

表 題 同種造血幹細胞移植後サイトメガロウイルス特異的
細胞傷害性 T 細胞の動態に関する研究

論 文 の 区 分 課程博士（甲種）

著 者 名 斎藤 桐子

担当指導教員氏名 教授 神田 善伸

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学系専攻 総合医学専攻分野 内科系総合医学専攻科

2015年1月9日申請の学位論文

内容

1. はじめに	2
2. 同種造血幹細胞移植後 CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞の受容体レパトア およびキメリズム解析	
2.1 背景	7
2.2 方法	10
2.2.1 対象	
2.2.2 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のモニタリング	
2.2.3 direct single-cell analysis 法を用いた HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の T 細胞受容体 β 鎖の解析	
2.2.4 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析	
2.2.5 単細胞からの CMV-CTL クローン樹立	
2.2.6 CMV-CTL クローンの IFN- γ ELISPOT 解析	
2.3 結果	18
2.3.1 臨床経過および HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の発現頻度	
2.3.2 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の分化・成熟	
2.3.3 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のクローン型	
2.3.4 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析	
2.3.5 CMV-CTL クローンの IFN- γ ELISPOT 解析	
3. 考察	31
4. おわりに	35
5. 文献	36

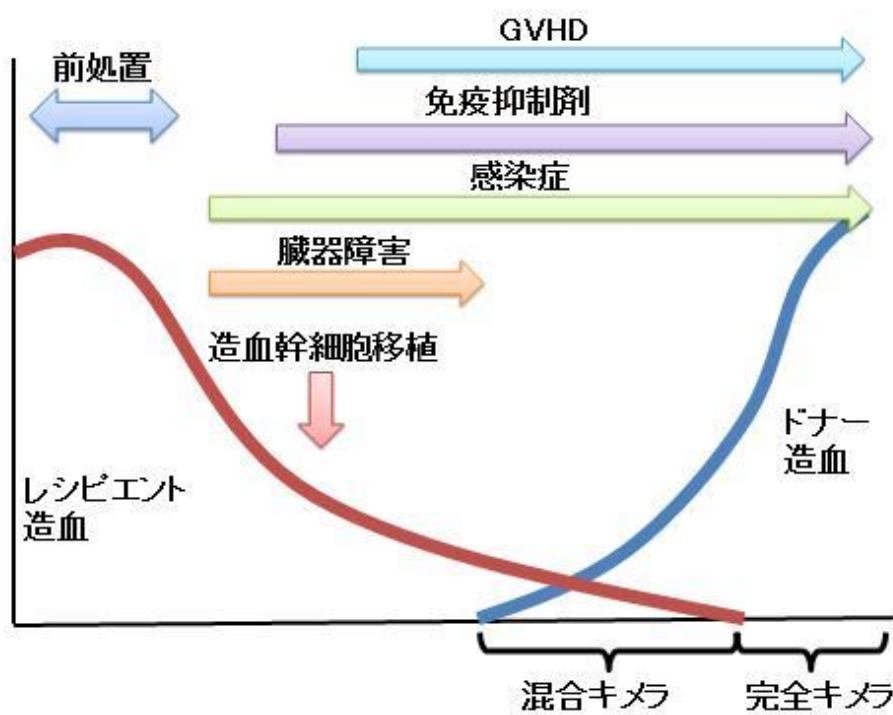
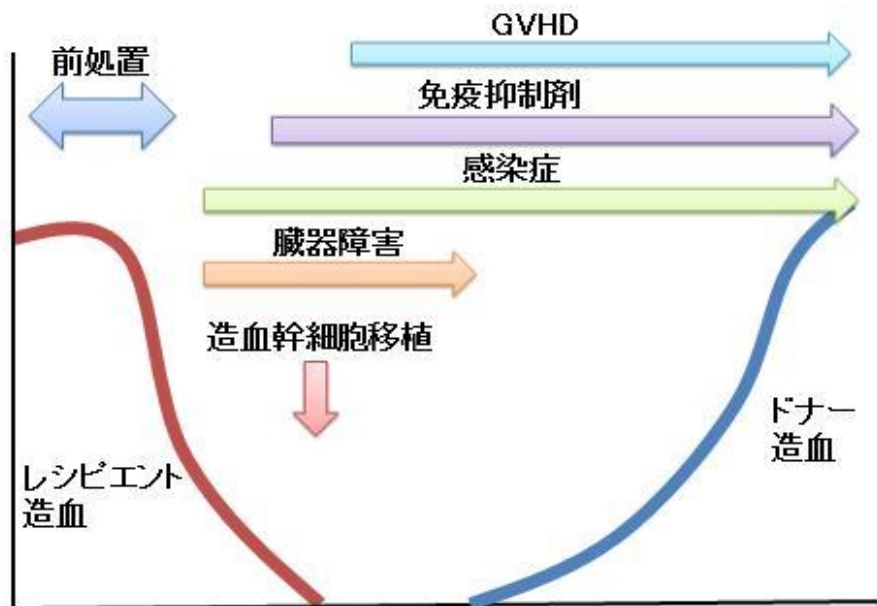
1. はじめに

造血器腫瘍は抗癌剤に対する感受性が高い悪性疾患の一つである。しかしながら、一部の難治性造血器腫瘍では抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示し、現在でも治療に難渋することは多く経験される。また、近年、遺伝子解析等の進歩により通常の抗癌剤治療や放射線治療のみでは再発リスクの高い患者の同定が可能となってきた^{1,2}。更に、慢性骨髄性白血病や多発性骨髄腫など、新規薬剤の登場により治療の奏効率、ひいては生存率の著しい改善を認めている疾患が存在するが、一般的には、再発した血液腫瘍は未だ根治が難しいと考えられている³。

ヒトに対する同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, Allo-HCT) は、1958年に Thomas 博士らが白血病患者に対して初めて施行した治療法である。その後、前述の難治性造血器疾患に対する唯一の根治治療法として、非常に重要な役割を担っている⁴。Allo-HCT は、大量抗がん剤や全身放射線照射による前処置をおこない、同種造血幹細胞を輸注することから始まる。前処置には、腫瘍細胞の根絶およびドナー造血細胞が拒絶されないように患者の免疫を抑制するという 2 つの大きな目的がある。同種血の輸注により造血回復が期待できるため、抗癌剤や放射線治療による血液学的な用量規定毒性 (dose limiting toxicity, DLT) は考慮しなくてよい。このため、年齢の若い症例では、通常の抗癌剤治療に比しより強度を増した骨髄破壊的な前処置が可能となり、抗腫瘍効果が増強できる。一方で、治療強度を増したのために、血液毒性以外の治療関連毒性、例えば粘膜障害や肝腎障害などが問題となることも少なくない。とくに比較的年齢の高い症例などでは合併症がおりやすく、こうした血液疾患患者にも移植を安全に行えるよう、前処置の強度を落とした骨髄非破壊的な前処置も発展してきた(図 1)。

図1 造血幹細胞移植の流れ

(上：骨髄破壊的前処置、下：骨髄非破壊的前処置)



骨髓非破壊的前処置では、移植後一定期間、レシピエント細胞とドナー細胞が共存する状態を経て、完全なドナー型へと移行する。移植後の骨髓中もしくは末梢血中の血液細胞がドナー由来の細胞に入れ替わっているか否か、遺伝子多型を利用して解析する方法をキメリズム解析という。95%以上がドナー由来の細胞である状態を「完全キメラ」、レシピエント細胞とドナー細胞が混在している状態を「混合キメラ」と定義している。骨髓非破壊的前処置を用いた Allo-HCT では、移植後一定期間混合キメラの状態を経て、完全キメラへ移行する。こうして患者体内でドナー由来の血液細胞が優位となり、レシピエントの白血病細胞を非自己と認識して、免疫学的に攻撃して腫瘍を根絶する移植片対白血病 (graft versus leukemia, GVL) 効果が期待されるのも、Allo-HCT の特徴の一つである。尚、ドナー由来の細胞が検出されず、レシピエント由来の細胞のみ検出された場合、移植片が拒絶されたことを意味する。また、この検出されたレシピエント由来の細胞が腫瘍細胞であった場合、再発を意味する。

いずれにしても、同種造血幹細胞移植においては、造血幹細胞がレシピエントからドナー由来へと移行し安定した造血を行うまでの間、免疫能が極めて低い期間が存在することから感染症の問題は避けられない(図 2)⁵。更にはドナー由来の血液細胞がレシピエントの非白血病細胞を認識し攻撃することで移植片対宿主病 (graft versus host disease, GVHD) を合併することもある⁶。GVHD をコントロールするために免疫抑制の強化が必要となる場合がある。しかし、免疫抑制剤の増量やステロイドの追加投与は感染のリスクを助長するため、重篤な感染症を合併することも少なくない。また、免疫抑制を強化した結果、GVL 効果も抑えられ、再発が増加することも懸念されている(図 3)。

図 2 造血幹細胞移植後の時期別の危険因子および好発する感染症

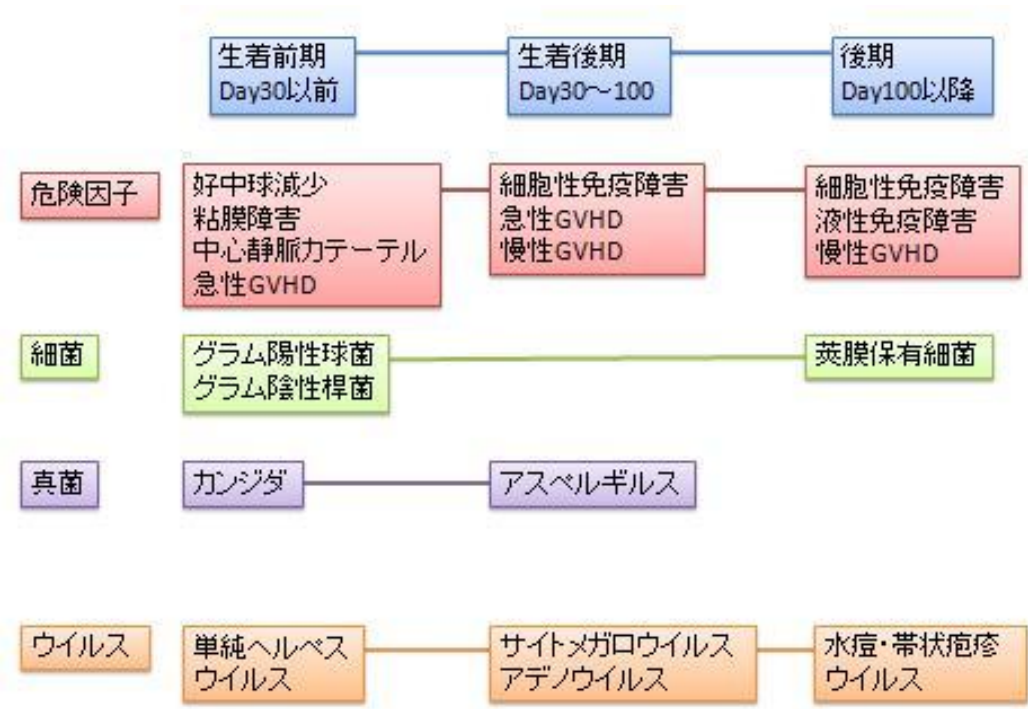
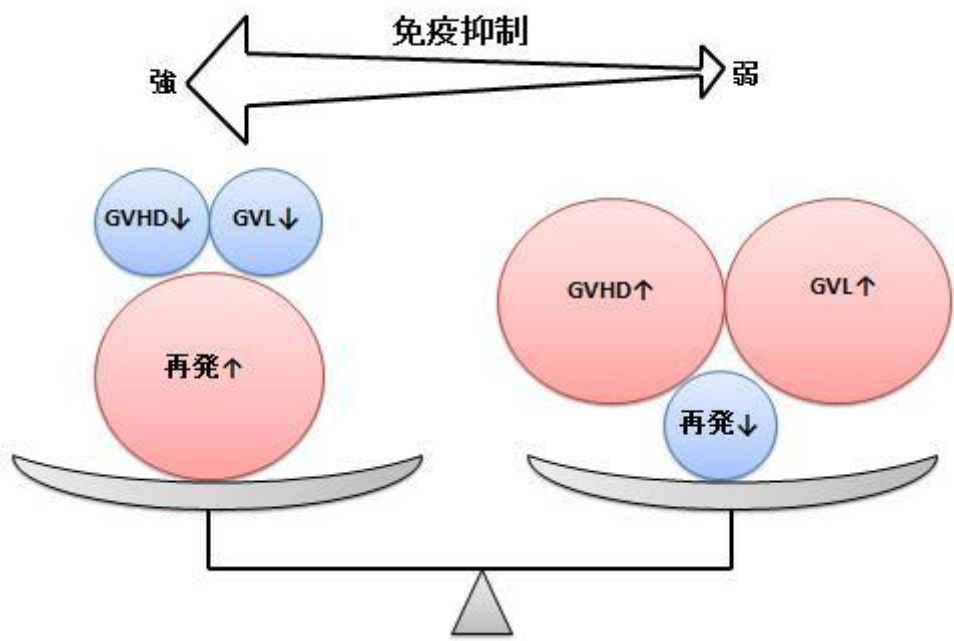


図 3 免疫抑制剤と GVHD、GVL、再発の関係



以上より、Allo-HCT を成功させるためには治療強度、免疫抑制のバランスが極めて重要になる。このような繊細なコントロールを行うには、治療期間中の感染症の管理が極めて重要である。Allo-HCT 後感染症の特徴としては、日和見感染症として細菌・真菌・ウイルスと多岐にわたるが、その中でもサイトメガロウイルス (cytomegalovirus, CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6、B 型肝炎ウイルスなど、既に体内に潜伏しているウイルスが、免疫抑制下、再活性化してしまうことが挙げられる。Allo-HCT 後、患者体内で感染症に対する免疫をどのように再構築し生体防御につなげているのか、その機序を明らかにすることで、これら感染症に対するより有効な予防法および治療法が確立されることが期待される。

このため、本研究では移植後合併症のなかでも頻度が高く、臨床上特に重要な CMV 感染症に着目し、CMV 感染における CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CMV specific cytotoxic T cell, CMV-CTL) の推移とそのキメリズムを解析することとした。

2. 同種造血幹細胞移植後 CMV 特異的細胞傷害性 T 細胞 (CMV-CTL) の受容体レパトアおよびキメリズム解析

2.1 背景

CMV はヘルペスウイルス科の二本鎖 DNA ウイルスに分類される。CMV 感染症は肺炎、肝炎、腸炎、網膜炎、脳炎などを引き起こす Allo-HCT 後の重要な合併症の一つである。過去数十年の経過において、抗ウイルス薬の予防内服や先制治療が研究され、発症予防や合併症・死亡率の低下に繋がっている⁷⁻¹⁰。一方で、長期的な CMV 感染症のコントロールのためには、宿主の細胞性免疫の再構築が重要であることも認識されてきた^{11, 12}。移植後、CMV-CTL の迅速な回復が重篤な CMV 感染症の発症を抑えるとの報告もある¹³。

CMV-CTL は感染細胞のヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen, HLA) に提示された CMV ペプチドを、T 細胞受容体を介して認識する。細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T cell, CTL) は受容体 β 鎖に固有の相補性決定領域 (complementarity-determining region3, CDR3) 配列を有しており、これが T 細胞の多様性に寄与している¹⁴。CMV ペプチドの認識に際しても CDR3 配列が極めて重要な役割を果たしている。よって、Allo-HCT 後の CDR3 配列を解析し CTL クローンを同定することで、細胞免疫学的な再構築の機序が明らかになる可能性が示唆されている¹⁵⁻¹⁷。

本邦からの報告によると、1986 年の妊婦の CMV 抗体保有率は 96.0%であった¹⁸。その後社会経済の発展とともに衛生環境が改善し、日本人成人における抗体保有率は低下を認めている。本邦の 20 歳以上の成人での CMV IgG 抗体価の陽性率は 1994 年が 87.6%であったのに対し、1999 年には 77.8%まで低下している。特に、20 歳代では CMV IgG 抗体保有率は 65.2%から 53.3%に低下していると報告されている。若年層の CMV 抗体保有率の低下に伴い、今後、CMV 既感染同士の移植が減少すると考えられている。

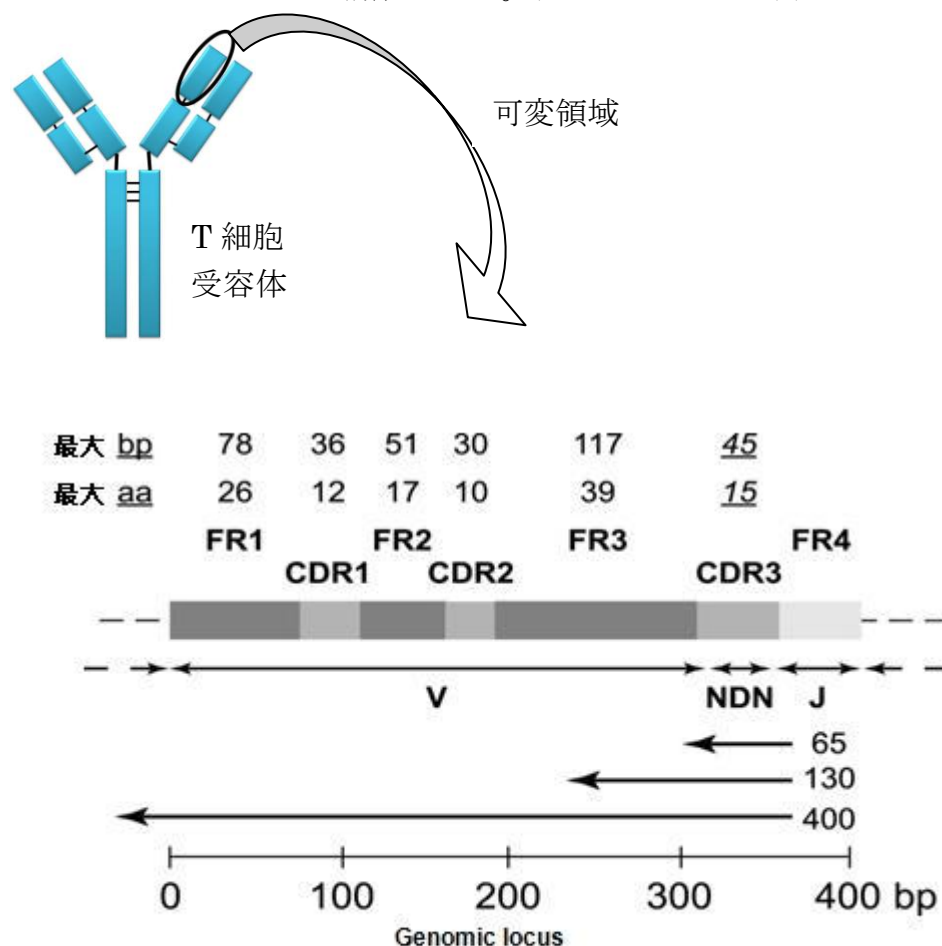
レシピエントとドナーの CMV 感染状況は、Allo-HCT 後の CMV 感染症に大きく影響する。血清学的 CMV 陽性ドナーから幹細胞を移植した場合、移植後の CMV 感染症発症率は、血清学的 CMV 陰性ドナーからの移植に比して低くなる

19。これは、移植片に含まれるドナー由来の CMV-CTL が移植後早期よりレシピエント体内で増殖し、長期間保持されうるためと考えられている¹¹。過去の報告同様、我々の研究室では、血清学的 CMV 陰性レシピエントに血清学的 CMV 陽性ドナーから幹細胞を移植した場合、移植後早期からドナー由来の CMV-CTL が検出され CMV 感染防御に有効であったことを確認している¹⁵。一方、血清学的 CMV 陽性レシピエントに血清学的 CMV 陰性ドナーから幹細胞を移植した場合、移植後の CMV 再活性化および CMV 感染症発症率が頻回であったとの報告がある^{7, 20, 21}。その理由として、この組み合わせにおいては、CMV が再活性化することによりドナー由来の CMV-CTL が構築されることが挙げられる。すなわち、CMV が再活性化することでようやく CMV に対し有効な CDR3 配列を有した CTL クローンが発達し、CMV 増殖を抑制すると考えられている^{11, 14}。一方、血清学的 CMV 陰性ドナーからの移植においても、CMV 再活性化を認めない症例も存在する。これらのケースでは、Allo-HCT 後もレシピエント由来の CMV-CTL が残存し、CMV 再活性化抑制に寄与していると推測されている²²⁻²⁴。しかしながら、Allo-HCT 後、CMV-CTL のキメリズムを直接解析している報告はほとんどないのが現状である²⁵。さらに、レシピエントが血清学的 CMV 陽性でありドナーが血清学的 CMV 陰性の組み合わせによる Allo-HCT において、*in vivo* の状態を反映した直接的な単細胞レベルでの CMV-CTL 解析はこれまでに施行されていない。

このため、本研究は、レシピエントが血清学的 CMV 陽性でありドナーが血清学的 CMV 陰性の組み合わせによる Allo-HCT において、CMV-CTL β 鎖の CDR3 領域の解析を行い、レパトア同定を行うこととした(図 4)²⁶。その際、CMV-CTL による CMV ペプチド認識機構が HLA 拘束性であるため、HLA-A 座のうち、36%と日本人が最も高頻度に有する HLA-A*2402 をレシピエント・ドナー共に有するペアを対象とした。また、同定された CMV-CTL がレシピエント・ドナーのいずれに由来するのかをキメリズム解析を用いて検討した。さらに同定された CMV-CTL のクローンを樹立し、CMV ペプチド提示細胞に対する細胞傷害活性の有無につき検討した。

本研究の意義としては CMV-CTL レパトアの移植後免疫構築の解析により、免疫回復と感染症における CTL の果たす役割を明らかにすることである。そして、将来的には移植後 CMV 感染症の高リスク群の同定や、日本人向けのワクチンの開発、更に細胞傷害活性の高い CTL を誘導することで治療抵抗性 CMV ウイルス感染症の免疫療法につなげ、生存率の向上に寄与したいと考えている。

図 4 VDJ 再構成後の TCR β 鎖の包括的構造。4 つのフレームワーク (FR1-FR4) と 3 つの相補性決定領域 (CDR1-CDR3)、および V-D 間と D-J 間の N スクレオシドより構成される。(blood 2013; 122(1): 19-22 より引用・改変)



2.2 方法

2.2.1 対象

本研究はレシピエント・ドナーともに HLA-A*2402 を有し、かつレシピエントが血清学的 CMV 陽性でありドナーが血清学的 CMV 陰性のペア 3 組を対象とした。

症例 1 は HLA 一致同胞から末梢血幹細胞移植を施行した。移植前処置はフルダラビン 30mg/ m²/day を 4 日間、シクロホスファミド 25mg/kg/day を 4 日間、そして抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン 1.25mg/kg/day を 2 日間用いた。

症例 2 は HLA 8/8 アリル一致非血縁ドナーから骨髄移植を施行した。移植前処置はフルダラビン 25mg/ m²/day を 5 日間とメルファラン 140mg/ m²/day を 1 日用いた。

症例 3 は HLA-B*座一アリル不一致、C*座一抗原不一致非血縁ドナーから骨髄移植を施行した。移植前処置はフルダラビン 30mg/m²/day を 4 日間と全身放射線照射 4Gy/day を 3 日間用いた。

GVHD 予防は全例でシクロスポリンと短期メトトレキサートにて施行した。また、全例で細菌、真菌、ヘルペスウイルス属、*pneumocystis jiroveci* に対する予防内服を行った。好中球生着後から週 1 回、CMV 再活性化のモニタリングを行った。方法は CMVpp65 抗原に対するモノクローナル抗体を用いて、ペルオキシダーゼ法により白血球中の CMV 抗原陽性細胞を検出する C10/C11 法にて施行した。そして血縁者間移植、非血縁者間移植ともに 2 スライドで合計 20 個以上の陽性細胞を認めた場合、ガンシクロビル、もしくはバラガンシクロビルにて pre-emptive therapy を開始した。実際に CMV 感染症を発症した場合はこれらの薬剤を治療量使用することとした。

Allo-HCT 後、1-3 ヶ月毎にレシピエントの末梢血検体を採取した。採取した末梢血はリンホプレップ (Axis-Shield PoC AS, Dundee, Scotland) を用いて密度勾配遠心を行い、末梢血単核球区分 (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) を採取し、凍結保存した。

本試験はヘルシンキ宣言の精神に則り、自治医科大学倫理審査委員会の承認

を受け、計画書を遵守して実施された。レシピエント全例につき、末梢血検体の採取および研究使用に関し書面にて同意を得ている。ただし、非血縁ドナーに関しては匿名性の観点から同意を取得することは難しく、よって、本研究にドナー検体は使用していない。

2.2.2 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のモニタリング

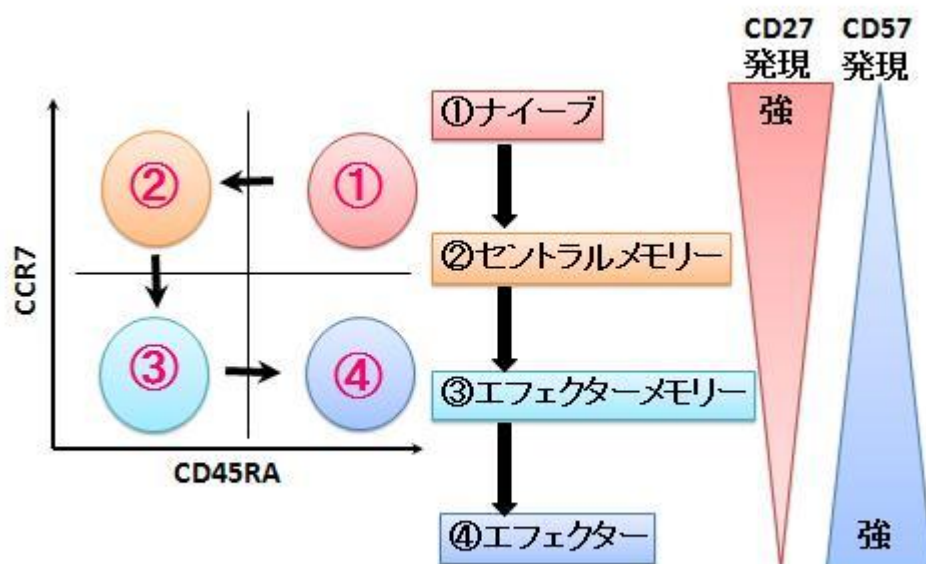
PBMC は最初に、CMV-pp65₃₄₁₋₃₄₉ ペプチド (QYDPVAALF) を提示した HLA-A*2402 テトラマーにフィコエリスリンを結合した試薬 (CMV-pp65-テトラマー) (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) を加え室温で 30 分反応させた。次に、PBMC に抗ヒト CD8-APC-Cy7、CCR7-PE-Cy7、CD27-PerCP-Cy5.5、CD45RA-APC、CD57-FITC 抗体 (BD Biosciences, Tokyo, Japan) を加え、氷上で 25 分反応させた。このようにして PBMC を染色した後、5% ウシ胎児血清を含むリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) にて洗浄し、FACS AriaII (BD Biosciences) を用いてフローサイトメトリーにて表面抗原解析を施行した。CMV-CTL は CD8 陽性かつ CMV-pp65-tetramer 陽性細胞と定義した。データは FACS Diva ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて解析した。

各症例において、CMV-CTL モニタリングは同種移植後 day30 (±7 日)、day60 (±7 日)、day90 (±14 日)、day180 (±30 日)、そして 1-1.5 年の 5 ポイントにつき解析した。ただし、症例 1 は移植後混合キメラが持続し、1 年 11 ヶ月時にドナーリンパ球輸注を施行したため、ドナーリンパ球輸注の前後 1 ヶ月のポイントにおいても解析を施行した。また、症例 2 は day30 の時点で CMV-CTL が存在しなかったため、day60 以降の 4 ポイントで解析を行った。

解析時、T 細胞は CD45RA と CCR7 の発現パターンにより CD45RA 陽性 CCR7 陽性ナイーブ T 細胞、CD45RA 陰性 CCR7 陽性セントラルメモリー T 細胞、CD45RA 陰性 CCR7 陰性エフェクターメモリー T 細胞、CD45RA 陽性 CCR7 陰性エフェクター T 細胞に分類した (図 5)^{27, 28}。同様に CD27 と CD57 の発現パターンにより T 細胞の成熟度を CD27 陽性 CD57 陰性未熟 T 細胞、CD27 陰性

CD57 陽性成熟 T 細胞に分類した(図 5)^{29, 30}。

図 5 T 細胞の分化・成熟



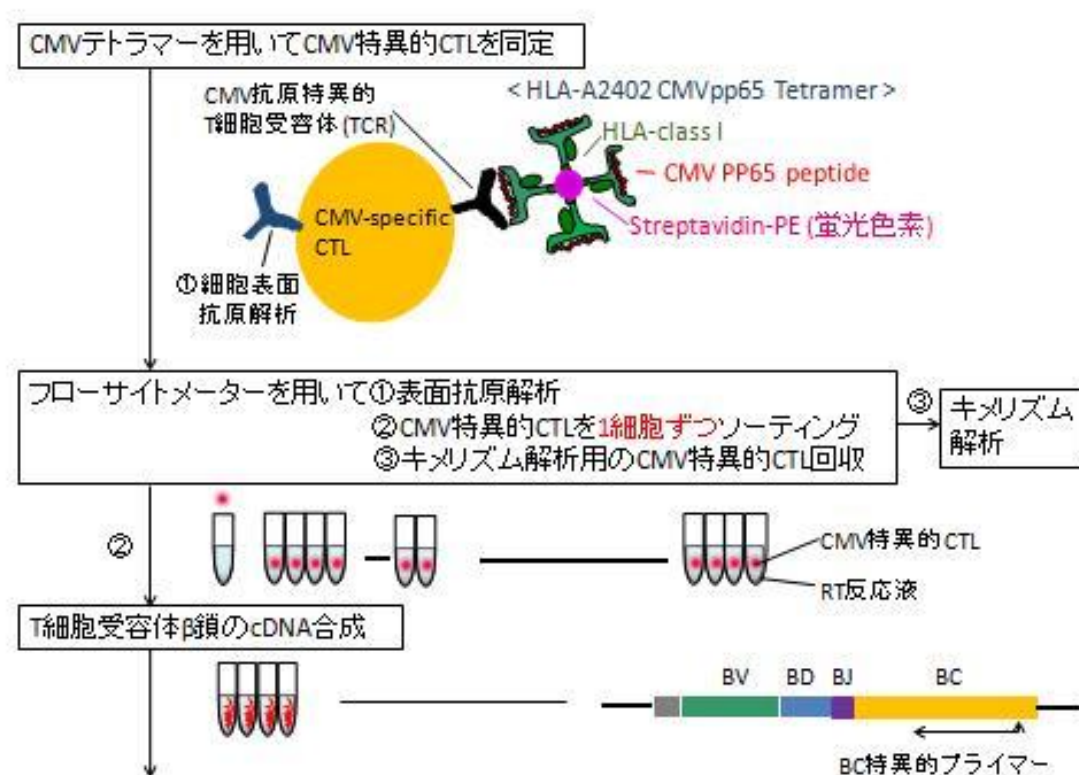
2.2.3 direct single-cell analysis 法を用いた HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の T 細胞受容体 β 鎖の解析

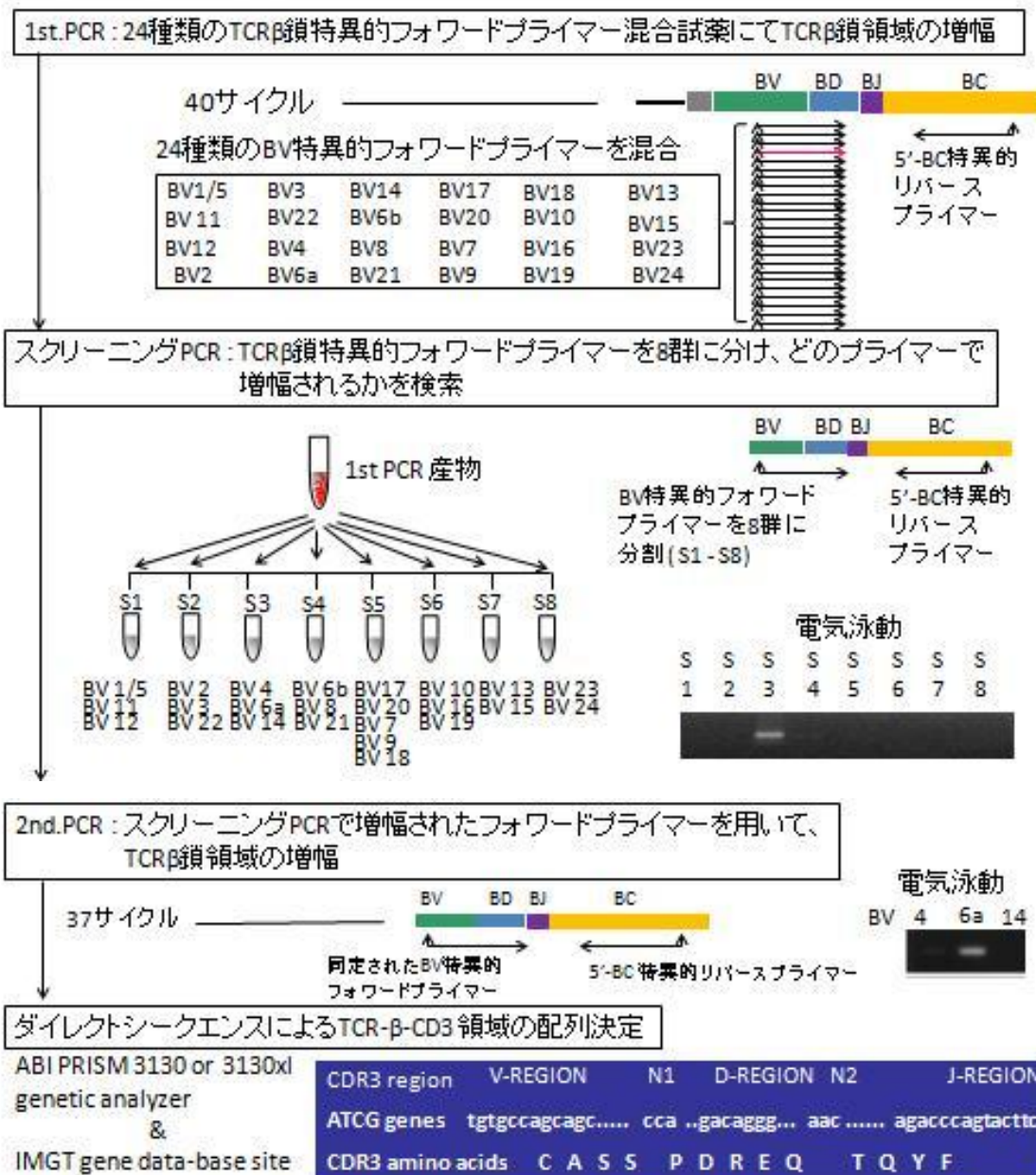
図 6 に direct single-cell analysis の方法を示す。CMV-CTL の T 細胞受容体 β 鎖の解析は、前項に示した表面抗原解析に使用した細胞と同じ細胞を引き続き使用した。まず FACS Aria II を用いて、CMV-CTL を一細胞ずつ、逆転写酵素等の試薬を含んだ PCR チューブへ直接ソーティングした。各ポイント 120 細胞をソーティングしたが、症例 2 の 1 年目の解析のみ、細胞数不足のため 96 細胞をソーティングした。次に、ソーティングした CMV-CTL を、TRIZOL[®] (Life Technologies, Foster City, CA, USA) を用いて溶解した。そして溶解した細胞中の mRNA の逆転写反応を行い、T 細胞受容体 β 鎖の相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) を作成した。作成された cDNA を用いて、24 種類の BV 特異的プライマーと BC 特異的プライマーを混合した試薬にて

1st.PCR を施行した。次に、24 種類の BV 特異的プライマーを 8 群に分け、1st.PCR 産物を鋳型としてスクリーニング PCR を施行した。この PCR 産物をアガロースゲルで電気泳動し、増幅に寄与したプライマー群を同定した。そして、再度、1st.PCR 産物を鋳型として同定したプライマー群に含まれる BV 特異的プライマーを各々用いて 2nd.PCR を施行した。2nd.PCR 産物も同様にアガロースゲルで電気泳動し、最終的に増幅に寄与している BV 特異的プライマーを 1 種類同定した。

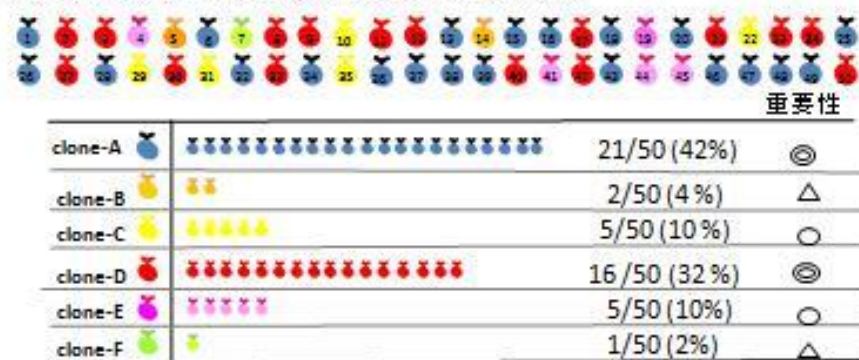
その後、2nd.PCR 産物から DNA を精製し、同定した BV 特異的プライマーを用いてサーマルサイクリングを行った。最後に、ABI 3130 もしくは 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いたダイレクトシーケンス法にて CMV-CTL の CDR3 領域の塩基配列を決定した。

図 6 direct single-cell analysis





CDR3 repertoire解析T細胞 (50細胞解析した場合)

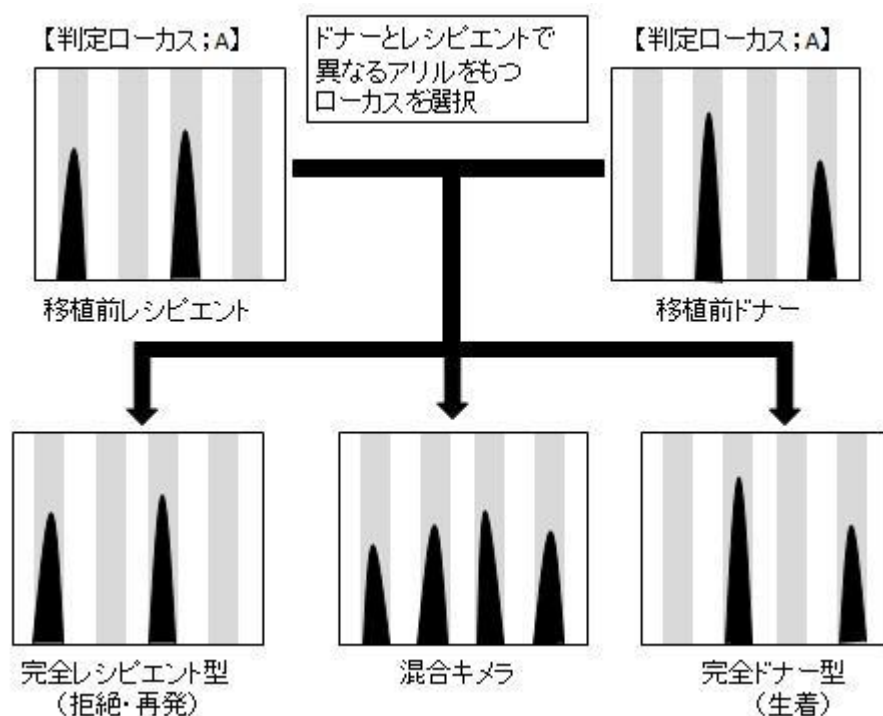


2.2.4 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析

前項の T 細胞受容体 β 鎖の解析に用いる CMV-CTL をソーティングした後、残った CMV-CTL を全て FACS Aria II を用いて回収し、キメリズム解析に使用した。ただし、症例 1 では移植後 30 日、60 日の CMV-CTL は細胞数不足のため回収不能であった。回収可能であったポイントにおいて、CMV-CTLs は症例 1 では中間 153 細胞（範囲：21-402 細胞）、症例 2 では中間 70 細胞（範囲：32-135 細胞）、症例 3 では中間 100 細胞（範囲：82-362 細胞）であった。各症例において初めて CMV-CTL が同定されたポイント（症例 1 および症例 3 は day30、症例 2 は day60）および症例 1 の移植後 1-1.5 年のポイントでは PBMC の細胞表面抗原染色を新たに行い、造血細胞集団として CD45 陽性、骨髓系細胞集団として CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD4 陽性 T 細胞集団として CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD8 陽性 T 細胞集団として CD3 陽性かつ CD8 陽性、および B 細胞集団として CD19 陽性の各細胞集団を FACS Aria II を用いてソーティングした。

前述のソーティングにて回収した CMV-CTLs、CD45 陽性、CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD3 陽性かつ CD8 陽性、および CD19 陽性の細胞集団はそれぞれ、QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA の抽出を行った。また、これらの DNA がレシピエント由来の DNA か否かを同定するため、各症例の移植前レシピエント PBMC からも同様に DNA を抽出した。抽出した DNA は Power Plex16 system (Promega, Madison, WI) を用いて 15 縦列型反復配列 (short tandem repeat, STR) ローカスとアメロゲニンの合計 16 ローカスを同時に PCR 法にて増幅し、ABI 3130 もしくは 3130xl Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて STR タイピングを行うことで、キメリズム解析を施行した。データは GeneMapper v4.1 ソフトウェア (Life Technologies) を用いて解析した（図 7）。判定に関して、症例 1 は性別不適合移植であったため、アメロゲニンを判定ローカスとした。症例 2 および症例 3 は、移植前と移植後のレシピエント DNA にて相違を認めた遺伝子座にて判定した。具体的に症例 2 は TH01 および vWA ローカスを、症例 3 は vWA ローカスと D5S818 ローカスをそれぞれ判定ローカスとした。

図 7 キメリズム解析の模式図



2.2.5 単細胞からの CMV-CTL クローン樹立

最初に、10% ヒト AB 血清 (Sigma Genosys, Tokyo, Japan)、5 μ g/mL PHA、200 IU/mL IL-2、およびマイトマイシン C (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 処理を施したフィーダー細胞を含む AIM-V (Life Technologies) を 96 ウェルプレートに満たした。次に、このウェルに直接、CD8 陽性かつ CMV-tetramer 陽性 T 細胞を FACS Aria II を用いて 1 細胞ずつソーティングした。その後、ヒト AB 血清および IL-2 を添加した AIM-V を加えながら CMV-CTL を培養した。2 週間後、細胞増殖を認めたウェルの細胞を CD3、CD8、CMV-tetramer で染色し、増殖した細胞が CMV-CTL かどうかの判定を行った。CMV-CTL であった場合、前項の CMV-CTL モニタリングと同様の方法にて CMV-CTL の CDR3 領域の塩基配列を解析し、クローンを同定した。培養開始から 3 週間後、確立した CMV-CTL クローンをを用いて IFN- γ ELISPOT 解析を施行した。

このようにして症例 1 では、移植後 1521 日に採取した CMV-CTL からクローンを樹立した。症例 2、症例 3 においても同様の方法にて CMV-CTL クロー

ン樹立を試みたが成功しなかった。

2.2.6 CMV-CTL クローンの IFN- γ ELISPOT 解析

CMV-CTL クローンからの IFN- γ 産生能を評価するため、IFN- γ ELISOT kit (MABTECH, Nacka Strand, Sweden) を用いて IFN- γ ELISPOT 解析を施行した。標的細胞は T2-A24 細胞 (慶応大学河上裕教授より御好意で頂いた) を選択した。最初に、IFN- γ 特異的モノクローナル抗体を固層表面に固定化した。次に、T2-A24 細胞に 10 μ g/mL の CMV-pp65₃₄₁₋₃₄₉ ペプチド (QYDPVAALF)、もしくは 10 μ g/mL の HIV env gp 160 ペプチド (RYLRDQQLL) (Sigma Genosis) を混合し 37 度で 1 時間反応させた。また、ポジティブコントロールとして 5 μ g/mL の PHA を加えた T2-24 細胞も用意した。その後、CMV ペプチド、HIV ペプチド、PHA の何れかを添加した標的細胞 (1×10^4 cells/well) に樹立した CMV-CTL クローン (1×10^4 cells/well) を加え、37 度で 24 時間、共培養を行った。培養後にウェルを洗浄し細胞を除去した後、ビオチン標識抗 IFN- γ 抗体を添加し 2 時間反応させた。再度洗浄後、ストレプトアビジン/ペルオキシダーゼ複合体を添加し 1 時間反応させた。更に洗浄後、発色基質 (True blue peroxidase substrate, TMB) を添加しスポット出現を確認した。得られたスポットは ELIPHOTO カウンター (Minerva Tech, Tokyo, Japan) を用いてカウントを行った。

2.3 結果

2.3.1 臨床経過および HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の発現頻度

患者背景を表 1 に示す。3 例全例で生着を認め、かつ CMV 感染症の発症は認めなかった。症例 1 および症例 3 は移植後 day30 から、症例 2 は移植後 day60 から CMV-CTLs が検出された。

表 1 患者背景

	レシピエント			ドナー				移植 前処置	GVHD 予防	CMV 再活性化
	疾患	年齢	性別	血縁 / 非血縁	移植源	年齢	性別			
症例 1	AA	22	女性	血縁	末梢血 幹細胞	24	男性	Flu+CY +ATG-G	CsA+MTX	認めず
症例 2	AML	64	男性	非血縁	骨髓	23	男性	Flu+Mel	CsA+MTX	移植後早期のみ
症例 3	BPDC neoplasm	58	男性	非血縁	骨髓	21	男性	Flu+TBI	CsA+MTX	移植後早期、 6ヶ月、1.5年

脚注: AA; 再生不良性貧血、AML; 急性骨髄性白血病、BPDC neoplasm; 芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍、Flu; フルダラビン、CY; シクロホスファミド、ATG-G; 抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリン、Mel; メルファラン、TBI; 全身放射線照射、CsA; シクロスポリン、MTX; メトトレキサート

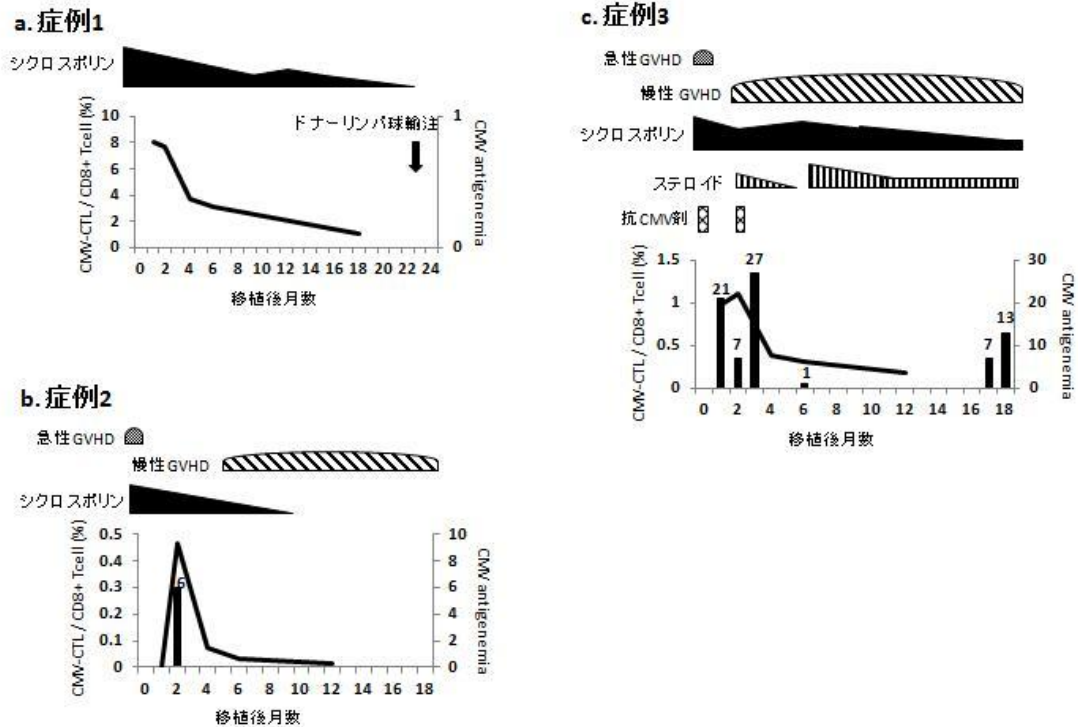
移植後の臨床経過を図 8 に示す。症例 1 は移植後経過中、急性・慢性 GVHD の発症を認めなかった。しかしながら生着後も長期間にわたり汎血球減少が持続し、骨髓・末梢血キメリズム解析では混合キメラが持続していた。このため造血回復を期待し、移植後 1 年 11 ヶ月にドナーリンパ球輸注を施行したが、その後も汎血球減少は持続した。

症例 2 は移植後 50 日に CMV 再活性化を一度のみ認めたが、抗ウイルス薬による pre-emptive therapy を要することなく陰性化した。GVHD に関しては grade2 acute GVHD および mild chronic GVHD (口腔・肝臓病変) の合併を認めた。急性・慢性 GVHD とともに非重篤であり、GVHD 管理のためにシクロスポリンの増量やステロイドの全身投与を要することはなかった。

症例 3 は移植後 30 日から 3 ヶ月までの間、6 ヶ月、1 年以降に CMV 再活性化を認めた。このためプロトコールに則り、ガンシクロビルもしくはバラガンシクロビルによる pre-emptive therapy を行った。本症例は生着後 grade1 acute GVHD を合併し、更に移植後 5 ヶ月から severe chronic GVHD (皮膚、肝臓、

眼、口腔、筋病変)を合併した。慢性 GVHD 管理のためにシクロスポリン増量およびステロイドの全身投与を要した。

図 8 各症例の移植後経過



CMV-CTL の同定方法を図 9 に示す。2.2.2 で示した通り染色した PBMC を FACS Aria II にて解析した。最初に forward scatter (FSC) と side scatter (SSC) で展開し、PBMC の細胞集団を同定した。次にソーティングの純度を高めるために、FSC と SSC の width を用いてダブルレットを除去した。ダブルレット除去後の PBMC (図 9 における P3 分画) を CD8 および CMV テトラマーで展開し、double positive の細胞集団を CMV-CTL と同定した (図 9 における P4 分画)。

図 9 CMV-CTL の同定方法

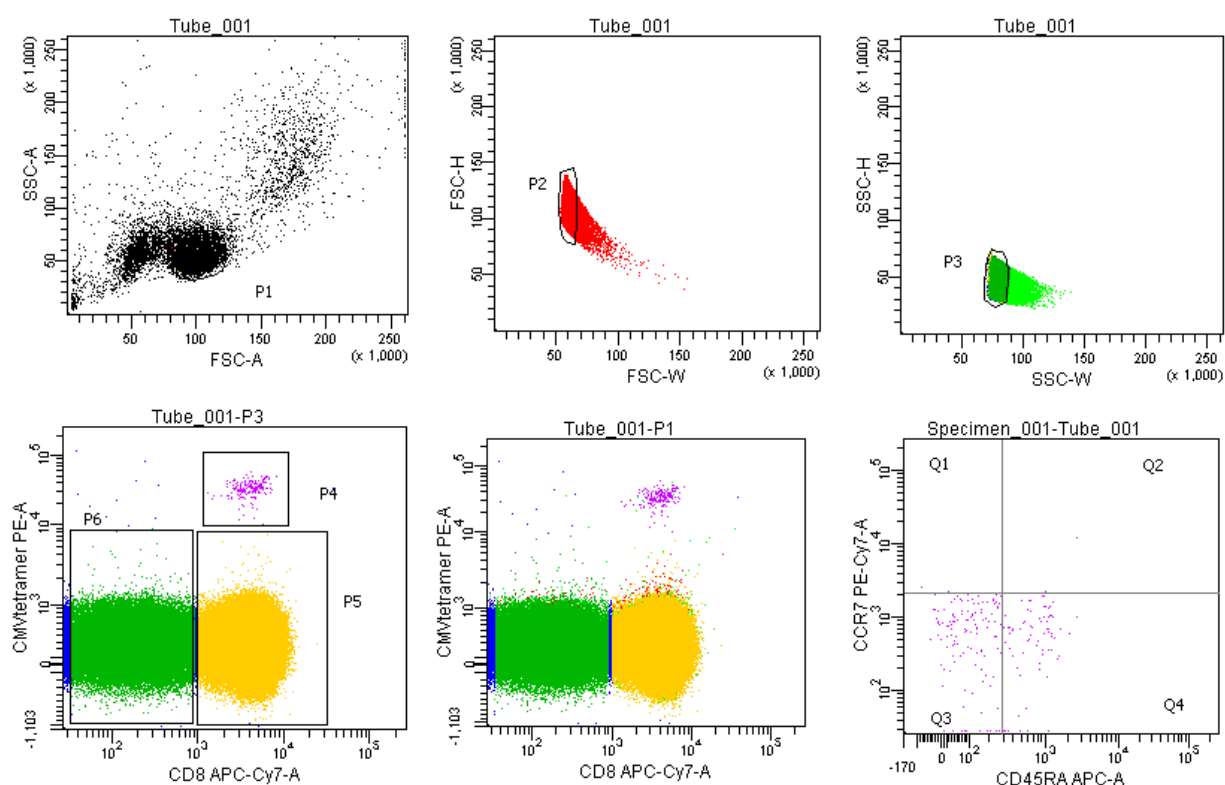


表 2 に移植後経過における白血球数、リンパ球数、CD8 陽性 T 細胞数、および CD8 陽性 T 細胞に占める CMV-CTL の割合を示した。症例 1 は移植後 30 日の時点で CMV-CTL が CD8 陽性 T 細胞の 8.1%を占めていたが、3 ヶ月後には 3.7%、1.5 年後には 1.1%と減少傾向を認めた。症例 2 では経過中を通じて CMV-CTL が CD8 陽性 T 細胞の 0.5%を超えることはなかった。症例 3 では、移植後 2 カ月までは CMV-CTL が CD8 陽性 T 細胞の約 1%を占めたが、その後減少傾向を認めた。

表 2 移植後血球数の推移

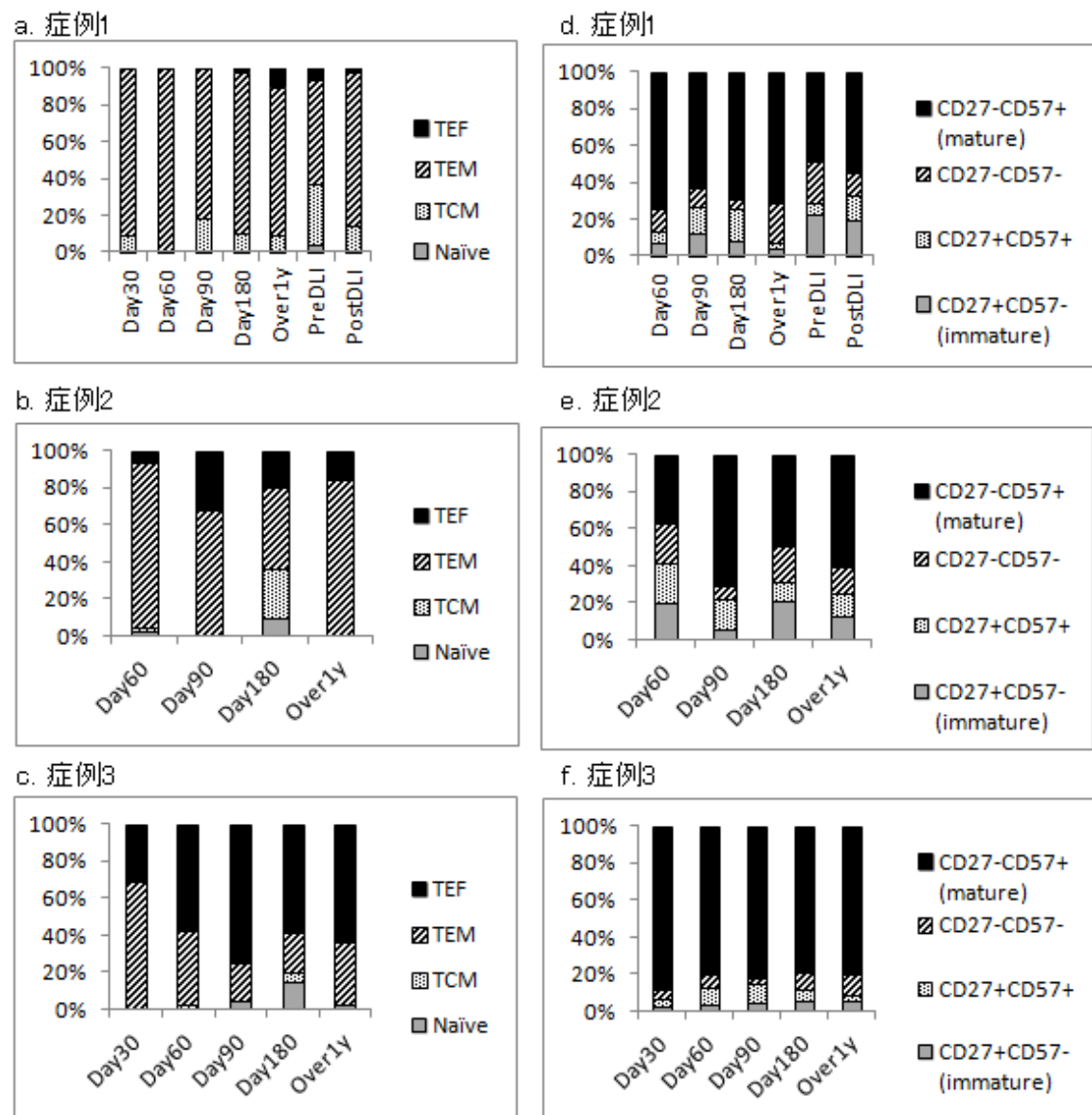
	移植後 日数	白血球数 (μ L)	リンパ球数 (μ L)	CD8 陽性 T 細胞数 (μ L)	CD8 陽性 T 細胞に占める CMV-CTL の割合 (%)
症例 1	day30	1500	180	2	8.1
	day60	2240	627	10	7.7
	day90	2300	644	4	3.7
	day180	2710	569	3	3.2
	1.5y	1190	714	3	1.1
症例 2	day60	5460	1529	1	0.5
	day90	4550	3276	1	0.1
	day180	8020	4571	1	0.03
	1y	7630	4349	0.4	0.01
症例 3	day30	2990	329	2	1.0
	day60	1450	493	3	1.1
	day90	1720	533	1	0.4
	day180	5530	1825	3	0.3
	1y	5030	2113	3	0.2

2.3.2 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の分化・成熟

CMV-CTL の分化段階及び成熟度を図 10 に示す。分化段階は CD45RA と CCR7 の発現パターンにより評価した。3 例全例において観察期間を通じて、CD45RA 陰性 CCR7 陰性エフェクターメモリーT 細胞、および CD45RA 陽性 CCR7 陰性エフェクターT 細胞が大多数を占めていた。詳細には、CMV の再活性化を認めなかった症例 1 と、CMV の再活性化を認めたものの無治療にて速やかに CMV アンチゲネミアの陰性化を認めた症例 2 では、エフェクターメモリーT 細胞が最も主要な構成要素であった。一方、pre-emptive therapy を要する CMV アンチゲネミアの増加を認めた症例 3 では、エフェクターT 細胞が最も多くの割合を占めていた。

CMV-CTL の成熟度に関しては、3 例全例において CD27 陰性 CD57 陽性の成熟した T 細胞が主要分画を構成していた。この傾向は CMV 再活性化を頻回に認めた症例 3 において特に顕著であり、経過中、CMV-CTL の約 80%を CD27 陰性 CD57 陽性が占めていた。

図 10 CMV-CTL の分化段階及び成熟度



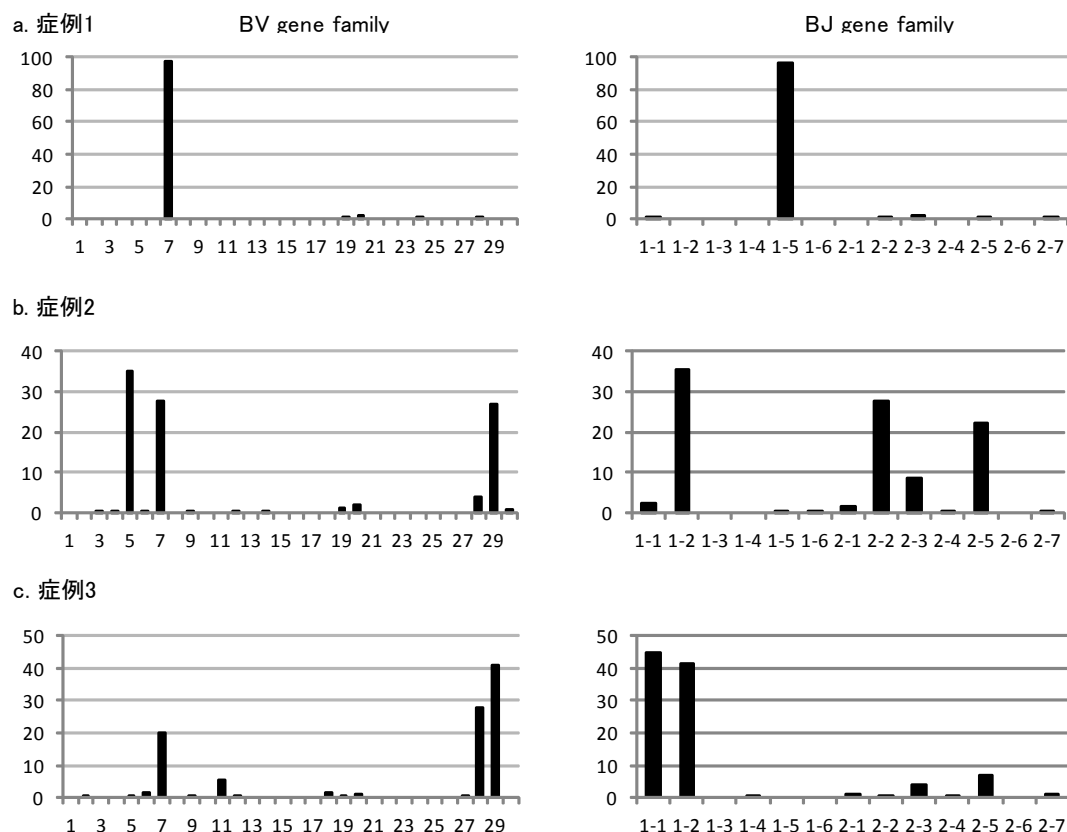
T_{EF} ; エフェクターT細胞、 T_{EM} ; エフェクターメモリーT細胞、
 T_{CM} ; セントラルメモリーT細胞、Naïve; ナイーブT細胞

2.3.3 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のクローン型

症例 1 では 472 細胞、症例 2 では 317 細胞、症例 3 では 495 細胞、合計 1284 細胞に関して、CTM-CTL のクローン型を同定した。ソーティングした細胞数に占める解析細胞数の割合は、症例 1 が 66% (範囲: 23-77) 、症例 2 が 75.5% (範囲: 41-91)、症例 3 が 85% (範囲: 68-94) であった。

CMV-CTL の BV および BJ gene family の使用割合を図 11 に示す。BV gene family に関して、症例 1 では BV7 が CMV-CTL の 9 割以上を占めていた。症例 2 では BV5、BV7、BV29 の 3 種類の BV gene family が、同様に症例 3 では BV7、BV28、BV29 の 3 種類の BV gene family が頻回に用いられていた。3 例全例で BV7 が使用され、症例 2 と症例 3 では BV29 が共通して用いられる傾向を認めた。一方 BJ gene family に関しては、症例 2 と症例 3 で 1-2 が共通して用いられていたものの、3 症例で共通して使用される BJ gene family は認めなかった。

図 11 CMV-CTL の BV および BJ gene family の使用割合



CMV-CTL のクローン型を CDR3 の配列により分類した推移を図 12 に示す。各ポイントにおいて一度でも 5%以上検出されたクローン型を記載した。症例 1 は 3 種類、症例 2 は 7 種類、症例 3 は 6 種類のクローン型が検出された。

全症例において、移植後早期に同定された CMV-CTL クローン型がその後も検出され、かつ主要クローンを占めていた。CMV の再活性化を認めなかった症例 1 では、単一の CDR3 配列を有する CMV-CTL クローン型（クローン ID 1-1; CASSSNQGAGGNQPQHF）が移植経過中 9 割以上を占めていた。症例 1 では移植後 1 年 11 ヶ月にドナーリンパ球輸注を施行したが、その後の解析でもクローン ID 1-1 が 92.1%を占めており、新たなクローン型の出現は認めなかった。

症例 2 では CMV 再活性化前の移植後 30 日間の解析では CMV-CTL が検出されなかった。移植後約 50 日で CMV の再活性化を認め、移植後 60 日の時点では 4 種類の CMV-CTL クローン型（クローン ID 2-1、2-4、2-6、2-7）が主要なクローンとして検出された。移植後 90 日以降はクローン ID 2-6 が減少し、残りの 3 種類のクローン型（クローン ID 2-1、2-4、2-7）が 8 割以上を占める状態が続いた。経過中に検出されたクローンは全て移植後 60 日の時点で検出されたクローンであり、移植後 90 日以降に新たなクローンの出現を認めることはなかった。

症例 3 では移植後 30 日の時点では単一の CMV-CTL クローン型（クローン ID 3-6）が 87%を占めていた。移植後約 40 日から CMV の再活性化を認め、その後に施行した移植後 60 日の解析では、新たにクローン ID 3-2 および 3-4 の台頭を認めた。これらのクローンはその後も主要クローンとして保持された。また、移植後 30 日の時点で主要クローンであったクローン ID 3-6 に関しても、割合は減少したものの、25%以上を占める状態が持続した。よって 3 種類のクローン（クローン ID 3-2、3-4、3-6）が経過中にわたり主要クローンとして保持され続けた。

CDR3 配列に関して、症例間で同一の配列は認めなかった。しかしながら、3 症例全てにおいて QGA モチーフが検出された。さらに、症例 1 と症例 2 では TGE および TDT モチーフが、症例 2 と症例 3 では RDRG モチーフが共に検出

された。各々の症例内では症例 2 では DPG モチーフが、症例 3 では TPY モチーフが 2 つのクローン型で検出された。

図 12 CMV-CTL のクローン型

症例	クローン ID	BV	CDR3 領域のアミノ酸配列	BJ	各CMV-CTLバリエーションの割合						
					day30	day60	day90	day180	1-1.5y	Pre DU	Post DU
a. 症例1	1-1	BV7	C A S S S N Q G A G N Q P Q H F	BJ1-5	100.0	98.2	100.0	98.8	94.3	95.7	92.1
	1-2	BV19	C A S S P G S T G E L F F	BJ2-2					5.7		
	1-3	BV20	C S A S L R S T D T Q Y F	BJ2-3						3.3	5.3
	1-4	Others			1.8			1.2		1.1	2.6
b. 症例2	2-1	BV5	C A S G D P G Q D F G G Y T F	BJ1-2	26.5	47.6		36.1	21.8		
	2-2	BV5	C A S S D P G D S L N G Y T F	BJ1-2		6.1					
	2-3	BV7	C A S S P F Q G A A E A F F	BJ1-1	6.1						
	2-4	BV7	C A S S L L T A Q E T Q Y F	BJ2-5	10.2	21.4		14.4	33.3		
	2-5	BV7	C A S S V I A G N T D T Q Y F	BJ2-3	8.2			8.2	2.3		
	2-6	BV28	C A S S I R D R G D T Q Y F	BJ2-3	10.2	2.4					
	2-7	BV29	C S V P T S G T T G E L F F	BJ2-2	20.4	17.9		29.9	35.6		
	2-8	Others			12.2	10.7		11.3	6.9		
c. 症例3	3-1	BV7	C A S S S N Q G A P A F F	BJ1-1				2.0	12.7		
	3-2	BV7	C A S S P E T P Y R Y G Y T F	BJ1-2	2.7	20.2	22.2	16.7	14.5		
	3-3	BV1	C A S S E Q S T T P Y G Y T F	BJ1-2		6.7	7.4	7.8	5.5		
	3-4	BV28	C A S K F R D R G Q G Y T F	BJ1-2	8.8	22.5	19.8	26.5	28.2		
	3-5	BV28	C A S K T R D S G E T Q Y F	BJ2-5		7.9	8.6	11.8	6.4		
	3-6	BV29	C S A N P T G G G T E A F F	BJ1-1	87.3	29.2	32.1	25.5	25.5		
	3-7	Others			3.5	13.5	9.9	9.8	7.3		

DU: ドナーリンパ球輸注、3例全例で共通したモチーフを下線で示す

2.3.4 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL のキメリズム解析

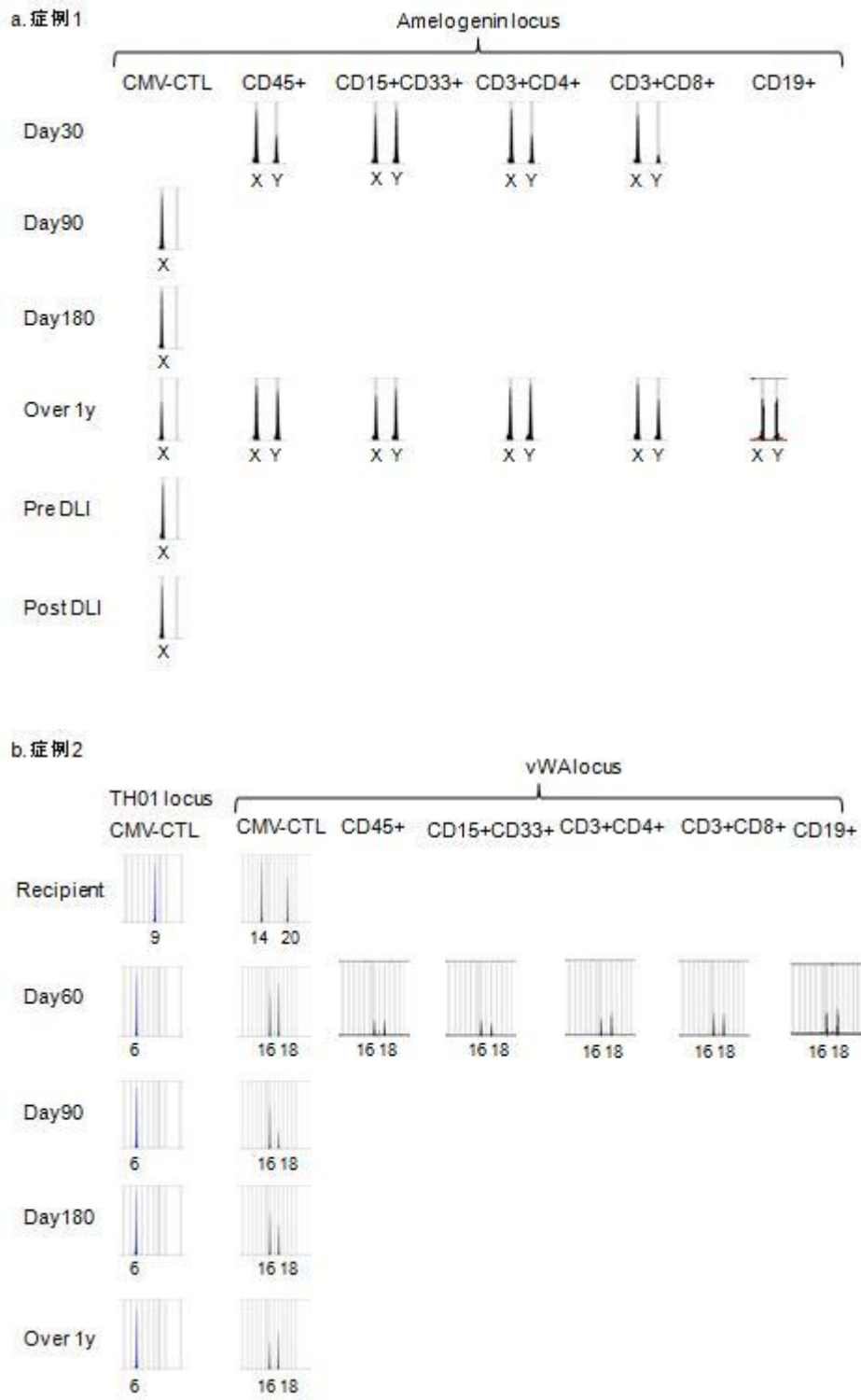
キメリズム解析の結果を図 13 に示す。症例 1 では、移植後 30 日、1.5 年両ポイントの CD45 陽性、CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD3 陽性かつ CD8 陽性細胞の細胞集団、および 1.5 年の CD19 陽性細胞集団は、全てが混合キメラであった。しかしながら CMV-CTL に関しては、アメロゲニンローカスにおいてドナー由来を示す Y アリルは一貫して検出されず、X アリルのみが検出された。ドナーリンパ球輸注後の解析においても、Y アリルが検出されることはなかった。これより、移植後 2 年間にわたり、CMV-CTL は専らレシピエントに由来していたことが判明した。すなわち、他の細胞集団は混合キメラであるにもかかわらず、CMV-CTL のみが完全にレシピエント由来という乖離した状態が持続していることが判明した。

症例 2 では移植前レシピエント細胞を用いた解析にて、レシピエントは TH01 ローカスのアリル 9 および、vWA ローカスのアリル 14 および 20 が陽性であることを確認している。移植後 CMV-CTL では、全ての解析ポイントにおいて TH01 ローカスはアリル 6 が、vWA ローカスはアリル 16 および 18 が陽性であった。つまり、移植後 60 日の時点から CMV-CTL は完全ドナー由来であることが判明した。また、移植後 60 日での CD45 陽性、CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD3 陽性かつ CD8 陽性、CD19 陽性の細胞の細胞集団に関しても TH01 および vWA ローカスにつき解析したところ、これらの細胞集団も完全ドナー由来であることが判明した。

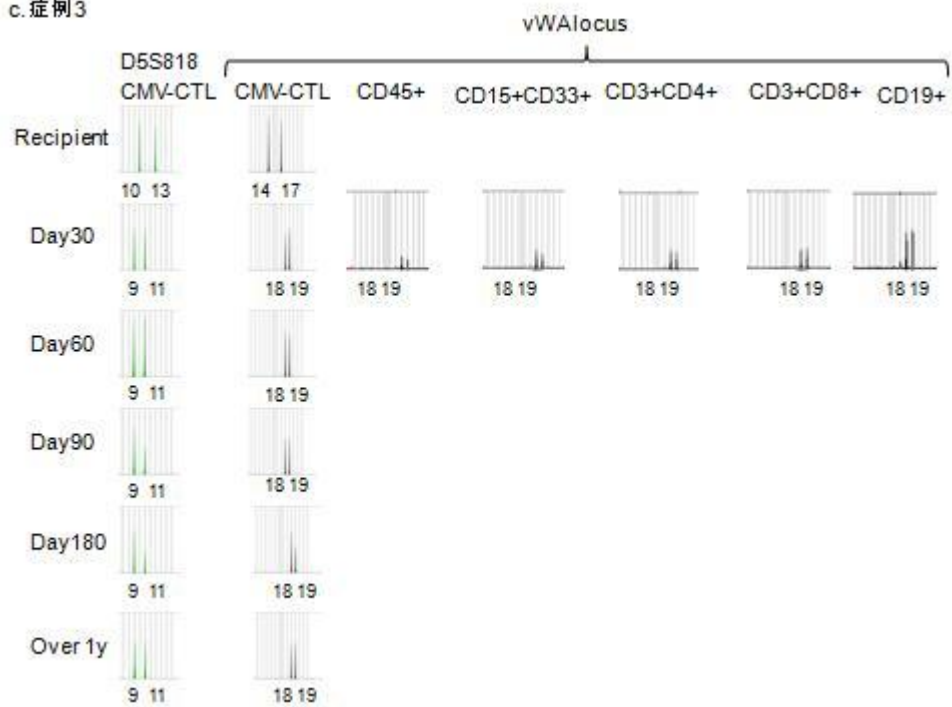
症例 3 では移植前レシピエント細胞を用いた解析にて、レシピエントは D5S818 ローカスのアリル 10 および 13 が、vWA ローカスのアリル 14 および 17 が陽性であることを確認している。一方、CMV-CTL は全ての解析ポイントにおいて D5S818 ローカスはアリル 9 および 11 が、vWA ローカスはアリル 18 および 19 が陽性であった。つまり、移植後 30 日の時点から CMV-CTL は完全ドナー由来であることが判明した。また、移植後 30 日での CD45 陽性、CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD3 陽性かつ CD8 陽性、CD19 陽性の細胞の細胞集団に関しても D5S818 および vWA ローカスにつき解析した

ところ、CMV-CTL 同様に完全ドナー由来であった。

図 13 キメリズム解析



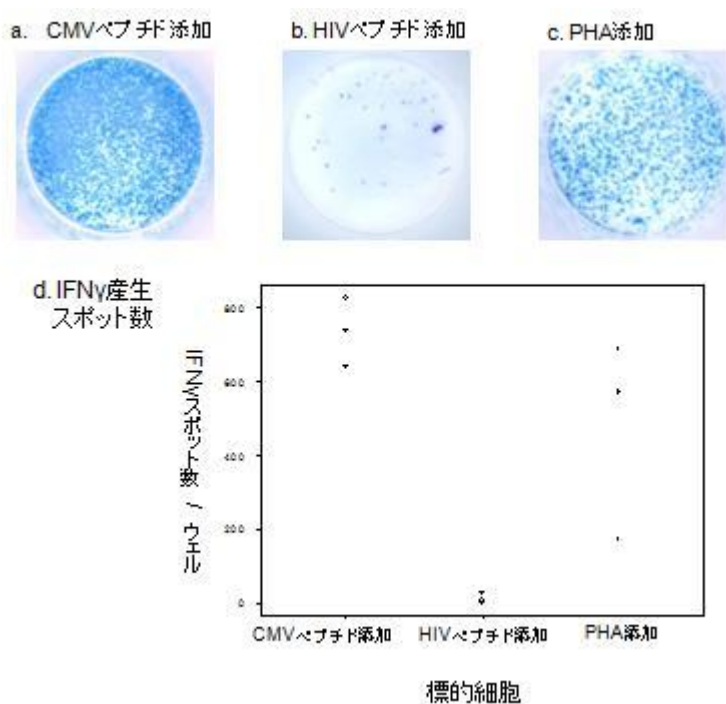
c. 症例3



2.3.5 CMV-CTL クローンの IFN- γ ELISPOT 解析

症例 1 において最も有意であったクローン型 ID1-1 (CDR3 領域のアミノ酸配列 ; CASSNQGAGGNQPQHF) につき、クローン樹立に成功した。本クローンをを用いた ELISPOT 解析の結果を図 14 に示す。本クローンは、CMV ペプチドを提示させた T2-A24 細胞との共培養において、著明な IFN- γ 産生を認めた。一方、HIV ペプチドを提示させた T2-A24 との共培養では IFN- γ 産生は乏しく、CMV ペプチド提示細胞を認識し、特異的に傷害していることが確認できた。

図 14 CMV-CTL クローンでの INF- γ ELISPOT 解析



3. 考察

Direct single-cell analysis を用いて、HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の T 細胞受容体 β 鎖の解析を 3 組のレシピエント CMV 既感染、ドナーCMV 未感染のペアで施行した。CMV-CTL の大多数はエフェクターメモリーもしくはエフェクターT細胞であった。約 1300 細胞の解析にて、症例間に共通した CDR3 配列を有する CMV-CTL クローン型は存在しなかったものの、各症例内で CDR3 内に特定のアミノ酸モチーフを共有していることが判明した。かつ、各症例においては特定の BV gene family が用いられる傾向を認めた。更に、移植後早期に同定されたクローン型が、その後も長期間にわたり主要クローンとして保持されることが明らかとなった。また、症例 1 の CMV-CTL は、移植後 2 年間にわたり完全にレシピエント由来であった。加えて、このレシピエント由来の CMV-CTL は CMV ペプチド提示 T2-24 細胞に対して明らかな IFN γ 産生を認めており、CMV 感染細胞に対する細胞傷害活性が存在することが示唆された。

Allo-HCT 後の CMV 感染症において、CMV-CTL の再構築は極めて重要な役割を果たしている^{11, 13, 19, 31, 32}。血清学的 CMV 陽性のレシピエントと血清学的 CMV 陰性のドナー間での移植では、CMV 再活性化のリスクが高いと言われている^{7, 23}。その理由の一つとして、移植源からのドナー由来 CMV-CTL の供給が皆無であることが挙げられる¹⁹。それゆえ、ドナー由来の幹細胞はレシピエント胸腺で教育を受けた後、CMV 再活性化に対応するために速やかに CMV-CTL へと分化・増幅する必要がある¹¹。CMV 再活性化への対応という観点から考えると、今回解析した CMV-CTL の大半がエフェクターメモリーもしくはエフェクターT細胞であった理由も、CMV 再活性化に対抗するために、より細胞傷害活性を有する段階へ分化していたためと考えられる^{33, 34}。特に症例 3 に関しては、慢性 GVHD の管理に対して免疫抑制剤の増量と全身性のステロイド投与を要したため、CMV 再活性化を頻回に認めていた。本症例においてエフェクターT細胞が著しく増加した理由は、CMV 感染症発症を抑止するためであったと考えられる³⁵。一方、CMV 再活性化に対する治療を要さなかった症例 1 および症例 2 では CMV 感染症に速やかに対抗できるよう、エフェクターメモリーT細胞

胞の段階で待機していた可能性が考えられる。CMV-CTL の成熟段階に関しては、既報と同じく成熟傾向を認めた^{30, 36}。

これまでの報告で HLA-A*0201 を有する健常ドナーの CDR3 領域は特定の BV gene family (BV3、14、21、23、11) が使用される傾向にあり、また似通ったモチーフを有すると報告されている³⁷。他の報告においても、CMV 感染時に特定の BV gene family が選択されるとの報告がある^{14, 38, 39}。しかしながら、これらの報告では、CMV-CTL クローン型の同定・定量の手法として *in vitro* での培養や細菌形質転換を用いている。これらの方法ではクローン型により培養速度や形質転換効率が異なるため、正確な *in vivo* における状況を反映していない可能性を否定できない¹⁵。それゆえ、我々は *in vivo* での CMV-CTL の動態をより正確に評価するため direct single-cell analysis 法を用いて解析した。今回の解析では、日本人に特に多い HLA-A*2402 を有する Allo-HCT 後患者において、特定の BV gene family が用いられる傾向を認めた。更に、我々が以前に CMV 血清学的陽性 HLA*-A2402 レシピエントに関して解析した報告と同様、BV5 および BV7 が頻回に使用される傾向を認めた¹⁵。これらの報告から、同種移植後の CMV-CTL は HLA 拘束性に特定の BV gene family を選択する傾向があるのかもしれない¹⁴。

骨髄破壊的前処置を用いた Allo-HCT と比較し、骨髄非破壊的前処置を用いた Allo-HCT では移植後の CMV 感染症の発症が遅い傾向にある。これは、移植後早期は、残存するレシピエント由来の T 細胞が CMV 感染症防御を担っているためではないかと推測されている^{40, 41}。実際、いくつかの報告では Allo-HCT 後、レシピエント由来の抗ウイルス T 細胞が残存していることを STR 法により証明している^{23, 24, 42}。しかしながら、これらは全血や CD3 分画、もしくは CD8 分画を用いて解析しているため、ウイルス特異的 CTL に限定したキメリズムは明らかではなかった。CMV-CTL について、直接キメリズム解析を行った報告はこれまでに 1 報のみである。Gandhi らは、血清学的 CMV 陰性ドナーから骨髄破壊的かつ T 細胞除去を伴う前処置により移植した、血清学的 CMV 陽性レシピエントの CMV-CTL についてキメリズム解析を行っている²⁵。この報告で

は、慢性 GVHD コントロールのため、移植後 20 ヶ月まで免疫抑制剤を使用していた。また、免疫抑制剤使用中の移植後 5 ヶ月で CMV 網膜炎を発症しガンシクロビルにて治療を行っている。その後も免疫抑制剤の影響か、CMV-CTL の出現は遅れ、移植後 9 ヶ月の時点では検出されず、12 ヶ月で初めて検出されている。初めて検出された CMV-CTL はキメリズム解析にてドナー由来であり、以降は CMV 感染症の合併は認めなかった。一方、我々の報告では移植後 30 日から一貫してレシピエント由来の CMV-CTL が残存しており、既報とは異なる結果となった。この理由の一つとして、移植前処置が骨髄非破壊的であったため、レシピエント由来の CMV-CTL が残存しえた可能性が考えられた。もう一つの理由として、前処置に抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリンを用いたことで、ドナー T 細胞が抑制され、レシピエント細胞がより残存しやすい環境であった可能性も考えられた。興味深い点として、症例 1 では移植後 2 年間にわたり CD45 陽性、CD15 陽性かつ CD33 陽性、CD3 陽性かつ CD4 陽性、CD3 陽性かつ CD8 陽性細胞、および CD19 陽性細胞集団が混合キメラであったのに対し、CMV-CTL は完全にレシピエント由来であった。これまでに、直接 CMV-CTL を解析してレシピエント由来であることを証明し、かつ、他の細胞分画との乖離を認めた報告は認めず、本報告が初めてである。また、症例 1 では移植後汎血球減少が持続したにもかかわらず、一度も CMV 再活性化を認めることなく経過した。これは残存したレシピエント由来の CMV-CTL が CMV 再活性化制御に有効であった可能性が考えられた。

移植後の CMV 再活性化を抑えるためには、CTL に特定のクローン型の存在が重要なのか(たとえば、特定の細胞障害活性の強い CDR3 モチーフを持つ CTL クローン)、クローン型の多様性が求められるのかは結論に至っていない⁴³⁻⁴⁵。しかしながら、少なくとも症例 1 からは、我々の以前の報告と同様、極めて限定された、特定のクローンのみで CMV 再活性化を十分に抑えられる可能性が示唆される¹⁵。我々は、Allo-HCT 後にクローン型が極めて限定されていたとしても、そのクローン型が十分に CMV 再活性化を抑止できれば、必ずしも CMV-CTL が多様化する必要はないのかと推測している。

本研究の限界点としては、3 症例のみの解析である点である。このため、CMV-CTL の推移と臨床経過の相関について断定的な結論は導くことができない。同様に、骨髄非破壊的前処置を用いたり、移植前後に抗ヒト胸腺細胞ウサギ免疫グロブリンを用いたりすることで、どのくらいの確率でレシピエント由来の CMV-CTL が残存しうるかも明らかではない。これらの問題を解決するためには、今後も臨床症状とリンクしながらの基礎研究による追試が必要である。

まとめ

今回、direct single-cell analysis 法を用いて、Allo-HCT 後 HLA-A*2402 拘束性 CMV 特異的 CTL の動態を解析した。いずれの症例も特定の BV gene family を限定的に使用し、かつ、特定のモチーフを有する傾向をみとめた。また、移植後 2 年にわたりレシピエント由来の CMV-CTL が残存しうることを初めて報告した。今後、更に症例を重ねることで、Allo-HCT 後の CMV-CTL の動態を明らかにできると考えている。

4. おわりに

造血器腫瘍に対する Allo-HCT は化学療法が進歩した現在においてもなお、重要な役割を占める治療法である。GVHD 発症を抑えるためには免疫抑制を強化することが必要であるが、一方で高度の免疫抑制状態では GVL 効果の減弱による再発のリスクや、感染症のリスクが高まる。移植臨床においては GHVD や再発、また臓器障害等により死に至ることも経験するが、感染症による死亡は回避したいという強い思いがある。

今回の研究では、Allo-HCT における CMV-CTL レパトア解析により、免疫回復と感染症における CTL の果たす役割の一端を明らかにすることができた。ウイルス特異的な CTL の同定や誘導が可能となれば、移植後に特に感染リスクが高いウイルスに対して、ウイルス特異的 CTL を誘導することで免疫抑制を弱めることなく感染対策を講じることが可能となる。今回の取り組みが今後のウイルス特異的 CTL の解明と新規治療に発展していくことを期待する。

5. 文献

1. Murati, A, Brecqueville, M, Devillier, R, Mozziconacci, MJ, Gelsi-Boyer, V, Birnbaum, D: Myeloid malignancies: mutations, models and management. *BMC Cancer*, 12: 304, 2012.
2. Morgan, GJ, Walker, BA, Davies, FE: The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 12: 335-348, 2012.
3. Chomel, JC, Bonnet, ML, Sorel, N, Bertrand, A, Meunier, MC, Fichelson, S, Melkus, M, Bennaceur-Griscelli, A, Guilhot, F, Turhan, AG: Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients with sustained undetectable molecular residual disease. *Blood*, 118: 3657-3660, 2011.
4. Okamoto, S: [Hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of hematological malignancies]. *Rinsho Ketsueki*, 55: 160-169, 2014.
5. Mori, S: [Infectious diseases in hematopoietic stem cell transplantation recipients]. *Rinsho Ketsueki*, 55: 177-183, 2014.
6. Sugita, J, Teshima, T: [Control of graft-versus-host disease]. *Rinsho Ketsueki*, 55: 170-176, 2014.
7. Boeckh, M, Ljungman, P: How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*, 113: 5711-5719, 2009.
8. Stocchi, R, Ward, KN, Fanin, R, Baccarani, M, Apperley, JF: Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Haematologica*, 84: 71-79, 1999.
9. Kanda, Y, Mineishi, S, Saito, T, Seo, S, Saito, A, Suenaga, K, Ohnishi, M, Niiya, H, Nakai, K, Takeuchi, T, Kawahigashi, N, Shoji, N, Ogasawara, T, Tanosaki, R, Kobayashi, Y, Tobinai, K, Kami, M, Mori, S, Suzuki, R, Kunitoh, H, Takaue, Y: Pre-emptive therapy against cytomegalovirus (CMV) disease guided by CMV antigenemia assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 27: 437-444, 2001.
10. Sakamoto, K, Nakasone, H, Wada, H, Yamasaki, R, Ishihara, Y, Kawamura, K, Ashizawa, M, Sato, M, Terasako-Saito, K, Machishima, T, Kimura, S, Kikuchi, M, Kako, S, Kanda, J, Yamazaki, R, Tanihara, A, Nishida, J, Kanda, Y: Evaluation of the validity of preemptive therapy against cytomegalovirus disease based on antigenemia assay with a cutoff of 20 positive cells per two slides. *PLoS One*, 8: e73754, 2013.
11. Gandhi, MK, Wills, MR, Sissons, JG, Carmichael, AJ: Human cytomegalovirus-specific immunity following haemopoietic stem cell transplantation. *Blood Rev*, 17: 259-264, 2003.
12. Cwynarski, K, Ainsworth, J, Cobbold, M, Wagner, S, Mahendra, P, Apperley, J, Goldman,

- J, Craddock, C, Moss, PA: Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 97: 1232-1240, 2001.
13. Reusser, P, Riddell, SR, Meyers, JD, Greenberg, PD: Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*, 78: 1373-1380, 1991.
 14. Wynn, KK, Fulton, Z, Cooper, L, Silins, SL, Gras, S, Archbold, JK, Tynan, FE, Miles, JJ, McCluskey, J, Burrows, SR, Rossjohn, J, Khanna, R: Impact of clonal competition for peptide-MHC complexes on the CD8+ T-cell repertoire selection in a persistent viral infection. *Blood*, 111: 4283-4292, 2008.
 15. Nakasone, H, Tanaka, Y, Yamazaki, R, Terasako, K, Sato, M, Sakamoto, K, Yamasaki, R, Wada, H, Ishihara, Y, Kawamura, K, Machishima, T, Ashizawa, M, Kimura, SI, Kikuchi, M, Tanihara, A, Kanda, J, Kako, S, Nishida, J, Kanda, Y: Single-cell T-cell receptor- β analysis of HLA-A*2402-restricted CMV- pp65-specific cytotoxic T-cells in allogeneic hematopoietic SCT. *Bone Marrow Transplant*, 49: 87-94, 2014.
 16. Price, DA, Brenchley, JM, Ruff, LE, Betts, MR, Hill, BJ, Roederer, M, Koup, RA, Migueles, SA, Gostick, E, Wooldridge, L, Sewell, AK, Connors, M, Douek, DC: Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8+ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med*, 202: 1349-1361, 2005.
 17. Tanaka, Y, Nakasone, H, Yamazaki, R, Sato, K, Sato, M, Terasako, K, Kimura, S, Okuda, S, Kako, S, Oshima, K, Tanihara, A, Nishida, J, Yoshikawa, T, Nakatsura, T, Sugiyama, H, Kanda, Y: Single-cell analysis of T-cell receptor repertoire of HTLV-1 Tax-specific cytotoxic T cells in allogeneic transplant recipients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res*, 70: 6181-6192, 2010.
 18. Takeda, N, Isonuma, H, Sekiya, S, Ebe, T, Matsumoto, T, Watanabe, K: [Studies of anti-cytomegalovirus IgG antibody positive rate and cytomegalovirus mononucleosis in adults]. *Kansenshogaku Zasshi*, 75: 775-779, 2001.
 19. Seggewiss, R, Einsele, H: Immune reconstitution after allogeneic transplantation and expanding options for immunomodulation: an update. *Blood*, 115: 3861-3868, 2010.
 20. Ljungman, P, Perez-Bercoff, L, Jonsson, J, Avetisyan, G, Sparrelid, E, Aschan, J, Barkholt, L, Larsson, K, Winiarski, J, Yun, Z, Ringdén, O: Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 91: 78-83, 2006.
 21. Ozdemir, E, Saliba, RM, Champlin, RE, Couriel, DR, Giralt, SA, de Lima, M, Khouri, IF, Hosing, C, Kornblau, SM, Anderlini, P, Shpall, EJ, Qazilbash, MH, Molldrem, JJ, Chemaly, RF, Komanduri, KV: Risk factors associated with late cytomegalovirus

- reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*, 40: 125-136, 2007.
22. Alterio de Goss, M, Holtappels, R, Steffens, HP, Podlech, J, Angele, P, Dreher, L, Thomas, D, Reddehase, MJ: Control of cytomegalovirus in bone marrow transplantation chimeras lacking the prevailing antigen-presenting molecule in recipient tissues rests primarily on recipient-derived CD8 T cells. *J Virol*, 72: 7733-7744, 1998.
 23. Taimur, S, Askar, M, Sobecks, R, Rybicki, L, Warshawsky, I, Mossad, S: Donor T-cell chimerism and early post-transplant cytomegalovirus viremia in patients treated with myeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Transpl Infect Dis*, 16: 61-66, 2014.
 24. Borchers, S, Weissinger, EM, Pabst, B, Ganzenmueller, T, Dammann, E, Luther, S, Diedrich, H, Ganser, A, Stadler, M: Expansion of recipient-derived antiviral T cells may influence donor chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*, 15: 627-633, 2013.
 25. Gandhi, MK, Wills, MR, Okecha, G, Day, EK, Hicks, R, Marcus, RE, Sissons, JG, Carmichael, AJ: Late diversification in the clonal composition of human cytomegalovirus-specific CD8+ T cells following allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102: 3427-3438, 2003.
 26. Warren, EH, Matsen, FA, Chou, J: High-throughput sequencing of B- and T-lymphocyte antigen receptors in hematology. *Blood*, 122: 19-22, 2013.
 27. Sallusto, F, Lenig, D, Förster, R, Lipp, M, Lanzavecchia, A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401: 708-712, 1999.
 28. Masopust, D, Vezys, V, Marzo, AL, Lefrançois, L: Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science*, 291: 2413-2417, 2001.
 29. Gupta, S, Bi, R, Su, K, Yel, L, Chiplunkar, S, Gollapudi, S: Characterization of naïve, memory and effector CD8+ T cells: effect of age. *Exp Gerontol*, 39: 545-550, 2004.
 30. Kern, F, Khatamzas, E, Sural, I, Frömmel, C, Reinke, P, Waldrop, SL, Picker, LJ, Volk, HD: Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol*, 29: 2908-2915, 1999.
 31. Hebart, H, Deginik, S, Stevanovic, S, Grigoleit, U, Dobler, A, Baur, M, Rauser, G, Sinzger, C, Jahn, G, Loeffler, J, Kanz, L, Rammensee, HG, Einsele, H: Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 99: 3830-3837, 2002.

32. Ljungman, P: CMV infections after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 42 Suppl 1: S70-S72, 2008.
33. Koch, S, Larbi, A, Ozcelik, D, Solana, R, Gouttefangeas, C, Attig, S, Wikby, A, Strindhall, J, Franceschi, C, Pawelec, G: Cytomegalovirus infection: a driving force in human T cell immunosenescence. *Ann NY Acad Sci*, 1114: 23-35, 2007.
34. Sallusto, F, Geginat, J, Lanzavecchia, A: Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22: 745-763, 2004.
35. Parish, IA, Kaech, SM: Diversity in CD8(+) T cell differentiation. *Curr Opin Immunol*, 21: 291-297, 2009.
36. Kuijpers, TW, Vossen, MT, Gent, MR, Davin, JC, Roos, MT, Wertheim-van Dillen, PM, Weel, JF, Baars, PA, van Lier, RA: Frequencies of circulating cytolytic, CD45RA+CD27-, CD8+ T lymphocytes depend on infection with CMV. *J Immunol*, 170: 4342-4348, 2003.
37. Luo, W, Ma, L, Wen, Q, Zhou, M, Wang, X: Analysis of the conservation of T cell receptor alpha and beta chain variable regions gene in pp65 peptide-specific HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells. *Cell Mol Immunol*, 6: 105-110, 2009.
38. Day, EK, Carmichael, AJ, ten Berge, IJ, Waller, EC, Sissons, JG, Wills, MR: Rapid CD8+ T cell repertoire focusing and selection of high-affinity clones into memory following primary infection with a persistent human virus: human cytomegalovirus. *J Immunol*, 179: 3203-3213, 2007.
39. Babel, N, Brestrich, G, Gondek, LP, Sattler, A, Wlodarski, MW, Poliak, N, Bethke, N, Thiel, A, Hammer, MH, Reinke, P, Maciejewski, JP: Clonotype analysis of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Am Soc Nephrol*, 20: 344-352, 2009.
40. Nakamae, H, Kirby, KA, Sandmaier, BM, Norasetthada, L, Maloney, DG, Maris, MB, Davis, C, Corey, L, Storb, R, Boeckh, M: Effect of conditioning regimen intensity on CMV infection in allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 15: 694-703, 2009.
41. Junghanss, C, Boeckh, M, Carter, RA, Sandmaier, BM, Maris, MB, Maloney, DG, Chauncey, T, McSweeney, PA, Little, MT, Corey, L, Storb, R: Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood*, 99: 1978-1985, 2002.
42. Nakai, K, Mineishi, S, Kami, M, Kanda, Y, Tanosaki, R, Takaue, Y: Chimerism induction and delayed onset of cytomegalovirus (CMV) infection after allogeneic

- reduced-intensity stem cell transplantation (RIST). *Blood*, 100: 2674-2675; author reply 2675-2676, 2002.
43. La Gruta, NL, Thomas, PG, Webb, AI, Dunstone, MA, Cukalac, T, Doherty, PC, Purcell, AW, Rossjohn, J, Turner, SJ: Epitope-specific TCRbeta repertoire diversity imparts no functional advantage on the CD8+ T cell response to cognate viral peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105: 2034-2039, 2008.
44. Messaoudi, I, Guevara Patiño, JA, Dylla, R, LeMaout, J, Nikolich-Zugich, J: Direct link between mhc polymorphism, T cell avidity, and diversity in immune defense. *Science*, 298: 1797-1800, 2002.
45. Turner, SJ, La Gruta, NL, Kedzierska, K, Thomas, PG, Doherty, PC: Functional implications of T cell receptor diversity. *Curr Opin Immunol*, 21: 286-290, 2009.