

平成 21 年 5 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591255
 研究課題名（和文） 慢性活動性EBウイルス感染症の感染細胞特性と治療に関する研究
 研究課題名（英文） Therapeutic strategy and biological characterization of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in chronic active EBV infection
 研究代表者
 大賀 正一（OHGA SHOUICHI）
 九州大学・大学病院・准教授
 研究者番号：60233053

研究成果の概要：

慢性活動性EBウイルス感染症（Chronic active Epstein-Barr virus infection: CAEBV）の治療法確立をめざして、EBV持続感染細胞（T/NK細胞）の特性と患児の治療成績について解析した。造血幹細胞移植が唯一の根治療法である本症の3大合併症は、神経、心血管および腸管病変である。患者のEBV感染細胞特性（T型、NK型、clonality、活性化マーカーなど）について高発現遺伝子を中心に網羅的に解析したが、病勢の進行と予後を予測することは困難であった。神経合併症については、神経症状のない時期から脳脊髄液にEBV量が上昇している例があり、末梢血より脳脊髄液でEBV量の多い例も確認できた。患児の髄液に細胞増多のみられたものはなく、cell free EBV DNAが中枢神経におけるEBV再活性化と感染細胞の浸潤を予測する可能性が示唆された。心合併症については、心血管病変の合併が60%と高く、このうち冠動脈病変が最も多いこと、そしてこれが予後不良因子であることが示された。さらに造血幹細胞移植後、感染細胞が排除された症例では冠動脈病変が消失することも確認した。EBV関連性血球貪食症候群とCAEBVの移植成績を文献報告し、骨髄非破壊的移植と非血縁臍帯血移植をうまく選択することが治療成績向上に結びつくことを報告した。今回の結果から、CAEBV患者は、発熱と血球減少に注意しながら観察し、中枢神経および心血管合併症が出現する前に速やかに造血幹細胞移植を行うことが重要であることが示唆された。移植源に応じた前処置の方法を今後の前向き調査により明らかにすることが必要である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性Epstein-Barr virus (EBV)感染症 (CAEBV)の患者は、T細胞またはNK細胞にウイルス量が多く、健常感受性者の感染様式と

異なる。患児の生命予後はT細胞型のほうがNK細胞型よりも不良とされていた。しかし、長期の全国調査から82例の15年生存率は29%それ以降には10%程度とさがり、両型の生命予後には差が無くいずれも同種造血幹

細胞移植が唯一の根治療法と認識されるようになった。その主な死亡原因は、中枢神経系、心血管系および腸管の3大合併症による臓器不全、あるいは経過中に続発する血球貪食症候群やリンパ腫による。病理学的には、全身に浸潤する非腫瘍性EBV感染T細胞・NK細胞が臓器傷害を引き起こすと考えられる。しかし、感染細胞の種類やクローン増殖の有無がどのように臨床経過と関連するののかについて明らかではない。CAEBV患者に対する移植の成績は不良であり治療関連死も多い。さらにEBV感染T/NK細胞が確認される皮膚以外に浸潤のない種痘様水疱症患者の長期予後にも不明な点が多い。

2. 研究の目的

このような背景から、日本、台湾、韓国などアジアに多い本症患者の病期に応じた治療法を確立することは急務である。CAEBV患者における感染細胞の特性を解析し、とくに経過中の特徴的な合併症の種類と重症度との関連を検討して、病期に基づいた治療戦略を提示する。

3. 研究の方法

下記の概要に従って段階的に解析を進めた。

(1) CAEBVの診断基準(Okano et al. Am J Hematol, 2007)を満たす患児、種痘様水疱症、蚊刺過敏症患者を無治療観察群、免疫療法群、およびがん化学療法群にわけた。

(2) 末梢血のEBV-DNA量が最も多い細胞亜群を同定し、CD69, HLA-DRなど活性化抗原の発現から活性化の程度を評価する。脳脊髄液(CSF)、骨髄細胞についても検討する。感染細胞移入実験のため、可能な患者について感染細胞株を樹立する。

(3) 感染細胞を高純度に分画し、遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析し、高発現遺伝子をreal-time PCRで定量確認する。

(4) 各患者の臨床経過を整理し、主たる感染細胞の特性と重症度の関係を検討する。

4. 研究成果

(1) 患者の主たる感染細胞特性

15歳未満発症のCAEBV15例を対象として解析した。男女比は7:8、T細胞型10例(うちT細胞感染2例)、NK細胞型3例。発症年齢の中央値は6.3歳。EBV DNA定量は、全血1mlあたり中央値950 copy(範囲200~50000)であった。同種造血細胞移植の成功した3例が無病生存であった。皮膚病変のみの2例(1例T細胞型、1例NK細胞型)と血球減少のみの1例は診断からは5年以上無治療生存であった。

(2) EBV感染T/NK細胞の解析

種痘様水疱症のみで無治療生存であるが、

EBV感染V9V2T細胞がクローン増殖している患児について検討した。非感染T細胞と感染T細胞の遺伝子発現を比較した。対照として、健常人T細胞(EBV非感染)、Salmonella感染症患者T細胞(EBV非感染)を用いて遺伝子発現を比較した。EBV感染T細胞に高発現でSalmonella反応性細胞にも高発現の遺伝子をT細胞特異的、またEBV感染T細胞に高発現だがSalmonella反応T細胞には低発現の遺伝子をEBV特異的として、EBV感染活性化T細胞に高発現の遺伝子群を検討したが、有意な結果は得られなかった。患児は経過に従ってこのT細胞の活性化が強くなったが病勢は進行していない。無治療5年以上観察中の2例を含む3例のEBV感染T/NK細胞株を樹立した。

(3) 神経合併症

患児の神経症状とCSF EBVについて検討した。9例のCSF中のEBV DNAを定量したが、細胞増多はなかった。CAEBV例は全例末梢血のEBV DNAが高いが、この9例のうち4例のCSF EBV DNA量は200 copy/ml未満であった。神経学的異常(けいれんなど神経学的症状あり、かつ/または画像診断異常あり)を呈した3例はCSF中にEBV DNA量が多かった(Table 1)。そのうち症例3では、CSFのコピー数が末梢血のコピー数をこえていた。対照とした2例のEBV急性脳炎の2例では、CSFにEBVが検出できたが末梢血では感度未満であった。

(4) 心血管系合併症

中央値8年(範囲2~20年)の観察期間に心血管系の定期検査を行い、9例(60%)に心血管合併症がみられた。冠動脈病変(4例, 44%)、左室駆出率低下と心嚢液貯留(3例, 33%)、完全房室ブロック(1例)そして突然の心停止(1例)であった。心血管合併症のあった患者は、なかった患者に比較して経過中に発熱(78%, $p=0.04$)と血球減少(100%, $p=0.01$)の頻度が高かった。CAEBVの発症から冠動脈病変発症までは、中央値3.4年(範囲, 1.8~8.6年)であった。平均z-scoreは3.98に上昇していた。心血管合併症を有した7例(78%)は、疾患増悪かつ/または移植関連により死亡した。同種臍帯血移植の成功した2例では冠動脈病変が消失した(Figure 1)。

(4) 考察

患者の感染細胞特性(T型、NK型、clonality、活性化マーカー)から病勢の進行と予後を予測することは難しく、病勢指標となる高発現遺伝子は明らかではなかった。しかし、CSFでのcell free EBV DNAがEBV感染T細胞NK細胞の中枢神経浸潤を予測できる可能性が示唆された。心血管病変の合併は60%と高く、このうち冠動脈病変が最も多いこと、そして

てこれが予後不良因子であることが示唆された。さらに造血幹細胞移植後、感染細胞が排除された症例では冠動脈病変が消失することが示された。CAEBV 患者の造血幹細胞移

植は、発熱と血球減少に注意しながら観察し、中枢神経および心合併症が出現する前に速やかに施行することが必要である。

Table 1. Epstein-Barr virus (EBV) load in cerebrospinal fluid in patients with chronic active EBV infection

Pt	Sex	Age (yrs) at diag.,exam.	Clinical/Laboratory finding at diagnosis	Cell type	Peripheral blood (copies/ml)	CSF	WBC (/μl)	poly. (%)	Prot. (mg/dl)	Glu. (mg/dl)	Blood glucose	CAL/ glucose carditis	Neurologic/ neuroimaging abnormality	SCT (yrs of age)	Death (yrs of age)
CAEBV															
1	f	10	16	C,HpSp, High-Abs	γδT	positive	<1	na	50	35	97	yes	Yes / Yes	no	18
			18			200000	2	na	40	39	87				
			18			300000	<1	na	50	46	98				
2	m	6	12	F,C,Sp, High-Abs	T	3000	3	na	19	41	85	yes	Yes / Yes	14	14
3	f	7	7	F,C,Hp,Sp, High-Abs	T	800	0	na	26	33	82	yes	Yes / No	8	8
4	m	6	17	C,Hp,Sp,HMB	T	200	2	na	11	55	74	yes	Yes / No	17	18
5	m	6	10	F,C,Hp,Sp	T	50000	1	na	14	84	138	yes	No	11	ADF (15)
6	f	4	5	F,C,Hp,Sp,HMB, High-Abs	NK	500	1	0/100	22	37	85	yes	No	5	ADF (7)
7	m	2	5	F,Hp,Sp, High-Abs	T	1000	0	0/0	11	45	83	no	No	5	ADF (5)
8	m	8	8	F,Sp,HMB	NK	800	<1	na	26	55	na	no	No	no	AOD (13)
9	f	11	19	F,C,HMB, High-Abs	NK	800	<1	na	25	51	86	yes	No	no	19
Acute encephalomyelitis with EBV-reactivation															
10	f	15	15			<200	2000	57	6/94	83	36	98	Yes / Yes	no	ADF
11	f	13	13			<200	200	141	1/99	36	54	115	Yes / Yes	no	ADF
Control: aseptic meningitis* (n=10)															
						<200	<200	468	9/91	51	57	97			

* Each CSF profile represents the median of 10 samples.

m: male, f: female, F: fever, C: cytopenia, Hp: hepatomegaly, Sp: splenomegaly, HMB: hypersensitivity to mosquito bites, High-Abs: abnormally high titers of EBV-antibodies, CSF: cerebrospinal fluid, PB: peripheral blood, WBC: white blood cell number in CSF, Prot: protein concentration in CSF, Glu: glucose concentration in CSF, CAL: coronary artery lesion, SCT: stem cell transplantation, na: not assessed, AOD: alive on disease, ADF: alive on disease-free state

(文献 より)

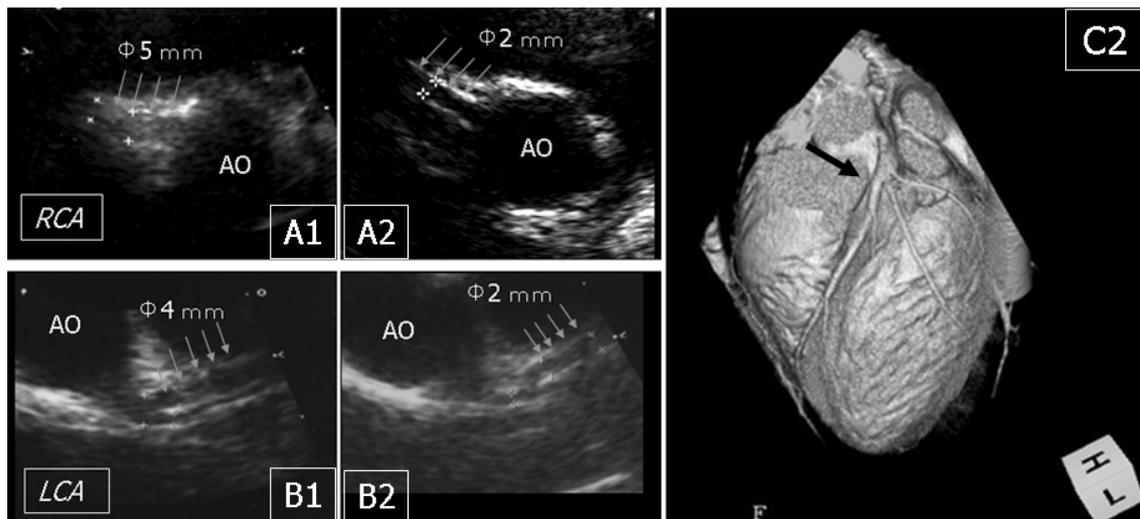


Figure. 1 移植前後 (患者 A1 A2, 患者 B1 B2) の超音波検査による冠動脈病変の変化 (矢印)。C2 は患者 A の移植後の multislice spiral computed tomography による病変の消失 (矢印)。

(文献 より)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

Suzuki N, Morimoto A, Ohga S, Kudo K, Ishida Y, Ishii E: Characteristics of hemophagocytic lymphohistiocytosis in neonates: a nationwide survey in Japan. J Pediatr 査読有 2009 in press

Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Ikeda K, Yamaguchi K, Nomura A, Takada H, Abe Y, Hara T: Cardiovascular complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. Pediatr Cardiol 査読有 2009 in press

Katsuragi S, Ohga S, Horiuchi H, Hara T, Terao K, Ikeda T: Neonatal onset hemophagocytic lymphohistiocytosis in a premature infant. Pediatr Blood Cancer 査読有 2009 in press

Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T: Epstein-Barr virus load in cerebrospinal fluid of patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. Pediatr Infect Dis J 査読有 27, 2008, 1027 - 1030

Kosaka Y, Yagasaki H, Sano K, Kobayashi R, Ayukawa H, Kaneko T, Yabe H, Tsuchida M, Mugishima H, Ohara A, Morimoto A, Otsuka Y, Ohga S, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S: Prospective multicenter trial comparing repeated immunosuppressive therapy with stem cell transplantation from an alternative donor as second-line treatment for children with severe and very severe aplastic anemia. Blood 査読有 111, 2008, 1054 - 1059

Takada H, Ishimura M, Inada H, Ohga S, Kusuhara K, Moroi Y, Furue M, Hara T: Lipopolysaccharide-induced monocytic cell death for the diagnosis of mild neonatal-onset multisystem inflammatory disease. J Pediatr 査読有 152, 2008, 885 - 887

Nagatomo T, Muta K, Ohga S, Ochiai M, Ohshima K, Hara T: Insulin-like growth factor-II: a novel autocrine growth factor modulating the apoptosis and maturation of umbilical cord blood erythroid progenitors. Exp Hematol 査読有 36, 2008, 401 - 411

Ohga S, Ideguchi H, Kato J, Ishimura M, Takada H, Harada N, Kawanaka H, Hattori Y, Kang D, Hamasaki N, Hara T: Thromboembolic complications in splenectomized patients with dominantly inherited beta-thalassemia. Acta

Haematol- Basel 査読有 120, 2008, 31 - 35

Sato E, Ohga S, Kuroda H, Yoshida F, Nishimura M, Nagasawa M, Inoue M, Kawa K: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/ NK-cell lymphoproliferative disease in Japan. Am J Hematol 査読有 83, 2008, 721 - 727

Sanefuji M, Ohga S, Kira R, Nomura A, Torisu H, Takada H, Kusuhara K, Hara T: Epstein-Barr virus associated encephalomyelitis: Intrathecal reactivation of the virus in an immunocompetent child. J Child Neurol 査読有 50, 2008, 723 - 726

Ohga S, Ichino K, Urabe K, Ishimura M, Takada H, Nishikomori R, Furue M, Hara T: Early-onset sarcoidosis mimicking refractory cutaneous histiocytosis. Pediatr Blood Cancer 査読有 50, 2008, 723 - 726

Hoshina T, Yamaguchi Y, Ohga S, Kira R, Ishimura M, Takada H, Tanaka T, Hara T: Sjogren's syndrome-associated meningo- encephalomyelitis: cerebrospinal fluid cytokines levels and therapeutic utility of tacrolimus. J Neurol Sci 査読有 267, 2008, 182 - 186

Nagafuji K, Nonami A, Kumano T, Kikushige Y, Yoshimoto G, Takenaka K, Shimoda K, Ohga S, Yasukawa M, Horiuchi H, Ishii E, Harada M. Perforin gene mutations in hemophagocytic lymphohistiocytosis with late-life onset. Haematologica 査読有 92, 2007, 978 - 981

Ishii E, Ohga S, Imashuku S, Yasukawa M, Tsuda H, Miura I, Yamamoto K, Horiuchi H, Takada K, Ohshima K, Nakamura S, Kinukawa N, Oshimi K, Kawa K: Nation-wide survey analysis of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan. Int J Hematol 査読有 86, 2007, 58 - 65

Hayashida M, Ogita K, Matsuura T, Takahashi Y, Nishimoto Y, Ohga S, Hara T, Soejima Y, Taketomi A, Maehara Y, Kohashi K, Tsuneyoshi M, Taguchi T: Successful prolonged rituximab treatment for post-transplant lymphoproliferative disorder following living donor liver transplantation in a child. Pediatr Transplant 査読有 11, 2007, 671 - 675

[学会発表](計7件)

Ohga S, Kudo K, Morimoto A, Honjo S, Osugi Y, Inoue M, Tabuchi K, Suzuki N, Ishida Y, Kawa K, Imashuku S, Hara T, Kato S, Ishii E: Clinical outcomes of stem cell transplantation for childhood hemophagocytic lympho- histiocytosis in Japan. The 4th JSPS-NRCT Hematology Workshop by Asian CORE Program. February 20, 2009, Bangkok, Thailand

Ohga S, Kudo K, Osugi Y, Sawada A, Tabuchi K, Suzuki N, Morimoto A, Ishida Y, Kato S, Ishii E: Hematopoietic stem cell transplantation for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis or Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lympho- histiocytosis in Japan. The 24th Annual Meeting of Histiocyte Society. October 1~3, 2008, Berlin, Germany

Morimoto A, Ishii E, Ohga S, Kudou K, Ishida Y, Suzuki N: Nationwide survey of single system single site Langerhans cell histiocytosis in Japan. The 24th Annual Meeting of Histiocyte Society. October 1~3, 2008, Berlin, Germany

Ohga S, Sanefuji M, Ishimura M, Nomura A, Torisu H, Kira R, Takada H, Mizuno Y, Kazuyama Y, Hara T: Central nervous system reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in chronic active EBV infection and EBV-associated encephalitis. The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research. October 7~8, 2007, Tokyo, Japan

Muneuchi J, Ohga S, Ishimura M, Yamawaki K, Kanaya Y, Takada H, Hara T: Clinical outcomes of cardiac complications associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. The 3rd Congress of Asian Society for Pediatric Research. October 7~8, 2007, Tokyo, Japan

Ohga S, Maeda A, Kimura H, Kawa K, and Wakiguchi H: Chronic active Epstein-Barr virus infection (CAEBV): the nationwide survey in Japan. The 2nd Workshop of Asian Hematology in Bangkok, JSPS Asian CORE program. October 31st, 2007, Bangkok, Thailand

大賀正一、前田明彦、木村宏、森尾友宏、今井章介、岡野素彦、金兼弘和、河敬世、土屋滋、森雅亮、森本哲、谷内江昭宏、岡村隆行、脇口宏：慢性活動性 EB ウイルス感染症の病態と予後。第 14 回ヘルペス感染症フォーラム 14th JHIF Panel Discussion 2007 年 8 月 24 ~ 25 日 札幌

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大賀 正一 (OHGA SHOUICHI)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：60233053

(2)研究分担者

宮本 敏浩 (MIYAMOTO TOSHIHIRO)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：70343324

田中 珠美 (TANAKA TAMAMI)
九州大学・医学研究院・学術研究員
研究者番号：60423547