

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 3 月 31 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：22590430

研究課題名（和文） EBウイルス感染モデルマウスにおける自然免疫応答の解析と免疫療法の基礎実験

研究課題名（英文） Analysis of native immune responses to Epstein-Barr virus in the virus-infected humanized mice

研究代表者

藤原 成悦（FUJIWARA SHIGEYOSHI）

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・部長

研究者番号：30173488

研究成果の概要（和文）：免疫不全マウス体内にヒト免疫系を再構築したヒト化マウスに EB ウイルス（EBV）を感染させると、脾臓 NK 細胞からインターフェロン γ が産生されることが示唆された。また、ヒト化マウスに一定量以上の EBV を感染させると大多数がリンパ増殖性疾患により死亡するが、自己臍帯血由来活性化 T 細胞を投与するとマウス体内の EBV DNA 量が低下し生存期間が延長することが分かった。以上より、EBV 感染ヒト化マウスはこのウイルスに対する自然免疫応答を解析するための実験系として、また EBV 関連疾患に対する免疫細胞治療を評価する場として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： Splenic NK cells isolated from EBV-infected humanized mice two days post-infection and cultured for two days produced higher levels of IFN- γ as compared with the same cells isolated from uninfected humanized mice and processed similarly. Activated T-cell preparations were generated from cord blood by culturing with IL-2 and anti-CD3 antibody. When this activated T-cell preparation was administered to EBV-infected humanized mice generated with hematopoietic stem cells isolated from the same cord blood sample, therapeutic effects was evident as decreased EBV DNA levels in mouse organs and prolonged life span.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・ウイルス学

キーワード：感染防御、ワクチン

1. 研究開始当初の背景

NK 細胞とインターフェロンはウイルス感染に対する自然免疫応答の主役として、抗原特異的な獲得免疫応答が誘導される以前の感染直後の時期に防御機構の中心的役割を担う。EBV 感染においても他のヘルペス

ウイルスの場合と同様に、NK 細胞やインターフェロンが重要な役割を果たすことが予想されていたが、ヒトの EBV 感染が通常は不顕性であり、伝染性単核症を発症する場合も数週間の潜伏期を経ているため、感染直後の自然免疫の活動時期が見逃されることか

ら、このウイルス に対する自然免疫応答の解析は全く進んでいなかった。また EBV はほぼヒトにのみ感染するウイルスであるため、適当な感染動物モデルが存在しなかったことも、EBV に対する自然免疫応答の解析を困難にしていた。

NOG マウスなどの免疫不全マウスにヒト造血幹細胞を移植すると、T, B, NK リンパ球、マクロファージ、樹状細胞など免疫系の主要コンポーネントが分化するためヒト化マウスと呼ばれる。申請者らは、このヒト化マウスを用いて新しい EBV 感染モデルを作製し、リンパ増殖性疾患、不顕性持続感染、T 細胞免疫応答、抗体応答などヒト EBV 感染の主要な事象をマウスにおいて再現することに成功した (Yajima et al, J Infect Dis, 2008)。またその後の研究により、ヒト化マウスに誘導される T 細胞応答が、EBV に対する防御機構として機能することも示している (Yajima et al, J Infect Dis, 2009)。本モデルの大きな利点は、腹腔内、静脈内など様々なルートから EBV を接種し、その直後からウイルス学的、免疫学的、病理学的解析を自由に行える点にあり、これまで不可能であった EBV に対する自然免疫の解析には格好の実験系である。また、免疫療法の基礎実験も、コットトツブタマリンや *scid* マウスなど従来の EBV 感染モデル動物では不可能であったが、ヒト化マウスモデルを用いれば容易であると考えられた。

2. 研究の目的

具体的な目的は以下の通りである。①EBV 感染直後のヒト化マウスの末梢血と主要免疫系臓器において、NK 細胞の数、表面マーカー発現、細胞傷害活性や、IFN- α , IFN- β , IFN- γ の濃度を測定し、EBV に対する自然免疫応答の実態を明らかにする。②EBV 感染直後のヒト化マウスの脾臓から分離した単核細胞を短期間培養し、上清への IFN- γ 産生量を測定する。また、特異抗体によりこの単核細胞を分画し IFN- γ 産生細胞を同定する。③臍帯血から IL-2 と抗 CD3 抗体を添加した培養液で活性化増幅させた T 細胞を EBV 関連リンパ増殖性疾患モデルマウスに投与し、その治療効果を検証すること。

3. 研究の方法

1) ヒト化マウスの作成

6~8 週齢の NOD/ Shi-*scid* $l\gamma_c^{null}$ マウス (NOG マウス) を実験動物中央研究所より購入し、SPF の環境で飼育・実験を行った。東京臍帯血バンクより提供された臍帯血より CD34 陽性造血幹細胞を分離し、尾静脈より NOG マウスに移植した。その後フローサイトメトリーによりマウス CD45 及びヒト CD45、CD19、CD3、CD56、CD14 陽性細

胞数を定期的に測定し、ヒト免疫系細胞の再構築を確認した。

2) ヒト化マウスへの EBV 感染

EBV 産生細胞株 B95-8 の培養上清より、デキストラン密度勾配中の超遠心により精製したウイルスを 0.45 μ m フィルターを通過させたのち尾静脈内に接種した。EBV 感染の確認は末梢血中 EBV DNA 量を real-time PCR により測定することにより行った。

3) EBV 感染後の NK 細胞解析

EBV 感染後、1, 2, 5 日目に採血してリンパ球分画の CD16, CD56, CD244, CD3, CD2 発現をフローサイトメトリーにより調べ、NK 細胞数を定量した。

4) EBV 感染後のインターフェロン解析

感染後、1, 2, 5 日目に採血して末梢血中の IFN- α , IFN- β , IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。

5) EBV 感染ヒト化マウスの脾臓における IFN- γ 産生の検討

EBV 感染後 48h のヒト化マウスを安楽死させ、脾臓単核細胞 (5 \times 10⁵ cells/200 μ l/well) を 10%牛胎児血清と 100 U/ml ヒト IL-2 を添加した RPMI1640 培養液により 48 時間培養した。培養上清中の IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。

6) EBV 感染モデルマウスに対する免疫細胞治療の基礎実験

臍帯血 DLI には、対象マウスをヒト化するのに用いたのと同じ臍帯血から autologous な T 細胞を活性化培養して一旦凍結保存した後、DLI 実験の時期に合わせ再度活性化培養して用いた。臍帯血からリンフォセパールを用いた比重遠心法により単核細胞を分離し、RPMI-1640 培養液(10%ヒト血清、IL-2 700 IU 添加)に浮遊させ、抗 CD3 抗体を固相化したフラスコを用い静置培養した。CD4 陽性 T 細胞の分離は、培養 5~7 日目に磁気ビーズを用いて行った。

ヒト化マウスに EBV を接種後 real time-PCR により末梢血中に EBV DNA が出現したことを確認してから、体重 (kg) あたり約 5.0 \times 10⁶ 個の活性化臍帯血 T 細胞を、1 週間隔で 3 回、尾静脈から投与した。27 頭の EBV 感染マウスを 2 群に分け、14 頭には臍帯血活性化 DLI を施行し、13 頭には対照として PBS を同じスケジュールで投与した。これらのマウスの生存曲線を Logrank 法で比較した。

7) 免疫細胞治療後のマウスにおけるリンパ球解析

臍帯血由来活性化 T 細胞を投与した後定期的に (1 週間毎) マウスより採血し、抗ヒト CD19, CD3, CD4, CD8, CD56, HLA-DR 抗体などにより染色し、フローサイトメトリーにより解析した。また、ヒト HLA-A*2402 により提示された 5 種類の EBV ペプチド

(LMP2, BRLF1, BMLF1, EBNA3A, EBNA3B 由来)の混合物により EBV 特異的 CTL を定量した。

4. 研究成果

1) EBV 感染ヒト化マウスのインターフェロン γ 産生

EBV 感染後 1, 2, 5 日目においてマウス末梢血中の CD16 或いは CD56 陽性で CD3 陰性の NK 細胞数を計測したが、EBV 感染マウスと対照マウスの間で明確な差は認められなかった。また、感染後 2 日目にヒト IFN- α および IFN- β の末梢血中濃度を測定したが、やはり明確な差は認められなかった。そこで、感染後 2 日目のマウス脾臓から回収した単核細胞を 48 時間培養し、培養上清中の IFN- γ 濃度を測定した。EBV 感染マウス 5 頭の結果は平均 24.1 pg/ml、範囲 16.0~34.5 pg/ml、標準偏差 6.7、対照マウス 5 頭では、平均 17.1 pg/ml、範囲 7.5~27.0 pg/ml、標準偏差 8.6 であった (図 1)。P>0.5 で有意性には達しなかったが、EBV 感染マウスで高い傾向が認められたため、EBV 感染により脾臓細胞の IFN- γ 産生が誘導される可能性が考えられた。脾臓単核細胞から磁気ビーズ結合抗体により CD56 陽性細胞を除去した場合、ほぼ全てのマウスにおいて IFN- γ 産生は検出感度以下に低下した。一方同じ方法により CD8 陽性細胞を除去した場合には、IFN- γ 産生の低下は認められなかった。従って IFN- γ の少なくとも一部分は NK 細胞により産生されると考えられた。

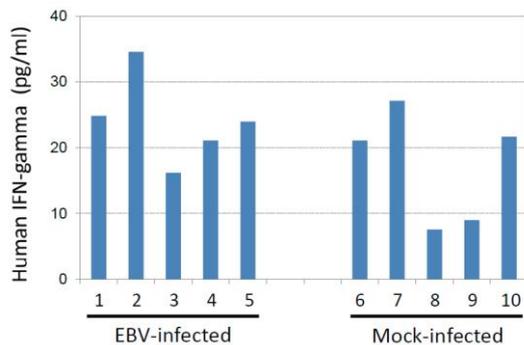


図 1. EBV 感染ヒト化マウスの脾臓単核細胞による IFN- γ 産生. EBV 感染マウス (1-5) 及び対照マウス (6-10) の結果を示す。

2) ヒト化マウスにおける免疫細胞治療の基礎実験

計 35 頭の EBV 感染ヒト化マウスを作成し、14 頭には活性化 T 細胞を分画せずそのまま 3 回投与した (全 T 細胞投与群)。8 頭には活性化 T 細胞から分離した CD4+細胞のみを投与した (CD4+細胞投与群)。残りの 13 頭には対照として PBS を投与した (PBS 投与群)。

PBS 投与群は感染後約 4 ヶ月の間に 62% のマウスが EBV 陽性リンパ増殖性疾患で死亡したのに対し、全 T 細胞投与群では 20% が死亡したのみであった。生存曲線を比較したところ、全 T 細胞投与群と PBS 投与群の間には Logrank 法により有意の差 (P<0.05) が認められた (図 2)。しかし、CD4+細胞投与群と PBS 投与群の間には有意差が認められなかった。これらの結果から、臍帯血由来活性化 T 細胞は EBV 関連リンパ増殖性疾患モデルマウスに対して有効であることが示された。CD4+細胞のみを分離して投与した場合の有効性は認められなかった。一部のマウスでは活性化 T 細胞投与後に HLA-DR+ の活性化 CD8+ T 細胞が増加していた。

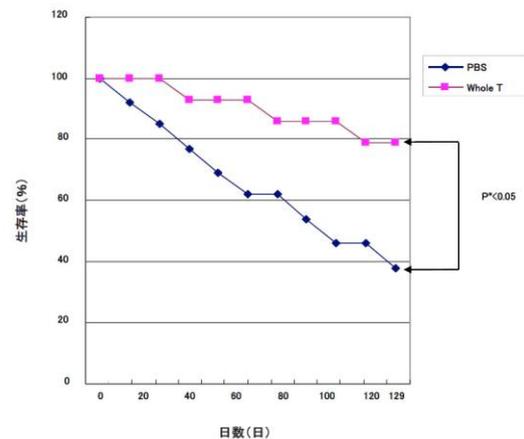


図 2. EBV 関連リンパ増殖性疾患モデルマウスに対する臍帯血活性化 T 細胞輸注の延命効果. 活性化 T 細胞投与群 (赤四角, N=14) と PBS 投与群 (青菱形, N=13) の間には Logrank 法により有意の差 (P<0.05) の差が認められた。

3) 活性化 T 細胞投与による EBV 特異的 T 細胞数の変化

臍帯血 DLI を施行したマウス 5 頭の脾臓あるいは肝臓から分離した CD8+ T 細胞の EBV テトラマー陽性率は平均 0.0212%、標準偏差 0.0194% であった。一方対照として PBS を投与したマウス 3 頭では平均 0.00754%、標準偏差 0.00526% であった。統計学的有意差には達しなかったが、臍帯血 DLI を施行したマウスにおいてテトラマー陽性率が高い傾向が認められた。従って、臍帯血由来活性化 T 細胞の投与により EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞が増加し、これが延命効果をもたらした可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Humanized mouse models of

- Epstein-Barr virus infection and associated diseases. *pathogens* 2: 153-176, 2013.
- ② 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. *Pediatr Transplant*. 2012 Nov;16(7):748-57.
- ③ 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*, ;96(5):669-73, 2012.
- ④ Iijima K, Yamada H, Miharuru 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*. 42(12):3405-15, 2012.
- ⑤ Arai A, Imadome K, Wang L, Nan W, Kurosu T, Wake A, Ohta Y, Harigai M, Fujiwara S, and Miura O. Recurrence of chronic active Epstein-Barr virus infection from donor cells after achieving complete response through allogeneic bone marrow transplantation. *Intern Med* 51: 777-782, 2012.
- ⑥ Yang X, Wada T, Imadome K, 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 type 2. *Herpesviridae* 2012, 3:1
- 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, and Fujiwara S. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLoS Pathogens*, 7(10): e1002326, 2011.
- ⑧ Kuwana Y, Takei M, Yajima M, Imadome K, Inomata H, Shiozaki M, Ikumi N, Nozaki T, Shiraiwa H, Kitamura N, Takeuchi J, Sawada S, Yamamoto N, Shimizu N, Ito M, and Fujiwara S. Epstein-Barr Virus Induces Erosive Arthritis in Humanized Mice. *PLoS ONE*, 6(10): e26630, 2011.
- ⑨ Iwata S, Yano S, Ito Y, Ushijima Y, Gotoh K, Kawada J, Fujiwara S, Sugimoto K, Isoe Y, Nishiyama Y, Kimura H. Bortezomib Induces Apoptosis in T Lymphoma Cells and Natural Killer Lymphoma Cells Independent of Epstein-Barr Virus Infection. *Int J Cancer* 129: 2263-2273, 2011.
- ⑩ Arai A, Imadome K, Watanabe Y, Takahashi M, 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* 93(5):602-9, 2011.
- ⑪ Arai A, Imadome K, Fujiwara S, and Miura O. Autoimmune hemolytic anemia accompanied by reactivation of an Epstein-Barr virus infection with suppressed CTL response to EBV-infected cells in an elderly man. *Inter Med* 49: 325-329, 2010.
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 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学術集会、2012 年 11 月 15 日、大阪。
- ② 仁多美奈子、山本正英、今留謙一、藤原成悦、三浦修、新井文子。Chronic active Epstein-Barr virus infection 成人例に対する骨髄非破壊的前処置を用いた造血幹細胞移植成績。第 34 回日本造血細胞移植学会総会 2012 年 2 月 24-25 日 大阪。
- ③ Ayako Arai, Ken-Ichi Imadome, Ludan Wang, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Ayako Nogami, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura. Inflammatory cytokines can be molecular targets for treatment of CAEBV. 第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都。
- ④ Ludan Wang, Ken-Ichi Imadome, Honami Komatsu, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. EBV infection enhances T-cell adhesion and survival contributing to EBV-T-LPD development。第 74 回日本血液学会総会、2012 年 10 月 18-20 日、京都。
- ⑤ 松田剛、今留謙一、矢島美彩子、落合央、

望月雅司、川野布由子、山田千尋、今井由美、濱崎霞、浅田恵理子、原口摩耶、千葉祐規乃、清水則夫、駒野淳、山本直樹、藤原成悦。ヒト化マウスを用いたEBウイルス関連リンパ増殖性疾患に対する免疫細胞治療のモデル実験。第60回日本ウイルス学会学術集会、2012年11月14日、大阪。

⑥仁多美奈子、新井文子、今留謙一、吉森真由美、王路丹、小山高敏、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修。EBV infection to T or NK cells activates NF- κ B leading to lymphoproliferative diseases development. 日本血液学会学術集会、2011年9月。

⑦新井文子、斉藤愛記、山岡昇司、藤原成悦、三浦修。EBウイルスはTあるいはNK細胞に感染後NF- κ B活性化を介して腫瘍発症に寄与する。第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3-5日、名古屋。chemoresistance。2010年9月、日本血液学会総会。

⑧今留謙一、矢島美彩子、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。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。第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月9日、徳島。

⑨Mayumi Takahashi, Ken-Ichi Imadome, Morito Kurata, Takatoshi Koyama, Shigeyoshi Fujiwara, Osamu Miura, Ayako Arai. P-glycoprotein expression is enhanced in EBV-infected T or NK cells in CAEBV and may cause its chemoresistance. 2010年9月、日本血液学会総会。

〔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

藤原成悦 (FUJIWARA SHIGEYOSHI)

国立成育医療研究センター・母児感染研究部・部長

研究者番号：30173488

(2) 研究分担者

今留謙一 (IMADOME KEN-ICHI)

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

(3) 連携研究者

なし