

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 10 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591384

研究課題名（和文）新規に開発したEBV感染細胞同定法によるEBV関連疾患の診断および病態解析

研究課題名（英文）Diagnosis and pathogenetic analysis using a novel identification method for EBV-infected cells.

研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30303621

研究成果の概要（和文）：Epstein-Barr Virus (EBV) 関連リンパ増殖性疾患の診断・発症病理の解明には、EBV 感染細胞の定量と同定が必須である。我々は EBV encoded small RNA (EBER) 特異的プローブを用い、細胞表面抗原と EBER を連続的に染色・検出する FISH 法を確立し、同法が慢性活動性 EBV 感染症を初めとする EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患や移植後リンパ増殖症の診断・治療効果判定に有用であることを示した。

研究成果の概要（英文）：To diagnose Epstein Barr virus (EBV)-associated diseases and to explore the pathogenesis of EBV infection, not only must the EBV load be measured, but EBV-infected cells must also be identified. We established a novel flow cytometric in situ hybridization assay to detect EBER and surface antigen in EBV-infected cells using an EBV-encoded small RNA (EBER) specific peptide nucleic acid probe, and showed that this assay was useful for the diagnosis and decision of treatment against EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases such as chronic active EBV infection or post transplant lymphoproliferative disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

Epstein-Barr virus (EBV) は B 細胞のみならず、T 細胞、NK 細胞などのリンパ球に感染し、伝染性単核症、血球貪食症候群、慢性活動性 EBV 感染症や鼻性 NK リンパ腫、EBV 関連 T リンパ腫、NK 白血病、移植後リンパ増殖症など、様々なリンパ増殖性疾患/悪性リンパ腫の原因となる。近年では、蚊刺過敏症や

種痘様水疱症という、一見皮膚に局限した疾患も EBV 関連疾患であり、高率に悪性リンパ腫へと進展していくことも明らかとなっている。これらの EBV 関連リンパ増殖性疾患は、その発症病理や診断定義が定まっていないものも多く、それがために治療法も確立していない。

これら EBV 関連リンパ増殖性疾患の診断・

発症病理の解明には、末梢血中の感染細胞数の定量に加え、EBV が感染している細胞の同定が必須である。病理組織では、感染細胞核内で多量に発現している EBV encoded small RNA (EBER) を *in situ* hybridization 法を用い検出する感染細胞同定法が確立されている。しかし、血液を用いた非侵襲的な感染細胞同定法はなく、その開発が望まれていた。我々は、世界に先駆けリアルタイム PCR 法による EBV DNA 定量法を確立し、EBV 関連疾患の診断法・治療モニタリングに臨床応用した (Kimura H, *J Clin Microbiol* 37:132-6, 1999)。更に、末梢血を磁気ビーズ法により分画しそれぞれの分画を EBV DNA 定量を行うことで、EBV 感染細胞を同定する方法を確立し、EBV 関連疾患の病態解析に応用した (Kimura H, *J Infect Dis* 191:531-9, 2005)。しかし、これらの方法は手技が煩雑である上に、間接的であり、正確な感染細胞の同定は難しかった。

Peptide nucleic acid (PNA) は、glycine 骨格が塩基に共有結合した構造をとり、DNA・RNA プロブより安定で、核酸に hybridization できる。私どもは PNA をプロブとして用い *in situ* hybridization 法と、flow cytometry を組み合わせ、末梢血中の EBV 感染細胞を検出できる flow cytometric *in situ* hybridization (FISH) 法を開発し既に特許申請した。この方法を用いれば、末梢血中の EBV 感染細胞を、簡便かつ非侵襲的に検出・定量できるばかりでなく、表面抗原との二重染色により、感染細胞の同定が可能となる。

2. 研究の目的

FISH 法による EBV 感染細胞の定量・同定法を確立し、以下のことを明らかにしていく。

- (1) FISH 法が移植後リンパ増殖症、血球貪食症候群、慢性活動性 EBV 感染症などの EBV 関連リンパ増殖性疾患に対して臨床応用可能であることを検証する。
- (2) FISH 法を用い、EBV 感染細胞の表面抗原のみならず、細胞内顆粒・サイトカインを染色することにより細胞機能を解析し、未だ定かでない様々な EBV 関連リンパ増殖性疾患の疾患定義・発症病理を明らかにしていく。
- (3) FISH 法を用い、移植後リンパ増殖症や慢性活動性 EBV 感染症を代表とする EBV 関連リンパ増殖性疾患の迅速診断法・治療効果判定法を確立する。

3. 研究の方法

- (1) EBV 感染細胞株 (B 細胞・T 細胞株・NK 細胞株など) を用い、本法の至的条件を決定する。
- (2) 共焦点レーザー顕微鏡にて、EBER の核内の存在と抗原の細胞表面への表出を確認す

る。

- (3) 浮遊細胞中にどれだけの EBV 感染細胞が存在すれば検出できるか (最低検出感度) を決定する。

- (4) 慢性活動性 EBV 感染症・移植後リンパ増殖症を初めとした EBV 関連リンパ増殖性疾患の末梢血に応用する。

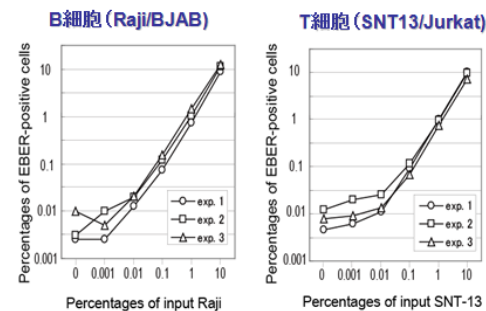
4. 研究成果

(1) FISH 法の確立

EBV 感染細胞株およびヒト末梢血単核球を用い、以下の手順で、FISH を行った。1) 蛍光色素 PE もしくは PC5 を用いて細胞表面抗原を標識、2) 細胞を固定、3) Tween20/PBS で処理、4) EBER に特異的な FITC 標識 PNA probe と hybridization、5) anti-FITC Alexa Fluor 488 標識抗体を用い蛍光強度を増幅、6) Flow cytometry により解析した。

EBV 陽性 B 細胞 3 株、T 細胞 2 株、NK 細胞 4 株を検討し、Flow cytometry/ISH 法で EBER と細胞表面抗原との多重染色に成功した。表面抗原と EBER の局在については共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。また、EBV 陽性 B 細胞株 Raji と EBV 陰性 B 細胞株 BJAB、もしくは EBV 陽性 T 細胞株 SNT13 と EBV 陰性 T 細胞株 Jurkat を様々な比率で混じ、EBV 陽性細胞の検出限界を検討した。その結果、EBV 陽性細胞混合比率 0.01% まで検出可能であった (図 1)。さらに、慢性活動性 EBV 感染症患者末梢血に対して、本法を応用し、患者末梢血リンパ球の数%が EBER1 陽性で、表面抗原解析より感染細胞の種類も同定できることを示した。

図1 FISH法の検出感度限界/EBV感染・非感染細胞を混合し解析

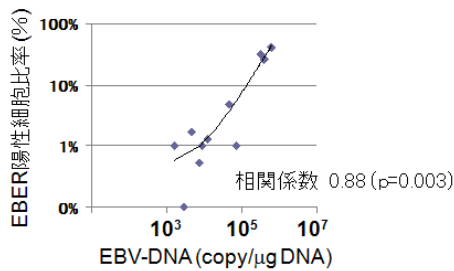


(2) FISH 法の EBV 関連 T/NK リンパ増殖症性疾患への応用

対象は慢性活動性 EBV 感染症 9 例、種痘様水疱症様リンパ腫 7 例、血球貪食性リンパ組織球症 4 例、全身性 EBV 陽性 T 細胞リンパ増殖症 2 例、NK/T 細胞リンパ腫 2 例、末梢性 T 細胞リンパ腫 1 例、アグレッシブ NK 細胞性白血病 1 例の計 26 例。FISH 法で末梢血単核球の表面抗原染色と核内 EBER 染色を連続施行後 flow cytometry で解析した。

0.15~67%のリンパ球がEBER陽性で、EBER陽性細胞率0.5%以上の症例は感染細胞の同定が可能だった。2例では2種類の細胞群にEBVの感染を認めた。種痘様水疱症様リンパ腫は $\gamma\delta$ T細胞5例、NK細胞1例、NKT細胞1例に感染を認めた。本法のEBER陽性細胞率とリアルタイムPCR法のEBV-DNA量に有意な相関を認めた(図2)。

図2 FISH法によるEBER陽性細胞とEBV-DNAコピー数との相関



一定以上の感染細胞が存在する場合、本法によるEBV感染細胞の同定/定量が可能である。特に複数のlineageの細胞にEBVが感染する疾患の診断に有用である。本法は既存の方法で診断の難しいEBV関連T/NKリンパ増殖性疾患の病理学的診断を補完し、疾患分類や発症病理の解析に役立つと考えた。

(3) FISH法のEBV関連移植後リンパ増殖症への応用

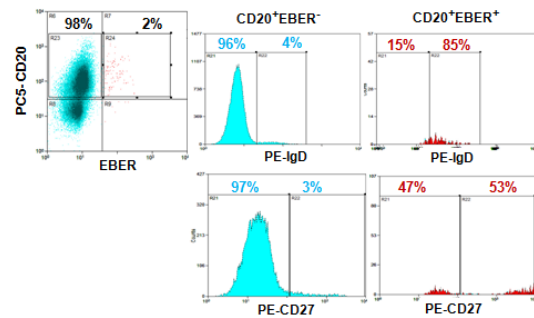
臓器・造血幹細胞移植後に、リアルタイムPCR法により血液中のEBV-DNA量増加が認められ、移植後リンパ増殖症が疑われた8症例を対象とした。症例の内訳はEBV関連移植後リンパ増殖症4例(骨髄移植後3例、臍帯血移植後1例)、移植後高EBV血症4例(いずれも生体肝移植後)。FISH法により、末梢血単核球の表面抗原染色および核内のEBER染色を連続して行った後、flow cytometryにて解析した。

全例で感染細胞の定量が可能であり、0.05~1.7%の末梢血リンパ球がEBV陽性であった。感染細胞の同定が可能であった症例では、CD20陽性B細胞にEBVの感染を認めた。細胞表面抗原よりメモリーB細胞が感染の主体であると考えられた(図3)。

骨髄移植後の1例ではリツキサンの使用したところEBV-DNAは減少した。FISH法により、非侵襲的な方法で移植後リンパ増殖症におけるEBV感染細胞の同定/定量が可能であった。臓器・造血幹細胞移植後における免疫抑制状態では、しばしばEBV関連リンパ増殖症が発症する。本症は、進行早く無治療な場合

予後不良な疾患であったが、近年では抗CD20ヒト型モノクローナル抗体(リツキサシ)などの分子標的治療剤が用いられるようになり予後が改善している。本法は移植後リンパ増殖症の早期診断、治療法の決定につながる有用な方法であると考えられた。

図3. 48歳女性 急性リンパ性白血病にて臍帯血移植後



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文] (計 13 件) (全て査読有)
- 1) Gotoh K, Ito Y, Maruo S, Takada K, Mizuno T, Teranishi M, Nakata S, Nakashima T, Iwata S, Goshima F, Nakamura S, Kimura H. Replication of Epstein-Barr virus primary infection in human tonsil tissue explants. *PLoS One* 6: e25490, 2011
 - 2) Ito Y, Kawabe S, Kojima S, Nakamura F, Nishiyama Y, Kaneko K, Kiuchi K, Ando H, Kimura H. Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27⁺ memory B cells in patients after transplantation. *J Gen Virol* 92:2590-5, 2011
 - 3) Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isobe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib induces apoptosis in T lymphoma cells and natural killer lymphoma cells independent of Epstein-Barr virus infection. *Int J Cancer* 129: 2263-2273, 2011
 - 4) Hoshino Y, Nishikawa K, Ito Y, Kuzushima K, Kimura H. Kinetics of Epstein-Barr virus load and virus-specific CD8⁺ T cells in acute infectious mononucleosis. *J Clin Virol* 50: 244-246, 2011
 - 5) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, Kimura H, Childs R, Cohen JI. Detection of EBV genomes in plasmablasts/plasma cells and non-B cells in the blood of most patients with EBV

- lymphoproliferative disorders using Immuno-FISH. Blood 116:4546-59, 2010
- 6) Ito Y, Takakura S, Ichiyama S, Ueda M, Ando Y, Matsuda K, Hidaka E, Nakatani A, Ishioka J, Nobori T, Sasaki M, Kimura H. Multicenter evaluation of prototype real-time PCR assays for Epstein-Barr virus and cytomegalovirus DNA in whole blood samples from transplant recipients" in its current form for publication in Microbiology and Immunology. Microbiol Immunol 54:516-22, 2010
 - 7) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Nakamura T, Kaneko K, Kiuchi T, Ando H, Kimura H. Immunologic and Virologic Analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients with Chronic High Epstein-Barr Viral Loads. J Infect Dis 202:461-469, 2010
 - 8) Funahashi Y, Iwata S, Ito Y, Kojima, Yoshikawa T, Hattori R, Gotoh M, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex Real-time PCR Assay for Quantifying BK Polyomavirus, JC Polyomavirus, and Adenovirus DNA Simultaneously. J Clin Microbiol 48: 825-30, 2010
 - 9) Iwata S, Wada K, Tobita S, Gotoh K, Ito Y, Demachi-Okamura A, Shimizu N, Nishiyama Y, Kimura H. Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection. J Gen Virol 90: 42-50, 2010
 - 10) Cohen JI, Kimura H, Nakamura S, Ko Y-H, Jaffe ES. Epstein-Barr virus Associated Lymphoproliferative Disease in Non-Immunocompromised Hosts. Ann Oncol 20: 1472-82, 2009
 - 11) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Nishiyama K, Iwata S, Iwatsuki K, Gotoh K, Kojima S, Ito Y, Nishiyama Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. J Infect Dis 200 : 1078-87, 2009
 - 12) Ito Y, Shibata-Watanabe Y, Kawada J, Maruyama K, Yagasaki H, Kojima S, Kimura H. Cytomegalovirus and Epstein Barr virus coinfection in three toddlers with prolonged illness. J Med Virol 81:1399-1402, 2009
 - 13) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, Kawada J, Yamauchi Y, Morishima T, Nishiyama Y, Kimura H. Multiplex real-time PCR for

the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. Microbiol Immunol 53:22-29, 2009

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 木村 宏. EB ウイルスリンパ関連 T/NK リンパ増殖性疾患. 第 43 回, 日本小児感染症学会、教育講演. 岡山 (2011.10)
- 2) Kimura H, Gotoh K, Maruo S, Takada K, Iwata S, Goshima F, Nishiyama Y, Ito Y. : *Ex vivo* model for Epstein-Barr virus primary infection using human tonsil tissue explants. XV International Congress of Virology, Sapporo, Japan (2011.9) .
- 3) Gotoh K, Ito Y, Ohta R, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Immunologic and Virologic analyses in Pediatric Liver Transplant Recipients. Restricted EBV genome expression in pediatric liver transplant recipients with chronic high Epstein-Barr viral loads. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9)
- 4) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Iwata S, Nishiyama Y. Noninvasive identification of EBV-infected lymphocyte subtypes in EBV-associated T/NK lymphoproliferative diseases. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9).
- 5) 木村 宏、河邊慎司、後藤研誠、伊藤嘉規、岩田誠子、西山幸廣: FISH 法を用いた EBV 関連リンパ増殖性疾患の非侵襲診断および病態解析: 第 57 回日本ウイルス学会学術集会、ワークショップ、東京 (2009.10)
- 6) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, Iwata S, Kawabe S, Gotoh K, Ito Y, Nishiyama Y: The 34th International Herpesvirus Workshop, July 26, 2009, Ithaca, USA (2009.7)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/virus/Kimura-ebv.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30303621

(2) 研究分担者

伊藤嘉規 (ITO YOSHINORI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20373491

(3) 連携研究者 なし