

總括報告書

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 移植医療研究分野)
総括研究報告書

臓器移植・造血細胞移植後日和見感染症に対する有効かつ安全な多ウイルス
特異的T細胞療法の開発と導入に関する研究

研究代表者 森尾友宏

(東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科発生発達病態学分野 准教授)

研究要旨:

造血細胞移植、臓器移植後の日和見感染症対策として、迅速体系的ウイルス測定系を brush up し、臓器移植後患者の解析を実施できる体制を構築した。さらにウイルスに対する治療として、特定の HLA を有するものに対して比較的安価かつ迅速に CTL を作成できる第一世代特異的 CTL 療法を導入し、臨床的知見を深めた。さらに最終目的である多ウイルス特異的 T 細胞調製 (HLA にかかわらず特異的 T 細胞を作製できる手法) においては、ADV, EBV, CMV に対する特異的な T 細胞を調製できることを確認し、細胞内 IFN- γ 産生測定法や ELISpot アッセイを用いて、各抗原に対する特異的 T 細胞の比率を算定した。その結果約 20-50% の特異的 T 細胞を得て、それを最高 1000 倍にまで増幅することが可能であった。また増幅した T 細胞の特異的標的に対する細胞傷害活性や、アロ反応性の欠如を証明した。臨床応用に向けて細胞培養は無血清化することに成功し、また GMP grade のガス透過性フラスコでの培養系に移行して、標準作業手順書を用意しつつ、来年度の臨床応用に向けて準備を進めた。

研究分担者氏名

高橋 聡：東京大学医科学研究所先端医療
研究センター分子療法分野
准教授

立川 愛：東京大学医科学研究所先端医療
研究センター感染症分野
准教授

高橋義行：名古屋大学医学部小児科学
成長発達医学 准教授

服部元史：東京女子医科大学腎臓小児科
教授

水田耕一：自治医科大学移植外科 准教授

A. 研究目的

造血細胞移植の成績は、前処置の最適化、適

切な移植源選択や免疫抑制薬の使用などにより向上している。しかし原疾患再発、生着不全や移植関連合併症などにより、その成績は未だに不十分である。中でも**移植後の日和見感染症は予後や移植後の生活の質に大きく関与**する。CMV、EBV、アデノウイルス(ADV)に加え、BKV、HHV6などによる感染症も大きな問題となっている。

肝移植や腎移植の生着率も90%に近づこうとしている。一方生涯に亘り免疫抑制薬が必要であり、日和見感染症が臓器の廃絶や治療抵抗性感染症という面から克服すべき重要課題として残されている。

ウイルス感染治療には、有効な治療薬の欠如(ADV, BKV, EBVなど)、長期投与による薬

剤耐性（CMVなど）、費用対効果など様々な問題を有している。GVHDや拒絶に影響を与えないウイルス特異的免疫療法はこれらの問題を根本的に解決する方策である。欧米では造血細胞移植分野で実臨床応用され効果をあげているが、日本は明らかに遅れをとっている。

本研究では移植領域全体の成績向上を最終目標とし、ウイルス特異的T細胞療法、特に短期間に増幅可能かつプラスミドやウイルスによる刺激を用いない、特異的T細胞療法の開発と導入を目的として研究を実施する。

具体的には、本研究では（1）臓器移植後日和見感染症の実態を把握し、（2）第一世代EBV、CMV特異的T細胞について臨床研究の中で有効性評価系・搬送系を確立し、（4）第二世代の3ウイルス特異的T細胞では細胞傷害活性、アロ反応評価系、無血清化を評価し、（5）最終的には臨床研究に進むと共に、7ウイルス特異的T細胞療法を確立する。

B. 方法

目的の達成のため、以下の方法を用いて検討を行う。

1. 臓器移植後・造血細胞移植(SCT)後日和見感染モニタリング（水田、服部、高橋聡、森尾）

SCT後では既に約500名（900検体）にて15ウイルス測定を実施している。一方、臓器移植後の多項目検査報告は少ない。まず肝臓移植後、腎臓移植後様々な時期で15ウイルス検出を行い（cross sectional study）また新規倫理審査委員会にprospective studyの申請を行った後に、今後移植を行う患者において移植前後のウイルス感染症モニタリングを行う。ウイルス検査は今までに行って方法に準じて、multi-stripあるいはmulti-well固相化試薬を用いて、リアルタイムPCRを実施する。方法については年内を目処に、核酸抽出、分注、リアルタイムPCR、結果解析までの全解析系を全自動化する。

2. 臓器移植後細胞療法におけるアロ反応検証系の確立（水田、服部、立川）

臓器移植後では拒絶促進が最も懸念される。原材料（血液）としてはレシピエント（リスク：拒絶）、ドナー（リスク：GVHD）の両者の可能性があるが、アロ反応性を最小限にする方策を模索すると共に、新規細胞傷害活性測定法や、CFSE系で簡便・高感度で反応を検出する方法を検証する。前者においては通常の⁵¹Cr遊離試験に加えて、caspase 3の細胞内染色、あるいはcaspase 3の基質を標的細胞（この場合はアロ細胞）にパルスし、caspase 3が活性化されるとその基質が分解されて蛍光を発生することを利用した検出方法、などを用いる。

3. EBV、CMV特異的T細胞の臨床研究（第一世代特異的T細胞）（高橋義）

EBV、CMV特異的T細胞療法は名古屋大学で開発され、GMP準拠施設で調製、臨床研究が実施されている。本治療方法ではHLAに対応したペプチドを用い、T細胞にパルスして抗原提示細胞とし、増殖した特異的T細胞を抗CD3抗体とIL-2で培養することにより、特異的T細胞を増幅して使用する。本研究の中では、さらに症例数を重ねつつ、有効性、有害事象評価系と搬送系を確立する。特に後者ではカテゴリーB対応搬送における予備実験を実施しつつ、広域における妥当な搬送系を確立する。

4. 3ウイルス特異的T細胞培養法の確立（第二世代）（高橋聡、立川、森尾）

1) 細胞調製と特性評価

3ウイルス7抗原特異的T細胞調製についての基礎検討を行う。具体的にはEBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE6), AdV(penton, hexon)の領域をカバーする11アミノ酸ずつoverlapする15merのペプチドを用い、末梢血単核球と共培養する。この培養系にはIL-4 (1,600 IU/mL), IL-7 (900 IU/mL)を添加したAIM-5培地を用いる。10日から12日後に細胞を収集し、その表面抗原特性、特異的T細胞の比率や産生する整理活性物質などを詳細に検証する。特異的T細胞の比率は、ペプチドパルス後の細胞内IFN- γ やIFN- γ ELISpot assayで検証する。

2) 細胞傷害活性およびアロ反応性の検証

本年はまた細胞傷害活性やアロ反応性を検

証する。このためには標的細胞 (EBV感染B細胞、ペプチドをパルスしたPHA刺激芽球、アロPHA刺激芽球) に⁵¹Crラベルし、用意した特異的T細胞と4時間培養し、上清に遊離した⁵¹Crを測定する。あるいは2で述べたような caspase 3の活性化を指標とした方法やCSFEパルスによる細胞分裂回数測定などを用いる。

(倫理的側面に対する配慮)

本研究では患者におけるウイルス測定や、健常人におけるHLA検査及びT細胞培養(採血)が実施される。これらについては倫理審査委員会の承認を得て、十分な説明と書類による同意取得のもとに実施される。

C. 結果

1. 日和見感染症モニタリング

造血細胞移植後、肝移植後、腎移植後のモニタリングシステムについて、測定すべきウイルスを抽出し、その測定系を再検証した。現時点では、肝臓移植分担者(水田)と腎臓移植分担者(服部)がそれぞれ施設倫理審査委員会に諮り、前向き研究及び cross sectionalな解析の両者を始めようとしているところである。現時点でのデータとしては、肝移植後のEBVやCMV感染症、腎移植後のCMV感染症が主体であるが、今後さらに測定ウイルスを拡大する。対象としているものとしては以下のものがあげられる。

通常セット:

HSV1, HSV2, VZV, EBV, CMV, HHV6, HHV7, HHV8, BKV, JCV, Parvovirus B19, AdV, HIV1, HTLV1, HTLV2

・肝移植後で追加: HAV, HBV, HCV, HDV, HEV, HGV, TTV (腎移植では追加項目なし)

測定系については抽出から分注、検出に至るまでのstreamline化した測定系が確立しつつある。全自動化はQIAGEN QIA Symphonyで行うことが可能で、実証しているところである。加えて簡便な抽出方法、分注機器、リアルタイムPCRを用いた混成型自動化も検証している。

2. アロ反応検証系の確立

現時点で6名の健常人にてHLA タイピングを行い、それぞれに対してのアロ反応性をCFSE assayを用いて検証した。MLRでは反応の主体がClass IIのdisparityとなるため、今後もCFSE assayを中心に据えることを考えている。また4で調製した細胞を用いて、アロ反応性を検証するところであるが、まだCFSEアッセイの感度が低い。そこでPHA blastを標的とした⁵¹Cr遊離アッセイを用いて検討したところ、比較的良好な感度を得ることができた。今後は細胞傷害活性と細胞増殖測定系を組み合わせた検討を行う予定である。

3. EBV, CMV 特異的 T細胞の臨床研究

名古屋大学小児科においてEBV特異的T細胞、CMV特異的T細胞治療の臨床研究を継続した。具体的には移植後ATGを投与してEBV関連リンパ増殖症候群となり、また感染細胞がCD20陰性となってrituximabの効果が認められない症例に対して、EBV特異的T細胞調製を行い投与して、良好な結果を得ている。また本症例においては後にCMV感染症にも罹患し、同様にドナーからCMV特異的T細胞を用意して輸注して、本ウイルスの消失を認めた。一方GVHDを認めずその他の有害事象も認めなかった。現在、少数例の中で有効性と安全性が明らかになっているが、今後輸送系を確立することにより、広範囲な臨床研究としていく予定である。

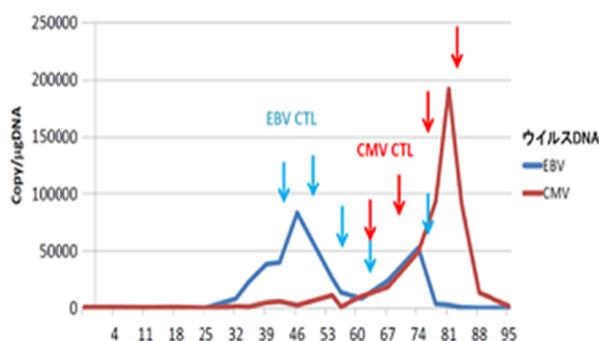


図1 移植後EBV-LPDに引き続き薬剤抵抗性CMV感染症を起こした患者へのEBV特異的T細胞治療→CMV特異的T細胞治療の効果

4.3 ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立

EBV(LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV(pp65, IE6), AdV(penton, hexon)の overlapping peptide を用いて刺激し、さらに IL-4, IL-7 で培養することにより(合計 12 日前後)特異的 T 細胞を得た。細胞は個別抄録が示すように CD3 が 95%以上であり、また CD4 が優位となる。現時点では 5 名にて解析しているが CD4/CD8 比率はドナーによっても大きく異なっている。大半の細胞は CD45RO+CD62L+CCR7+の central memory 分画にあり、一部が effector memory 分画であることが明らかになっている。それぞれの細胞は細胞内 IFN γ 染色および ELISPOT アッセイで特異的 T 細胞の存在が明らかになっており、合計するとほぼ 20-50%程度が特異的 T 細胞、一方その他が非特異的 T 細胞という結果であった。再刺激による特異的 T 細胞の増幅を様々な手法で試みているが、今のところ末梢血単核球(放射線処理あるいは MMC 処理)を用いるのがベストという結果を得ている。

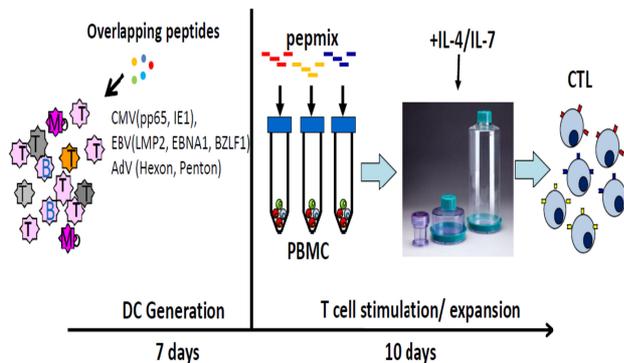


図2 3 ウイルス特異的 T 細胞培養系の概要

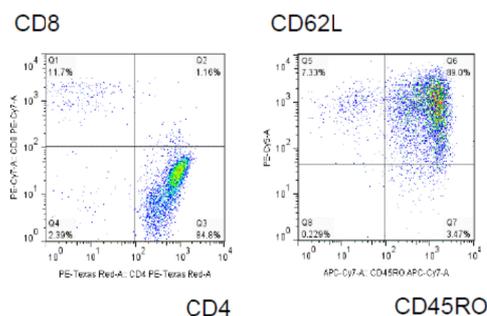


図3 調製した細胞の表面形質: CD45RO 陽性 CD62L 陽性の central memory が大半である。

さらにこれらの調製においては、無血清化を試みた。用いた無血清培地は KBM や TexMAX であり、現時点では血清フリーの状態での培養に成功している。また最終的な臨床応用を視野に入れ、IL-4, IL-7 濃度の至適化(低価格化の試み)及び培養容器の最適化(細胞調製施設での培養を鑑み 24 well plate から G-Rex システムへの移行)を行っており、ほぼ完成形が確立している。これらの細胞培養については手順を定め、標準作業手順書を作成している。

IFN- γ producing cells (pp65-CTL n=4)

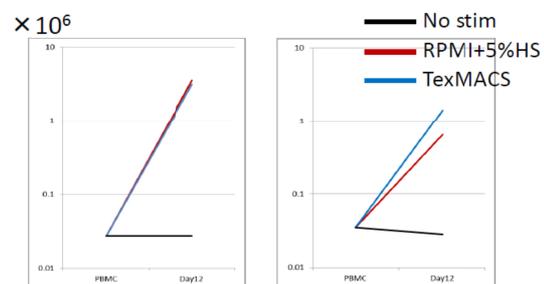


図4 無血清培地による培養: 血清入り培地と遜色のない増殖を示す。

基本的な部分の検討が終了するなか、細胞傷害活性検査の開発にもあたった。実際に最終的には 51Cr release assay で検討するが、非アイソトープ系の測定方法として、caspase 3 cleavage assay や蛍光色素を取り込ませ、その放出を感度良く検出する方法、Annexin V 染色による apoptosis 細胞の検出など様々な方策をとっているところである。51Cr release assay ではすでに peptide pulsed PHA blast を用いて、抗原特異的 CTL 活性を明らかにしつつある。一方アロ反応性は最小限(測定不可)であった。

本年度はまた HHV6(U90,U54), BKV(Large T, VP1)を加えた 5 ウイルス 11 抗原特異 T 細胞、JCV(Large T, VP1), VZV (IE62, IE63)を加えた 7 ウイルス 15 抗原特異的 T 細胞の調製も試み、すべての抗原に対して特異的な反応の誘導が可能であることを明らかにした。細胞の増殖も良好である。一方ペプチドの総種類が 1000 以上になることによるペプチド間の competition が生じることが懸念され、実際に単一ペプチド

刺激に比べて多ペプチド刺激では増殖(それぞれに対する最終特異的 T 細胞数)が劣る傾向にある。その問題を回避するために、加えるペプチドの絞り込みに向けて、それぞれの HLA に対するエピトープマッピングを開始した。

D. 考察

ウイルス検査系は完成の段階にあり、試薬化、キット化、自動化にむけて着実に歩みを進めている。そのような中、既に国外を中心に移植後のウイルス解析データが蓄積しており、今後一般的免疫能や、特異的免疫能と連動した形のウイルスモニタリングなどが必要となると考えている。

上記以外にこの研究班において本年度は、3 ウイルス特異的 T 細胞の樹立に注力した検討を行った。その結果、当初の目標を超えてより臨床応用に近い段階にまで達することができた。

しかし今後の課題としていくつかのことがあげられる。

1 つは価格である。サイトカインはオリジナルプロトコールでは IL-4 1,600IU/mL, IL-7 900IU/mL であり、費用を押し上げる要因となっている。この点については減量と至適化をはかっている。原材料費のみで一投与 2-3 万円程度までの価格低下を計りたい。2 つめは purity の問題である。ペプチドパルスした抗原提示細胞による再刺激が必須であり、その最適化が必要である。3 つめは CD4 細胞の比率が高いことであるが、本部分についてはおそらくペプチド長を 15 アミノ酸としている点が大きく効いているが、中庸な長さとして 15 mer は一般的には CD8 細胞の増幅にも用いられているものである。すでに Bayler 大学ではより短いもの、長いものでの検討が終了しており、CD8 陽性細胞の増幅のためには短いペプチドが有利であるが、その優劣については今後の検討課題としたい。4 つめは re-expansion の方法であり、これは 2 つめの課題と重複するが、現時点で 20mL 採血から得られる 10^8 オーダーの特異的 T 細胞は成人では 2-3 回投与分程度にあたる。再刺激によるさらなる増幅を目指したい。さらには実際に

特異的な CTL が得られたかどうかの検証には、HLA 拘束性についての検討が必要であり、現在 ELISPOT 法を用いた検討を開始しようとしているところである。最後に、多ウイルス特異的とした場合のペプチド間の競合による均等な増幅の阻害が問題になる可能性がある。この点についてはエピトープマッピングをストリームライン化して、少なくとも用いたドナーについては、HLA に応じたそれぞれの抗原に対するエピトープを明らかにし、最終的には最小限のペプチドプールにて刺激を行えるようにと考えている。

一方先行する 1 ウイルス特異的 CTL 療法については、輸送系の確立あるいは培養可能施設の拡大による、経験数の拡大が重要であり、輸送システムの確立と共に、臨床研究開始に向けては、経済的基盤の確立が必須の段階にある。

E. 結論

臓器移植後のウイルス感染症に対しては、ウイルス計測技術が確定しつつあり、測定すべきウイルスを決定し今年度内からデータが集積し始める段階にある。本年度は 3 ウイルス特異的 T 細胞の樹立方法をほぼ確立した。樹立した細胞についてはその性格を明らかにし、抗原特異的に細胞傷害活性があるという証左を得つつある。無血清化や IL-4, IL-7 の低濃度化、気密容器の使用など、現実的な対応策についても検討にはいり、ほぼ条件が確立しつつある。5 ウイルス特異的、7 ウイルス特異的 T 細胞培養にも着手しているが、3 ウイルス特異的 T 細胞調製については標準作業手順書も作成され、平成 26 年度内の臨床研究開始に向けての準備が整った。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

巻末に記載の通り

2. 学会発表

各分担研究者学会発表(G.2)参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

各分担研究者参照

2. 実用新案登録

各分担研究者参照

3. その他

各分担研究者参照

