

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17352

研究課題名（和文）移植後リンパ増殖性疾患の発症に関わる細胞疲弊の研究

研究課題名（英文）Immune escape and exhaustion attributing to development of PTLD

研究代表者

山田 全毅（Masaki, Yamada）

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・高度感染症診断部・医長

研究者番号：30445316

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：EBV関連リンパ増殖性疾患（LPD）はEBV感染細胞の異常増殖により引き起こされる疾患群である。中でも移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）は、免疫抑制薬の使用によるT細胞の機能不全に起因すると考えられている。そこで本研究では、まずPTLD様の病態を動物モデルで再現しその細胞疲弊に関連した免疫監視機構の破綻を再現することを試みた。しかしながら、ヒト化マウスモデルでは、EBV特異的T細胞の誘導や、細胞疲弊を再現することができず、方針転換を余儀なくされた。そこでヒト末梢血単核細胞を用いて、シングルセルRNA解析を実施し、ヒト末梢血中におけるEBV感染細胞の性質を解析する実験系の確立を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児移植患者における移植後リンパ増殖性疾患の病態およびそれと関連した危険因子の解明を目指した研究である。病態の解明やより優れた診断マーカーの発見に寄与しうる実験系の開発を行った。高度先進医療である移植治療を受けたのちに、合併症を制御し患者予後を改善するために重要な研究である。

研究成果の概要（英文）：EBV-associated lymphoproliferative disorders (LPD) are a group of disorders caused by the abnormal proliferation of EBV-infected cells. Among them, post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) is thought to result from T-cell dysfunction due to the use of immunosuppressive agents. In this study, we attempted to create a PTLT model using humanized mice and elucidate the immune surveillance mechanisms related to T-cell exhaustion. However, in this model, EBV-specific T cells and replicate T-cell exhaustion were not appropriately reproduced, forcing a change in our approach. Consequently, we aimed to establish an experimental system using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to conduct single-cell RNA analysis and analyze the properties of EBV-infected cells.

研究分野：感染免疫学

キーワード：EBV 小児 固形臓器移植 細胞疲弊

## 研究成果報告

### 1. 研究計画申請時の背景

- ① ヘルペスウイルス科に属する、Epstein-Barr virus (EBV) は 90%以上の健常成人に感染している一般的なウイルスである。免疫の正常な小児ないし成人では、EBVの再活性化や、潜伏感染細胞の増殖がおこることはまれであるが、様々な疾患に対する、免疫抑制薬・調節薬の普及に伴い、免疫抑制状態にある小児や成人に発症する慢性 EBV 感染症やこれに続発するリンパ増殖性疾患 (LPD) が生命予後を決定する大きな問題となっている。なかでも 移植後リンパ増殖性疾患 (PTLD) は、固形臓器および骨髄移植後患者に発症する致死的な難治性 EBV 関連合併症のひとつであるが、多くの患者が感染する EBV に比して、なぜ一部の患者にのみ PTLD を発症するのか、など詳細な発症機序は不明である。LPD の発症と免疫応答は密接に関連しており、EBV 感染細胞の排除に必要な免疫細胞の欠如や機能不全は LPD 発症リスクを上昇させる。
- ② 細胞疲弊は、活性化 T 細胞などの表面に発現する共抑制分子すなわち Programmed Death 1 (PD-1)などを介した抑制系シグナルにより引き起こされる細胞機能の低下ないし消失をさす。細胞疲弊は、固形腫瘍や慢性ウイルス感染が引き起こす過剰な抗原暴露やこれらの疾患に続発する慢性炎症、恒常性サイトカインの欠如、などが相乗しておこる。また PTLD 組織中の EBV 感染 B 細胞がより少クローン性に増殖するにつれ、PD-1 のリガンドである Programmed death ligand 1 (PD-L1) の発現が増加することが知られる。これらは細胞疲弊が PTLD の発症機序に関与する可能性を強く支持するものである。

### 2. 目的

- ① EBV 感染細胞が腫瘍性増殖する過程で、PD-L1などを介して、細胞疲弊に寄与する機序を解明しする、
- ② 細胞疲弊と PTLD 発症の関係から、免疫チェックポイント分子の発現を PTLD の早期診断・治療マーカーとして用いる実用性を検討する。

### 3. 研究の方法および結果

- ① 臨床検体を用いた EBV 感染細胞における PD-L1 の発現解析  
PTLD 患者から得た臨床検体を用いて末梢血 B 細胞の表面分子の発現状態を解析し、PD-L1 の発現は濾胞性 B 細胞に偏向することを発見した。一例のみの解析であったため、一般化できるかどうかの評価は実現できなかったが、特定の B 細胞の形質変化が PTLD の早期診断に寄与する可能性が示唆された。
- ② 臨床検体を用いた細胞疲弊の解析  
慢性 EBV 感染状態にある小児移植患者の末梢血 T 細胞の解析から、EBV ウイルス量や、臓器移植の種類が細胞疲弊の深度に関与することを示した。

③ EBV 感染マウスモデルによる PTLD モデルの作成

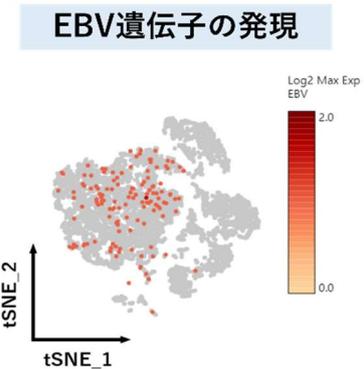
ヒト化マウスモデルを用いて EBV 感染動物モデルを作成し、LPD 発症のモデル化とその過程における免疫応答の評価系の作成を試みた。経時的に EBV 感染人かマウス内に生着した T 細胞の形質を解析したところ、LPD 発症前より極端にレパートリーの偏った疲弊 T 細胞が増加していた。この現象は、EBV 非感染モデルでも観察されたことから、継続的に異種抗原に暴露されるヒト化マウスでは T 細胞の分化増殖が、非生理的な状態にあると判断し、本モデルによる PTLD の病態解析は困難であると結論付けた。

④ EBV 感染細胞の解析を実現する解析系の確立

上にのべたように、ウイルス感染、免疫応答の動物モデル化が困難な病態であると考えられたため、臨床検体における病態解析が必要と考え、新規技術を応用し、EBV 感染細胞の特徴を探索した。本研究では解析技術の確立までを行ったが、今後これらの技術を応用し病態解明研究に応用する予定である。

I. シングルセル RNA シークエンス解析を用いた EBV 感染細胞の検出

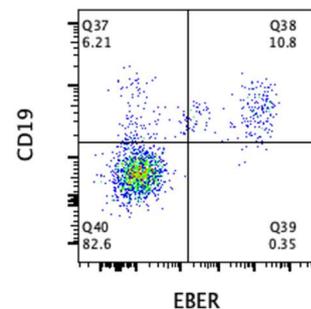
細胞内に存在する EBV の遺伝子配列を検出することで、EBV 感染細胞を同定し、かつそれらの性状を解析できる系の開発を目指した。臨床検体においても EBV 感染細胞の検出が可能であった一方で、その感度は、下に述べる別法に比べ劣っており、EBV 感染細胞と非感染細胞の遺伝子発現解析では、両者に差を認めなかった。病態解析に応用するためには、EBV 関連遺伝子の検出感度を上げる必要があると結論付けた。



II. Flow-FISH による EBV 感染細胞の検出

特定の遺伝子配列に対する DNA probe と蛍光分子の組み合わせによる、Flow-FISH を用いて EBV 感染細胞の同定を行った。RNA シークエンスに比べ、細胞生物学的な情報の量は限られるが、EBV 感染細胞の検出感度は優れていることが分かった。

FlowFISHによる EBV感染細胞の検出



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamada Masaki, Shoji Kensuke, Miyairi Isao, Kasahara Mureo, Saitoh Akihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Pediatric Infectious Diseases Related to Transplantation: Insights From Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 e18 ~ e25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000003731	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Masaki, Sakamoto Seisuke, Sakamoto Kenichi, Uchida Hajime, Shimizu Seiichi, Osumi Tomoo, Kato Motohiro, Shoji Kensuke, Arai Katsuhiro, Miyazaki Osamu, Nakano Noriyuki, Yoshioka Takako, Fukuda Akinari, Kasahara Mureo, Imadome Ken Ichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Fatal Epstein Barr virus associated hemophagocytic lymphohistiocytosis with virus infected T cells after pediatric multivisceral transplantation: A proof of concept case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Transplantation	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ptr.13961	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Masaki, Nowalk Andrew, Green Michael	4. 巻 1
2. 論文標題 Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Emerging Transplant Infections	6. 最初と最後の頁 1 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-3-030-01751-4_27-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamada Masaki, Fukuda Akinari, Ogura Miyuki, Shimizu Seiichi, Uchida Hajime, Yanagi Yusuke, Ishikawa Yuri, Sakamoto Seisuke, Kasahara Mureo, Imadome Ken-Ichi	4. 巻 107
2. 論文標題 Early Detection of Epstein-Barr Virus as a Risk Factor for Chronic High Epstein-Barr Viral Load Carriage at a Living-donor?dominant Pediatric Liver Transplantation Center	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Transplantation	6. 最初と最後の頁 1322 ~ 1329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/TP.0000000000004429	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Masaki, Macedo Camila, Louis Kevin, Shi Tiange, Landsittel Douglas, Nguyen Christina, Shinjoh Masayoshi, Michaels Marian G., Feingold Brian, Mazariegos George V., Green Michael, Metes Diana	4. 巻 23
2. 論文標題 Distinct association between chronic Epstein-Barr virus infection and T cell compartments from pediatric heart, kidney, and liver transplant recipients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Transplantation	6. 最初と最後の頁 1145 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajt.2023.05.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山田全毅
2. 発表標題 EBV infection and post-transplant lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation
3. 学会等名 日本移植学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田全毅
2. 発表標題 Diagnosis and treatment of lymphoproliferative diseases after pediatric liver transplantation
3. 学会等名 China Advanced academic program for organ Transplantation & its cutting-edge research (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田 全毅
2. 発表標題 Epidemiology and risk factors of Epstein-Barr virus high load carriage following pediatric liver transplantation
3. 学会等名 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田全毅、阪本靖介、今留謙一、笠原群生
2. 発表標題 肝・小腸移植後に発症した難治性EBV関連血球貪食リンパ組織球症の一例
3. 学会等名 日本移植学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 日本小児感染症学会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 80
3. 書名 慢性活動性EBウイルス病とその類縁疾患の診療ガイドライン2023	

1. 著者名 一般財団法人日本移植学会Transplant Physician委員会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 ぱーそん書房	5. 総ページ数 266
3. 書名 必携 内科医のための 臓器移植診療ハンドブック	

1. 著者名 Masaki Yamada, Andrew Nowalk, Michael Green	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature Switzerland	5. 総ページ数 16
3. 書名 Epstein-Barr Virus and Posttransplant Lymphoproliferative Disorders, Emerging Transplant Infections	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------