

EBV 陽性リンパ腫モデルを用いた細胞免疫治療の研究

分担研究者 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 ヒト化マウスによる EB ウイルス (EBV) 陽性リンパ腫モデルを用いて、*ex vivo* で活性化・増幅した T 細胞を輸注する細胞免疫治療の効果を検証した。23 頭のモデルマウスのうち 11 頭には T 細胞輸注、12 頭には対照として PBS を輸注したところ、T 細胞輸注群では生存期間が有意に延長された ($P=0.036$, Logrank テスト)。これにより、活性化 T 細胞輸注の EBV 陽性リンパ腫モデルマウスに対する治療効果が実証されたと考えられる。

A. 研究目的

エイズリンパ腫は主に抗がん剤により治療されているが、一部のリンパ腫は薬剤耐性を示し治療に難渋することも少なくない。エイズリンパ腫の約 50% は EB ウイルス (EBV) 陽性であり抗原となるウイルス蛋白質を発現している。従って、細胞免疫療法は選択肢の一つとして考えられる。私たちは免疫不全マウスにヒト免疫系細胞を再構築したヒト化マウスに EBV を感染させるモデル感染系を確立し、びまん性大型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) タイプの EBV 陽性エイズリンパ腫を再現することに成功している。今年度は、このモデルを用いて、*ex vivo* で活性化・増幅した T リンパ球を輸注する治療法の効果を検証した。

B. 研究方法

1. EBV 陽性リンパ腫モデルの作成

NOD/Shi-*scid*/IL2R γ ^{null} マウス (以下 NOG マウス) は、6~8 週齢の雌マウスを実験動物中央研究所より購入し、SPF 環境で飼育した。臍帯血から Ficoll 比重遠心法により単核細胞を分離し、MACS CD34⁺ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) あるいは Stemsep キット (ステムセルテクノロジー社) を用いて CD34 陽性造血幹細胞を分離した。1 × 10⁴ ~ 1.2 × 10⁵ 個の CD34 陽性細胞を尾静脈より移植した。末梢血ヒト CD45, CD19, CD3 陽性細胞数を測定しヒト化を確認したのち、10² 50% transforming dose (TD₅₀) の B95-8 株 EBV を静脈内接種した。

2. 臍帯血由来 T 細胞の活性化培養とマウスへの輸注

ヒト化マウス作製にもちいたのと同じ臍帯血サンプルから Lymphosepar I による比重遠心法により単核細胞を分離し、AIM-V 培養液 (Life technologies) にヒト血清アルブミン、抗生物質、L-グルタミン、ヒト IL-2 (Proleukin, Novartis; 700 U/ml) を添加し、抗 CD3 抗体 (OKT-3, Janssen Pharmaceuticals) を固相化したフラスコで 10-14 日間培養した。細胞は一旦凍結保存したのち 2 × 10⁷ cells/kg の用量で輸注された。マウスの生存期間および末梢血中 EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数を対照マウスと比較して、T 細胞輸注の効果を検証した。EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数は、EBV 蛋白質 LMP2, BFLF1, BMLF1, EBNA3A, EBNA3B に由来するエピートープを提示する MHC クラス I テトラマーを用いた。

(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、ヒト臍帯血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。臍帯血バンクに提供された臍帯血には、血液量の不足などの理由により移植に用いられないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者およびバンク利用者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。一部の臍帯血は日本大学医学部付属病院で出生した新生児か

ら、母親の同意を得て提供された。これらの臍帯血は連結不可能匿名化され、個人情報の保護を徹底した。動物実験については、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、東京臍帯血バンク、および日本大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。また、国立成育医療研究センター動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 臍帯血由来活性化 T 細胞の性状

10-14 日間の活性化培養を行った後の臍帯血由来 T 細胞の典型的な性状を図 1 に示す。ほぼ全て (98%) の細胞が CD3 陽性の T 細胞であり、そのうち 88.8% が CD4⁺、11.8% が CD8⁺であった。CD4⁺HLA-DR⁺は 26.8%、CD8⁺HLA-DR⁺は 8.4%であった。CD16⁺CD56⁺ の NK 細胞は 0.1%以下であった。

2. 臍帯血由来活性化 T 細胞輸注による生存期間の延長

EBV 感染後 8 週間或いは末梢血に EBV DNA が検出された時点で T 細胞輸注を開始した。輸注は 2 週間のインターバルを置いて 3 回行った。計 23 頭の EBV 感染マウスのうち 11 頭に活性化 T 細胞、12 頭に対照として PBS (phosphate-buffered saline) を輸注した。生存曲線 (図 2) を比較したところ、活性化 T 細胞輸注群は有意に生存期間が長かった (P=0.036、Logrank テスト)。

3. 臍帯血由来活性化 T 細胞輸注による EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞の変化

活性化 T 細胞輸注群と PBS 輸注群の脾臓および肝臓における EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞数をテトラマーにより測定したところ、T 細胞輸注群に高い個体が認められたが、有意差には達していなかった。

D. 考察

エイズリンパ腫の約半数は EBV 陽性であり、ヒト化マウスによる EBV 陽性リンパ腫モデルは、このような EBV 陽性エイズリンパ腫の病態解明や治療法開発に有用と考えられる。本研究で検証した活性化 T 細胞輸注療法は、はじめ悪性腫瘍に対する治療法として開発されたが、

その後難治性感染症に対する効果も実証されている。抗がん剤抵抗性のエイズリンパ腫にはこのような免疫細胞治療も選択肢の 1 つと考えられる。

MHC クラス I テトラマーによる測定では、T 細胞輸注群でやや EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞が多かったものの有意差には達していなかった。従って現時点で活性化 T 細胞輸注の作用機序は不明である。しかし、今回用いたテトラマーが提示する EBV エピトープの種類は限られており、より多くのエピトープを提示するテトラマーを用いてさらに解析する必要があると考えられる。初感染直後のヒトではウイルス複製サイクルの蛋白質を認識する T 細胞が大部分を占めることが知られているため、今後このような複製サイクル蛋白質のエピトープを提示するテトラマーを多数用いて計測すれば、活性化 T 細胞輸注による効果が認められる可能性があると考えられる。また、今回の実験では臍帯血から活性化増幅した T 細胞を用いているが、臍帯血はナイーブリンパ球が大部分を占めるため、EBV 特異的な成分をほとんど含まないと考えられる。輸注した T 細胞の大部分は CD4 陽性細胞であることから、マウス体内でプライムされた EBV 特異的細胞の機能を促進した可能性がある。

E. 結論

移植後 EBV 陽性 B 細胞リンパ腫のモデルマウスを用いて臍帯血由来活性化 T 細胞輸注の効果を検証した。輸注を受けたマウスは対照と比較して有意に生存期間が延長し、その効果が自称された。輸注群マウスでは EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞が増加している傾向が認められたが有意差には達していなかった。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* (2015) 47, e136; doi:10.1038/emm.2014.102

Published online 23 January 2015.

- 2) Matsuda G, Imadome K-I, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, and Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. Immunotherapy, in press.
 - 3) 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.
 - 4) 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. 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) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-likalizing protein isoforms through differential translation initiation. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
 - 4) 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.
 - 5) Nagasawa Y, Natsumi I, Nozaki T, Inomata H, Imadome K-I, Iwata M, Kitamura N, Fujiwara S, Takei M. Human Osteoclasts are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-infected Humanized NOD/Shi-scid/IL-2R γ null Mice. American College of Rheumatology Annual meeting, Boston, November 14-19, 2014.
 - 6) Komatsu H, Imadome K-I, Shibayama H, Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV in EBV-T/NK-LPDs leading to development of the disorders. December 6, 2014, American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA.

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
該当なし。

図 表

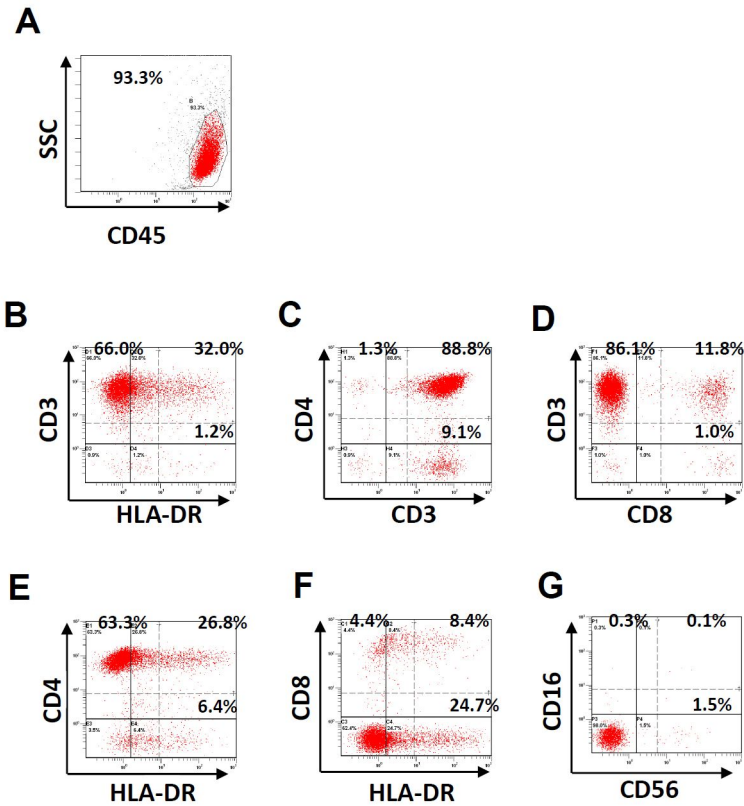


図 1 . 臍帯血より増幅した T 細胞の典型的フローサイトメトリーパターン . 98%の細胞が CD3 陽性で、そのうち 88.8%が CD4⁺、11.8%が CD8⁺だった。CD4⁺HLA-DR⁺は 26.8%、CD8⁺HLA-DR⁺は 8.4%。CD16⁺CD56⁺ の NK 細胞は 0.1%以下であった。

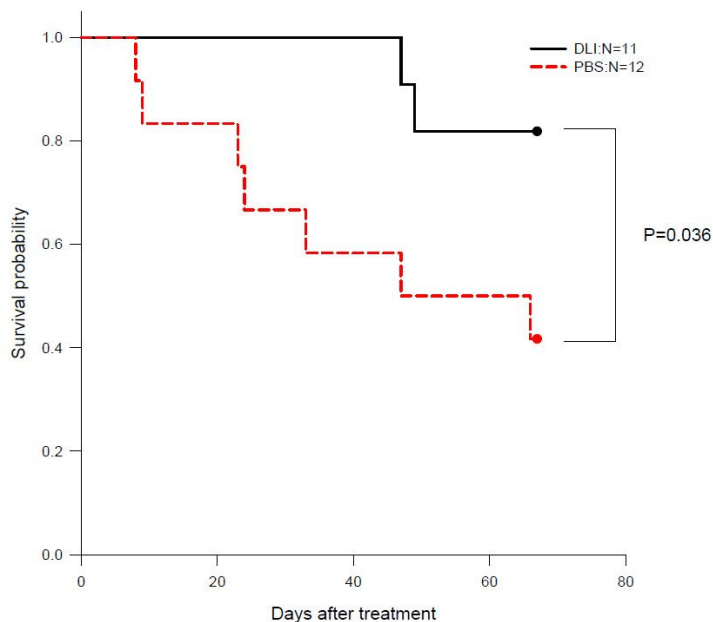


図 2 . 活性化 T 細胞輸注による延命効果 . Logrank 法による P 値を示す。T 細胞輸注群を実線、対照の PBS 輸注群を破線で示す。

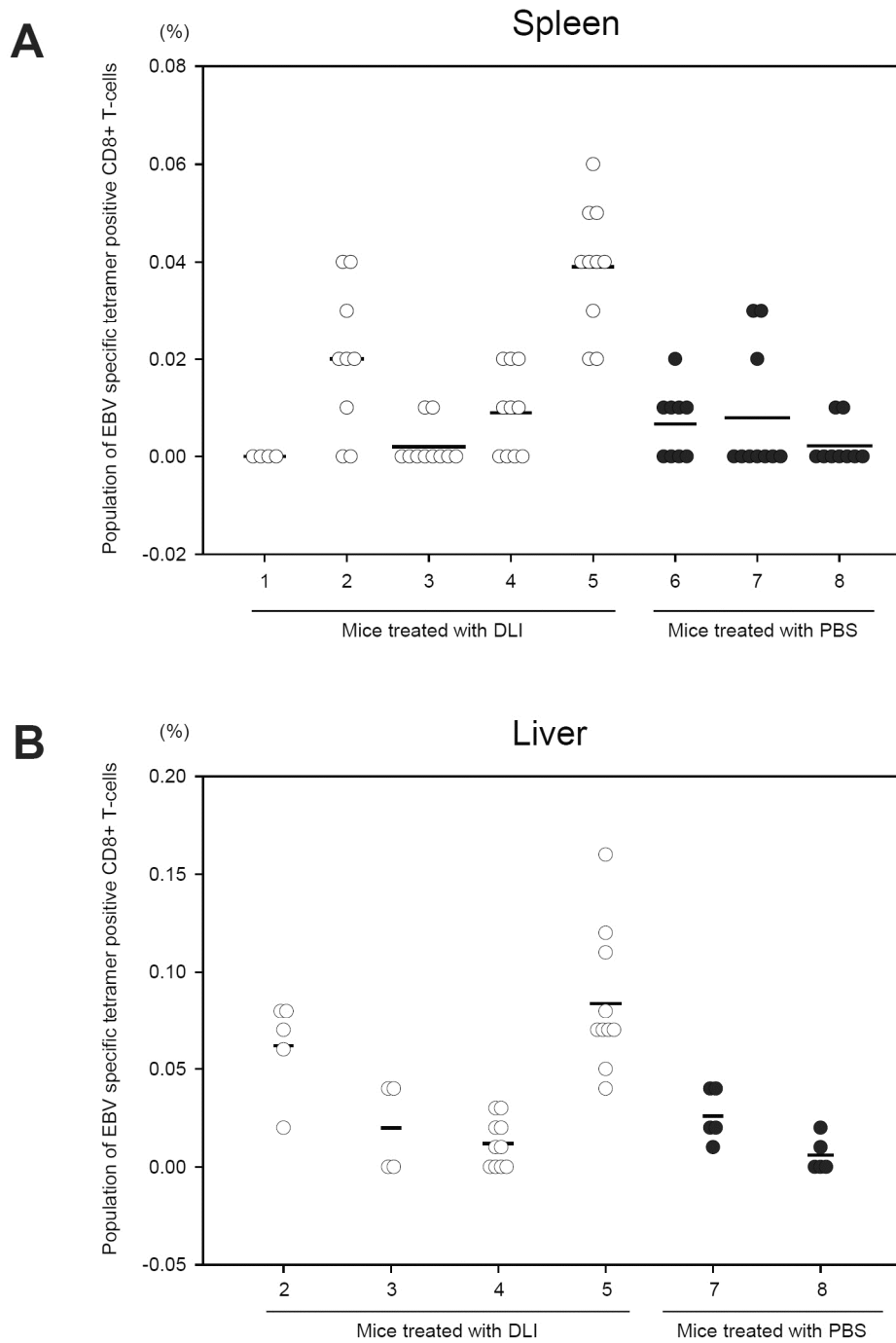


図 3. T 細胞輸注と EBV 特異的 CD8⁺ T 細胞 . 活性化 T 細胞輸注を受けたマウス (○) と対照マウス (●) の脾臓と肝臓における Tetramer⁺CD8⁺細胞の%を示す。