

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591279

研究課題名（和文） 新たな動物モデルを用いた難治性ウイルス感染症に対する免疫遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） The development of novel immune gene therapy for chronic viral infections.

研究代表者

田内 久道（TAUCHI HISAMICHI）

愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30314959

研究成果の概要（和文）：慢性活動性 EB ウイルス感染症や EB ウイルス関連血球貪食症候群などの小児の難治性感染症に対して新たな治療法の開発が求められている。我々は EB ウイルス特異的ヒト CD4, CD8 の樹立を行った。その EB ウイルス特異的ヒト CD4, CD8 細胞は自己の LCL 株に対し細胞傷害活性を認め、自己の HLA によって提示された EB ウイルス由来の抗原に反応していることを証明した。

研究成果の概要（英文）： Development of new treatments for children with intractable infections such as chronic active EB virus infection and virus-associated hemophagocytic syndrome have been demanded. We established EB virus specific human CD4, CD8 T lymphocyte. We confirmed the EB virus specific CD4, CD8 T lymphocyte have cytotoxicity for LCL cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：難治性感染症 免疫遺伝子治療 EB ウイルス 細胞障害活性 T 細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス感染症や EB ウイルス関連血球貪食症候群などの小児の難治性感染症の予防・治療法の開発は成人のみならず小児領域でも重要な課題の一つである。難治性感染症に対しては治療法開発に向けてさまざまアプローチがなされているが、いまだ満足できるレベルまでには至っておらず、新たな概念に基づく治療法の開発が求められている。

免疫機構は、本来生体に備わっている重要な防御機構であり、特に感染症やがんに対し

てはきわめて重要な生体防御システムである。免疫療法の概念は古くから提唱されていたが、免疫系が認識しうる標的抗原の本態が不明であったため、その治療効果には限界があった。しかしながら、がんに対しては1990年代になって、ヒト T 細胞が認識できるがん関連抗原が同定されるに至って、分子基盤に基づく細胞免疫療法の開発が可能となった。このような背景のもと、現在国内外で多くのがん免疫臨床試験が進行している。

感染症や悪性腫瘍に対する免疫監視機構はさまざまな免疫担当細胞の複雑な相互作用

用によって構築されているが、病原体感染細胞やがん細胞を直接認識してそれらを殺傷する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が中心的役割を担っていることは論を俟たない。つまり、患者体内でいかに標的抗原特異的 CTL を効率よく誘導できるかが、治療成功の鍵を握っている。しかし残念ながら、これまで実施されてきた臨床試験の多くは、CTL 誘導効率が低く、その臨床効果は満足できるものではない。

T 細胞は T 細胞レセプター (TCR) を介して、ウイルス感染細胞表面に発現しているウイルスまたはがん関連抗原由来ペプチドと HLA との複合体を特異的に認識する。従って、CTL 由来 TCR 遺伝子を T 細胞に遺伝子導入することによって病原体特異性が獲得できることが期待される。

2. 研究の目的

EB ウイルス特異的ヒト CTL クローンの樹立と TCR 遺伝子導入による抗原特異性の獲得を行う。すでに樹立したウイルス (HSV-1, EBV, HCMV, HHV-6) 特異的 CTL クローンに加え、さらにウイルス特異性が高い CTL クローンの樹立を試みる。

また新たな免疫不全マウスの開発によって、マウス体内でヒト細胞・組織を構築することが可能となりこの動物モデルを用いて、新たな発想に基づく難知性ウイルス感染症に対する免疫遺伝子治療の開発を目的とした。

3. 研究の方法

EB virus specific CD4, CD8 誘導を行った

健常者から末梢血単核球を分離し、自己から誘導した Auto-LCL を用いて Mix lymphocyte reaction (MLR) を行い、リンパ球を増殖させる。

Medium は 10% human serum/RPMI pc/sm
96well plate で 1well あたり

Stimulator 自己由来 LCL MMC 処理
: 2.5×10^4 個/well

Responder 分離した末梢血単核球 (PBMC)
: 5.0×10^4 個/well

混合し培養する

1 週間後もう一度 Auto-LCL を用いて MLR を行う。この時に培養液に IL-2 を加える。

Medium は 10% human serum/RPMI pc/sm,
IL-2: 10IU/ml

96well plate で 1well あたり

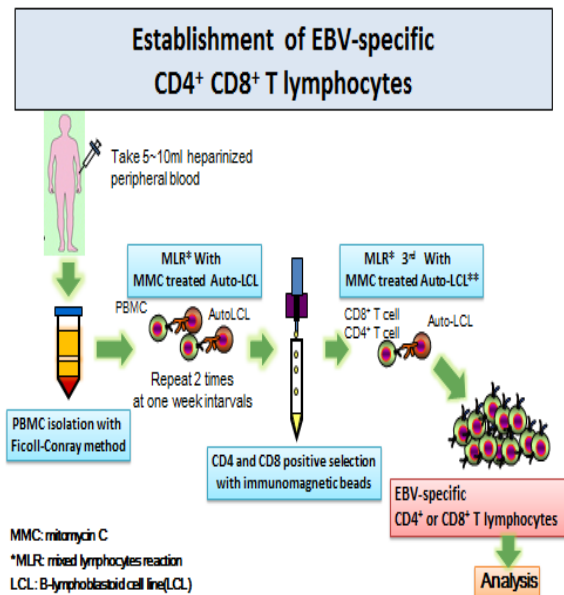
Stimulator 自己由来 LCL MMC 処理
: 5.0×10^5 個/well

Responder MLR を受けた PBMC

: 5.0×10^5 個/well 混合し培養する

2 回目の MLR から 5 日後に MACS beads 法により CD8 陽性分画と CD4 陽性分画をそれぞれ分離する。

CD8 陽性リンパ球と CD4 陽性リンパ球に対し Auto-LCL を用いて MLR を行い増殖させる。3 回目刺激の 5 日後に Auto-LCL に対して Cr release assay を行った。



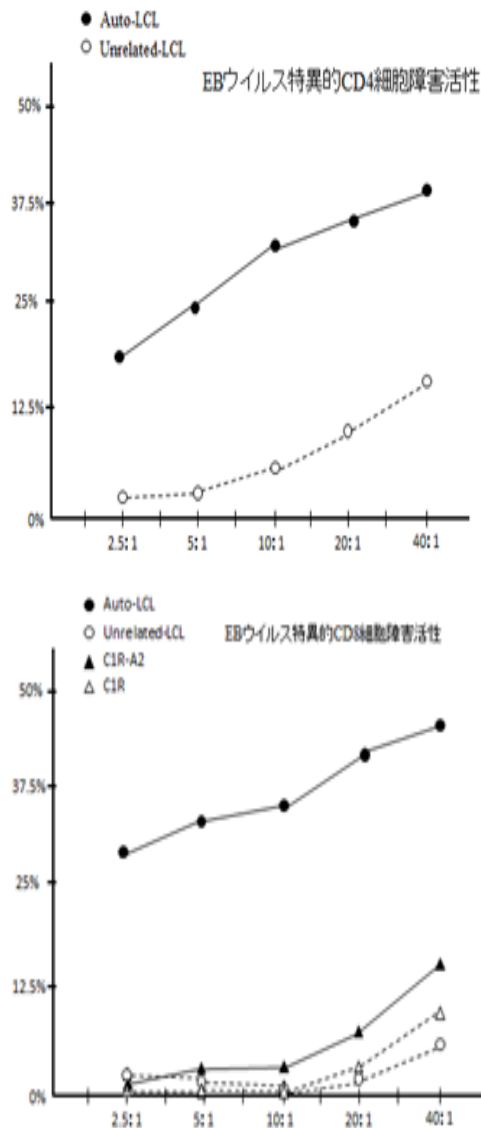
4. 研究成果

健常者の末梢血より単核球を分離し、あらかじめ EB ウイルスを感染させて作成した自己 Lymphoblastoid cell line (LCL) とリンパ球混合刺激 (mix lymphocyte reaction: MLR) を行い HLA-A24 拘束性に EB ウイルス遺伝子産物に対し特異的な T 細胞を誘導させた。誘導された T 細胞に対し MACS beads 法により、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞をそれぞれ分離して、自己 LCL に対する細胞傷害活性の検討を行った。

その結果、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞共に自己の LCL 株に対し細胞傷害活性を認め、自己の HLA によって提示された EB ウイルス由来の抗原に反応していることが示唆された。(下図)

これらの樹立された EB ウイルス蛋白特異的 T 細胞クローンから TCR 遺伝子を単離、この遺伝子を発現するレンチウイルスベクターが作成されれば、患者末梢血よりウイルス特異的な T 細胞を大量に誘導することができ、慢性活動性 EB ウイルス感染症や EB ウイ

ルス関連血球貪食症候群などの小児の難治性感染症に対して新たな治療法となる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Imamura T, Sato T, Tauchi H (他8名、8番目) Outcome of pediatric patients with Langerhans cell histiocytosis treated with 2-chlorodeoxyadenosine: a nationwide survey in Japan. Int J Hematol. 91:646-51, 2010 査読有
- ② Nagai K, Ishii E, Tauchi H, (他9名、8番目) Subtypes of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis

in Japan based on genetic and functional analyses of cytotoxic T lymphocytes. PLOS ONE 2010 (in press) 査読有

- ③ Toki T, Kanezaki R, Tauchi H (他8名、8番目) The key role of cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. Leukemia. 23:95-103, 2009 査読有
- ④ Fujieda M, Matsunaga A, Tauchi H (他4名、4番目) Children's toxicology from bench to bed - Drug-induced Renal Injury (2): Nephrotoxicity induced by cisplatin and ifosfamide in children. J. Toxicol. Sci. 34:251-257, 2009 査読有
- ⑤ Sakayama K, Kidani T, Tauchi H (他6人、4番目) Reconstruction using a frozen bone method for osteosarcoma of the talus. A case report and review of the literature. Anticancer Res. 29:4093-4098, 2009 査読有
- ⑥ Tauchi H, Tomizawa D, Ishii E. Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. Leuk Res. 32:1523-1529, 2008 査読有
- ⑦ Sakayama K, Tauchi H, Sugawara Y. A complete remission of sclerosing rhabdomyosarcoma with multiple lung and bone metastases treated with multi-agent chemotherapy and peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT): a case report. Anticancer Res. 28:2361-2367, 2008 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 田内久道、中野夏代、長谷川均、高田清式、村上雄一、安川正貴. 臨床実習証を用いた医学部学生に対する感染制御教育とその成果、第80回日本感染症学会西日本地方会、2010年11月20日、松山市
- ② 永井功造、越智俊元、末盛浩一朗、藤原弘、本田美里、田内久道、森本哲、大賀正一、石井榮二、安川正貴. 日本における家族性血球貪食性リンパ組織球症の実態とその多様性. 第71回日本血液学会学術集会、2009年10月25日、京都
- ③ 田内久道 Clinical features and outcome of MLL gene rearranged acute lymphoblastic leukemia in infants

- ④ with additional chromosomal abnormalities other than 11q23 translocation. 第12回乳児白血病講演会、2009年4月11日、東京
- ⑤ 田内久道、江口真理子、石前峰斉、石井榮一、富澤大輔、康勝好、平山雅浩、宮村能子、絹川直子、林泰秀、堀部敬三. 11q23 転座以外の付加的染色体異常を認めた *MLL* 遺伝子再構成陽性の乳児急性リンパ性白血病の臨床的特徴及び予後. 第70回日本血液学会総会、2008年10月11日、京都
- ⑥ 土岐力、金崎里香、足立壮一、徐剛、佐藤知彦、鈴木かほり、田内久道、遠藤幹也、伊藤悦朗. ダウン症関連白血病細胞の増殖における Stem cell factor/KIT シグナリング. 第70回日本血液学会総会、2008年10月11日、京都

[図書] (計2件)

- ① 市川光太郎、他 中山書店、これから出会う物語、2010、pp180-184
- ② 荒木博陽、他 医薬ジャーナル社、小児科領域の服薬指導 Q & A、2009、pp18-33

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田内 久道 (TAUCHI HISAMICHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30314959

(2) 研究分担者

石井 榮一 (ISHII EIICHI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：20176126

安川 正貴 (YAMAKAWA MASAKI)
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60127917