

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659493

研究課題名(和文) 難治性EBウイルス感染症に対する免疫寛容を利用した細胞療法の確立

研究課題名(英文) Cell therapy against intractable EB virus infection using immunological tolerance

研究代表者

木村 宏 (Kimura, Hiroshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30303621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

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性リンパ組織球症などの難治性EBウイルスは、治療抵抗性で予後不良な疾患である。近年、母子の体内には胎児期に移行した極微量のリンパ球がそれぞれに存在し、母子間免疫寛容が成立していることが明らかとなり、この免疫寛容を利用した細胞療法の可能性が広がってきた。本研究では、難治性EBウイルス感染症患者に対する新規治療法として、母から患者への細胞療法を確立することを目的として基礎的実験を行い、母子間マイクロキメリズムの存在を立証するなどの成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Severe Epstein-Barr virus (EBV) infections, such as chronic active EBV infection and EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis, are refractory to therapies and intractable diseases. Recently, fetal-maternal lymphohematopoietic microchimerism can be detected in blood from healthy individuals, and immunological tolerance exists between mothers and children. In this study, in order to develop novel therapies for severe EBV infections, fundamental studies including the proof of fetomaternal microchimerism have been performed for establishing cell therapy.

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：細胞療法 慢性活動性EBV感染症 母子間マイクロキメリズム 免疫寛容

## 1. 研究開始当初の背景

慢性活動性 EB ウイルス感染症や血球貪食性リンパ組織球症などの難治性 EB ウイルス感染症は治療抵抗性で予後不良な疾患である。本症に対して、化学療法や造血幹細胞移植が行われているが、治療関連死亡が多いなど安全性の点で問題が多い。米国を中心に EB ウイルス特異的細胞障害性 T 近年細胞を用いた治療が行われたが (Savoldo B, Blood 2002) 実用化には至っていない。

近年、母子の体内には胎児期に移行した極微量のリンパ球がそれぞれに存在することが明らかとなってきた。この母子間マイクロキメリズムが存在する場合、お互いのリンパ球に対する免疫寛容が成立しているため、HLA が不一致でも拒絶や移植片対宿主病 (GVHD) が起こりにくく、移植ドナーとしてより適合性が高いとされている (Ichinohe T, Curr Opin Immunol 2005)。昨年、中国のグループから、この母子間免疫寛容を利用して、慢性活動性 EB ウイルス感染症患者に母からリンパ球を大量輸注したところ、血液中の EB ウイルス量が減少したという報告がなされた (Wang Q, Blood 2010)。しかし、彼らの報告は少数例を対象とし、安全性・有効性の検証はおろか、そのメカニズムについての科学的な解析はなされていない。

我々はこれまでに、難治性 EB ウイルス感染症は EB ウイルスが感染した T 細胞もしくは NK 細胞がモノクローナルに増殖した T/NK リンパ増殖性疾患であること (Kimura H, Blood, 2001)、感染 T/NK 細胞はごく一部のウイルス抗原しか発現していないため免疫回避しやすい上 (Iwata S, J Gen Virol, 2010)、患者ではウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞機能が損なわれていることを、明らかにしてきた (Kimura H, Med Microbiol Immunol 1994; Sugaya N, J Infect Dis 2004)。また、慢性活動性 EB ウイルス感染症患者に対して、我が国で初めてウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞を用いた細胞療法を実施した (Kuzushima K, Clin Exp Immunol 1996)。

母子間免疫寛容を利用した造血幹細胞移植は、広く行われているが、前処置を施さない細胞療法は前述のグループ以外からの報告はほとんどない。細胞療法は、安全性の点で移植に優り、簡便性の点でウイルス特異的 T 細胞を用いた細胞療法に優っている。これらの実証を踏まえて、新規細胞療法が確立されれば、学術的にも革新的な進歩が得られるのみならず、難治性疾患の克服と言う点でも極めて意義深い。

## 2. 研究の目的

本研究では、難治性 EB ウイルス感染症患者に対する新規治療法として、母から患者へ

の大量リンパ球輸注による細胞療法を確立することを最終目標として、まず基礎的実験として以下を行った。難治性 EB ウイルス感染症患者で母子間免疫寛容が成立していることを検証するために、母子間マイクロキメリズムが存在することを証明した。母のリンパ球が患者の EB ウイルス感染リンパ球を排除するメカニズムを明らかにするために、免疫不全マウスを用いた *ex vivo* モデル構築した。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠中、胎盤を通して母子間では血液の交流があり、出産後も児の体内には母のリンパ球が存在し、同様に母の体内にも児のリンパ球が存在すると言われている。我々は、難治性 EB ウイルス感染症患者とその母の末梢血中から、定量的 PCR 法を用いて極微量の母子間マイクロキメリズムの検出を試みた。予備実験として、ヒト細胞株、健康人血液細胞を用い検討した。

(2) NOD/Shi-scid IL2r<sup>gnull</sup> (NOG マウス) は、NOD-scid マウスに遺伝子改変マウスである IL2R $\gamma$  KO マウスを戻し交配することで、NOD-scid マウスに IL2R $\gamma$  KO 遺伝子を導入した新しい免疫不全マウスであり、このマウスはヒト組織および血液細胞を受容するため、腫瘍性疾患の再構築・治療モデルとして適している。名古屋大学医学部附属病院小児科に通院していた慢性活動性 EB ウイルス感染症患者リンパ球  $2 \times 10^6$  個を、NOG マウスに経静脈的投与し、経時的に観察した。

なお、本研究の実施にあたっては、本人および保護者に十分な説明を施し、文書により同意を得た。患者末梢血と免疫不全マウスを用いた *ex vivo* 解析は、名古屋大学医学部倫理委員会にて承認を得た。

## 4. 研究成果

(1) 難治性 EBV 感染症患者および母における母子間マイクロキメリズムの証明。

当初、4-6 個の塩基の欠失もしくは挿入などの多型が認められる遺伝子をターゲットにし、定量的 PCR 法を行ったが極微量の細胞を検出することはできなかった。次に対象遺伝子を (Sex-determining region Y) SRY 遺伝子および HLA-DR に変更したところ、2 種類の細胞株を異なる濃度で混ぜ合わせた再現実験により、極微量の混入細胞を検出する系を確立できた。

次いで、名古屋大学医学部附属病院小児科に通院していた慢性活動性 EB ウイルス感染症患者とその母の血液に対してこの系を応用したところ、5 組中 2 組に母子間マイクロキメリズムを証明することができた (図 1 および図 2)。

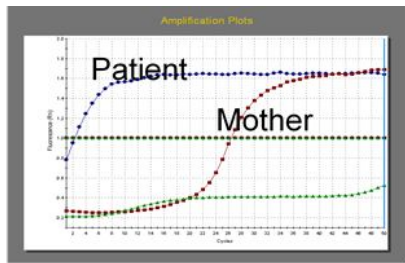


図 1 SRY gene in Mother's DNA

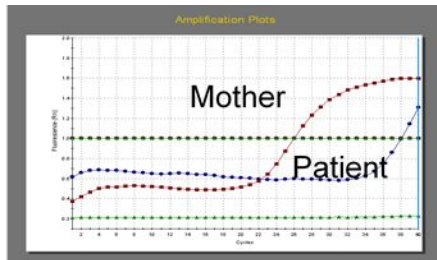


図 2 HLA\_DR\*11 in Patient's DNA

妊娠中、胎盤を通して母子間では血液の交流があり、出産後も児の体内には母のリンパ球が存在し、同様に母の体内にも児のリンパ球が存在する。母子間マイクロキメリズムが存在する母子では、HLA が不一致であっても、互いに対して免疫寛容が成り立っている。この理論に基づいて、母子間マイクロキメリズムの存在する母子では、母からの造血幹細胞移植を行った際に GVHD の頻度が少ないことが明らかにされ、移植ドナーの選定の基準となりつつある。しかし、この母子間免疫寛容を、移植以外の細胞療法に応用した研究はほとんどない。通常、HLA の異なる他人から大量のリンパ球を輸注すると、高率に GVHD が生じ、またリンパ球は排除される。本研究の最終的な目的は母子間免疫寛容を応用して、移植前処置を施すことなく、母のリンパ球大量輸注による細胞療法を確立することにあるため、実現化されれば難治性 EBV 感染症患者治療における大きな進歩であり、患者にとって極めて有意義である。

## (2) マウスを用いた ex vivo モデルによる細胞療法の有効性検証

次に、患者リンパ球を免疫不全マウスに慢性活動性 EB ウイルス感染症様症状を再現する ex vivo モデルを確立した。

慢性活動性 EB ウイルス感染症患者リンパ球を、NOG マウスに経静脈的投与したところ、数週で難治性 EB ウイルス感染症が再現され、リンパ節腫脹、肝脾腫が出現した。尾静脈から血液を採取し、血液中のウイルス DNA 定量/EB ウイルス感染細胞数をモニタリングし、患者細胞の生着を確認した。

母子間免疫寛容を利用した細胞療法の報告はわずかながらあるが、効果と安全性を科学的に立証した研究は未だない。免疫不全マウスである NOG マウスは、ヒト細胞を受容できるため、様々なヒト腫瘍性疾患のモデルと

なっている。近年、患者末梢血を NOG マウスに接種することにより、マウスに慢性活動性 EB ウイルス感染症などの難治性 EB ウイルス感染症を再構築できることが報告された（今留ら、日本ウイルス学会 2010 年）。この免疫不全マウスに患者末梢血を接種し、難治性 EB ウイルス感染症を発症させた後に、母のリンパ球をマウスに輸注する ex vivo モデル系を作成・応用することで、細胞療法の効果と安全性を科学的に検証できる。将来的には、これらの in vitro および ex vivo モデルで有効性・安全性を確認した母子間に対して、母のリンパ球を患者に大量輸注し、その効果と安全性をヒトにおいても検証することが目標である。

以上、難治性 EB ウイルス感染症患者で、母子間マイクロキメリズムの存在を立証し、免疫不全マウスを用いた ex vivo モデル系を確立した。これらの結果は、慢性活動性 EB ウイルス感染症患者に対する母から患者へのリンパ球輸注による細胞療法の実現性に向けて基盤となる重要な知見と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

- 1) Kimura H, Karube K, Ito Y, Hirano K, Suzuki M, Iwata S, Seto M. Rare occurrence of JAK3 mutations in NK cell neoplasms in Japan. *Leukemia & Lymphoma* 査読有 55:962-3, 2014 doi: 10.3109/10428194.2013.819577.
- 2) Fujiwara S, Kimura H, Imadome KI, Arai A, Kodama E, Morio T, Shimizu N, Wakiguchi H. Current Studies on Chronic Active Epstein-Barr virus Infection in Japan. *Pediatr Int* 査読無 56, 159-166, 2014 doi: 10.1111/ped.12314.
- 3) Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J, Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus -associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 査読有 60: 326-328, 2013 doi: 10.1002/pbc.24319.
- 4) Isobe Y, Hamano Y, Ito Y, Kimura H, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol* 査読有 56:150-2, 2013
- 5) Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 査読有 57:139-44, 2013 doi: 10.1111/1348-0421.12010.
- 6) Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K,

- Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma viral MicroRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 査読有208: 771-9, 2013 doi: 10.1093/infdis/jit222.
- 7) Murata T, Iwata S, Siddiquey NA, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat shock protein 90 inhibitors repress latent membrane protein 1 (LMP1) expression and proliferation of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lymphoma. *PLoS One* 査読有8:e63566, 2013 doi: 10.1371/journal.pone.0063566.
- 8) Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. *Hum Pathol* 査読有 44: 2849-52, 2013 doi: 10.1016/j.humpath.2013.05.025.
- 9) Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. *Nagoya J Med Sci* 査読無75: 169-79, 2013  
[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya\\_j\\_med\\_sci/7534/02\\_Kimura.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medlib/nagoya_j_med_sci/7534/02_Kimura.pdf)
- 10) Iwata S, Saito T, Ito Y, Kamakura M, Gotoh K, Kawada J, Nishiyama Y, Kimura H. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 査読有 103:375-8, 2012 doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02127.x
- 11) Kimura H, Ito Y, Kawabe S, Gotoh K, Takahashi Y, Kojima S, Naoe T, Esaki S, Kikuta A, Sawada A, Kawa K, Ohshima K, Nakamura S. Epstein-Barr virus (EBV)-associated T/NK lymphoproliferative diseases in non-immunocompromised hosts: prospective analysis of 108 cases. *Blood* 査読有119:673-86, 2012 doi: 10.1182/blood-2011-10-381921.
- 12) Hirai Y, Yamamoto T, Kimura H, Ito Y, Tsuji K, Miyake T, Morizane S, Suzuki D, Fujii K, Iwatsuki K. Hydroa vacciniforme is associated with increased numbers of Epstein-Barr virus-infected  $\gamma\delta$  T-cells. *J Invest Dermatol* 査読有132:1401-8, 2012 doi: 10.1038/jid.2011.461.
- 13) Isobe Y, Aritaka N, Setoguchi Y, Ito Y, Kimura H, Hamano Y, Sugimoto K, Komatsu N. T/NK-cell type chronic active Epstein-Barr virus (EBV) disease in adults: an underlying condition for EBV-associated T/NK-cell lymphoma. *J Clin Pathol* 査読有 65: 278-82, 2012 doi: 10.1136/jclinpath-2011-200523.
- 14) Kawabe S, Ito Y, Gotoh K, Kojima S, Matsumoto K, Kinoshita T, Iwata S, Nishiyama Y, Kimura H. Application of flow cytometric *in situ* hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/NK lymphoproliferative diseases. *Cancer Sci* 査読有103: 1481-8, 2012 doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02305.x.
- 15) Ko Y-H, Kim H-J, Oh Y-H, Park G, Lee S-S, Huh J, Kim C-W, Kim I, Ng S-B, Tan S-Y, Chuang S-S, Nakamura N, Yoshino T, Nakamura S, Kimura H, Ohshima K. EBV-associated T and NK cell lymphoproliferative disorders: Consensus report of the 4th Asian Hematopathology Workshop. *J Hematopathol* 査読有 5:319-324, 2012  
<http://link.springer.com/article/10.1007/s12308-012-0169-1/fulltext.html>

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) Kawano Y, Iwata S, Kawada JI, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Circulating Viral MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Disease Status in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA, July 22, 2013
- 2) Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, and Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA, July 22, 2013
- 3) 木村 宏. EBV 感染症の病態と診断. EB ウイルス感染症研究会 レクチャー. ベルサール八重洲、東京都中央区. 2013 年 3 月 16 日
- 4) 木村 宏. 難治性 EB ウイルス感染症 ~ EBV-HLH と CAEBV の病態から治療まで ~: CAEBV ~ アジア型と欧米型 ~. 第 44 回日本小児感染症学会学術集会 ワークショップ. 西日本総合展示場/北九州国際会議場、北九州市. 2012 年 11 月 24 日
- 5) 木村 宏. EBV と血液・腫瘍性疾患. 第 74 回日本血液学会学術集会 教育講演. 国立京都国際会館、京都市. 2012 年 10 月 21 日
- 6) 木村 宏. CAEBV 診療の問題点: 今、求められている研究とは? 第 3 回 CAEBV 患者交流会. 京都祇園ホテル、京都市. 2012 年 10 月 20 日
- 7) 木村 宏. ウイルス学の基礎よりみた臓器移植後の感染症. 第 48 回日本移植学会総会、教育セミナー. 愛知県産業労

働センター、名古屋市。2012年9月22日

- 8) Kimura H. Chronic active Epstein-Barr virus infection and related diseases in Japan. Asian Hematopathology Symposium, Soul, Korea, Jan 29, 2012

〔産業財産権〕

取得状況（計 1 件）

名称：ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット

発明者：木村 宏、西山幸廣

権利者：国立大学法人名古屋大学

種類：特許

番号：第 5429679 号

取得年月日：2013年12月13日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 宏 (KIMURA Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：30303621

(2) 研究分担者

五島 典 (Goshima Fumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70201499

鎌倉 真紀 (KAMAKURA Maki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE 特任助教

研究者番号：80437003

伊藤 嘉規 (ITO Yoshinori)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20373491