

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16410

研究課題名（和文）慢性活動性EBウイルス感染症における血管障害発症機構の解明と治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of angiopathy mechanism and development of therapeutic methods in chronic active Epstein-Barr virus disease

研究代表者

大橋 彩香（Ohashi, Ayaka）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：60844371

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）：慢性活動性Epstein-Barrウイルス病（CAEBV）の細胞株の培養上清は血管内皮細胞株の凝固関連因子の発現に影響を与え、凝固活性を促進した。原因となる液性因子を同定するため、CAEBV患者血漿を用いてサイトカインアレイを実施した。IL-1 は、血管病変を合併した患者の血漿中で高発現しており、血管病変を発症していない患者では発現していなかった。IL-1 は血管内皮細胞の細胞増殖を抑制し、凝固活性を亢進した。IL-1 はCAEBVに併発する血管病変発症に寄与することを明らかにした。さらに、IFN- と血球貪食症候群など、他の液性因子とCAEBV病態の相関についても明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAEBV患者の25%が発症する血管病変は、臓器傷害やTMA発症などに関与し、唯一の根治療法である造血幹細胞移植の移植成績を低下させ、予後を悪化させる極めて重篤な病態である。IL-1 が血管病変を合併したCAEBV患者の血漿中でのみ認められたことは、IL-1 がCAEBVで高率に合併する血管病変の発症に関与し、治療標的となることを示唆した。IFN- など他の液性因子とCAEBV病態との関連も見出している。本研究成果は、CAEBVに併発する血管病変だけでなく、HLH等の病変の発症や病態解明に寄与すると共に、IL-1 等液性因子を標的とした治療法やバイオマーカーの開発に貢献し得る。

研究成果の概要（英文）：Supernatants from chronic active Epstein-Barr virus disease (CAEBV) cell lines affected the expression of coagulation-related factors in vascular endothelial cell lines and activated coagulation. Cytokine array was performed using CAEBV patients' plasma to identify the causative factors. IL-1 was highly expressed in the plasma of patients with vascular lesions and not in patients without them. IL-1 inhibited cell proliferation and enhanced coagulation activity of vascular endothelial cells. IL-1 was found to contribute to the development of vascular lesions associated with CAEBV. Furthermore, we also clarified the correlation between IFN- and hemophagocytic lymphohistiocytosis.

研究分野：血液学

キーワード：慢性活動性Epstein-Barrウイルス病 CAEBV 血管病変 IL-1 血管内皮細胞 凝固

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス病 (CAEBV) は、発熱、肝機能障害等の慢性炎症症状に加え、EB ウイルスが感染した T, NK 細胞が腫瘍性に増殖し、末梢血及び組織に浸潤する疾患である。自然軽快はなく、数か月から数年を経て悪性度の高いリンパ腫、血球貪食性リンパ組織球症を発症して死に至る。根治療法は造血幹細胞移植のみで有効な治療薬は無い (2018 年 AMED 研究班調査)。EB ウイルスは唾液を介して主に B 細胞に感染する。本邦の成人ではほぼ 100% が感染を受け、ひとたび感染すると生涯にわたり潜伏し続ける。このような普遍的なウイルスが、なぜ一部のヒトで T, NK 細胞に感染するのか? なぜ EB ウイルス感染細胞は排除されないのか? なぜこれらの細胞が増殖、活性化し CAEBV 発症に至るのか? そしてなぜ CAEBV は治療抵抗性を示すのか? これらは未だ明らかにされていない。

CAEBV は 25% と高率に血管障害 (血管炎、動脈瘤、血栓症) を合併する。血管障害は血流低下による臓器障害、動脈瘤による出血に加え、凝固障害も来しうる。さらに血栓性微小血管障害症 (TMA) を引き起こし、造血幹細胞移植成績を低下させる。血管障害を発症している CAEBV 患者組織所見で血管内皮細胞への EB ウイルスの感染はないことから、感染細胞による直接的、もしくは間接的な障害と考えられる。しかし、なぜ CAEBV で血管障害が生じるのか、どのような患者に起きやすいのかは未だ明らかにされていない。CAEBV 患者の血中では、しばしばサイトカインストームにより過剰な炎症状態となる。そこで私たちは、血液中のサイトカイン等液性因子や分泌型 RNA、それを分解し得る RNase 1 が、CAEBV における血管病変の発症に関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

CAEBV 患者由来 EB ウイルス陽性 T, NK 細胞が分泌する液性因子等の同定と、CAEBV 患者由来細胞やその培養上清と血管内皮細胞の共培養により血管内皮細胞が発現する凝固関連因子を解析する。以上より、CAEBV 患者由来細胞と血管内皮細胞の相互作用による血管障害の発症メカニズムを解明し、液性因子を標的とする治療法の開発への基礎とすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CAEBV 患者由来細胞の培養上清と血管内皮細胞との共培養実験

CAEBV 患者由来細胞株 (NK 細胞由来細胞株; SNK10、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞由来細胞株; SNT15、 $\alpha\beta$ 型 T 細胞由来細胞株; SNT16) の培養上清と血管内皮細胞株 (ヒト臍帯静脈内皮細胞株; Ea.hy926) を共培養し、血管内皮細胞の機能 (形態、増殖能、細胞周期) の変化を解析した。定量 PCR 法で凝固関連因子の発現を調べた。カルシウム再加凝固時間 (PCA) を用いて凝固活性を測定した。共培養による細胞内シグナリングの変化を解析した。

(2) CAEBV 患者由来細胞の培養上清中の液性因子の解析

(1) で、CAEBV 患者由来細胞株の培養上清が血管内皮細胞に変化を与えたため、CAEBV 患者由来細胞株の培養上清中のサイトカイン等液性因子をサイトカインアレイ解析によって測定した。

(3) CAEBV 患者血漿における液性因子の同定

CAEBV 患者血漿を用いて、サイトカイン等液性因子をサイトカインアレイ解析によって測定した。特に、血管病変を合併した患者と合併していない患者の血漿中で発現に違いが見られる液性因子に着目した。

(4) 液性因子による血管病変発症メカニズムの解明

(3) で同定した液性因子で血管内皮細胞を処理し、(1) と同様の実験手法も用いて、液性因子が血管内皮細胞に影響を与え、血管障害を起こし得るかを検証した。

4. 研究成果

CAEBV 患者由来細胞株の培養上清は、血管内皮細胞株の形態を紡錘状に変化させ、生細胞数を減少させた。さらに、caspase 3 や PARP を切断し、アポトーシスを誘導した。凝固活性因子である組織因子 (TF) や PAI-1 の発現を亢進させ、抗凝固因子であるトロンボモジュリンと抗凝固的に働く RNase1 の発現を低下させた。さらに、PCA により凝固活性が促進されることを明らかにした。CAEBV 患者由来細胞株の培養上清による、このような血管内皮細胞の変化を引き起こす原因となる液性因子を同定するため、CAEBV 患者由来細胞株上清中のサイトカイン等液性因子を、サイトカインアレイにより網羅的に測定したところ、血液凝固等に関連するいくつかの因子が検出された。さらに、CAEBV 患者血漿を用いてサイトカインアレイを実施したところ、炎症性サイトカイン IL-18 は、血管病変を合併した患者の血漿中で高発現しており、血管病変を発症していない患者では発現していないことを見出した。この結果から、IL-18 は CAEBV に合併する血管病変の発症に関与すると推測し、血管内皮細胞を用いた *in vitro* の検証実験を実施し

た。その結果、IL-1 β は血管内皮細胞の細胞増殖を抑制し、凝固促進因子の発現を亢進させ、抗凝固因子の発現を抑制した。さらに、IFN- γ と血球貪食症候群など、他の液性因子と CAEBV 病態の相関に関する明らかな結果を得た。これらの研究成果は、国際誌 *Frontiers in Microbiology*, *Blood Advances*, *Cancers*, *Frontiers in Virology* 等で報告した。さらに、国際学会 19th International Symposium on Epstein-Barr Virus and associated diseases, 12th AACR-JCA Joint Conference, 63rd ASH Annual meeting and exposition 等や、国内学会 第 81 回日本癌学会学術集会、第 84 回日本血液学会学術集会などで発表した。

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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Yoshimori Mayumi, Nishio Miwako, Ohashi Ayaka, Tateishi Megumi, Mimura Ayaka, Wada Naomi, Saito Minoru, Shimizu Norio, Imadome Ken-Ichi, Arai Ayako	4. 巻 13
2. 論文標題 Interferon- Produced by EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induces Differentiation into Macrophages and Procoagulant Activity of Monocytes, Which Leads to HLH	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5097 ~ 5097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205097	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 Ohashi Ayaka, Uemura Yu, Yoshimori Mayumi, Wada Naomi, Imadome Ken-Ichi, Yudo Kazuo, Koyama Takatoshi, Shimizu Norio, Nishio Miwako, Arai Ayako	4. 巻 13
2. 論文標題 The Plasma Level of Interleukin-1 Can Be a Biomarker of Angiopathy in Systemic Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 874998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2022.874998	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 Yoshimori Mayumi, Shibayama Haruna, Imadome Ken-Ichi, Kawano Fuyuko, Ohashi Ayaka, Nishio Miwako, Shimizu Norio, Kurata Morito, Fujiwara Shigeyoshi, Arai Ayako	4. 巻 5
2. 論文標題 Antineoplastic and anti-inflammatory effects of bortezomib on systemic chronic active EBV infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 1805 ~ 1815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2020002417	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 Uemura Yu, Ohashi Ayaka, Yoshimori Mayumi, Nishio Miwako, Hirakawa Tsuneaki, Shimizu Norio, Wada Naomi, Imadome Ken-Ichi, Arai Ayako	4. 巻 2
2. 論文標題 Plasma interferon- concentration: a potential biomarker of disease activity of systemic chronic active Epstein-Barr virus infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Virology	6. 最初と最後の頁 999929
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fviro.2022.999929	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 Oshima Kumi, Yoshimori Mayumi, Ohashi Ayaka, Nishio Miwako, Shimizu Norio, Arai Ayako	4. 巻 13
2. 論文標題 Simvastatin Induces Anti-Tumor Effects on Systemic CAEBV In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of St. Marianna University	6. 最初と最後の頁 59 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.17264/stmarieng.13.59	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 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大橋彩香、上村悠、吉森真由美、和田尚美、今留謙一、遊道和雄、小山高敏、西尾美和子、新井文子
2. 発表標題 慢性活動性EBウイルス感染症患者血漿中のIL-1 は血管病変のバイオマーカーとなり得る
3. 学会等名 第34回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayaka Ohashi, Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Kazuo Yudo, Miwako Nishio, and Ayako Arai
2. 発表標題 Plasma level of IL-1 in Chronic Active EBV Infection can be a biomarker of angiopathy
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 Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Tsuneaki Hirakawa, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai
2. 発表標題 What plasma level of Interferon- indicates in systemic chronic active Epstein-Barr virus infection
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 Ayaka Ohashi, Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Kazuo Yudo, Miwako Nishio, and Ayako Arai
2. 発表標題 慢性活動性EBV感染症患者血漿中のIL-1 は血管病変のバイオマーカーとなり得る
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Tsuneaki Hirakawa, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai
2. 発表標題 全身性慢性活動性EBウイルス感染症患者の血漿中INF- 濃度の意義
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Uchida A, Uemura Y, Hirakawa T, Ohashi A, Yoshimori M, Kojima S, Sakurada T, Arai A
2. 発表標題 HLHに伴う高サイトカイン血症に対するPEとCHDFの効果
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayaka Ohashi, Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Kazuo Yudo, Takatoshi Koyama, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 The Plasma Level of IL-1 As a Biomarker of Angiopathy in Systemic Chronic Active EBV Infection
3. 学会等名 63rd ASH Annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Yu Uemura, Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Tsuneaki Hirakawa, Naomi Wada, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai
2. 発表標題	What plasma level of interferon- indicates in systemic chronic active Epstein-Barr virus infection
3. 学会等名	63rd ASH Annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題	Products of EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induce Differentiation into Macrophages and Procoagulant Activity of Monocytes, which Leads to HLH
3. 学会等名	25th Congress of European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Ken-Ichi Imadome, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題	EBV-Positive Neoplastic NK-Cells Induce Macrophage Differentiation from monocytes, Leading to HLH
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Megumi Tateishi, Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Shixing Wu, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題	The Cytokines of EBV+Neoplastic NK-Cells Enhance the Procoagulant Activity of Monocytes Causing DIC
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Wu Shixing, Mayumi Yoshimori, Megumi Tateishi, Ayaka Ohashi, Shimizu Norio, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題	The Elucidation of Targets of EBV-Derived Micro-RNA in Chronic Active EBV Infection
3. 学会等名	第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	平川経晃、齊木祐輔、内田晶子、上村悠、大橋彩香、吉森真由美、小島尚美、清水則夫、今留謙一、新井文子
2. 発表標題	HLA班合致末梢血幹細胞移植を行った慢性活動性EBウイルス感染症
3. 学会等名	第44回日本造血・免疫細胞療法学会総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	上村悠、神野正敏、大橋彩香、今留謙一、大島久美、小島尚美、清水則夫、新井文子
2. 発表標題	HLA半合致同種造血幹細胞移植症後のHuman herpesvirus 7型脳症
3. 学会等名	第35回ヘルペスウイルス研究会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Ayaka Ohashi, Morito Kurata, Ayako Arai
2. 発表標題	EBV陽性T,NK細胞腫瘍、慢性活動性EBV感染症に対するBCL2阻害剤の効果
3. 学会等名	第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名 Ayaka Ohashi, Yusuke Saiki, Ken Shimizu, Marie Obuchi, Norio Shimizu, Kazuo Yudo, Morito Kurata, Mayumi Yoshimori, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 BCL2及びBCL-xL阻害剤は慢性活動性EBV感染症の腫瘍・炎症の両側面に有効である
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ayaka Ohashi, Mayumi Yoshimori, Miwako Nishio, Kaoru Koike, Norio Shimizu, Kazuo Yudo, Morito Kurata, Ayako Arai
2. 発表標題 Will BCL2 be a Potent Therapeutic Target for Systemic Chronic Active Epstein-Barr Virus Disease?
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mayumi Yoshimori, Ayaka Ohashi, Kotaro Yoshioka, Takanori Yokota, Norio Shimizu, Miwako Nishio, Ayako Arai
2. 発表標題 Expression profile of EBV-derived micro-RNA in systemic chronic active EBV disease
3. 学会等名 64th ASH Annual Meeting & Exposition
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大橋彩香、上村悠、新井文子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 日本臨牀社	5. 総ページ数 542
3. 書名 日本臨牀増刊「新リンパ腫学」	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 慢性活動性Epstein-Barrウイルス感染症(CAEBV)の検出方法	発明者 新井文子、今留謙一、大橋彩香、上村悠	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022- 48139	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------