

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

平成18年度

政策創薬総合研究  
重点研究報告書（Ⅱ）

## 目 次

KH51039	臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化	藤原成悦 ……	589
KH51041	C型肝炎ウイルスの感染・複製系の確立とその応用による抗ウイルス療法の開発	脇田隆字 ……	636
KH51042	個体特性に着目した食品成分の骨粗鬆症に対する予防効果に関する研究	石見佳子 ……	656
KH51043	食品からの食中毒起因菌の高感度迅速検出法の開発とリスクマネージメントへの応用	山本茂貴 ……	671
KH51044	食品添加物等の新機能性に関する研究	広瀬雅雄 ……	680
KH51045	新規ミスマッチDNA特異的修飾試薬を用いた全ゲノムからの既知および未知の生活習慣病関連遺伝子のSNPs検出システムの開発	池田康行 ……	691
KH51046	気管支喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 重症化機序の分子細胞システムとしての理解に基づく新たな制御方法の確立に関する研究	松本健治 ……	707
KH51048	新しい粘膜アジュバントおよび粘膜ワクチンの開発に関する研究	長谷川秀樹 ……	720
KH51049	バイオテクノロジーによるワクチンの創製と改良技術の開発	松浦善治 ……	728
KH51050	可溶性ウイルス受容体等を利用した抗ウイルス剤の開発に関する研究	田口文広 ……	740
KH51051	ワクチン創生の新テクノロジーと新規ワクチンの開発	小島朝人 ……	761
KH51052	脂質輸送を制御する生活習慣病予防薬開発のための基礎的研究	最上知子 ……	772
KH51054	核酸封入ナノカプセルによるウイルス消毒薬、抗ウイルス薬の創薬に関する研究	武田直和 ……	783
KH51055	siRNA発現ライブラリーによる新興・再興感染症の原因ウイルスの複製に必須な遺伝子の検索および創薬への応用	森川 茂 ……	795
KH51057	血管新生の制御による虚血系疾患治療薬の開発に関する基礎的研究	新見伸吾 ……	814
KH51058	天然抗酸化剤を利用した創薬化学	福原 潔 ……	826
KH51102	内因性幹細胞の動員、生着、心筋分化による重症心不全・再生療法の確立	長谷川浩二 ……	836
KH61059	幹細胞等を用いた細胞組織医療機器の開発と評価技術の標準化	土屋利江 ……	839
KH61060	新しい修飾技術を用いた再生医療用生物由来素材の開発	岸田晶夫 ……	919
KH61061	霊長類ES細胞の無フィーダー、無血清培養を用いた新しい未分化維持増殖培養法と血液細胞分化制御系の開発	湯尾 明 ……	939
KH71063	臓器移植患者の小腸及び肝組織を用いた遺伝子機能解析に基づくテラーメイド免疫抑制療法の確立に関する研究	乾 賢一 ……	951
KH71064	ヒト細胞を供給源とした再生医療の早期実現化を目指す有効性、安全性の検証システムの確立	梅澤明弘 ……	966

KH71066	創薬基盤としての公共的ヒト組織バンクを中心とした肝組織・細胞の研究利用システムの構築	絵野沢 伸 …… 979
KH71068	ヒト型遺伝毒性試験系の開発とそのバリデーション	本間 正充 …… 1000
KH71069	高機能保持ヒト肝細胞組込型細胞チップとナノセンサーによる新薬開発における薬物動態・毒性を評価する新規バイオセンサーの開発	永森 静志 …… 1021
KH71070	ケミカルゲノミクスによる難治固形癌に有効な主要抗癌剤の薬効貢献分子の探索と発見された分子を標的とする次世代抗癌剤の開発	西尾 和人 …… 1042
KH71071	外科手術摘出ヒト組織を用いたオーダーメイド医療の研究と遺伝多型を考慮したヒト肝細胞の代謝研究への応用に関する研究	大野 泰雄 …… 1054
KH72077	ヒト胎盤組織を用いた薬物の胎児移行性及び胎児毒性の定量的評価	澤田 康文 …… 1070
KHB1201	タンパクリン酸化酵素SIKの糖・脂質代謝における役割と創薬標的評価系の開発	竹森 洋 …… 1080
KHB1202	家族性黄斑変性カニクイザルを用いた加齢黄斑変性の新規治療及び予防薬の開発	寺尾 恵治 …… 1086
KHC1203	弱毒性ウイルスワクチンの品質向上、生産性向上に関する研究	大隈 邦夫 …… 1090
KHC1204	チオレドキシシンなど抗酸化反応性活性酸素種処理分子の高発現を促す新しい健康増進医薬の開発	井上 達 …… 1096
KHC2206	腹膜癒着予防剤の開発と応用	土肥多恵子 …… 1106
KHD1205	ヒト乾燥羊膜の機能再生医療材料への実用化に関する研究	阿久津英憲 …… 1111
KHD2207	ヒト由来細胞・組織バンクの活用拡大のためのシステム構築と研究資源の高度化に関する研究	後藤 雄一 …… 1115

## 臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法(DLI)の実用化

所属 国立成育医療センター研究所 母児感染研究部  
研究者 藤原成悦

研究要旨：臍帯血 DLI について、ヒト化マウスを用いた前臨床試験と臨床パイロット研究を行い、その安全性と効果を示唆する結果を得た。これらの基盤データに基づき臍帯血 DLI 臨床試験のプロトコール原案を策定した。

### 分担研究者

- (1) 東京医科歯科大学難治疾患研究所 清水則夫
- (2) 東京医科歯科大学医学部 森尾友宏
- (3) 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部 清河信敬
- (4) 国立成育医療センター小児腫瘍科 熊谷昌明
- (5) 日本大学医学部 麦島秀雄
- (6) 名古屋第一赤十字病院 加藤剛二
- (7) 株式会社リンフォテック 関根暉彬
- (8) 東京医科歯科大学医学部 寺嶋一夫
- (9) 先端医療センター血液再生研究グループ 伊藤仁也

### A. 研究目的

臍帯血移植では1人のドナーから得られる細胞数が骨髄移植と比較して少ないため、生着遅延(不全)をきたしやすい。また、移植後の生着不全、悪性腫瘍再発、感染症に対してドナーリンパ球輸注療法(DLI)が不可能であることも重大な欠点である。本研究は、移植に用いた臍帯血細胞の一部を凍結保存し、必要に応じて活性化・増幅したのちレシピエントに輸注する治療法(臍帯血DLI)を、従来のDLIと同等あるいはより優れた治療法として確立・実用化することを目的とする。本研究の成果により、臍帯血移植後の生着不全、悪性腫瘍再発、感染症などに対して臍帯血DLIが実用化されれば、悪性腫瘍や先天性免疫不全症の臍帯血移植による治療成績および移植後のQOLの向上が期待される。これらの効果は医療費の削減にもつながり、長期的に広く国民の医療・福祉の向上に寄与するものである。

本研究は全体として3カ年計画であり、昨年度までに、1) 臍帯血単核細胞からCD4陽性Tリンパ球を選択的に効率よく活性化・増幅するための

培養プロトコールの確立、2) 得られた活性化臍帯血リンパ球の性状解析、3) 臍帯血DLI動物モデル作製への第一段階としての臍帯血移植モデルマウスの作製、4) 治療に用いる活性化臍帯血T細胞の安全性評価法の確立、5) 臍帯血DLIの臨床パイロット研究による有効性と安全性の評価、などを行った。当初は、3カ年の間に臨床試験を実施する計画であったが、基礎研究および前臨床試験に慎重を期したため、期間内における臨床試験の実施は困難となった。そこで、最終年度は以下の具体的目標に向けて研究を進めた。①臍帯血DLI動物モデル作製への第二段階としてのヒトウイルス感染モデルマウスの作製、第三段階としての臍帯血DLI治療モデルの作製、②臍帯血中Tリンパ球前駆細胞定量法の確立、③臍帯血DLI臨床パイロット研究の継続と症例蓄積、④臍帯血DLI臨床試験プロトコールの原案策定。

### B. 研究方法

#### 1. 臍帯血リンパ球活性化培養法

昨年度までに確立した臍帯血T細胞活性化培養法を用いた。比重遠心法により得られた臍帯血単核細胞をRPMI-1640に10%ヒト血清および700U/ml IL-2を添加した培養液に浮遊させ、抗CD3固相化フラスコに移しCO<sub>2</sub>インキュベーターで静置培養した。

#### 2. NOD/Ltz/SCIDマウスを用いたモデル実験

成人末梢血B細胞をEBVによりトランスフォームして得られたリンパ芽球様細胞株(EBV-LCL)をRPMI+7(10%FCS)にて培養を行った。培養後洗浄して、 $1.0 \times 10^6$  cells / 200  $\mu$ l / mouseでRI照射したNOD/Ltz/SCIDマウス(5W、♂)に尾静脈から移植し、モデルマウスを作製した。このマウスに健康成人ボランティアから

調整した活性化 T 細胞を輸注した。マウスは EBV-LCL 輸注群 (Control 群)、PBMC 全血 + EBV-LCL 輸注群 (Whole 群) 及び PBMC CD 4 陽性細胞 + EBV-LCL 輸注群 (CD 4 群) の 3 群とした。また、各群のマウスは 10 匹とした。PBMC 全血及び CD 4 陽性細胞は EBV-LCL 輸注 1 週間後に  $1.0 \times 10^7$  cells / 200  $\mu$ l / mouse で輸注した。輸注後は経時的に採血と骨髓穿刺を行い、輸注 28 日後に屠殺した。

### 3. NOG マウスを使用したモデル実験系の確立

#### 1) ヒト化マウスの作製

6-8 週齢の NOD/SCID/ $\gamma_c^{-/-}$  マウス (NOG) マウスを実験動物中央研究所より購入し、国立感染症研究所の無菌飼育室で飼育した。 $1 \times 10^4$  ~  $1.2 \times 10^5$  個の CD34 陽性細胞を尾静脈内に投与した。CD34 陽性造血幹細胞は MACS CD34+ アイソレーションキット (Miltenyi Biotec) を用いたポジティブセレクションにより分離した。

#### 2) HIV-1 感染実験

移植後、120-151 日目のマウスに、HIV-1JRC5F (R5 指向性)、HIV-1MNp (X4 指向性) および HIV-1NL4-3 (X4 指向性) をそれぞれ尾静脈より投与した ( $2.0 \sim 6.0 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mouse)。投与後 4 ヶ月までに定期的に採血・剖検を行い、ウイルスコピー数の定量およびフローサイトメトリー解析を行った。

#### 3) EBV 感染実験

ヒト化 NOG マウス末梢血よりフローサイトメーターにてヒト血球細胞が確認された後、(CD34 陽性造血幹細胞移植後 2 ヶ月) マウス尾静脈より EBV を 1,000 transforming units 投与した。

#### 4) 臍帯血 DLI

EBV の感染が real time-PCR にて確認されたマウスに対し、活性化臍帯血 T 細胞 DLI を行った。DLI に用いた T 細胞は、マウス移植時に一部培養用に分取した臍帯血より培養しておいたものを一度凍結保存し、マウス DLI 時期に合わせて再度活性化培養した細胞を用いた。DLI 当日に培養細胞を RPMI-1640 で洗浄し、再び RPMI-1640 に浮遊させ、kg あたり  $5.0 \times 10^6$  cells ( $1.0 \times 10^6$  cells) を 2 週間隔で計 2 回、尾静脈から投与した。

### 4. GeneChip を用いた活性化臍帯血 CD4 細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

臍帯血および成人末梢血 (対照) 由来の活性化 CD4 陽性 T 細胞を上記 1 の方法で調製した。それぞれの活性化増幅全 T 細胞、CD4 陽性細胞から total RNA を RNeasy kit + DNase 処理 (Qiagen 社) で抽出し、各 2.5  $\mu$ g を用いて

Affimetrix 社 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array により網羅的遺伝子発現解析を行った。得られたデータは解析ソフト GeneSpring (Agilent 社) を用いて解析した。

### 5. 臍帯血 DLI 実用化のためのウイルス検査法の開発

昨年度までに開発した定性的ウイルス検査法に加えて、本年度は半定量的検査法の開発を目指した。

#### 1) 検査対象ウイルスの選定

臍帯血に混入する可能性があるウイルスおよび母体に持続感染している DNA ウイルスおよびレトロウイルス (細胞にインテグレートした DNA を検出) の半定量検査系の開発を行った。具体的には、単純ヘルペスウイルス (HSV-1, HSV-2)、水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-Zoster virus: VZV)、EB ウイルス (EBV)、サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV)、ヒトヘルペスウイルス 6 型、7 型、8 型 (HHV-6, -7, -8)、パルボウイルス B19 型 (Parvovirus B19) B 型肝炎ウイルス (HBV)、レトロウイルス: ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1, 2) ヒト T リンパ球指好性ウイルス (HTLV-1, 2) の 13 種類を選定した。また、ウイルススパイクの試験項目として、血液により伝播し重症な貧血の原因となるヒトパルボウイルス B19 型 (PVB19) を選定した。

#### 2) 多項目 DNA ウイルス同時検出系の開発

検査用プレートを予め作成しておき、PCR 検査時に資料を加えるだけで同時・多種類のウイルスを半定量的に測定することができる検査系の開発を目指した。基本条件は以下のとおりである。PCR 装置: Prism7300 (アプライドバイオシステムズジャパン)

PCR 反応: 95°C 10 分処理の後、95°C 15 秒、60°C 60 秒の反応を 45 サイクル。

PCR 試薬: AmpliTaqGold & Gold Buffe (アプライドバイオシステムズジャパン)

プライマー: 通常のオリゴマーを使用

プローブ: Taqman Probe を使用

#### (3) ウイルススパイク試験

臍帯血を 2 分し、片方に PVB19 のウイルス液 0.2ml を添加し、非添加の臍帯血と同様に単核球分離、T 細胞の培養を行なった。細胞やウイルス解析用のサンプルは、臍帯血、臍帯血へウイルス添加後、フラスコ中での活性化培養時、凍結保存からの解凍時、フラスコ培養からバッグ培養への移行時および輸血バッグに充填後に採取した。

### 6. 臍帯血中 T リンパ球前駆細胞定量法

マウス胸腺由来の TSt-4 ストローマ細胞株にレトロウイルスを用いてヒト Delta-like 1 gene(hDLL1)を導入し強制発現させた。臍帯血から比重遠心法により分離された単核細胞、あるいはさらに MACS Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit により分離された CD34+細胞を、この細胞と共培養し、CD3-CD5+CD7+の未熟 T 細胞を分化させた。未熟 T 細胞に分化しうる細胞の頻度はポワソン分布の式により推定した。

## 7. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

### 1) 細胞の準備

臍帯血バッグ内に残存する極めて少量の臍帯血に対して、1% ヒト血漿加 RPMI-1640 を 20ml 加え、比重遠心法にて単核球を分離した。前年度に確立されたプロトコルにより、抗 CD3 および IL-2 添加培養、CD4 陽性細胞の選択を行い、いったん液体窒素中に保存した。DLI 施行直前に細胞を融解しさらに培養した後、多項目ウイルス検査法、細菌試験、エンドトキシン試験を行った。

### 2) 対象患者の選択

1) 移植後生着不全、2) 移植後白血病再発、3) 移植後難治性日和見感染症、のいずれかのリスクありと主治医に判断された症例を対象として、臍帯血 CD4T 細胞を増殖させ保存した。

### 3) 臍帯血移植後ウイルス感染症モニタリング

移植後の定期的モニタリングあるいは、移植後ウイルス感染症疑い患者において、HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BK virus, JC virus, Parvovirus B19, HBV の 12 種類のウイルスを測定した。尿検体では Adenovirus の測定も行った。方法はマルチプレックス PCR を用いた。

## 8. 臍帯血 DLI 臨床試験プロトコル案の策定

「臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験」プロトコル案策定委員会で協議し策定した。

(倫理面への配慮)

### 1) 基礎研究について

臍帯血バンクに提供された臍帯血には、細胞数不足などの理由により移植に用いることができないものが一定の割合で含まれ、多くは廃棄されている。本研究はこのような臍帯血を利用するものであり、提供者に不利益は生じない。バンクへの臍帯血提供の際には、移植に使用できない場合は研究に利用する旨を説明し同意を得ている。また、臍帯血バンクより提供を受ける際には、連結不可能匿名化を行い、個人情報の保護を徹底した。動物実験においては、動物実験指針を遵守し、動物

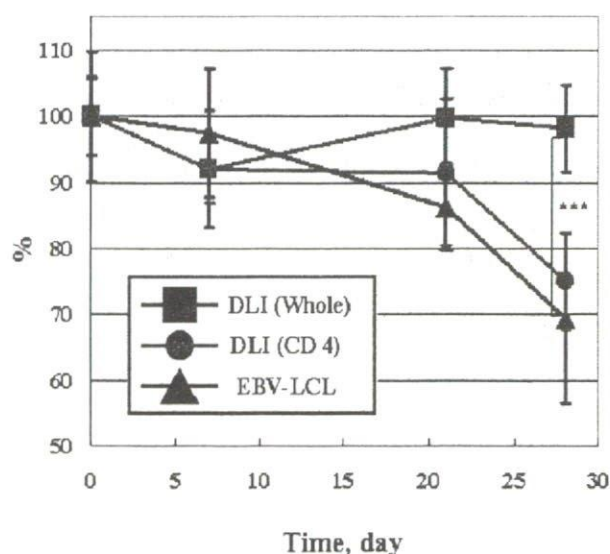


図 1. ドナーDLI 施行後の EBV 感染症モデルマウスの体重変化。

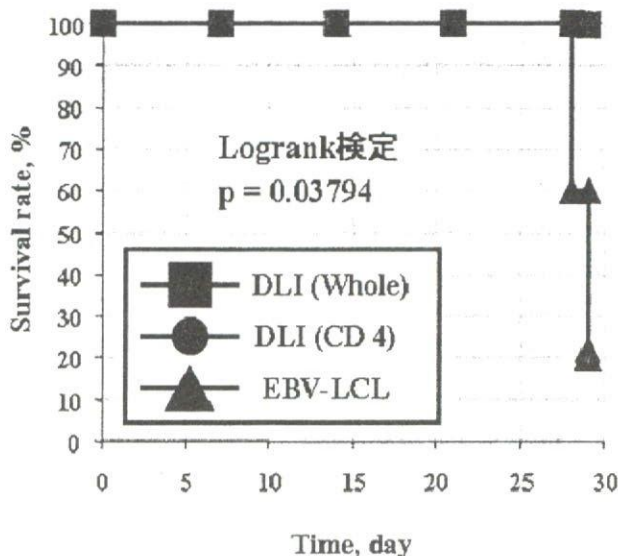


図 2. ドナーDLI 施行後の EBV 感染症モデルマウスの生存率。

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センターおよび東京臍帯血バンク倫理委員会の承認を得ている。

### 2) 臨床パイロット研究について

東京医科歯科大学医学部倫理審査委員会の承認を得た。実際の培養・投与に当たっては、細胞調製前・及び細胞投与前に、十分に研究内容を説明し、インフォームドコンセントを取得した。

## C. 研究結果

1. NOD / Ltz / SCID マウスを用いたモデル実験  
本マウスに EBV-LCL を移植すると白血病化し、

日和見 EBV 感染症のモデルとなることは、昨年までに報告している。今年度は、臍帯血 DLI 前臨床試験の前段階として、健康成人末梢血由来活性化 T 細胞による DLI の実験を行った。

#### 1) DLI による延命効果

図 1 にマウス体重率の推移を、図 2 にマウス生存率の推移を示す。EBV-LCL のみを移植した Control 群では細胞の移植後体重は減少し続け、28 日後には 80.00% のマウスが死亡した。Whole 群では体重の減少が抑制され、28 日後には移植前とほぼ同等の体重まで回復し、コントロール群と有意な差が認められた ( $p < 0.001$ )。その一方で CD 4 群においては、一時体重を保ったものの、移植 28 日後には再び減少した。DLI を行った 2 群 (Whole 群、CD 4 群) に関しては 28 日目の解剖の時点でのマウスの死亡は見られず、Logrank 検定により有意な差が得られた。また、DLI を行った 2 群では脱毛等の GVHD 所見は認められず、マウス運動も正常であった。

#### 2) DLI による抗腫瘍効果

EBV-LCL は CD 23 の発現率が 98.97% 以上であり、白血化の指標として CD 23 陽性細胞率を指標とした。マウス末梢血中において、Control 群では CD 23 陽性率の上昇が見られ、DLI を行った 2 群では、活性化リンパ球の投与後 CD 23 陽性率の減少が確認された。また、臓器でのフローサイトメトリー解析においても、肝臓を除くその他の臓器で、DLI を行った群は Control 群と比較して CD 23 陽性率を有意に減少させていることが確認できた。DLI の 2 群においても CD 4 群と比較して Whole 群の方がより有意に CD 23 陽性率を抑制することが確認された。また、DLI を行った群では Control 群と比較して腎臓の腫大が抑制されていた。これらのことから、活性化 DLI により末梢血及び臓器において CD 23 陽性細胞は抑制されたと考えられ、活性化 DLI の抗腫瘍効果が示唆された。

#### 3) マウス末梢血中ヒト T 細胞の検討

DLI 後のマウス末梢血リンパ球のマーカー発現を解析すると、輸注後に CD3 陽性 T 細胞が急激に増加することが示された。さらに、EBV-LCL lysate による刺激後の IFN- $\gamma$  産生をフローサイトメトリーおよび ELISPOT 法により解析して結果、輸注された細胞の中から EBV 特異的細胞傷害性 T 細胞が誘導されることが、延命効果・抗腫瘍効果につながることを示唆された。

### 2. NOG マウスを用いたモデル実験

#### 1) ヒト化 NOG マウスに対するヒト免疫不全症ウ

#### イルス (HIV) 感染実験

今年度は、HIV 感染後長期にわたって、CD4 陽性 T 細胞の減少を経時的に解析した。造血幹細胞移植後 120~151 日目のマウス 24 匹において、非感染コントロールマウスと感染マウスにおける末梢血 CD4/CD8 の割合および CD4 陽性 T 細胞の絶対数の変動を感染と同時に経時的に追跡した。CD4/CD8 の割合は、非感染コントロールマウス (7 匹) では、時間の経過と共にやや増加する傾向があるのに対し、X4 指向性 HIV-1MNp (5 匹) および HIV-1NL4-3 (5 匹) に感染した 2 つの個体群では経時的な減少がみられ、感染後 10 週目にはゼロに近い値まで低下した。一方、R5 指向性 HIV-1JRCSF (7 匹) 感染マウスでは比較的早期に減少するが、その値は感染後 10 週目まで低いまま維持された。末梢血中 CD4 陽性 T 細胞の絶対数も同様な傾向をしめし、非感染コントロールマウスでは、時間の経過と共に細胞数が増加するのに比し、X4 指向性 HIV-1 の場合 2 つの個体群では細胞数が経時的に減少し、感染後 10 週目にはほとんど検出されないレベルまで低下した。一方、R5 指向性 HIV-1JRCSF に感染した個体群では、細胞数が感染後 10 週目まで低いまま維持された。以上、このマウスがエイズモデルとしての可能性が示された。

#### 2) ヒト化 NOG マウスに対する EBV 感染実験

臍帯血造血幹細胞を移植してヒト化した NOG マウスに、B95-8 株 EBV (約  $10^3$  transforming units) を静脈内あるいは腹腔内に接種した。接種後、末梢血中 EBV DNA レベルをリアルタイム PCR 法によりモニターしたところ、接種後 3~10 週間で EBV DNA が検出され  $10^3 \sim 10^4$  copies/ $\mu$ g DNA レベルまで上昇したのち、再び減少した。一部のマウスは感染後、体重が著明に減少し一般状態が著しく悪化したため安楽死させ剖検したところ、脾臓、肝臓、骨髄、胸腺、リンパ節などから EBV DNA が検出された。この病態は、EBV による日和見感染症であるリンパ増殖性疾患 (LPD) のモデルとなりうることを示唆された。

#### 2) ヒト化 NOG マウスにおける臍帯血 DLI 治療実験

ヒト化 NOG マウスに EBV を投与後、14 日目・28 日目に活性化臍帯血 DLI を行った。ウイルス投与を行わなかったマウスは全身状態良好であったのに対し、ウイルス投与後 DLI を行わなかったマウスは、投与後 30 日前後で顕著な体重減少が認められた。一方、ウイルス投与後に DLI を行ったマウスでは、ウイルス投与後 DLI を行わなかつ



たマウスに比べ、生存率が高い傾向が得られた(図3)。CD4陽性T細胞投与群・Whole細胞投与群での生存率の差は認められなかった。体重減少が認められたマウスを剖検し各臓器よりDNA抽出後、real time-PCRにてEBVコピー数を定量したところ、CD4陽性T細胞投与群よりもWhole細胞投与群でEBVコピー数が低い傾向が認められた。以上よりEBV関連リンパ増殖性疾患に対する活性化臍帯血DLIの治療効果が示唆された。

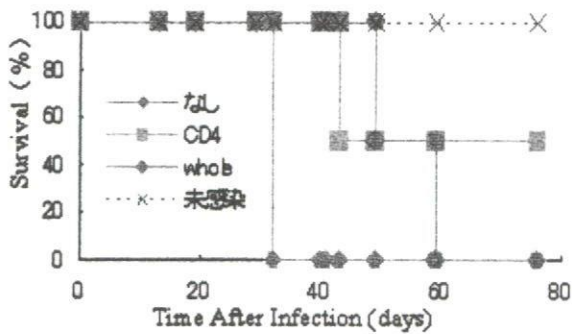


図3. 臍帯血DLI施行後の、EBV感染ヒト化NOGマウスの生存率。

### 3. GeneChipを用いた活性化臍帯血T細胞の遺伝子発現プロファイルの解析

臍帯血から活性化増幅したCD4(+)T細胞(CB-CD4)の遺伝子発現と、末梢血から活性化増幅したCD4(+)T細胞(PB-CD4)の遺伝子発現について、今年度の各2例を、昨年度の各1例に加えて網羅的に比較検討した。

#### 1) サイトカイン、ケモカインの発現

サイトカインでは、昨年度の結果から示唆された、IL-10, IL-23, M-CSF, GM-CSF, TNFスーパーファミリー(TNF-SF)-10に加えて、白血球抑制因子(LIF)の遺伝子発現がCB-CD4でのみ、有意に上昇していることが確認された。また、TNF-SF-4, 6, 13, IG $\gamma$ はPB-CD4でも発現を認めるものの、全般的にCB-CD4でより発現が高い傾向を認めた。一方、IL-9, TNF-SF-1(lymphotoxin), -8については、全例ではないが、一部のドナー由来のCB-CD4で非常に高発現であった。これに対して、IL-4, IL-3, IL-5, IL-13, TNF-SF-11については、検体間での差が大きく、明確に一定の傾向があるとは言い難いものの、一部のドナー由来のCB-CD4で非常に高発現であった。逆に、IL-17の発現はPB-CD4でのみ有意に高かった他、IL-7やTNF-SF-7もCB-CD4でも発現を認める場合はあったが、全般にPB-CD4で高発現である傾向を認めた。

ケモカインでは、CCL1, XCL-1, -2はCB-CD4で特徴的に高発現であった。逆に、CCL5の発現はPB-CD4で特徴的であった。これに対して、IL-8, IL-22, CCL-3, -4, -20, CXCL-9, 10は、CB, PBを問わず、検体間での差が著しかった。

#### 2) サイトカインおよびケモカインの受容体の発現

受容体の発現に着目して解析した結果、IL-2, -18, GM-CSF等のサイトカインに対する受容体、およびCXCR6, CCR-1, -2等のケモカイン受容体は、CB-CD4で特徴的に高発現していた。逆に、IL-6, -7に対する受容体や、CX3CR1, CCR6等のケモカイン受容体は、PB-CD4で特徴的に高発現していた他、IL-3および1型BMP受容体やCXCR4は相対的にPB-CD4で発現が高い傾向が認められた。

#### 3) 膜表面分子の遺伝子発現

CB-CD4とPB-CD4の膜表面分子の遺伝子発現について比較した。CB-CD4ではCD38, CD96, CD9の発現が特徴的に上昇していたが、PB-CD4では全般に発現が低かった。またCD28, CD40-ligand, CD109の発現は、PB-CD4に比較して、CB-CD4で全般的に高い傾向を認めた。逆に、PB-CD4ではCD86, CD74の発現が有意に高く、またCD59, CD80の発現もCB-CD4に比較してPB-CD4で全般的に高い傾向を認めた。一方、CD3, CD6, CD48, CD53, CD81等の発現は双方で高く、ほぼ同等と考えられた。

### 4. 臍帯血DLIの安全性評価のためのウイルス検査法の開発

B.研究方法に記載した操作による半定量的多項目同時ウイルス検出法を開発し、その感度と特異性を検証した。

#### 1) 検査系の感度測定

披検ウイルス陰性が確認されている細胞のDNA 0.5 $\mu$ gに各ウイルスのスタンダードDNAを50コピー加えた測定用サンプルを各ウイルス毎に作成した。その結果、測定系は全てのウイルスに対して50コピー/ウェルの測定感度を持つことが確認された

#### 2) 特異性(交差反応性)の検討

検査対象の13種類のウイルスに関しては交差反応性が無く、検査系が特異的にウイルスを検出できていることが確認された。

#### 3) パルボウイルスB19のスパイク試験

臍帯血3検体について試験を行なった。

a. 細胞培養に与える影響: B19ウイルスを培養細胞に添加することにより、生存率・総細胞数に顕著な差は見られなかった。当初は添加したPVB19の

ウイルスゲノムが高濃度に検出されたが、培養工程が進むにしたがって検出されるゲノムコピー数は低下し、輸血バッグに充填した際には殆ど検出されなかった。培養によりウイルスは増幅しておらず、培地添加や充填前の洗浄工程でウイルスが希釈されていることが示唆された。

b. 感染性の検討：活性化T細胞へのPVB19の感染性の有無を検討するため、各培養工程およびバック充填後のサンプルからRNAを抽出し、ウイルスのVp-2遺伝子由来のmRNAをRT-PCR法およびnested PCR法により検出を試みた。臍帯血にウイルスを添加後にT細胞の活性化培養を行なったサンプルからはVp-2遺伝子由来のmRNAの存在を示すバンドは全く検出できなかった。

#### 5. 臍帯血中 T リンパ球前駆細胞定量法の確立

ヒト delta-like 1 遺伝子を強制発現させたマウスストローマ細胞 TSt-4 との共培養により、臍帯血 CD34+CD38-Lin<sup>-</sup>細胞から CD3-CD5+CD7+ の未熟 T 細胞を分化させることが可能であった。10 検体の臍帯血を用いて、単核細胞中の T 前駆細胞の頻度を測定したところ、1/861 から 1/4803 までの幅があり、平均は 1/2803 であった。また、1 検体の臍帯血で、CD34+CD38-Lin<sup>-</sup>細胞中の T 前駆細胞の頻度を測定したところ、1/1.9 であった。

6. 臍帯血 DLI の臨床パイロットスタディ（臍帯血バッグあるいは生着細胞からの ex vivo CD4T 細胞培養）

研究方法の項で示した対象患者について、輸注後バッグ内に残存した臍帯血から CD4T 細胞を培養した。また一部の症例では生着細胞からの培養も行った。解析可能であった 13 症例において平均 19.3 日で 303 倍までの細胞増殖を達成した。しかし一部、35, 40 倍までにしか増殖しない場合もあり、凍結細胞の状態や解凍時の問題などの原因が示唆された。用意した CD4T 細胞の純度は>95%で、CD8 細胞の混入率は<1%、viability は>95%であった。

一方生着細胞からの細胞調製は困難であった。4 症例において調製不能あるいは調製細胞不適格となった。2 症例では増殖が不良であり、1 症例では EBV が陽性となると共に CD4 が純化できず、1 症例では HHV6 陽性となった。いずれも移植後免疫学的再構築が不十分で、感染症を合併し、一部では CD4 陽性細胞の著減を認めていた。

これまでの培養依頼を集計すると、計 25 症例となった。依頼理由としては、移植後拒絶・再発・感染症に備えてが 14 例、移植後混合キメラ・再発・免疫学的再構築が 4 例、移植後感染症が 8 例

であった（重複 1 例）。

#### 7. 臍帯血 DLI 臨床試験プロトコル案の策定

今までの全国調査及び私たちの解析から、移植後細菌感染症、生着不全、再発、感染症などが臍帯血移植の問題点となっており、早期の免疫学的再構築により、それらが回避できる可能性がある。また臍帯血移植では移植後の血球回復が遅れるが、それに対しても CD4-DLI が効果を示す可能性がある。一方で、CD4-DLI の安全性評価は最も大切な要件である。今回は以下のような骨子にてプロトコル案を作成した。

##### 1) 目的：

臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法の生着促進効果及び安全性について評価する。

Primary endpoint は生着日（白血球、血小板、網赤血球）、Secondary endpoint は移植後 90 日目までの細菌・真菌・ウイルス感染症の頻度、GVHD、GVHD 以外の有害事象、免疫学的再構築とする。

##### 2) 対象：

前処置のもとに臍帯血移植を行う腫瘍性疾患あるいは非腫瘍性疾患を有する患者

##### 3) 治療方法：

凍結臍帯血（twin bag の小さいほう）から調製した CD4 陽性細胞（ $1 \times 10^7/\text{kg}$ ）を臍帯血移植時、及び 1 週後に 2 回使用する。

##### 4) 主たる評価項目と方法：

臨床症状、臨床所見、血算（白血球 - 好中球、網赤血球数、血小板数）、ドナー・レシピエントキメラリズム、感染症、治療の副作用

##### 5) 予定登録者数：

50 症例

このプロトコルでは臍帯血移植時及び 1 週後に CD4-DLI を併用し、早期の血球回復及び免疫学的再構築を図ることにしている。一方、GVHD に及ぼす影響が懸念され、臍帯血移植の利点と相反しないか、注意深い検討が必要と考えられる。

#### D. 考察

##### 1. マウスモデルについて

NOD/Ltz/scid マウスを用いた実験では、成人末梢血由来活性化 T 細胞による DLI の抗腫瘍効果と延命効果が示されたので、臍帯血由来活性化 T 細胞も同様の効果を持つことが期待された。

ヒト化 NOG マウスに EBV を感染させたところ、脾臓、腎臓、肝臓などが腫大し、多数の EBV 感染リンパ球の浸潤が認められた。この病態は実際のヒトの LPD に類似するものと考えられたので、臍帯血 DLI による治療実験を行い、その効果と安

全性を示唆する結果を得た。CD4 陽性細胞よりも全 T 細胞の効果が大きいことを示唆する結果が得られたが、これは輸注された細胞から CD8(+) の EBV 特異的 CTL が誘導されることを示した NOD/Ltz/scid マウスの実験結果とも一致するものである。CD8(+)細胞は GVHD の原因となるために、末梢血活性化 T 細胞による DLI の場合は除去されるが、臍帯血 DLI では、CD8(+)細胞が混入しても GVHD を起こしにくいことも考えられる。この点について今後検討したい。

## 2. Gene Chip による活性化臍帯血 T 細胞の網羅的遺伝子発現解析について

臍帯血由来活性化 CD4(+)細胞では、末梢血由来のものと比較して、IL-10, GM-CSF, M-CSF 等のサイトカイン、IL-2, IL-18, GM-CSF 等に対する受容体、CCL-1, XCL-1, -2 等のケモカイン、CCR-1, -2, CXCR6 等のケモカイン受容体、CD38, CD96, CD9 等の細胞膜表面分子の発現が高かった。一方、IL-17, IL-7 等のサイトカイン、IL-6, IL-7 に対する受容体、CCL-5 等のケモカイン、CCR1, CXCR3 等のケモカイン受容体は、末梢血由来活性化 CD4(+)細胞でより高い発現が認められた。これらの結果から、同じ活性化 CD4(+)細胞であっても、臍帯血由来と末梢血由来では、サイト (ケモ) カイン、サイト (ケモ) カイン受容体、膜表面分子の発現に差異があることが示唆された。これらの分子はリンパ球の機能発現に重要な役割を持つことから、臍帯血 DLI には末梢血 DLI とは異なる特性が存在する可能性が考えられた。

## 5. 臍帯血 DLI の安全管理に関する研究

HSV-1, HSV-2, VZV, EBV, CMV, HHV-6,-7,-8, Parvovirus B19, HBV, HIV-1, -2, HTLV-1 の 13 種類のウイルスに対して、半定量的な多種類ウイルス同時検出系を開発した。感度は 50 コピーウイルス DNA 分子/ウェル、12 種類のなかで交差反応性は認められず、高感度で特異性の高い検査法であった。また、パルボウイルス B19 のスパイク試験により、添加したウイルスが予想通りに検出された。また、このウイルスが活性化臍帯血 T 細胞に感染しないことが示された。

## 6. 臍帯血中 T 前駆細胞定量法の確立

造血幹細胞移植では造血機能だけでなく、免疫機能の再構築も重要である。ここで確立された臍帯血中 T リンパ球前駆細胞定量法は、移植前に臍帯血サンプルの T 細胞再構築能を評価する有効な方法と考えられた。

## 7. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究

CD4-DLI 調製依頼の理由の大きなものの 1 つはウイルス感染症であり、免疫能が回復しないままに罹患するヘルペス属などの感染症に対しては、CD4-DLI の存在意義が大きいと考えられる。また調製依頼では臍帯血移植の問題点である生着不全、再発に対してという希望があり、試案であるプロトコルにはこれらを反映させて、CD4-DLI の造血機能回復、免疫能回復を大きな主眼とした。

## E. 結論

1. NOD/Ltz/scid および NOG マウスを用いて、臍帯血 DLI モデルが作製された。このモデル実験により、臍帯血 DLI の安全性と効果が示唆され、作用メカニズムが解析された。

2. Gene Chip 法により、臍帯血由来活性化 T 細胞の遺伝子発現が網羅的に解析された。サイトカイン、ケモカイン、それらの受容体、膜表面分子などの発現が末梢血由来活性化 T 細胞と若干異なっていた。

3. マルチプレックス PCR 法を応用して、半定量的な多種類ウイルス同時検出法が開発され、臍帯血 DLI の安全管理に利用することが可能となった。

4. 臍帯血中の T リンパ球前駆細胞定量法が開発され、移植前に臍帯血サンプルの T 細胞再構築能を評価する有効な方法と考えられた。

5. 臍帯血 DLI の臨床パイロット研究が継続され、適応となる病態の分析が行われた。

6. 臍帯血 DLI 臨床試験のプロトコル原案が策定された。

## F. 研究発表 (抜粋)

### 1. 論文発表

1) Hirokazu Tanaka, Itaru Matsumura, Kiminari Ito, Asako Hatsuyama, Masayuki Shikamura, et al, HOX Decoy Peptide Enhances the Ex vivo Expansion of Human Umbilical Cord Blood CD 34+ Hematopoietic Stem Cells/Hematopoietic Progenitor Cells, Stem Cells, 24, 2592-2602, 2006

2) Watanabe S., Terashima K., Shimizu N., Honnda M., Yamamoto N, Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL-2 gamma cjain -/-mice(NOG) for long-lasting infection of model of both M- and T-tropic HIV-1, Blood 109; 212-218, 2007.

3) Okamoto H, Arii C, Shibata F, Toma T, Wada T, Inoue M, Tone Y, Kasahara Y, Koizumi S, Kamachi Y, Ishida Y, Inagaki J, Kato M, Morio T, Yachie A. Clonotypic analysis of T cell reconstitution after

haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in patients with severe combined immunodeficiency. Clin. Exp. Immunol. 2007 (in press)

4) Sugita S, Shimizu N, Kawaguchi T, Akao N, Morio T, Mochizuki M Identification of human herpesvirus 6 variant A in a patient with unilateral panuveitis..

Archives of Ophthalmology, 2007 (in press)

5) Tono C, Takahash Y, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Tandai S, Sato T, Ko Kudo, Toki T, 4. Tachibana N, Yoshioka T, Nakahata T, Morio T, Nishikomori R, Ito E. Correction of immunodeficiency associated with NEMO mutation by umbilical cord blood transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen Bone Marrow Transplant. 2007 (in press).

## 2. 学会発表

1) Watanabe S, Terashima K, Yajima M, Morio T, Shimizu N, Honda M, Yamamoto N Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/IL-2 gamma c/jain -/-mice (NOG) for long-lasting infection of model of both M- and T-tropic HIV-1 in American society for cell biology summer meeting The cell biology of HIV-1 and other retroviruses in Emory university, Atlanta, GA, July 20-23, 2006,

2) Watanabe S., Terashima K., Yajima M., Honda M., Yamamoto N. Hematopoietic stem cell-engrafted NOG mice develop human lymphoid system and induced long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses in 2006 日本免疫学会 2・J・W 33-4・O/P

3) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 54 回日本ウイルス学会学術集会. 2006 年 11 月、名古屋.

4) 矢島美彩子、今留謙一、渡辺哲、寺嶋一夫、中村浩幸、山本直樹、藤原成悦. ヒト臍帯血幹細胞移植 NOG マウスを用いた EB ウイルス感染モデルの作製. 第 36 回日本免疫学会学術集会. 大阪. 2006 年 12 月.

5) 寺嶋一夫. リンパ濾胞/濾胞樹状細胞 (FDC) と HIV-1 感染症 in 造血幹細胞移植と感染症対策 臍帯血移植、エイズ、活性化 T 細胞輸注療法をめぐって、平成 19 年 2 月 3 日 (土) 於 ベルサール西新宿.

6) 鹿村真之、伊藤仁也、清水則夫. 「免疫不全マウスを用いた活性化 CD 4-DLI 後の経時的 T 細胞の性質と動態に関する検討」第 29 回日本造血細胞移植学会総会 (2006, 2 16, 福岡)

7) 丸山京子、伊藤仁也、田中宏和、鹿村真之、初山麻子、高田のぞみ、中畑龍俊. 「NOD/SCID マウスを用いた ex vivo 増幅臍帯血移植における生着促進効果の検討」第 29 回日本造血細胞移植学会総会 (2006, 2 16, 福岡).

8) 清谷知賀子、崎山美知代、塩田曜子、森 鉄也、熊谷昌明: 原発性免疫不全症 8 例に対する造血幹細胞移植. 第 29 回 日本造血細胞移植学会総会, 福岡, 2007 年 2 月.

9) 田口智子、宮川世志幸、今留謙一、堀内保臣、竹野内寿美、松井淳、北村紀子、佐藤伴、片桐洋子、大喜多肇、藤原成悦、藤本純一郎、清河信敬: EBV 感染によってヒト B 細胞に誘導される遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会学会, 大阪. 11 月 25-26 日, 2006.

10) 清河信敬、宮川世志幸、堀内保臣、竹野内寿美、田口智子、佐藤伴、片桐洋子、大喜多肇、藤本純一郎: 培養系を用いたヒト造血幹細胞の放射線照射による遺伝子発現の変化の解析. 第 48 回日本小児血液学会学会, 大阪. 11 月 25-26 日, 2006

11) 加藤麻衣子、麦島 秀雄、桂 義元、河本宏: ヒト臍帯血を用いた B 前駆細胞および T 前駆細胞の定量的検出法の確立, 金沢, 第 109 回日本小児科学会 2006.4.22

12) Tomohiro Morio: Nutrition and Immunity in Health and Disease. Symposium on Infection, Immunity and Nutrition, BK 21 Project for Functional Foods & Nutrigenomics, March 16, 2006, Seoul.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

ヒューマンサイエンス振興財団  
政策創薬総合研究 KH51039  
「臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化」

臍帯血活性化 CD4DLI 療法に関する臨床第 I-II 相試験実施計画書

政策創薬総合研究代表者

藤原成悦

国立成育医療センター研究所母児感染研究部

〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1

TEL: 03-3417-2457, FAX:03-3417-2419

e-mail: shige@nch.go.jp

プロトコール起草者

森尾友宏

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・発達病態小児科学

同・医学部附属病院・細胞治療センター

〒113-8519 東京都文京区湯島1-5-45

TEL&FAX: 03-5803-4583, FAX:03-03-5803-5245

e-mail: tmorio.ped@tmd.ac.jp

2007年3月09日 計画書案第1版作成

Websiteを参照

National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0

(CTCAE) Publish Date: December 12, 2003

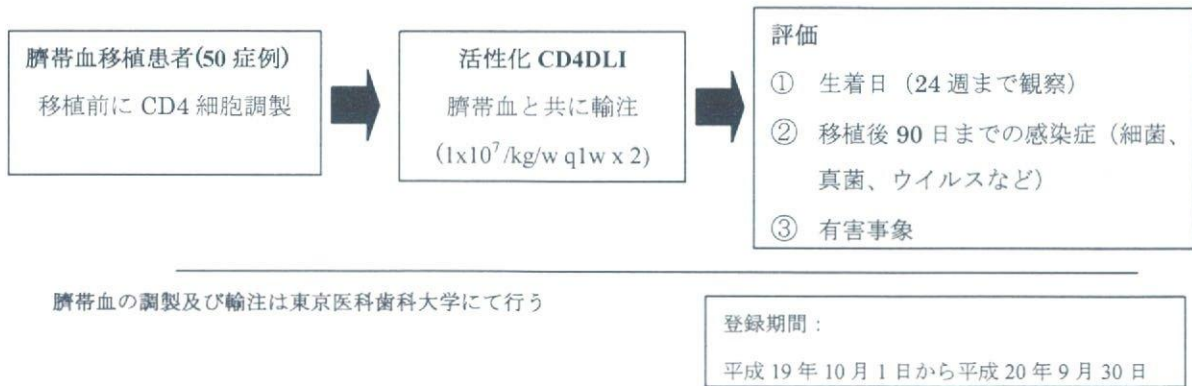
有害事象 共通毒性基準 第3版 (CTCAE) < 日本語訳 >

(財) 先端医療振興財団 臨床研究情報センター 臨床試験運営部 版

[http://www.tri-kobe.org/DCTM/data/NCI-CTC\\_v3\\_J\\_20040601.pdf](http://www.tri-kobe.org/DCTM/data/NCI-CTC_v3_J_20040601.pdf)

[http://www.tri-kobe.org/DCTM/data/NCI-CTC\\_v3\\_J\\_20040601.pdf](http://www.tri-kobe.org/DCTM/data/NCI-CTC_v3_J_20040601.pdf)

臨床試験のシエーマ



1) 目的:

臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法の生着促進効果及び安全性について評価する。

Primary endpoint は生着日 (白血球、血小板、網赤血球)、Secondary endpoint は移植後 90 日目までの細菌・真菌・ウイルス感染症の頻度、GVHD、GVHD 以外の有害事象、免疫学的再構築とする。

2) 対象:

前処置のもとに臍帯血移植を行う腫瘍性疾患あるいは非腫瘍性疾患を有する患者

3) 治療方法:

凍結臍帯血 (twin bag の小さいほう) から調製した CD4 陽性細胞 ( $1 \times 10^7/\text{kg}$ ) を臍帯血移植時、及び 1 週後に 2 回使用する。

4) 主たる評価項目と方法:

臨床症状、臨床所見、血算 (白血球 - 好中球、網赤血球数、血小板数)、ドナー・レシピエントキメラリズム、感染症、治療の副作用

5) 予定登録者数:

50 症例

6) 臨床研究実施期間:

平成 19 年 10 月 1 日から平成 20 年 9 月 30 日 (12 ヶ月)

7) 治療施設:

本輸注治療は東京医科歯科大学医学部附属病院にて行なわれる。

## 1. 目的

臍帯血移植後活性化 CD4DLI 療法の生着促進効果及び安全性について評価する。Primary endpoint は生着日（白血球、血小板、網赤血球）、Secondary endpoint は移植後 90 日目までの細菌・真菌・ウイルス感染症の頻度、GVHD、GVHD 以外の有害事象、免疫学的再構築とする。

## 2. 本臨床研究計画の背景、経緯、及び期待される効果

### 1. 臍帯血移植数の増加

### 2. 移植関連合併症

- ・ 移植後早期（2 週以内）の細菌感染症
- ・ 移植後ウイルス感染症
- ・ GVHD

### 3. 生着に関する問題

- ・ 好中球 $>500/\text{mm}^3$ : 25 日、血小板 $>20,000/\text{mm}^3$  75 日  
Day90 での好中球生着 79%, Day180 での血小板生着( $>20,000/\text{mm}^3$ )56%
- ・ 拒絶

### 4. 再発時等に DLI が不可能

造血幹細胞移植は悪性腫瘍や先天性免疫不全症の根治治療として普及しているが、最近では自己免疫疾患や固形がんにも適応の範囲を拡げている。造血幹細胞移植の一つ臍帯血移植は、ドナーに負担と危険を及ぼさない、HLA 不適合を許容しやすい、コーディネート作業が不要であり必要なドナー細胞を速やかに供給しうるなど、多くの長所をもつため急速に普及しており、2006 年の非血縁者間臍帯血移植は約 700 件に達した。

臍帯血移植では、1 人のドナーから得られる細胞数が骨髄移植と比較して少ないため、生着遅延（不全）をきたしやすいこと、またこのため体重の重いレシピエントにとって不利になることが欠点としてあげられている。これに対しては複数臍帯血移植ご試みられ、現在臨床試験が行われているが、他のアプローチによる対応策も必要である。

移植治療に際しては、幹細胞移植の前処置、移植後の免疫抑制剤の使用により、ホストは深い免疫不全状態に陥るため、さまざまな日和見感染症が発生する。移植後初期には、細菌・真菌感染症、単純ヘルペスウイルス（HSV）やヒトヘルペスウイルス 6 型（HHV-6）など、やや遅れてアデノウイルス（AdV）、EB ウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）などが問題となり、重篤な経過をとることも数多く経験される。これらのウイルスのうち、HSV、HHV-6、および CMV に対しては有効な治療薬が存在するが、AdV と EBV に対しては明らかな効果が実証された治療薬はない。また、有効な抗ウイルス薬があっても耐性ウイルスが問題となる。

化学療法剤抵抗性のウイルス感染症に対してはおもに EBV や CMV を中心としてウイルス特異的細胞障害性 T 細胞輸注や、ドナーリンパ球輸注(DLI)などが用いられてきたが、前者は細胞調製手技と調製までの時間の点に問題があり、後者では DLI による GVHD という問題点を抱えている。また両者ともドナーに対し、採血量の点で負担がかかるという点が問題である。さらに臍帯血幹細胞移植では、ドナーの採血ができないという決定的な不利益がある。

活性化 T 細胞輸注法は、リンフォテックの関根らにより開発された方法で、T 細胞を体外で活

活性化し、1,000 倍以上に数を増やした後に、患者の体内に点滴で戻す方法である。現在まで腫瘍性疾患を中心に 700 症例以上の患者に対し、延べ 7000 回以上の投与が行われている。1998 年ごろより免疫不全症患者の CMV 感染症や単純ヘルペス感染症、慢性活動性 EBV 感染症などに対する活性化自己 T 細胞輸注療法が開始され、今までに 40 症例以上に対し試みられてその効果と安全性が報告されつつある。(Morio *et al*, unpublished observation)

ドナーからの活性化 CD4DLI 療法も移植後の白血病再発、難治性感染症などを対象にして 30 例以上の患者に対して投与が行われている。前臨床試験における移植後難治性感染症に対する活性化 CD4 陽性 T 細胞輸注は、骨髄移植後の DHPG 抵抗性 CMV 腸炎・CMV 肺炎、臍帯血幹細胞移植後の CMV 肺炎・腸炎・網膜炎などに対して改善を認め、CMV 感染症に関しては 10 症例中 7 症例で有効性を認めた。

平成 16~18 年度政策創薬総合研究「臍帯血移植患者へのドナーリンパ球輸注療法 (DLI) の実用化」では、臍帯血移植後の感染症や腫瘍 (白血病) 再発に対して DLI を可能とするために、臍帯血由来 T 細胞を活性化・増幅したのちにレシピエントに投与する臍帯血 DLI を実用化するために、基礎および臨床パイロット研究を進めてきた。臍帯血 T 細胞の活性化培養法、CD4 陽性細胞の選択的活性化、などのプロトコルを確立し、また、臨床パイロット研究では、薬剤体制 CMV 感染症、コクサッキーウイルス感染症、混合キメラ状態などの症例に対して有効性が示唆された。本臨床試験は、この研究班の成果を臨床応用するべく計画された。

今回の検討では、臍帯血移植を行う腫瘍性疾患あるいは非腫瘍性疾患を有する患者に対して、凍結臍帯血 (twin bag の小さいほう) から調製した CD4 陽性細胞 ( $1 \times 10^7/\text{kg}$ ) を臍帯血移植時、及び 1 週後に 2 回使用し、生着 (好中球  $>500/\text{mm}^3$ 、血小板  $>20,000/\text{mm}^3$ ) までの日数および、感染症、GVHD およびその他の有害事象、免疫学的再構築への効果を評価するべく治療計画を作成した。目標症例数は 50 例とする。今までの臍帯血バンクネットワークを通じたヒストリカルコントロールと比較して有意なデータを出せる症例数として 50 例を設定した。

### 3. 治療用活性化 T 細胞の概要

#### 活性化 T 細胞 (Activated T cells)

- ・ CD3 陽性率 95%以上, CD4 陽性率 90%以上, CD8 陽性 CD4 陰性細胞 5%以下, 生細胞率 90%以上
- ・ エンドトキシン  $<0.4\text{EU/ml}$  以下、無菌テスト 陰性
- ・ ウイルス検査 (PCR) にて HBV, HCV, HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2, Parvovirus B19 の増幅なし
- ・ ウイルス検査 (PCR) にて CMV, EBV の増加がなく、HHV6 陰性。

#### —活性化 T 細胞の誘導方法—

- 0) 解凍臍帯血で HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6 HHV7, HHV8, Parvovirus B19, BK virus, Adenovirus, JC virus, HBV, HCV, HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2 の存在を PCR 法で検討する。
- 1) 解凍臍帯血より単核球を分離する。分離単核球から CD4 陽性細胞分離用マグネティックビーズ (Dynal 社) を用いて、CD4 陽性細胞を単離し、以下の培養に使用する。
- 2) 細胞を 5ml の AIM-5 培地 (Invitrogen 社) [1~2%輸入外国産血漿:当該輸血センター及び細胞治療センターにて品質保証、350 unit/ml ヒト IL-2 (Chiron 社) 添加] に浮遊させ、抗 CD3 抗体 (オ



ルソクローン CD3 注、5 $\mu$ g/ml) を固相化した 25cm<sup>2</sup> フラスコで培養する。

- 3) 細胞の増殖具合を見ながら一週間程度培養した後、ビーズを除去する。
- 4) 培地を 5ml 加えて 75cm<sup>2</sup> のフラスコ (抗 CD3 抗体固相化) に移し、さらに 4 日間ほど培養する (培地を適宜追加し、最終的に 50ml 程度まで増量)。
- 5) 225cm<sup>2</sup> フラスコ (抗 CD3 抗体固相化) に移し、さらに 4 日間ほど培養する (培地を適宜追加し、最終的に 250 ml 程度まで増量)。培養最終日に、羊血液寒天培地とサブロー寒天培地による無菌テストを行う。
- 6) 細胞を培地 750 ml (1%ドナー血清、175 unit/ml IL-2 添加) に浮遊させ、ガス透過性バッグ (ニプロ社) に全量を加え 5~7 日間培養を続ける。
- 7) 培養細胞は投与 2 日前に羊血液寒天培地による無菌テストを行い、投与 2 日前にエンドトキシン HSV1, HSV2, CMV, EBV, VZV, HHV6, HHV7, HBV, HCV, HIV1, HIV2, HTLV1, HTLV2, Parvovirus B19 のチェックを行う。
- 8) 無菌テスト、エンドトキシン、微生物のチェックで問題がない場合、当日細胞を回収し、1% アルブミン加生理食塩水で洗浄後、1% アルブミン加生理食塩水に浮遊し、経静脈的に患者に輸注する。なお、投与の前には CD4, CD8 陽性細胞の%をフローサイトメータにて確認する。
- 9) 投与するリンパ球 (T 細胞) は培養上清の無菌テスト陰性かつエンドトキシンが検出されないことを確認する。

#### 【治療細胞の提供、細胞調製の行われる場所】

細胞の調製は、東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センター (以下細胞治療センター) で行う。特殊検査の大半は細胞治療センターで行われる。

## 4. 患者選択基準 :

### 4.1 適格基準

#### 4.1.1 疾患

悪性腫瘍、非悪性腫瘍など疾患の種類を問わない。骨髄非破壊的あるいは骨髄破壊的前処置後の単一臍帯血移植症例

#### 4.1.2 年齢

年齢に規定を設けない。

#### 4.1.3 前治療の規定

特別な要件はない。

#### 4.1.4 併存疾患に関する制限事項

- ・ 原疾患を問わない。
- ・ 移植後 3 ヶ月以上の生存が見込まれること
- ・ 移植前に重篤なあるいはコントロール不能な細菌・真菌感染症に罹患していないこと

#### 4.1.5 併用薬剤・併用療法についての制限事項

GVHD 予防としてステロイドを用いていないこと

移植前処置として ATG あるいは ALG を用いていないこと

(予防的抗菌薬投与については制限を設けないが、各施設の移植マニュアルに沿った治療で

あること：)

#### 4.1.6 臓器機能（臨床検査値）

AST/ALT	施設基準値上限の 20 倍以下
総ビリルビン	6mg/dl 未満
クレアチニン・クリアランス	10ml/ min 以上
EF	50%以上
PaO <sub>2</sub>	60mmHg 以上
PaCO <sub>2</sub>	60mmHg 以下

#### 4.1.7 試験参加について患者本人かつ・または親権者から文書で同意が得られていること

#### 4.1.8 HLA 適合度

HLA-A, B, DR locus において、血清型にて GVH, HVG 方向ともに 2-locus mismatch までを対象とする。

#### 4.1.9 臍帯血バンク

臍帯血バンクの指定はない。

#### 4.1.10 臍帯血細胞数

臍帯血有核細胞として  $0.5 \times 10^7/\text{kg}$  以上、CD34 陽性細胞として  $0.3 \times 10^5/\text{kg}$  以上であることを条件とする（有核細胞として  $2.5 \times 10^7/\text{kg}$  以上、CD34 陽性細胞として  $1.0 \times 10^5/\text{kg}$  以上で生着が有意に早いとされている）

#### 4.1.11 その他

リンパ球を増殖させることが可能なこと

### 4.2 被験者の除外基準：

- 1) 心疾患に関する条件 心不全でかつ心エコーにて EF50%以下
- 肺疾患に関する条件 PaO<sub>2</sub> 60mmHg 以下かつ PaCO<sub>2</sub> 60mmHg 以上。  
人工呼吸管理されている患者。
- アレルギー アルブミンに対するアナフィラキシー反応の既往
- 感染症 HIV 抗体陽性  
敗血症を含む重症細菌感染症  
重症真菌感染症（アスペルギルス肺炎、ムコール感染症など）  
重症 CMV 感染症  
重症 RS ウイルス感染症  
麻疹  
その他の重篤な感染症  
疑問がある場合は事務局まで問い合わせること。
- 併用薬剤 G-CSF、併用抗菌薬は可とする。  
免疫抑制剤は投与までに可能な限り減量をはかる。

### 4.3 患者治療施設

本研究では患者は原則として登録施設から東京医科歯科大学医学部附属病院に搬送し、同大

学附属病院小児科病棟あるいは血液内科病棟にて加療を行い、治療終了とともに登録施設に搬送するものとする。

## 5. 登録・割付

### 5.1 登録の手順

対象患者が適格基準をすべて満たし、除外基準のいずれにも該当しないことを確認し、登録連絡票及びドナー登録票に必要事項をすべて記入の上、臨床研究調整委員会事務局に FAX 送信する。臨床研究調整委員会事務局の設置場所などについては今後の検討課題とする。

### 5.2 ランダム割付と割付調整因子

第 I-II 相試験である本臨床試験ではランダム割付を行わない。

## 6. 投与方法、投与量、投与期間、併用療法

### 6.1 プロトコール治療

- ・ ドナーCD4 陽性 T 細胞(CD4 $\geq$ 90%, CD3 $\geq$ 95%, CD8 single positive  $\leq$ 5%)  $1 \times 10^7$ /kg を臍帯血移植時及び 1 週後に 2 回投与する。
- ・ 細胞は新鮮凍結血漿用輸血セット（添付説明書参照）を用い、30 分以上かけて輸注する。
- ・ 治療開始後の体重変動については登録時の体重に比して $\pm$ 10%以内の場合は投与量の補正は行わないが、 $\pm$ 10%を超える体重変動が見られた場合は、投与量を再決定する。
- ・ 本プロトコール治療は入院による治療とする。

### 6.2 用量・スケジュール変更規準

治療効果を損なうことなく安全性を確保するために用量及びスケジュールの変更規準を定める。

以下、変更規準については次の用語を用いる。

延期：規定の日時に投与せず、それを遅らせること

減量：規定の用量未満に減じて投与すること

中止：治療の一部または全部の、再開しない中途終了

休止：条件を満たせば再開する可能性のある一時的中止や休薬

#### 6.2.1 延期に関する規定

- ・ 第一回投与における有害事象のため、第二回投与の延期が必要な場合には、第二回投与予定日の 7 日以内に投与を行う。
- ・ 第二回投与に当たっては、適格規準に定める臓器機能条件を満たすことを条件とする。

#### 6.2.2 減量に関する規定

- ・ 第一回投与における有害事象のために第二回投与の投与量を減量する条件は設定しない。
- ・ 第一回投与後、臍帯血固有あるいは細胞調製環境など、細胞調製の問題により第二回投与が 8 日以上延期されると判断されるときにも、現有細胞の投与（減量）は行わない。

#### 6.2.3 治療変更に関する相談

- ・ 治療変更に関する疑問点がある場合には、研究事務局に問い合わせる。

## 6.3 治療の中止

### 6.3.1 プロトコール治療完了の定義

- ① CD4 陽性細胞 ( $1 \times 10^7/\text{kg}$ ) を 1 週間隔で 2 回投与した時点。

### 6.3.2 プロトコール治療中止の基準

以下のいずれかの場合、プロトコール治療を中止とする。

- ① 原病の再発により、原病の治療が必要になる場合
- ② 有害事象 (NCI-CTC v3.0 の Grade4 の非血液毒性) によりプロトコール治療が継続できない場合
- ③ 移植に伴う合併症により、合併症の治療が優先される場合。
- ④ 有害事象と関連する理由により、患者がプロトコール治療の中止を申し出た場合
- ⑤ 有害事象と関連しない理由により、患者がプロトコール治療の中止を申し出た場合
- ⑥ プロトコール治療中の死亡
- ⑦ そのほか、登録後治療開始前の増悪、急速な増悪によりプロトコール治療が開始できなかった、プロトコール違反が判明、登録後の診断変更などにより不適格性が判明した場合。
- ⑧ そのほか試験担当医師の判断。

プロトコール中止/終了日は①の場合最終治療日、⑧の場合死亡日、その他の場合はプロトコール治療中止と判断した日とする。

## 6.4 併用治療・支持治療

### 6.4.1 併用治療

前処置として、あるいは GVHD 予防としての ATG, ALG は用いない。また GVHD 予防としてステロイドは用いない。

予防的抗菌薬投与に関しては制限を設けない。

### 6.4.2 支持治療

- ・ 支持治療として造血因子の使用は許容される。また患者の症状に応じた対症療法薬の使用はこれを妨げない。

例：G-CSF、抗菌薬

活性化 T 細胞輸注治療に際して、血液製剤に対して蕁麻疹などのアレルギー反応を頻回に示すものに対しては抗ヒスタミン薬の前投与は許容される。

- ・ 支持治療として以下のものは許容されない（併用禁止）。

CD4-DLI 前投薬としてのステロイド剤の使用。

## 7. 有害事象の評価・報告

### 7.1 有害事象、有害反応の定義

有害事象とは、投薬や医療処置に関連した、好ましくない、意図しない徴候（臨床検査値異常も含む）、症状、または病気で、治療または医療処置に関連があると考えられるものも考えられないものもある。有害事象とは、特異的な事象を示す、固有の用語であり、医学的文書および科学的な分析に用いられる。有害事象は、それぞれ MedDRA 用語およびコードに対応して