

## 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 3 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790954

研究課題名（和文）造血幹細胞移植後のヒトヘルペスウイルス 6 脳炎に対する適切な診断方法の確立

研究課題名（英文）Diagnosis of human herpesvirus 6 (HHV-6)-associated infection after hematopoietic stem cell transplantation.

研究代表者

谷口 亜裕子 (TANIGUCHI AYUKO)

高知大学・教育研究部医療学系・助教

研究者番号：30403885

研究成果の概要（和文）：ヒトヘルペスウイルス 6（HHV-6）は造血幹細胞移植後など宿主の免疫低下により再活性化し、脳炎などの各種感染症を引き起こす。しかし HHV-6 は遺伝的に宿主細胞の染色体に組み込まれて存在する様式があることが知られている。そこでウイルス DNA を検出することで HHV-6 感染症を診断するにあたっては、一般の HHV-6 再活性化による感染症と明確に区別される必要がある。本研究では、HHV-6 の染色体への組み込み機序を中心に検討した。HHV-6 の組み込みは染色体末端のテロメア領域に局限することが示唆された。組み込み HHV-6 を持つ個体では、通常の HHV-6 潜伏感染と比較すると、高コピー数の HHV-6 が検出されることから、造血幹細胞移植後早期に高コピー数の HHV-6 が検出される場合は、染色体に組み込まれた HHV-6 血症である可能性を考える必要がある。

研究成果の概要（英文）：Human herpesvirus 6 (HHV-6) infection is recognized as a potentially life-threatening condition affecting hematopoietic stem cell transplantation recipients due to reactivation of the virus from a latent state. For example, HHV-6 can cause acute encephalitis in immunocompromised patients. However, HHV-6 is unique among human herpesviruses because of its ability into chromosomes of the host cells. This entity, termed chromosomally integrated HHV-6 (CIHHV-6), has the potential to confound the diagnosis of active HHV-6 infection, since chromosomally integrated HHV-6 DNA sequences are inherited through the germline. Therefore, CIHHV-6 should be distinguishable from acute HHV-6 infection. In all CIHHV-6 cases studied, fluorescence in situ hybridization showed that HHV-6 DNA colocalized with telomeric regions of one allele on chromosomes. It is important to exclude CIHHV-6 before concluding that there is evidence of active HHV-6 infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・感染症内科学

キーワード：ウイルス学・感染症学・ヘルペスウイルス・染色体

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトヘルペスウイルス 6 (HHV-6) はサイトメガロウイルスと同様に同種造血幹細胞移植後の再活性化により各種感染症をひき起こすことが報告されている。同種造血幹細胞移植を受けた症例の約半数で、末梢血の HHV-6 DNA 量が増加しており、この HHV-6 再活性化により、発熱、皮疹、肺炎、骨髄抑制、脳炎など多彩な臨床症状を呈する。特に HHV-6 脳炎は、診断が遅れば短期記憶障害などの重大な後遺症を残し、QOL を大きく損なう例もある。このため HHV-6 関連感染症の病態解明はもとより、早期診断など HHV-6 感染症に関する研究が望まれていた。

一方、当該研究機関において、HHV-6 ゲノムが染色体に組み込まれて存在し得ること (Chromosomally integrated HHV-6: CIHHV-6)、しかもそれが遺伝的伝播を受けることが世界に先駆けて発見された。他のヘルペスウイルスでは見られない新発見であった。

このような HHV-6 ゲノムの遺伝的伝播を受けている個体は全人口の 1-3% いると推測されている。CIHHV-6 の個体は常に HHV-6 高 DNA 血症の状態であり、そのような CIHHV-6 を持つ患者が移植後 HHV-6 脳炎など HHV-6 感染症の発症にどう関係しているかは全く不明であり、HHV-6 高 DNA 血症のため、不要な ganciclovir や foscarnet の投与が行なわれる例が多いと推測される。即ち、移植後患者が CIHHV-6 を有しているかどうかを判別することは臨床的に極めて重要であるが、そのような検査はなされていないのが現状である。

また、海外からの報告では、CIHHV-6 ドナーから移植されたレシピエントに HHV-6 ウイルス血症が起り、「活動性の HHV-6 感染症」と“誤診”を受け、不要な抗ウイルス薬を投与されることに警鐘を鳴らしている。

## 2. 研究の目的

全人口の 1-3% が CIHHV-6 陽性で、血中はもとより髄液中にも常に高コピー数の HHV-6 ゲノムを有している。この状態を「活動性 HHV-6 感染症」と間違われている症例が少なからず存在すると考えられ、CIHHV-6 の除外診断なしに移植後 HHV-6 感染症と診断することは避けなければいけない。「CIHHV-6」と「活動性 HHV-6 感染症」との鑑別診断が臨床の場でルーチンに行なわれる検査体制が構築される必要がある。

そのためには、HHV-6 の染色体への組み込み機序が解明されることが不可欠である。本研究では主に「CIHHV-6」が起こる機序について解析した。

## 3. 研究の方法

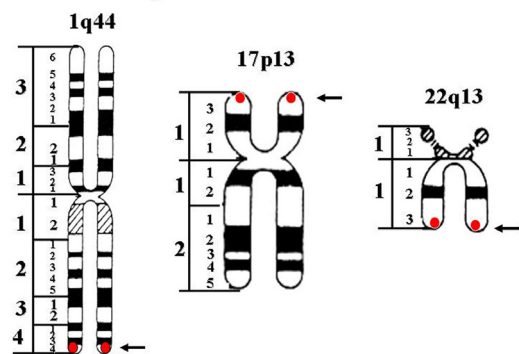
CIHHV-6 の検出には、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法を用いた。分離した細胞を短期間培養し、コルセミドを加えた。その後、塩化カリウムで低張処理し、カルノア固定を行なった。細胞をスライドグラス上に滴下し、標本作製した。*in situ* hybridization を行なうプローブとして 6.9 kb の HHV-6 *Bam*HI フラグメントを使用した。

CIHHV-6 の機序を詳細に解析するには、*in vitro* での系が必要である。CIHHV-6 感染細胞を不死化させるために、*Herpesvirus saimiri* を感染させ、細胞株の樹立を試みた。

## 4. 研究成果

CIHHV-6 の染色体への組み込み部位として、これまでに本邦では、1 番染色体 1q44、22 番染色体 22q13 のみの報告であるが、欧米では 17 番染色体 17p13 の報告も見られる。(下図)

HHV-6 Integration into Human Chromosomes

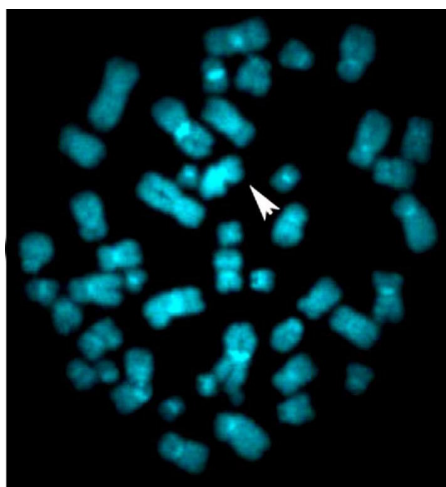
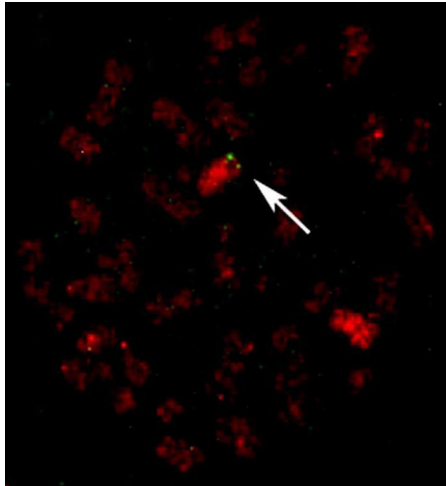


本研究において、さらに 3 例の CIHHV-6 を見出した。HHV-6 の染色体への組み込み部位は、2 例が 1 番染色体 1q44 で、1 例が X 染色体 p22 であった。

これまで本邦から HHV-6 の染色体への組み込み部位の報告は多くはないが、1q44 は海外からの報告はなく、本邦の CIHHV-6 として染色体の 1q44 が関係していると示唆される。CIHHV-6 は遺伝的伝播を受けることが当該研究機関において世界で最初に発表されているが、HHV-6 の染色体への組み込み部位が人種により違いがあるのかどうか、今後の検討が必要である。

一方、本研究で提示された X 染色体 p22 の報告はこれまでに国内外でなく、CIHHV-6 の組み込み部位として初めての発見である。(次図)

これら HHV-6 の組み込み部位により、CIHHV-6 の臨床症状の発現に差異があるかどうかは現時点で不明である。



「上図」FISH法によるCIHHV-6の検出陽性シグナルがX染色体短腕(Xp22)で双方の染色体上に対照的に認められる(矢印)。

「下図」DAPI (Propidium iodide and diamidino-2-phenylindole) 染色による対比染色。

矢印はX染色体を示す。

これらCIHHV-6陽性細胞に*Herpesvirus saimiri*を感染させて細胞株の樹立に成功した。得られた細胞株は、CD2、CD3、CD4、CD5陽性あるいはCD2、CD3、CD8、CD5陽性であり、CD4<sup>+</sup>T細胞株とCD8<sup>+</sup>T細胞株の2種類のCIHHV-6陽性細胞株を得ることができ、今後のCIHHV-6研究に役立つ*in vitro*系を確立できた。

このように、HHV-6の染色体への組み込み部位はすべて染色体のテロメア近郊であることが示唆された。FISH法により、HHV-6ゲノムが22番染色体q13のテロメア側に組み込まれていることが証明されている細胞株

であるKatataを解析系に用いた。Katata細胞におけるHHV-6組み込み様式をさらに詳細に解析するため、Katata DNAを*Pst*I制限酵素で消化後、self ligationを行いHHV-6ゲノム末端のDR領域に設定したプライマーによりinverse polymerase chain reaction (PCR)を行なった。このPCR産物のTAクローニングを行ない、DNA配列をBLASTサーチにて解析した。今回のinverse PCR法を用いた解析においても、22番染色体q13のDNA配列が結果として得られた。また22番染色体q13のみならず、21番染色体q22のテロメア側のDNA配列も一部得られ、同部位にもHHV-6ゲノム部分が組み込まれている可能性が示唆された。このように、CIHHV-6ではHHV-6は感染細胞のテロメア部位に組み込まれることが確認された。

またCIHHV-6の場合、HHV-6ゲノムの両末端がどこまで保持されているのか、その詳細は明らかにされていない。そこでKatata細胞株を使って解析を行なった。HHV-6ゲノム末端側に位置するU98遺伝子の末梢側にプライマーを設定し、PCRを行なったところ、DNA配列の増幅が確認された。CIHHV-6では末端のゲノムも保持されていることが証明された。

CIHHV-6を持つ個体では、「通常のHHV-6潜伏感染」と比較すると、高コピー数のHHV-6が検出されることから、造血幹細胞移植後早期に高コピー数のHHV-6が検出される場合は、CIHHV-6である可能性を考える必要がある。

## 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4件)

- ① Yumiko Hashida, Yuiko Nemoto, Masayuki Imajoh, Masanao Murakami, Ayuko Taniguchi, Naoki Komatsu, Akihito Yokoyama, Masanori Daibata. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein 6 gene in multiple myeloma. 査読有, *Oncology Reports*. 27, 2012, 825-830.
- ② Takayuki Ikezoe, Jing Yang, Chie Nishioka, Mayuka Isaka, Naomi Iwabu, Mizu Skai, Ayuko Taniguchi, Goichi Honada, Akihito Yokoyama. Thrombomodulin enhances the anti-fibrinolytic and anti-leukemic effects of all-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. 査読有, *Experimental Hematology*, 2012. 印刷中.
- ③ Takayuki Ikezoe, Asako Takeuchi, Ayuko

Taniguchi, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Recombinant human soluble thrombomodulin counteracts capillary leakage associated with engraftment syndrome. 査読有, Bone Marrow Transplantation, 46, 2011, 616-618.

- ④ Yuiko Nemoto, AyukoTaniguchi, Mikio Kamioka, Yoko Nakaoka, Makoto Hiroi, Akihito Yokoyama, Hideaki Enzan, Masanori Daibata. Epstein-Barr virus-infected subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma associated with methotrexate treatment. 査読有, International Journal of Hematology, 92, 2010, 364-368.

〔学会発表〕（計4件）

- ① Ayuko Taniguchi, Yuiko Nemoto, Naoki Komatsu, Akihito Yokoyama, Masanori Daibata. Promoter methylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in multiple myeloma. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日、名古屋国際会議場（名古屋市）
- ② Mizu Sakai, Tetsuya Kubota, Ayuko Taniguchi, Yoshio Kuwayama, Takayuki Ikezoe, Kazuto Togitani, Akihito Yokoyama. Diffuse alveolar hemorrhage associated with lenalidomide in a patient with multiple myeloma. 第73回日本血液学会学術集会、2011年10月14日、名古屋国際会議場（名古屋市）
- ③ 根来暁子、井坂真由香、池添隆之、酒井瑞、谷口亜裕子、桑山善夫、砥谷和人、窪田哲也、横山彰仁、大串文隆、関節リウマチの治療中に発症した MALT リンパ腫に対して rituximab 投与が関節リウマチにも奏功した1例、第104回日本内科学会四国地方会、2011年5月8日、高知市文化プラザかるぽーと（高知市）
- ④ Ayuko Taniguchi, Yuiko Nemoto, Kentaro Bandobashi, Makoto Hiroi, Yoko Nakaoka, Hideaki Enzan, Akihito Yokoyama, Masanori Daibata. Epstein-Barr virus-associated subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma arising during methotrexate therapy for rheumatoid arthritis. 第72回日本血液学会学術集会、2010年9月25日、パシフィコ横浜会議センター（横浜市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

谷口 亜裕子 (TANIGUCHI AYUKO)  
高知大学・教育研究部医療学系・助教  
研究者番号：30403885