

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591418

研究課題名(和文) 全てのHLAクラスIを対象としたCMV特異的CTL監視法および樹立法の開発

研究課題名(英文) Development of monitoring systems for CMVpp65 specific CTLs restricted to each HLA class I.

研究代表者

近藤 英生 (Kondo, Eisei)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30379747

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：CMV特異的CTLの検出法として、IFN ELISPOT assayの条件を検討した結果、末梢血単核球、CD8陽性T細胞のみでは、十分な感度が得られなかったが、CD8陽性T細胞に抗原提示細胞であるCD40活性化B細胞を加えることにより、CMVpp65特異的T細胞が検出可能であった。CMV既感染のHLA一致ドナーより造血幹細胞移植を行う患者およびそのドナー、計5組より、文書同意を得た上で血液を採取し、未知エピトープを同定中である。既知および同定したペプチドを含めIFN ELISPOT assayを行う予定である。

研究成果の概要(英文)：CMV pp65 specific T cells are able to be detected in magnetically separated CD8+ T cells by IFN $\gamma$  ELISPOT assay with epitope peptide pulsed CD40-activated B cells, but not with peptide alone or unseparated PBMCs. Under written informed consent, PBMCs were collected and stored from five CMV sero-positive HLA identical donors and their recipients. After identification of unknown CMV pp65 epitopes, IFN $\gamma$  ELISPOT assay with the epitope peptides will be conducted.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：血液内科学

キーワード：CTL CMV pp65 HSCT

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞移植後におけるウイルス感染症は、依然大きな問題である。移植後早期のサイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、CMV 抗原血症または CMV-DNA のモニタリングにより Pre-emptive に抗ウイルス剤を使用することによりコントロール可能となったが、移植後 100 日以降の後期サイトメガロウイルス感染症は抗ウイルス剤に耐性のことが多く、CMV 肺炎などの CMV 病に進展した場合には死亡率 46% (Boeckh et al., Blood 2003) と治療成績は極めて不良である。難治性の移植後ウイルス感染症 (CMV, EBV など) に対して、ウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞を投与する養子免疫療法が試みられており、有望な成績が報告されている。しかし、欧米人に多い HLA 型を対象としたものであるため、日本人では一部にしか適用できない。

日本人に多い HLA クラス I アリルの頻度みると、既報 (Kondo E, Blood 2004 など) の CMVpp65 由来エピトープによるカバー率は、HLA-A 70.7%, HLA-B 72.4%, HLA-C 41% であり、ハプロタイプ (1 染色体上にある HLA-A, C, B の組み合わせ) でみると、既報エピトープのカバー率は 14.8% となる。これは、各個人 (ハプロタイプ 2 つを持つ) で考えると、すべての HLA クラス I に提示される CMVpp65 ペプチドが分かっている人は計算上 2% にすぎない。欧米人に多い HLA-A\*02:01 拘束性の CMVpp65 由来エピトープは、B\*07:02 拘束性のものを除いて、概ね免疫優性であるため、HLA-A\*02:01 拘束性のエピトープのみを用いて免疫モニタリングをすることが可能であるが、日本人に多い HLA-A\*24:02 拘束性の CMVpp65 由来エピトープは、ほとんどの組み合わせで免疫優勢でないため、HLA-A\*24:02 拘束性のエピトープのみを対象にした方法では、正確な免疫モニタリングは不可能である。

## 2. 研究の目的

CMV 既感染健常人検体を用い、各 HLA の組合せにおける免疫優位 (Immunodominant) 性を解析する。さらに、得られたデータを基に、実際の造血幹細胞移植後患者検体にて、CMV 特異的 CTL のモニタリングを行い、CMV 抗原血症、感染症との関係を分析する。また、これらエピトープおよび免疫優位性のデータを基に CMV 未感染者からの CMV 特異的 CTL の効率樹立法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

「同種造血細胞移植患者のサイトメガロウイルスに対する細胞性免疫モニタリングに関する研究」(当院倫理委員会 2011/11/29 承認済) の同意説明文書にもとづき、CMV 既

感染の HLA 一致ドナーより造血幹細胞移植を行う患者およびそのドナー、または健常人に説明と同意を実施。同意を得た後、血液を採取し、末梢血単核球を分離後、凍結保存した。

CMV 既感染者であり、HLA クラス I 拘束性 CMVpp65 由来エピトープが全て既知であった患者、ドナー、または健常人においては、各ペプチド、overlapping peptides IFN-ELISPOT 法により、CMVpp65 特異的 CTL を解析する。CMV 既感染かつエピトープが未知である HLA が有する患者、ドナー、または健常人においては、CMVpp65 特異的 CTL 株を樹立する。末梢血単核球より CD40 活性化 B (CD40-B) 細胞を樹立し、抗原提示細胞として用いる。この CD40-B 細胞に In vitro transcription 法にて作成した CMVpp65 mRNA を導入または overlapping peptide をパルスし、CD8+T 細胞を繰り返し刺激することによって、CMVpp65 特異的 CTL 樹立する。樹立された CTL 株の HLA 拘束性を、研究代表者らまたは他者によって既に同定されているペプチドを用いて、IFN-ELISPOT 法、Europeum release assay、CD107 mobilization assay 法にて解析する。

## 4. 研究成果

CMV 既感染者であり、HLA クラス I 拘束性 CMVpp65 由来エピトープが全て既知である健常人の末梢血検体を用い、ELISPOT assay の条件を検討した。CMV pp65 由来 15mer (11mer overlap) の peptide mix を添加した場合、PBMC 20 万/well では 1well あたり 191.7 spots みられたのに対し、CD8 陽性 T 細胞 10 万/well、および CD8 陽性 T 細胞 + CD40-B 細胞 10 万/well ずつでは、ほとんどスポットを認めなかった (図 1 左)。15mer (11mer overlap) peptide mix は、PBMC 中に存在する CMVpp65 特異的 CD4 陽性 T 細胞に対する抗原提示には十分であるが、CD8 陽性 T 細胞、および CD8 陽性 T 細胞 + CD40-B 細胞を用いた場合、CMVpp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出は難しいと考えられた。

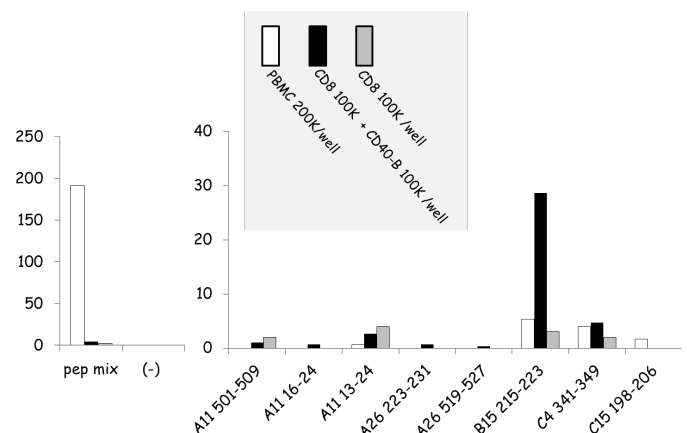


図 1. 未刺激 CD8 陽性 T 細胞を用いた IFN-ELISPOT assay

また、PBMC 20 万/well、CD8 陽性 T 細胞 10 万/well、および CD8 陽性 T 細胞 + CD40-B 細胞 10 万/well ずつに対して、各 HLA クラス I 拘束性の CMVpp65 特異的エピートープペプチド (A\*11:01, ATVQGQNLK[501-509], GPISGHVLK [16-24]; A\*26:01, YVKVYTLSEF[223-231], DIYRIFAEL[519-527], B\*15:01, KMQVIGDQY [215-223], C\*04:01, QYDPVAALF[341-349]; C\*15:02, VVCAHELVC[198-206]) を添加した場合、PBMC 20 万/well、CD8 陽性 T 細胞 10 万/well では十分なスポットが得られず、特異性が識別できなかったが、CD8 陽性 T 細胞に CD40-B 細胞 10 万/well を加えた場合、B\*15:01 拘束性ペプチド KMQVIGDQY において、1well あたり 28.7spots と有意に多くのスポットを認めた。これは、以前に報告したレトロウイルスベクター-CMVpp65 発現 CD40-B 細胞により樹立した CMVpp65 特異的 CTL での特異性と同様 (図 2) であり、エピートープペプチドおよび CD40-B 細胞を抗原提示細胞とすることで、末梢血より分離した未刺激 CD8 陽性 T 細胞でも十分反応を認めることを確認した。

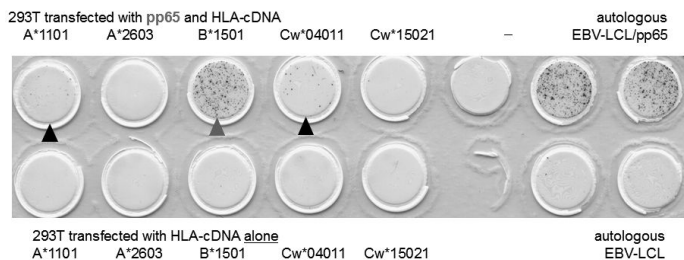


図 2 CMVpp65 特異的 CTL を用いた ELISPOT assay

CMV 既感染の HLA 一致ドナーより造血幹細胞移植を行う患者およびそのドナー、5 組より文書による同意が得た後、患者は移植前 (CMV 既感染者のみ)、day30 前後、day60 前後、day90 前後、day180 前後に、ドナーは造血幹細胞採取前または 1 ヶ月健診時に採血を行った。表 3 に 5 組の HLA 型を示して、うち CMVpp65 のエピートープ (表 4 参照) が未知であるものを灰色としている。

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-D	HLA-E	HLA-F
1	26:01	31:01	35:01	40:02	03:03	03:04
2	26:01	31:01	13:01	51:01	03:04	03:04
3	26:03	31:01	40:01	54:01	01:02	03:04
4	26:03	31:01	35:01	55:02	01:02	03:03
5	24:02	26:02	52:01	-	12:02	-

表 3 HLA 一致ドナーより造血幹細胞移植を行う患者の HLA クラス I アリル型

現在、CMVpp65 由来 8-11mer peptide library (1aa overlapped) を作成し、未知エピートープの同定を続けており、同定したペプチドを含め IFN ELISPOT assay を行う予定である。

表 4 . 日本人における HLA アリル頻度と CMVpp65 特異的既知エピートープ

A	Allele Frequency	rank	epitope from CMVpp65	aa	position
*24:02	38.09%	1	QYDPVAALF	9	341-349
*02:01	11.64%	2	NLVPMVATV	9	456-503
*02:06	9.29%	3			
*11:01	8.98%	4	ATVQGQNLK GPISGHVLK	9	501-509 16-24
*31:01	8.88%	5			
*28:01	7.65%	6	A28: YVKVYTLSEF A28: DIYRIFAEL	9	223-231 519-527
*33:03	6.97%	7	SVNWHNFTGR	10	91-100
*02:07	3.49%	8	RIFAELGV	9	522-530
*28:03	2.27%	9	A26		
*28:02	1.88%	10	A26		
B	Allele Frequency	rank	epitope from CMVpp65	aa	position
*52:01	11.30%	1	QMWQARLTV	9	155-163
*51:01	9.30%	2	DALPGPCI	8	545-552
*35:01	8.11%	3	IPSINVHYY	9	123-131
*40:02	8.04%	4	HERNGFTVL	9	267-275
*15:01	7.76%	5	KMQVIGDQY	9	215-223
*54:01	7.55%	6			
*44:03	6.23%	7	SEHP TITSQY	10	364-373
*07:02	5.67%	8	RPHERNGFTV	10	265-274
			TPRV TGGGAM	10	417-426
*40:01	5.35%	9	CEVPSGKL	9	232-240
			HERNGFTVL	9	267-275
*46:01	4.87%	10			
*40:06	4.54%	11	AELEGVWQPA	10	525-534
*39:01	3.43%	12			
*48:01	2.82%	13			
*55:02	2.47%	14			
*59:01	1.91%	15			
*15:18	1.44%	16			
*13:01	1.22%	17			
*67:01	1.15%	18			
C	Allele Frequency	rank	epitope from CMVpp65	aa	position
*01:02	17.88%	1	ROPEMISVL	9	7-15
*03:03	12.70%	2			
*03:04	12.70%	2			
*07:02	12.03%	4			
*12:02	11.51%	5	VAFTSHEHF	9	294-302
*08:01	7.25%	6	VVCAHELVC	9	198-206
*14:02	7.15%	7			
*14:03	6.22%	8			
*04:01	4.40%	9	QYDPVAALF	9	341-349
*15:02	3.21%	10	VVCAHELVC	9	198-206
*08:03	1.52%	11			

## 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 1 件)

近藤英生, 木浦勝行: 抗 PD-1 抗体. 呼吸 32(12): 1141-1147, 2013. (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

1. 吉田 将平、近藤 英生、浅野 豪、廻 勇輔、吉岡 尚徳、西之原 正昭、藤原 英晃、岡本 幸代、浅田 騰、西森 久和、藤井 敬子、松岡 賢市、藤井 伸治、前田 嘉信、品川 克至、谷本 光音: 同種移植後のサイトメガロウイルス抗原血症が急性骨髄性白血病の再発に及ぼす影響. 第 34 回日本造血細胞移植学会(2012/2/24-25、大阪)

2. 近藤英生, 葛島清隆, 市村浩一, 前田嘉信, 藤井伸治, 松岡賢市, 品川克至, 長谷川詠子, 黒井大雅, 佐伯恭昌, 浅野豪, 高田尚良, 佐藤康晴, 吉野正, 谷本光音: MTX 中止直後に一過性の白血球増多を認め、その後自然退縮した MTX LPD の一例. 日本リンパ網内系学会 (2013/6/16-6/18, 京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

近藤 英生 (KONDO, Eisei)  
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師  
研究者番号: 30379747

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし