

原 著

## Epstein-Barr virus 特異的 CD4 陽性 bulk cytotoxic T lymphocytes の *ex vivo* 増幅と解析

漆原 範子<sup>1)</sup> 山田 淑子<sup>1)</sup> 宮崎 孔<sup>1)</sup> 山口 美樹<sup>1)</sup>  
村橋 秀明<sup>2)</sup> 関本 達也<sup>1)</sup> 佐藤進一郎<sup>1)</sup> 加藤 俊明<sup>1)</sup>  
藤原 満博<sup>1)</sup> 東 寛<sup>1)</sup> 池田 久實<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>北海道赤十字血液センター

<sup>2)</sup>ニプロ株式会社総合研究所

(平成 15 年 12 月 8 日受付)

(平成 16 年 3 月 4 日受理)

### *Ex vivo* EXPANSION AND CHARACTERIZATION OF EPSTEIN-BARR VIRUS-SPECIFIC CD4-POSITIVE BULK CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES

Noriko Urushibara<sup>1)</sup>, Yoshiko Yamada<sup>1)</sup>, Toru Miyazaki<sup>1)</sup>, Miki Yamaguchi<sup>1)</sup>,  
Hideaki Murahashi<sup>2)</sup>, Tatsuya Sekimoto<sup>1)</sup>, Shin-ichiro Sato<sup>1)</sup>,  
Toshiaki Kato<sup>1)</sup>, Mitsuhiro Fujihara<sup>1)</sup>, Hiroshi Azuma<sup>1)</sup> and Hisami Ikeda<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup>Hokkaido Red Cross Blood Center  
<sup>2)</sup>Research and Development Laboratory, Nipro Corporation

Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) were induced from PBMCs of a sero-positive healthy donor by stimulation with an autologous EBV-transformed B-lymphoblastoid cell line (EBV-LCL). CD4<sup>+</sup> lymphocytes with high cytotoxic activities were found in the cultured fraction. The purified CD4<sup>+</sup> bulk CTLs were expanded with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies in the presence of IL-2. The CD4<sup>+</sup> CTLs showed vigorous proliferation, up to 6,000-fold cumulative expansion. They maintained high killing activity against autologous target cells while exhibiting no NK and LAK activities, even after expansion. These data indicate that *ex vivo* expansion with immobilized antibodies is useful to obtain a large number of CTLs without losing their specific activities. The cytotoxicity mediated by the CD4<sup>+</sup> bulk CTLs seemed to depend mainly on the perforin/granzyme pathway because a H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor, concanamycin A, strongly inhibited the killing. The CD4<sup>+</sup> CTLs proliferated in response to autologous monocyte-derived dendritic cells pulsed with one of the EB viral proteins, EBNA 1. This finding suggests the existence of EBNA 1-recognizing clone(s) in the cell fractions. When stimulated with autologous EBV-LCL or activated with PMA and ionomycin, the CD4<sup>+</sup> CTLs predominantly produced IFN- $\gamma$ , not IL-4, indicating that they belong to the T helper 1 (Th1) type.

**Key words** : CD4<sup>+</sup> CTL, *ex vivo* expansion, EBV, EBNA-1

#### はじめに

Epstein-Barr virus (EBV) はヒトヘルペスウィ

ルスのひとつで、我が国の成人では 95% 以上に顕性感染がみられる。感染の主な標的は B リンパ

球で<sup>1)</sup>、正常な個体内では、細胞傷害性T細胞(CTL)が細胞表面上のウィルス抗原を認識して排除することにより<sup>2)</sup>、感染Bリンパ球の増殖が抑制されている。しかしながら、移植後の患者のような強度の免疫抑制状態におかれている個体ではEBVが再燃し、リンパ球増多症、日和見リンパ腫等をひきおこす<sup>3)</sup>。EBVが潜伏感染している細胞では、限られたウィルス遺伝子の発現により、核抗原(EBV-nuclear antigen; EBNA) 1, 2, 3A, 3B, 3C, LPと潜伏感染膜蛋白(latent infection membrane protein; LMP) 1, 2A, 2Bが検出される。これらの発現は宿主細胞によって異なり、EBNA 1のみが発現しているI型、さらにLMP 1と2とが発現しているII型、上記の分子全てが見られるIII型とに分けられる<sup>1, 4)</sup>。

近年、再燃EBVに対する治療法として、選択的攻撃性のあるCTLの応用が期待されている。その際には、特異性の高い細胞傷害活性と、有効な数の輸注細胞の確保が必須である。通常CTLはCD8陽性のリンパ球であるが、しかしながらヘルパーT細胞(Th)と呼ばれるCD4陽性Tリンパ球のなかに細胞傷害活性を有する一群が存在するという報告が相次いでなされてきた<sup>5)-7)</sup>。CD4陽性Tリンパ球の細胞傷害機序にはCD8陽性Tリンパ球と同様、Fas-Fas ligand(FasL)と、perforin/granzymeの二経路が存在する。後者の経路はvacuolar type H<sup>+</sup>-ATPaseの選択的阻害剤であるconcanamycin Aにて阻害される<sup>8, 9)</sup>。

我々はEBVに対するCTLの臨床応用を目的とし、*ex vivo*での誘導を行った。その過程で1名のドナー由来CD4陽性画分に細胞傷害活性が検出された。この細胞集団を抗CD3抗体ならびに抗CD28抗体を固相化したプレートにて増幅し、*in vitro*での解析を行ったので報告する。

## 材料と方法

### 1. ヒト末梢血検体

インフォームドコンセントの得られたEBV陽性健康人よりヘパリン加採取した末梢血をFicollに重層し、定法に従って末梢血単核球(PBMC)を得た。下記の「2. 細胞株と培養条件」、「3. 抗EBV-LCL CD4陽性CTLの誘導と固相化抗体による増

幅」に記載した実験を行う都度、繰り返し採血した。全ての実験は同一ドナー由来末梢血から誘導したCTLを用いて行ったものである。

### 2. 細胞株と培養条件

Bリンパ芽球様細胞株(EBV-LCL)HA-2は、定法に従い0.1μg/mlサイクロスポリン存在下、EBV産生株B95-8培養上清とPBMCを培養して樹立した。B細胞マーカーCD19, CD20, CD22, CD80, CD86, CD19陽性、T細胞マーカーCD2, CD3, CD4, CD8陰性であった。HA-2, K562, Daudiは10% fetal calf serum(FCS)を含むRPMI-1640にて継代培養した。ヒト巨核芽細胞UT7/TPOは10% FCSと10ng/ml トロンボポエチン(キリンビール株式会社, 東京)を含むIscove's Modified Dulbecco's Mediumにて継代培養した。

### 3. 抗EBV-LCL CD4陽性CTLの誘導と固相化抗体による増幅

CTLの誘導は、EBV-LCLを刺激細胞としたautoの系で行った。γ線照射(20 Gy)したHA-2と自己PBMCを10% FCSを含むRPMI-1640+7(日研生物医学化学, 京都)培地中にて共培養を繰り返すことによって得た。初回刺激はPBMCとHA-2との比率を20:1で行い10日間培養した。2回目は比率を10:1とし、50U/mlのIL-2(藤沢薬品, 大阪)を添加した。3回目以降は5:1の比率で刺激を行い、175U/mlのIL-2濃度で培養を続けた。得られたリンパ球画分からCD8陽性細胞をDynabeads M-450 CD8(DYNAL A.S., Oslo, Norway)にて除き、CD4陽性画分を得た(Fig. 1)。

抗CD3/CD28抗体刺激による増幅は<sup>10)</sup>、抗CD3抗体(Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, NJ, USA)と、抗CD28抗体(BD Bioscience, San Jose, CA, USA)を固相化したプレートにCD4陽性CTL、それと同数のγ線照射自己PBMCとを加え、175U/mlのIL-2を含む培地中で培養することによって行った。培養4日目に抗体を固相化していないプレートに移し、IL-2存在下で引き続き培養を続けた。

### 4. 細胞傷害活性の測定

細胞傷害活性は、<sup>51</sup>Crにてラベルした細胞を対

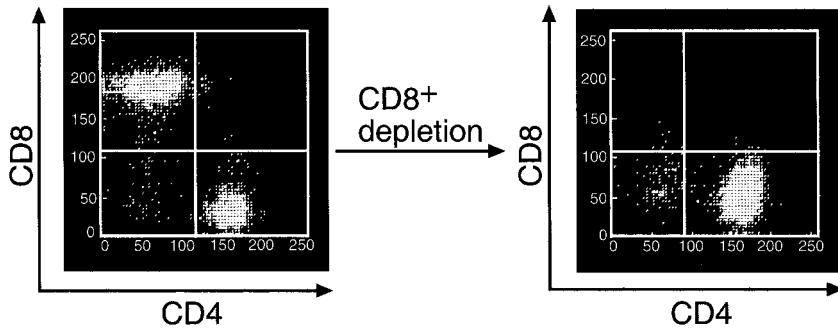


Fig. 1 Enrichment of CD4<sup>+</sup> fractions

Enrichment of CD4<sup>+</sup> cells was performed by depleting CD8<sup>+</sup> cells by the use of immunomagnetic beads from PBMCs co-cultured with the autologous EBV-LCL, HA-2. The remaining fraction, which contained more than 95% CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> cells and no CD8<sup>+</sup> cells, was subjected to further analysis. Cell suspensions were stained with anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies and analysed by flow cytometry. Results were displayed as dot plots for CD4 and CD8.

象とし、CD4 陽性 CTL と 4 時間共培養後、上清に放出される放射活性を  $\gamma$  線カウンター GAMMA 5500 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) にて測定することにより行った。下記の計算式により特異的細胞傷害活性を算出した (共培養での放出 - 自然放出) / (最大放出 - 自然放出) = 細胞傷害活性 (% lysis)。自己 EBV-LCL の他に、LAK 活性の指標として Daudi 細胞、NK 活性測定の対象として K562 細胞を用いた。

### 5. 細胞増殖試験

自己 PBMC を 2% ヒトアルブミン存在下プラスチックプレートにて培養し、付着した細胞を 50 U/ml の IL-4 (PEPRO TECH EC LTD, London, UK), 500U/ml の GM-CSF (PEPRO TECH EC LTD) 存在下で培養し、単球由来樹状細胞 (monocyte derived dendritic cell; MoDC) を誘導した。誘導 4 日目あるいは 5 日目に組み換え型 EBNA 1 タンパク (ViroStat, Portland, ME, USA) をパルスし、 $\gamma$  線照射後、96 ウェルプレートにて CTL 活性の確認できた CD4 陽性 bulk CTL と共培養した。培養 3 日目に 1 ウェル当たり 0.185 MBq の [<sup>3</sup>H]Thymidine [<sup>3</sup>H]TdR を加え、更に一晚培養後、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンタ LS 5000 TD

(Beckman Coulter) にて測定した。

### 6. 産生サイトカインの検討

細胞内サイトカイン染色は、 $5 \times 10^6$  個の増幅した bulk CD4 陽性 CTL と  $5 \times 10^5$  個の HA-2 を 40  $\mu$ g/ml の蛋白質細胞内輸送阻害剤 BrefeldinA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 存在下で 24 時間共培養した後、Pc5 標識抗 CD3, CD4, CD8 モノクローナル抗体 (Immunotech, Marseille, France) で染色した。固定後 IntraPrep permeabilization reagent (Immunotech) にて膜透過処理し、FITC 標識抗 IFN- $\gamma$  モノクローナル抗体 (Immunotech), PE 標識抗 IL-4 モノクローナル抗体 (Immunotech) にて細胞内サイトカインの染色を行った。フローサイトメトリーは Epics XL (Beckman Coulter) にて行い、Elite ソフトウェア (Beckman Coulter) にて解析した。細胞外に分泌されたサイトカインは、BrefeldinA 非存在下で共培養し、上清中のサイトカインを ELISA キット (BioSource International, Inc. Camarillo, CA, USA) にて測定した。HA-2 を加えず phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) とカルシウムイオンフォア ionomycin にて bulk CD4 陽性 CTL を活性化したものを陽性対照とした。

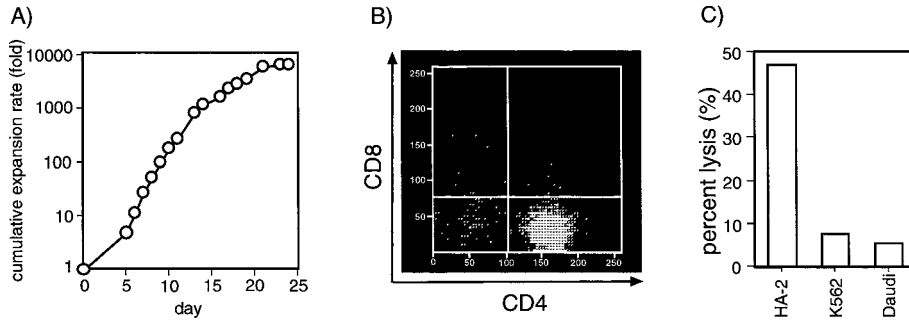


Fig. 2 Cumulative fold expansion of CD4<sup>+</sup> bulk CTL ( A ), CD4/CD8 marker ( B ) and their cytotoxicities ( C )

( A ) CD4<sup>+</sup> bulk CTL induced with  $\gamma$ -irradiated HA-2 were expanded with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and their proliferation rate was measured. Cumulative fold expansion during 25 days of culture is shown. ( B ) Flow cytometric analysis of the expanded CD4<sup>+</sup> bulk CTL. ( C ) Cytotoxicities were evaluated by using <sup>51</sup>Cr-labeled HA-2, K562 and Daudi as target cells with an E : T ratio = 40. The representative pattern from two independent experiments is shown.

## 7. RT-PCR

2 - 5 × 10<sup>7</sup> 個の細胞より定法に従って RNA を抽出した. 逆転写酵素を用いて cDNA を合成し (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA), これを鋳型として perforin, granzymeB, FasL の遺伝子増幅を行った. PCR サイクルは 94 1分, 55 1分, 72 1分 で 35 サイクル行い, 増幅産物を 2% アガロースゲルにて電気泳動した.

### 結果

#### 1. CD4 陽性 T リンパ球の細胞傷害活性と固相化抗体による増幅

自己 EBV-LCL にて一回刺激を行った後, IL-2 の存在下, 固相化抗体にて増幅を行った ( Fig. 2 ). 抗体刺激後 day 25 までに細胞数は約 6,000 倍まで増幅し ( Fig. 2A ), CD4 陽性率は高値を維持していた ( Fig. 2B ). 増幅した細胞集団は自己 EBV-LCL である HA-2 に対して細胞傷害活性を示す一方, NK 活性の標的細胞 K562, LAK 活性の対象である Daudi に対しては, ほとんど細胞傷害活性を示さなかった ( Fig. 2C ). 抗体固相化プレートによる増幅の前後での細胞傷害活性を比較した ( Fig. 3 ). *Ex vivo* 増幅を行った後でも, CD4 陽性 bulk CTL は HA-2 に対する細胞傷害活性を保持していた ( Fig. 3B ). NK 活性ならびに LAK 活性

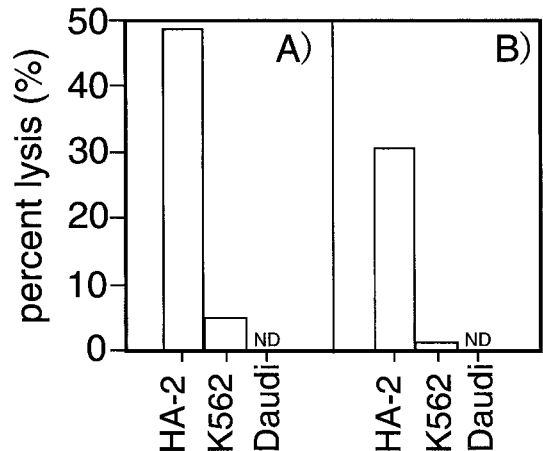


Fig. 3 Cytotoxic killing before and after *ex vivo* expansion

Cytotoxicities of CD4<sup>+</sup> bulk CTL fractions were compared before ( A ) and after ( B ) *ex vivo* expansion. The target cells are HA-2, K562 and Daudi. The E : T ratio was 10. The results of 1 of 4 experiments with similar results are shown.

は, 増幅の前後ともにほとんど検出されなかった ( Fig. 3A, B ).

#### 2. 細胞傷害のメカニズム

perforin/granzyme 系の選択的阻害剤である

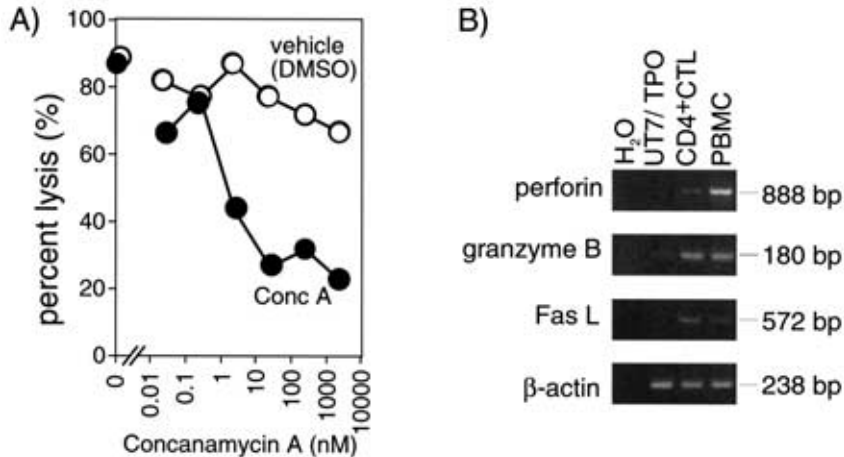


Fig. 4 Mechanism of cytotoxicity mediated by CD4<sup>+</sup> bulk CTL

(A) <sup>51</sup>Cr-releasing assay was performed in the presence of various concentrations of concanamycin A (ConcA) (B) RT-PCR analysis was investigated on perforin, granzyme B and FasL, and the PCR product was 888 bp, 180 bp and 572 bp respectively. β-actin mRNA was used as an internal control (238 bp PCR products) PCR primers were as follows: perforin sense 5'-GAG GCC CAG GTC AAC ATA GGC ATC-3' and antisense 5'-TCA CCA CAC GGC CCC ACT CCG GTT-3'; Granzyme B sense 5'-TGC AGG AAG ATC GAA AGT GCG-3' and antisense 5'-GAG GCA TGC CAT TGT TTC GTC-3'; FasL sense 5'-GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA-3' and antisense 5'-GAG CTT ATA TAA GCC GAA AAA CG-3'; β-actin sense 5'-GGG TCA GAA GGA TTC CTA TG-3' and antisense 5'-GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3'. PCR thermal cycles were as described in *Materials and Methods*.

concanamycin A 存在下で CTL assay を行った。細胞傷害活性は concanamycin A の濃度依存的に著しく低下し (Fig. 4A), concanamycin A 非存在時の活性 (89%) に比して、その 1/4 程度 (23%) まで低下した。対照 (DMSO) では活性の顕著な低下は見られなかった。以上のことから、得られた CD4 陽性 bulk CTL では、perforin/granzyme 系が主たる細胞傷害メカニズムと考えられた。RT-PCR を行ったところ、CD4 陽性 CTL では perforin, granzyme さらに FasL の mRNA の発現が確認された (Fig. 4B)。他方、巨核球系の細胞である UT7/TPO では、細胞傷害活性を担うこれらの分子の発現は見られなかった。

### 3. 認識しているウイルス抗原同定の試み

EBV 核抗原のひとつである EBNA1 の組み換えタンパクをパルスした自己樹状細胞と、CD4 陽性 CTL 画分とを共培養したところ、パルスし

た濃度依存的に [<sup>3</sup>H] TdR の取り込み量が増し、対照に比して 2.8 倍まで上昇した (Fig. 5)。このことから bulk CD4 陽性 CTL 画分に class II MHC 上に提示された EBNA 1 由来ペプチド断片を認識するクローンの存在が示唆された。

### 4. 刺激によって Th1 タイプのサイトカインの産生が見られる

増幅した bulk CD4 陽性 CTL を HA-2 にて刺激し、その際に産生されるサイトカインを検討した (Fig. 6)。HA-2 と共培養後の細胞内サイトカイン染色を行ったところ (Fig. 6A, CTL + HA-2), 11.3% が IFN-γ 陽性, 3.14% の細胞が IL-4 陽性となった。PMA と ionomycin による活性化の際 (Fig. 6A, activated CTL) には 67.3% が IFN-γ 陽性, 15.8% の細胞が IL-4 陽性と、IFN-γ 陽性細胞の占める割合が高かった。細胞外に分泌されたサイトカインの定量 (Fig. 6B) においても同様の結果

が得られた。以上のことから本実験によって得られた CD4 陽性 CTL 画分では Th1 タイプの細胞が優位であると考えられた。

**考 察**

EBV-LCL 刺激にて自己 CTL を誘導した。1名のドナーより CTL 活性を有する CD4 陽性細胞を

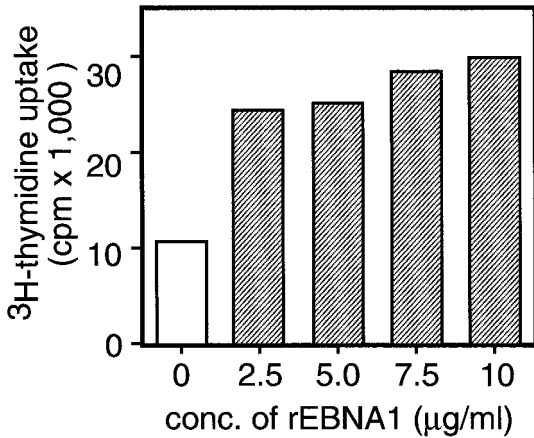


Fig. 5 EBNA 1-specific proliferation

Proliferative response of EBV-specific CD4<sup>+</sup> bulk CTLs was measured by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation. Responses to EBNA 1 (0-10µg/ml) were observed. Representative results of three similar experiments are shown.

得た。

この細胞集団を抗 CD3 抗体ならびに抗 CD28 抗体を固相化したプレートにて増幅したところ、増幅後も高い細胞傷害活性を示し、他方 NK 活性 (K562 に対する細胞傷害活性), LAK 活性 (Daudi に対する細胞傷害活性) は検出されなかった。以上の結果から、選択的攻撃性の高い CTL を誘導した後に固相化抗体での増幅を行うという手法は、臨床応用に必要な細胞数の CTL を簡便に得る手法として適しているものと考えられた。

結果には示さないが、抗 DR 抗体と抗 DQ 抗体存在下では HA-2 に対する細胞傷害活性が低下した。また自己 EBV-LCL である HA-2 の class II HLA タイプ (DRB1\*0403/0901, DQB1\*0301/0302) と DRB1\*0901 のみが共通のアロ EBV-LCL や、DQB1\*0301 が一致しているアロ EBV-LCL との反応性も見られたことから (CTL アッセイ, 細胞外 IFN-γ 産生), 得られた CTL 画分中には異なる class II HLA 拘束性のクローンが含まれるものと推測された。

本研究で得られた CD4 陽性 bulk 画分では、perforin/granzyme 系が主たる細胞傷害機序との結果が得られたが、concanamycin A を高濃度にしても活性が完全には阻害されなかったこと、また FasL の mRNA 発現も RT-PCR にて確認され

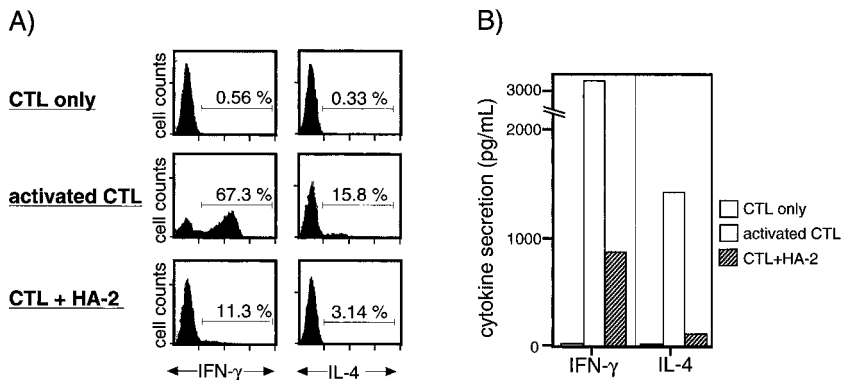


Fig. 6 Th1-type behavior of EBV-specific CD4<sup>+</sup> bulk CTLs

Expression of IFN-γ and IL-4 was examined. (A) Intracellular cytokines were analysed by flow cytometry. Cells were gated on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and the results were displayed as histograms. (B) Secreted cytokine concentrations were determined by ELISA.

た( Fig. 4B )ことなどから, Fas-FasL 経路による細胞傷害の可能性も否定することはできない. また, 本研究では検討していないが, TRAIL<sup>11)</sup>, granulysin<sup>12)13)</sup>といった近年新たに報告されてきた細胞傷害性分子の関与も考えられる.

自己 EBV-LCL での刺激, あるいは PMA と ionomycin による活性化の際には, Th1 タイプサイトカインである IFN- $\gamma$  の産生が, Th2 タイプサイトカインの IL-4 に比較して優位であった. この結果は EBV に対する CD4 陽性 CTL で得られてきた結果<sup>14)-16)</sup>と同様のものである.

これまでも EBNA 1 を認識する CD4 陽性 CTL は報告されているが<sup>14)-17)</sup>, 本研究にて得られた bulk CD4 陽性 CTL 画分にもウィルス核抗原 EBNA 1 反応性のクローンの存在を示唆する結果が得られた. 冒頭で触れたとおり, EBNA 1 は全ての不顕性感染細胞において発現しているウィルスタンパクであるが, 分子 N 末端にある Gly/Ala リピートドメインの存在により class I MHC 上へ抗原提示が抑制されているため<sup>18)19)</sup>, CD8 陽性 CTL の免疫応答から免れている<sup>19)</sup>. よって EBV に対する生体防御, 特にパーキットリンパ腫のように EBNA 1 のみを発現している細胞に対する免疫応答においては CD4 陽性 CTL が重要な働きを担っている可能性が考えられる. 細胞内抗原である EBNA 1 が class I ではなく class II MHC 上に cross-presentation されるということは, EBV-LCL<sup>14)17)</sup>やパーキットリンパ腫細胞<sup>14)16)17)</sup>でも報告されており, 本論文の HA-2 細胞でも同様のメカニズムで抗原提示されているものと推測される.

本手法にて試みた限りでは, 報告したドナー以外にこのような細胞集団が誘導されたドナーはなかったが, 異なる刺激法を用いるなどして他ドナーから CD4 陽性 CTL が得られる可能性も考えられる.

骨髄移植後患者での EBV によるリンパ腫発症の回避を目的とし, ドナー PBMC から EBV 特異的なポリクローナル CTL を誘導し予防的に投与する試みもなされている<sup>20)</sup>. 今回報告した CD4 陽性 bulk CTL も *in vivo* で有効な細胞傷害活性

を示すことが期待される.

## 文 献

- 1) Kieff, E. : Epstein-Barr virus and its replication. ( B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. Virology ) Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 2343-2396.
- 2) Rickinson, A.B. and Moss, D.J. : Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu. Rev. Immunol.*, 15 : 405-431, 1997.
- 3) Heslop, H.E. and Rooney, C.M. : Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease. *Immunol. Rev.*, 157 : 217-222, 1997.
- 4) Kieff, E. and Rickinson, A.B. : Epstein-Barr virus. ( B.N. Fields, D.M. Knipe and P.M. Howley, eds. Virology ) Lippincott-Raven, Philadelphia, 1996, 2397-2446.
- 5) Tite, J.P. and Janeway, C.A., Jr. : Cloned helper T cells can kill B lymphoma cells in the presence of specific antigen : Ia restriction and cognate vs. noncognate interactions in cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*, 14 ( 10 ) : 878-886, 1984.
- 6) Jacobson, S. et al. : Measles virus-specific T4 + human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens. *J. Immunol.*, 133 ( 2 ) : 754-757, 1984.
- 7) Chen, B.P. et al. : Cytotoxic T cell recognition of an endogenous class I HLA peptide presented by a class II HLA molecule. *J. Exp. Med.*, 172 ( 3 ) : 779-788, 1990.
- 8) Kataoka, T. et al. : Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H ( + )ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 153 ( 9 ) : 3938-3947, 1994.
- 9) Kataoka, T. et al. : Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 156 ( 10 ) : 3678-3686, 1996.
- 10) Azuma, H. et al. : Functional evaluation of ex vivo expanded cord blood lymphocytes : possible use for adoptive cellular immunotherapy. *Exp. Hematol.*, 30 ( 4 ) : 346-351, 2002.
- 11) Thomas, W.D. and Hersey, P. : TNF-related apoptosis-inducing ligand ( TRAIL ) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *J. Immunol.*, 161 ( 5 ) : 2195-2200, 1998.
- 12) Jongstra, J. et al. : The isolation and sequence of a

- novel gene from a human functional T cell line. *J. Exp. Med.*, 165 ( 3 ): 601-614, 1987.
- 13) Sun, Q. et al. : Cytokine production and cytolytic mechanism of CD4( + ) cytotoxic T lymphocytes in ex vivo expanded therapeutic Epstein-Barr virus-specific T-cell cultures. *Blood*, 99 ( 9 ): 3302-3309, 2002.
- 14) Munz, C. et al. : Human CD4( + ) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J. Exp. Med.*, 191 ( 10 ): 1649-1660, 2000.
- 15) Bickham, K. et al. : EBNA1-specific CD4 + T cells in healthy carriers of Epstein-Barr virus are primarily Th1 in function. *J. Clin. Invest.*, 107 ( 1 ): 121-130, 2001.
- 16) Paludan, C. et al. : Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4 ( + ) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol.*, 169 ( 3 ): 1593-1603, 2002.
- 17) Khanna, R. et al. : Targeting Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 ( EBNA1 ) through the class II pathway restores immune recognition by EBNA1-specific cytotoxic T lymphocytes : evidence for HLA-DM-independent processing. *Int. Immunol.*, 9 ( 10 ): 1537-1543, 1997.
- 18) Levitskaya, J. et al. : Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375 ( 6533 ): 685-688, 1995.
- 19) Blake, N. et al. : Human CD8 + T cell responses to EBV EBNA1 : HLA class I presentation of the ( Gly-Ala )-containing protein requires exogenous processing. *Immunity*, 7 ( 6 ): 791-802, 1997.
- 20) Rooney, C.M. et al. : Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*, 92 ( 5 ): 1549-1555, 1998.
-