

## 総説

## 重症複合免疫不全症に対する臍帯血ミニ移植後の混合キメリズムの遷延

渡辺 恵理<sup>1)</sup>, 阿部 泰子<sup>2)</sup>, 工藤 寿子<sup>2)</sup>, 浜田 聡<sup>3)</sup>, 糸洲 倫江<sup>4)</sup>, 中内 啓光<sup>5)</sup>,  
森尾 友宏<sup>6)</sup>, 渡辺 信和<sup>1)</sup>

Persistent mixed chimerism in patients with severe combined immunodeficiency  
after cord blood transplantation

Eri Watanabe, M. Sc.<sup>1)</sup>, Yasuko Abe, M. D.<sup>2)</sup>, Kazuko Kudo, M. D., Ph. D.<sup>2)</sup>, Satoru Hamada, M. D., Ph. D.<sup>3)</sup>,  
Michie Itosu, M. D.<sup>4)</sup>, Hiromitsu Nakauchi, M. D., Ph. D.<sup>5)</sup>, Tomohiro Morio, M. D., Ph. D.<sup>6)</sup>,  
Nobukazu Watanabe, M. D., Ph. D.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Laboratory of Diagnostic Medicine, <sup>2)</sup>Division of Stem Cell Therapy, Center for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo; <sup>3)</sup>Division of Hematology and Oncology, Shizuoka Children's Hospital; <sup>4)</sup>Bone Marrow Transplantation Center, <sup>5)</sup>Department of Pediatrics, Ryukyuu University; <sup>6)</sup>Department of Pediatrics and Developmental Biology, Graduate School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

## Abstract

Severe combined immunodeficiency (SCID) is a fatal syndrome of diverse genetic causes characterized by profound deficiencies of T cell and B cell function. In the absence of therapy, the lack of adaptive immunity results in overwhelming infections and death within the first year of life. Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a curative treatment for SCID. Although SCID patients are deficient in T cells, graft failure and prolonged mixed chimerism have occurred in some cases with SCID after HSCT. To explore the mechanisms that underlie these pathogenic conditions, we analyzed the chimerism of each leukocyte subset in two cases with SCID after HLA-mismatched cord blood transplantation (CBT) using flow cytometry, HLA-Flow. We found that the mixed chimerism in myeloid cells persisted for several years after CBT in both cases. In addition, the chimerism and the colony-forming ability were recipient dominant in the hematopoietic stem/progenitor cells (HSPC) of the patient two months after CBT. It showed that the replacement of recipient-derived HSPC by donor-derived ones had not been sufficient. The development of recipient-derived memory B cells in SCID patient with T<sup>+</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>-</sup> phenotype was skewed compared with donor-derived ones. These data suggest that the necessity of long-term support of intravenous immunoglobulin in SCID after HSCT is concerned with the insufficient replacement of HSC. HLA-Flow was very useful to investigate the pathophysiology of the immunological disorders after HSCT in SCID.

**Key words : severe combined immunodeficiency (SCID), cord blood transplantation, chimerism**

## 【はじめに】

SCIDは、細胞性免疫と液性免疫の両者を欠損することで重篤な免疫不全状態を呈する先天性疾患である。生後数ヶ月から反復感染を起こし、早期に診断し適切な治療を行わなければ乳幼児期に死亡する<sup>1)</sup>。これまでにIL2RG, JAK3, IL7RA, RAG1/RAG2, Artemis,

東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター<sup>1)</sup> 病態解析領域,<sup>5)</sup> 幹細胞治療分野;<sup>2)</sup> 静岡県立こども病院 血液腫瘍科;<sup>3)</sup> 琉球大学医学部 骨髄移植センター, <sup>4)</sup> 琉球大学医学部 小児科;<sup>6)</sup> 東京医科歯科大学 小児科

受付日：平成25年7月1日 受理日：平成25年7月18日

Table 1 Characteristics of SCID Patients

UPN	Molecular Deficiency	Sex	Age at CBT (month)	Sex of CB	Donor HLA		Recipient HLA		Mother		Conditioning Regimen
					A	B	A	B	A	B	
1	$\gamma$ c	Male	7	Female	2, <u>31</u>	60, 12	2, <u>11</u>	60, 12	ND	ND	Flu +L-PAM
2	Artemis	Female	7	Male	11, 33	35, <u>12</u>	11, 33	<u>13</u> , 35	<u>26</u> , 33	61, 35	Flu +L-PAM

UPN, unique patient numbers; CB, Cord Blood; CBT, Cord Blood Transplantation; HLA, Human leukocyte antigen; ND, not determined; Flu, Fludarabine; L-PAM, Melphalan; The antibodies against the HLA with underlined number were used for analysis.

Ligase4, DNA-PKcs, CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\zeta$ , ADA, CD45 など, 13 種類以上の責任遺伝子が報告されている<sup>1)</sup>。治療には造血幹細胞移植が有効であり, 乳幼児への前処置関連毒性や晩期障害を軽減するため, 前処置を軽減した移植が行われている。ドナー細胞資源としては, 必要時にすぐ移植できることや HLA ミスマッチでも重症の GVHD が少ないことなどの利点から, 近年臍帯血が用いられている<sup>2)</sup>。SCID に対する前処置軽減臍帯血移植では, レシピエントに T 細胞や NK 細胞が存在しないにもかかわらず, 移植後長期にわたりドナーとレシピエントの血液細胞が混在する混合キメリズムが遷延する場合がある<sup>3)</sup>。T 細胞はもともとレシピエントに存在しないため, 移植後のどの時点においてもすべてドナー由来である一方で, 骨髄系細胞である好中球や単球がレシピエント優位という, いわゆるスプリットキメリズムとなる場合も多い<sup>3)</sup>。また, 移植後の長期的評価では, キメリズムと免疫再構築との関連が示唆されており<sup>4)</sup>, 混合キメリズムの遷延がその後の拒絶につながる可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。このように, キメリズムの遷延は臨床問題であるが, そのメカニズムについてはなお不明である。

キメリズム解析は, 造血細胞移植後の生着確認を目的として広く用いられている。通常は X/Y-FISH 法<sup>6)</sup> や STR-PCR 法<sup>7)</sup> により, 全白血球分画におけるレシピエント由来細胞の頻度が測定されるが, SCID 患児への造血細胞移植においては, 白血球サブセットごとに異なる頻度のキメリズムを示すため, 現行の解析方法では詳細な病態解析は困難である。我々は, HLA 不一致移植における不一致 HLA 抗原を指標として, フローサイトメーターとアレル特異的抗 HLA 抗体 [allele-specific anti-HLA antibodies (ASHmAb)] を使用したキメリズム解析法 (HLA-Flow 法) を開発した<sup>8)</sup>。本法は白血球のサブセット毎にキメリズムの測定が可能なることから, 生着不全, 拒絶あるいは再発の早期診

断に極めて有用である<sup>8), 9)</sup>。我々は, SCID 患児に対する前処置軽減臍帯血移植後の末梢血と骨髄におけるキメリズム動態を, HLA-Flow 法により白血球サブセット毎に解析した。

### 【患者と方法】

#### 患者

2008 年と 2010 年にそれぞれ琉球大学病院と静岡県立こども病院において臍帯血移植を受けた 2 例の SCID 患児を対象とした。SCID 患児の原疾患および移植における HLA の組み合わせを Table 1 に示す。

研究計画書を各移植施設の治験審査委員会と東京大学医科学研究所・倫理審査委員会に提出し, 承認を受けた。研究計画を両親に説明し, 文書で同意を得た後, 患児の末梢血あるいは骨髄液をヘパリン添加で採取した。

#### 細胞の調整と染色

末梢血あるいは骨髄液を Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 不含リン酸緩衝生理食塩水 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> free phosphate buffered saline [PBS(-)] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で 2 倍に希釈し, リンパ球比重分離液 (Lymphosepar I, IBL, Japan) を用いて比重遠心法により単核細胞を分離した。得られた単核細胞を冷 PBS(-) で 1 回洗浄し, 100  $\mu$ l の staining medium [5% fetal bovine serum (FBS) 添加 PBS(-)] に懸濁し, 蛍光標識抗体で染色した。

移植前の患児 (症例 2) とその母親の末梢血における免疫細胞の絶対数を, BD Trucount tubes<sup>TM</sup> (BD Biosciences, San Jose, USA) を用いて測定した。抗体組み合わせには, Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗 CD66b 抗体 (FITC-CD66b), Phycoerythrin (PE)-CD16, Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanin5.5 (PerCP-Cy5.5)-CD8, PE-Cy7-CD3, Allophycocyanin (APC)-CD56, APC-Cy7-CD19, Pacific Blue-CD4 および Pacific Orange-CD14 を用いた。

末梢血の白血球サブセット毎のキメリズム解析（症例1および症例2）には、症例2を例にとると、FITC-HLA-B12, PE-CD123, PE-Cy5-CD235a, PerCP-Cy5.5-CD8, Biotin-HLA-B13 [Streptavidin (SA) -PE-Cy7で二次染色], PE-Texas Red (TR) -CD3, APC-CD11c, Alexa Fluor 700-CD56, APC-Cy7-CD19, Pacific Blue-CD4 および Pacific Orange-CD14 の抗体組み合わせを用いた。

骨髄の造血幹・前駆細胞サブセットのキメリズム解析（症例2）には、FITC-HLA-B12, PE-CD123, PerCP-Cy5.5-CD38, PE-Cy7-CD45, APC-CD34, Biotin-HLA-B13 (SA-APC-Cy7で二次染色), Pacific Blue-CD45RA および Pacific Orange-CD14 の抗体組み合わせを用いた。

末梢血のB細胞サブセットの解析（症例1）には、FITC-CD138, PE-IgD, PE-Cy5-CD235a, PerCP-Cy5.5-CD20, PE-Cy7-CD27, PE-TR-CD19, APC-CD34, Alexa Fluor 700-CD38, Biotin-HLA-A11 (SA-APC-Cy7で二次染色), V450-IgM および Biotin-HLA-A31 (SA-V500で二次染色) の抗体組み合わせを用いた。

抗HLA抗体はOne Lambda社 (Canoga Park, CA, USA) から、PE-TR-CD3とPE-TR-CD19はInvitrogen社 (Carlsbad, CA, USA) から、その他の抗体とstreptavidin試薬はBD Pharmingen社 (San Diego, CA, USA) から購入した。

免疫細胞の絶対数の解析では、標識抗体で染色した後、1mlの溶血試薬 (BD Pharm Lyse™, BD Biosciences, San Jose, USA) を添加し室温で15分間インキュベート後、フローサイトメーターで解析した（後述）。その他の染色においては、細胞を各蛍光標識抗体の組み合わせで染色後、冷PBS(-)で洗浄した。100μlのstaining mediumに懸濁し、適当な蛍光標識streptavidinで二次染色した後、冷PBS(-)で洗浄した。なお、B細胞サブセットの解析においては、2種類のBiotin標識抗HLA抗体を同時に用いざるを得なかったため、交叉反応を避けるために次の手順で染色した。まず、Biotin-HLA-A11を反応させた後、SA-APC-Cy7で二次染色を行った。冷PBS(-)で洗浄後、streptavidin (1mg/ml, 10μl) でブロッキングを行い、冷PBS(-)で洗浄した。続いてbiotin (0.5mM, 50μl) でブロッキングを行い、冷PBS(-)で洗浄した。Biotin-HLA-A31とその他の蛍光標識抗体を反応させ、最後にSA-V500で二次染色を行った。ASHmAbによる染色が特異的に行われたか確認するため、移植後1,105日目においてB細胞をドナー由来細胞とレシピエント由来細胞に分けてソーティングし、XY-FISH法で各分画のキメリズムを解析した。その結果、HLA-

Flow法によるキメリズム解析結果と一致した（データは示さず）。

#### フローサイトメトリー解析

染色した細胞はstaining mediumに懸濁し、死細胞染色試薬Propidium iodide (PI) を添加後（絶対数測定の場合を除く）、BD FACS Aria™ II SORP (BD Biosciences, San Jose, USA) を用いて測定した。得られたFCSデータは解析用ソフトウェアFlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR) で解析した。

#### 造血前駆細胞のコロニーアッセイ

骨髄幹・前駆細胞の各分画をフローサイトメトリーによりドナー由来細胞とレシピエント由来細胞に分けて300個ずつソーティングし、それぞれ1mlのメチルセルロース培地 (MethoCult™, STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada) に懸濁後、35×10mm Tissue culture dishで培養した。2週間後にコロニーを観察し、それらの種類と数を測定した。

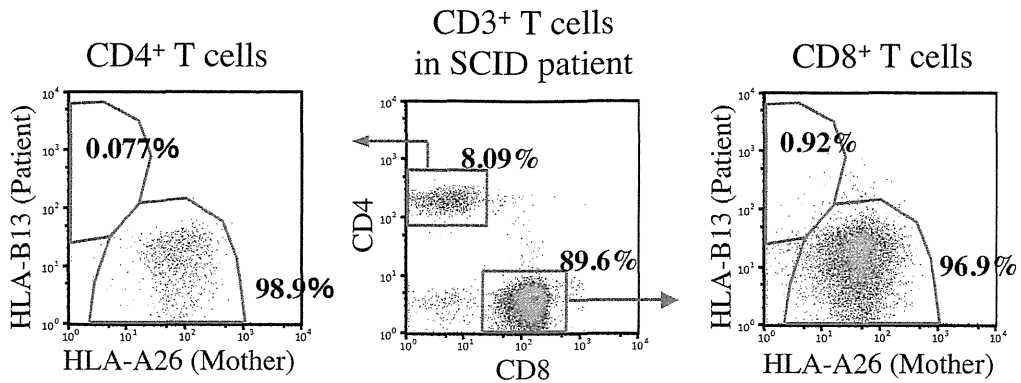
## 【結果】

### SCID 患児末梢血における母親由来細胞の検出と移植後の動態

臍帯血移植前の症例2 (Artemis異常症) とその母親の末梢血について、免疫細胞の絶対数を測定した結果、SCID患児の末梢血に有意な頻度のT細胞 (520 cells/μl) が検出され、その90%はCD8陽性T細胞であった (Fig. 1中央)。HLA-Flow法によりキメリズムを解析した結果、患児の末梢血で検出されたT細胞はすべて母親由来であった (Fig. 1左と右)。また、移植後2週目のキメリズム解析では、CD8陽性T細胞で母親由来細胞とドナー由来細胞が検出され (Fig. 2上段右)、前者が約25%を占めていた。4週目の解析では母親由来のCD8陽性T細胞は消失し、すべてドナー由来に置き換わっていた (Fig. 2下段右)。

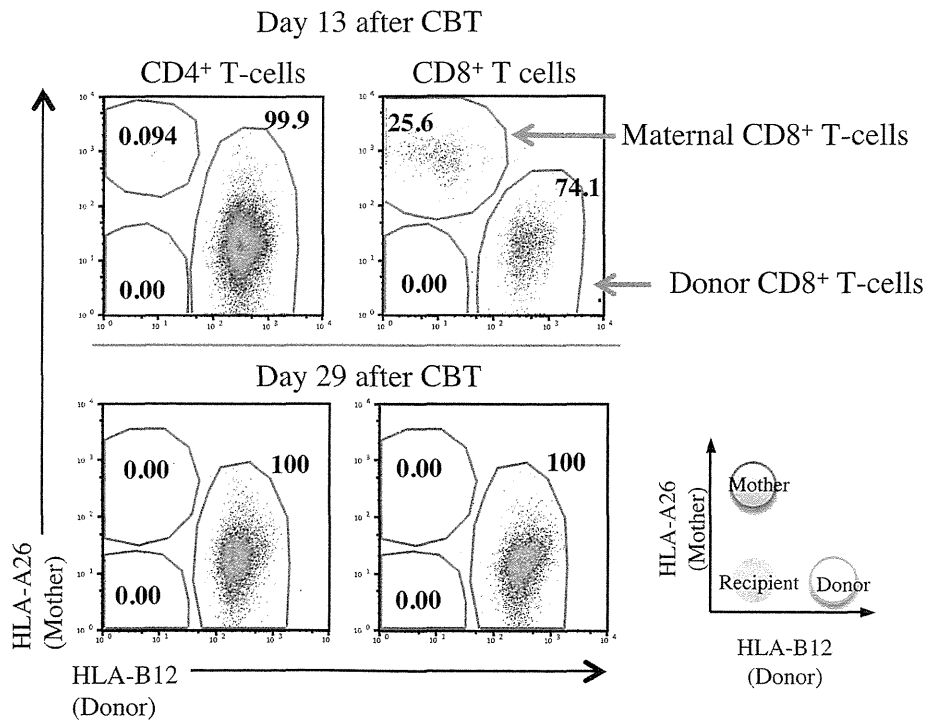
### 移植後に遷延するスプリットキメリズム

臍帯血移植後の末梢血のキメリズムを経時的に解析した結果、どちらの症例においてもリンパ系細胞はドナー優位、骨髄系細胞はレシピエント優位という極端なスプリットキメリズムが長期に渡り継続していた (Fig. 3, 4)。症例1 (共通γ鎖欠損症) では、リンパ系細胞のうちもともと欠損するT細胞とNK細胞は移植後常にドナー由来であったが、骨髄系細胞である単球と好中球は移植直後から3年以上経過後もレシピエント優位のキメリズムが遷延していた (Fig. 3)。また、骨髄系樹状細胞 [myeloid dendritic cells (mDC)] と形質細胞様樹状細胞 [plasmacytoid dendritic cells (pDC)]



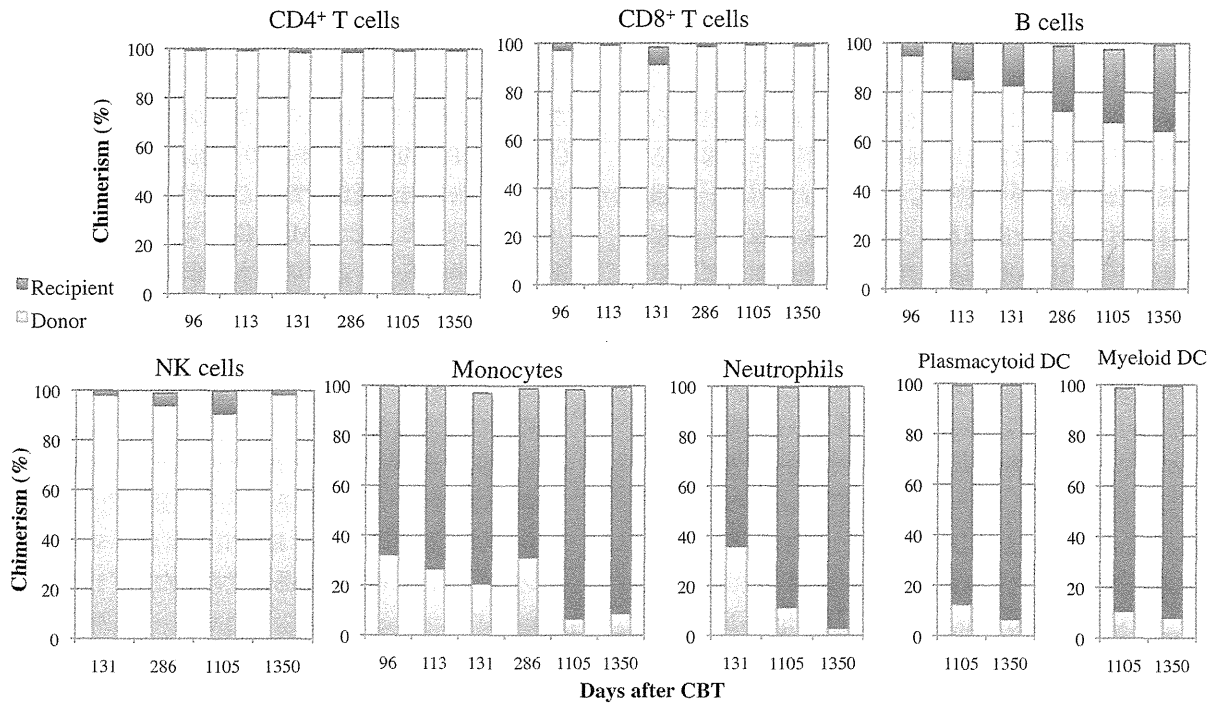
**Figure 1** Chimerism analysis of peripheral blood T cells in SCID patient before CBT.

Significant amount of T cells were detected in the peripheral blood of Artemis-SCID patient before CBT. Chimerism analysis showed that these T cells came from her mother.



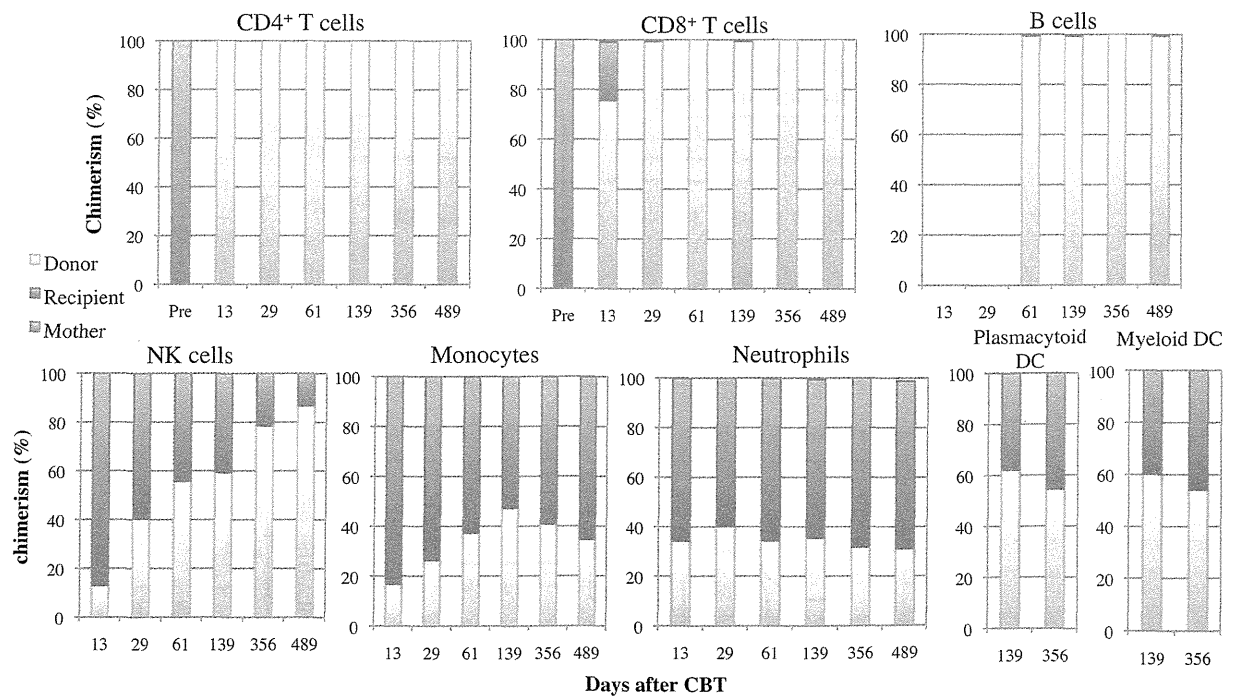
**Figure 2** Chimerism analysis of peripheral blood T cells in SCID patient after CBT.

Maternal CD8+ T cells had remained in the peripheral blood of Artemis-SCID patient thirteen days after CBT. Those cells had been disappeared until twenty nine days after CBT.



**Figure 3** Chimerism analysis of lymphocyte subsets in  $\gamma c$ -deficient SCID patient after CBT.

T cells and NK cells of the patient had shown complete donor chimerism during follow-up. On the other hand, myeloid cells and dendritic cells had shown recipient-dominant chimerism. Recipient-derived B cells had increased gradually after CBT.



**Figure 4** Chimerism analysis of lymphocyte subsets in Artemis-SCID patient after CBT.

T cells and B cells of the patient had shown donor chimerism since two months after CBT. On the other hand, myeloid cells had shown recipient-dominant chimerism. Recipient-derived NK cells have decreased gradually after CBT.

共に、移植後常にレシピエント優位のキメリズムを示した (Fig. 3 下段右)。症例 2 (Artemis 異常症) においては、リンパ系細胞のうちもともと欠損する B 細胞は移植後 2 ヶ月目からすべてドナー由来細胞であり、T 細胞は移植後 2 週目の時点ではドナー由来細胞と母親由来細胞とのキメリズムを示したものの、4 週目にはすべてドナー由来となった (Fig. 4 上段)。一方、単球、好中球では、移植後 1 年半経過後もレシピエント優位のキメリズムを呈していた (Fig. 4 下段)。

移植後早期における骨髄細胞のキメリズム解析とコロニーアッセイ

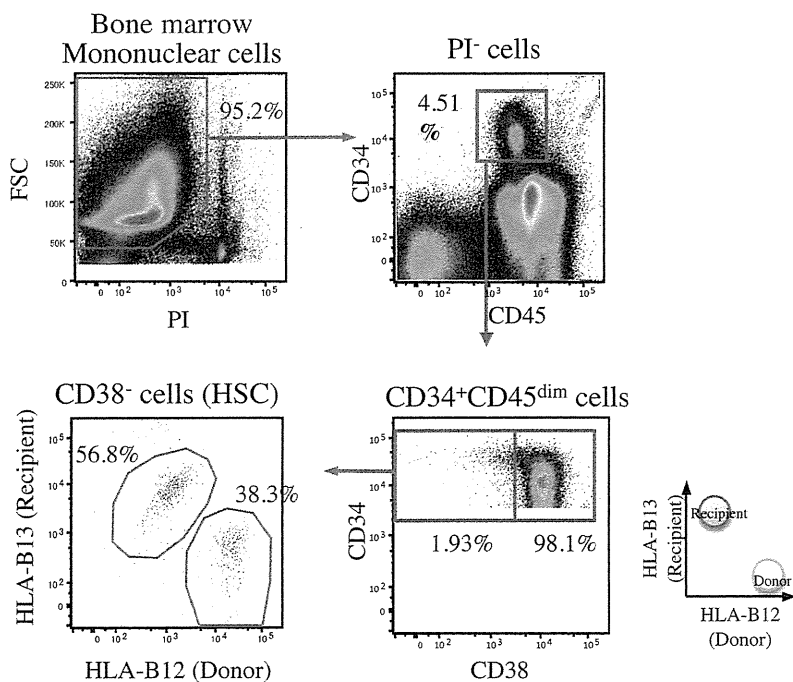
症例 2 (Artemis 異常症) の移植後 61 日目の骨髄細胞について、造血幹・前駆細胞のサブセット毎にキメリズムを解析した。まず、骨髄単核細胞中の造血幹・前駆細胞分画 (CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup>) を、造血幹細胞を含む分画 (HSC: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>) と造血前駆細胞を含む分画 (HPC: CD34<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) とに分け (Fig. 5 下段右)、後者はさらに骨髄系共通前駆細胞 [common myeloid progenitors (CMP): CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>+</sup>]、顆粒球・単核球系前駆細胞 [Granulocyte / Macrophage progenitors (GMP): CD45RA<sup>+</sup>CD123<sup>+</sup>]、巨核球・赤血球系前駆

細胞 [Megakaryocyte/Erythrocyte progenitors (MEP): CD45RA<sup>-</sup>CD123<sup>-</sup>] の 3 つの分画<sup>10, 11)</sup>に分けた (データは示さず)。それぞれの分画でキメリズム解析を行った結果、最も幼若な HSC の分画に加え (Fig. 5, 下段), CMP, GMP, MEP のいずれの分画においてもレシピエント由来細胞が優位であった (データは示さず)。

次に、これら HSC, CMP, GMP および MEP 分画をドナー由来細胞とレシピエント由来細胞に分けてそれぞれ 300 個ずつソーティングした後、1ml のメチルセルロース培地に懸濁し、3cm ディッシュで 2 週間培養してコロニーアッセイを行った。その結果、造血前駆細胞のフェノタイプによる分類、すなわち、CMP, GMP, MEP 分画より、それぞれの分類から予想された種類のコロニーが生じることを確認した。さらに、いずれの前駆細胞分画においてもコロニー形成能はレシピエント由来細胞が優位であった (データは示さず)。

ドナー由来 B 細胞とレシピエント由来 B 細胞における分化段階の比較

症例 1 (共通  $\gamma$  鎖欠損症) の移植後 1,350 日目において、末梢血の B 細胞 (CD19<sup>+</sup>) をドナー由来細胞と



**Figure 5** Chimerism analysis of bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells in Artemis-SCID patient after CBT. The fraction including hematopoietic stem cells (HSC) were determined as CD38<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD45<sup>dim</sup> cells.

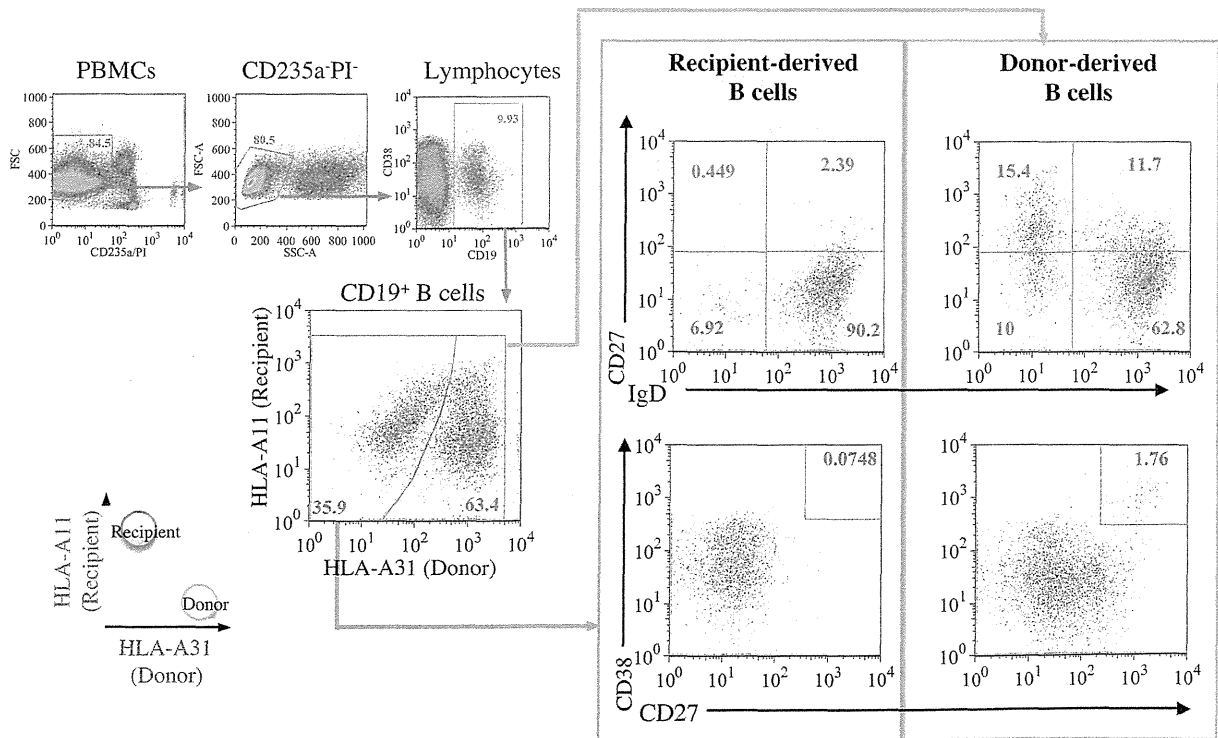
レシピエント由来細胞に分け、それぞれの分化段階を比較した。解析の結果、ドナー由来B細胞にはメモリー・フェノタイプ (CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>) がみられた一方で、レシピエント由来細胞はほとんどがナイーブフェノタイプ (CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup>) であった<sup>12)</sup>。また、ドナー由来B細胞では幼若な形質細胞である plasmablast (CD38<sup>hi</sup>CD27<sup>hi</sup>)<sup>13, 14)</sup> が検出されたが、レシピエント由来B細胞ではほとんど確認されなかった (Fig. 6)。

**【考 察】**

症例2 (Artemis 異常症) において、臍帯血移植前後の SCID 患児の末梢血における母親由来T細胞の動態が明らかとなった。移植前の患児の末梢血において有意な数のT細胞が検出され、キメリズム解析の結果、それらのT細胞は母親由来であった。SCID では、母親由来のT細胞が胎児に生着する場合がある<sup>15)</sup>。母親由来T細胞がSCID患児に存在すると、GVHDの発症に加え<sup>15)</sup>、SCIDの診断が遅れることで重症感染症により致命的となるおそれがある<sup>16)</sup>。HLA-Flow法は

T細胞数の測定に加えその細胞の由来が判定可能であり、TREC解析とともにSCIDの診断に有効である。また、母親由来のT細胞が移植後もSCID患児の体内に存在する場合、移植片に対する免疫反応により拒絶が起こる可能性も考えられる。本症例では、移植後2週間経過後もCD8陽性T細胞のうち母親由来細胞が約25%を占めていたが、4週間目では検出されなかった。よって、この症例では母親由来T細胞の拒絶反応への関与はないものと考えられた。

今回解析した2症例において、いずれも移植後長期に渡り極端なスプリットキメリズムが遷延していた。SCID患児に欠損するリンパ系細胞群 (共通γ鎖欠損症ではT細胞とNK細胞, Artemis異常症ではT細胞とB細胞) では、移植後のキメリズムは常にドナー由来細胞が占めていた。一方、患児に欠損しないリンパ球 (共通γ鎖欠損症ではB細胞, Artemis異常症ではNK細胞) や骨髄系細胞では、移植後長期に渡りキメリズムが遷延していた。したがって、もともと患児で欠損するリンパ系細胞のキメリズム解析は生着動態



**Figure 6** Chimerism analysis and development of peripheral blood B cells in  $\gamma$ c-deficient SCID patient after CBT. The peripheral CD19<sup>+</sup> B cell subsets were defined: naive B cells as CD27<sup>-</sup> IgD<sup>+</sup> and class-switched memory B cells as CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup>. Plasmablasts was defined as CD19<sup>+</sup> CD27<sup>hi</sup> CD38<sup>hi</sup>. The progress stage of maturation is different between the two origins of B cells.

の指標にはならず、患児で欠損しないリンパ球や骨髄系サブセットのキメリズムを解析することが生着の確認には重要であるといえる。また、患児で欠損していないリンパ球に注目すると、症例 1 (共通  $\gamma$  鎖欠損症) では徐々にレシピエント由来 B 細胞の割合が増加し、症例 2 (Artemis 異常症) では徐々にドナー由来 NK 細胞の割合が増えており、他のサブセットとは異なる変化が続いている。今後の生着動態との関連に注目したい。

骨髄系細胞においてキメリズムの遷延が生じるメカニズムを解明するため、我々は症例 2 (Artemis 異常症) において、移植後早期の骨髄細胞の解析を行った。その結果、HPC (GMP, EMP, CMP) と HSC のキメリズムは共にレシピエント優位であり、コロニーアッセイではこれら全ての分画でコロニー形成能がレシピエント優位であった。すなわち、移植後早期の段階で骨髄の造血幹細胞ニッチがドナー由来細胞に置き換わっていないことが示唆され、このことが移植後長期にわたり混合キメリズムが遷延する原因であると推測された。その背景にある要因として、SCID 患児に対する治療関連毒性や合併症を回避する目的で前処置が軽減されていることが推測される。化学療法や放射線に依らない新たな前処置法 (造血幹細胞ニッチを空ける方法) の開発が望まれる。

一方、成人の造血器悪性腫瘍に対する前処置軽減臍帯血移植では、通常移植後 1~2 週間の間にすべての白血球サブセットで 90% 以上の細胞がドナー由来細胞に置き換わることが報告されている<sup>8, 9)</sup>。したがって、今回観察された SCID 特有のスプリットキメリズムの遷延は、弱い前処置法に加え、レシピエントにもともと T 細胞が存在しないという特殊な環境によるのではないかと推測される。

ところで、混合キメリズムの遷延は生着不全の他にどのような問題を引き起こすのであろうか。B 細胞で混合キメリズムが検出されている症例 1 (共通  $\gamma$  鎖欠損症) において、ドナーとレシピエントにそれぞれ由来する B 細胞の成熟度の違いについて解析した。その結果、ドナー由来 B 細胞にはメモリー細胞や plasmablasts が存在する一方で、レシピエント由来 B 細胞はナイーブ・フェノタイプが大部分を占めていた。本症例では、T 細胞-B 細胞の相互作用に必要な MHC class II の HLA-DR はドナーとレシピエントで遺伝子型は一致しているため、移植後ドナー由来の T 細胞が補充されることで、残存するレシピエント由来 B 細胞の抗体産生能も回復することが期待された。しか

しながら、レシピエント由来 B 細胞のフェノタイプは、移植後 1,350 日 (3.7 年) 経過後もナイーブのままであった。IL-21 は生体内での B 細胞の分化や抗原特異的な抗体産生に必要であるという報告があるが<sup>13)</sup>、共通  $\gamma$  鎖に変異が生じているレシピエント由来 B 細胞では、IL-21 のシグナルを受けることができない。このことが、造血細胞移植後もレシピエント由来 B 細胞において分化障害が回復しない原因であると推測された。共通  $\gamma$  鎖欠損症に対する造血細胞移植では、B 細胞はレシピエント由来のままである場合も多く、長期に渡り免疫グロブリン補充療法が必要となることが報告がされている<sup>17, 18)</sup>。本症例ではレシピエント由来 B 細胞の割合が徐々に増えており、抗体産生能を持つ機能的な B 細胞の割合が減少することが危惧された。今後、より多数の症例で B 細胞のキメリズム動態とレシピエント由来 B 細胞の分化状態を調べることで、キメリズムと抗体産生障害との関連性が明らかとなることが期待される。

#### 【おわりに】

本研究により確立された解析方法は、SCID に対する造血細胞移植において、生着不全の早期診断や移植後における様々な病態のメカニズムの解明に有用である。これらの結果が、より安全で有効な造血細胞移植法の開発につながることを願っている。

#### 【謝 辞】

SCID の病態についてご教授いただきました東京医科歯科大学小児科の今井耕輔先生、骨髄細胞のコロニーアッセイを行うにあたりご指導いただきました東京大学医学研究所セルプロセッシング・輸血部の尾上和夫先生に心より感謝致します。

#### 【文 献】

- 1) Buckley RH : B-cell function in severe combined immunodeficiency after stem cell or gene therapy: a review. *J Allergy Clin Immunol.* 125 (4): 790-797, 2010
- 2) Bhattacharya A, Slatter MA, Chapman CE, et al: Single centre experience of umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiency. *Bone Marrow Transplant.* 36 (4): 295-299, 2005
- 3) Haddad E, Le Deist F, Aucouturier P, et al: Long-term chimerism and B-cell function after bone marrow transplantation in patients with severe combined immunodeficiency with B cells: A single-center study



- of 22 patients. *Blood*. 94 (8): 2923-2930, 1999
- 4) Neven B, Leroy S, Decaluwe H, et al: Long-term outcome after hematopoietic stem cell transplantation of a single-center cohort of 90 patients with severe combined immunodeficiency. *Blood*. 23: 113 (17): 4114-4124, 2009
  - 5) Fischer A, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al: Severe combined immunodeficiency. A model disease for molecular immunology and therapy. *Immunol Rev*. 203: 98-109, 2005
  - 6) Turkiewicz D, Gorczynska E, Toporski J, et al: Monitoring of hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) by dual-color FISH analysis of X and Y chromosomes. *Leuk Res*. 27 (11): 993-998, 2003
  - 7) Thiede C, Florek M, Bornhäuser M, et al: Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant*. 23 (10): 1055-60, 1999
  - 8) Watanabe N, Takahashi S, Ishige M, et al: Recipient-derived cells after cord blood transplantation: dynamics elucidated by multicolor FACS, reflecting graft failure and relapse. *Biol Blood Marrow Transplant*. 14 (6): 693-701, 2008
  - 9) Matsuno N, Yamamoto H, Watanabe N, et al: Rapid T-cell chimerism switch and memory T-cell expansion are associated with pre-engraftment immune reaction early after cord blood transplantation. *Br J Haematol*. 160 (2): 255-258, 2013
  - 10) Rizo A, Dontje B, Vellenga E, et al: Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BMI1. *Blood*. 111 (5): 2621-30, 2008
  - 11) Manz MG, Miyamoto T, Akashi K, et al: Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (18): 11872-11877, 2002
  - 12) Vale AM, Schroeder HW Jr. Clinical consequences of defects in B-cell development. *J Allergy Clin Immunol*. 125 (4): 778-787, 2010
  - 13) Recher M, Berglund LJ, Avery DT, et al: IL-21 is the primary common  $\gamma$  chain-binding cytokine required for human B-cell differentiation in vivo. *Blood*. 118(26): 6824-6835, 2011
  - 14) Perez-Andres M, Paiva B, Nieto WG, Caraux A, et al: Primary Health Care Group of Salamanca for the Study of MBL. Human peripheral blood B-cell compartments: a crossroad in B-cell traffic. *Cytometry B Clin Cytom. Suppl 1: S47-60*, 2010
  - 15) Müller SM, Ege M, Pottharst A, Schulz AS, et al: Transplacentally acquired maternal T lymphocytes in severe combined immunodeficiency: a study of 121 patients. *Blood*. 98 (6): 1847-1851, 2001
  - 16) Brown L, Xu-Bayford J, Allwood Z, et al: Neonatal diagnosis of severe combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood*. 117 (11): 3243-3246, 2011
  - 17) Buckley RH, Schiff SE, Schiff RI, et al: Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*. 340 (7): 508-516, 1999
  - 18) Myers LA, Patel DD, Puck JM, et al: Hematopoietic stem cell transplantation for severe combined immunodeficiency in the neonatal period leads to superior thymic output and improved survival. *Blood*. 99 (3): 872-878, 2002

# インフルエンザに対する自然および獲得免疫応答

森尾友宏\*

## はじめに

インフルエンザウイルスは主要な呼吸器感染ウイルスで、毎年多くの重症患者が発生している。ウイルスの感染・増幅様式を明らかにし、それを阻害する薬を開発するとともに、宿主側の免疫応答を理解することにより予防方策を開発し、将来的な免疫系の操作を模索することが、インフルエンザの制御につながるものと思われる。

インフルエンザウイルス（以下、インフルエンザ）は、「インフルエンザウイルスの生態（1927頁）」の解説にもあるように、ssRNAウイルスであり8つのRNAセグメントからなり、11のタンパク質で構成されている。主要な抗原はヘマグチニン（HA）とノイラミニダーゼ（NA）であり、16のHAと9のNAサブタイプが知られている。インフルエンザはssRNAウイルスという特性からの頻繁な遺伝子変異（→抗原変異）により宿主免疫応答から免れるが、宿主の応答により感染の重症度が異なることは事実であり、最終的には抗体産生（侵入を阻止）とT細胞応答（感染細胞の除去）の両者を誘導できる、変異にも対応可能なワクチンを開発することが理想と考えられている<sup>1~4</sup>。

ここではインフルエンザ感染症における、自然免疫（認識から初期応答）と獲得免疫（抗体産生反応と細胞傷害性T細胞応答）に分けて宿主応答を概説したい。まず、より理解しやすい獲得免疫

から始めるが、呼吸器感染症における免疫応答の首座は呼吸器系・局所であり、末梢血での解析結果と乖離があることにまず注意が必要である。

## I. インフルエンザに対する獲得免疫

### 1. 抗体産生<sup>2,4)</sup>

インフルエンザ感染後には11種類のウイルス抗原のうち大半に対する抗体が産生されているが、それぞれに反応の程度や時期が異なっている。最も強力な抗体応答をするのはHA抗原に対してである。抗体は感染の防御に重要であり、再感染を予防する効果が認められる。したがって、たとえば、HA1、HA2の保存された領域に対する、変異に影響されない交差反応する抗体が産生されれば予防手段としては理想的であるが、まだ実現レベルには達していない。抗体が認識するのは立体構造であり、短いペプチドを認識するT細胞応答に比べて、その誘導方法は複雑である。

抗体反応はまず上気道とつながる流入領域リンパ節でつかさどられる。ウイルスが下気道まで侵入した場合は、縦隔リンパ節などが反応する。気管支肺胞洗浄液では早期より抗体反応が検出され、数日遅れて血中でも捕まるようになる。いわゆる自然抗体（IgM）は感染局所でインフルエンザをある程度中和し、さらに特異抗体産生を促すとされる。インフルエンザが侵入すると自然免疫系がそれを認識し、特異的T細胞が作動する前からT細胞非依存的抗体産生が始まる。自然抗体だけではインフルエンザの中和には不十分で、実際にはCD4 T細胞の発動による特異抗体産生が重要になる。いずれの場合にも実際には自然免疫系によるウイルスの認識が重要であり、これについてはIIの項で記載することにする。もう少しやや

MORIO Tomohiro

\* 東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野

〔〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45〕

TEL 03-5803-5245 FAX 03-5803-5245

E-mail: tmorio.ped@tmd.ac.jp

こしい話をすれば、抗体産生は二次リンパ組織（リンパ節など）の胚中心以外でも、胚中心内でも観察され、後者により長期生存する記憶B細胞が形成されて、終生のインフルエンザの予防に働く。1909～1919年の間にフィンランドで生まれた人の96%が、2009年のH1N1パンデミックに対する交差反応性抗体を保有していたことは記憶に新しい。抗体は感染予防に働く。

## 2. T細胞免疫応答

インフルエンザ感染症により成立した細胞性免疫は特定の血清型をもつインフルエンザに対して効果的な生体防御能を示すことは間違いなく、感染排除に最も重要な免疫機構である。実際にはウイルスサブタイプ間で保存されたウイルス抗原（ペプチド）に交差反応性を示すT細胞が、その対応に当たり感染の制御をつかさどる。HLAにより認識されるペプチドが異なることから、どのような抗原がどのようなHLAに認識されているのかについての研究が進んでいる。近年では、Class I MHCに提示されたペプチドを、イムノプロテオミクス法を用いてマスマスペクトメトリー解析を行い、同定する手法も汎用されている。実際にはすべての構造タンパクに対する細胞傷害性T細胞応答が観察されている<sup>5-7)</sup>。これらはいわゆる overlapping peptides を用いて、*in vitro*でも誘導することが可能である。

T細胞による抗ウイルス感染細胞活性は3つの範疇に分類することができる<sup>8)</sup>。1つはいわゆるT細胞による細胞傷害活性でありパーフォリンやグランザイムの作用により感染細胞の融解を惹起する。2つめは、T細胞上にCD95 (FAS) リガンドやTNF関連アポトーシス誘導リガンド (TRAIL) を発現し、感染細胞にアポトーシスを誘導する方法である。3つめは炎症性メディエータの放出による作用である。このなかでCD8陽性細胞傷害性T細胞の働きが最も強力であるが、近年、活性化したマクロファージにより (TRAILの作用により) インフルエンザ感染肺上皮細胞が排除されるとの論文も見受けられる。マクロファージの活性化にはT細胞からのtype II インターフェロン (IFN- $\gamma$ ) などが重要である。CD4 T細胞による

直接的なインフルエンザ感染細胞の傷害活性は弱い一方、特異的CD8 T細胞維持という点では重要である。さらに、特異抗体産生という点でも必須の細胞群である。

これらのウイルス特異的T細胞の増殖は、抗体反応と同様に、流入領域リンパ節にてつかさどられることになる。さらなる増幅は気道（肺）内でも観察され、ここでは炎症性マクロファージが産生するIL-15や、発現する共刺激分子が重要とされている。興味深いことに、流入領域リンパ節で増殖したCD8 T細胞はIFN- $\gamma$ などを産生するが、肺に移行して増殖するとIFN- $\gamma$ とともに調節性サイトカインであるIL-10も産生するようになる。インフルエンザ感染上皮細胞に提示された抗原を認識したT細胞は、感染細胞を殺傷するのみであるが、一方、活性化した単球などの抗原提示細胞に接触したT細胞は、細胞傷害活性を発揮するとともに、炎症性サイトカインを放出する。後者は主に、抗原提示細胞上の共刺激分子の働きであるが、どのような形で抗原を認識するかで、炎症の程度が異なっている。肺内でのIL-10の産生は、Ⅲの項で述べるように、過剰な炎症およびそれに伴う組織破壊を防御するためである可能性もあると考えられている<sup>8)</sup>。

## 3. 抗原提示細胞

抗原提示細胞としては上皮細胞、単球、マクロファージ、骨髄由来樹状細胞 (mDC)、形質細胞様DC (pDC) などがあげられるが、それぞれ働きが異なり、また気道系では特有の作用をつかさどる。

前述したように、気道上皮細胞もいわゆる抗原提示機能を有するが、炎症性サイトカイン産生を誘導せず、特別な状況を除いては攻撃を受けるといった側面が強い。一方、肺胞マクロファージは二次リンパ組織への遊走能に乏しく、少なくともウイルス感染症においては獲得免疫誘導に関与しないと考えられている。しかし、肺胞マクロファージは感染した上皮細胞と接すると、TRAILを介して細胞傷害に活躍するようである。気道上皮細胞の下に位置する樹状細胞は、上皮細胞間に突起を伸ばし、気道内に入ったウイルスを捕まえて、局

所リンパ節に移行し、獲得免疫反応の誘導に寄与する。これらのうち、CD103 陽性気道 DC は炎症性サイトカインを産生し、CD11b<sup>high</sup> 気道 DC はケモカインを産生して炎症細胞を呼び寄せるとされている。単球由来 DC は naive T 細胞の教育役としての働きは弱く、一方 pDC は type I IFN (IFN- $\alpha/\beta$ ) を産生する重要な細胞であり、一方 naive T 細胞の活性化作用は比較的弱いとされている。肺胞マクロファージ以外のものとして、組織マクロファージは非感染肺間質に数多く存在し、感染に伴ってさらに局所に流入してくると考えられている<sup>8)</sup>。

## II. インフルエンザに対する自然免疫

植物や非脊椎動物では用いられ、脊椎動物ではマイナーな役割を果たす「抗ウイルス作用を有する自然免疫系」として RNAi (RNA 干渉) がある。RNA ウイルスに感染すると長い 2 本鎖 RNA (dsRNA) が産生され、植物や非脊椎動物では endoRNase Dicer が dsRNA を切断して small interfering RNA (siRNA) duplex を生成する。より古いシステムとして、CRISPR (clustered, regularly interspaced short palindromic repeats) がある。最近では研究室などで遺伝子の特異的切断にも使われるシステムであるが、もともとは侵入した DNA が CRISPR loci に取り込まれ、siRNA となって標的ウイルス DNA に結合し、CRISPR 関連タンパクによりウイルスを分断する。この系は有核細胞には存在しない<sup>9)</sup>。古典的な siRNA 系もその特異性が洗練され、ホストが標的にならなければ、今後の創薬につながる可能性がある。

脊椎動物はより優れた自然免疫系抗ウイルス作用を有しており、それがインターフェロンシステムである。RNA による免疫からタンパクによる免疫への転換であるともいえる。私たちは数多くのウイルスパターン認識受容体 (pattern recognition receptors : PRRs) を発現しており、第一線防御ラインでのウイルスの侵入を感知して、Jak-STAT 系が発動して IFN を産生し、さらにインターフェロン刺激遺伝子 (ISGs) を誘導して、抗ウイルス作用を発揮するのである<sup>1,9,10)</sup>。

### 1. インフルエンザを認識する PRRs<sup>9,10)</sup>

インフルエンザの標的細胞は気道系上皮細胞であるが、マクロファージや DCs にも感染する。インフルエンザはこれらの細胞において RIG-I like receptors (RLRs), Toll-like receptors (TLRs), および Nod-like receptors (NLRs) によって認識される。

細胞内の RNA センサーである RIG-I はインフルエンザゲノム RNA の 5' -triphosphate を認識し、MAVS と IRF3 を介して type I IFN や type III IFN (IFN- $\lambda 1/\lambda 2/\lambda 3$ ) 産生を誘導する。一方、ウイルスタンパクである NSI はウイルス RNA を隔絶する、あるいは RIG-I やその下流のタンパクに結合するなどの作用により、RIG-I 認識機構をかく乱する (図)。

pDC ではインフルエンザの ssRNA はエンドゾームに位置する TLR7 により認識され (TLR7 は pDC の主要な PRR である)、さらに炎症性サイトカインやインターフェロンの産生が惹起される。TLR3 は ssRNA タイプであるインフルエンザが増殖する過程で生成する dsRNA を認識するが、この系によっても炎症反応が惹起される。肺上皮細胞における炎症反応や急性肺炎に関与するとされている (図)。

インフルエンザによる感染はまた NLRP3 インフラマゾームを活性化し、獲得免疫の橋渡し役となる。インフルエンザに感染したマクロファージは IL-1 $\beta$  や IL-18 を産生する。インフルエンザは proIL-1 $\beta$  や NLRP3 を誘導し (signal 1)、さらに NLRP3 インフラマゾームを活性化する (signal 2) が、signal 1 は TLR7 経路で NF- $\kappa$ B が活性化することにより誘導される。一方、signal 2 にはさまざまな因子が関与しており、P2X7 受容体を介したカリウムの流出や trans-Golgi の PH のアンバランス、細胞内の活性酸素種などが関わっているとされている。signal 2 はウイルスの M2 タンパクにより誘導されるという共通点がある (図)。

これらの自然免疫系は獲得免疫系への橋渡しとしても重要であり、それは一般のウイルス感染症における免疫系発動機構と同様である。また DC にインフルエンザが感染すると RIG-I や TLR7 系が活性化され、invariant natural killer T cells

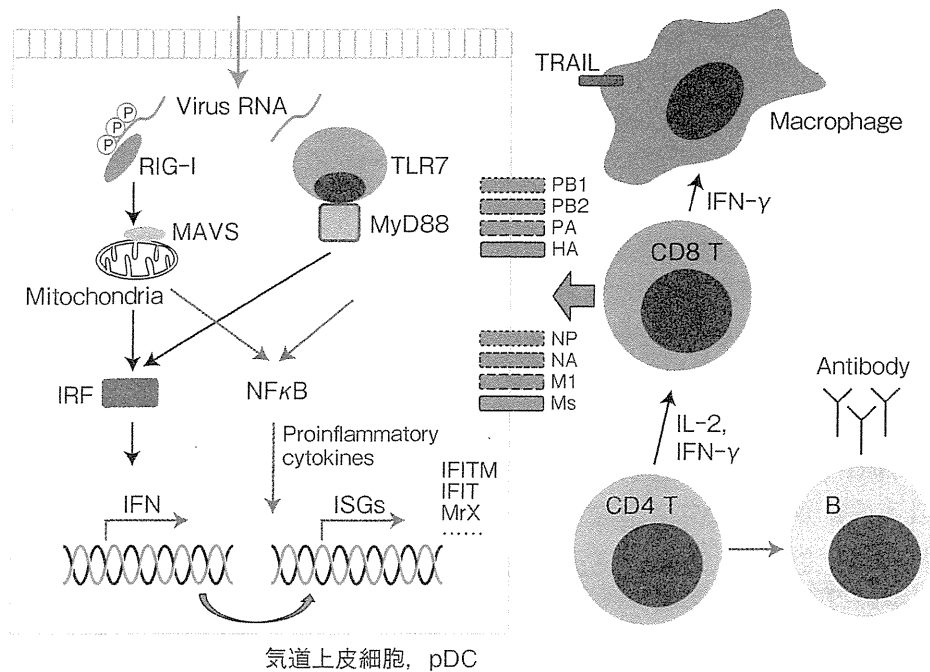


図 インフルエンザに対する生体防御応答（自然免疫と獲得免疫）  
 詳細は本文中のⅠ、Ⅱ項を参照。感染細胞に表出される代表的な抗原を CD8 T 細胞  
 に認識される構造として 8 種類例示している。（文献 1, 9 より改変）

(iNKT 細胞) が誘導される, さらにこの iNKT 細胞は type II IFN である IFN- $\gamma$  や IL-22 を分泌して, 獲得免疫系を増強するようである。

## 2. インターフェロンに誘導される抗インフルエンザウイルス物質 (ISGs)<sup>9)</sup>

インターフェロンによって発現する遺伝子は数百種類以上あるが, その中でも以下のものは抗インフルエンザ作用に重要であるとされている。1 つは IFITM (interferon-induced transmembrane) family タンパクであり, エンドゾーム以降のウイルス侵入を防御し, その複製を阻害する。IFIT (interferon-induced proteins with tetratricopeptide repeats) には IFIT1, 2, 3, 5 があり, これらはインフルエンザの (2'-O-methylation を欠く) 5' triphosphate を認識し, ウイルスの翻訳を阻害する。MxA は GTPase であり幅広い抗ウイルス作用を有するが, インフルエンザにおいては二次転写 [vRNA (-)  $\rightarrow$  mRNA (+)  $\rightarrow$  cRNA (-)] を抑制し, ウイルスの複製を阻害する。

## Ⅲ. 過剰反応をどのように制御しているのか? <sup>1,8)</sup>

インフルエンザが肺にまで進入した際には, 自然免疫系と獲得免疫系が働き, ウイルスを排除しようとするが, 同時に過剰な炎症を誘導する危険性がある。定常状態の肺では, さまざまな細胞が免疫抑制分子を発現することにより, 恒常性を保っている。感染時にはどのような抑制機構が働くのであろうか?

まず, 肺に常駐する抑制性 T 細胞 (FoxP3 を発現する Treg) は活性化すると, Th1 (IFN- $\gamma$  など) を産生する CD4 T 細胞) の鍵転写因子である T-bet が発現し, さらに強力な, Th1 を抑制する Treg となる。また Blimp-1 が発現し, 抑制性サイトカインである IL-10 をより多く産生するようになる。

通常の CD4, CD8 エフェクター T 細胞もインフルエンザ感染に際して IL-10 を産生するようになる (Ⅱの項で記載したとおり)。本現象はインフルエンザのみならず, RS ウイルス感染症でも観察される。

pDC も過剰な T 細胞反応を抑制する方向性に働

き、好中球もウイルスの排除と炎症の終焉に貢献し、肺の上皮細胞もマクロファージの過剰活性化を、CD200を発現することで抑制している。さらに、いわゆるM2マクロファージ (alternatively activated macrophage) も炎症の制御に関与している。この際に核内転写因子であるPPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) が通常の単球からM2マクロファージへの分化に重要な役割を果たしていると報告されている。肺の上皮細胞はTGF- $\beta_1$ を恒常的に発現しており、こちらも過剰反応抑制に働く。

逆の視点をとると、これらの分子のvariation, 個体差, 異常が, 重症インフルエンザ感染症を規定する遺伝的背景を構成している可能性がある。

## おわりに

インフルエンザ感染症における生体防御機構 (自然免疫系と獲得免疫系) について概説した。大まかなまとめについては図を参照いただきたい。

抗インフルエンザ薬 (あるいは戦略) の開発には、インフルエンザ自体の動態を熟知するとともに、宿主の免疫機構 (植物・非脊椎動物から脊椎動物まで) を学ぶことが重要と思われる。筆者らも現在、さまざまなウイルス特異的T細胞の簡易誘導系について検討を進めているが、今後、効果的なウイルス排除、過剰な免疫反応の制御の両局面において、免疫系の操作が利用される日がくることが期待される。

## 文献

- 1) Fukuyama S, Kawaoka Y : The pathogenesis of influenza virus infections : the contributions of virus and host factors. *Cur Opin Immunol* **23** : 481-486 2011
- 2) Lambert LC, Fauci AS : Influenza vaccines for the future. *N Engl J Med* **363** : 2036-2044, 2010
- 3) Medina RA, Garcia-Sastre A : Influenza A

## Key Points

- ① インフルエンザがRIG-I, TLR3/7などの細胞内センサーに認識されるとIFN- $\alpha/\beta$ , - $\lambda$ などが産生され、さまざまな抗ウイルス物質が誘導される。
- ② 局所における抗原認識から、最終的に細胞傷害性T細胞が誘導されることが重要である。
- ③ 交差反応性抗体を産生する記憶B細胞は、抗原変異を起こしたインフルエンザの予防に働く。
- ④ 肺では過剰な免疫反応を抑制する機構が働いており、その破綻が重症化と関連する可能性がある。

viruses : new research developments. *Nature reviews. Microbiology* **9** : 590-603, 2011

- 4) Waffarn EE, Baumgarth N : Protective B cell responses to flu--no fluke ! *J Immunol* **186** : 3823-3829, 2011
- 5) Gotch F, McMichael A, Smith G, et al : Identification of viral molecules recognized by influenza-specific human cytotoxic T lymphocytes. *J Experim Med* **165** : 408-416, 1987
- 6) Jameson J, Cruz J, Ennis FA : Human cytotoxic T-lymphocyte repertoire to influenza A viruses. *J Virol* **72** : 8682-8689, 1998
- 7) Testa JS, Shetty V, Hafner J, et al : MHC Class I-presented T cell epitopes identified by immunoproteomics analysis are targets for a cross reactive influenza-specific T cell response. *PloS One* **7** : e48484, 2012
- 8) Braciale TJ, Sun J, Kim TS : Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection. *Nature reviews. Immunology* **12** : 295-305, 2012
- 9) Yan N, Chen ZJ : Intrinsic antiviral immunity. *Nature Immunol* **13** : 214-222, 2012
- 10) Hsu AC, See HV, Hansbro PM, Wark PA : Innate immunity to influenza in chronic airways diseases. *Respirology* **17** : 1166-1175, 2012

\* \* \*

【第54回日本小児血液・がん学会学術集会】シンポジウム5：細胞治療（腫瘍免疫・感染免疫・移植免疫）

## 移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的CTL療法

森尾 友宏<sup>1,2\*</sup>, 宮坂あかね<sup>1,2</sup>, 小野 敏明<sup>1</sup>, 落合 央<sup>2</sup>, 藤田由利子<sup>3</sup>, 高橋 聡<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター

<sup>3</sup>東京大学医科学研究所先端医療研究センター分子療法分野

### 要旨

造血細胞移植や臓器移植の成功率は免疫抑制薬の進歩などにより次第に向上しているが、一方移植後の日和見感染症は大きな問題となっている。ウイルス感染症は生存率、生着不全に関与するのみならず、有効薬剤の欠如、薬剤耐性誘導、長期使用による費用負担の増大などの問題も内包している。薬剤に頼らず、拒絶やGVHDを誘導しない特異的細胞治療の導入は喫緊の課題である。古典的なウイルス特異的T細胞治療は有効性が検証されているが、臨床応用にあたりいくつかの解決すべき問題点がある。1つは抗原提示にあたりウイルスそのもの、あるいはプラスミドを用いる点である。安全性の点から可能であれば使用を控えたい。2点目は作成作業の煩雑さである。高度な技術を必要とし、手順も多い。3つは作成に要する時間である。EBV特異的T細胞の作成には最低6-8週以上必要とされている。さらに現時点では特定のHLAに拘束されたT細胞を作成する方法が主流であり、すべてのHLAはカバーできない。また特異的CD4T細胞の作成は難しいという問題もある。これらを克服するために、ウイルス抗原の主要エピトープをカバーする15merの(11アミノ酸ずつ重なる)ペプチドをパルスし、最適化したサイトカインと共に培養し、2週間で特異的T細胞を作成する手法が開発された。この方法を用いれば多ウイルス多抗原特異的T細胞を短期間に効率的に作成することが可能である。すでに臨床応用され、第三者からの特異的T細胞輸注の形で検証が始まっている。

キーワード：ウイルス特異的T細胞, オーバーラッピングペプチド, 造血幹細胞移植, アロ反応性

Key words: virus-specific T cells, overlapping peptides, hematopoietic stem cell transplantation, allo-reactivity

## I はじめに

造血細胞移植 (hematopoietic stem cell transplantation: HSCT) 後のウイルス感染症は未だに大きな問題であり、移植後の様々な時期に、EBV関連リンパ増殖症候群、CMV感染症、出血性膀胱炎 (BKウイルス (BKV)/アデノウイルス (AdV)), HHV6脳炎、内臓播種性VZV感染症、RSV感染症、Parainfluenza感染症など種々な感染症が発症する。

ウイルス感染症への対応に当たっては、モニタリング、適切な抗ウイルス薬の使用に加えて、(特異的・非特異的)免疫学的再構築の促進が重要である。

## II 移植後ウイルス特異的T細胞治療の歴史

### 1. 非特異的T細胞治療

移植後ウイルス感染症の中で、早くから注目を集めていたものとしてEBV関連リンパ増殖症候群 (EBV-associated lymphoproliferative disorder: EBV-LPD) が挙げられる。EBV-

LPDでは免疫抑制薬の中止あるいはドナーリンパ球輸注が選択され、免疫能の増強によりウイルス感染細胞を排除できることが明らかとなっていた<sup>1)</sup>。CMV感染症、AdV感染症、RSウイルス感染症などのウイルス感染症も、ドナーリンパ球輸注によって改善する可能性がある。これはおそらく、ドナーリンパ球中の特異的T細胞によるものである以上に、免疫系の全般的な賦活化による間接的な作用が重要と思われる。

### 2. ウイルス特異的CD8T細胞治療 (in vitro expansion)

#### 1) 単ウイルス特異的T細胞調製

ウイルス特異的細胞傷害性T細胞 (CTL) 療法の歴史は比較的古い。1992年にRiddellらはCMV感染症に対して特異的T細胞を用い、効果を認めたと報告した<sup>2)</sup>。彼らは骨髓移植ドナーの線維芽細胞をCMVで感染させ、末梢血単核球とIL-2存在下で共培養し、さらに反復刺激を行うことで特異的CTLを樹立している。さらに1995年にRooneyらはEBV特異的T細胞をHSCT前に予め作成しておき、EBV再活性化を認めた時点で投与したところ効果を認めたと報告している<sup>3)</sup>。ここではドナーから先にEBVを感染させたリンパ芽球様リンパ球を作成しておき、ドナー単核球とIL-2存在下で共培養することによって特異的CD4/CD8

2013年5月31日受付, 2013年5月31日受理

\* 別刷請求先: 〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 森尾友宏

E-mail: tmorio.ped@tmd.ac.jp

細胞を得ている。これらの単純な共刺激系を用いたウイルス特異的T細胞では、特異的細胞傷害活性はE:T比20:1で最大70%程度であったが、 $10^7$ 程度の細胞でも効果を示し、また明らかなGVHDなどの有害事象を認めなかった。

その後開発された単ウイルス特異的T細胞療法では、さらに特異性を高くし、より増殖高率を高める工夫が加えられている。例えばEBV特異的T細胞調製では、まずEBV-LCLにLMP2発現ベクターを導入し、LMP高発現EBV-LCLを作成しておく。さらに樹状細胞を分化・調製して同様にベクターを導入してLMP2を発現させ、それを末梢血単核球と共培養する。さらに予め用意したLMP2発現EBV-LCLで刺激を加え、IL-2存在下で培養するなどの方法がそれに当たる<sup>4)</sup>。明らかに手順が多く、最低12週以上の時間を必要とするが、十分量の特異性の高いT細胞が得られる点が最大の特徴である。有効性と安全性も検証されている。

## 2) 多ウイルス特異的T細胞調製

造血細胞移植後には様々なウイルス感染症に罹患する危険性がある。感染症の種類が明らかになってから特異的T細胞調製に当たる場合には、調製までの時間が死活的に重要となる。10週前後の時間は許容されないことも多い。さらに予め特異的T細胞を作成していても、異なるウイルスによる感染に罹患することも想定される。従って適切な時期に有事対応するためには、予めいくつかのウイルスを標的にしたT細胞を作成しておく方が妥当と考えられる。

実際にこの手法は既に臨床応用されている。例えばアデノウイルスベクターでCMV抗原を発現させたEBV-LCLを用いて刺激を行うことにより、AdV, CMV, EBVの3者に特異的なT細胞を作成することが可能である。当初は移植後ウイルス感染症に対して用いられていたが、近年では感染症予防にも用いられるようになり、効果を上げている<sup>5,6)</sup>。

予防的投与に際して重要なことは、effector memory T細胞のみならずcentral memory T細胞を用意しておくこと、およびできれば特異的CD4T細胞を調製しておくことである。Central memory T細胞の輸注により長期生存可能なT細胞が供給され、また特異的CD4T細胞は、*in vivo*でウイルスのチャレンジを受けた際に抗原提示細胞から指令を受け、特異的CD8T細胞の分化や増殖に関与する。

## 3) 古典的ウイルス特異的T細胞調製の問題点

上記の方法で調製されたT細胞の主体はCD8T細胞であるが、CD4T細胞も様々な割合で混在する。この方法の臨床応用上の(広く臨床に展開する上での)問題点は抗原を提示するためにウイルスあるいは発現ベクターを用いることであろう。品質保証や安全管理上、これらの非自己産物は安定した特性を示す必要があり、また一方最終産物でのウイルスや発現ベクターの混在は否定される必要があ

る。また調製に時間を要すること、専門性の高い調製技能が必要であること、などの問題も存在する。

## 3. ウイルス特異的T細胞治療(ドナー由来特異的T細胞直接採取)<sup>7,8)</sup>

上に挙げたような*in vitro*分化・増幅古典的ウイルス特異的T細胞の欠点を補うために、ドナーに内在する特異的T細胞を採取して、投与する試みがなされている。抗原提示にあたり取り込まれた抗原はproteaseで分解を受け、MHC class IIには10~30アミノ酸長(多くは15前後)の、MHC class Iには8~12アミノ酸長(多くは9)のペプチドとなり、それぞれのMHC分子の溝にはまって提示される。Class I MHCはCD8T細胞に、Class II MHCはCD4T細胞に抗原提示することは周知の通りである。この知見を応用して、実際のウイルスで抗原となる部位の全ての領域を11アミノ酸ずつoverlapする15-merのペプチドとして用意し、それを末梢血単核球(リンパ球, 単球, 樹状細胞などを含む)にパルスして、IFN- $\gamma$ を産生するものを磁気ビーズで回収する手法がある。Class I, class IIが提示するdominantなペプチドはMHCにより異なる(例えばA24とA11では異なったペプチドを主としてはめ込んでいる)が、この「オーバーラップペプチド」を用いれば、ドナーのHLAタイプに関わらず特異的T細胞を集めてくることが可能である。さらにCD4, CD8T細胞を共に採取できることが利点である。実際にHSCT後の感染症の場で用いられており、 $10^5$ レベルの細胞数でも有効である。現時点ではEBV(LMP1, LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(IE1, pp65), AdV(hexon, penton)などが臨床応用され、さらにBKV, JCV, Influenza B, Papilloma virusなどに対するペプチド混合物も用意されている。

本治療法の最大の利点は増幅が不要、従って調製当日に投与が可能、という点であり十分な有効性が検証されている。投与数も少なく有害事象も少ない。問題点としては特異的T細胞の%が低いものが多く(特にAdV)、多くの場合は有効な細胞数を確保するためにapheresisを必要とすることである。例えばIE-1特異的T細胞が全リンパ球中0.5%あったとした場合、2,000/ $\mu$ Lのリンパ球があるドナーでは $1 \times 10^4$ /mLの特異的T細胞が存在することになり、 $5 \times 10^5$ 個投与を希望する場合50%回収できたとしても100mLの血液を必要とする。さらに1抗原ごとに費用が発生するため大変高価な治療手段となってしまう。

## 4. ペプチド+サイトカインによる多ウイルス特異的T細胞治療

以上のような経緯を経て、古典的ウイルス特異的T細胞調製、ドナー由来特異的T細胞直接採取の両者の利点を生かし、問題点を克服するような細胞調製法がAnn Leenら



表1 特異的 T 細胞治療の対象となるウイルスと T 細胞の標的となる抗原

Virus	Antigen
CMV	IE-1, pp65
EBV	EBNA1, LMP2, BZLF1
Adenovirus	Hexon, Penton
BK virus	LT, VP-1
Influenza	MP1, NP1
RSV	N, F
HHV6	U14, U90

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; RSV, respiratory syncytial virus

により開発された<sup>9)</sup>。私たちの施設でも 2012 年より同手法を用いて基礎的検討に入っている。

1) 調製方法と調製細胞の特性

調製方法は極めて簡便である。末梢血から単核球を分離し、表 1 に記載するペプチドにより 100 ng/peptide/15 × 10<sup>6</sup> PBMCs で 30-60 分刺激し、さらに IL-4, IL-7 の存在下で培養することにより、特異的 T 細胞を増幅する (図 1)。特異的 T 細胞は 12 日間にて約 10-200 倍に増幅することが可能である。調製した細胞は約 95% 以上が CD3 陽性で、CD4/CD8 はほぼ開始時の比率を維持し、CD45RO 陽性比率には変化なく、また CD62L 陽性の central memory 細胞も豊富に含まれている。一方 B, NK 細胞はほぼ混在しない状態になっている。単刺激でも複数刺激でも同程度の増幅が可能なのは重要である。現時点では EBV: BZLF1, EBNA1, LMP2, CMV: IE1, pp65, AdV: Penton, Hexon の 3 ウイルス, 7 抗原を用いて最終的に調製された細胞における特異的 T 細胞は 35% を超えるものとなっている。各特異的 T 細胞の増幅はペプチド刺激後の細胞内 IFN-γ 陽性細胞比率に加えて、ELISPOT アッセイにて確認されている (図 2, 3)。一方 Ann Leen らの報告では 7 ウイルス, 15 抗原刺激では最終産物の特異的 T 細胞は 98% 以上である。

これらの細胞はさらに、ペプチドパルスした自己由来

単核球あるいは PHA 刺激単核球 + サイトカイン (IL-4, IL-7, IL-15 など) で増幅可能である。調製した特異的 T 細胞を用いて自己 EBV-LCL に対する細胞傷害活性を検討したところ、E:T 比 2:1 で 53% という高値を示した。現在それぞれの HLA に合致した既知のペプチドに対して反応を示すかどうかを解析しているところであるが、A2402 を有するドナーでは特定のペプチド断片に反応する A2402 拘束性 T 細胞が検出される。

用いるサイトカインは IL-4 + IL-7 であり、多くの方は違和感をもたれると思われる。Ann Leen らにより様々な組み合わせと dose が検証された結果の最適化されたものである。IL-2 は増幅には効果的であるが NK 細胞や非特異的な細胞の増幅などが問題になる。初期の段階での特異的 T 細胞の誘導において IL-15 はあまり効果的ではない (一方濃縮後の二次増殖では効果を発揮する)。

2) 臨床応用に向けての検証と課題

さらに私たちは本調製方法の臨床応用に向けて、無血清化と (EBV 以外の) ウイルス特異的 T 細胞による細胞傷害活性検証系開発を試みている。M 社などの無血清培地は増幅を指標とした場合、現行の AIM-5 + ヒト血清と遜色はない。今後は難治疾患研究所ウイルス治療学分野の清水則夫博士などが開発する新規無血清培地を含め、細胞亜群や細胞傷害活性の差異などについても検証が進められる。小児においては最小限の侵襲という意味で自己血清を回避する手段が必要である。反復投与の可能性のある免疫細胞治療においては、異種血清、同種血清ともに回避できる方法が好ましい。

細胞傷害活性測定も EBV-LCL を用いることのできる EBV 特異的キラー活性測定以外は比較的難しい。現在はペプチドをパルスした自己の単核球を <sup>51</sup>Cr ラベルし、通常 % <sup>51</sup>Cr release の形で活性を測定するケースが多い。CMV に関しては間葉系幹細胞に感染させることが可能であるが、真の標準細胞作成にはまだ工夫を必要とする。さらに非アイソトープ化も現時的な問題である。私達は標的細胞を Cell

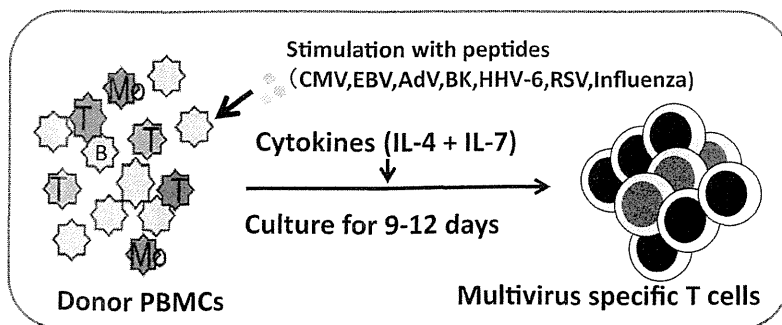


図1 多ウイルス特異的 T 細胞の作成法の模式図。ドナー末梢血単核球 (PBMCs) を各ウイルス抗原 (ペプチドミクスチャー) で刺激し、さらに IL-4, IL-7 と共に培養する。

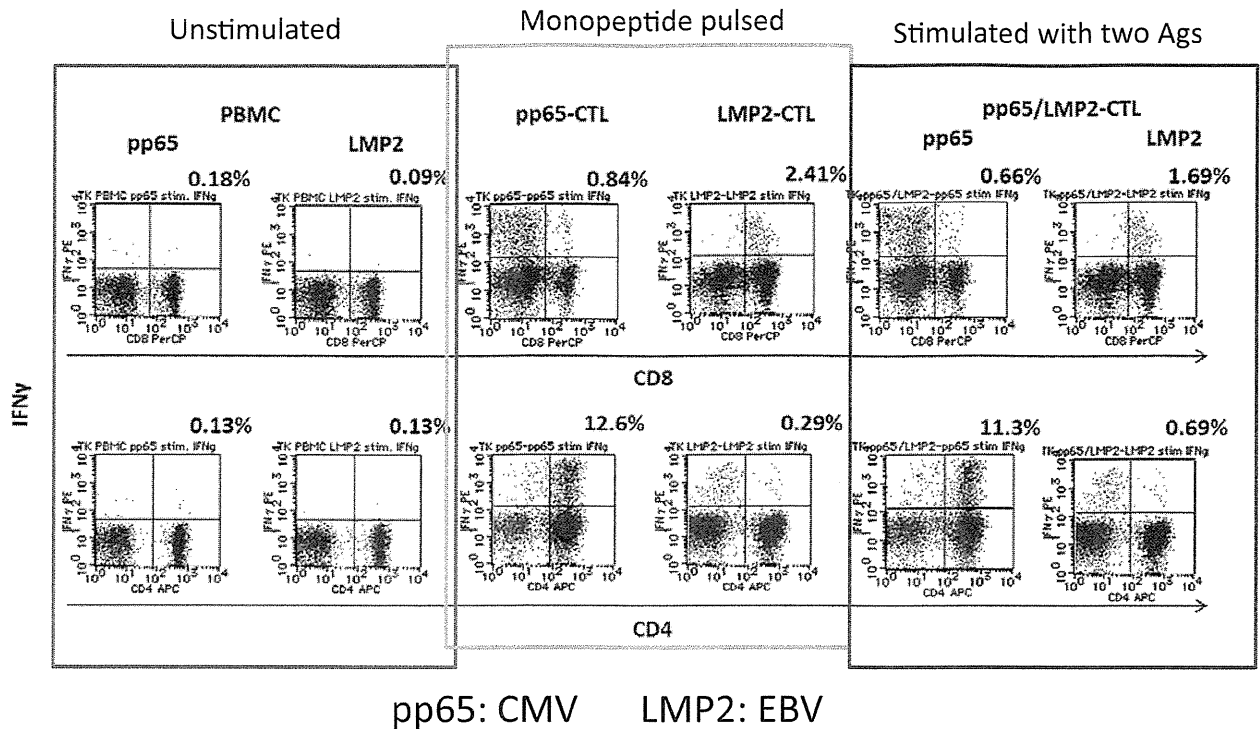


図2 抗原特異的T細胞比率の測定 (フローサイトメトリー). 末梢血単核球 (PBMC), 単独抗原 (ペプチドミクスチャー) 刺激を加えサイトカインで増幅したもの, 2抗原で刺激し増幅したもので, CD4, CD8細胞群におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞比率を測定した.

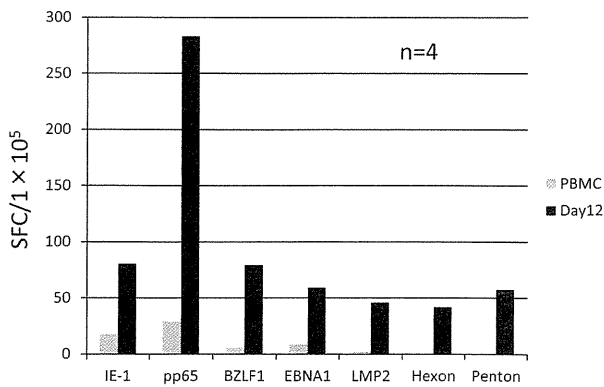


図3 抗原特異的T細胞比率の測定 (ELISPOT アッセイ). 末梢血単核球 (PBMC) を3ウイルス7抗原 (ペプチドミクスチャー) で刺激を加えサイトカインで増幅した. 刺激前と刺激後の細胞を用いてIFN- $\gamma$ 産生 ELISPOT アッセイで測定した. なおここでは細胞は無血清培地を用いて培養した.

tracker orange/violet, CFSE, Protein transduction domain tagged EGFPなどでラベルし, 調製したT細胞と共培養し, 細胞外に放出された上記色素をFluorometerで測定する方法を試みたが比較的感度が低かった. 他の方法として, 標的細胞をCell tracker orange/violetなどでラベルし, アポトーシスの際に発動するCaspase 3で切断されると傾向を発する物質 (PhiPhiLux など) を細胞内にパルスし, FACSにて切断物質を含む細胞の%を測定するという方法も報告されて

いる. 私達は細胞の標識は同様として, Caspase 3 cleavage をcleaved Caspase 3抗体で検出することにより, また同時にAnnexinV/7AAD測定することにより, 傷害細胞の%を算出する方法を用いている.

さらに重要な課題はアロ反応性の検証であろう<sup>10-12)</sup>. 2つの課題がある. 1つは特異性を高める (非特異的クローンを最小限にする) 点であり, もう1つは特異的T細胞のアロ反応性である. 前者に関しては調製および濃縮手法により克服可能である. 後者に関しては, 特異的T細胞でも*in vitro*ではアロ反応性を示すというデータが蓄積している. 一方100例前後に達している臨床データからは, 特異的T細胞治療によるGVHD (あるいはその明らかな増悪) は認められていない. アロ反応性については同一ドナーからの投与において議論されているが, 現時点ではアロ反応性の問題は極めて低いという認識である. 一方, 今後次項に述べるようなthird party, off-the-shelf細胞治療が開発された際には, さらに掘り下げた科学的検証が必要となるであろう.

この細胞調製において最も費用が必要な部分はサイトカインであるが, 試算でも現行の一般的な活性化T細胞調製に比べ, より安価に調製できる可能性が高い. 無血清化した場合は原材料としての血清の品質評価が必要となくなり, さらにコストダウンをはかることができる.

	DLI	Expanded T	Specific T (in donor)	Specific CTL (plasmid/virus)	Specific CTL (peptide)
Memory T	△	△	○	△	○
Specific CD4	X	X	○	X	○
From 10mL?	X	○	X	X	△
Simple	○	△	△	X	△
Rapid	◎	X	◎	X	○
Side effect	X	△	○	○*	○*
Effect	△	△	○	◎	◎
Multi-viruses	○	○	△	△	◎
Low cost	○	△	X	X	△
From CB	X	○	X	○	X

図4 移植後のウイルス対応T細胞治療法の比較. Expanded T: 例えば anti-CD3/IL-2 や anti-CD3/CD28 で増幅したT細胞あるいはCD4T細胞, Specific T (in donor): ドナー血液中の特異的T細胞をそのまま収集する方法

### III ペプチド+サイトカインによる多ウイルス特異的T細胞治療成績

米国 Baylor 大学では既に phase I/II 多施設共同研究が行われている。対象は薬剤治療に反応しないEBV, CMV, AdV 感染症であり, 最も HLA が合致したドナーの特異的T細胞を  $2 \times 10^7$  cells/m<sup>2</sup> の量で一度投与した。反応を認めない場合は2週おきに4回までの輸注を追加可能とされている。登録された患者は45名で (CMV 感染症 21, EBV 感染症 10, AdV 感染症 13, CMV+AdV 1), 40%が末梢血肝細胞を24%が骨髄を, 24%が臍帯血 (ダブルユニット) を, 12%が臍帯血 (シングルユニット) を移植されていた。HLA 合致度は1/6が26%, 2/6が45%, 3/6が26%, 4/6が3%で半合致であれば良い程度であった。45名の内33名は一度の輸注で終了し, 7名は2回投与を受けている。部分的反応あるいは完全寛解はCMVで88.2%, EBVで78.2%, AdVで78.6%である。GVHDは0が33症例, 皮膚のGVHDが5例, 肝臓GVHDが1例, 慢性GVHDが1例で, TMAが2症例で認められた。

以上より, 今後ドナー由来特異的T細胞療法から, 第三者からのHLAが最も合致した特異的T細胞を輸注する方向性への転換を考慮できることを強く示した結果と言える。

### IV ウイルス特異的T細胞治療の展望

今までのウイルス特異的T細胞治療は, HLA に適合したペプチドと簡易抗原提示細胞系 (名古屋大学ではT細胞) を用いて迅速T細胞誘導系を除き, 安全性, 迅速性, 簡便性, 経済性の面での問題を内包していた。今回紹介したウイルス特異的T細胞調製では, さらにHLAに関わらず細

胞を調製できること, 多ウイルス特異的なT細胞を用意できること, また第三者からの特異的T細胞も用いることができることなどを示唆しており, より汎用性のある治療法へと向かおうとしている。図4に現時点で実施されている主要な移植後ウイルス感染症に対する細胞治療の利点と欠点についてのまとめを掲載する。

再生医療新法案 (再生医療等の安全性の確保等に関する法律案) の中でもこのペプチド+サイトカインによる調製は第3種再生医療として, 医療機関としては届け出のみで良い部類に入る治療となると思われる (一方プラスミドやウイルスを用いた調製は第1種などに分類される)。一方本治療の普及のためには, いずれアカデミアから細胞調製機関への細胞培養加工委託や, あるいは再生医療医薬として改正薬事法の中で薬として展開するような方向性が模索されることも重要と思われる。さらに, その中で (もし本治療が標準となるのであれば) 培養の全自動化も重要な課題と言える。

特異的T細胞のバンク化については現在, 適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究「(H24-難治等 (免) 一般 008) (研究代表者: 東京大学医科学研究所分子療法分野・高橋聡先生) の元で体制作りについて模索されており, 今後のすりあわせが期待される。またこの多ウイルス特異的T細胞調製の最適化と妥当性の検証は, 臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ安全な多ウイルス特異的T細胞療法の開発と実用化に関する研究 (H24-難治等 (免) 一般 105) (研究代表者: 森尾友宏) の中で検証されようとしており, 様々な場面で進捗状況を報告させていただきたいと願っている。

## V おわりに

移植後ウイルス感染に対する多ウイルス特異的CTL療法について概説した。日本はこの領域で諸外国に著しく遅れをとっているが、明らかな非自己抗原を表出する標的を根絶できる特異的T細胞治療の原型として、本治療がさらに安全に簡便に用いることができる日が近いことを願っている。またこの手法は抗原部位さえ明らかになれば様々な微生物に応用可能であり、さらなる応用や展開が期待される。

## 文 献

- 1) Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al: Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med*, 330: 1185–1191, 1994.
- 2) Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, et al: Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*, 257: 238–241, 1992.
- 3) Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al: Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*, 345: 9–13, 1995.
- 4) Fujita Y, Rooney CM, Heslop HE: Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant*, 41: 193–198, 2008.
- 5) Hanley PJ, Cruz CR, Savoldo B, et al: Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naive T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood*, 114: 1958–1967, 2009.
- 6) Leen AM, Myers GD, Sili U, et al: Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med*, 12: 1160–1166, 2006.
- 7) Feuchtinger T, Opherk K, Bethge WA, et al: Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood*, 116: 4360–4367, 2010.
- 8) Geyeregger R, Freimuller C, Stevanovic S, et al: Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application. *PLoS One*, 8: e59592, 2013.
- 9) Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, et al: Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Mol Ther*, 20: 1622–1632, 2012.
- 10) Amir AL, D’Orsogna LJ, Roelen DL, et al: Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common. *Blood*, 115: 3146–3157, 2010.
- 11) Melenhorst JJ, Leen AM, Bollard CM, et al: Allogeneic virus-specific T cells with HLA alloreactivity do not produce GVHD in human subjects. *Blood*, 116: 4700–4702, 2010.
- 12) Morice A, Charreau B, Neveu B, et al: Cross-reactivity of herpesvirus-specific CD8 T cell lines toward allogeneic class I MHC molecules. *PLoS One*, 5: e12120, 2010.