

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06412

研究課題名(和文)重症熱性血小板減少症候群の病態形成機序の核心解明を目指したネコ症例の病理学的解析

研究課題名(英文)Histopathological analysis of feline cases of lethal SFTS

研究代表者

坂井 祐介 (Sakai, Yusuke)

国立感染症研究所・感染病理部・主任研究官

研究者番号：60615722

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、致死的な重症熱性血小板減少症候群(SFTS)を発症し斃死したネコの剖検例の病理組織学的解析を行った。この結果、(1)SFTS症例のリンパ系組織ではT細胞の外因系経路によるアポトーシスが顕著であること、(2)活性化胚中心細胞の減少が著しく、胚中心活性化反応が抑制されていること、(3)これら2つの反応は血清中の抗SFTS抗体価と負の相関を示すことを明らかにした。また、(4)SFTS症例で特徴的な異型リンパ球には細胞生存・細胞死抑制因子であるBcl-xL、Mcl-1が発現していること、(5)SFTS症例の骨髓巨核球には自己抗体が沈着していること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低い抗SFTS抗体価は重症SFTS患者の特徴であること、SFTS患者では免疫機能低下による二次感染も問題となっていることから免疫機能低下の原因の解明は重要であり、本研究ではT細胞の顕著なアポトーシスと胚中心の形成不全という現象がその根底にあることを解明できた。現象の具体化は創薬のための分子的メカニズムの解明を進めるのに必須であり、将来的にSFTS発症時の免疫機能を正常化する治療法の開発につながる基盤となると言える。また、異型リンパ球はSFTSウイルス増殖の場であり、その増生・維持に関わる因子を特定できたことは異型リンパ球を標的とした創薬につながる知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed histopathological analysis of feline cases of lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTS). We clarified that massive apoptosis by extrinsic pathway in T-lymphocyte and depletion of activated germinal center B-lymphocyte in the lymphoid organs of SFTS cases. Further analysis showed these phenomena correlated with serum anti-SFTS virus antibody titer. These results suggested remarkable decrease of active T- and B-lymphocytes is one possible cause of necrotic change of lymphoid organs and dysregulated immunity in the patients of SFTS. We also demonstrated expression of pro-survival and anti-apoptotic factor Bcl-xL and Mcl-1 in atypical lymphocyte, a characteristic cell type in SFTS patients. Because the atypical lymphocyte is a target of SFTS virus and the site of viral replication, these factors promote viral replication by preserving atypical lymphocytes. Further, we demonstrated antibody deposition in the marrow megakaryocytes.

研究分野：獣医病理学

キーワード：重症熱性血小板減少症候群 人獣共通感染症 ネコ 獣医病理学 ウイルス学 感染病理学 病理学

## 1. 研究開始当初の背景

重症熱性血小板減少症候群(SFTS)は2011年に確認された新興感染症であり、ブニヤウイルス科フェヌイウイルス属のSFTSウイルス(SFTSV)により引き起こされる。血小板減少や白血球減少を伴う高熱、消化器症状、出血傾向を主要症状とし、致死率は6~30%に達する重要な感染症である。組織学的には、諸臓器の出血、SFTSV感染標的細胞と考えられる異型リンパ球の集積、消化管潰瘍、壊死性リンパ節炎などが特徴とされる。このようにSFTSは非常に特徴的な組織病変を引き起こすが、その病態形成機序については不明な点が多い。血小板減少はなぜ生じるのか、リンパ系組織に広範な細胞死が生じるのはなぜか、感染標的細胞である異型リンパ球の維持機構、といった核心部分についてもほとんど知見がないのが現状である。

ネコ科動物はSFTSVに感受性が高く、SFTSV感染によってヒトのSFTSに類似した重篤な臨床症状を引き起こす。当研究グループは病理組織学的な特徴もヒトの変化と類似していることを明らかにしており、ネコの症例は、動物とヒトに共通のSFTSの病態を理解するための貴重なサンプルとなり得ると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、致死的なSFTSを発症し斃死したネコの剖検例の組織標本を用いた病理組織学的なアプローチにより、リンパ系組織に存在するリンパ球に何が起きているのかを解明すること、通常は存在しない特異な細胞であり感染標的細胞である異型リンパ球はどのような機序により体内で維持されているのかを調べること、にある。

## 3. 研究の方法

### 実験 1. リンパ節の検索

#### 実験 1-1. 組織標本

SFTSで斃死したネコの剖検例7症例、SFTSV非感染のネコの剖検例5症例から得られたリンパ節の組織標本を検索に用いた。SFTS症例のリンパ節は、個々のリンパ節に対するSFTSVに対する免疫染色結果をもとにSFTSV陽性細胞の多数認められるHigh viral-loadリンパ節(High-VL LN)とSFTSV陽性細胞が少数しか認められないLow viral-load(Low-VL LN)に分け、それぞれ5個のリンパ節の組織標本を用いた。また、SFTSV非感染症例のリンパ節は5個のリンパ節の標本を用いた。実験的SFTSV感染ネコのリンパ節の組織標本も使用した。これらは抗SFTSV抗体の高い個体(High Ab responder)と低い個体(Low Ab responder)それぞれ3個体のリンパ節を解析した。

#### 実験 1-2. 免疫染色

上記の組織標本に対して、B細胞の反応を調べるために活性化胚中心B細胞のマーカーであるKi67、Bcl6、細胞死を調べるためにアポトーシス細胞のマーカーであるcleaved-caspase3および外因系経路のアポトーシスマーカーであるcleaved-caspase8、リンパ節内の細胞ポピュレーション解析のためにT細胞マーカーであるCD3、制御性T細胞マーカーであるFoxP3、マクロファージマーカーであるIba1、細胞傷害性T細胞/NK細胞マーカーであるGranzymeBに対する免疫染色を実施した。

#### 実験 1-3. 抗SFTSV抗体価との関連性の評価

剖検例は血清サンプルの解析を実施していないため、抗SFTSV抗体価が不明である。そのため、当研究室で保管されている過去に実験的にSFTSVを接種し、抗体価の検索がなされたネコの組織標本を用いて実験1-2と同様の染色を実施した。各個体は抗体価に応じて、抗体価の高い個体(High-Ab responder)と抗体価の低い個体(Low-Ab responder)に分けて、それぞれ3個体の解析を実施した。

### 実験 2. 異型リンパ球における細胞生存・細胞死阻害因子の検索

実験1で使用したものと同様のSFTSで斃死したネコの剖検症例のリンパ節の組織標本を用いて解析を実施した。解析には、異型リンパ球の多数認められる標本を使用した。細胞生存・細胞死阻害因子であるc-IAP、c-IAP2、survivin、Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1に対する免疫染色を実施し、異型リンパ球で発現が認められるものを調べた。その後、SFTSV感染との関連性を調べるためにSFTSVとの二重染色を実施した。

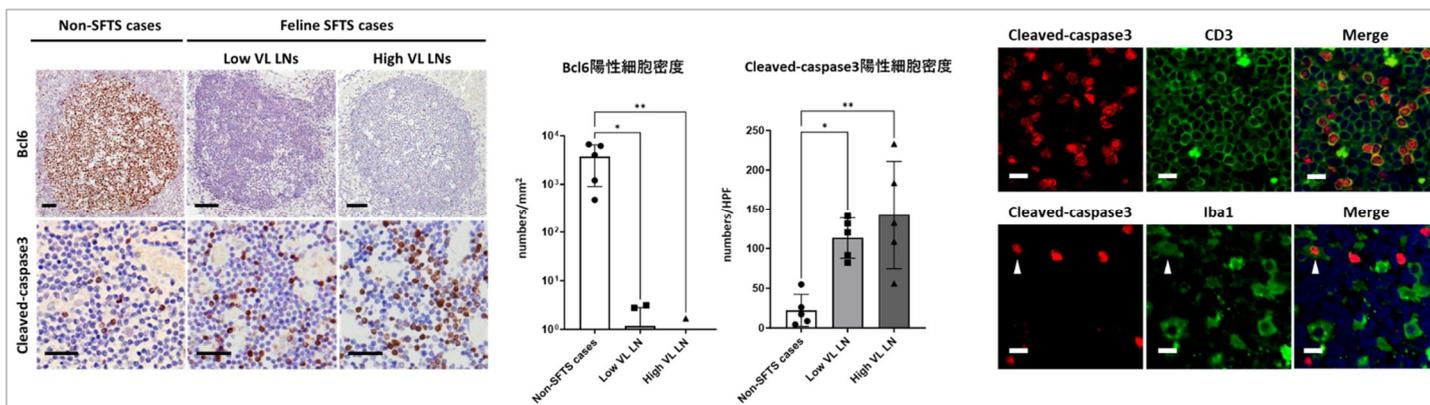
### 実験 3. 骨髄巨核球の解析

骨髄巨核球に対するIgGやIgMの沈着および各種免疫担当細胞の反応を調べるために、実験1で用いたSFTSを発症し斃死したネコの剖検例4症例の骨髄組織およびSFTSV非感染症例2症例を用いて抗ネコIgG、抗ネコIgMを実施すると共に巨核球への沈着を証明するために、巨核球マーカーvWFとネコIgGおよび巨核球マーカーCD61とマクロファージマーカーIba1または細胞傷害性T細胞マーカーGranzyme Bの二重染色も実施した。

#### 4. 研究成果

##### SFTS 発症ネコでは活性化胚中心 B 細胞の減少と T 細胞のアポトーシスが顕著である

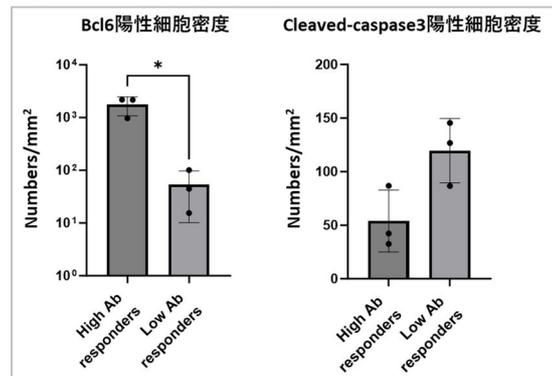
胚中心の活性化状態を調べるために活性化胚中心細胞のマーカーである Ki67 と Bcl6 の免疫染色を実施したところ、いずれも SFTS 症例で減少していた。特に Bcl6 陽性細胞の減少が顕著であった (図 1)。また、SFTS 症例では Low-VL のリンパ節と High-LN のリンパ節で大きな差は T 細胞領域である傍濾胞領域で生じている病的変化を調べるためアポトーシスマーカーである cleaved-caspase3 と cleaved-caspase8 の免疫染色を実施したところ、いずれも SFTS 症例で有意に増加していた。こちらも Low-VL と High-LN で有意な差は認められなかった。また、cleaved-caspase3 に陽性を呈する細胞の種類を調べるために傍濾胞領域に存在する T 細胞 (CD3) またはマクロファージ (Iba1) と cleaved-caspase3 との二重染色を実施したところ、cleaved-caspase3 に陽性を示す細胞はそのほとんどが CD3 陽性の T 細胞であることがわかった。以上の結果より、SFTS 発症個体のリンパ系組織では、胚中心 B 細胞の活性化は抑制され、T 細胞はアポトーシスにより顕著に減少していることがわかった。



##### SFTS 症例で生じる胚中心形成の抑制と T 細胞の細胞死は免疫応答と負に相関する

上記で認められた胚中心形成の抑制と T 細胞の細胞死が実際に免疫応答に関連するかを調べるために抗 SFTS 抗体価が調べられている SFTSV の実験感染ネコの病理組織を上記と同様に解析した。その結果、Bcl6 陽性細胞数は抗体価の高い個体で有意に多いことがわかった。Cleaved-caspase3 陽性細胞は抗体価の高い個体で少ない傾向にあることがわかった。

以上の結果より、SFTS 症例で認められる胚中心 B 細胞の減少や T 細胞の細胞死は免疫応答と相関していることがわかった。ヒトでは重症例では SFTSV に対する抗体価が低いことが知られており、SFTS 患者では免疫機能の低下による二次感染等が増悪因子として知られている。以上の結果は、SFTS 患者で認められる免疫機能の低下の原因となっている現象の 1 つを解明したものと言える。今後、どのような機序で細胞死や胚中心の消失が生じるのかを解明してゆくことで、SFTS 発症時の免疫機能を適切にコントロールする薬剤の開発につながるものと考えられる。

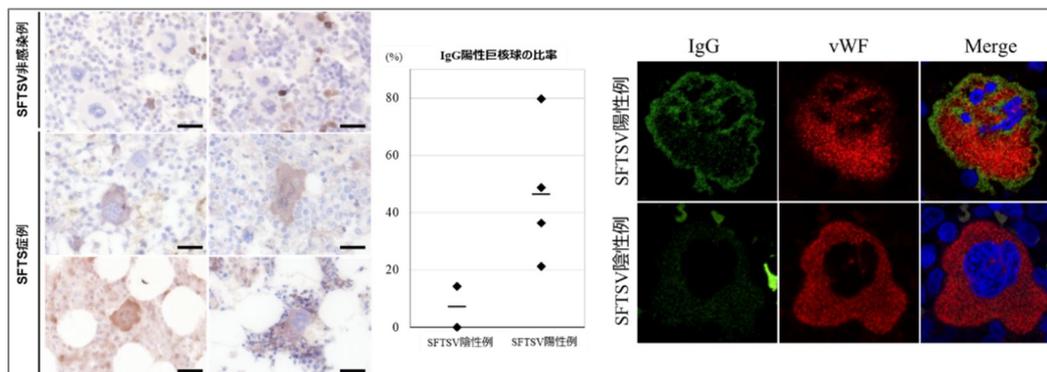


##### SFTS 症例で認められる異型リンパ球における細胞生存・細胞死阻害因子の発現

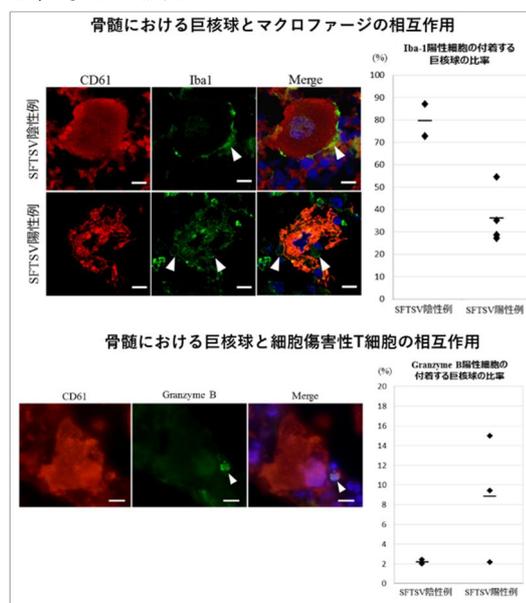
SFTS 発症し斃死したネコのリンパ節の組織標本を用いて c-IAP、c-IAP2、survivin、Bcl-2、Bcl-xL、Mcl-1 の発現を免疫染色で検討したが、異型リンパ球で陽性を呈した因子は Bcl-xL と Mcl-1 の 2 つであった。これら 2 つの因子の発現と SFTSV 感染との関連性を解析するために SFTSV との二重染色を実施したが、必ずしも SFTSV 陽性細胞にこれらの因子の発現が認められる訳ではないことがわかった。このことは、SFTSV の感染を契機として何らかの刺激により異型リンパ球の増生が生じて維持されていることを示唆していると考えられた。そして、この異型リンパ球の増生・維持機構に Bcl-xL と Mcl-1 が関わっているものと考えられた。異型リンパ球は通常状態ではきわめて少ない SFTSV の感染標的細胞であり、この細胞の増生・維持機構が完全に解明できれば、SFTSV の増殖を阻害する薬剤の開発につながる可能性があるものと考えられた。

## 骨髄巨核球の解析

SFTS で認められる顕著な血小板減少が骨髄巨核球への自己抗体の沈着のような免疫学的機序によって生じている可能性を検討するために、SFTSV 感染例 4 症例と SFTSV 非感染症例 2 症例の剖検で得られた骨髄組織を用いて IgG や IgM 沈着を検索した。その結果、程度は様々なであるが SFTS 症例では巨核球が IgG や IgM で染めだされたのに対して、SFTSV 非感染例ではこれらの陽性シグナルは抗体産生細胞である形質細胞に認められるのみであった。



巨核球に対する免疫担当細胞の反応を調べるために、抗原に付着した抗体に反応するマクロファージや細胞傷害性 T 細胞の染色を実施したところ、予想に反してマクロファージは SFTSV 陰性症例では巨核球に付着しているのに対して、SFTS 症例ではマクロファージの巨核球の付着が認められなくなっていた。一方で、細胞傷害性 T 細胞は SFTS 症例で巨核球に接するように存在する像が多く認められた。上記の結果より、SFTS における血小板の減少の原因の 1 つとして自己抗体の沈着も挙げられる可能性が推測された。また、マクロファージは巨核球の分化に関与する骨髄常在性マクロファージと考えられたため、Iba1 の単染色を実施したところ SFTS 症例では骨髄常在性マクロファージに典型的な樹状の形態をしたものが少なく、単球様の形態をしたものが多見された。このことから、造血環境の変化も白血球や血小板の産生に影響を与えている可能性が推測された。



## 研究成果の総括

本研究では、SFTS の病態を構成する、獲得免疫機能の低下に対応する T 細胞・B 細胞の組織学的異常、異型リンパ球の出現と維持をサポートすると考えられる Bcl-xL と McI1 の発現、血小板減少に対応する巨核球への自己抗体沈着と細胞傷害性 T 細胞の反応を明らかにした。これらの成果は直ちに薬剤の開発につながるものではないが、SFTS の病態の理解にとって重要な知見であるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yusuke Sakai, Yuko Kuwabara, Keita Ishijima, Saya Kagimoto, Serina Mura, Kango Tatemoto, Ryusei Kuwata, Kenzo Yonemitsu, Shohei Minami, Yudai Kuroda, Kenji Baba, Masaru Okuda, Hiroshi Shimoda, Masashi Sakurai, Masahiro Morimoto, Ken Maeda	4. 巻 27
2. 論文標題 Histopathological Characterization of Cases of Spontaneous Fatal Feline Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Emerging infectious diseases	6. 最初と最後の頁 1068-1076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3201/eid2704.204148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Y, Mura S, Kuwabara Y, Kagimoto S, Sakurai M, Morimoto M, Park ES, Shimojima M, Nagata N, Ami Y, Yoshikawa T, Iwata-Yoshikawa N, Fukushi S, Watanabe S, Kurosu T, Okutani A, Kimura M, Imaoka K, Saijo M, Morikawa S, Suzuki T, Maeda K	4. 巻 14
2. 論文標題 Lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection causes systemic germinal centre failure and massive T cell apoptosis in cats	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in microbiology	6. 最初と最後の頁 1333946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2023.1333946	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井祐介、武良千里 <sup>2</sup> 、櫻井優、森本将弘、前田健、鈴木忠樹
2. 発表標題 SFTS感染ネコのリンパ節における胚中心反応と細胞死の組織学的検索
3. 学会等名 第4回SFTS研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------