

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670495

研究課題名(和文)造血幹細胞移植患者における生体内ウイルス集団(Virome)の解明

研究課題名(英文)Analysis of virome in patients with hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

木村 宏(Kimura, Hiroshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30303621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：小児に対する造血幹細胞移植では、様々なウイルス関連合併症が相次いで現れるため、ウイルス感染症制御が移植の成否の鍵を担っている。しかし、我々の目に触れているウイルス感染は、氷山の一角に過ぎない。本研究では、次世代シーケンサーより、包括的なウイルス遺伝子解析を行い、生体内ウイルス集団(Virome)を解き明かした。4例の造血幹細胞移植患者から経時的に末梢血を採取、MiSeqにより網羅的遺伝子解析を行ったところ、血液中から、TTウイルス、SENウイルス、ヒトヘルペスウイルス6B型などが検出され、これらウイルス動態と臨床経過が一致するなど興味深い結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In hematopoietic stem cell transplantation against children, it is essential to control a variety of viruses that sequentially emerge during transplantation. However, we can detect only small part of the iceberg. To clarify the genomes of all the viruses (so-called "virome") that inhabit patients with stem cell transplantation, we applied next generation sequencing (NGS) to peripheral blood from transplanted recipients. Peripheral blood was sequentially taken from 4 patients with hematopoietic stem cell transplantation, and comprehensive genome sequencing was performed using MiSeq. From patients' peripheral blood, TT virus, SEN virus, human herpesvirus 6B, and so on were detected by NGS. Interestingly, dynamics of viral load was correlated with clinical courses in some patients.

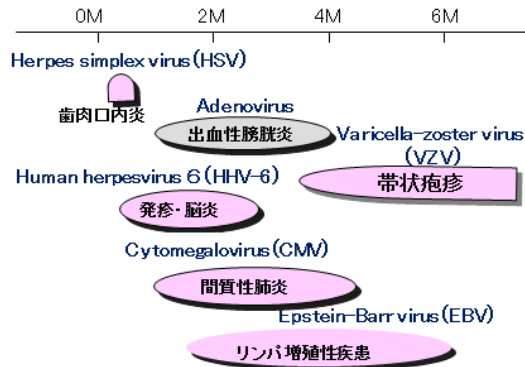
研究分野：ウイルス学

キーワード：ウイルス 造血幹細胞移植 次世代シーケンサー

### 1. 研究開始当初の背景

小児に対する造血幹細胞移植では、移植片や輸血を介した初感染が高頻度で起こり、潜伏ウイルスの再活性化も相まって、様々なウイルス関連合併症が相次いで現れる(図1)。ひとたび、ウイルス感染症が発症すると、それ自体が致命的になるだけでなく、拒絶・移植片体宿主病(GVHD)などの移植関連合併症を誘発する。よって、ウイルス感染症制御が移植の成否の鍵を担っていると言っても過言ではない。

図1 造血幹細胞移植後のウイルス関連合併症



これらウイルス感染症は、水疱、リンパ節腫脹、血尿、肺炎像といった臨床所見により診断されるか、もしくは疑われる。歴史的にも、特徴的な臨床徴候から、ウイルス関連合併症が発見・定義づけられてきた。しかし、既知のウイルスが思いも寄らない疾病の原因となっている場合、見過ごされてしまう。例として、移植後の大脳辺縁系脳炎の原因ウイルスが Human herpesvirus 6B(HHV6B)だとわかったのは、ごく近年のことである。更に、移植時は、未知のウイルス感染症が潜在している可能性が高く、我々の眼に触れているウイルス感染は、氷山の一角に過ぎない。

予てより、ウイルス検出技術として、細胞培養法と核酸検出法が用いられてきた。細胞培養法は、未知のウイルスを検出できるが、感度が悪く、細胞培養できるものに限定されるため、極めて限られたウイルスにしか応用できない。PCR法やLAMP法などの核酸検出法は、感度に優れ、遺伝子配列さえ分かればどんなウイルスにも応用可能である(Kimura H Rev Med Virol 2008)。我々はマルチプレックスPCR法を用い、造血幹細胞・臓器移植時に活性化する複数のウイルスを同時に検出・定量し、それらの病態解析・感染制御に役立ててきた(Wada K, J Clin Microbiol 2007; Funahashi Y, J Clin Microbiol 2010)。しかし、核酸検出法は、既知のウイルスにしか適用できない上、対象となるウイルスしか検出できないという問題点がある。

近年、次世代シーケンサー(NGS)の登場により、包括的な微生物叢(Microbiome)の

解析が可能となった。細菌に共通な16S rRNAを遺伝子増幅した後に、網羅的に塩基配列を読み取るメタゲノム解析により、ヒトの腸管や呼吸器のMicrobiomeが解明されつつある。一方、細胞に寄生し、宿主の転写/翻訳系を利用するウイルスは、16S rRNAを標的にできないため、独自のメタゲノム解析法が必要であった。

NGSを用いた網羅的遺伝子解析は、検体内に含まれるあらゆる核酸をすべて検出し、塩基配列を読み解く技術であり、宿主ゲノム解析に加えて、その中に含まれるウイルス・細菌の包括的解析も可能である。本研究では、NGSを用いて包括的なウイルス遺伝子解析を行い、以下の点を明らかにする。(1)造血幹細胞移植患者における既知のウイルスの動態、(2)移植患者における未知のウイルスの存在の有無、(3)ウイルスの共感染がもたらす相互作用、(4)これらのウイルスによる新たな移植関連合併症の発見とそのメカニズムの解明。

### 2. 研究の目的

今回我々は、NGSにより、移植患者の末梢血に存在するウイルス由来転写産物を包括的に解析する。NGSを用いることにより、以下が可能となる。(1)DNA/RNAウイルスを含むほぼ全てのウイルスを対象、(2)未知のウイルス遺伝子の検出、(3)血液に感染しているウイルスに限らず、組織由来エクソソームに存在するウイルス遺伝子も検出。これらにより、造血幹細胞移植時に潜在するウイルスが織りなす生物学的意義を明らかにしたい。

本研究の特色は、造血幹細胞移植という究極の免疫不全状態における、生体内のウイルス動態を解き明かすことにある。生体内の複数ウイルスによる共感染は、Viromeと呼ばれ近年注目を集めている。

移植後患者のViromeを明らかにすることで、以下の結果を導き出したい。移植時にはこれまで知られている以上に様々なウイルスが共感染していること、未知のウイルスを発見すること、既知のウイルスが思いもよらなかった感染症を引き起こしていること、生体内で増殖しているウイルスは単一ではなく多様で変異体の集団から形成されていること。

本研究で得られる知見は、学術的に極めて価値が高い上に、ウイルス感染症の発症予防・診断・新規治療確立に役立ち、臨床的な観点からも大きな意義がある。

### 3. 研究の方法

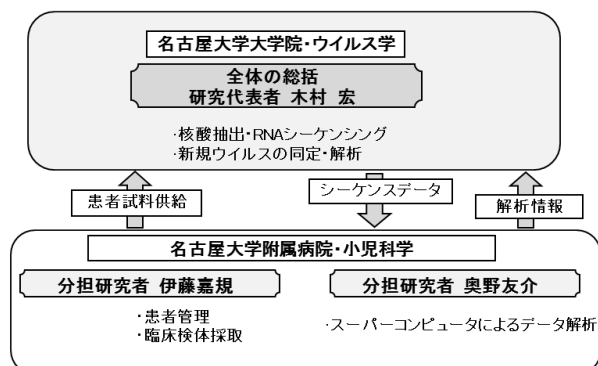
対象は名古屋大学医学部附属病院小児科に入院し、同種造血幹細胞移植を受けた小児。患者より全血2.5mLを採血後、DNA/RNAを抽出。Nextera DNA、TrueSeq RNAなどのキットを用いてライブラリーの作成を行った。その後、HiSeq Reagent Kitを用いて、

次世代シーケンサーによる全塩基配列の解読を行った(図2参照)



データ解析は国立感染症研究所が提供しているメタゲノム用パイプライン (MePIC) を用いて行った。読み取ったリードを、NCBI (National Center of Biotechnology Information) のデータベースに登録されているヒトおよびウイルス由来の核酸配列をリファレンス配列として、BLAT (Kent WJ, Genome Res 2002) でアラインメントした。各ウイルス遺伝子に貼り付いたリード数を、ウイルスを含まない検体のそれと比較し、特異度の高いウイルスの検出・定量を行った。

【研究体制】



上記に示した体制で、研究を実施した。ウイルス学教室は、検体の処理/核酸抽出/次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を担当した。研究代表者の木村 宏は全体を総括した。分担研究者である小児科学の伊藤嘉規は患者診療を行うと共に、患者材料を供給した。同じく分担研究者の奥野友介はスーパーコンピュータによるデータ解析を担当した。

患者材料の使用に当たっては、平成 25 年 4 月 1 日付一部改正「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、および平成 21 年 4 月 1 日付「臨床研究に関する倫理指針」に則り行実施した。また、患者もしくはその保護者に対して、十分な説明を施した上で、文書にてインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、個人情報の擁護に努めた。

4. 研究成果

造血幹細胞移植後の小児 4 症例に対して、それぞれ 3 ポイント、12 検体の末梢血を解析

した。末梢血中に検出された遺伝子断片、約 2000 万リード中、10~1000 リードがウイルス由来であった。以下にそれぞれの患者血液中に認められたウイルス由来遺伝子を示す。  
 症例 1: Torque teno virus (TTV), SEN virus (SEV), TTV-like minivirus, rotavirus  
 症例 2: TTV, SENV Epstein-Barr virus  
 症例 3: TTV, SENV, HHV6B, BK virus  
 症例 4: HHV6B

これらウイルス遺伝子のリード数の多寡、すなわちウイルス動態と臨床経過が一致するなど興味深い結果が得られた。また、ウイルスのみならず、細菌・バクテリオファージの遺伝子も血液中から検出された。細菌の検出は、血液培養の結果ともほぼ一致していた。一方、TTV や SEN などのウイルスが移植後患者血液中に存在することの意義については、今後の課題であり、NGS 解析による症例の蓄積が必要であろう。

小児に対する造血幹細胞移植では、様々なウイルス関連合併症が相次いで現れるため、ウイルス感染症制御が移植の成否の鍵を担っている。しかし、我々の眼に触れているウイルス感染は、氷山の一角に過ぎない。NGS を用いることで、網羅的なウイルス検出および定量が可能である。本法により造血幹細胞移植患者における生体内のウイルス動態を解き明かすことができるのみならず、将来的には、ウイルス・細菌・真菌感染の診断法としても有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Ito Y, Suzuki M, Kawada J, Kimura H. Diagnostic values for the viral load in peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic active Epstein-Barr virus disease. J Infect Chemother. 22(4):268-71, 2016. 10.1016/j.jiac.2015.11.002. 査読有り
2. Kawashima N, Muramatsu H, Okuno Y, Torii Y, Kawada J, Narita A, Nakanishi K, Hama A, Kitamura A, Asai N, Nakamura S, Takahashi Y, Ito Y, Kojima S. Fulminant adenovirus hepatitis after hematopoietic stem cell transplant: Retrospective real-time PCR analysis for adenovirus DNA in two cases. J Infect Chemother 21(12):857-63, 2015. 10.1016/j.jiac.2015.08.018. 査読有り
3. Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, Takahashi Y, Kojima S. Choreito formula for BK virus-associated

hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 21(2):319-25, 2015.

10.1016/j.bbmt.2014.10.018. 査読有り

4. 木村 宏. JHIF のあゆみ 診断・検査. Herpes Management 18( 1 ): 11-12, 2015. 査読無し
5. 木村 宏. 移植後ヘルペスウイルス感染症 Up-to-date : EB ウイルス. 臨床とウイルス 43(5): 254-260, 2015. 査読無し
6. 木村 宏. サイトメガロウイルス・Epstein-Barr ウイルス. 感染症診断の新たなツール、柳原 克紀 編. 化学療法の領域、増刊号. 医薬ジャーナル社, 151-156, 2015. 査読無し
7. Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, Takahashi Y, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. J Pediatr Hematol Oncol. 2014 Jan;36(1):e65-8. 10.1097/MPH.0000000000000008. 査読有り
8. Nagata K, Higaki K, Nakayama Y, Miyauchi H, Kiritani Y, Kanai K, Matsushita M, Iwasaki T, Sugihara H, Kuwamoto S, Kato M, Murakami I, Nanba E, Kimura H, Hayashi K. Presence of Epstein-Barr virus-infected B lymphocytes with thyrotropin receptor antibodies on their surface in Graves' disease patients and in healthy individuals. Autoimmunity 47:193-200, 2014. 10.3109/08916934.2015.1022163. 査読有り

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 川田潤一、鳥居ゆか、堀場千尋、安藤将太郎、鈴木高子、神谷泰子、伊藤嘉規. 次世代シーケンサーを用いた急性脳症・脳炎患者からの網羅的ウイルス検出の試み. 第 47 回日本小児感染症学会, ザ・セレクトン福島、福島県福島市、2015 年 10 月 31 日
2. 木村 宏. 感染症関連ガイドライン: これまでとこれから ヘルペスウイルス感染症. 第 47 回日本小児感染症学術集会 シンポジウム, ザ・セレクトン福島、福島県福島市、2015 年 10 月 31 日
3. 伊藤嘉規、鈴木道雄、川田潤一、木村 宏. 慢性活動性 EB ウイルス感染症における

診断的意義のある末梢血単核球分画中ウイルス DNA 量の解析. ザ・セレクトン福島、福島県福島市、2015 年 10 月 31 日

4. Kawada JI, Torii Y, Suzuki M, Murata T, Yoshiyama H, Kimura H, Ito Y. EBV infection of human monocytes induces AIM2 inflammasome activation. 40th International Herpesvirus Workshop, Boise, USA, 2015/07/29
5. Ando S, Kawada JI, Suzuki M, Watanabe T, Torii Y, Murata M, Kimura H, Ito Y. Antitumor activity of Tofacitinib on Epstein-Barr virus-associated lymphoma cells. 40th International Herpesvirus Workshop, Boise, USA, 2015/07/29
6. 木村 宏. 新生児、乳児への抗ウイルス療法: 単純ヘルペスウイルス感染症. 第 63 回日本化学療法学会学術集会 シンポジウム, 京王プラザホテル新宿、東京、2015 年 6 月 4 日
7. Kawada JI, Suzuki M, Torii Y, Kawano Y, Kotani T, Kikkawa F, Kimura H, Ito Y. Oral valganciclovir for congenital cytomegalovirus infection identified on newborn hearing screening. The 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, Japan. 2014/7/20
8. 伊藤嘉規, 河野好彦, 鳥居ゆか, 安藤将太郎, 神谷泰子, 鈴木道雄, 川田潤一, 木村宏. 国際標準物質を用いた Epstein-Barr ウイルス・サイトメガロウイルス定量 PCR 系の標準化. 第 88 回日本感染症学会・第 62 回日本化学療法学会合同学会, ヒルトン福岡シーホーク、福岡県福岡市, 2014 年 6 月 18 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

木村 宏 (KIMURA Hiroshi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 30303621.

### (2)研究分担者

奥野 友介 (OKUNO Yusuke)  
名古屋大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号: 00725533.

伊藤 嘉規 (ITO Yoshinori)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 20373491.

### (3)連携分担者

なし

### (4)研究協力者

川田 潤一 (KAWADA Jun-ichi)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教