

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591572

研究課題名(和文) ヒト化動物モデルを用いた難治性EBウイルス感染症の免疫治療に関する研究

研究課題名(英文) Study on immunotherapy of the intractable EB virus infectious disease using the humanized animal model

研究代表者

田内 久道 (Tauchi, Hisamichi)

愛媛大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：30314959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：Chediak-Higashi症候群と診断された患者さんと、血球貪食症候群(HLH)を合併した患者と合併していない患者の血液検体を得た。血球貪食症候群を合併したPatient1は合併していないPatient2と比較してより、CTLの細胞傷害活性の機能が損なわれていることが判明した。末梢血リンパ球にEBウイルスを感染導入する事によって、Bリンパ球系細胞(LCL)を樹立した。この細胞を使用し、免疫不全患者のCTL機能解析を行うことによって、血球貪食症候群の発症メカニズムの理解と造血幹細胞移植の適応の判断に大きく役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Among the Japanese children with Chediak-Higashi syndrome who have or dont have hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) registered at our laboratory. We analyzed the cytotoxicity and degranulation activity of CTLs. In Chediak-Higashi syndrome who have hemophagocytic lymphohistiocytosis In HLH positive patient with CTL-mediated cytotoxicity was low or deficient, and degranulation activity was also low. Chediak-Higashi syndrome who have hemophagocytic lymphohistiocytosis can be diagnosed and classified on the basis of CTL-mediated cytotoxicity, degranulation activity, and genetic analysis. Based on the data obtained from functional analysis of CTLs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：細胞傷害活性 T細胞クローン EBウイルス

1. 研究開始当初の背景

EB ウイルス関連血球貪食症候群 (EBV-HLH)は EBV が感染した T/NK 細胞がクローン性に増殖しサイトカインを過剰に産生し血球貪食などの病態を引き起こす。疾患の重症度に合わせて、ステロイドや免疫抑制剤、抗がん剤などが治療法として選択されるが、その治療成績は満足できるレベルまでには至っておらず、治療の長期的な合併症も問題になっており新たな概念に基づく治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

B ウイルス関連血球貪食症候群 (EBV-HLH) と慢性活動性 EB ウイルス感染症 (CAEBV) においてクローン増殖している EB 感染 NK/T 細胞では LMP2A 蛋白が発現している。本研究ではこの LMP2A 特異的な T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子を細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に導入し、EBV-HLH、CAEBV に対する遺伝子免疫療法を確立する。

3. 研究の方法

LMP2A のアミノ酸配列より HLA-A24 拘束性に抗ウイルス性 CTL の誘導することのできる 9-mer ペプチドエピトープを同定し、LMP2A 特異的 TCR 遺伝子導入 CTL の in vitro 抗ウイルス効果を検討する。

4. 研究成果

日本人に認められる HLA の型を保有しない健常者をドナーとして、末梢血から単核球を分離した。その単核球に EB ウイルスを感染させて B リンパ球系の細胞株を樹立した。(KI-LCL) また、日本人に普遍的に保持される HLA ハプロタイプを持つ健常者からも末梢血単核球を提供して頂き、同様に B リンパ球系の細胞株を樹立した。(TA-LCL) 先天性白皮症、好中球巨大顆粒を有し Chediak-Higashi 症候群と診断された患者さんと、血球貪食症候群 (HLH) を合併した患者と合併していない患者の血液検体を得た。この EB を感染させた LCL 株を用いて、これらの患者のリンパ球機能解析を行った。

<Pt No 1>

Age/Gender

22-yr-old/Female

Recurring infection

None

HLH development

Yes

Neurological dysfunction

Hypopituitarism, diabetes insipidus

LYST gene mutation

7982C>G (nonsense)

8281A>T(nonsense)

<Pt No 2>

Age/Gender

23-yr-old/Male

Recurring infection

Otitis media

Subcutaneous

HLH development

No

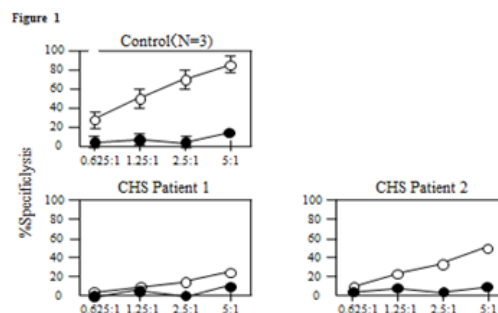
Neurological dysfunction

Parkinson's disease

LYST gene mutation

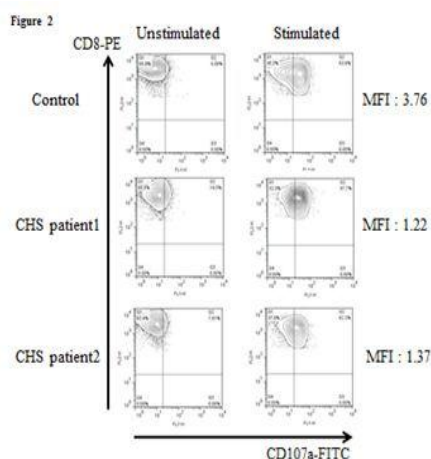
No mutation detected

患者から分離された末梢血単核球を KI-LCL 株と混合して刺激する (リンパ球混合刺激) を行い CD8 陽性 T 細胞を分離する事により、KI-LCL の持つ HLA に特異的に反応する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を樹立した。これらの T 細胞を用いて、樹立された CTL の KI-LCL に対する細胞傷害活性を Cr 放出試験により評価、比較した。



その結果、血球貪食症候群を合併した Patient1 は合併していない Patient2 と比較してより、CTL の細胞傷害活性の機能が損なわれていることが判明した。

また、CTL は T 細胞受容体を介して抗原を認識し、小胞体からの Perforin、Granzyme を放出し標的細胞を障害する。小胞体からの脱顆粒が生じた際に出される CD107a 抗原をフローサイトメトリーで検出し、CTL の脱顆粒機能の評価を行った。



患者 CTL 細胞は正常 Control と比較して脱顆粒機能が低下していることが判明した。このように末梢血リンパ球に EB ウイルスを感染導入することによって、B リンパ球系細胞 (LCL) を樹立した。この細胞を使用し、免疫不全患者の CTL 機能解析を行うことによって、血球貪食症候群の発症メカニズムの理解と造血幹細胞移植の適応の判断に大きく役立つことが期待できる。

## 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 10 件)

① Morimoto A, Shioda Y, Imamura T, Kanegane H, Sato T, Kudo K, Nakagawa S, Nakadate H, Tauchi H, Hama A, Yasui M, Nagatoshi Y, Kinoshita A, Miyaji R, Anan T, Yabe M, Kamizono J. Nationwide survey of bisphosphonate therapy for children with reactivated Langerhans cell histiocytosis in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有、2011,56, 110-115, doi: 10.1002/pbc.22703.

② Morio T, Atsuta Y, Tomizawa D, Nagamura-Inoue T, Kato K, Ariga T, Kawa K, Koike K, Tauchi H, Kajiwara M, Hara T, Kato S. Outcome of unrelated umbilical cord blood transplantation in 88 patients with primary immunodeficiency in Japan. *Br J Haematol*. 査読有, 2011,154, 363-372, doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08735.x.

③ Horiuchi A, Kameoka K, Kuwabara J, Watanabe Y, Kawakami S, Tauchi H, Ishii E. Neonatal iliopectoral abscess. *Pediatr Int*. 査読有, 2012,54, 712-714, doi: 10.1111/j.1442-200X.2012.03593.x.

④ Nishi M1, Eguchi-Ishimae M, Wu Z, Gao W, Iwabuki H, Kawakami S, Tauchi H, Inukai T, Sugita K, Hamasaki Y, Ishii E, Eguchi M. Suppression of the let-7b microRNA pathway by DNA hypermethylation in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL gene rearrangements. *Leukemia*. 査読有、2013,27, 389-397, doi:10.1038/leu.2012.242.

⑤ Kato M1, Matsumoto K, Suzuki R, Yabe H, Inoue M, Kigasawa H, Inagaki J, Koh K, Hashii Y, Tauchi H, Suminoe A, Kikuta A, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Fukuda T. Salvage allogeneic hematopoietic SCT for primary graft failure in children. *Bone Marrow Transplant*. 査読有, 2013,48, 1173-1178, doi:10.1038/bmt.2013.36.

⑥ Watanabe S, Tanaka A, Ono T, Ohta M, Miyamoto H, Tauchi H, Tanaka M, Suemaru K, Araki H. Treatment with linezolid in a neonate with meningitis caused by methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Eur J Pediatr*. 査読有, 2013,172,1419-1421, doi: 10.1007/s00431-013-1978-7.

⑦ Hato N, Tsujimura M, Takagi T, Okada M, Gyo K, Tohyama M, Tauchi H. Infantile inflammatory pseudotumor of the facial nerve as a complication of epidermal nevus syndrome with cholesteatoma. *Auris Nasus Larynx*. 査読有, 2013,40,569-572, doi: 10.1016/j.anl.2012.11.016.

⑧ Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Yagi C, Kawabe M, Moritani K, Niiya T, Tauchi H, Ishii E, Eguchi M. CLTC-ALK fusion as a primary event in congenital blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm. *Genes Chromosomes Cancer*. 査読有, 2014, 53, 78-89, doi: 10.1002/gcc.22119.

⑨ Nagai K, Nakano N, Iwai T, Iwai A, Tauchi H, Ohshima K, Ishii E. Pediatric Subcutaneous Panniculitis-Like T-Cell Lymphoma with Favorable Result by Immunosuppressive Therapy: A Report of Two Cases. *Pediatr Hematol Oncol*. 査読有, 2014, 31. [Epub ahead of print]

- ⑩ Tokuda K, Eguchi-Ishimae M, Iwabuki H, Kawakami S, Tauchi H, Ishii E, Eguchi M. Lineage-dependent skewing of loss of heterozygosity (LOH) of KRAS gene in a case of juvenile myelomonocytic leukemia. Eur J Haematol. 査読有, 2014, 26, doi: 10.1111/ejh.12355. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田内久道、感染対策の基礎、第 24 回ペインクリニック学会専門医講習会(招待講演) 2011 年 7 月 23 日、松山市
- ② 田内久道、河上早苗、石井榮一、高田清式、村上雄一、本間義人、安川正貴. 熱帯熱マラリアを発症したパキスタン人の 3 兄弟例. 第 86 回日本感染症学会. 2012 年 4 月 25 日~26 日、長崎市.
- ③ 金子英雄、内田靖、大西秀典、深尾敏幸、谷内江昭宏、清河信敬、滝田順子、山崎直也、田内久道、近藤直実. 本邦における Bloom 症候群の実態調査. 第 49 回日本アレルギー学会. 2012 年 9 月 15 日~16 日. 大阪府.
- ④ 中野直子、越智史博、永井功造、八角高裕、河上早苗、石前峰斉、江口真理子、田内久道、石井榮一. Munc13-4 ミスセンス変異による学童期発症 FHL3 型の症例. 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会. 2012 年 11 月 30 日~12 月 2 日、横浜市.
- ⑤ 田内久道、河上早苗、石井榮一、村上雄一、高田清式、長谷川均、安川正貴. 造血幹細胞移植後の閉塞性細気管支炎治療中に発症した M. abscessus 肺感染症の小児例. 第 87 回日本感染症学会. 2013 年 6 月 5 日~6 日、横浜.
- ⑥ 武洲英、石前峰斉、八木千裕、徳田桐子、森谷京子、田内久道、江口真理子、石井榮一. MLL-AF4 融合遺伝子を有する急性リンパ性白血病に対する新規治療法についての検討. 第 55 回日本小児血液・がん学会. 2013 年 11 月 29 日~12 月 1 日、福岡市.
- ⑦ 森谷京子、石前峰斉、江口真理子、田内久道、徳田桐子、石井榮一. ウイルス関連血球貪食性リンパ組織球症を繰り返した骨髓異形成症候群の 1 女児例. 第 55 回日本小児血液・がん学会. 2013 年 11 月 29 日~12 月 1 日、福岡市.

[図書] (計 1 件)

田内久道、石井榮一. 【血液症候群(第 2 版)-その他の血液疾患を含めて-】リンパ球の異常リンパ球機能異常と類縁疾患 原発性免疫不全症候群 Wiskott-Aldrich 症候群別冊血液症候群第 2 版 II 293-296, 2013.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田内 久道 (Tauchi, Hisamichi)  
愛媛大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号: 30314959

### (2) 研究分担者

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

江口 真理子 (Egushi, Mariko)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40420781

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: