

19. EB ウイルス (1)

—EBV 感染成立と宿主免疫応答のダイナミクス—

葛島 清隆

I. はじめに

Epstein-Barr virus (以下 EBV) は Burkitt リンパ腫、上咽頭癌の発症と深くかかわりがあり、Hodgkin 病、胃癌などとの関連が注目されている。また、先天性免疫不全、AIDS 患者や臓器移植後などで問題になっている lymphoproliferative disorders (LPD) の主な原因ウイルスとして重要である¹⁾。ほとんどの人は小児期から青年期にかけて EBV の感染を受ける。その症状の多くは非特異的な感冒症状か、あるいは無症候性と推測されるが、一部の人では伝染性単核球症 (infectious mononucleosis, 以下 IM) として顕性発症するため初感染像として捕らえることができる。

EBV は初感染の後に末梢血 B リンパ球の一部に潜伏感染し、既感染者は生涯にわたりウイルスゲノムと共存し、ウイルスを唾液中に排泄する。種々の免疫低下時 (先天性免疫不全患者や臓器移植後に拒絶予防の免疫抑制剤の投与を受けている患者など) に、これらのウイルスによる感染症が頻発することから、潜伏感染しているウイルスの再活性化を生体の免疫機構が制御していることが推測できる。初感染時、およびその後の潜伏感染時いずれにおいてもウイルス感染細胞の活動を制御しているおもな免疫担当細胞は、CD8 陽性の特異的細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte, 以下 CTL) であると考えられている²⁾。

種々の EBV 感染症において、このような CTL の働き

を明瞭に示すために、抗原特異的な CD8⁺T 細胞を single cell レベルで同定する方法が近年相次いで開発された。

1) Enzyme-linked immunospot assay, 2) Cytokine flow cytometry (CFC), 3) Tetrameric MHC-peptide complex (tetramer) などであるが、これらの新しい技術の導入により、より定量性を持って、ウイルス特異的 CD8⁺T 細胞の存在を示すことができるようになった。本稿では、CFC 法と tetramer 法に焦点を絞り、その原理から応用について述べる。

II. Cytokine flow cytometry (CFC)

1. 原理

一定数の自己の Lymphoblastoid cell line (LCL) と末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte, 以下 PBL) をチューブ内で6時間混合培養する。この際に細胞内蛋白輸送阻止剤である Brefeldin A を添加しておくこと、抗原に反応した T 細胞で産生された interferon (IFN)- γ は分泌されることなく当該細胞内に蓄積する。反応終了後、細胞をパラホルムアルデヒドで固定し、サポニン等で膜透化処理を行うことで、細胞内の IFN- γ の染色を可能にする。それぞれ異なる色素標識した抗 CD8 抗体と抗 IFN- γ 抗体と反応させた後、FACS にて解析を行う。解析では、まず CD8 gating して、解析の対象を CD8 陽性 T 細胞に絞り込む。CD69, CD45RO などの表面抗原と2次元で解析することで IFN- γ 産生細胞の phenotype を解析することができる。この方法を用いると EBV 既感染成人末梢血 CD8⁺T 細胞の約1%が IFN- γ を産生し、EBV 未感染成人では0.05%以下である³⁾。

2. IM 患者 PBL 中の EBV 特異的 CD8⁺T 細胞頻度

図1は、有熱期の IM 患者 PBL をそれぞれ自己の LCL で6時間刺激した後、CD8⁺T 細胞内に産生された IFN- γ を X 軸に、活性化抗原として CD45RO を Y 軸に表示した結果である。CD45RO⁺/CD8⁺T 細胞の60%が EBV 特異的 T 細胞であった。この結果は IM 急性期において増加している CD8⁺T 細胞の多くが EBV 特異的であることを

愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 (〒464-8681
名古屋市千種区鹿子殿1-1)

Epstein-Barr virus (1)

—Establishment of the infection and dynamics of virus-specific T cell responses—

Kiyotaka Kuzushima

Division of Immunology Aichi Cancer Center Research Institute

1-1 Kanokoden, Chikusa-ku, Nagoya 464-8681, Japan

TEL: 052-762-6111 (内線7040)

FAX: 052-764-2990

E-mail: kkuzushi@aichi-cc.jp

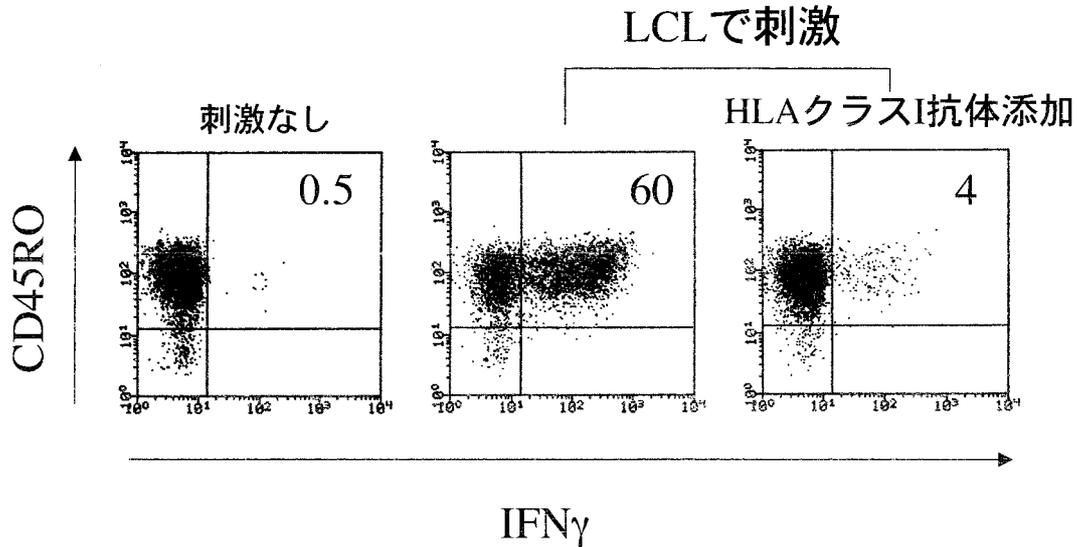


図1 伝染性単核球症患者末梢血リンパ球中のEBV特異的CD8⁺T細胞頻度。
伝染性単核球症患者の有熱期に採取した末梢血リンパ球を自己のLCLで6時間刺激した後、CD8⁺T細胞内に産生されたIFN-γをX軸に、活性化抗原CD45ROをY軸に表示した。数値はCD45RO陽性CD8⁺T細胞中のIFN-γ陽性細胞%を示す。文献4)より引用。

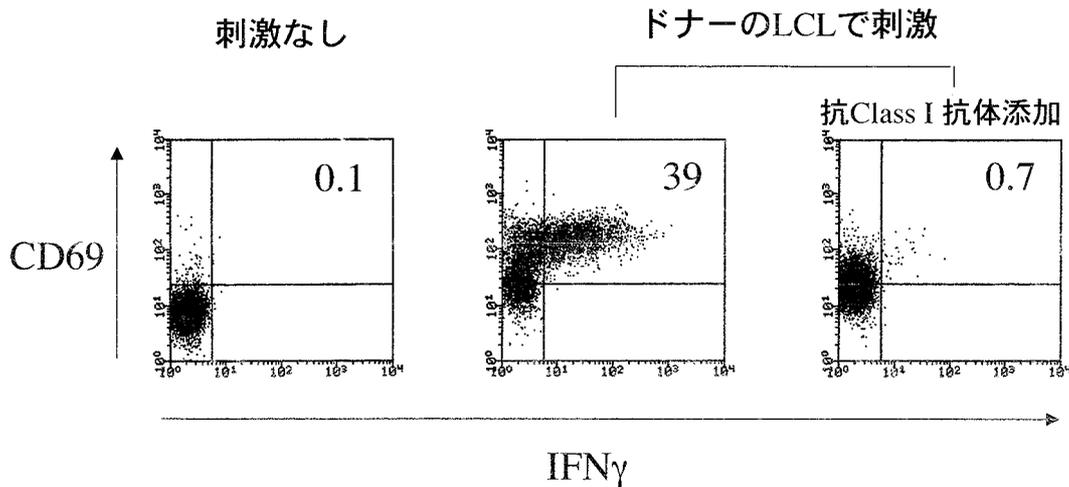


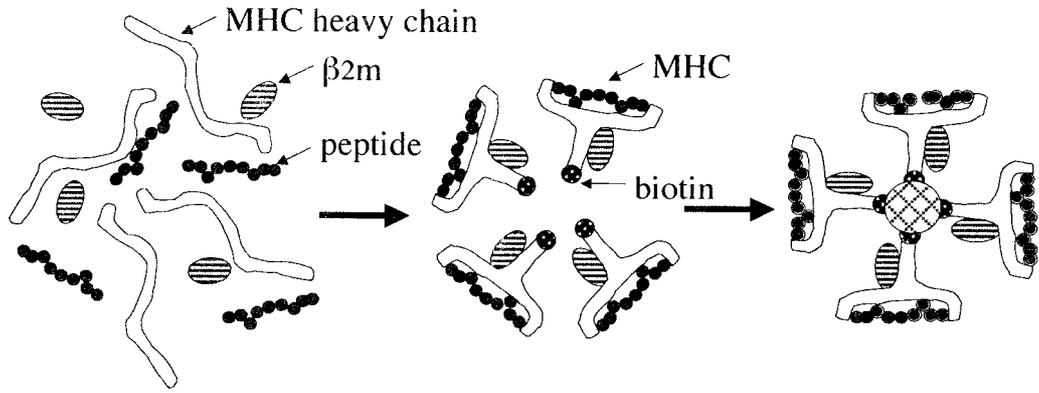
図2 同種骨髄移植後に発症したEBV関連リンパ増殖性疾患発症時に末梢血に動員されたEBV特異的CD8⁺T細胞。
数値はCD8⁺T細胞中のIFN-γ陽性細胞%を示す。文献5)から一部引用。

示している⁴⁾。

3. 骨髄移植後のEBV関連LPDにおけるEBV特異的CD8⁺T細胞の動態

臓器移植後などの強い免疫抑制状態では、ウイルス特異的細胞性免疫が減弱するため、EBV関連リンパ増殖症(EBV-LPD)が発症し得る。EBV-LPDの一部の症例では、タイミング良く免疫抑制剤を減量することで、自然寛解にいたる症例がある。ここで示す症例は、移植41日に頸部リンパ節生検にてEBV-LPDと診断された。同時にCD

8優位のT細胞増多が認められ、移植49日目のCD8⁺Tリンパ球中のEBV特異的頻度を測定したところ、図2中央に示すように患者CD8⁺T細胞の約40%はドナー由来のLCLで刺激することでIFN-γを産生し、EBV特異的T細胞と考えられた。この反応は抗HLA class-I抗体によって特異的に阻止された(図2右)。内因性のEBV特異的CD8⁺T細胞が動員されていることが確認できたので、その後は免疫抑制剤を減量しEBV関連LPDの寛解に至っている⁵⁾。細胞性免疫の評価が、病態を把握し治療方針を決定する上での基礎データとなり得ることを示した



大腸菌による組換え蛋白産生と
in vitro refolding

MHCのビオチン化

蛍光標識アビジン
による4量体化

図3 MHC-tetramerの作製模式図.

組換え蛋白としてそれぞれ大腸菌で発現，精製したMHC heavy chain, $\beta 2$ ミクログロブリンと抗原ペプチドをバッファー内でrefoldさせる．正しくrefoldしたMHC monomerをゲル濾過にて精製し，そのC末にあらかじめ付加されているspecific biotinylation siteに，biotin-protein ligase BirAを用いてビオチンを付加する．色素標識アビジンとモル比4対1の結合を利用し4量体化する

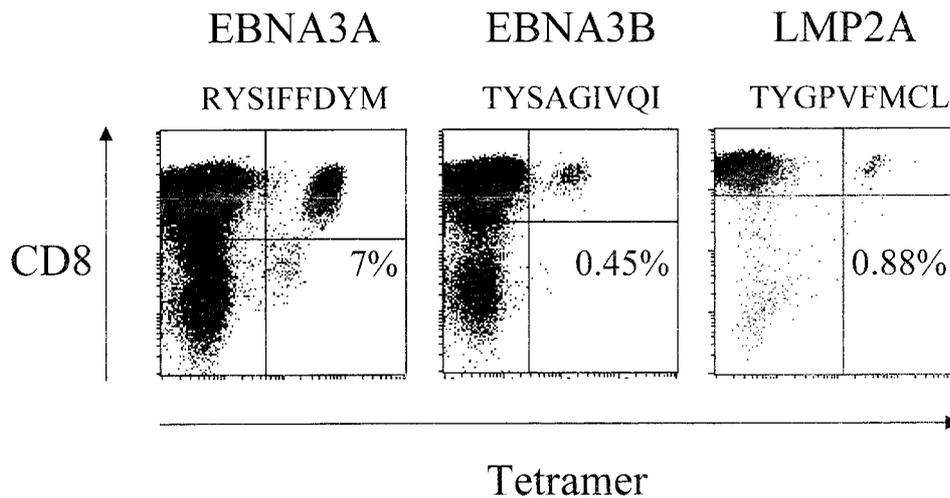


図4 HLA-A*2402-tetramerによるEBV特異的 polyclonal T cell lineの染色.

一例と考えられる。

III. Tetrameric major histocompatibility complex (MHC)-peptide complex (tetramer)

1. 原理

抗原特異的なCD8⁺T細胞は固有のT cell receptor (TCR)を細胞表面に発現している。一方，ウイルス感染細胞での抗原提示は以下のように行われている。すなわち，ウイルス蛋白の一部が細胞質内の proteasome で短いペプチド断片に切断され，transporters associated with antigen processing と呼ばれる蛋白の働きにより，endoplasmic reticulum 内に輸送される。ここではMHCクラス1蛋白（ヒト

では human leukocyte antigen, 以下 HLA), $\beta 2$ ミクログロブリン ($\beta 2m$) そして抗原ペプチドの3者複合体が形成され，細胞表面に運ばれる。この様な仕組みで特定のペプチド断片（通常8-10個アミノ酸）となったウイルス抗原がMHC (HLA) 依存性に感染細胞表面に提示され，それにTCRが結合することでCD8⁺T細胞の抗原認識がなされる。

MHC-peptide complexを4量体化することでTCRとの結合のavidity（接着力の総和）を高め，特異的なT細胞に安定して結合できる試薬がtetrameric MHC-peptide complex (tetramer)である⁶⁾。組換え蛋白として大腸菌でそれぞれ発現させたMHC heavy chainと $\beta 2m$ および合

成ペプチドを *in vitro* で refold させる。正しく refold した MHC monomer をゲル濾過精製する。MHC heavy chain の C 末にあらかじめ付加されている特殊なアミノ酸配列 (specific biotinylation site) に, biotin-protein ligase BirA

を用いてビオチンを付加する。最後に種々の色素標識アビジンとモル比 4 対 1 の結合を利用し 4 量体化する (図 3)。抗 CD 8 抗体と 2 重染色することで, CD 8⁺T 細胞中の tetramer 陽性細胞数を FACS で測定することができる (図 4)。

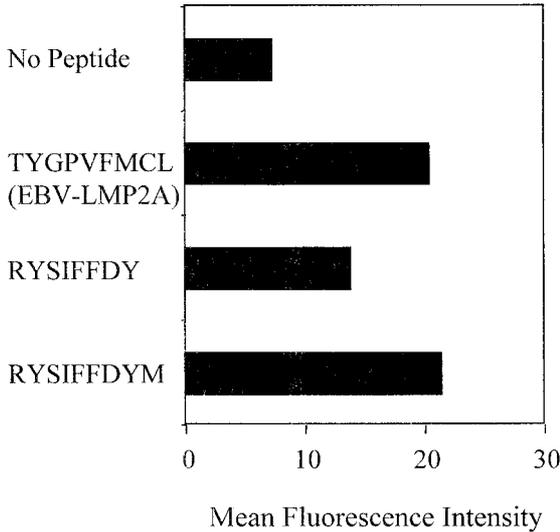


図 5 EBNA 3 A 由来ペプチド RYSIFFDYM (9 mer) は RYSIFFDY (8 mer) より HLA-A*2402 に 親和性が強い。

MHC stabilization assay : HLA-A*2402 遺伝子導入 T 2 細胞に各ペプチド (10μM) を 26℃ で 16 時間パルス, さらに 37℃ にて 3 時間静置後に細胞表面の HLA-A24 抗原を間接蛍光抗体法にて染色し FACS で蛍光強度を測定した。9 番目の M がアンカーとして重要であることを示す。

2. EBV 特異的 CD 8⁺T 細胞に結合する HLA-A*2402-tetramer の作製

日本人の 6, 7 割が保有する HLA-A*2402 によって提示される EBV 特異的 CD 8⁺T 細胞認識エピートープとして, これまでに EBNA 3 A, EBNA 3 B, LMP 2 A などの蛋白から由来するペプチドが報告されている²⁾。この内, EBNA 3 A 由来の 8 mer (RYSIFFDY) について我々が検討したところ, C 末を 1 アミノ酸延長した 9 mer (RYSIFFDYM) の方がより安定した tetramer になり得る可能性を示していた。すなわち, HLA-A*2402 導入 T 2 細胞を用いた MHC stabilization assay で, 9 mer は 8 mer よりも HLA-A*2402 分子から離れにくいことが示された (図 5) ので 9 mer を用いた tetramer を作製した。この EBNA 3 A-tetramer は, 対応する CD 8⁺T cell clone を特異的に染色し (図 6), 0.1μg/ml まで希釈しても使用可能であった。そのほか, EBNA 3 B に由来する 9 mer (TYSAGIVQI), LMP 2 A に由来する 9 mer (TYGPVFMCL) についても安定な tetramer を作製している (図 4)。

現在, これらの HLA-A*2402-tetramer は, 造血幹細胞移植後, 固形臓器移植後の患者における EBV および CMV

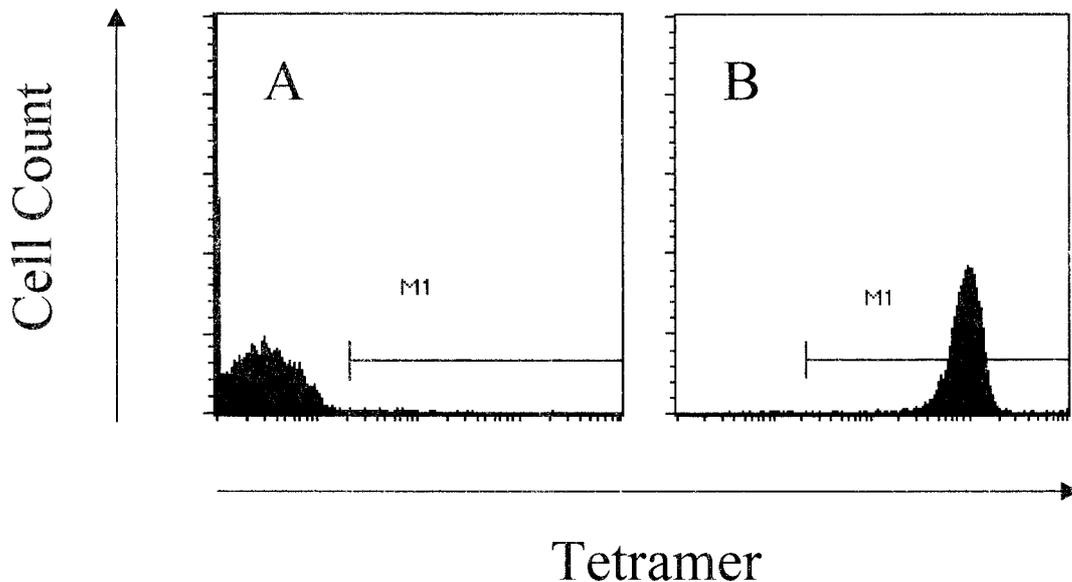


図 6 HLA-A*2402-tetramer による EBV 特異的 CD 8⁺T cell clone の染色。A, CMV-specific CD 8⁺T cell clone (pp65 ; 328-337, QYDPVAALF を認識)。B, EBV-specific CD 8⁺T cell clone (EBNA 3 A ; 246-253, RYSIFFDYM を認識), 各 T cell clone を HLA-A*2402-RYSIFFDYM-tetramer と 37℃, 15 分反応させた後, FACS で解析した。

-特異的 CD8⁺T 細胞解析研究のため、多施設で使用されている。また、腫瘍浸潤 T 細胞培養を用いた検討では、EBV 陽性胃癌組織内には抗原特異的な CD8⁺T 細胞が浸潤していることが判明しているが、その抗原の同定には至っていない⁷⁾。EBV 陽性胃癌、上咽頭癌では LMP2A の発現が報告されており、これを癌抗原として認識する CTL が組織に浸潤し癌抑制的に働いている可能性がある。また、自己（癌）抗原も候補としてあげられる。病理組織を tetramer で染色し、局所にある抗原特異的な CD8⁺T 細胞を同定方法が報告されており⁸⁾、EBV 陽性癌組織へ応用することで、CTL 認識抗原が明らかになる可能性がある。

IV. おわりに

近年の移植医療の進歩に伴い、免疫低下時における EBV を含むヘルペスウイルス感染症のコントロールは重要な課題となっている。これらのウイルスについては現在のところウイルス抗原量や、ゲノムコピー測定によるモニタリングが主流である。しかしながら、感染症制御に重要な内因性の CD8⁺特異的 T 細胞を定量的に各施設でリアルタイムにモニターできるならば、これらのウイルス感染症をさらに合理的に管理、治療することが可能になると思われる。本稿で紹介したウイルス特異的 CD8⁺T 細胞数測定の中で、tetramer はその目的に最も適した方法と考えられる。また、ウイルスに対する特異的な細胞性免疫応答の基礎研究を進める上でも、tetramer の果たす役割は今後も重要であろう。

文 献

- 1) Rickinson AB, and Kieff E. Epstein-Barr virus. In : Knipe DM and Howley PM, editors. Fields Virology. 4 th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers ; 2001. p. 2575-2627.
- 2) Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. Annu Rev Immunol 1997 ; **15** : 405-431.
- 3) Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, *et al.* Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8⁺T cell frequencies by flow cytometry. Blood 1999 ; **94** : 3094-3100.
- 4) Hoshino Y, Morishima T, Kimura H, *et al.* Antigen-driven expansion and contraction of CD8⁺activated T cells in primary EBV infection. J Immunol 1999 ; **163** : 5735-5740.
- 5) Kuzushima K, Kimura H, Hoshino Y, *et al.* Longitudinal dynamics of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes during the posttransplant lymphoproliferative disorder. J Infect Dis 2000 ; **182** : 937-940.
- 6) Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, *et al.* Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. Science 1996 ; **274** : 94-96.
- 7) Kuzushima K, Nakamura S, Nakamura T, *et al.* Increased frequency of antigen-specific CD8⁺cytotoxic T lymphocytes infiltrating an EBV-associated gastric carcinoma. J. Clin. Invest 1999 ; **104** : 163-171.
- 8) Skinner PJ, Daniels MA, Schmidt CS, *et al.* Cutting edge : *In situ* tetramer staining of antigen-specific T cells in tissues. J Immunol 2000 ; **165** : 613-617.