

## 免疫不全状態における EBV モニタリングに関する研究

研究分担者 藤原成悦 （独）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** 移植後の免疫不全状態にある患者において、定期的に末梢血 EBV DNA 量を測定し、その結果に基づき免疫抑制剤の用量を調節することは一般的に行われており、EBV 関連リンパ増殖性疾患の予防につながっている。私たちは当センターの移植患者に対して同様のアプローチにより良好な結果を得ているが、HIV-1 感染者においても同様な EBV DNA モニタリングを行い、エイズリンパ腫の予防あるいは preemptive therapy を行うことが原理的に可能であると考えている。今年度は、当センターにおける移植患者 EBV DNA モニタリングの状況を報告し、併せて EBV DNA が増加した 2 名の HIV-1 感染者において EBV 感染細胞の同定を行った結果を報告する。

### A. 研究目的

EB ウイルス (EBV) は B リンパ球を主な標的細胞とし、これを無制限に増殖するリンパ芽球様細胞株にトランスフォームする能力をもつ。正常な免疫能をもつ感染宿主では、このリンパ芽球様細胞は EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞により除去されるため、EBV 感染は不顕性感染にとどまる。しかし、移植後や HIV-1 感染者の免疫不全状態では、リンパ芽球様細胞が免疫監視機構をのがれて増殖するため、移植後リンパ増殖性疾患やエイズリンパ腫のような日和見リンパ腫を発症することがある。この移植後リンパ増殖性疾患の発症予防あるいは早期発見を目的として、臓器移植あるいは造血幹細胞移植後に免疫抑制剤の投与を受けている患者においては、末梢血 EBV DNA 量を定期的に測定し、これが上昇した場合は免疫抑制剤の用量を下げるなどの対処をすることが一般的に行われており、有効な手段となっている。一方 HIV-1 感染者においては CD4 陽性細胞数などを免疫能の指標として定期的に測定しているが、EBV DNA のモニタリングは行われていない。ART 導入後のエイズリンパ腫は、EBV 陽性のびまん性大型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) が減少し、パーキットリンパ腫が増加している。パーキットリンパ腫は免疫能の極度の低下を示

さない HIV-1 感染者にも発症するため、CD4 陽性細胞数によるモニタリングが不十分となる可能性も考えられる。そこで私たちは、移植後の EBV DNA モニタリングを範として、HIV-1 感染者の EBV DNA モニタリングによる発症予防あるいは早期発見が可能であるかどうかを検討する研究を計画した。まず初めに少数の感染者においてパイロット的に定期的に EBV DNA を測定し、種々の免疫能の指標や臨床所見との関連を検討する。今年度は、末梢血 EBV DNA 量が上昇した HIV-1 感染者における EBV 感染細胞の同定や免疫学的解析の結果について報告する。

### B. 研究方法

#### 1. 末梢血 EBV DNA 量の測定

全血よりキアゲン社自動核酸精製装置 BIOROBOT EZ1 を用いて DNA を精製した。この DNA を鋳型として、EBV の BALF5 遺伝子上に設定したプライマーを用いて、Applied Biosystems 社 7500 型リアルタイム PCR 装置により EBV DNA を定量した。

#### 2. EBV 感染細胞の同定

末梢血より Lymphosepar I による比重遠心法により単核細胞を分離し、磁気ビーズを結合させた抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T

細胞、CD56 あるいは CD16 陽性 (CD3 陰性) NK 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞などの分画を得た。各分画より上記の方法で DNA を抽出し EBV DNA 量を定量した。

### (倫理面への配慮)

移植患者の EBV モニタリングとリンパ球マーカー解析に関する研究については、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得て行った。研究対象者からはインフォームドコンセントを取得した。検体は匿名化され個人情報厳密に管理された。HIV-1 感染者に対する同様の研究については、現在同倫理委員会の審査を申請しており、承認を得た上で開始する予定である。

## C. 研究結果

### 1. 移植後免疫不全状態における EBV DNA モニタリングの結果と免疫能の関係について

成育医療研究センターにおいては年間約 40 例の生体肝移植手術が行われる。その全例に対して毎週 EBV DNA 量を測定している。測定値が  $5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ g DNA を超えた場合はフローサイトメトリーによるリンパ球表面マーカー解析を行う。ここでは主に CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>の活性化 T 細胞数を免疫能の指標とし、その変化を免疫抑制剤投与量決定の参考とした。代表的症例の末梢血 EBV DNA 量の変化と図 1 に示す。本症例は、移植手術後 20 日目から EBV DNA 量が増加し 27 日目には  $2 \times 10^3$  copies/ $\mu$ g DNA に達した (図 1)。その時点のリンパ球解析では CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>細胞は 5.8%と低値を示した (図 2)。そこで免疫抑制剤のサイクロスポリン A の投与量を 400 mg/day から漸次 60 mg/day まで減量したところ、術後 34 日後から EBV DNA 量が低下し始め、54 日目には測定感度以下まで低下した。その間、CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>細胞の割合は 9.2%、36.1%と上昇した (図 2)。この症例からは、免疫抑制剤の用量と EBV DNA 量が正に相関し、これらと CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>細胞数が負に相関することが示唆された。このような EBV モニタリングを 140 症例に行った結果の解析から、上記の傾向が確認されたため、これらの数値に基づく EBV 感染管理のアルゴリズム

を公表した (Pediatr Transplant 16:748-57, 2012)。現在までの約 200 症例からは EBV 関連リンパ増殖性疾患が発症していない。

### 2. HIV-1 感染者における EBV DNA モニタリングの可能性について

現在研究班内の医療機関と連携をとり HIV-1 感染者の血液を定期的に採取しモニタリングを行うための体制を構築中である。体制が整い次第各研究機関の倫理委員会の承認を得てパイロット研究を開始する予定である。

これまでに大阪医療センターの依頼を受け、末梢血 EBV DNA 量が軽度上昇した HIV-1 感染者において EBV 感染細胞の同定を行っている。症例 1 は末梢血 (全血) EBV DNA 量が  $2.8 \times 10^2$  copies/ $\mu$ g DNA、分画後は CD19<sup>+</sup> (B 細胞) 分画が  $1.0 \times 10^3$  copies/ $\mu$ g DNA、CD8<sup>+</sup> (T 細胞) 分画が  $4.0 \times 10^2$  copies/ $\mu$ g DNA であった。両分画ともに全血分画より高い数値であったため、どちらにも EBV が感染していると考えられた。T 細胞免疫能の低下による EBV 感染 B 細胞の増殖の可能性が考えられる。また、数値は低いが CD8<sup>+</sup> (T 細胞) 分画の増加は EBV 関連血球貪食性リンパ組織球症の所見と一致しているため、警戒が必要であると考えられた。症例 2 では、血漿中の EBV DNA 量が  $1.2 \times 10^2$  copies/ml であり、全血では検出感度以下であったが、分画を行うと CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> の NK 細胞分画に感染していることが突き止められた。この結果は、HIV-1 感染者においては B 細胞以外の EBV 感染リンパ球が増加することがあるという以前の報告に一致していた。

## D. 考察

移植後の患者に対して定期的に末梢血 EBV DNA 量を測定し、その変動に対応して免疫抑制剤の用量を調節することは現在ほとんどの医療機関で一般的に行われていて、これにより EBV 関連リンパ増殖性疾患の予防あるいは早期発見による preemptive therapy が可能となっている。私たちも成育医療研究センターにおいて肝移植症例全例に対してこの EBV DNA モニタリングを行い、必要に応じてリンパ球表面マーカー解析を追加して行い、良好な結果を得ている。

HIV-1 感染者においてもその免疫能の低下に一致して EBV 感染細胞数が増加し、EBV DNA 量も上昇することが知られている。末梢血中の EBV 感染細胞は大多数が B 細胞であるが、一部 T 細胞および NK 細胞を含むことも報告されている。しかし、移植後のように EBV DNA 量をモニタリングし、エイズリンパ腫の発症予防或いは preemptive therapy に役立てようとする取り組みは行われていないように考えられる。末梢血 EBV DNA 定量、分画による EBV 感染細胞の同定、リンパ球マーカー解析による T 細胞免疫能の簡易測定は HIV-1 感染者においても原理的に可能である。EBV 感染細胞が増加している場合は、その細胞分画から RNA を抽出し RT-PCR 法により EBV 遺伝子発現を解析することも可能である。特に T 細胞に対して免疫原性の高い EBNA3, EBNA2 などの EBV 遺伝子の発現が認められた場合は T 細胞免疫能の顕著な低下が推測されるなど、感染者の免疫能について多くの情報が得られる可能性もある。ART の導入により HIV-1 感染者が極度の免疫不全状態に陥ることは希になり、パーキットリンパ腫などある程度免疫能が保たれた状態でも発症するリンパ腫が増加している。CD4<sup>+</sup> T 細胞数のみでなく EBV DNA 量や EBV 遺伝子発現パターンなど幅広い指標により感染者の免疫能を追跡することは、より効果的なエイズリンパ腫予防につながる可能性があると考えられる。

## E. 結論

移植後の EBV 関連リンパ増殖性疾患は末梢血 EBV DNA モニタリングにより予防あるいは preemptive therapy が可能となっている。HIV-1 感染者において同様の EBV DNA モニタリングを行い、エイズリンパ腫の予防あるいは preemptive therapy につなげることは原理的に可能であると考えられる。

## F. 健康危機情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A,

Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current studies on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatrics International*, 2014, in press.

2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network*, 2014, in press.

3) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.

4) Nakamura H, Liao H, Minami K, Toyoda M, Akutsu H, Miyagawa Y, Okita H, Kiyokawa N, Umezawa A, Imadome K, Inoue N, and Fujiwara S. Human cytomegalovirus induces apoptosis in neural stem/progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells by generating mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress. *Herpesviridae* 4:2, 2013.

### 2. 学会発表

(国際学会)

1) Fujiwara S. Reproduction and Analysis of Epstein-Barr Virus Pathogenesis in Humanized Mice. 4th International Workshop on Humanized mice. Sep 30, 2013, Seoul.

2) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases in Humanized Mice. Fall Conference of the Korean Association of Immunologists. Nov 8, 2013.

3) Matsuda G, Imadome K, Yajima M, Ochiai N, Mochizuki M, Kawano F, Shimizu N, Komano J, Yamamoto N, Fujiwara S. A humanized mouse model of cell-mediated immunotherapy against EBV-associated lymphoproliferative disorder. 38th Annual International Herpesvirus Workshop, Jul 20-24, 2013, Grand Rapids.

(国内学会)

1) 今留 謙一、松田 剛、川野 布由子、千葉 祐規乃、新井 文子、中澤 温子、伊藤 守、清水 則夫、藤原 成悦. 難治性 EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用

いた新規治療薬 3 剤の評価研究. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会、2013 年 11 月 11 日、神戸 .

- 2) 堀野雅人、今留謙一、今井耕輔、王路丹、松田剛、浜崎霞、小松穂菜実、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子 . EBV は T、NK 細胞に感染後 AID 発現とそれによる遺伝子変異蓄積をもたらす腫瘍発症に寄与する . 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌 .
- 3) 王路丹、今留謙一、小松穂菜実、福田哲也、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子 . EBV の感染により T,NK 細胞では IL-2 の存在下

CD137 発現が誘導され細胞生存が亢進する . 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌 .

- 4) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子 . EBV 陽性 T,NK 細胞は FOXP3 を発現し制御性 T 細胞同様 T 細胞の増殖を抑制する . 第 75 回日本血液学会学術集会、平成 25 年 10 月 11 日、札幌 .

**H. 知的所有権の出願・取得状況** ( 予定を含む )  
該当なし。

図 表

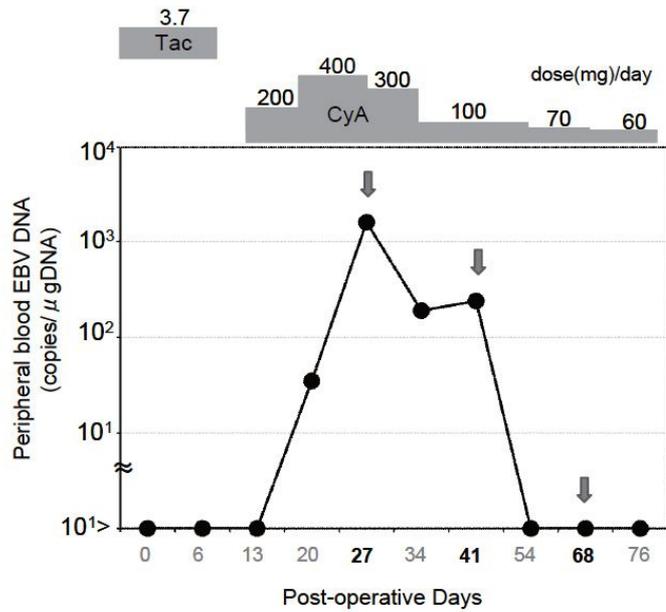


図 1 . 小児生体肝移植後の 1 症例における末梢血 EBV DNA 量の変化 . 上部に免疫抑制剤のタクロリムスおよびサイクロスポリン A の投与量を示す。矢印の日付にフローサイトメトリーによるリンパ球表面マーカー解析を行った。

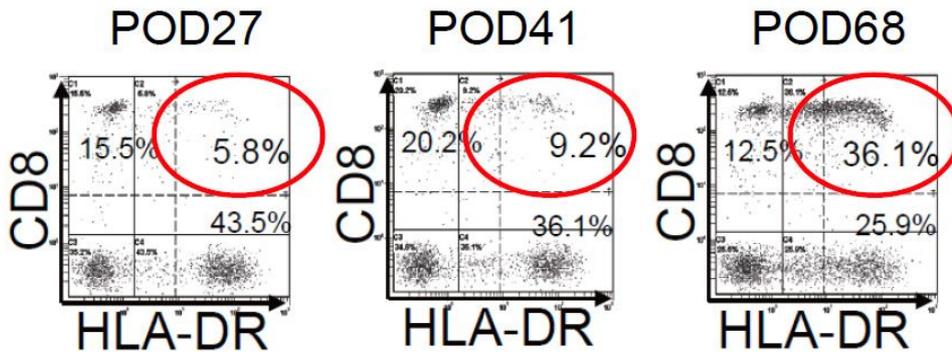


図 2 . 小児生体肝移植後の 1 症例における CD8<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>活性化 T 細胞数の変化 . 移植手術後 (POD) 27, 41, 68 日目のフローサイトメトリーの結果を示す。

