

Title	同種造血細胞移植後ヒトヘルペスウイルス6型再活性化の免疫機構の解明と予防法の確立
Sub Title	Human Herpes Virus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation
Author	山崎, 理絵(Yamazaki, Rie) 中山, 瞳(Nakayama, Hitomi)
Publisher	
Publication year	2020
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09961

研究課題名(和文) 同種造血細胞移植後ヒトヘルペスウイルス6型再活性化の免疫機構の解明と予防法の確立

研究課題名(英文) Human Herpes Virus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation

研究代表者

山崎 理絵 (YAMAZAKI, Rie)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：80365262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：同種移植患者34例の血漿中のHHV-6DNA量をデジタルPCR及びリアルタイムPCRで測定し、CD4+ T細胞におけるCD134(HHV-6特異的受容体)発現率とHHV-6再活性化の関連を前向きに検討した。HHV-6再活性化群では非再活性化群に比し移植前のCD4+ T細胞におけるCD134発現率(CD134/CD4比)が有意に高値だった(3.8% vs 1.5%, $P<0.01$)。多変量解析にて移植前CD134/CD4比高値(odds比=10.5, $P=0.03$)と臍帯血を含むHLA不適合移植(odds比=15.4, $P=0.04$)がHHV-6再活性化のリスク因子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種造血幹細胞移植後のHHV-6再活性化は幹細胞生着後に起こり、脳炎脊髄炎に進展した場合致命的な経過をたどることが多い。臍帯血移植がリスク因子となることが知られているが、その病態については不明な点が多い。今回の検討で、CD134陽性CD4T細胞の移植前モニタリングによりハイリスク群を抽出できる可能性が示唆された。今後個々のリスクにあわせたウイルス量モニタリング・予防・早期治療介入を行うことで、移植後HHV-6感染症発症を減らすことができれば、移植成績の向上が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We prospectively evaluated the relationship between HHV-6 reactivation and CD134+ T cells in the recipients of allo-HSCT.

HHV-6 viral load in plasma was quantitatively measured weekly after allo-HSCT by digital PCR in 34 patients. The ratio of CD134 in CD4+ T cells (CD134/CD4 ratio) was serially measured by flow cytometry before and after HSCT. The CD134/CD4 ratio before HSCT was significantly higher in patients with HHV-6 reactivation than in those without (median, 3.8% vs 1.5%, $P<0.01$). In the multivariate analysis, a higher CD134/CD4 ratio before conditioning (odds ratio [OR], 10.5, $P=0.03$) and a stem cell source from an HLA-mismatched donor (OR, 15.4, $P=0.04$) remained as significant factors associated with HHV-6 reactivation.

研究分野：造血幹細胞移植

キーワード：ヒトヘルペスウイルス6型 同種造血幹細胞移植 CD134 デジタル PCR

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内外の研究動向

ヒトヘルペスウイルス6型 (HHV-6) の概要

幼少時に発症する突発性発疹の原因ウイルスであり、初感染後、宿主体内に一生潜伏感染する。成人の大部分が抗 HHV-6 抗体陽性の既感染者である。HHV-6 ウイルスは β ヘルペスウイルス亜科に帰属し、HHV-6A および HHV-6B の 2 つに分類されるが、その病原性が問題となるのは HHV-6B である。HHV-6B の増殖はリンパ球、特に CD4 陽性細胞、マクロファージ、アストロサイト、オリオゴデンドロサイト、肝細胞、繊維芽細胞と様々な細胞で起こる (Bone Marrow Transplant 2015; 50: 1030)。他のヘルペスウイルス同様、初感染後これらの細胞に持続感染し、免疫抑制によって再活性化を起こす。

同種造血細胞移植との関連

現在、我が国では、白血病を中心とした難治性造血器腫瘍に対する根治療法として同種造血幹細胞移植が年間 3000 例近く行われている。しかし、大量抗がん剤による不可逆的な臓器障害と、同種免疫応答を抑えるための強い免疫抑制により、重篤な移植後感染症を合併し、致死的な経過をたどる症例も少なくない。特に HHV-6 再活性化は、30-50 % の症例で認められるといわれ、その発症時期は移植後 2 週から 6 週と幹細胞生着直後に集中している (Clin Infect Dis 2013; 57: 671)。HHV-6 脳炎、脊髄炎は特に致死的な経過をたどることが多く、発症例の生存率は半数未満、生存例においても多くは記憶障害やてんかんなどの後遺症のため、社会復帰が困難となる。脳炎脊髄炎以外にも、移植後早期に起こる発熱を伴う発疹や生着不全にも HHV-6 再活性化が関与しているとの報告がある (Bone Marrow Transplant 2013; 48: 574)。

HHV-6 再活性化に影響を与える危険因子

我々は以前造血幹細胞ソースとしての臍帯血が HHV-6 再活性化のリスクとなることを報告した (Biol Blood Marrow Transplant. 2007; 13: 100)。抗がん剤治療によるアポトーシスが、HHV-6 ウイルスの Replication を引き起こすこと (J Virol. 2013; 87: 10641) また CD134 分子が HHV-6 ウイルスのリンパ球へのエントリーに関与すること (J Virol. 2015; 89: 10125) が報告されているが、実際の臨床検体を使った検討はなされていない。またヘルペスウイルス属の再活性化には液性免疫および細胞性免疫の低下が関わるといわれ、近年になり HHV-6 についても特異的 T 細胞の同定が進み、免疫療法への応用が期待されている (Curr Opin Virol 2014; 9: 154, Clinical Immunol 2012; 144: 179) がさらなる検討が待たれる状況である。

(2) 着想の経緯

先にも述べたように、我々は以前に同種移植後の HHV-6 再活性化の最大の危険因子は臍帯血移植であることを報告した (Biol Blood Marrow Transplant. 2007; 13: 100)。出生時に採取される臍帯血ドナーの免疫担当細胞は HHV-6 に対して naïve で特異的な抗 HHV-6 免疫が存在しない。このため既感染レシピエントの体内に潜在する HHV-6 が移植後高頻度に再活性化すると考えられている。

しかし、臍帯血移植患者全例が再活性化することはなく、また骨髄や末梢血幹細胞移植後にも HHV-6 再活性化がみられることがある。また、同種移植後、特異的免疫細胞の再構築が確立する以前の移植後超早期に感染が頻発していることから、特異免疫がどの程度再活性化抑制を担っているのか、詳細は明らかでない。

先にあげた我々の報告では HHV-6 の再活性化に患者血清中の HHV-6 特異的 IgG 値が関連することを報告し、液性免疫の関与を示唆しているが、HHV-6 に対するドナー由来抗体産生がどのタイミングで惹起されるのかは明らかになっていない。

我々は HHV-6 再活性化においては他のウイルスとは異なる特異免疫の再構築パターンを示すのではないかと推測している。

2. 研究の目的

同種造血幹細胞移植後の HHV-6B 再活性化は、重篤な脳炎や脊髄炎を起こし、移植後早期死亡の原因となるが、再活性化の免疫学的・ウイルス学的機序の詳細はまだ分かっていない。本研究では、同種移植患者及びドナーについて継時的に

HHV-6B 特異的液性免疫および細胞性免疫の評価 潜在ウイルス量の評価 ウイルスの増幅や神経細胞感染に関与する液性因子の解析

を行い、再活性化のリスク因子を抽出するとともに、細胞療法や免疫グロブリン療法も視野に入れた「HHV-6B 再活性化の予防及び先行的治療のガイドライン」を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

当院で同種造血幹細胞移植を施行する患者およびドナー約 100 組を対象に下記の解析を行う。

血漿及び血球中の HHV-6DNA 量の測定

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA 法)および indirect immunofluorescence assay(IF 法)による抗 HHV-6 抗体価測定：特異的液性免疫の評価

HHV-6B 再活性化に伴うサイトカイン、ケモカイン、アポトーシス関連因子、リンパ球表面マーカーの評価

これらの実験結果と臨床情報を合わせて統計的解析を行い、HHV-6B 再活性化のリスク因子を抽出し、早期診断、早期治療につながる知見を得る。

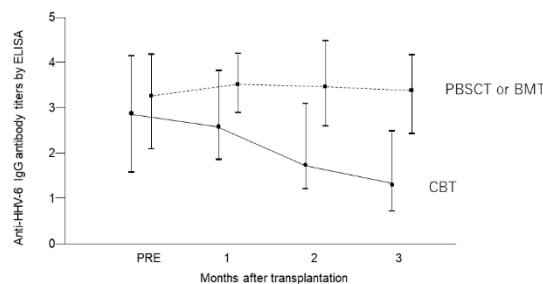
4. 研究成果

(1) ELISA 法および IF 法による抗 HHV-6 抗体価測定

56 例の同種造血幹細胞移植患者および 32 例の健常人コントロールにつき、抗体価を測定した。IF 法では陰性例を認めなかったが、ELISA 法では 5 例が陰性となった。ELISA 法の結果と IF 法の結果はほぼ相関した(Correlation coefficient: 0.53、 $P < 0.01$)。臍帯血移植症例に限定して検討したところ、22 例のうち再活性化を起こさなかったのは 4 例のみであり、この 4 例の ELISA 法で測定した HHV-6 抗体価は、再活性化を起こした 18 例に比べ有意に高く ($P = 0.03$) IF 法でも 4 例全例が 1 : 80 以上であった。臍帯血移植症例では、再活性化が起こっているにもかかわらず移植後 2 か月、3 か月と HHV-6 抗体価が有意に低下しており ($P < 0.01$)、再活性化を起こした非臍帯血移植症例では、このような経時的変化は見られなかった ($P = 0.13$)。移植後 2 か月、3 か月の各ポイントで臍帯血移植と非臍帯血移植の抗体価の中央値を比較すると、いずれも臍帯血移植症例において有意に抗体価が低かった ($P < 0.01$)。

臍帯血移植症例は、再活性化のハイリスク群であると報告されているが、本検討により臍帯血移植後症例では HHV-6 に対する液性免疫応答が低下していることが確認された。輸注される教育を受けた B リンパ球や残存しているホストの抗体産生細胞が、HHV-6 再活性化の抑制に寄与している可能性がある。(Figure1)

Figure 1. Anti-HHV-6 IgG antibody titers in HHV-6 reactivated patients before and after transplantation



(2) 血漿中 HHV-6 ウイルス量と CD134 陽性 CD4T 細胞の関連性

リンパ球の各種細胞表面マーカー、特に、HHV-6 特異的な宿主受容体である CD134 の発現に着目し、HHV-6 再活性化への関与について解析した。

Table 1. Factors associated with HHV-6 reactivation after allo-HSCT

Factors	Univariate <i>P</i> value	Multivariate		
		Odds ratio	95% CI	<i>P</i> value
Stem cell source				
HLA-mismatched donor (including CBT) vs HLA-matched donor	< 0.01	15.4	2.0–121.0	0.04
CD134/CD4 ratio before conditioning				
≥ 3.0% vs < 3.0%	0.03	10.5	1.3–85.1	0.03

CI, confidence interval; HLA, human leukocyte antigen; CBT, cord blood transplantation; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation.

同種造血幹細胞移植を行った患者 34 例を対象に、高感度にウイルス DNA を評価可能なデジタル PCR を用いてより精密に血漿中の HHV-6 DNA 量を測定し、CD4+ T 細胞における CD134 発現率と HHV-6 再活性化の関連について前向きに検討した。

デジタル PCR では HHV-6 DNA の検出感度は 7 copy/mL と向上し、従来のリアルタイム PCR (検出感度 200

copy/mL) と比較して HHV-6 DNA の検出率は有意に高かった (31% vs. 13%, $P < 0.01$)。また HHV-6 脊髄炎発症例を含む 30% の症例において、デジタル PCR ではリアルタイム PCR より 1-2 週間早く HHV-6 DNA の検出が可能であった。HHV-6 再活性化群では非再活性化群と比較して移植前の CD4+ T 細胞における CD134 発現率 (CD134/CD4 比) が有意に高値であった (中央値 [範囲], 3.8% vs. 1.5% [0.4–3.7], $P < 0.01$)。多変量解析では、移植前に CD134/CD4 比が高い症例 (odds 比 = 10.5, $P = 0.03$) と、臍帯血移植を含むヒト白血球型抗原不適合移植において (odds 比 =

15.4, $P = 0.04$) 移植後 HHV-6 再活性化のリスクが有意に増加することが判明した。(Table1)
さらに対象症例を増やし 109 例について移植前の CD134+CD4+T 細胞の絶対数を調べたところ、high copy 数の活性化あるいは HHV-6 関連 CNS 合併症をきたし治療を必要とした症例(要治療群: $N = 10$)において、治療不要群($N = 99$))に比べ移植前の CD134+CD4+T 細胞の絶対数が有意に多いことが確認された($8.1/\mu\text{l}$ vs. $2.1/\mu\text{l}$, $P = 0.01$)。多変量解析でも、移植前の CD134+CD4+細胞の絶対数が高い症例において、移植後治療を必要とするような重篤な HHV-6 再活性化を起こすリスクが有意に高いことが明らかとなった。(odds 比= 16.9, $P = 0.01$)

(3) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究では、まず第 1 に HHV-6 再活性化を起こしやすい臍帯血移植症例における HHV-6 特異的液性免疫の低下を確認し、液性免疫応答が HHV-6 再活性化抑制に關与している可能性を示唆した。

第 2 に、同種造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化を検出するための新たな検査方法として、より高感度に HHV-6 DNA を検出できるデジタル PCR による検査法を開発した。

第 3 に、移植後の HHV-6 再活性化のリスク因子として、従来の幹細胞種に加え、新たに独立したリスク因子として、移植前の CD134/CD4 比が高値であることを同定した。

第 4 に、脳炎などの HHV-6 disease の発症、高コピー陽性化など治療を必要とするような症例においては、移植前の CD134 陽性 CD4 陽性 T 細胞の絶対数が高値であることを確認した。

特に第 3、第 4 の結果より、HHV-6 再活性化の高リスク症例の抽出に移植前の CD134/CD4 比あるいは絶対数のモニタリングが有用である可能性が示唆された。第 1 の結果より、移植前の患者 HHV-6 抗体価測定もリスク評価に有用かもしれない。これらの結果を踏まえ、より効率のよい HHV-6 ウイルス量のモニタリング、予防、早期治療法を考案し、臨床現場に還元していく予定である。

また、移植前の CD134+ T 細胞が移植後 HHV-6 再活性化に及ぼすメカニズムについてはまだ不明な点が多く、今後の解析が待たれるところである。CD134 陽性 CD4 陽性 T 細胞の特性を解明するため、これらの細胞に高発現するその他の因子に着目し、解析を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakayama H, Yamazaki R, Kato J, Koda Y, Sakurai M, Abe R, Watanuki S, Sumiya C, Shiroshita K, Fujita S, Yamaguchi K, Okamoto S, Mori T.	4. 巻 220(6)
2. 論文標題 Human Herpesvirus 6 Reactivation Evaluated by Digital Polymerase Chain Reaction and Its Association With Dynamics of CD134-Positive T Cells After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 1001-1007
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/infdis/jiz237.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 中山瞳、山崎理絵	4. 巻 60 巻 8号
2. 論文標題 Introduce my article	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1000-1001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.11406/rinketsu.60.1000	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Mori T, Nakayama H, Koda Y, Sakurai M, Abe R, Chieko S, Shiroshita K, Okamoto S, Yamazaki R
2. 発表標題 Association of CD134-positive T cells and HHV-6 reactivation evaluated by digital polymerase chain reaction in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantatiton
3. 学会等名 11th International Conference on HHV-6 & 7 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Nakayama, Rie Yamazaki, Jun Kato, Yuya Koda, Masatoshi Sakurai, Ryohei Abe, Chieko Sumiya, Kohei Shiroshita, Shinichiro Okamoto, Takehiko Mori
2. 発表標題 HHV-6 reactivation evaluated by digital polymerase chain reaction and its association with dynamics of CD134-positive T cells after allogeneic stem cell transplantation
3. 学会等名 45th Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中山 瞳、山崎 理絵、加藤 淳、甲田 祐也、櫻井 政寿、安部 涼平、綿貫 慎太郎、城下 郊平、住谷 智恵子、藤田 進也、山口 健太郎、岡本 真一郎、森 毅彦
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後HHV-6再活性化におけるCD134陽性T細胞の影響
3. 学会等名 第41回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi Nakayama, Rie Yamazaki, Jun Kato, Yuya Koda, Masatoshi Sakurai, Ryohei Abe, Chieko Sumiya, Kohei Shiroshita, Shinichiro Okamoto, Takehiko Mori,
2. 発表標題 Establishment of novel monitoring assay, digital PCR, for HHV-6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation
3. 学会等名 23rd Annual Congress of Asia-Pacific Blood and Marrow Transplantation Group (APBMT 2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山 瞳、山崎 理絵、加藤 淳、甲田 祐也、安部 涼平、橋田 里妙、山根 裕介、城下 郊平、佐藤 雄紀、岡本 真一郎、森 毅彦
2. 発表標題 同種造血幹細胞移植後の HHV-6 再活性化に対する特異的液性免疫の評価.
3. 学会等名 第 40 回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中山 瞳 (NAKAYAMA Hitomi)		