

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670198

研究課題名(和文) ヒト化マウスをもちいたウイルス特異的原発性免疫不全症の疾患モデル

研究課題名(英文) Reproduction of virus-specific immunodeficiency in 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・その他部局等・その他

研究者番号：30173488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス(EBV)に対して免疫応答の異常を示す原発性免疫不全症をヒト化マウスで再現することを試みた。1名のXIAP欠損症患者から分離した造血幹細胞を4頭のNOGマウスに移植したところ、3頭のマウスでヒト細胞が生着した(ヒトCD45陽性率、0.3-20.4%)。うち2頭にEBVを感染させたところ、末梢血にEBV DNAが検出され(最高 8×10^3 copies/ μ g DNA)、末梢血CD8+ T細胞の割合が急激に増加したため、感染が成立したと考えられた。XIAP欠損症患者のEBV感染に特徴的な高サイトカイン血症がこれらのマウスで再現されているかどうか、現在詳細を解析中である。

研究成果の概要(英文)：To reproduce EBV-related immunodeficiency in humanized mice, hematopoietic stem cells were isolated from a patient with XIAP deficiency and transplanted to four NOG mice. Three of the four mice showed signs of reconstitution with human immune system components; 0.3-20.4% of PBMC was positive with human-specific anti-CD45 antibody. Two of the three mice were inoculated with EBV and EBV DNA (up to 8×10^3 copies/ μ g DNA) was detected in the peripheral blood 6-10 weeks post inoculation. The percentage of CD8+ T cells among peripheral blood lymphocytes increased drastically to ~80% in these mice. These results indicated that humanized mice could be prepared with stem cells isolated from a patient with XIAP deficiency, and EBV can infect these mice and induce CD8+ T cell responses. Peripheral blood levels of human cytokines are currently evaluated to see if hypercytokinemia, characteristic to EBV infection in patients with XIAP deficiency, is reproduced in these mice.

研究分野：ウイルス学

キーワード：EBウイルス ヒト化マウス XIAP欠損症 免疫不全症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

単一遺伝子の異常による原発性免疫不全症の動物モデルは従来ノックアウトマウスをもちいて作成されてきた。しかしマウスとヒトでは免疫関連遺伝子の機能が完全には一致しないため、ノックアウトマウスでは病態が正しく再現されない疾患も多い。また、マウスに感染しない微生物に対して免疫応答の異常を呈する疾患の場合、ノックアウトマウスでその感染病態を再現することは不可能である。申請者らは、免疫不全マウスに健常者臍帯血由来の造血幹細胞を移植しヒト免疫系を再構築したマウス(ヒト化マウス)にEBVを感染させると、このウイルスに特異的なヒトT細胞の免疫応答が誘導され生体防御機構として機能すること、感染ウイルス量が多く免疫応答が追いつかない場合はリンパ増殖性疾患などのEBV関連疾患を発症することを示してきた(Yajima et al, J Infect Dis 198: 673, 2008; Yajima et al, J Infect Dis 200: 1611, 2009)。その過程で、原発性免疫不全症患者の造血幹細胞をもちいてヒト化マウスを作成すれば、当該疾患に特徴的な免疫不全状態をマウスで再現できるのではないかと、またそのようなマウスに、EBVのようにヒトのみを宿主とし免疫系細胞を標的とするウイルスを感染させ、それに対する免疫応答の異常を再現できるのではないかという着想を得た。対象疾患として選んだX連鎖リンパ増殖症(XLP)はDuncan病ともよばれ、1975年米国のPurtiloらにより報告された。EBV以外の病原性微生物に対しては明らかな異常を示さないが、EBV初感染により劇症伝染性単核症や血球貪食性リンパ組織球症を発症し致命的転帰をとることが多く、根治には造血幹細胞移植を必要とする。1998年に原因遺伝子としてSAP(SH2D1A)が同定され、その遺伝子産物はT、NK、及びNKT細胞に発現され、リンパ球表面に発現されるSLAM(signaling lymphocyte activation molecule)蛋白質からのシグナルを細胞内部に伝えるアダプター分子として機能することが知られている。SAP蛋白質は、T及びNK細胞による標的細胞の認識や傷害作用に関与する。しかし冒頭に述べた理由から、EBVに対するこの疾患特有の免疫異常をノックアウトマウスで解析することは不可能であった。もう一つの対象疾患であるXIAP欠損症は、X染色体上のXIAP(X-linked inhibitor of apoptosis)遺伝子の機能異常により、EBV感染後の免疫応答に異常を来し、血球貪食性リンパ組織球症や腸炎を発症する疾患である。

2. 研究の目的

本研究は、EBVに対するXLPおよびXIAP欠損症特有の免疫応答異常をヒト化マウスで再現し、疾患モデルとしての有用性を検討することを目的とした。具体的には、XLPおよびXIAP欠損症患者由来造血幹細胞によ

り作製したヒト化マウスに、T、NK細胞の機能異常やNKT細胞の欠損などこれらの疾患特有の免疫異常が存在するかどうかを検討する。また、これらのマウスにEBVを感染させたときに劇症伝染性単核症や血球貪食性リンパ組織球症など、XLPやXIAP欠損症に特徴的な病態が出現するかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 患者骨髄細胞の採取

富山大学病院或いは関連施設でXLP患者およびXIAP欠損症患者から骨髄液を採取し、成育医療研究センター研究所において、造血幹細胞を分離し下記のNOGマウスに移植した。

2) ヒト化マウスの作製

6~8週齢のNOD/Shi-scid/c^{null}マウス(NO_G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。患者骨髄細胞より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。対照として、東京臍帯血バンクより提供された健常者臍帯血より分離したCD34陽性造血幹細胞を用いてヒト化マウスを作製した。

3) 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0.45µm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EBVDNA量をreal-timePCRにより測定することにより行った。

3) EBV感染ヒト化マウスの解析

末梢血のEBVDNA量をリアルタイムPCR法により、ヒトリンパ球フェノタイプをフローサイトメトリーにより、ヒトサイトカイン産生をアレイにより測定した。

4) 倫理面への配慮

骨髄細胞の採取については、文書による研究内容の説明を行った後文書による承諾を得た。骨髄細胞の採取は、診療に必要な部分を余分に採取した。研究試料は連結可能匿名化され、個人情報 は 厳重に管理された。本研究は、国立成育医療研究センター倫理審査委員会の承認を受けている(受付番号586)。動物実験については、動物実験指針を遵守し、動物愛護の観点から十分な配慮をした。本研究は国立成育医療研究センター実験動物委員会の承認を得ている(承認番号A2011-004)。

4. 研究成果

1) 免疫不全症患者骨髄細胞の採取

これまでに、2名のXIAP欠損症患者と1名のXLP患者から骨髄細胞を採取しNOGマウスに移植した。

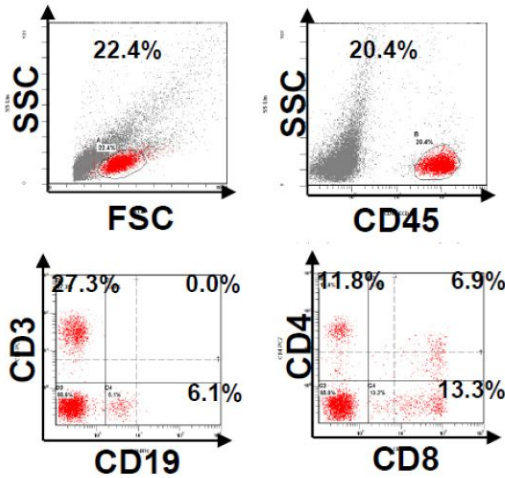


図 1 . XIAP 欠損症由来ヒト化マウスにおけるヒトリンパ球の分化 . 末梢血単核細胞の 20.4% がヒト CD45 陽性であり、CD19 陽性 B 細胞、CD4 陽性および CD8 陽性の T 細胞が認められた。

2) 免疫不全症由来ヒト化マウスの解析

1 名の XIAP 欠損症患者から得られた造血幹細胞を移植した 4 頭のマウスのうち 3 頭で、様々な程度 (0.3%, 1.5%, 20.4%) でヒト CD45 陽性細胞が定着し、CD19 陽性の B 細胞、CD4 陽性 T 細胞、および CD8 陽性 T 細胞の分化が認められた。最も高い程度でヒト化されたマウス (マウス A) の結果を図 1 に示す。他の 1 名の XIAP 欠損症患者から採取した骨髓細胞では十分なヒト免疫系細胞の分化が認められなかった。XLP 患者由来細胞を移植したマウスは現在ヒト化の途上であり、今後解析する予定である。

3) 免疫不全症患者由来ヒト化マウスへの EBV 感染

XIAP 欠損症患者由来骨髓細胞を用いて作製された 3 頭のヒト化マウスのうち、20.4% と 0.3% のヒト化率を示した 2 頭のマウス (それぞれを A および B とする) に B95-8 株由来 EBV を感染させた。マウス A では、感染 6 週間後に末梢血 EBV DNA 量が 8×10^3 copies/ μ g DNA まで上昇し、7-15 週では検出感度以下に低下したが、16 週で再び 3×10^3 copies/ μ g DNA まで上昇した (図 2A)。末梢血 CD8+ T 細胞の割合は感染 5 週間後に上昇を始め、6 週間後に約 75%、10 週間後には 82% に達し、その後 16 週までわずかに減少した (図 2B)。感染 16 週間後において、CD8+ T 細胞の 99% が HLA-DR+ の活性化細胞であった。また CD4+ T 細胞の 99% が HLA-DR+ であった (図 2C)。マウス B では、感染の 10 週間後に末梢血 EBV DNA 量が 1×10^4 copies/ μ g DNA まで上昇し、その後 11-14 週では検出感度以下まで低下したが、15 週で再び 2×10^3 copies/ μ g DNA まで上昇した。末梢血 CD8+ T 細胞の割合は感染 8 週間後から上昇を始め、10 週間で約 75% のヒ

ークに達し、その後は 16 週まで大きな変化がなかった。感染 16 週間後において、CD8+ T 細胞の 98% が HLA-DR+ の活性化細胞であった。また CD4+ T 細胞の 77% が HLA-DR+ であった。

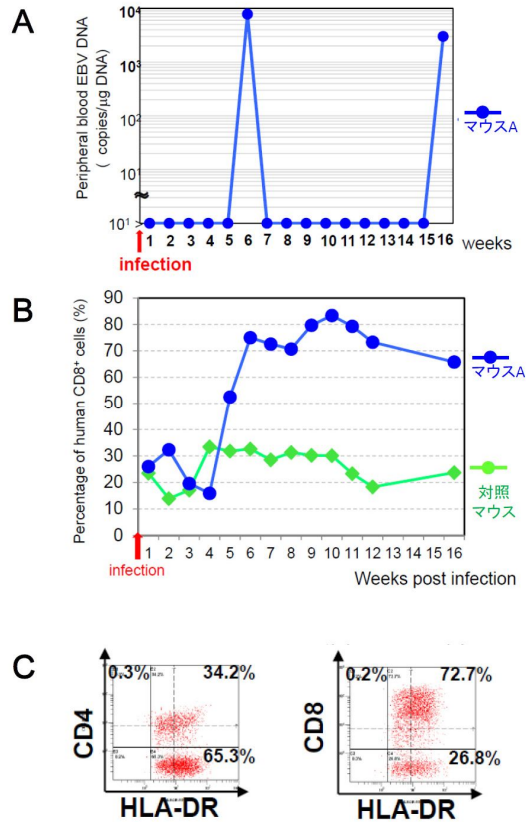


図 2 . XIAP 欠損症由来ヒト化マウスに対する EBV 感染実験 . EBV 感染後のマウス A の末梢血 EBV DNA 量 (A)、末梢血 T 細胞中の CD8 陽性細胞の割合 (B)、CD4+ および CD8+ 細胞の HLA-DR 発現 (C) を示す。緑は対照の未感染マウス。

EBV 感染後のマウス A の末梢血ヒトサイトカインレベルをアレイにより測定したところ、感染の 6 週間後に IFN- γ が約 500 pg/ml に達した (図 3)。一方健康者臍帯血によるヒト化マウス 5 頭に EBV を感染させた後の IFN- γ レベルはそれぞれ 2, 55, 60, 255, 485 pg/ml (平均 171 pg/ml) であった。

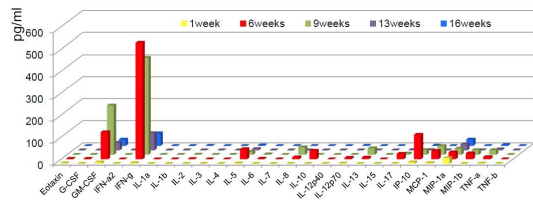


図 3 . EBV を感染させた XIAP 欠損症由来ヒト化マウスのヒトサイトカイン産生 . マウス A の末梢血のヒトサイトカインをアレイにより測定した。

以上の結果より、XIAP 欠損症患者の骨髄に由来する造血幹細胞を用いてヒト化マウスを作製することが可能であること、このマウスに EBV 感染が成立し、活性化 CD8 陽性細胞が急激に増加することなど、健康者臍帯血由来ヒト化マウスに EBV を感染させたときに認められるのと同様の現象が認められた。XIAP 欠損症患者の EBV 感染では、サイトカインの過剰産生による血球貪食性リンパ組織球症が特徴的である。また IFN- γ は血球貪食性リンパ組織球症で過剰産生されるサイトカインの代表的なものである。XIAP 欠損症由来ヒト化マウスの 1 頭において、健康者臍帯血由来ヒト化マウスと比べて比較的高いレベルの血中 IFN- γ が認められたことは以上の観点から興味深い。今後より多くのヒト化マウスを作製し、サイトカイン産生の特徴を含め、XIAP 欠損症由来ヒト化マウスの EBV に対する免疫応答の特徴を明らかにしたい。

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) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, and Nakamura H. The Highly conserved HCMV UL136 ORF generates multiple Golgi-localizing protein isoforms through differential translation initiation. *Virus Res* 179: 241-246, 2014.
- 2) Siddiquey MN, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome KI, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T- and natural killer- cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2014; 105(6):713-22.
- 3) Fukuda A, Imadome K-I, Sakamoto S, Shigeta T, Uchida H, Matsunami M, Sasaki K, Kanazawa H, Kawano F, Nakazawa A, Fujiwara S, and Kasahara M. Evaluation of the Immune Function Assay in Pediatric Living Donor Liver Transplantation. *Pediatr Transplant*. 2014 Nov 23. doi: 10.1111/petr.12402. [Epub ahead of print]
- 4) Yoshimori M, Imadome KI, Komatsu H, Wang L, Saitoh Y, Yamaoka S, Fukuda T, Kurata M, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. CD137 expression is induced by Epstein-Barr virus infection through LMP1 in T or NK cells and mediates survival promoting signals. *PLoS ONE*, 2014 Nov 19;9(11):e112564.
- 5) Fujiwara S, Kimura H, Imadome K, Arai

A, Kodama, E, Morio T, Shimizu N, and Wakiguchi H. Current research on chronic active Epstein-Barr virus infection in Japan. *Pediatr Int*, 56:159-66. 2014.

- 6) Fujiwara S. Reproduction of Epstein-Barr virus infection and pathogenesis in humanized mice. *Immune Network* 14: 1-6, 2014.
- 7) Jinta M, Imadome K, Komatsu H, Yoshimori M, Kurata M, Fujiwara S, Miura O, Arai A. L-Asparaginase monotherapy for EBV-positive T/NK lymphoproliferative diseases: A pilot Study. *Journal of Medical and Dental Sciences*. 2015, in press.
- 8) Matsuda G, Imadome K-I, Kawano F, Mochizuki M, Ochiai N, Morio T, Shimizu N, and Fujiwara S. Cellular immunotherapy with ex vivo expanded cord blood T cells in a humanized mouse model of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Immunotherapy* 7:335-341, 2015.
- 9) Yoshimori M, Komatsu H, Imadome K, Kurata M, Yamamoto K, Koyama T, Shimizu N, Fujiwara S, Miura O, Arai A. P-glycoprotein is expressed and causes resistance to chemotherapy in EBV-positive T-cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Med*, 2015, in press.
- 10) Fujiwara S, Imadome K, and Takei M. Modeling EBV infection and pathogenesis in new-generation humanized mice. *Exp Mol Med* 2015 Jan 23;47:e135.

[学会発表](計 10 件)

- 1) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Applications of mouse models of EBV-associated diseases for the evaluation of novel therapies. 16th International Symposium on EBV and Associated Diseases. Brisbane, 16-19 July, 2014.
- 2) Imadome K, Matsuda G, Kawano F, Kodama E, Arai A, Shimizu N, Fujiwara S. Preclinical studies of novel therapies for Epstein-Barr virus-associated diseases in humanized mouse models. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
- 3) Liao H, Lee J-H, Kondo R, Katata M, Imadome K, Miyado K, Inoue N, Fujiwara S, Nakamura H. The highly conserved human cytomegalovirus UL136 ORF generates multiple Golgi-likalizing protein isoforms through differential translation initiation. 39th

- Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
- 4) Siddiquey M, Nakagawa H, Iwata S, Kanazawa T, Suzuki M, Imadome K, Fujiwara S, Goshima F, Murata T, Kimura H. Anti-tumor effects of suberoylanilide hydroxamic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer-cell lymphoma. 39th Annual International Herpesvirus Workshop. Kobe, 20-23 July, 2014.
 - 5) Nagasawa Y, Natsumi I, Nozaki T, Inomata H, Imadome K-I, Iwata M, Kitamura N, Fujiwara S, Takei M. Human Osteoclasts are Mobilized in Erosive Arthritis of Epstein-Barr Virus-infected Humanized NOD/Shi-scid/IL-2R γ null Mice. American College of Rheumatology Annual meeting, Boston, November 14-19, 2014.
 - 6) Komatsu H, Imadome K-I, Shibayama H, Yada T, Yamada M, Yamamoto K, Koyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV in EBV-T/NK-LPDs leading to development of the disorders. December 6, 2014, American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, CA, USA.
 - 7) 堀野雅人、今留謙一、今井耕輔、王路丹、松田剛、浜崎霞、小松穂菜実、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子。EBVはT、NK細胞に感染後AID発現とそれによる遺伝子変異蓄積をもたらす腫瘍発症に寄与する。第75回日本血液学会学術集会、平成25年10月11日、札幌。
 - 8) 王路丹、今留謙一、小松穂菜実、福田哲也、倉田盛人、藤原成悦、三浦修、新井文子。EBVの感染によりT、NK細胞ではIL-2の存在下CD137発現が誘導され細胞生存が亢進する。第75回日本血液学会学術集会、平成25年10月11日、札幌。
 - 9) 小松穂菜実、今留謙一、王路丹、倉田盛人、小山高敏、藤原成悦、三浦修、新井文子。EBV陽性T、NK細胞はFOX-p3を発現し制御性T細胞同様T細胞の増殖を抑制する。第75回日本血液学会学術集会、平成25年10月11日、札幌。
 - 10) Komatsu H, Imadome K, Yata T, Kiyama T, Fujiwara S, Miura O, Arai A. STAT3 is activated by EBV infection through LMP1 in EBV-T-LPDs and can be a therapeutic target. 第76回日本血液学会 2014.10.31-11.2 大阪.

〔図書〕(計1件)

- 1) Fujiwara S, Matsuda G, and Imadome K. Epstein-Barr virus infection in humanized mice. In Poluektova, L.Y., Garcia-Martinez, J.V., Koyanagi, Y., Manz, M.G.,

Tager, A.M. Eds. Humanized Mice for HIV Research, Springer, Berlin, 2015, pp.493-508.

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

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)連携研究者
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
松田剛 (MATSUDA GO)
国立成育医療研究センター・母児感染研究部・研究員
研究者番号：60392130
- (4)連携研究者
金兼弘和 (KANEGANE HIROKAZU)
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科・准教授
研究者番号：00293324