

慢性活動性 EB ウイルス感染症における 感染細胞同定法の研究：異種移植モデルの応用

研究分担者 藤原成悦 国立成育医療研究センター研究所・母児感染研究部・部長

研究要旨 EB ウイルス (EBV) 感染細胞の正確な同定が困難な症例において、免疫不全マウスに患者細胞を移植し感染細胞を生着させた後に感染細胞の正確な同定を試みた。一人の CAEBV 患者末梢血単核細胞において、CD56+細胞分画に 1.3×10^6 copies/ μ g DNA、CD8+細胞分画に 8.6×10^3 copies/ μ g DNA の EBV DNA が検出され、感染細胞の正確な同定が困難であった。そこで末梢血単核細胞から CD56+細胞を抗体ビーズにより除去した後 NOG マウスに移植したところ、EBV 陽性の CD56-CD16+CD8+細胞が生着した。この結果より、この患者では、CD56+CD16+CD8+および CD56-CD16+CD8+の 2 つのフェノタイプの細胞に EBV が感染していたことが分かった。NOG マウスへの移植を介することにより、通常の方法では困難な EBV 感染細胞の同定が可能になるケースが存在すると考えられる。

A. 研究目的

慢性活動性 EB ウイルス (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正確に決定する必要がある。通常この作業は、磁気ビーズを付着させた抗体により特定のリンパ球分画を分離し、それぞれの分画に含まれる EBV DNA 量をリアルタイム PCR 法により測定して行う。あるいは、flow-cytometric in situ hybridization (FISH) 法により、リンパ球表面に結合した抗体と in situ hybridization により検出された EBV RNA をフローサイトメーターで同時に検出することにより行う。しかし患者によっては、分離に必要な磁気ビーズ付抗体が入手できないマイナーな分画に感染している場合や、血液サンプル量が

非常に少ない場合などがあり、EBV 感染細胞の同定が困難になる。特に、複数の lineage の細胞に EBV DNA が検出される場合、実際に複数の lineage に感染しているのか、あるいは分画間のクロスコンタミネーションによるのかを見分けるのが困難な場合が多い。私たちは以前に CAEBV 患者末梢血単核細胞を免疫不全マウスの一系統である NOG マウスに移植すると、患者体内で増殖していたのと同じ EBV 感染細胞クローンが生着し全身性に増殖することを示した。このような異種移植モデルマウスでは EBV 感染細胞のみが選択的に増殖するため、そのフェノタイプ解析が容易であった。そこで、患者末梢血では EBV 感染細胞の正確な同定が困難な症例において、末梢血単核細胞

胞を NOG マウスに移植した後生着・増殖した細胞のフェノタイプを解析することにより、感染細胞の正確な同定を行うことを試みた。

B. 研究方法

1. CAEBV 患者

発熱、リンパ節腫脹、肝脾腫、肝機能障害、末梢血 EBV DNA 量上昇などの所見により CAEBV を疑われた。

2. リンパ球分画と EBV DNA 定量

比重遠心法により単核細胞分画を得た後、順番に磁気ビーズ付抗 CD19、抗 CD4、抗 CD8、抗 CD56、抗 CD14 抗体と反応させ、それぞれのマーカーを発現する細胞の分画を得た。単核細胞全体、それぞれの細胞分画、どの抗体とも反応しなかった分画のそれぞれについてリアルタイム PCR 法により EBV DNA 量を測定した。

3. NOG マウスへの異種移植

末梢血単核細胞より CD56⁺細胞を磁気ビーズ付抗体により除去した後、 5×10^5 個の細胞を 6 週齢の雌 NOG マウスの尾静脈内に接種した。接種後毎週末梢血 EBV DNA 量を測定し、 1×10^5 copies/ μ g DNA に達した段階で安楽死させ、全採血を行った。その後上記と同様の方法でリンパ球を分画し、それぞれの EBV DNA 量を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は直接ヒトを対象とする医療行為を含まないが、CAEBV 患者由来ヒト細胞を利用するため、ヘルシンキ宣言に則った倫理的配慮を必要とする。患者本人あるいは保護者に対して、本研究に関する十分な説明を文書と口頭で行い、自由意思による同意書への署名を得ることによりインフォームドコンセントを取得し

た。試料および臨床情報は匿名化され、患者の個人情報は厳重に管理された。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センターの倫理審査委員会および実験動物委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

本患者の末梢血解析の結果、各細胞分画の EBV DNA レベルは以下の通りであった：全単核細胞分画、 2.1×10^4 copies/ μ g DNA；CD19⁺分画、検出感度以下；CD4⁺分画、検出感度以下；CD8⁺分画、 8.6×10^3 copies/ μ g DNA；CD56⁺分画、 1.3×10^6 copies/ μ g DNA；CD14⁺分画、検出感度以下；その他(CD19⁻CD4⁻CD8⁻CD56⁻CD14⁻)、 6.5×10^2 copies/ μ g DNA。さらに詳しい解析により CD56⁺CD8⁻CD16⁺分画に確実に EBV が感染していることが判明した。しかし上記のように CD8⁺分画にも中程度の EBV DNA 量が検出されたことから、CD56⁺CD8⁻CD16⁺分画以外のフェノタイプの細胞にも感染している可能性が考えられた(図 1A)。そこでこの可能性を検証すること、またそのような細胞があるとしたらその詳細なフェノタイプを決定することを目的として NOG マウスへの移植実験を行った。患者末梢血単核細胞から磁気ビーズ付き抗体により CD56⁺細胞分画を除去した後 NOG マウスに移植した。患者末梢血において最も EBV DNA レベルが高かった CD56⁺分画を除いてもマウスに EBV 感染細胞が生着・増殖し、そのフェノタイプは CD56⁻CD16⁺CD8⁺であった(図 1B)。以上より、複数の lineage の細胞に EBV が感染していて患者末梢血を用いた解析ではそのフェノタイプ決定

が困難な場合でも、NOG マウスに移植し EBV 感染細胞を選択的に増幅することにより、詳細なフェノタイプ決定が可能となる場合があることが分かった。

D. 考察

CAEBV 患者末梢血単核細胞を NOG マウスに移植すると EBV 感染細胞が選択的に増殖するため、フェノタイプ解析のために十分な数の感染細胞を得ることができ、患者末梢血では不可能であった解析を行うことができた。以前に私たちは CAEBV 患者末梢血細胞を移植された NOG マウスでは、患者と同一の EBV 感染細胞クローンが増殖していることを示しており、マウスへの移植により患者のものと異なる感染細胞クローンが増殖した例は経験していない。以上より、複数の lineage に EBV が感染している場合や血液量が少ない場合など感染細胞のフェノタイプ決定が困難である場合に、NOG マウスへの移植を行うことにより正確な解析が可能になる場合があると考えられた。ただし、複数の感染細胞クローンが存在する場合、どのクローンも同じ効率でマウスに生着し同じスピードで増殖するかどうかは、ケースにより異なる可能性も考えられ、今後の検討が必要である。

E. 結論

複数の EBV 感染細胞クローンが存在するため、患者末梢血を用いて EBV 感染細胞のフェノタイプ解析が困難であった症例において、末梢血単核細胞を NOG マウスに移植し EBV 感染細胞を増殖させることにより、正確なフェノタイプ解析が可能となった症例を経験した。NOG マウスへの移植は EBV 感染細胞の正確な同定を

するための補助手段として有用であると考えられた。

F. 健康危機情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. *Cancer Sci.* 2014; 105(6):713-22.
- 2) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. *PLoS ONE*, 2014 Nov 19;9(11):e112564.
- 3) Fukuda A, Imadome K-I, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, and Kasahara M. Evaluation of the Immune Function Assay in Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Pediatr Transplant* 2014 Nov 23. doi: 10.1111/petr.12402. [Epub ahead of print]
- 4) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int*, 56:159-66. 2014.
- 5) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M.

Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102
Published online 23 January 2015.

2 . 著書

なし

3 . 学会発表

(国際学会)

1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, 16-19 July, 2014.

2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

3) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer-cell lymphoma. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.

(国内学会)

1) Honami Komatsu, Ken-Ichi Imadome, Tomotaka Yata, Takatoshi Kiyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. STAT3 is activated by EBV infection through LMP1 in EBV-T-LPDs and can be a therapeutic target. 第 76 回日本血液学会 2014.10.31 - 11.2 大阪.

H . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

図 表

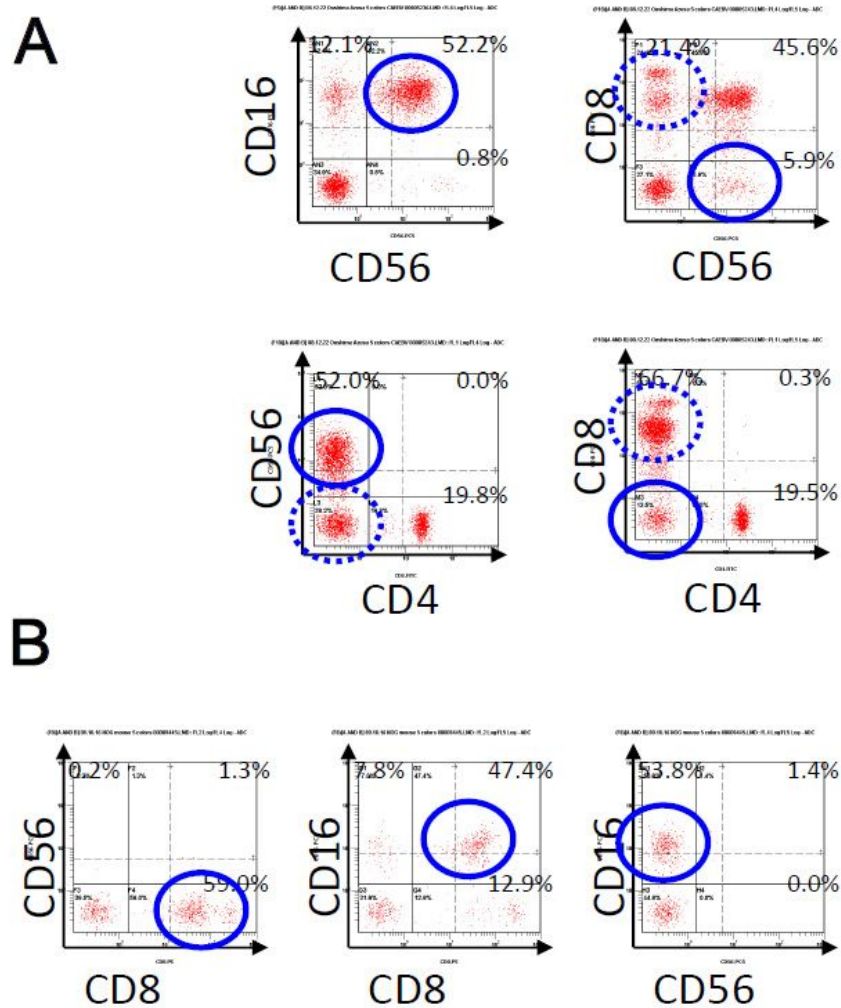


図 1. NOG マウスへの移植を介する EBV 感染細胞分画の決定. A. 患者末梢血単核細胞の解析. EBV DNA が確実に検出された分画を実線、低レベルで検出された分画を破線の丸で示す。B. 患者細胞を移植したマウス末梢血の解析. 患者末梢血単核細胞から CD56+細胞を除去した後 NOG マウスに移植した。EBV 感染細胞が生着した後末梢血単核細胞を解析した。EBV DNA が確実に検出された分画を実線の丸で示す。