

infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation

Int Medicine, 2012;51(7):777-82.

・内田慧美、本間りこ、五十嵐愛子、倉田盛人、今留謙一、大本英次郎、三浦修、新井文子
血漿中 EBV-DNA 量を経時的に測定した EBV 陽性 Hodgkin リンパ腫

臨床血液,2012,53(1) : 87-91

総説

・新井文子

原発性眼内リンパ腫の診断と治療

Diagnosis and treatment of primary intraocular lymphoma

血液内科 科学評論社 62 p106-111,2011

著書

・新井文子

Splenic marginal zone lymphoma

脾辺縁帯リンパ腫 p393-400

みんなに役立つ悪性リンパ腫の基礎と臨床改訂版 2011年1月1日

医薬ジャーナル社 押味和夫編

・新井文子/片岡純

多発性骨髄腫 p103-109

病態生理ビジュアルマップ3 2011年1月1日

医学書院 佐藤千史/井上智子編

・新井文子

発熱 p2-6

緊急度・重傷度からみた症状別看護過程 2011年11月1日

医学書院 井上智子/佐藤千史編

2010年国内学会

第32回日本造血細胞移植学会総会 2010年2月浜松

・中枢神経浸潤を伴った悪性リンパ腫に対して自己末梢血幹細胞移植 (BU/CY/TEPA) を施行した3例

大木学、桑川華枝、佐々木宏治、村田論孝、山本正英、黒須哲也、福田哲也、新井文子、東田修二、小山高敏、村上直巳、三浦修

・同種移植後難治性出血性膀胱炎に対し高压酸素療法が奏効した一例

佐々木宏治、桑川華絵、村田論孝、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、大橋一輝、秋山秀樹、坂巻壽、三浦修
第164回日本血液学会例会 2010年2月東京

・再生不良性貧血の経過中に反応性形質細胞増加を合併した一例

桑川華恵、佐々木宏治、村田論孝、山本正英、大木学、黒須哲也、福田哲也、新井文子、三浦修、村上直巳

第20回EBウイルス感染症研究会 2010年3月東京

・ Epstein-Barr virus-positive T- or NK-cell lymphoproliferative disorder 成人例の臨床的特徴と化学療法の効果

渡部優子、高橋真由美、今留謙一、藤原成悦、三浦修、新井文子

・ EBウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と病態発現解析

今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中川温子、新井文子、市川紗弓、森尾友宏、大賀正一、大石勉、清水則夫、山本直樹、藤原成悦

第27回日本TDM学会・学術大会 2010年6月札幌

・メトトレキサートの静脈内・眼内投与併用時の血清及び硝子体液の薬物濃度モニタリング
柴田聡子、石渡泰芳、渋谷有香、安原真人、中内祐介、新井文子、三浦修、高瀬博、杉田直、望月學

第72回日本血液学会学術集会 2010年9月横浜

・ Intraocular lymphoma with CNS involvement treated with concurrent intravenous and intravitreal MTX

Yusuke Nakauchi, Hiroshi Takase, Sunao Sugita, Manabu Mochizuki, Satoko Shibata, Yasuyoshi Ishiwata, Yuka Shibuya, Masato Yasuhara, Osamu Miura, Ayako Arai

• P-glycoprotein expression is enhanced in EBV-infected T or NK cells in CAEBV and may cause its chemoresistance

Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai

第 64 回日本臨床眼科学会 2010 年 11 月神戸

• 眼内リンパ腫に対する治療と全身予後の検討
高瀬博、岩永洋一、菅本良治、川口龍史、高橋仁美、横田眞子、鴨居功樹、宮永将、杉田直、望月學、新井文子

国際学会

The 15th Congress of European Hematology Association, June 2010 Barcelona

• 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

• 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

The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases
September 2010, Birmingham

• 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 52nd Annual meeting of American society of Hematology December 2010 Orlando

• Ayako Arai, Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Takatoshi Koyama, Yasunori Saitoh, Shoji Yamaoka, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura

NF- κ 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

原著論文

1. Arai A, Imadome K, Fujiwara S, 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. Intern Med 49:325-329,2010

2. Kuninaka N, Kurata M, Yamamoto K, Suzuki S, Umeda S, Kirimura S, Arai A, Nakagawa Y, Suzuki K, Kitagawa M
Expression of Toll-like receptor 9 in bone marrow cells of myelodysplastic syndromes is down-regulated during transformation to overt leukemia. Exp Mol Pathol 88:293-298,2010

3. Nakagawa Y, Suzuki K, Hirose T, Chou T, Fujisawa S, Kida M, Usuki K, Ishida Y, Taniguchi S, Kouzai Y, Tomoyasu S, Miyazaki K, Higashihara M, Ando K, Aoki S, Arai A, Akiyama N, Hatake K, Okamoto S, Dan K, Ohyashiki K, Urabe A
Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying

hematopoietic diseases: a multi-institutional study.

J Infect Chemother 17:58-67,2010

4. Nakauchi Y, Takase H, Sugita S, Mochizuki M, Shibata S, Ishiwata Y, Shibuya Y, Yasuhara M, Miura O, Arai A Concurrent administration of intravenous systemic and intravitreal methotrexate for intraocular lymphoma with central nervous system involvement. Int J Hematol 92:179-185,2010

5. Okuhashi Y, Itoh M, Arai A, Nara N, Tohda S Gamma-secretase inhibitors induce erythroid differentiation in erythroid leukemia cell lines. Anticancer Res 30:4071-4074,2010

6. Oshikawa G, Kurosu T, Arai A, Murakami N, Miura O Clonal evolution with double Ph followed by tetraploidy in imatinib-treated chronic myeloid leukemia with e19a2 transcript in transformation. Cancer Genet Cytogenet 199:56-61,2010

総説

新井文子

眼附属器 MALT リンパ腫の臨床病理学的特徴と治療 血液・腫瘍科 60:521-525, 2010

G.知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

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

研究分担者 木村 宏 名古屋大学大学院医学系研究科ウイルス学 准教授

研究要旨

新規開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を、慢性活動性 EBV 感染症患者を含む EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に応用し以下のことを明らかにした。1) EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 26 症例に対して適用したところ、患者末梢血リンパ球中 0.15~67%のリンパ球が EBV 陽性で、EBV 陽性細胞率 0.5%以上の症例では感染細胞の同定が可能であった。2)一部の患者では 2 種類の細胞群に EBV の感染を認め、複数の lineage の細胞に EBV が感染する疾患の診断に有用であった。3)主として本法を用い診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行い、その臨床・病理像と治療成績を明らかにした。高感度特異的 EBV 感染細胞同定法は EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断に有用であるのみならず、本症の発症病理への理解を深め、将来的な疾患分類の制定にも役立つと考えられる。

A. 研究目的

Epstein-Barr Virus (EBV) は B 細胞のみでなく T 細胞や NK 細胞に感染し様々な病態を引き起こす。EBV 関連疾患の診断と発症病理の解明には EBV 感染細胞の同定と定量が必須である。慢性活動性 EBV 感染症は EBV に感染した T 細胞もしくは NK 細胞が短クローン性に増殖する T/NK リンパ増殖性疾患であることが明らかとされてきており、EBV 感染細胞を同定することは本症の診断上重要である。また、感染細胞により予後が異なること、感染細胞表面抗原をターゲットとした分子標的治療の開発などにより、予後判定や治療法の決定のためにも、感染細胞を同定することは意義深いと考えられる。

我々は EBV encoded small RNA (EBER) 特異的 Peptide Nucleic Acid (PNA) プロー

ブを用い、細胞表面抗原と EBER を連続的に染色する高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を確立した。初年度は、この高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を慢性活動性 EBV 感染症を含む EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者の末梢血へ適用し、本疾患の非侵襲的診断と病態解析に有用性を検証した。次年度には、本法を主に用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行った。

B. 研究方法

(1) 初年度：高感度特異的 EBV 感染細胞同定法の EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患診断への応用

対象は慢性活動性 EBV 感染症 18 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、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。

末梢血より単核球を分離し、高感度特異的 EBV 感染細胞同定法による EBV 感染細胞の定量・同定を行った。

比較対照として、単核球より DNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により EBV-DNA を定量した。

(2) 次年度：高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を用いた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患臨床像の解明

対象は 1998 年以降、名古屋大学医学部に EBV 感染細胞の診断依頼が有り、1) 末梢血中に有意な EBV-DNA の上昇を認め ($10^{2.5}$ copies/ μ g DNA 以上)、2) EBER 特異的 PNA プローブを用いた高感度特異的 EBV 感染細胞同定法、もしくは磁気ビーズ法により EBV が T 細胞または NK 細胞に感染していると診断された症例。

診断時に、骨髄検査および可能な限り病理組織診断を施行した。更に、定量的 PCR 法による末梢血中の EBV-DNA 量の測定、EBV terminal repeat を用いたサザンブロット法によるクロナリティ解析、PCR 法による T 細胞受容体再構成の有無、などのウイルス学的解析を行った。概ね 3 年毎に診療経過・施行した治療・転帰を問うアンケートを主治医に送付し、回収した。最終調査は、2010 年 12 月に施行した。

(倫理面への配慮)

参加症例に対しては、平成 15 年 7 月 30 日付厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に則り、十分な説明を施した上で、患者および親権者よりインフォームドコンセントを得た。さらに検体の採取法、患者情報の取り扱いについても倫理規定を遵守し、

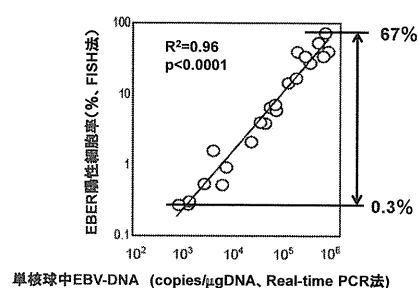
個人情報の擁護に努めることとした。また本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

(1) 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法の EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患診断への応用

1) 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を用い、各 EBV 関連疾患の末梢血中末梢血単核球中の EBER 陽性細胞を測定したところ、全例の単核球中 0.3-67% に EBER 陽性細胞を認め、陽性細胞率は血液単核球中の EBV-DNA 量と相関していた (図 1)。

図1 単核球中EBV-DNA量と FISH法におけるEBER陽性細胞率との相関



2) 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。解析できた 23 症例中、NK 細胞に主に EBV が感染していた患者が 8 例、 $\gamma\delta$ T 細胞が 6 例、CD8⁺T 細胞が 5 例、CD4⁺T 細胞が 4 例、NKT 細胞が 2 例であった。

3) 種痘様水疱症を伴う慢性活動性 EBV 感染症患者 8 例中では、 $\gamma\delta$ T 細胞 5 例、NK 細胞 1 例、NKT 細胞 1 例に EBV の感染を認めた。

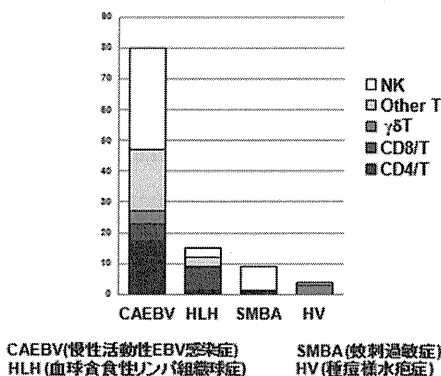
4) 更に 2 症例においては複数の細胞群に EBV 感染を認めた。一例では CD56 陽性の NK 細胞に主に感染しているものの、CD3、CD4、TCR $\alpha\beta$ 陽性の T 細胞にも一部感染しており、もう一例は CD4⁺T と CD8⁺T 細胞の両方に感染していた。

(2) 高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を用いた EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患臨床像の解明

1) 該当する症例は 108 例存在した。患者は 50 例が男性、58 例が女性で、発症年齢は 1 歳から 50 歳に渡っていた(中央値 8 歳)。64 例が T 細胞に、44 例が NK 細胞に感染していた。小児期発症例が多かったが 20 代の若年成人も少なからず認めた。感染細胞による年齢差異は認められなかった。

2) 臨床的には、慢性活動性 EBV 感染症 80 例、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症 15 例、蚊刺過敏症 9 例、種痘様水疱症 4 例に分けられた。図 2 にこれら疾患群別の EBV 感染細胞を示す。慢性活動性 EBV 感染症では CD4 陽性 T 細胞、NK 細胞が多いものの、CD8 陽性 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 関連血球貪食性リンパ組織球症では CD8 陽性 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。以上のごとく臨床型別は EBV 感染細胞のフェノタイプと極めて密接に関連していた。

図2. EBV関連T/NKリンパ増殖性疾患 108例臨床型別感染細胞



3) サザンブロット法による感染細胞のクローナリティ解析の結果、3/4 以上の患者ではモノクローナルであったが、一部の患者はオリゴクローナルもしくはポリクローナルであった。

4) 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、逆に移植を受けた患者は生命予後が良いと示された。

5) 移植を受けた 59 症例のうち、最終解析時に生存していたのは 39 例 (66%) であり、残りの 20 例が死亡していた。死因は多臓器不全が 5 例、頭蓋内出血が 5 例、敗血症 2 例などであったが、移植関連合併症による死亡が 15 例に上った。予後に関連する因子としては、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いという結果が得られた。

D. 考察

慢性活動性 EBV 感染症の診断には、EBV がどのリンパ球分画に感染しているかを決定することが必須である。従来は病理診断法が最も信頼性が高い診断法とされていたが、同法は侵襲が高いこと、また必ずしもすべての患者で病理組織を得られないという欠点があった。我々が新規に開発した高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を末梢血中 EBV 感染細胞に応用することにより、慢性活動性 EBV 感染症の非侵襲かつより精度の高い診断が可能となり、本疾患の実態解明と疾患概念の明確化が促進され、正確な診断にもとづく適切な治療の実施が可能となると考えられる。

初年度に行った EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患診断への応用により、一定以上の感染細胞が存在する場合、高感度特異的 EBV 感染細胞同定法は、末梢血中の EBV 感染細胞数の定量のみならず、どんな細胞に感染しているかを同時に同定できるため、EBV 関連疾患の非侵襲かつ迅速な診断として極

めて有用であることがわかった。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。本法は侵襲的かつ一部の患者では行い得ない病理学的診断を補完し、T/NK リンパ増殖性疾患の疾患分類や発症病理の解析に役立つと考えた。

次年度には、本法を用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者 108 例に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行い、1) 本症が小児および若年成人を中心に発症していること、2) 臨床型別は EBV 感染細胞のフェノタイプと極めて密接に関連していること、3) 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/リンパ腫に進展していたこと、4) 59 例が造血幹細胞移植を受け、そのうち 66% が生存していたこと、5) 8 歳以上の発症、肝障害が生命予後不良因子であり、逆に移植を受けた患者は生命予後が良好であったこと、6) 更に移植を受けた患者では、発症時の年齢と疾病の活動性の低い患者の生存率が高いことを示した。

2008 年に改訂された WHO のリンパ腫/白血病分類には、EBV 関連疾患として、小児全身性 EBV 陽性 T 細胞増殖症と種痘様水疱症様リンパ腫が新たに加わった。これら二つの疾患は、これまで本邦で慢性活動性 EBV 感染症、EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症と診断されてきた患者群とオーバーラップする部分が多いものの、その疾患定義・位置づけについては不明瞭な点がある。今回我々が明らかにした、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の臨床像・ウイルス学的特徴は、本症の発症病理への理解を深めるのみならず、近い将来行われる WHO 分類の改訂にも役立つと考えられる。

今後は、この高感度特異的 EBV 感染細胞同定法を誰にでも利用可能で幅広く用いられるために、プロトコール化されたキット

を製作すること、AIDS や臓器・造血幹細胞移植後の EBV 関連リンパ増殖症など診断困難で難治な疾患への応用・標準的診断法としての確立をはかり、そして最終的には同法の健保採用を通しての普及を目指している。

E. 結論

EBER と細胞表面蛋白質とをともに蛍光染色したのち、フローサイトメトリーにより同時に解析する検査法を独自に開発した（高感度特異的 EBV 感染細胞同定法）。平成 22 年度はこの検査法を慢性活動性 EBV 感染症患者を含む EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患に対して応用し、同法により、EBV 感染細胞の定量・同定が正確かつ迅速に可能であることを示した。

平成 23 年度は同法を主に用いて診断した EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患患者に対して臨床・病理・ウイルス学的な前方視的解析を行った。得られた知見は、EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断・治療介入決定に有用であるのみならず、本症の発症病理への理解を深め、将来的な疾患分類の制定にも役立つと考えられる。

F. 研究発表

(1) 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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. *Microbiol Immunol* 54:516-22, 2010
 - 4) Calatini S, Sereti I, Scheinberg P, **Kimura H**, Childs R, Cohen JJ. 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
 - 5) 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
 - 6) Kunitomi A, **Kimura H**, Ito Y, Naitoh K, Noda N, Iida H, Sao H. Unrelated bone marrow transplantation induced long-term remission in a patient with life-threatening Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Exp Hematop* 51:57-61, 2011
 - 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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
 - 10) 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
 - 11) 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
 - 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) Kawada J, Iwata N, Kitagawa Y, **Kimura H**, Ito Y. Prospective monitoring of Epstein-Barr virus and other herpesviruses in patients with juvenile idiopathic arthritis treated with methotrexate and tocilizumab. *Mod Rheumatol in press*
- 17) 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. 学会発表
- 1) **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).
- 2) 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)
- 3) 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)
- 4) **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) .
- 5) 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)
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
特になし
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

（総合）分担研究報告書

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

分担研究者：清水 則夫

（東京医科歯科大学准教授）

研究要旨 慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）は、EBV 感染 T/NK 細胞を原因細胞とする予後不良の疾患である。患者末梢血から EBV 感染細胞クローンを分離し、その解析により EBV 感染 T/NK 細胞の成立・維持機構を解明することを目的に研究を行った。合計 3 名の患者末梢血から細胞クローンを分離し解析したところ、以下の知見を得た。

1. 患者には当初複数の細胞クローンが存在し、その中から悪性形質を獲得した細胞が選択され、症状の重篤化やリンパ腫に至っている可能性が示唆された。2. 同一患者末梢血から、細胞種は異なるもののクロナリティーが一致する複数の EBV 感染細胞クローンが得られ、EBV は未分化なリンパ球に感染し、その後独立に NK 細胞、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞へと分化したことが示唆された。本知見は、いまだ不明な CAEBV の原因細胞の成立機序の解明に極めて重要である。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）は予後不良の疾患であり、適切に治療しないと患者のほとんどは数年から十数年の経過でリンパ腫・臓器不全・血球貪食症候群などにより死亡する。抗ウイルス剤や抗ガン剤による治療が行われているが、これらの薬剤治療では根治は望めず、造血幹細胞が現在のところ唯一の根治治療法である。しかし、造血幹細胞移植は長い入院期間を必要とするとともに移植関連死亡率が高く、患者負担が大きく非常にリスクの高い治療法である。したがって、EBV を標的とした治療薬の開発が急務であるが、現在までに有効性が確立した抗 EBV 剤は実用化されていない。

一方、CAEBV 患者末梢血中には、EBV 潜伏

感染 T/NK 細胞が持続的に検出される。感染細胞分泌される様々なサイトカインが、CAEBV 患者の病態と密接に関連しているとともに EBV 関連リンパ腫の原因ともなっていると考えられている。したがって、CAEBV の成立の要因や病態を正しく理解するためには EBV 陽性 T/NK 細胞の成立・維持の機構を解明することが極めて重要である。

我々は CAEBV 患者末梢血から EBV 感染細胞を長期培養する手法を確立し、これまでに多くの EBV 陽性 T/NK 細胞株を樹立した。本研究では、CAEBV 患者末梢血から多数の EBV 感染細胞クローンを分離し、詳細に解析することにより EBV 感染 T/NK 細胞クローンの成立過程を明らかにすることを目的に研究を行った。

B : 研究方法

1. EBV 感染細胞クローンの分離培養

a. CAEBV 患者

患者 A: 24 歳女性 繰り返す咽頭炎と発熱により受診し CAEBV と診断され、咽頭潰瘍、悪性リンパ腫を発症した。その後、造血幹細胞移植を受けるが、その後間質性肺炎、敗血症により死亡。

患者 B: 23 歳男性 蚊刺過敏症にて発症し、約 3 年間の経過中症状の変化はない。

患者 C: 19 歳男性、3 歳のころより蚊刺により発熱と水疱性丘疹を繰り返えず蚊刺過敏症を発症しており、精密検査により皮膚への EBV 陽性細胞浸潤と末梢血中の EBV ゲノム高値、EBV 関連抗体価高値が判明し、CAEBV と診断された。

b. 細胞培養

患者末梢血より比重遠心法により単核球を分離し、 1×10^5 cells/well の割合で 96 well plate に播種した。細胞培養には、RPMI1640 + 700IU/ml rIL-2 + 10%非動化ヒト血清 を添加した培地を使用した。

2. EBV 感染細胞クローンの解析

a. EBV-DNA の検出 (定量的 PCR)

Forward primer : cggaagccctctggacttc

Reverse primer : ccctgtttatccgatggaatg

Probe:

6FAM-tgtacacgcacgagaaatgcgcc-iowaBK

・PCR 条件

使用機器 : ABI7300

Primer 濃度 : $0.5 \mu\text{M}$ Probe 濃度 : $0.2 \mu\text{M}$

反応液組成 :

DNA	$8 \mu\text{l}$
2X Buffer	$10 \mu\text{l}$
Primer, Probe	$0.6 \mu\text{l}$
Taq 酵素	$0.4 \mu\text{l}$
H ₂ O	$1.0 \mu\text{l}$

Total $20 \mu\text{l}$

反応条件 :

Denature $95^\circ\text{C} 10$ 秒

PCR 反応 $95^\circ\text{C} 5$ 秒, $60^\circ\text{C} 20$ 秒

45 サイクル

b. 細胞表面抗原解析

フローサイトメーター : EPICS XL (ベックマンコールター)

蛍光標識抗体 : CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD21, CD25, CD56, CD57, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ (ベックマンコールター)

c. 分子生物学的解析

サザンブロッティングにより、TCR β , γ , δ 鎖遺伝子と免疫グロブリン遺伝子のリアレンジメントの有無および EBV-TR のリピート数を解析し、分子生物学的な細胞種の特定制および EBV ゲノムのクロナリティー解析を行った。実験には、FITC でラベルした C β 1, J γ 1, J δ 1, J δ 3 および J_H プロブを使用し、Fluorescein Gene Images System (Amersham) を用いて検出した。

(倫理面への配慮)

者検体は、採取医療機関の倫理委員会の許可と患者のインフォームドコンセントを得て採取し、EBV 遺伝子と TCR および免疫グロブリン遺伝子以外の遺伝子解析は行わなかった。

C : 結果

1. EBV 陽性細胞クローンの分離と表面抗原解析

患者 A から得た細胞クローンは全て CD3, CD4, CD8, CD19, TCR $\alpha\beta$, TCR $\gamma\delta$ 陰性、CD16, CD56 陽性の NK 細胞に分類される細胞だった。患者 B からは CD3, CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$ 陽性、

CD19, TCR γ δ 陰性の α β T 細胞系の細胞、CD3, TCR γ δ 陽性、CD4, CD8, CD19, TCR α β 陰性の γ δ T 細胞系の細胞、および CD3, CD4, CD8, CD19, TCR α β , TCR γ δ 陰性、CD16, CD56 陽性の NK 細胞系の細胞の 3 種類の細胞クローンが分離された。患者 C からは、CD3, CD4, TCR α β 陽性、CD8, CD19, TCR γ δ 陰性および CD3, CD8, TCR α β 陽性、CD4, CD19, TCR γ δ 陰性の 2 種類の α β T 細胞系の細胞と CD3/TCR γ δ 陽性、CD4/ CD8/CD19/TCR α β 陰性の γ δ T 細胞系細胞クローンが分離された。

3. 培養細胞クローンの T 細胞受容体遺伝子の解析

患者末梢血から得た細胞クローンの TCR および Ig 遺伝子解析を行い、分子生物学的に 3 名の患者から得た細胞クローンの細胞種の同定を試みた。その結果、表面抗原解析結果から α β T 細胞系と推定された細胞クローンは CD4 陽性細胞・CD8 陽性細胞ともに、C β 1, J γ 1 遺伝子リアレンジメント陽性、J δ 1, J δ 3 遺伝子は欠失、J γ 1, J_H 遺伝子リアレンジメント陰性であり、いずれも α β T 細胞と確定した。表面抗原解析から γ δ T 細胞系と考えられた細胞クローンは、C β 1, J γ 1, J δ 3 遺伝子リアレンジメント陽性、J δ 1 遺伝子は欠失、J_H 遺伝子リアレンジメント陰性の γ δ T 細胞と確定した。また、表面抗原解析から NK 細胞と考えられた細胞クローンは、TCR および Ig 遺伝子のリアレンジメントは検出されず、NK 細胞であることが裏付けられた。

4. EBV-TR を用いたクロナリティー解析

EBV が細胞に感染すると、ウイルスゲノムは環状で細胞核に存在する。ウイルス粒子中ではゲノムは直鎖状でパッケージされ、ゲノム

DNA の両端には繰り返し配列 (Terminal Repeat: TR) が存在し、その繰り返し配列の数はウイルス粒子間で 2~10 以上とバリエーションがある。EBV ゲノムは感染すると環状化し細胞分裂と同調して増幅するが、TR の数は感染当初のウイルスゲノムに由来する TR の数が維持される。したがって、細胞クローンの TR 数を解析することで複数の細胞クローンが同じ親細胞に由来するの否かを知る事が可能となる。

患者 A から得られた細胞クローンおよび患者 A の組織 (リンパ節と咽頭潰瘍部) から得た DNA を BamHI で消化し、TR プロブを用いたサザンブロッティングにより解析したところ、図 1 のような結果を得た。

結果は、咽頭潰瘍部には 2 つの細胞クローンが存在するが、リンパ節には同じ 2 つのクローンに加えて 3 番目のクローンが存在すること、そして培養細胞クローンはリンパ節に存在する 3 番目のクローンとクロナリティーが一致することが明らかとなった。

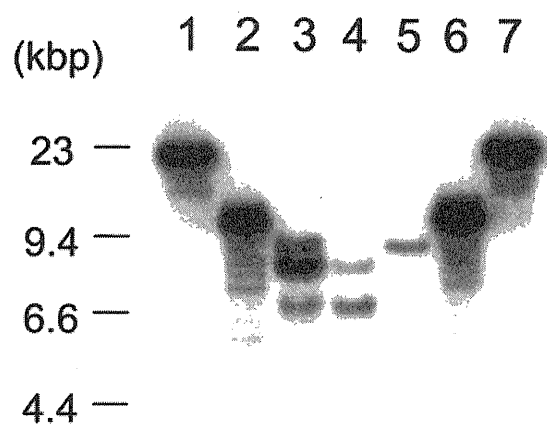


図 1 患者 A から得られた細胞クローンおよび患者 A 組織の EBV-TR を利用したクロナリティー解析 Lane 1, 7: Raji 細胞 (EBV ゲノムの複製が生じないためバンドは 1 本、Lane 2, 6: B95-8 細胞 (ウイルス複製が起きているためラダーバンドが認められる)、

Lane 3: A リンパ節、 Lane 4: 咽頭潰瘍部、
Lane 5: 培養細胞クローン

また、患者 B および C の末梢血から得られた細胞クローンの TR 解析では、いずれのクローンからも単一のバンドが検出され、その長さは 3 群の細胞クローンすべてで完全に一致することが明らかとなった (図 2)。

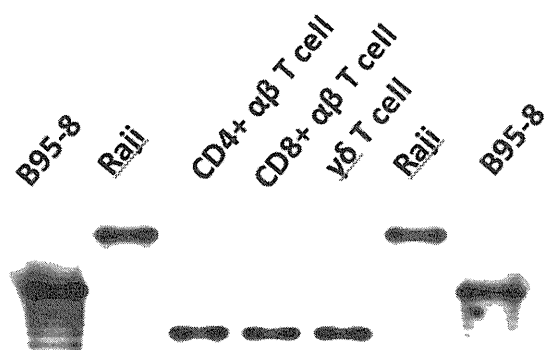


図 2: 患者 C から得られた細胞クローンに感染している EBV の TR 解析結果

D: 考 察

1. 患者 A の末梢血から分離された培養細胞クローンは全て NK 細胞だった。患者の組織中には多数の EBV 感染細胞が浸潤していることが ISH 法により明らかになっていたことから、組織中の EBV 感染細胞と培養細胞クローンのクロナリティーを EBV-TR を用いたサザン法で解析した。その結果、咽頭潰瘍部とリンパ節には同じクロナリティーをもつ 2 つのクローンが存在し、リンパ節にはその 2 つに加えて 3 番目のクローンが存在し、末梢血中から得られた細胞クローンはリンパ節にのみ存在する 3 番目のクローンと TR のリピート数が完全に一致した。このことから、培養細胞クローンは他の EBV 陽性 NK 細胞クローンよりも *in vitro* での増殖活性が高いと推定され、さらに患者が最終的にはリンパ腫を発症していることから、この 3 番目

の細胞クローンがリンパ腫の原因細胞である可能性が高いと考えられる。この症例の解析結果から、CAEBV 患者では当初ポリクローナルあるいはオリゴクローナルな EBV 感染細胞が存在するが、その中から悪性度の高い細胞クローンが選択的に増殖し、リンパ腫の発生につながる経路の存在が示唆された。

2. 患者 B の末梢血から得られた培養細胞クローンは、細胞表面マーカーおよび TCR・Ig 遺伝子解析の結果から、 $\alpha\beta$ T 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、NK 細胞の異なる 3 種類の系統の細胞であることが示された。しかし、EBV-TR のリピート数によるクロナリティー解析では 3 種類とも同一のクロナリティーと判定された。この結果は、3 種類の細胞クローンは細胞種の系統は明らかに違うが、同じ親細胞クローンから派生した細胞クローンであることを示唆している。したがって、EBV が T 細胞と NK 細胞に分化する前の幼若な細胞に感染し、その後細胞分化が進んで 3 種類の細胞になった可能性が高いと考えられる。患者 C の解析でも、EBV が $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞に分化する以前の幼弱なリンパ球に感染したことが示されており、患者 B の解析結果と一致している。これらの結果は、EBV が分化段階が低い幼弱なリンパ球に感染し、その後ことなる細胞種のリンパ球に分化したことを示唆している。今後、ヒト造血幹細胞移植によりヒトリンパ球が発生する NOG マウスを利用し、移植マウスから骨髓細胞や胸腺細胞を分離し、EBV 感染実験を行い T/NK 細胞への EBV 感染の詳細を解析していく予定である。

E: 結 論

CAEBV 原因である EBV 感染 T/NK 細胞がどの

ように成立・維持されているのかを探る事を目的に研究を行った。その結果、患者末梢血中には複数の EBV 感染細胞クローンが存在し、その中からリンパ腫細胞が生じている例や、細胞種の違う複数の EBV 感染細胞が末梢血中に検出される症例があることを見出した。これらの結果は、CAEBV 患者には当初複数の細胞クローンが存在し、その中から悪性形質を獲得した細胞が選択され、症状の重篤化やリンパ腫に至っている可能性を示唆している。

F：健康危険情報 なし

G：研究発表

論文発表

1. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. 2011; 95:345-349.
2. Ng SB, Selvarajan V, Huang G, Zhou J, Feldman AL, Law M, Kwong YS, Shimizu N, Nagami Y, Aozasa K, Salto-Tellez M and Chng WJ. Activated oncogenic pathways and therapeutic targets in extranodal nasal-type NK/T cell lymphoma revealed by gene expression profiling. *J Pathol*. 2011; 223:496-510.
3. Abe T, Segawa Y, Watanabe H, Yotoriyama T, Kai Y, Yasuda A, Shimizu N and Tojo N. Point-of-Care Testing System Enabling 30-min Detection of Influenza Genes. *LAB CHIP*. 2011; 11:1166-1167.
4. Yagasaki H, Kato M, Shimizu N, Shichino H, Chin M and Mugishima H. Autoimmune hemolytic anemia and autoimmune neutropenia in a child with erythroblastopenia of childhood (TEC) caused by human herpesvirus-6 (HHV6). *Ann Hematol*. 2011; 90(7):851-852.
5. Watanabe A, Tagawa H, Yamashita J, Teshima K, Nara M, Iwamoto K, Kume M, Kameoka Y, Takahashi N, Nakagawa T, Shimizu N and Sawada K. The role of microRNA-150 as a tumor suppressor in malignant lymphoma. *Leukemia*. 2011; 25(8):1324-1334.
6. Sugita S, Ogawa M, Inoue S, Shimizu N and Mochizuki M. Diagnosis of ocular toxoplasmosis by two polymerase chain reaction (PCR) examinations: qualitative multiples and quantitative real-time. *Jpn J Ophthalmol*. 2011; Jul 13. 55(5):495-501.
7. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, Sugimoto Y and Mochizuki M. Detection of Candida & Aspergillus species DNA using broad-range real-time PCR for fungal endophthalmitis. *Graefe Arch Clin Exp*. in press.
8. 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.
9. 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*, 2011;7(10):e1002326. Epub 2011 Oct 20.

10. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Inomata H, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, **Shimizu N**, Ito M and Fujiwara S Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE* 2011;6(10):e26630. Epub 2011 Oct 19.
 11. Ramakrishnan R, Donahue H, Garcia D, Tan J, **Shimizu N**, Rice AP and Ling P. Epstein-Barr virus BART9 miRNA modulates LMP1 levels and affects growth rate of nasal NK T cell lymphomas. *PLoS ONE*, 2011;6(11):e27271 2011 Nov 11.
 12. Nagasawa M., Ogawa K., Nagata K., **Shimizu N**. Serum granulysin as a possible biomarker of NK cell neoplasm. *Br J Haematol.* 148(5):812-814, 2010.
 13. Zhang Y, Ohyashiki JH, **Shimizu N**, Ohyashiki K. Aberrant expression of NK cell receptors in Epstein-Barr virus-positive gammadelta T-cell lymphoproliferative disorders. *Hematology.* 15(1):43-47, 2010.
 14. Kariya Y, Hamatake M, Urano E, Yoshiyama H, **Shimizu N**, Komano J. Dominant-negative derivative of EBNA1 represses EBNA1-mediated transforming gene expression of Epstein-Barr virus infection independent of rapid loss of viral genome. *Cancer Sci.* 101(4):876-881, 2010.
 15. 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.
 16. Miyagawa Y., Kiyokawa N., Ochiai N., Imadome K., Horiuchi Y., Onda K., Yajima M., Nakamura H., Katagiri Y., Okita H., Morio T., **Shimizu N**, Fujimoto J. and Fujiwara S. Ex vivo expanded cord blood CD4 T lymphocytes exhibit a distinct expression profile of cytokine-related genes from those of peripheral blood origin. *Immunology.* 128(3):405-419, 2010.
 17. Chan KK, Shen L, Au WY, Yuen HF, Wong KY, Guo T, Wong ML, **Shimizu N**, Tsuchiyama J, Kwong YL, Liang RH, Srivastava G. Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J Pathol.* 221(2):164-74, 2010.
- 国内学会発表
1. 伊藤仁也、橋本尚子、永井謙一、清水則夫、永野誠司、有馬浩史、田端淑恵、松下章子、柳田宗之、渡邊 健、丸山京子、初山麻子、高橋隆幸
網羅的ウイルス・真菌PCR 法を用いた造血細胞移植後肺障害の迅速診断
第33回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 松山市
 2. 谷ヶ崎博、加藤麻衣子、清水則夫、七野浩之、陳基明、麦島秀雄 非血縁骨髄ドナー由来の Chromosomal integrate HHV-6 (CIHHV-6) の1 女兒例 第33 回日本造血細胞移植学会 2011年3月10日 松山市
 3. 小川学、杉田直、井上静、望月學、片山未来、渡邊健、清水則夫、森尾友宏 ヘルペスウイルスの関与が疑われるぶどう膜炎に対する眼内液 PCR 検査の有用性の検討 第114 回日本眼科学会 2010年4月 名古屋市

4. 小川学、杉田直、井上静、清水則夫、赤尾信明、望月學 PCR 法を用いたアcant・アマーバ角膜炎の補助診断 第 21 回臨床寄生虫学会 2010 年 6 月 東京
 5. 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、伊藤守、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 徳島市
 6. 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、伊藤守、山本直樹、藤原成悦 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と解析 第 7 回 EB ウイルス研究会 2010 年 7 月 札幌市
 7. 今留謙一、矢島美彩子、川野布由子、中川温子、新井文子、市川紗弓、森尾友宏、大賀正一、大石勉、清水則夫、山本直樹、藤原成悦 : EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの政策と病態発現解析、第 20 回 EB ウイルス感染症研究会、東京、2010 年 3 月
 8. 満生紀子、遠藤明史、青木由貴、小野敏明、高木正稔、梶原道子、長澤正之、峯岸志津子、落合 央、清水則夫、森尾友宏、水谷修紀 : 当科で施行した造血幹細胞移植患者における網羅的 PCR 法による経時的ウイルス、第 32 回日本造血細胞移植学会総会、2010 年 2 月、浜松市
- reveals a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. XV International Congress of Virology, Sept 2011, Sapporo, JAPAN.
2. Ogawa M, S. Sugita S, Shimizu N, Morio T, Mochizuki M. Use of Human Herpes Virus (HHV) PCR Assays to Detect Viral DNA in Ocular Fluids of Patients with Herpetic Eye Diseases. ARVO 2010, Fort Lauderdale, Florida.
 3. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakagawa A, Kawano F, Ichikawa S, Miura O, Ito M, Shimizu N, Yamamoto N and Fujiwara S. A xenotransplant model of chronic active EB virus infection by use of NOG mice. The 14th Biennial Conference of the International Association for Research on Epstein-Barr Virus & Associated Diseases, Sept 2010, Birmingham, UK.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- なし

国際学会発表

1. Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Ito M, Komano J and Fujiwara S. Novel mouse xenograft models of CAEBV and EBV0HLH

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
研究分担者 東京医科歯科大学・大学院・発生発達病態学分野 森尾友宏)

研究要旨

慢性活動性EBV感染症(Chronic active EB virus infection: CAEBV)は予後不良のEBV-DNA量の増加とT細胞あるいはNK細胞への感染を特徴とする疾患であるが、その真の原因についての探索は限定的である。本研究では、CAEBVの分子基盤を明らかにするために、その詳細な免疫学的検討と共に、責任遺伝子探索研究を行い、候補遺伝子の策定を行った。その結果原因の候補となるものがいくつか抽出され、検証作業に入った。

A. 研究目的

CAEBVは、持続あるいは再発する伝染性単核症様症状と、末梢血および病変組織におけるEBVDNA量の増加を特徴とする予後不良の疾患である。T細胞やNK細胞へのEBVの持続感染が特徴とされており、また治療としては造血細胞移植が有効であることが示されているものの、本疾患の根本的原因は不明である。本研究はCAEBVの免疫学的異常および遺伝的背景について検討を加え、その発症機序・遺伝的素因を明らかにすることを目的として実際された。

B. 研究方法

1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積

2) CAEBVの免疫学的特性に関する研究

CAEBVの中で、先天性免疫不全症を背景に発症した症例を蓄積し、免疫学的特徴について、multicolor flow cytometryによる免疫細胞亜群同定、B細胞・T細胞新生能解析を行った。またEBNA1, BZLF1などのペプチド刺激後の細胞内IFN- γ を測定し、ウイルス特異的T細胞の頻度を測定した(研究分担者である新井文子先生との共同研究)。またISH-Flow法を確立すると共に、従来の方にてEBVコピー数を測定した。

3) CAEBVの遺伝的背景に関する研究

候補遺伝子解析(SAP, XIAP, BAFFR, CD19, CD21, CD81, ICOS, TACI) : 患者から得たgenomic DNAを用いて、全エクソン及びエクソン・イントロン境界領域の塩基配列を決定し。さらに、上記患者の末梢血単核球よりDNAを抽出して、全エクソン解析を行った(研究分担者である新井文子先生との共同研究)。

(倫理面への配慮)

本研究は、患者検体(末梢血)を用いて解析を行った。今回の解析においては遺伝子解析が含まれており、各種指針を遵守し、個人情報管理に十分配慮した研究を実施した。本研究に関しては、医学部遺伝子解析に関わる倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1) 当院CAEBV患者における臨床データの集積及び免疫学的特性の解析

平成22年度には2症例が新規症例として加わった。2症例ともに造血細胞移植を受け存命中である。1例では移植後にHHV6肺炎、原因不明の脳症を起こしたが、GVHDなく当科転院となった。転院後著しい右心不全となり、肺高血圧として入院加療を必要とした。新規症例以外の1例においては、最初に臍帯血移植を行ったが拒絶され、父親からのハプロ一致移植を実施した。しかし移植後のCMV感染症により逝去となった。もう1例のCAEBV患者は化学療法への反応は不良で、ウイルスコピー数に変化はなく、移植待機中であるが、HLAフルマッチドナーは骨髓バンクに見つけれず、1座不一致でコーディネート中である。

平成23年度に解析を行った患者は2名であった。共に造血細胞移植が行われているが、移植前の解析により、NKT細胞の低値が観察された。また1名においては低身長や汎血球減少を呈しており、何らかのDNA損傷修復異常症を基盤としている可能性が示唆された。

2) 免疫学的特性に関する研究

免疫学的検討ではSAP異常症やXIAP異常症で認められるNKT細胞の末梢血リンパ球中の比率が低下している症例があった。ウイルス特異的T細胞は検討した全員で低値であった。ISH-Flow法については、感染細胞を同定することが可能になった。また従来通り、リ

アルタイムPCRによってウイルスコピー数を測定しフォローアップに用いた。現時点ではImmunomagnetic beads法による細胞精製とreal time PCRによりウイルス感染細胞の同定が可能となっている。一方FACSによる解析は、single color解析では十分な解像度を得るまでに至っているが、multi-colorではまだ改善の余地がある。

3) 遺伝的背景の研究

分担者が実施した分類不能型免疫不全症 (Common variable immunodeficiency: CVID) の全国調査において、CVID患者199名の中で4名CAEBVの発症を認めており、有意に発症率が高いことが明らかになった。これらの患者はすべて女性であったが、X連鎖リンパ増殖症候群 (致死性EBV感染症) の責任遺伝子でありX染色体上に位置するSAP, XIAPに遺伝子変異を認めなかった。一方既知のCVID遺伝子についても塩基配列にはSNP以外の塩基置換や欠失・挿入などを認めなかった

2名の患者検体から得たDNAをGenomiPhiを用いて増幅し、断片化後、全エクソンをAgilentのsureselectを用いて捕捉して、Illumina HiSeq2000を用いてwhole exome解析を行った。検査結果はRead mapping genome build 37 (hg19): (Genome Reference Consortium human build 37:UCSC human genome 19) with BWA version 0.5.9を用いて解析し、またVariationはSAM (Sequence Alignment/Map) tools version 0.1.18を用いて検出した。その結果、固有の変異と思われるものがそれぞれ300-400カ所に、homozygous/compound heterozygous mutationは50前後の領域に認められた。まず50カ所の異常についてはcapillary sequencingで確認し、1名においては有意な変異を確定した。

D. 考察

本年の研究では、免疫不全症を背景としたCAEBV患者に絞って解析を行い、CAEBVの病態の背景には共通の免疫学的・遺伝的欠陥があることを示唆する所見を得た。ヘルペス属ウイルスにおいてはde novoの自然免疫系シグナル異常による重症ヘルペスウイルス感染症が報告されており、その責任遺伝子数も増加傾向にある。EBVでも同様に男性にて脆弱性を示す疾患が判明している。今回行った全エクソン解析を端緒としてさらに解析を進めることにより、CAEBVの根本原因を明らかにし、さらには予防法、根治的治療法の開発に繋がることが期待できる。

E. 結論

免疫不全症を背景に発症したCAEBVにおいて、その免疫学的解析及び遺伝子解析から、発症に関与すると思われるいくつかの遺伝子変異を抽出した。今後さらに責任遺伝子の同定を進める予定である。

F. 健康危険情報

報告すべき健康被害、健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. **Morio T.** Common variable immunodeficiency: an update on etiology, pathophysiology, and classification. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi.* 35:14-22, 2012.
2. Uchida Y, Matsubara K, Wada T, Oishi K, **Morio T**, Takada H, Iwata A, Yura K, Kamimura K, Nigami H, Fukuya T. Recurrent bacterial meningitis by three different pathogens in an isolated asplenic child. *J Infect Chemother.* 52:607-15, 2012.
3. 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, 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:e1002326., 2011.
4. 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.
5. **Morio T.** Atsuta Y. Tomizawa D. Nagamura-Inoue T. Kato K. Ariga T. Kawa K. Koike K. Tauchi H. Kajiwara M. Hara T. Kato S.: Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br. J. Haematol.* 154:363-372, 2011

2. 学会発表 国外学会

1. **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.
2. **Morio T,** Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. **The 52nd ASH Annual Meeting.** Orlando, Florida, USA. December 2010.
3. **Morio T,** Tomizawa D, Atsuta Y, Nagamura T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara S, and Kato S. Unrelated umbilical cord blood transplantation for patients with primary immunodeficiency in Japan. **XIVth meeting of the European Society for Immunodeficiencies.** Isutanbul, Republic of Turkey. October 2010.

国内学会：

1. 森尾友宏：ウイルス特異的 T 細胞とその維持、第 18 回日本輸血・細胞治療学会秋季シンポジウム、埼玉、2011 年 10 月 21 日
2. 渡辺恵理、渡辺信和、森尾友宏、安部泰子、原寿郎、中内啓光：重症複合免疫不全症に対する前処置軽減臍帯血移植後の混合キメリズム病態の解析、第 73 回日本血液学会学術集会、名古屋、2011 年 10 月 14 日-16 日
森尾友宏：分類不能型免疫不全症の病態解明へのアプローチ、第 39 回日本臨床免疫学会総会・学術集会、東京、2011 年 9 月 17 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金 分担研究報告書

(難治性疾患克服研究事業 H22-難治-一般-080) 研究

研究課題名(公募番号):

慢性活動性 EB ウイルス感染症の全国調査(2005~2010 年)

研究代表者 藤原成悦

分担研究者 脇口 宏

研究要旨

慢性活動性 EB ウイルス感染症(Chronic active EBV infection; CAEBV)は、T 細胞およびNK細胞への EB ウイルス感染に基づく腫瘍性リンパ増殖症で、数年経過で進行し致命的となる重症難治性疾患である。この疾患の現況を把握する目的で、アンケートによる全国調査を行い、患者発生状況を検討した。一次アンケートで CAEBV 症例ありと回答のあった施設に二次アンケートを送付し、臨床症状、検査所見、治療、予後等に関して集計、解析した。二次アンケートを送付した 148 例中 66 例から回答を得た(回収率 45%)。感染細胞は T 細胞、NK 細胞が主であり、感染細胞別での予後の差は認めなかった。造血幹細胞移植が施行された症例は 39 例(59%)で 2001~2004 年度(16 例/46 例; 35%)と比較して割合が増加していた。二次アンケート登録例での死亡率は 32%であり、2001~2004 年度(48%)と比較して低下していた。CAEBV の根治療法は造血幹細胞移植であり、造血幹細胞移植の進歩に伴う移植割合の増加が、予後改善に貢献していると考えられた。

分担研究者

高知大学小児思春期医学 脇口 宏(教授)

協力研究者

佐藤哲也(助教)、堂野純孝(学内講師)、

久川浩章(講師)、藤枝幹也(准教授)

前田明彦(高知県立幡多けんみん病院小児科)

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス感染症(Chronic active EBV infection; CAEBV)は、T 細胞およびNK細胞への EB ウイルス感染に基づく腫瘍性リンパ増殖症で、数年経過で進行し致命的となる重症難治性疾患である。患者は主として小児や働き盛りの若年青年層が主体であることから、この疾患の病態解明、治療の開発は患者個人にとっても、また、社会にとっても極めて重要である。

従来、CAEBV はわが国、韓国、台湾から多数報告例がみられた。近年、ヨーロッパから同疾患患者の報告がなされはじめており、注目度も上がっている。わが国では約 20 年前から熱心に研究されており、学術的にも診療レベルも高く、パイオニア的な役割を担っていることから、本研究の意義は国際的にもきわめて高い。

今回の研究は、過去の全国調査結果と比較し、治療予後の変化について検討し、より有効