

20112804/B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H22-難治-一般-080)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究

平成 22~23 年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 24 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

(H22-難治-一般-080)

慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究

平成 22~23 年度 総合研究報告書

研究代表者 藤原成悦

平成 24 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告	
慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究 藤原成悦	1
II. 分担研究報告	
1. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の臨床像解析と新規治療法開発に関する研究 新井文子	11
2. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法による新規慢性活動性 EBV 感染症診断法 キットの作成と普及に関する研究 木村宏	21
3. 慢性活動性 EB ウイルス感染症における EBV 感染細胞クローンに関する研究 清水則夫	27
4. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の遺伝的素因に関する研究 森尾友宏	35
5. 慢性活動性 EB ウイルス感染症の全国調査 (2005～2010 年) 脇口宏	39
6. CAEBV モデルマウスの開発と応用 藤原成悦	45
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	53
IV. 研究成果の刊行物・別刷	61

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

慢性活動性 EB ウイルス感染症の診断法及び治療法確立に関する研究

研究代表者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症 (CAEBV) の臨床像解析により、成人例の診断数が近年増加傾向にあること、移植を受ける患者が増加し予後がやや改善傾向にあること、成人例は小児例と比べて予後がやや悪いことなどが示唆された。L-asplによる CAEBV 初期治療は大多数の患者で効果が認められなかったが、EBV 感染細胞の arginine synthetase 活性が低い症例では有効である可能性が示された。骨髄非破壊的造血幹細胞移植は、移植時の病勢が非活動性の症例で良好な結果が得られた。CAEBV を含めた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患全体の解析により、CAEBV では CD4+T 細胞及び NK 細胞、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 (EBV-HLH) では CD8+T 細胞、種痘様水疱症では  $\gamma\delta$ T 細胞、蚊刺過敏症では NK 細胞に感染している例が多く、EBV 感染細胞のフェノタイプが病態と強く関連することが示された。8 歳以上の発症と肝障害の存在が生命予後不良因子であり、移植を受けた患者は生命予後が良いことが示された。また、移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生存率が有意に高かった。一部の CAEBV 患者において、単一の EBV 感染細胞に由来するクローンでありながら、T 細胞と NK 細胞にまたがる幅広いフェノタイプを示す細胞が認められたことから、CAEBV 患者では極めて未熟なリンパ球に EBV が感染する可能性が示された。EBV 感染 T 或いは NK 細胞の全身的な増殖を再現する CAEBV 及び EBV-HLH モデルマウスが開発され、新規治療法の評価が可能となった。CD137、NF- $\kappa$ B、P 糖蛋白質、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CD4+細胞などを標的分子とする新規治療法の可能性が示された。

研究分担者

新井文子（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・講師）

木村宏（名古屋大学大学院医学系研究科・准教授）

清水則夫（東京医科歯科大学難治疾患研究所・准教授）

森尾友宏（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授）

脇口宏（高知大学教育研究部医療学系・教授・医学部長）

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス (EBV) 感染症

(CAEBV) は EBV 感染 T 或いは NK 細胞の増殖を根本的な病態とし、遷延或いは再発する伝染性単核症様症状を呈する。発症機構は不明であり、造血幹細胞移植以外の根治療法はない。本研究では、CAEBV の診断法及び治療法の確立を最終目標として、臨床像の解析、新規治療法の探索的臨床研究、T 及び NK 細胞における EBV 感染成立機構及び EBV による細胞増殖誘発機構の解析、モデルマウス作成による発症機構解析と新規治療法の評価、ゲノム解析による原因遺伝子の探索などを行った。

## B. 研究方法

### 1. CAEBV の臨床像解析

#### 1) CAEBV の治療実態及び予後に関するアンケート調査

小児科、皮膚科、内科、耳鼻咽喉科を対象に、約 2000 の診療科にアンケート用紙を送付し、CAEBV の臨床症状、検査結果、病態、経過、治療内容、予後について調査した。

#### 2) 成人例 CAEBV の臨床像について

東京医科歯科大学血液内科で治療した成人 CAEBV 患者 5 例及び文献から抽出した成人患者 19 例を対象とした。

### 2. CAEBV 治療法に関する臨床的研究

#### 1) L-asparaginase (L-asp) による CAEBV 初期治療の探索的臨床研究

十分な腎機能をもつ成人 CAEBV 患者 5 例に対し、L-asp (6,000 U/m<sup>2</sup>) を一日一回、隔日で 7 回投与した。

#### 2) 成人 CAEBV 患者に対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植の効果に関する検討

東京医科歯科大学付属病院において骨髄非破壊的造血幹細胞移植を受けた 7 症例を後方視的に解析した。年齢は 20 歳から 62 歳。前処置は、3 例が Flu+Mel+TBI、

4 例が Flu+Mel+ATG 。

### 3. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法

Peptide nucleic acid (PNA)を用いた in situ hybridization と蛍光標識抗体による細胞表面染色を組み合わせ、フローサイトメーターで EBV 感染細胞を同定・定量した。

### 4. EBV による T 及び NK 細胞感染の成立機構及び感染細胞の増殖誘発機構の解析

#### 1) CAEBV 患者由来 EBV 感染 T 及び NK 細胞のクローン解析

患者より末梢血単核細胞を分離し、10% ヒト血清と 700 IU/ml IL-2 を添加した培養液を用い、96 well microplate により細胞クローンを樹立した。

#### 2) NF-κB 及び CD137 の役割について

CAEBV 患者末梢血中の EBV 感染 T 及び NK 細胞と樹立された EBV 感染 T 及び NK 細胞株を用いて、NF-κB 及び CD137 の発現と活性を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法などにより調べた。またヒト T 細胞株に EBV を感染させた後の上記 2 蛋白質の発現を調べた。

#### 3) CAEBV における P 糖蛋白質発現

P 糖蛋白質の発現は RT-PCR 法とウェスタンブロットティングにより検出した。P 糖蛋白質による薬剤排出能は Rhodamine efflux assay で検討した。

#### 4) CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療応用への検討

血清中のサイトカイン濃度は ELISA 法で測定した。細胞が産生するサイトカインは RT-PCR 法及び ELISA 法で測定した。

### 5. CAEBV モデルマウスの作成と解析

CAEBV 及び EBV-HLH 患者由来末梢血単核細胞を NOG マウスに経静脈的に移植した。また、末梢血単核細胞中の各細胞分画やその様々な組み合わせについて

も移植実験を行った。

## 6. CAEBV 発症における遺伝的背景の探索

分類不能型免疫不全症に合併して発症した CAEBV 患者 2 名について、ゲノム DNA のうち蛋白質をコードする部分（エクソン）の全体（エクソーム）の塩基配列を決定した。

### （倫理面への配慮）

CAEBV 患者由来試料を利用する研究は、国立成育医療研究センター及び国立感染症研究所倫理委員会の承認を得て行った。臨床研究については、東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認を得た。「CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討」は UMIN-CTR へ登録した（UMIN 試験 ID：UMIN000003498）。患者本人あるいは保護者に対して、研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得した。試料および臨床情報は匿名化され、患者の個人情報は厳重に管理された。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。国立成育医療研究センター及び国立感染症研究所の動物実験委員会の承認を得た。

## C. 研究結果

### 1. CAEBV の臨床像解析

#### 1) CAEBV の治療実態及び予後に関する調査

2005~2010 年度の死亡率は 32% であり、2001~2004 年度（48%）と比較して低下傾向にあった。造血幹細胞移植は 59% の症例に行われ、2001~2004 年度の 35% と比較して増加していた。また、骨髄非破

壊的前処置による移植が増加した。

#### 2) 成人例 CAEBV の臨床像について

成人発症患者 19 例を後方視的に解析し小児例と比較したところ、臨床症状と検査所見に差は認められなかったが、経過が早く死亡率が高いこと、T 細胞感染型が多いなどの特徴が判明した。

#### 3) EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の臨床像解明

名古屋大学医学部において診断した CAEBV 80 例、EBV-HLH 15 例、蚊刺過敏症 9 例、種痘様水疱症 4 例を対象とした。50 例が男性、58 例が女性であり、64 例が T 細胞に、44 例が NK 細胞に感染していた。CAEBV では CD4+T 細胞、NK 細胞が多いものの、CD8+T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞に主として感染している症例も認められた。一方、EBV-HLH では CD8+T 細胞が、蚊刺過敏症では NK 細胞が、種痘様水疱症では  $\gamma\delta$ T 細胞が、主たる感染細胞であった。観察期間中 47 例が臓器合併症などで死亡し、13 例は明白な白血病/リンパ腫に進展した。59 例が造血幹細胞移植を受け、そのうち 66% が生存していた。多変量解析により、8 歳以上の発症、肝障害が独立した生命予後不良因子であり、移植を受けた患者は生命予後が良かった。移植を受けた 59 例のうち 39 例（66%）が解析終了時に生存していた。移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生存率が有意に高かった。

#### 2. CAEBV 治療法に関する臨床的研究

##### 1) L-asp による CAEBV 初期治療の探索的臨床研究

成人発症の CAEBV 5 例に対して L-asp の効果を検討したところ、有効は 1 例のみであった。L-asp は、EBV 感染細胞の Asparagine synthetase 産生が低い症例で有

効であることが示唆された。

## 2) 骨髄非破壊的造血幹細胞移植の効果に関する検討

成人発症の CAEBV 7 症例に対し、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植を行ったところ、移植時に病勢が非活動性であった 5 例は全例寛解したが、活動性であった 2 例は死亡した。また前処置として抗 T 細胞抗体を投与した 3 例はいずれも EBV 関連 B リンパ増殖性疾患を発症した。

## 3. 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法の診断への応用

この方法を様々な EBV 関連疾患の診断に応用したところ、全例の単核球中 0.3-67% に EBER 陽性細胞を認め、EBER 陽性細胞率 0.5% 以上の 23 症例では感染細胞の同定が可能だった。

## 4. EBV による T 及び NK 細胞感染の成立機構及び感染細胞の増殖誘発機構の解析

### 1) CAEBV 患者由来 EBV 感染 T 及び NK 細胞のクローン解析

フェノタイプが異なる複数の細胞クローンに EBV が感染している患者 2 名が見いだされ、詳しい解析を行った。1 名では、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NK 細胞の 3 種類の細胞に EBV が感染していたが、EBV DNA の末端繰り返し配列の解析により、これらは全て一つの EBV 感染細胞に由来するクローンであることが判明した。もう 1 名では、CD4+CD8- 及び CD4-CD8+ の二つのタイプの  $\alpha\beta$ T 細胞に加え  $\gamma\delta$ T 細胞に EBV が感染していたが、末端繰り返し配列の結果やはり単一クローンであった。これらの結果より、CAEBV 患者では、T 細胞と NK 細胞が分化する以前を含めた極めて未熟なリンパ球に EBV が感染し、そこから様々なフェノタイプに分化することが示唆された。

### 2) CD137 の役割について

CAEBV 患者の EBV 感染 T 及び NK 細胞において CD137 発現が亢進していること、EBV 感染により、LMP1 依存的にヒト T 細胞株に CD137 発現が誘導されること、CD137 リガンドを発現する細胞と共培養すると EBV 感染 T 及び NK 細胞のアポトーシスが抑制されることが示され、EBV による CD137 発現の誘導が、感染 T 及び NK 細胞の生存に重要な役割を果たすことが示唆された。

### 3) NF- $\kappa$ B の役割について

CAEBV 患者の EBV 感染 T 及び NK 細胞において転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化していること、EBV 感染により LMP1 依存的にヒト T 細胞株で NF- $\kappa$ B が活性化されること、CAEBV モデルマウスへの NF- $\kappa$ B 阻害薬 Bortezomib 投与により、血中 EBV DNA 量が減少することが示され、NF- $\kappa$ B が治療標的として有用であることが示唆された。

### 4) CAEBV における P 糖蛋白質発現

CAEBV 患者の EBV 感染 T 及び NK 細胞では、薬物の細胞外排出に関与する P 糖蛋白質の発現が亢進していること、EBV 感染によりヒト T 細胞株で P 糖蛋白質の発現が上昇すること、P 糖蛋白質の阻害薬 Cyclosporin A により Doxorubicin の EBV 感染 T 及び NK 細胞に対するアポトーシス誘導が促進されることが示され、P 糖蛋白質が CAEBV の化学療法抵抗性に関与することが示唆された。

### 5) CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療応用への検討

CAEBV 患者血清では IL-6、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  の濃度が対照に比べ有意に高く、臨床経過、重症度と相関すること、また抗 TNF- $\alpha$  抗体 infliximab と抗 IL-6 抗体

tocilizumab は VP16 との併用により細胞死を相乗的に亢進させることが示された。以上から、これらの炎症性サイトカインは CAEBV 病勢のバイオマーカーおよび治療標的として有用と考えられた。

## 5. CAEBV モデルマウスの作成と解析

### 1) EBV 感染 T 及び NK 細胞の増殖における CD4+ T 細胞の役割の解明

CAEBV 患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植して作成されるモデルマウスにおける EBV 感染細胞生着条件の検討から、EBV 感染 T 及び NK 細胞の増殖には CD4+ T 細胞が必須の役割を果たすことが示され、実際に感染細胞が生着したマウスに OKT-4 抗体を投与し CD4+ T 細胞を除去すると血中 EBV DNA 量が減少することが示された。以上より、CD4+T 細胞を標的とした新しい CAEBV 治療の可能性が示された。

### 2) EBV-HLH モデルマウスの作成

EBV-HLH 患者末梢血単核細胞を移植した NOG マウスでは、EBV 感染 CD8<sup>+</sup> T 細胞が増殖し、IFN- $\gamma$ 、IL-8、RANTES などの高サイトカイン血症が引き起こされた。この EBV-HLH モデルマウスを CAEBV モデルマウスと比較すると、EBV 感染細胞の増殖が早く急激に重篤な状態に陥ること、血中サイトカインレベルがより高いこと、出血性病変が胸腔や腹腔に認められること、脾臓と肝臓で EBV 感染 B 細胞が認められること等の違いが認められた。

## 6. CAEBV 発症における遺伝的背景の探索

分類不能型免疫不全症患者 199 名中 4 名が CAEBV を発症したが、これらの患者で X 連鎖リンパ増殖症の原因遺伝子、*SAP* と *XIAP* の変異は認められなかった。

また、既知の分類不能型免疫不全症原因遺伝子についても変異が認められなかった。そこで、2名の患者において全エクソン解析を行ったところ 1名から原因と考えられる変異を同定し、現在確認作業を行っている。

## D. 考察

CAEBV 成人例が小児例よりやや予後が悪いことが示唆されたが、成人例では NK 細胞型と比べて予後が悪い T 細胞型の CAEBV が多いことも注目される。成人例と小児例の疾患としての同一性の問題や、成人例に適した治療プロトコールの開発などについて今後検討する必要があると考えられた。CAEBV 成人例の診断数が近年増加傾向にあることには、本疾患に関する知識が内科医の間にも浸透してきたことも関わっていると考えられる。

蛍光標識抗体により染色されたリンパ球表面マーカーと *in situ hybridization* により染色された EBV RNA (EBER) をフローサイトメーターにより同時に検出する高感度特異的 EBV 感染細胞同定法が、CAEBV を含めた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断に有用であることが本研究で示されてきた。EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患 108 例の解析により、CAEBV では CD4+T 細胞及び NK 細胞、EBV-HLH では CD8+T 細胞、種痘様水疱症では  $\gamma\delta$ T 細胞、蚊刺過敏症では NK 細胞に感染している例が多く認められ、EBV 感染細胞のフェノタイプが病態と強く関連することが示された。また、8歳以上の発症及び肝障害が生命予後不良因子であり、移植を受けた患者は生命予後が良いことが判明した。さらに、移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生

存率が有意に高かった。これらの知見は、治療方針の決定や予後判定に重要な情報を与えると考えられる。

L-aspによるCAEBV初期治療は大多数で無効であったが、arginine synthetase活性が低い症例で効果が高いことが示唆された。成人例CAEBVに対する骨髄非破壊的造血幹細胞移植では、移植時の病勢が非活動性であることが、良好な結果を得るために重要であることが示された。また、前処置として抗T細胞抗体を用いると移植後のEBV関連Bリンパ増殖性疾患が高率に発症するため留意すべきと考えられた。

通常のT及びNK細胞はEBV受容体であるCD21を発現しないため、これらの細胞への感染メカニズムの解明が重要課題となっている。その一方で、未熟Tリンパ球にはCD21が発現されているという知見も報告されている。今回、CAEBV患者から異なるフェノタイプをもつ複数のEBV感染T及びNK細胞クローンが樹立され、これらの細胞が一つのEBV感染細胞に由来することが示されたため、CAEBV患者ではT細胞とNK細胞が分化する以前を含めた極めて未熟なリンパ球にEBVが感染し、その後複数のフェノタイプに分化したことが示唆された。これらの知見は、T及びNK細胞へのEBV感染メカニズムやCAEBV発症機構を考える上で重要な材料となると考えられる。

EBV感染T及びNK細胞の解析から、CD137やNF- $\kappa$ Bが感染細胞の生存と増殖に重要な役割を果たすことが示され、これらの分子を標的とする新しいCAEBV治療法の可能性が示された。P糖蛋白質の発現がCAEBVの化学療法剤に対する抵抗性の原因となっている可能性が示され

たため、P糖蛋白質の機能阻害により、治療効果を改善できる可能性が示された。IL-6やTNF- $\alpha$ などはCAEBV患者末梢血で上昇していることが知られているが、これらのサイトカインに対する特異抗体により、EBV感染T及びNK細胞のアポトーシスが亢進したことは、これらを標的とする新規治療法の可能性を示している。

モデルマウスを用いた研究からは、EBV感染細胞の増殖がCD4+T細胞に依存することが立証された。現在、CD4+T細胞をさらにサブフラクションに分画し、EBV感染T及びNK細胞の増殖を支持するフラクションを探索している。またCD4+T細胞が産生するサイトカインなどの中から、これらの細胞の増殖を支持する因子を探している。このようなサブフラクションまたはサイトカインは、新規CAEBV治療法の標的として有望と考えられる。

分類不能型免疫不全症に合併して発症したCAEBV患者の1名から、発症への関与が強く疑われる遺伝子が同定されたことは、免疫不全症と合併しない通常のCAEBVについても、遺伝子変異に起因する微細な免疫不全が発症に関わる可能性を示している。これらの症例についてもエクソーム解析を実施する計画である。

## E. 結論

CAEBV臨床像の解析により、成人例の診断数が近年増加傾向にあること、移植を受ける患者が増加し予後がやや改善傾向にあること、成人例は小児例と比べて予後がやや悪いことなどが示唆された。L-aspによるCAEBV初期治療は大多数の患者で効果が認められなかったが、EBV

感染細胞の arginine synthetase 活性が低い症例では有効である可能性が示された。骨髄非破壊的造血幹細胞移植は、移植時の病勢が非活動性の症例で良好な結果が得られた。CAEBV を含めた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患全体の解析により、CAEBV では CD4+T 細胞及び NK 細胞、EBV-HLH では CD8+T 細胞、種痘様水疱症では  $\gamma\delta$ T 細胞、蚊刺過敏症では NK 細胞に感染している例が多く、EBV 感染細胞のフェノタイプが病態と強く関連することが示された。8 歳以上の発症と肝障害の存在が生命予後不良因子であり、移植を受けた患者は生命予後が良いことが示された。また、移植時の年齢および疾病の活動性が低い患者の生存率が有意に高かった。一部の CAEBV 患者において、単一の EBV 感染細胞に由来するクローンでありながら、T 細胞と NK 細胞にまたがる幅広いフェノタイプを示す細胞が認められたことから、CAEBV 患者では極めて未熟なリンパ球に EBV が感染する可能性が示された。EBV 感染 T 或いは NK 細胞の全身的な増殖を再現する CAEBV 及び EBV-HLH モデルマウスが開発され、新規治療法の評価が可能となった。CD137、NF- $\kappa$ B、P 糖蛋白質、IL-6、TNF- $\alpha$ 、CD4+T 細胞などを標的分子とする新規治療法の可能性が示された。

## F. 健康危機情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Arai, A., Imadome, K., Fujiwara, S. and Miura O. Autoimmune hemolytic anemia accompanied by reactivation of an

Epstein-Barr virus infection with suppressed CTL response to EBV-infected cells in an elderly man. *Inter Med* 49: 325-329, 2010.

2) 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.

3) Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Takahashi M, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis. *Int J Hematol* May;93(5):602-9, 2011.

4) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10): e1002326, 2011.

5) Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Inter Med* 51(7):777-82, 2012.

6) Nomura K, Kanegane H, Otsubo K, Wakiguchi H, Noda Y, Kasahara Y, Miyawaki T.: Autoimmune lymphoproliferative syndrome mimicking chronic active Epstein-Barr virus infection. *International*

- Journal of Hematology, 93, 760-764, 2011.
- 7) Ishimura M, Takada H, Doi T, Imai K, Sasahara Y, Kanegane H, Nishikomori R, Morio T, Heike T, Kobayashi M, Ariga T, Tsuchiya S, Nonoyama S, Miyawaki T, Hara T. Nationwide Survey of Patients with Primary Immunodeficiency Diseases in Japan. *J Clin Immunol*. 31:968-76, 2011.
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) Nakamura M, Iwata S, Kimura H, Tokura Y. Elevated expression of activation-induced cytidine deaminase in T and NK cells from patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Eur J Dermatol* 21: 780-2, 2011
- 11) Yamaguchi M, Kwong YL, Kim WS, Maeda Y, Hashimoto C, Suh C, Izutsu K, Ishida F, Isobe Y, Suzumiya J, Kodama T, Kimura H, Hyo R, Nakamura S, Oshimi K, Suzuki R. Phase II study of SMILE chemotherapy for newly-diagnosed stage IV, relapsed or refractory extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: the NK-cell Tumor Study Group (NKTSG) study. *J Clin Oncol* 29: 4410-4416, 2011.
- 12) Takahashi E, Ohshima K, Kimura H, Hara K, Suzuki R, Kawa K, Eimoto T, Nakamura S. Clinicopathological analysis of the age-related differences in patients with Epstein-Barr virus-associated extranasal NK/T-cell lymphoma with reference to the relationship with aggressive NK cell leukemia and chronic active Epstein-Barr virus infection-associated lymphoproliferative disorder. *Histopathology* 59:660-671, 2011
- 13) Iwata S, Saito T, Ito Y, Kamakura M, Gotoh K, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 103:375-8, 2012
- 14) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 119:673-86, 2012
- 15) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK-cell type chronic active Epstein-Barr virus (EBV) disease in adults: an underlying condition for EBV-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol* 65: 278-82, 2012.
- 16) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected  $\gamma\delta$  T-cells. *J Invest Dermatol* in press.
2. 著書

なし

### 3. 学会発表

(国際学会)

- 1) Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako Arai, Atsuko Nakagawa, Fuyuko Kawano, Sayumi Ichikawa, Hiroyuki Nakamura, Osamu Miura, Mamoru Ito, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto, and Shigeyoshi Fujiwara. A xenotransplant model of chronic active Epstein-Barr virus (EBV) infection by use of NOG mice. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases. Sep. 7, 2010, Birmingham, UK.
- 2) Yoshimori M, Arai A, Imadome K, Ludan W, Fukuda T, Koyama T, Fujiwara S, Miura O. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus (EBV) infection and activates NF- $\kappa$ B contributing to the development of EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disease. Annual Meeting of the European Hematology Association, June 2011, London.
- 3) Arai A, et al. L-asparaginase Monotherapy for T- and NK-Cell Type of Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection in adults: A Pilot Study. Annual Meeting of the American Association for Hematology, November 2011, San Diego.
- 4) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Komano J, Fujiwara S. Novel mouse senograft models of CAEBV and EBV-HLH reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV. International Congress of Virology, Sep 11-16, 2011, Sapporo.
- 5) Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome,

Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. P-Glycoprotein expression is enhanced in Epstein-Barr virus (EBV)-infected T or NK cells and may cause drug resistance of chronic active EBV infection. 15th Congress of European Hematology Association, June 2010, Barcelona.

6) Ayako Arai, Yuko Watanabe, Ken-Ichi Imadome, Mayumi Takahashi, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. Clinical features and response to chemotherapy of chronic active Epstein-Barr virus infection in adulthood: a retrospective analysis. 15th Congress of European Hematology Association, June 2010, Barcelona.

7) Ayako Arai, Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Takatoshi Koyama, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. NF- $\kappa$ B Is Constitutively Activated in EBV-infected T or NK Cells and Can Be a Molecular Target for EBV-positive T/NK-cell Lymphoproliferative Disease Treatment. 52nd Annual meeting of American society of Hematology December 2010, Orlando.

8) Ayako Arai, Mayumi Yoshimori, Ken-Ichi Imadome, Wang Ludan, Tetsuya Fukuda, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus (EBV) infection and activates NF- $\kappa$ B contributing to the development of EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disease. 16th Congress of European Hematology Association, June 2011, London.

9) Morio T. Dissection of Common Variable immunodeficiency With Distinct Phenotype.

2011 Pediatric Academic Societies & Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting. Denver, Colorado, USA. April 2011.

10) Ng SB, Yan J, Huang G, Selvarajan V, Tay J, Lin B, Bi C, Tan J, Kwong YL, Shimizu N, Aozasa K, Chng W. Dysregulated MicroRNAs Affect Pathways and Targets of Biological Relevance in Nasal-type Natural Killer / T-cell Lymphoma. *Blood*. 118(18):4919-4929. 2011 Nov 3.

11) 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*. 91(Pt1):42-50, 2010.

12) 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).

13) Kawada J, Iwata S, Yano S, Gotoh K, Ito Y, Fujiwara S, Isobe Y, Sugimoto K, Nishiyama Y, Kimura K. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr virus & Associated Diseases, Birmingham, UK (2010.9)

(国内学会)

1) 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、

市川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、駒野淳、山本直樹、藤原成悦. EB ウイルス関連血球貪食症候群モデルマウスの作製と解析. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月 9 日、徳島.

2) 仁多美奈子、新井文子、今留謙一、吉森真由美、王路丹、小山高敏、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修. EBV infection to T or NK cells activates NF- $\kappa$ B leading to lymphoproliferative diseases development. 日本血液学会学術集会、2011 年 9 月.

3) 新井文子、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修. EB ウイルスは T あるいは NK 細胞に感染後 NF- $\kappa$ B 活性化を介して腫瘍発症に寄与する. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3-5 日、名古屋.

4) 堂野純孝、富田 理、久川浩章、佐藤哲也、高杉尚志、前田明彦、阿部孝典、脇口 宏: 移植 15 カ月後、髄液中に LGL を認めた EBV 関連 NK リンパ腫の 1 例. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、2011, 11, 前橋.

5) Ayako Arai, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. EBV infection of T or NK cells activates NF- $\kappa$ B leading to lymphoproliferative diseases development. 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月名古屋.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

慢性活動性 EB ウイルス感染症の臨床像解析と新規治療法開発に関する研究

分担研究者 新井文子 (東京医科歯科大学大学院血液内科学 講師)

### 要旨

慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) 成人例の病態の解析と、発症機構解明とに基づいた新規治療法の開発を目的に以下の 7 項目について研究を行った。

#### 1) 慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV)成人症例の病態の解明

成人発症 CAEBV 19 例を後方視的に解析した。小児例との間に臨床症状、検査所見などに差は認めなかったが、成人例は小児例に比べ死亡率が高いこと、臨床経過が短いことからより予後が悪いことが示された。

#### 2) CAEBV成人例に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 reduced-intensity conditioning (RIC) stem cell transplantation の有効性の検討

成人 CAEBV7 例を後方視的に解析し RIC の有効性を明らかにした。

#### 3) CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討

5 人の CAEBV 成人例に対し L-asp の効果を検討する前向き探索的研究を施行し L-asp の有効性は AS 依存性である可能性が示唆された。

#### 4) EBV 陽性 T、NK 細胞腫瘍発症における CD137 分子の役割の解明

EB ウイルス感染 T および NK 細胞では、共刺激分子 CD137 が EBV 感染により LMP1 によって発現が誘導され、細胞の不死化を介して CAEBV 発症および病態形成に寄与していると考えられた。

#### 5) EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症における NF-κB 活性化

EB ウイルス感染 T および NK 細胞では、EBV 感染により LMP1 を介し NF-κB が活性化され腫瘍発症に関与すること、NF-κB 活性を阻害する Bortezomib によつ EB ウイルス感染 T および NK 細胞の apoptosis が誘導され、CAEBV モデルマウスの末梢血中の EBV-DNA が優位に抑制された。以上から EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症の発症には LMP1 を介した NF-κB の活性化が関与していると考えられた。

#### 6) CAEBV における P-glycoprotein (P 糖蛋白) 発現

CAEBV の EBV 感染腫瘍細胞では薬剤耐性に関与する分子 P 糖蛋白が強く発現し、化学療法耐性の原因のひとつであることが示された。

#### 7) CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

CAEBV では IL-6, IFN-γ, TNF-α の濃度は CAEBV で優位に高く、臨床経過、重症度と相関することに加え infliximab、tocilizumab は VP16 との併用により細胞死を相乗的に亢進させることが示された。以上から炎症性サイトカインは CAEBV 病勢のバイオマーカーおよび治療標的として有用と考える。

#### A. 研究目的

CAEBV は小児において提唱され、小児例を中心に報告されてきた疾患であるが、近年

EBV による T および NK 細胞の腫瘍性疾患であることが明らかになり、2008 年に改訂された WHO 造血器腫瘍分類にリンパ腫のひとつ

として記載された。また診断指針が作成され (Am J Hem 2005; 80,p64)、疾患の周知が進んだ結果、成人例の存在が報告されるようになった。しかし成人例の予後は不良とする報告が多く、小児例と同じ診療を行ってよいか、そもそも両者は同一の疾患としてよいかは検討が必要であった。

そこで本研究では、CAEBV 成人例の病態解明と治療法の開発を第一の目的とし、成人例を後方視的に解析しその臨床的特徴を小児例と比較した。また、CAEBV の発症のメカニズム、つまり、一部のヒトでなぜ EBV は T もしくは NK 細胞に感染し腫瘍発症の原因になるのかは、いまだ不明である。本研究の第二の目的は CAEBV 発症機構の解明とそれに基づいた新規治療法の開発とした。

## B.研究方法

診断：

CAEBV は Okano らの診断指針 (Am J Hem 2005; 80,p64) を用いて診断した。

成人例の解析および新規治療法の開発：

東京医科歯科大学で診断、治療を行った成人症例および、文献的に報告されている成人発症 CAEBV を解析した。

**CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討：**

治療法開発のため EBV 感染症研究会診断指針に基づいて診断され、十分な肝腎機能を持つ患者に対し L-asp を一日一回、6000U/m<sup>2</sup> を隔日で7回投与した。主評価項目は一ヵ月後の末梢血 EBV-DNA 量の減少率、副評価項目は有害事象発現率とした。また、EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase(AS)の発現を RT-PCR 法で解析し、L-asp の効果との関連を検討した。

**In vitro** での発症機構の解析：

EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症細胞株 (SNT8,15,16, SNK6: 清水則夫博士より供与)、および CAEBV 患者の末梢血から磁気ビーズ

を用いて分離した EBV 感染細胞を用いた。対照には EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。CD137 の発現は RT-PCR およびフローサイトメトリーで解析した。NF-κB 活性は Western blotting および electrophoretic mobility shift assay (EMSA)で解析した。*In vitro* EBV infection は B95-8 細胞培養上清から抽出したウイルスを T 細胞株 MOLT4 と共培養し感染させた。EBV 感染と CD137 発現あるいは NF-κB 活性化の関連は、EBV 蛋白発現ベクターと CD137 promoter あるいは NF-κB reported plasmid を用いた一過性発現実験系を用い、luciferase assay で解析した。Cell viability および apoptosis の解析には、それぞれ DiOC6 染色および Annexin V assay を用いた。*In vivo* での薬物効果を検討するため、CAEBV 患者細胞を NOG マウスに移植して作成したマウスモデル (PLoS Pathog. 2011 Oct;7(10):e1002326) を使用した。P 糖蛋白の薬剤排出機能は Rhodamine efflux assay で解析した。対照には、EBV 陽性 B 細胞リンパ腫細胞株、EBV 陰性 T および NK 細胞腫瘍株を用いた。

(倫理面への配慮)

以上の研究は東京医科歯科大学倫理委員会および(臨床試験は)東京医科歯科大学医学部附属病院施設内審査委員会の承認を受け、患者の文書による同意を得て施行した。「CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討」は UMIN-CTR へ登録、患者の文書による承諾を得たうえで施行した(UMIN 試験 ID : UMIN000003498)。

## C.研究結果

### 1) 慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV) 成人症例の病態の解明

東京医科歯科大学血液内科で診断、治療を行った成人 CAEBV5 症例および文献的に報告されている 19 例を加えた成人発症 CAEBV23 例を解析した。

男性 14 名、女性 9 名。年齢は 24～72 歳(中央値 36)。診断前罹病期間は 2 週間～108 か月(中央値 19)で、小児発症例と比較し経過が短い傾向があった。感染細胞は T 細胞 20 名、NK 細胞 3 名で、それぞれが同率の小児例に対して T 細胞感染型が多かった。抗 EBV 抗体価は、VCA-IgG および EA-IgG が高く、VCA-IgM は低値で再活性化からの発症と考えられた。経過の記載のある 21 例中 12 例(69%)が死亡した。治療開始から死亡までの期間は 6-72 ヶ月(平均 21 ヶ月)であった。(Int J Hematol. 2011, 93(5):602-9)

## 2) CAEBV成人例に対する骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植 reduced-intensity conditioning (RIC) stem cell transplantation の有効性の検討

東京医科歯科大学血液内科で診断、移植を行った成人 CAEBV5 症例 7 例を解析した。年齢は 20 歳から 62 歳。女性 5 例、男性 2 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、2 例、2 例。移植時病勢は、発熱などの臨床症状のある状態が継続している症例を活動性、消失している症例を非活動性と定義すると、非活動性 5 例、活動性 1 例(発熱)、そして活動性かつ進行性 1 例(皮膚および筋への浸潤が進行)であった。移植は非血縁骨髄 6 例、臍帯血 1 例で、HLA は全アレル一致 5 例、血清型一致で 1 アレル(DR)不一致 1 例。臍帯血例は 3 アレル(A、B、DR)不一致であった。前処置は Flu+Mel+TBI 3 例、Flu+Mel+ATG 4 例で、GVHD 予防は FK か CsA+短期 MTX を用いた。

移植時病勢が非活動性であった 5 例は移植後観察期間 6～39 か月で全例寛解した。活動性、進行性であった 2 例はそれぞれ敗血症、病氣進行で移植後 12 日、46 日に死亡した。全体の 2 年全生存率は 71.4%であった。ATG 使用 3 例は移植後 2 週～2 か月後に PTLD と診断した。

感染細胞はいずれもドナー由来 B 細胞で、Rituximab 投与で全例 EBV は陰性化した。7 例中 3 例で EBV 特異的ドナーCTL を確認した。うち 1 例では経過中 CTL が消失したが寛解を維持した。(第 34 回日本造血細胞移植学会、2012 年 2 月大阪、論文準備中)

## 3) CAEBV 成人例に対する L-asparaginase (L-asp) 単剤療法の検討

5 人の CAEBV 成人例に対し、L-asp の効果を検討した。対象患者は女性 5 名。年齢は 20～62 歳。感染細胞は CD8 陽性 T 細胞 1 例、CD4 陽性細胞 2 例、CD56 陽性細胞 2 例であった。末梢血中 EBV 量は 1 例で 0.08 倍の減少を見たが、1 例で 22 倍に増加、2 例は不変であった。1 例は投与中鼻粘膜病変が増悪したため途中で中止した EBV 感染腫瘍細胞の Asparagine synthetase (AS) の発現の検討を行ったところ、効果を示した症例では発現が有意に低かった。以上から L-asp の有効性は AS 依存性である可能性が示唆された。(第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月名古屋、論文準備中)

## 4) EBV 陽性 T、NK 細胞腫瘍発症における CD137 分子の役割の解明

EBV 陽性 T および NK 細胞株 4 種(SNT8,SNT15,SNT16,SNK6)に加え、CAEBV 患者 16 例の EBV 感染細胞について CD137 の発現をフローサイトメトリーおよび RT-PCR 法で検討した。年齢は 8 歳から 72 歳。女性 10 例、男性 6 例。EBV 感染細胞は CD4 4 例、CD8 5 例、 $\gamma\delta$  1 例、CD56 6 例。細胞表面の CD137 蛋白の発現は対象に比べ EBV 感染細胞で優位に上昇していた。また検索しえた細胞すべてで CD137 の mRNA の発現をみとめた。対照とした EBV 陰性 T,NK 細胞株である Jurkat,MOLT4, KHYG1 細胞では CD137 の発現は RNA のレベルでは認めなかった。CD137L の発現は全例で認めなかった。T 細胞株 MOLT-4 へ in vitro で EBV を感染させると(感染効率>60%)CD137 の

発現が誘導された。Luciferase assay を用いた検討では CD137 の発現は LMP1 を介することが示された。上記 EBV 感染 T、NK 細胞のうち CD137 蛋白の発現を認める細胞を CD137L 遺伝子導入 CHO 細胞と共培養すると VP-16 に対する apoptosis 誘導が抑制された。EBV 感染 T、NK 細胞株において NF- $\kappa$ B 活性化の恒常的活性化が認められ CD137L 遺伝子導入 CHO 細胞と共培養により増強を認めた。(欧州血液学会年次総会 2011 年 6 月 London、論文投稿中)

#### 5) EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症における NF- $\kappa$ B 活性化

EBV 陽性 T および NK 細胞株 4 種 (SNT8,SNT15,SNT16,SNK6) に加え 10 例の CAEBV 患者細胞を解析した。年齢は 9 歳から 65 歳。女性 7 例、男性 3 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、 $\gamma\delta$ 、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、4 例、1 例、2 例。これらの細胞では NF- $\kappa$ B の構成分子である p52、p50、RelA が核に恒常的に局在し、DNA 結合能を持つ事が示された。つまり NF- $\kappa$ B が古典的および非古典的経路両者を介して恒常的に活性化していた。T 細胞株 MOLT-4 へ *in vitro* で EBV を感染させると(感染効率>60%) NF- $\kappa$ B 活性が亢進した。Reporter assay では EBV 蛋白 LMP1 によって NF- $\kappa$ B の活性化がもたらされた。さらに NF- $\kappa$ B の阻害剤 Bortezomib 処理によってこれらの細胞では apoptosis が誘導された。CAEBV モデルマウスを用いた *in vivo* の解析では Bortezomib を投与したところ、末梢血中の EBV-DNA 量は対象とした Acyclovir および PBS は投与前後で増加したのに比べ優位に低下した。(米国血液学会年次総会 December 2010 Orlando、論文準備中)

#### 6) CAEBV における P-glycoprotein (P 糖蛋白) 発現

EBV 陽性 T および NK 細胞株 4 種 (SNT8,SNT15,SNT16,SNK6)に加え年齢は 8 歳

から 72 歳。女性 10 例、男性 6 例。EBV 感染細胞は CD4 4 例、CD8 5 例、 $\gamma\delta$  1 例、CD56 6 例。EBV 陽性 T/NK 細胞株および CAEBV 患者細胞で P 糖蛋白が強く発現し、薬剤排出機能を示すことを見出した。以上はコントロール細胞では認められなかった。T 細胞株 MOLT-4 へ *in vitro* で EBV を感染させると(感染効率>60%) P 糖蛋白の発現および薬剤排出機能が亢進した。さらに P 糖蛋白の阻害因子 CsA によりこれらの細胞で Doxorubicin による apoptosis 誘導は亢進することが示された。以上から P 糖蛋白は CAEBV の化学療法耐性に寄与することが示された。(第 72 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月名古屋、論文準備中)

#### 7) CAEBV における炎症性サイトカインの動態解析と治療への応用の検討

6 名の CAEBV 患者のを解析した。年齢は 21 歳から 64 歳。女性 5 例、男性 1 例。EBV 感染細胞は CD4、CD8、CD56 陽性細胞がそれぞれ 3 例、1 例、2 例。対照として 5 名の健常者を用いた。CAEBV では、血清中の INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  濃度は健常者に比べ優位に上昇していた。1 人の患者では治療後病勢(血球貪食症候群、肝機能障害)の改善とともにこれらは低下し、再発とともに上昇した。次にこれらのサイトカイン産生機序を解析した。CAEBV 患者の EBV 陽性細胞において TNF- $\alpha$  の転写が亢進していたこと、EBV 陽性細胞株 SNT8 の培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度の上昇をみとめたことから TNF- $\alpha$  は EBV 陽性 T 細胞から産生されていると考えられた。さらに T 細胞株 MOLT-4 へ *in vitro* で EBV を感染させると(感染効率>60%)、TNF- $\alpha$  の発現が亢進した。これらの結果から EBV の感染によって T 細胞の TNF- $\alpha$  の産生が亢進することが示された。In vitro で EBV 感染 T、NK 細胞を抗 TNF- $\alpha$  抗体 infliximab および抗 IL-6 抗体 tocilizumab で処理すると VP-16 の apoptosis 誘導作用を相乗的に亢進させた。以上

から、INF- $\gamma$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  は CAEBV の病態形成に重要な働きをし、かつ治療標的となりうると考えられた。

#### D. 考察

冒頭で述べたとおり、本研究班の第一の目的は CAEBV 成人例の病態解明と治療法の開発である。成人例の報告は増えているが小児例と果たして同じなのか、そして治療は同じでよいのか、などは今まで明らかにされていなかった。本研究はその観点にたつて解析を行い、その結果、成人 CAEBV は小児例と臨床症状、検査所見に違いは認められなかったが、臨床経過では進行が急速でかつ死亡例が多く、予後が不良であることを明らかにした (Int J Hematol. 2011, 93(5):602-9)。成人症例の実態が明らかになった事は臨床上の意義が大きい。成人では (おそらく思春期前後までであろう) EBV 初感染から発症までの期間が長いこと、小児例の解析で予後不良因子とされた T 細胞感染型が多いことなどが予後不良の理由と考えられる。今後は引き続き予後の改善のために、発症機構の詳細な解明と、それに基づいた治療法の開発が必要である。

後方視的な検討を行った結果、単施設の少数例の解析であるが、RIC 施行 7 例では 2 年全生存率は 71.4% であり、化学療法や免疫抑制療法のための治療の成績 (77% が治療後平均 13 カ月で死亡し) と比較するとよいと思われ、成人 CAEBV に対して RIC は有効であると考えられた。しかし、移植時病勢が活動性であった 2 例は早期に死亡しており、病勢がコントロールされた状態での移植が望ましい。さらに至適移植時期、移植前治療の検討、確立も必要である。ATG 使用 3 例は全例で PTLD を発症した。ATG は Donor T-cell のみならず EBV 感染 T、NK 細胞も抑制することで疾患を制御しうするため、ATG (+TBI) を含んだ前処置は有効である。しかし今回の結果から ATG 使用時には PTLD の

リスクが増すことが示されたため、定期的な EBV-DNA 量のモニタリングが必要であると考えられた。

RIC の成績は良いことが示された一方で、移植の適応の無い高齢者、全身状態不良者などに対しての薬物療法開発も急務である。今回効果を検討した L-aspl は、CAEBV と同じく EBV 感染腫瘍で P-gp の発現が高く CHOP 抵抗性をしめす ENKL で効果を認めることは周知であり、さらに P-gp の影響を受けない。よって効果が期待された薬剤であったが、残念ながら効果は一部の症例に限定されていた。その原因のひとつは CAEBV の病態の複雑さにあると考える。今回の検討では、L-aspl の効果に影響を与えるとの報告もある AS の発現が患者ごとに大きく異なった。AS 発現のみならず、CAEBV は感染細胞、臨床像など、非常に多様性がある。今後は多くの症例を引き続き解析することで、それらの因子の詳細な検討を重ね、因子別の治療効果の検討が必要と考える。

CAEBV 発症機構の解明についても、患者の協力の下、細胞株のみならず多くの臨床検体を用いた研究が施行し得た。さらに、T 細胞への EBV の *in vitro* での感染系の確立に成功し、EBV 直接の効果を検討できたこと、NOG マウスを用いた CAEBV モデルの作成に成功し、それを用いて薬剤効果の判定が行えたことも意義深いと考える。解析の結果、EBV が B 細胞のみならず T、NK 細胞を不死化し、T/NK-LPD 発症に寄与しうることを *in vitro* での感染実験をふくめて初めて明らかにした (2010 年米国血液学会、2011 年癌学会、日血総会発表、論文準備中)。細胞内の分子シグナリングの解析では EBV による T、NK 細胞不死化には NF- $\kappa$ B が深く関わっていることが明らかになった。その結果をもとに NF- $\kappa$ B 阻害作用をもつ Bortezomib の効果を *in vitro* および *in vivo* 両方で検証したところ、それぞれ apoptosis 誘導、

末梢血 BV-DNA 量低下が得られ、EBV-T/NK-LPD に対し Bortezomib は効果をもとめることが明らかになった。同薬は本邦でも承認された薬であり、今後臨床応用を開始する予定である。また、EBV 感染により T/NK 細胞では、薬剤耐性の原因となる P 糖蛋白の発現、炎症症状や血球貪食症候群の原因となりうるサイトカインの産生、インテグリンへの細胞接着、などが亢進することも明らかになった。これらの現象と CAEBV 発症の関与を今後検討の上、治療への応用を検討の予定である。

CAEBV は以下の点で腫瘍としては非典型的である。つまり、細胞周期依存性の抗腫瘍薬が効きにくいこと、形態異常が少ないこと、NOG マウスへの移植では単独で腫瘍を形成しないこと、などから、典型的な腫瘍にくらべ、その増殖力は低いと考えられる。発症の背景には、何らかの患者側の因子があると考えられ、それについて今後は検討していきたい。CAEBV は強い炎症を伴う。今回の研究では CD137 分子が EBV 感染によって発現することが示された。CD137 は effector、regulatory など活性化 T 細胞に発現し、それらの機能と増殖を亢進させることが知られている。さらに、Dendritic cells などの antigen presenting cells に発現している CD137L を介して免疫反応を正および負に調整しうることも知られている。CD137 の病態形成における機能について、そしてそれを含めた CAEBV における免疫調節機能について、発症との関与も含め今後検討の必要がある。

CAEBV 患者では血中の IL-6、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  などの炎症性サイトカイン濃度が上昇していた。さらにその値は病勢を反映していた。これらの阻害剤は単独では EBV 感染細胞の増殖抑制には至らなかったが、VP16 との併用は化学療法への抗サイトカイン試薬導入の良い適応になる可能性を示唆した。今後 infliximab、tocilizumab、etanercept は血球貪食症候群に効果

を認めたという報告もあり、CAEBV に合併する炎症反応、特に致死的合併症 HPS を抑える可能性があり今後検討していきたい。

#### E. 結論

- 1) CAEBV 成人例は小児例との間に臨床症状、検査所見などに差は認めなかったが、小児例に比べ死亡率が高いこと、臨床経過が短いことからより予後が悪いことが示唆された。
- 2) 成人例へも小児同様 RIC が有効であった。
- 3) L-asparaginase は一部の症例にしか効果を認めなかった。至適化学療法は確立されておらず今後の検討が必要である。P 糖蛋白非依存性の新規治療法の検討が必要である。
- 4) EBV 陽性 T/NK リンパ増殖症発症では EBV 感染により LMP1 を介した NF- $\kappa$ B の活性化がおこり細胞の不死化、腫瘍発症に寄与していると考えられた。
- 5) EBV 感染により T/NK 細胞では CD137 発現、サイトカイン産生などがおこる。おそらく免疫反応の亢進、異常をもたらす疾患発症に寄与していると考えられる。

#### F. 研究発表

2011

##### 国内学会

第33回日本造血細胞移植学会総会 2011年2月  
松山

・梅澤佳央、野上彩子、五十嵐愛子、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、三浦修

低用量 thymoglobulin を含んだ前処置による同種移植後に EBV 関連リンパ増殖性疾患

(EBV-LPD) を発症した2例における

EBV-DNA 定量モニタリング

第166回日本血液学会例会 2011年7月東京

・石田信也、秋山めぐみ、梅澤佳央、五十嵐愛子、山本正英、黒須哲也、福田哲也、新井文子、村上直己、三浦修

皮膚、髄膜浸潤を伴い、緩徐な経過の後急速な

悪化を来した T-PLL の 1 例  
第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月  
名古屋

・ Ayako Arai, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka,  
Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura  
EBV infection of T or NK cells activates NF- $\kappa$ B  
leading to lymphoproliferative diseases  
development

第 73 回日本血液学会学術集会 2011 年 10 月  
名古屋

・ Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Mayumi  
Yoshimori, Ludan Wang, Takatoshi  
Koyama, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka,  
Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura  
EBV infection of T or NK cells activates NF- $\kappa$ B  
leading to lymphoproliferative diseases  
development

・ Minako Jinta, Ken-Ichi Imadome, Mayumi  
Yoshimori, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi  
Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai  
L-asparaginase monotherapy for chronic active  
Epstein-Barr virus infection: A pilot study  
・ Ludan Wang, Aiko Sato-Otsubo, Sunao Sugita,  
Hiroshi Takase, Manabu Mochizuki, Yoshihiko  
Usui, Hiroshi Gotoh, Osamu Miura, Seishi Ogawa,  
Ayako Arai

High-resolution genomic copy number profiling of  
primary intraocular lymphoma by SNP microarray

・ Chihiro Yamada, Ken-Ichi Imadome, Ayako Arai,  
Atsuko Nakazawa, Fuyuko Kawano, Sayumi  
Ichikawa, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto,  
Tomohiro Morio, Syouichi Ohga, Mamoru Ito,  
Takatoshi Koyama, Osamu Miura, Jun Komano,  
Shigeyoshi Fujiwara

High level of human cytokines were detected in a  
novel mouse xenograft model of CAEBV and  
EBV-LHL

国際学会

The 16th Congress of European Hematology  
Association, June 2011 London

・ Ayako Arai, Mayumi Yoshimori, Ken-Ichi  
Imadome, Wang Ludan, Tetsuya Fukuda, Takatoshi  
Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura  
CD137 EXPRESSION IS INDUCED BY  
EPSTEIN-BARR VIRUS (EBV) INFECTION  
AND ACTIVATES NF- $\kappa$ B CONTRIBUTING TO  
THE DEVELOPMENT OF EBV-POSITIVE  
T/NK-CELL LYMPHOPROLIFERATIVE  
DISEASE

The 53<sup>rd</sup> Annual meeting of American society of  
Hematology December 2011 San Diego

・ Ludan Wang, Aiko Sato-Otsubo, Sunao Sugita,  
Hiroshi Takase, Manabu Mochizuki, Yoshihiko  
Usui, Hiroshi Gotoh, Osamu Miura, Seishi Ogawa,  
Ayako Arai

High-Resolution Genomic Copy Number Profiling  
of Primary Intraocular Lymphomas using SNP  
Microarrays

原著論文

・ Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A,  
Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N,  
Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura  
Novel mouse xenograft models reveal a critical  
role of CD4<sup>+</sup> T cells in the proliferation of  
EBV-infected T and NK cells. PLoS Pathog. 2011  
Oct;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.

・ Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Yoshimori M,  
Koyama T, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S,  
Miura O.

Clinical features of adult-onset chronic active  
Epstein-Barr virus infection: a retrospective  
analysis. Int J Hematol. 2011, 93(5):602-9.

・ Arai A, Imadome K, Wang L, Wu N, Kurosu T,  
Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara  
S, Miura O.

Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus