

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 20 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590374

研究課題名（和文） EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と病態発現機構の解析

研究課題名（英文） The manufacture of the EBV-T/NK LPD model mouse and the study of the clinical condition expression mechanism

研究代表者 今留 謙一（Ken-Ichi IMADOME）

独立行政法人 国立成育医療研究センター・母児感染研究部・室長

研究者番号：70392488

研究成果の概要（和文）：慢性活動性 EB ウイルス感染症(CAEBV)の疾患モデルマウスの作製を行い、病態発現機構の解明と新規治療薬の開発を目指した。CAEBV の CD4 タイプ、CD8 タイプ、 $\gamma\delta$ タイプ、NK タイプの全てのもれるマウスの作製に成功した。本研究により EBV 感染 T/NK 細胞が NOG マウスに生着し増殖するためには非感染 CD4⁺T 細胞の存在が必須であることが明らかとなった。CAEBV モデルマウス内の EBV-DNA 量が高値を示した(10E4 copies/ μ gDNA 以上)ところで非感染 CD4⁺T 細胞の除去を抗 CD4 抗体(OKT4 抗体)で行い、治療への応用に関する検討を行った。OKT4 抗体を投与した後、末梢血中の EBV-DNA は減少をはじめ、マウスの体重減少も軽減した。また、解剖の結果、非感染 CD4⁺T 細胞の除去による EBV 感染 T/NK 細胞の減少が示された。

研究成果の概要（英文）：Epstein-Barr virus (EBV), a ubiquitous B-lymphotropic herpesvirus, ectopically infects T or NK cells to cause severe diseases of unknown pathogenesis, including chronic active EBV infection (CAEBV) and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis (EBV-HLH). We developed xenograft models of CAEBV and EBV-HLH by transplanting patients' PBMC to immunodeficient mice of the NOD/Shi-scid/IL-2R^{Null} strain. In these models, EBV-infected T, NK, or B cells proliferated systemically and reproduced histological characteristics of the two diseases. Analysis of the TCR repertoire expression revealed that identical predominant EBV-infected T-cell clones proliferated in patients and corresponding mice transplanted with their PBMC. Transplantation of individual immunophenotypic subsets isolated from patients' PBMC as well as that of various combinations of these subsets revealed a critical role of CD4⁺T cells in the engraftment of EBV-infected T and NK cells. In accordance with this finding, in vivo depletion of CD4⁺T cells by the administration of the OKT4 antibody following transplantation of PBMC prevented the engraftment of EBV-infected T and NK cells. This is the first report of animal models of CAEBV and EBV-HLH that are expected to be useful tools in the development of novel therapeutic strategies for the treatment of the diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

EBV は B 細胞を主要な標的とし、正常の免疫能をもつ感染宿主には通常伝染性単核症以外の疾患を起こさない。しかし一部の宿主においては、T あるいは NK 細胞に感染し増殖を誘発することにより、CAEBV や EBVAHS を代表とする EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患を引き起こす。EBV が T あるいは NK 細胞に感染し増殖を誘発するメカニズムについてはほとんど知られていない。CAEBV においては特定の EBV 蛋白質を認識する CD8⁺ T 細胞の欠損など免疫不全を疑わせる知見があるが、その一方で EBV 感染 T あるいは NK 細胞のモノクローナルな増殖など腫瘍性疾患を思わせる所見もみとめられ、疾患の本態は依然として不明である。EBV-T/NK-LPD の病態解明と治療法開発に有用な疾患モデル動物はこれまでまったく知られていない。

2. 研究の目的

CAEBV は感染細胞が存在する分画の CD4, CD8, $\gamma\delta$ -T, NK タイプの 4 つのタイプに分類される。この全てのタイプのモデルマウスを作製し、*in vivo* における新規治療薬候補の評価を行い、新規治療薬の開発を目指した。また、モデルマウスを使用し病態発現のメカニズムの解明を進めた。

3. 研究の方法

CAEBV 患者の末梢血から PBMC を分離し、 1×10^6 細胞(PBMC)をマウス尾静脈より移植する。移植後毎週、移植マウスの採血をし、末梢血中の EBV-DNA 定量解析と FCM 解析によるヒト細胞の生着および増殖をチェックする。感染細胞を含めたヒト細胞の増殖と末梢血 EBV-DNA 量が 1×10^4 copies/ μ gDNA 以上になった時点で抗 CD4 抗体(OKT4 抗体)をマウス尾静脈より投与する。OKT4 抗体は

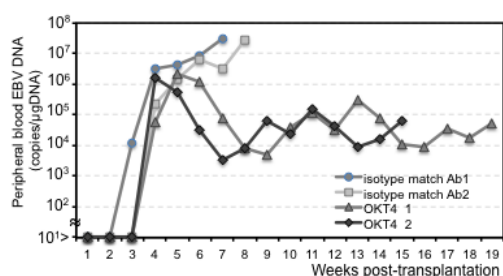
2 日連続で 1 回 100 μ g 投与する。その後は通常週 1 回/週で、体重減少が 2g 以上ある時に限り 2 回/週 (2 日連続投与) する。OKT4 抗体投与後も毎週採血し末梢血中の EBV-DNA 定量解析と FCM 解析を行なう。コントロール群には PBS を投与する。採血に当たっては、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を得ており、本研究への参加を求める前に、患者本人、あるいは保護者、あるいは両者に対して文書および口頭により研究内容等の十分な説明をおこない、自由意思により参加の有無を決定するための環境を整える。また、同意後も自由に撤回できることを説明する。検体は取得する医療機関担当者により連結可能匿名化され、匿名化照合表は施錠のうえ厳重に保管される。従って、研究者には提供者の個人情報 は伝えられず、その漏洩の危険はない。学会・論文発表の際には、個人を特定する情報を含めないため、プライバシーは保護される。

4. 研究成果

患者 PBMC(CD8 タイプ)投与 4 週目 1×10^6 copies/ μ gDNA で OKT4 抗体の投与を開始した。OKT4 抗体の 2 日連続投与により末梢血中の CD4⁺T 細胞は消滅する。PBS 投与マウスは 6,7 週で死亡し、EBV-DNA 量も 10^7 copies/ μ gDNA 以上になった。一方、OKT4 抗体を投与したマウスでは、末梢血 EBV-DNA 量がおおよそ 10^2 copies/ μ gDNA の減少が認められ、生存も 15~19 週まで延長した (図 1 参照)。末梢血中の EBV ゲノム量が増加に転じてくる時期の末梢血の FCM 解析結果を見ると僅かであるが CD4⁺T 細胞が検出された。

OKT4 抗体投与マウスを解剖し FCM 解析を行った。その結果、脾臓・肝臓に CD4⁺T 細胞が検出され、感染細胞分画も検出された。NK タイプや $\gamma\delta$ -T タイプでも同様の結果を得

ている。



OKT4 抗体を投与したマウスの生存延長、体重減少の阻止と EBV ゲノム量の減少により非感染 CD4⁺T 細胞の除去による感染 T/NK 細胞増殖阻害効果は明らかである。コントロールの PBS 投与マウスは末梢血中の EBV ゲノム量は減少することなく、上昇し 8 週目で 2 匹とも死亡している。一方、OKT4 抗体投与マウスの寿命は毛並みが悪く運動能も低下した所で解剖しているが、2 倍以上の生存を示している。EBV ゲノム量が検出感度以下にならないのは、臓器に浸潤している感染細胞が OKT4 抗体の影響が低く生き残っている CD4⁺T 細胞のヘルプにより増殖し、末梢血中に供給される可能性が考えられる。今回、10⁶ copies/μgDNA で OKT4 抗体の投与を開始したが、現在患者で初診時に見つかる時が多いゲノム量である 10⁴ copies/μgDNA レベルでの投与開始実験を行なっている。マウスの中では末梢血ゲノム量が陰性になるものも出始めている。EBV 感染 T/NK 細胞が NOG マウスに生着し増殖するためには非感染 CD4⁺T 細胞の存在が必須であり、非感染 CD4⁺T 細胞の除去による感染細胞の減少を誘導できた。今後、1.非感染 CD4⁺T 細胞の感染細胞への cell to cell による影響であるのか？ 2. 非感染 CD4⁺T 細胞の産生するサイトカイン・ケモカインが影響しているのか？ を検討するとともに非感染 CD4⁺T 細胞がどのような細胞であるのか(regT 細胞、Th1、Th17 etc.)を明らかにしてい、治療

薬・標的分子の開発を進めていく。

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 13 件)

1. Arai A, Imadome K, Yamazaki E, Fujiwara S, Miura O

Autoimmune hemolytic anemia accompanied by reactivation of an Epstein-Barr virus infection with suppressed CTL response to EBV-infected cells

Internal Medicine 2010;49(4):325-9. Feb 15.

2. Shigeta T, Imadome K, Sakamoto S, Fukuda A, Kakiuchi T, Matsuno N, Tanaka H, Nakazawa A, Kasahara M.

Epstein-barr virus infection after pediatric living-related liver transplantation-management and risk factors. Transplant Proc. 2010 Dec;42(10):4178-80.

3. Kawaguchi T, Tsukamoto S, Ohwada C, Takeuchi M, Muto T, Tanaka S, Sakai S, Takeda Y, Abe D, Sakaida E, Shimizu N, Yokote K, Iseki T, Imadome K, Nakaseko C
Successful treatment with rituximab and donor lymphocyte infusions for fulminant EBV-associated lymphoproliferative disease that developed 14 years after unrelated BMT
Bone Marrow Transplantation 2011 Jan 31:1-3

4. Ohga S, Ishimura M, Yoshimoto G, Miyamoto T, Takada H, Tanaka T, Ohshima K, Ogawa Y, Imadome K, Abe Y, Akashi K, Hara T

Clonal origin of Epstein-Barr virus (EBV)-infected T/NK-cell subpopulations in

EBV-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorders of childhood
J Clin. Virol. 2011 May;51(1):31-7.

5. Arai A, **Imadome K**, Watanabe Y, Yoshimori M, Koyama T, Kawaguchi T, Nakaseko C, Fujiwara S, Miura O. Clinical features of adult-onset chronic active Epstein-Barr virus infection: a retrospective analysis.
Int J Hematol. 2011 May;93(5):602-9

6. Kuwana Y, Takei M, Yajima M, **Imadome K**, Inomata K, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki N, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, Fujiwara S. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice
PLoS One 2011 Oct; 6(10): 26630-26634

7. **Imadome K**[¶], Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells ([¶] **Corresponding author**)
PLoS Pathogens 2011 Oct; 7(10): 1002326-1002340

8. **Imadome K**^{*}, Yang X^{*}, Wada T^{*}, Nishida N, Mukai T, Fujiwara M, Kawashima H, Kato F, Fujiwara S, Yachie A, Zhao X, Miyawaki T, Kanegane H. Characterization of Epstein-Barr virus (EBV)-infected cells in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in two

patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 and 2. (^{*} **contributed equally to this work**) Herpesviridae. 2012 Feb 10;3(1):1.

9. Uchida E, Honma R, Igarashi A, Kurata M, **Imadome K**, Omoto E, Miura O, Arai A. Sequential monitoring of plasma EBV-DNA level in a patient with EBV-positive Hodgkin lymphoma.
Rinsho Ketsueki. 2012 Jan;53(1):87-91.

10. Arai A, **Imadome K**, Wang L, Wu N, Kurosu T, Wake A, Yamamoto H, Ota Y, Harigai M, Fujiwara S, Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation.
Intern Med. 2012 ;51(7):777-82.

11. **Imadome K**[¶], Fukuda A, Kawano F, Imai Y, Ichikawa S, Mochizuki M, Shigeta T, Kakiuchi T, Sakamoto S, Kasahara M, Fujiwara S. Effective control of Epstein-Barr virus infection following pediatric liver transplantation by monitoring of viral DNA load and lymphocyte surface markers. ([¶] **Corresponding author**)
Pediatr Transplant. 2012 Jul 5. 1399-3046

12. Iijima K, Yamada H, Miharu M, **Imadome K**, Miyagawa Y, Akimoto S, Kobayashi K, Okita H, Nakazawa A, Fujiwara S, Fujimoto J, Kiyokawa N. ZNF385B is characteristically expressed in germinal center B cells and involved in B-cell apoptosis

Eur J Immunol. 2012 Sep 4. doi:
10.1002/eji.201242530.

13. Arai A, Nogami A, **Imadome K**, Kurata M,
Murakami N, Fujiwara S, Miura O.

Sequential monitoring of serum IL-6, TNF- α ,
and IFN- γ levels in a CAEBV patient treated
by plasma exchange and
immunochemotherapy.

Int J Hematol. 2012 Sep 16.

〔学会発表〕 (計 16 件)

1. EB ウイルス関連血球貪食症候群モデル
マウスの作製と解析
今留謙一、矢島美沙子、川野布由子、市
川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、
駒野淳、山本直樹、藤原成悦 第 58
回日本ウイルス学会 2010.11.7~9 徳
島
2. EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患
モデルマウスの作製と病態発現解析
今留謙一、矢島美沙子、川野布由子、市
川紗弓、清水則夫、中村浩幸、松田剛、
駒野淳、山本直樹、藤原成悦 第 20 回
EB ウイルス感染症研究会 2010 東京
3. ヒト化マウスを用いたトランスレーショ
ナルリサーチ
今留謙一 第 20 回サイトメトリー学
会 東京 2010 (ランチョンセミナー招
聘講演)
4. EB ウイルス関連 LPD と PTLD の制御に
ついて
今留謙一 千葉大血液セミナー 千葉
大学医学部付属病院 千葉 2010 (招聘
講演)
5. 腫瘍ウイルスの新診断法と新抗ウイルス
薬の開発~その克服に向けて~
今留謙一 第 7 回東京都医学検査学会 東

京 2010 (招聘講演)

6. A xenotransplant model of chronic active
Epstein-Barr virus infection by use of
NOG mice

Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako
Arai, Atsuko Nakagawa, Fuyuko Kawano,
Sayumi Ichikawa, Osamu Miura, Mamoru
Ito, Norio Shimizu, Naoki Yamamoto,
Shigeyoshi Fujiwara

The 14th Biennial Conference of the
International Association for Research on
Epstein-Barr virus & Associated Diseases
4-7 Sep. 2010 UK

7. 小児生体肝移植後の免疫抑制剤減量に伴
う EBV 特異的 CTL の誘導の検討
今留謙一、福田晃成、川野布由子、市川
紗弓、今井由美、望月雅司、重田孝信、
坂本靖介、笠原群生、藤原成悦 第 8 回
EBV 研究会 2011 大阪
8. EBV 関連 T/NK-LPD の診断と治療
今留謙一 筑波大学小児治療セミナー
筑波大学付属病院 2011 (招聘講演)
8. NOG マウスを用いたヒト疾患モデル作
製による病態発現解析
今留謙一 重粒子医科学センターセミ
ナー 独立行政法人放射線医学研究所
2011 (招聘講演)
9. Novel Mouse Xenograft Models of CAEBV
and EBV-HLH Reveals a Critical Role of
CD4+ T Cells in the Proliferation of
EBV-Infected T and NK Cells
Ken-Ichi Imadome, Misako Yajima, Ayako
Arai, Atsuko Nakazawa, Norio Shimizu,
Naoki Yamamoto, Tomohiro Morio, Shouichi
Ohga, Mamoru Ito, Jun Komano,
Shigeyoshi Fujiwara
XV, International Congress of Virology
11-16 September 2011 Sapporo

9. EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスの作製と病態発現解析
今留謙一 第 44 回小児感染症学会：
ワークショップ~難治性 EBV 感染症
2012.11.23 小倉
- 11.慢性活動性 EB ウイルス感染症
(CAEBV)の診断・検査について
今留謙一
第 3 回 CAEBV 患者交流会 特別講演
2012.10.20 京都
12. EB ウイルス関連 T/NK リンパ増殖性疾患の診断と治療および基礎研究の現状
今留謙一 第 1 回血液 Interactive
Forum 2012 仙台(招待講演)
13. 今留謙一、清水則夫、川野布由子、山田千尋、藤原成悦
細胞表面抗原マーカー解析による EBV 特異的 CTL 誘導の検討
第 27 回ヘルペスウイルス研究会
2012.6.7、名古屋
14. 今留謙一、新井文子、川野布由子、大賀正一、森尾友宏、清水則夫、伊藤守、山本直樹、藤原成悦
EBV 関連血球貪食リンパ組織球症モデルマウスの作製と病態発現解析
第 21 回 EB ウイルス感染症研究会
2012 年 3 月 17 日、東京
15. 今留謙一、福田晃也、川野布由子、望月雅司、山田千尋、阪本靖介、笠原群生、藤原成悦
小児生体肝移植後の EBV ゲノム定量モニタリングの重要性と免疫抑制剤減量に伴う EBV 特異的 CTL 誘導の検討
第 60 回日本ウイルス学会 2012.11.15
大阪
16. 今留謙一、川野布由子、千葉祐規乃、

新井文子、中澤温子、大賀正一、森尾友宏、清水則夫、伊藤守、藤原成悦
難治性 EBV 関連 T/NK リンパ増殖性疾患モデルマウスを用いた新規薬剤の評価研究
第 9 回 EB ウイルス研究会、2012.7.6
米子

〔図書〕(計 2 件)

1. 「移植後 EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患の予防と治療」

今留謙一 医学のあゆみ Vol.243 No.2
頁:186-187 2012

2. 「EB ウイルス関連リンパ増殖性疾患」

今留謙一 小児科診療 Vol.76 No.3
頁:459-466 2013

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

年 1 回の CAEBV 患者会開催と教育講演
(病気の理解と現状説明)

6. 研究組織

(1) 研究代表者 今留謙一

(Ken-Ichi IMADOME)

独立行政法人国立成育医療研究センター
研究所母児感染研究部 室長

研究者番号：70392488