

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17352

研究課題名(和文) 種痘様水疱症の早期治療介入マーカーと T細胞による重症化制御機構の検討

研究課題名(英文) Monokine induced by gamma interferon levels in plasma is a sever diagnostic marker of Hydroa vacciniforme like lymphoproliferative disorder

研究代表者

三宅 智子 (Miyake, Tomoko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30749627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：cHVとsHVの血漿中のMIGをROC曲線を使用して解析した結果、MIG：152.1 pg/mlで感度特異度ともに88.9%と87.5%と高値であった。またsHV患者では経過中、血漿中のMIGは常にカットオフ値を超えており、cHVからsHVに移行した患者では経過の8/10地点で高値を示した。MIGはHVの血液中のIFN やCRPとの相関を認め、全身の炎症と関連があり、客観的にsHVとcHVを鑑別できるマーカーになりうると考えている。さらにsHVの皮膚病変部ではMIGとそのligandであるCXCR3の発現を認めており、IFN 系の経路がsHVの皮膚病変形成に関与していると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血漿中のMIGは、現在HV-LPDの中に含まれているcHVとsHVを明確に分ける客観的基準値になりうると考える。またsHVの皮膚病変の病態がMIGとCXCR3によるIFN の経路により形成されている可能性を考えると、皮膚病変の治療ターゲットとして上記経路の阻害剤を使用することで、皮膚病変の重症化を抑えうる可能性があり、今後のsHVの皮膚病変の治療選択の拡大につながる研究になると考えている。

研究成果の概要(英文)：The MIG of the plasma with cHV were significantly higher than that with sHV.

A cut off level of MIG was set up at 152.1 pg/ml by using receiver operating curve ($p=0.05$), and both of the sensitivity and the specificity for the difference of cHV or sHV were 88.9% and 87.5%, respectively. We analyzed the plasma MIG (from 15.7 to 472.6 pg/ml) of the HV patient, whose phenotype shifted from cHV to sHV, were almost higher than the cut off level during her clinical courses. The other patient with sHV, who died of HPS, showed that the MIG levels of the plasma ranged from 1561.9 to 17175.8 pg/ml during her clinical course. The level of MIG was related to the level of IFN and CRP. A sHV patient showed a few MIG expression near the ulceration and many CXCR3 positive cells, which is ligand of MIG, infiltrated the skin lesions. But there were no expression of MIG and CXCR3 in cHV lesions. The plasma MIG levels might be associated with the systemic inflammation severity in the patients with HV.

研究分野：Hydroa vacciniforme lymphoproliferative disorder

キーワード：Epstein-Barr Virus CXCR9/MIG Hydroa vacciniforme T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種痘様水疱症 (Hydora vacciniforme; HV) は、日光露光部の皮膚を中心に水疱、痂皮や瘢痕のサイクルを繰り返す小児に認める疾患で、皮膚病変部に Epstein-Barr virus (EBV) を認める。本疾患は、皮膚症状のみの古典型 (classical HV: cHV) と、発熱、リンパ節腫脹あるいは肝機能障害等の全身症状を認める重症型 (systemic HV: sHV) の2つの病型がある。自施設は、HV 患者の末梢血単核球中で、EBV 陽性 T 細胞が増加していること (J Invest Dermatol, 2012)、また cHV は予後良好だが、sHV は予後不良で、予後不良因子は、1) 発症年齢が、9 歳以上、2) 皮膚病変部に EBV 再活性化マーカーである *BZLF1* mRNA が発現していること (Br J Dermatol, 2015)、さらに、sHV の中に、T 細胞ではなく、T 細胞に EBV が感染する型があり、型 sHV が予後不良であることを報告した (Eur J Dermatol, 2019)。

cHV の治療は、遮光のみで経過観察だが、sHV は、化学療法や骨髄移植が必要となり、移植の時期に関して基準がない。このように cHV と sHV は異なる臨床経過を辿るが、稀に cHV から sHV へ移行する患者がおり (EBV 陽性 T 細胞型から EBV 陽性 NK 細胞型への移行例)、cHV と sHV の明確な診断基準が必要である。現在申請者は、sHV 患者の血漿中に、(CXCR9/MIG; monokine induced by interferon) が高値を認めていることを確認し、また cHV 患者の皮膚病変部は、EBV 陽性 T 細胞以外に EBV 陰性 T 細胞が浸潤を認めていた。これらの結果より、血漿中の MIG の発現と EBV が T 細胞に感染することが疾患の重症度に関与する可能性を考えた。

2. 研究の目的

cHV と sHV の診断基準と早期治療介入マーカーとして血漿中の MIG の検討、2. HV の皮膚病変の形成機序の検討のために、EBV 陰性 T 細胞の EBV 陽性 T 細胞に対する免疫応答、さらには EBV 陰性 T 細胞の EBV 陽性 T 細胞や NK 細胞への免疫応答も検討することで、移植を必要とする sHV 患者への補助療法として T 細胞免疫応答を細胞レベルで確認することを目的としている

3. 研究の方法

HV患者の血漿中とEBV陽性培養細胞でのMIGの推移の検討

当科で経験した cHV と sHV の患者血漿中の MIG の推移と臨床経過に関して、当科で経験した症例にて MIG, Human, ELISA Kit, Quantikine (96 well) (CXCL9, ELISA kit: R&D systems) にて検討を行う。ROC 曲線 (エクセル統計を使用) を作成し、感度特異度が高い値を確認し、cHV と sHV の診断基準と早期治療介入マーカーとしての MIG の値を統計学的に確認する。さらに EBV 感染細胞 (KAI3: NK cell line, NKED: NK cell line, AIK-T4: T cell line, AK82: B cell line, SNT5, 8: T cell line) の細胞培養液を経時的に保存し、上清での MIG の発現を確認する。これらの検討により、EBV 感染細胞の違いにより MIG の発現が異なる可能性も確認する。

cHV患者の T細胞株の樹立

予後良好な cHV の皮膚病変部や末梢血中では EBV 陽性 T 細胞を認める。今回申請者は長崎大学田中義正先生により開発された T 細胞培養キット (テクノスズタ) を用いて、型 HV 患者の末梢血単核球より EBV 陽性 T 細胞株の樹立を行う。

3-1) 当院倫理委員会承認下で患者から同意を得て (研 1610-008)、末梢血単核球を分離し、FACS

にて CD3, 4, 8, 56, 16 と を確認する。

3-2) 培養キットを用いて、患者の末梢血から T 細胞の培養株を樹立する。本キットを用いて、健常人(申請者)からの T 細胞の培養株の樹立は既に確認済である(図4)。

3-3) すでに樹立されている EBV 陽性 γ T 細胞 : SNT8 と SNT5(CD3+, CD56+, HLADR+, CD4-, CD8-, CD16-, CD21-)(Am J Pathol. 2003)と cHV 患者の血液から樹立した(3-2)細胞の細胞表面マーカーの発現を FACS (Macq Quantify)で確認する。

EBV 感染細胞に対する T 細胞の免疫応答の測定

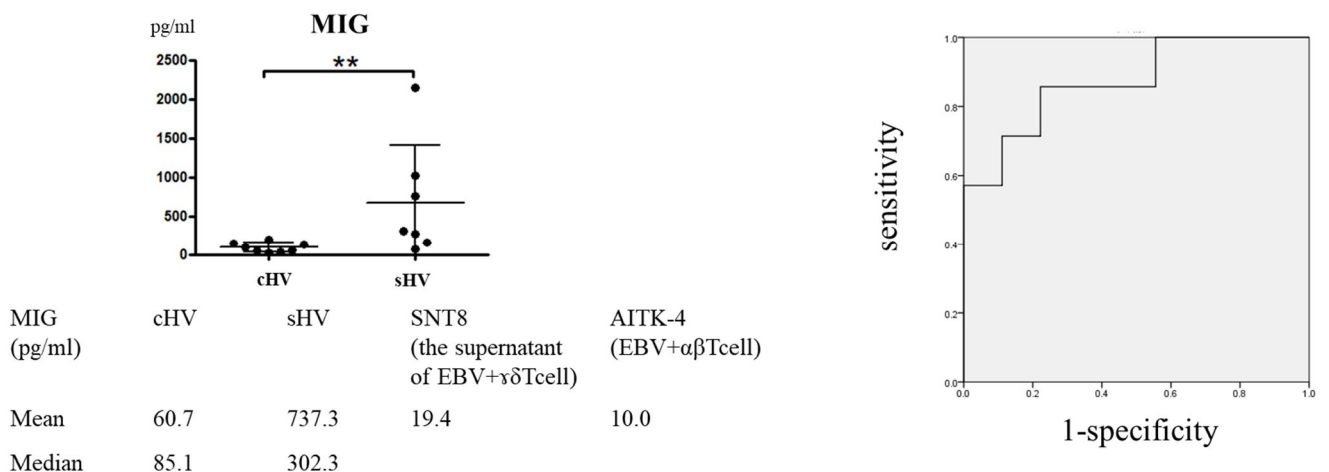
EBV は通常 B 細胞に感染しているが、HV では T 細胞に主に感染しており、さらに類縁疾患となる蚊刺過敏症では NK 細胞に感染している。EBV 感染細胞(KA13: NK cell line, NKED: NK cell line, AITK-T4: T cell line, AK82: B cell line, SNT5, 8: T cell line)に対して、細胞障害性測定キット(テクノススタ)を用いて、T 細胞と CD8 陽性細胞の細胞障害性機能を測定する。本法は、EBV 陰性の T 細胞が EBV 感染細胞(T, NK, さらに γ T 細胞)を障害し、細胞死を誘導する際に、細胞質からの標識キレート剤の漏出を時間分解蛍光法で測定することにより、非 RI で細胞障害性を定量化する。その結果を統計学的に解析し、EBV 陰性 γ T 細胞の EBV 陽性細胞への免疫応答が可能かを確認する。さらに、他の EBV 陽性細胞に対する T 細胞の免疫応答が可能かを確認する。これらの結果をまとめ、学会にて報告し、論文報告を行う

4 . 研究成果

結果 -1: cHV と sHV の血漿中の MIG の値の検討

HV の血漿中の MIG を測定し、cHV (平均値 : 60.7 pg/ml) と sHV (平均値 ; 737.3 pg/ml) の MIG の値を ROC 曲線を用いて解析した結果、MIG : 152.1 pg/ml で感度特異度ともに 88.9% と 87.5% で高値を認めていた。以上より MIG は、cHV と sHV を客観的に判断するマーカーになりうる可能性を考えた。また感染細胞ごとに MIG の値を測定した結果、SNT8 (EBV 陽性 T 細胞) では 19.4 pg/ml , AITK-4 細胞 (EBV 陽性 T 細胞) では 10.0pg/ml であり、感染細胞自体の MIG の値の変化は明らかではなかった。(本キットの説明文書で、健常人を検討した結果での平均値では 56.7 pg/ml であった。)

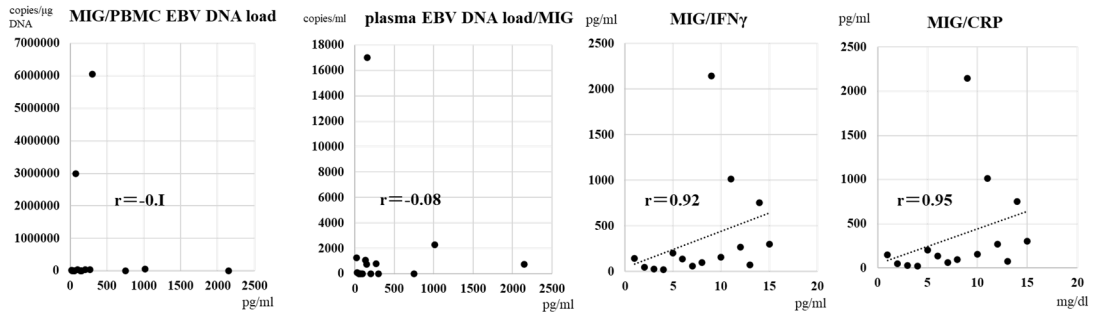
図 1 : cHV と sHV 患者の血漿中の MIG 値の検討



結果 -2: 血漿中の MIG と血液検査の値の検討

HV 患者の血漿中の MIG の値と同時期に採取された血液検査の値を相関係数にて比較検討を行った。MIG は HV 患者血液中の IFN (r=0.92) と CRP (r=0.95) と相関を認めていた (図 2)。一方血球中の EBVDNA 量、血漿中の EBVDNA 量、他血液学的検査 (WBC、異形リンパ球の絶対数、リンパ球絶対数、ヘモグロビン、血小板、AST、ALT、LDH) とは明らかな相関を認めなかった。以上の結果より MIG は EBV のウイルス量自体には関連はないが、全身の炎症と関連していると考えた。

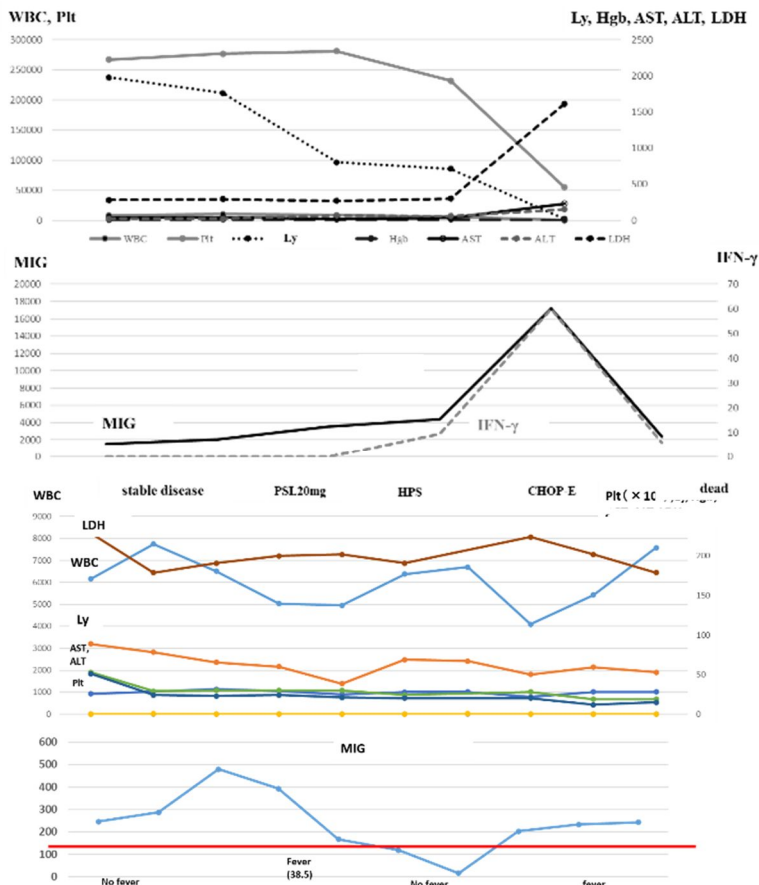
図 2: 血漿中の MIG と血液中の EBVDNA 量や血液検査値の検討



結果 -3: HV の経過中の血漿中の MIG の推移の検討

sHV 患者で全経過中の MIG の推移を検討した結果、発症から死亡に至る時期まで、1561.9 ~ 17175.8pg/ml とカットオフ値を有意に超えた値であった。また本患者は、MIG の高値を認めた時期は血球貧食症候群の状態であり、図 2 の結果を含めて、全身の炎症を反映している可能性を考えた (図 3: 上図)。一方 cHV から sHV に移行した患者の血漿中の MIG は、経過中 10 地点中 8 地点でカットオフ値 (152.1 pg/ml) より高かった (図 3: 下図、赤線がカットオフ値)。また本患者は、初期は発熱などの全身症状が明らかではなく、その時点でも MIG の高値を認めており、初期に皮膚症状のみの HV 患者が、経過中に sHV に移行する可能性を指摘できうるマーカーになることも考えている。一方血漿中の MIG の値と皮膚の重症度 (水疱や痂皮の出現) を検討した結果、MIG が高い際に皮膚症状が増悪をしているという臨床経過ではなく、皮膚と MIG は相関していないと考えた。以上より MIG は皮膚の局所的な炎症よりも全身的な炎症を反映した結果で、sHV では高値を認めていると考えた。

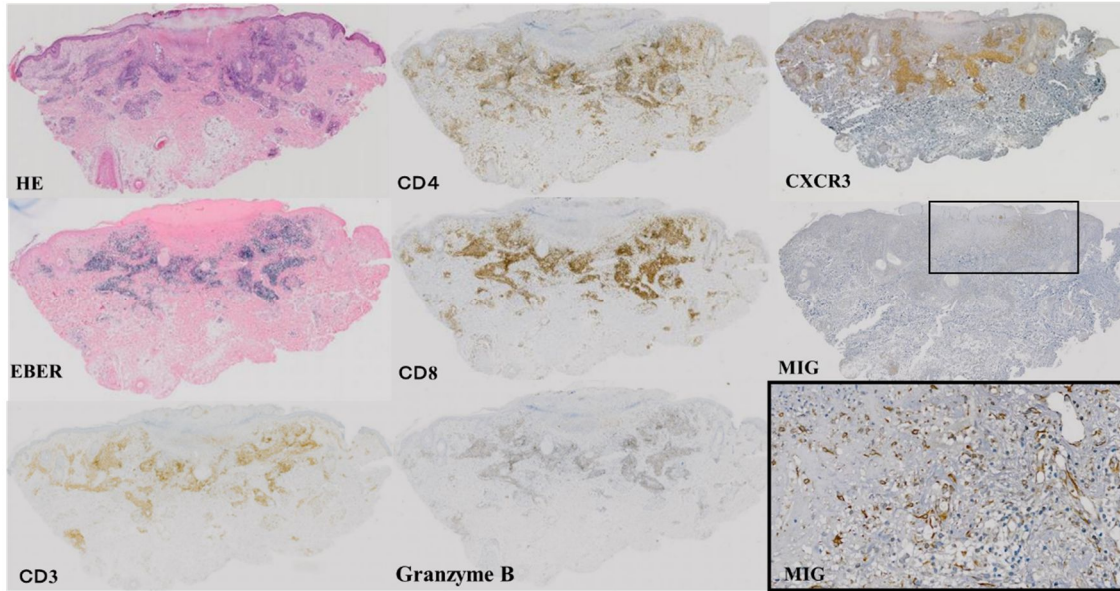
図 3: HV 患者の全経過中の MIG の推移の検討 (上図: sHV, 下図: cHV から sHV へ移行した患者)



結果 -4: MIG の皮膚病変部での発現の検討

本検討の計画から少し追加して、MIG の発現部位の検討を行った。SHV 患者の皮膚病変部での MIG と MIG の ligand である CXCR3 の発現を検討した結果、SHV 患者の炎症を認めた表皮真皮の浅層部位で MIG の発現を認め、その周囲に CXCR3 陽性細胞の発現を認めていた。MIG の発現細胞までは同定することは二重免疫染色を試みたが困難であった(図 4)。また cHV 患者の皮膚病変部では、明らかな MIG の発現を認めていなかった。EBV 陽性 T 細胞から IFN の発現を認めることが報告されており、SHV の皮膚病変部は EBV 陽性細胞の皮膚への浸潤 IFN の発現 MIG の発現に伴い CXCR3 陽性細胞が皮膚病変部に集まってくることで SHV の皮膚病態を形成している可能性を考えた。一方なぜ EBV 陽性細胞が皮膚病変部に浸潤してくるかは今後の検討課題である。

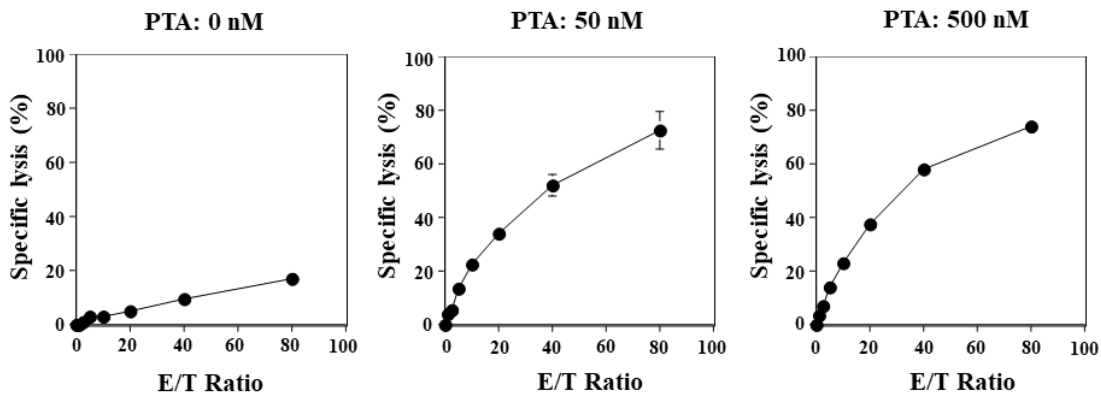
図 4 : SHV 患者の皮膚病変部の免疫染色



結果 : 当院で γ T 細胞が血液中に 7% 程度認めた健常人(当院大学院生)の γ T 細胞を培養キットを用いて、培養を行った結果、血液中の γ T 細胞は 90% までの増加を認めた。しかし、cHV 患者は、今回はコロナ下で遠方のため、電話診療となり、行うことができず、今後の検討課題である。

結果 ; 当科で EBV 陽性 B 細胞である Raji 細胞を使用し攻撃実験を行った結果、図 5 に示される通り、PTA を添加した場合(γ T 細胞が標的細胞を認識するため) PTA を添加しなかった場合と比較して、 γ T 細胞は Raji 細胞を破壊し、 γ T 細胞の濃度が濃くなるにつれて、標的細胞である Raji 細胞への細胞障害性が増加していることが分かった。また PTA を 50nM と 500nM にした場合は、細胞障害の割合に関しては差を認めない傾向にあった。一方 AITK-4 (EBV 陽性 γ T 細胞) 細胞は細胞劣化が強く、また他培養依託業者ですでに販売がされていなかったため検討が行えなかった。現在 NKED (EBV 陽性 NK 細胞) と SNT8 細胞 (EBV 陽性 γ T 細胞) に対して、同様な検討を行うことを田中義正先生の指導下のもと最終確認中である。

図 5: γ T 細胞の EBV 陽性細胞に対する細胞障害機能の検討



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyake T, Iwatsuki K, Hirai Y, Yamamoto T, Hamada T, Fujii K, Imamura H, Morizane S.	4. 巻 92
2. 論文標題 The aim of the measurement of Epstein-Barr virus DNA in hydroa vacciniforme and hypersensitivity to mosquito bites.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Virol.	6. 最初と最後の頁 3689-3696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jmv.25811.	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 1件）

1. 発表者名 Tomoko Miyake, Yoji Hirai, Takenobu Yamamoto, Keiji Iwatsuki, . Shin Morizane
2. 発表標題 The association between the severity of hydroa vacciniforme and monokine induced by gamma interferon (MIG/CXCL9)
3. 学会等名 The 45th annual meeting of the Japanese society for investigative dermatology（国際学会）
4. 発表年 2020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
---------	---------