

201415006A

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)

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成27年3月

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)

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

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 森 尾 友 宏

平成27年3月

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)

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

目 次

I.	班員・研究協力者名簿.....	1
II.	総括研究報告	3
	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 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)	
III.	分担研究報告	
	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)	7
	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)	11
	高橋義行 (名古屋大学大学院医学系研究科)	15
	立川 愛 (東京大学医科学研究所先端医療研究センター	19
	現・国立感染症研究所エイズ研究センター)	
	服部元史 (東京女子医科大学腎臓小児科)	23
	水田耕一 (自治医科大学移植外科)	29
	長村文孝 (東京大学医科学研究所先端医療開発推進分野)	33
IV.	研究事業報告	37
V.	研究成果の刊行に関する一覧表	41
VI.	研究成果の刊行物・別刷	45

I 班員・研究協力者名簿

班員・研究協力者名簿

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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	教 授
研究分担者	高橋 聡	東京大学医科学研究所	准 教 授
	高橋 義行	名古屋大学大学院医学系研究科	准 教 授
	立川 愛	国立感染症研究所エイズ研究センター 第二室（東京大学医科学研究所（～2015年 1月31日））	室 長
	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
	長村文孝	東京大学医科学研究所	教 授
研究協力者	藤田由利子	東京大学医科学研究所	研究レジデント
	田中ゆきえ	東京大学医科学研究所	研究補助員
	小野敏明	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	大 学 院 生
	熊木恵里	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	大 学 院 生
	清水則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイル ス治療学分野	准 教 授
	多田憲正	東京女子医科大学腎臓小児科	助 教
事 務 局	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 〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL&FAX : 03-5803-5245	
	星川あき子	E-mail : ahosikawa.cct@tmd.ac.jp	
	岡森美圭	E-mail : professor.sec5245@gmail.com	
経理事務担当者	鈴木亜耶	国立大学法人東京医科歯科大学 研究・産学連携推進機構事務部 研究推進掛 〒113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45 TEL : 03-5803-5872・7162 FAX : 03-5803-0179 E-mail : ayasuzuki.adm@cmn.tmd.ac.jp	

Ⅱ 総括報告書

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 教授

研究要旨

本年度は、本研究班においては多ウイルス特異的T細胞療法の臨床展開に向けて、標準規格に関する検証を行い、培養手順や資材・培地などについての検討を行った。この検証により、7名以上の健常人ドナーにて、特異的T細胞の特性、細胞傷害活性、アロ反応性を明らかにし、また無血清化やGMPgradeガス透過性容器での培養に成功した。これらを元に標準作業手順書や製品標準書(細胞培養加工品概要書)などの策定を行った。またそれぞれのウイルスにおけるエピトープを決めるなど将来的展開を見据えた検討を行った。一方単ウイルス特異的T細胞療法はHLAハプロ一致造血細胞移植において、ハプロ一致ドナーからの調製の形で3例に投与された。また臓器移植後のウイルス解析についても検討が進んだ。

細胞調製施設の改修工事が進む中、改修工事が終了次第、新しい手順書の中で、2015年4月以降の開始が可能な段階となった。

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
高橋義行：名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学・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・准教授(現国立感染症研究所エイズ研究センター第二室・室長)
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
長村文孝：東京大学医科学研究所先端医療開発推進分野・教授

A. 研究目的

1. 3ウイルス特異的T細胞の製品標準規格策定(策定方法の確立と、実検証)
(担当者：高橋聡、立川、森尾)

2. 3ウイルス特異的T細胞療法のプロトコル作成と臨床応用に向けての培養条件改変
(担当者：森尾、長村)
3. 臓器移植後のウイルス感染症の把握
(担当者：水田、服部)
4. 7ウイルス(EBV,CMV,HHV6,ADV,BKV, JC V, VZV)15抗原特異的T細胞調製
(担当者：森尾)
5. 第一世代特異的T細胞の臨床研究
(担当者：高橋義)
を5つの柱として検討を行った。

B. 研究方法

1. 3ウイルス特異的T細胞の製品標準規格策定(策定方法の確立と、実検証)
Flow cytometryを用いた多重染色により、CD4, CD8比率、naïve, central memory, effector memory, NK細胞, B細胞の比率を検討し、またtrypan blue法あるいはPI法により生細胞比率

を検証した。

また特定の HLA に拘束された特定のウイルスに対する特異的 T 細胞が存在するかを証明するために、EBV にて形質転換した B 細胞を標的として用いる方法、およびペプチド混合物を用いた大規模 ELISpot アッセイにてエピートープマッピングを用いて検討した。

アロ反応性については 51Cr release assay および、CFSE を用いた細胞増殖アッセイの両者を用いた。微生物検査や生細胞検査については常法を用いつつ、ウイルス検査・マイコプラズマ検査については独自に開発した 12 種類同時測定系を用いた。

2. 3ウイルス特異的T細胞療法のプロトコル作成と臨床応用に向けての培養条件改変

11 月に交付された法案やそれに規定される文書に基づいて、特定細胞培養加工物概要書や標準作業手順書を作成した。また細胞培養にあたっては無血清培地として NS-A2 と Tex-MACS を用いて、血清入り培地を用いて、細胞数計測による増殖能解析や Flow cytometry 法を用いた細胞亜群解析などの検討を行った。

3. 臓器移植後のウイルス感染症の把握

臓器移植後(あるいは前後)の患者において、血液検体、尿検体を用いてウイルス検査を実施した。検討したものは 12 ウイルス(単純ヘルペスウイルス 1/2 型(HSV1/2)、水痘・帯状疱疹ウイルス(VZV)、EBV、CMV、ヒトヘルペスウイルス 6/7/8 型(HHV6/7/8)、アデノウイルス(ADV)、ポリオマウイルス(BKV、JCV)、パルボウイルス B19(parvovirus B19))であり、東京医科歯科大学にて開発した手法を用いた。

4. 7 ウイルス(EBV,CMV,HHV6,ADV,BKV, JCV, VZV)15 抗原特異的 T 細胞調製

抗原の種類(overlapping peptide の種類)を増やして、3 ウイルス、5 ウイルス特異的 T 細胞調製と同様のペプチド濃度、IL-4、IL-7 濃度を用いて培養し、培養産物の特性を検討した。

5. 第一世代特異的 T 細胞の臨床研究

HLA-A2 または A24 を持つ場合には、同意を得て移植前に末梢血 50ml よりウイルス特異的 CTL を、以前からの方法を用いて調製し、移植後リツキシマブ抵抗性 EBV-LPD または、抗ウイルス剤抵抗性 CMV 感染に対して、ウイルス特異的 CTL を初回量 2X10⁵/kg より投与した。

(倫理面の配慮)

本研究ではヒト検体を扱う。健常者からの採血に際しては、十分な説明のもと、被験者の同意を得て実施した。健常者からの採血→細胞調製および特性解析については、東京医科歯科大学及び東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て行われた。単ウイルス特異的 T 細胞調製および治療については、ドナーおよびレシピエントに対して十分な説明と同意のもと、名古屋大学医学部倫理審査委員会の承認を得て実施した。ウイルス検査についてはそれぞれの施設において、患者に対する説明と同意の下、各施設の倫理審査委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

1. 3 ウイルス特異的 T 細胞の製品標準規格策定(策定方法の確立と、実検証)

・一般的標準規格

通常の生細胞比率(>90%)、エンドトキシン陰性、細菌・真菌培養陰性、PCR によるウイルスおよびマイコプラズマ陰性、などに加え、CD3 陽性細胞比率、B/NK 細胞の混入を規定することとした。

・アロ反応性検証

アロ反応性を基準として入れるかどうかについても、検討を行った。今まで作成した多ウイルス特異的 T 細胞を用いて、アロの PHA 芽球(PHA 添加により芽球化した T 細胞)を標的として、51Cr 放出試験で、細胞傷害活性を評価する場合には、HLA 完全不一致でも細胞傷害は認めない。今回は HLA 合致、不一致の細胞を放射線照射した後に標的として、多ウイルス特異的 T 細胞と混合し、その分裂を CFSE アッセイにて検討した。その結果、フルマッチでは増殖しないが、2 座不一致でも全不一致でもほぼ同程度に 15-60%程度の細胞が増殖することが明らかになった。

・細胞傷害活性検証

レシピエントの感染細胞を調製したドナー細胞が特異的に傷害するかどうかを確定できる系の開発が必要である。EBV 形質転換 B 細胞に目的のウイルス抗原由来 overlapping peptide をパルスし、HLA の合致、不一致のド

ナー由来特異的 T 細胞と共培養する形で、その抗原提示 B 細胞を認識できるかを細胞内 IFN- γ 染色で同定した。その結果、HLA0 合致では反応を認めず、1 座、2 座一致では認めるなど、大まかに HLA 拘束性特異的 T 細胞の存在を検証できる系が確立した。

・エピトープマッピング

Matrix-ELISpot を行い、CMV-pp65/IE1, EBV-EBNA1/LMP2/BZLF1, AdV-Penton から 198 種類の候補 OLP を決定し、さらに各 OLP を抗原として ELISpot assay を行い、反応の見られた OLP を決定した。隣り合う 2 種類の OLP に反応が見られたものは 1 領域とカウントすることとした。その結果、34 領域で Background 以上の IFN- γ 産生細胞が検出された。強い反応 (1000SFC/1x10⁶ cells) の見られた部位だけでも、17 領域存在しており、CMV-pp65 で 11 領域、CMV-IE1 で 3 領域、EBV-LMP2 で 1 領域、AdV-Penton で 2 領域存在していた。同様の方法で、計 5 名の健常人ドナーの PBMC を用いて標的部位の同定を行った結果、CMV に対する反応が全く検出されなかった 1 名を除いて、CMV に対する T 細胞が最も高頻度に存在しており、標的部位の数も最も多かった。

2. 3 ウイルス特異的 T 細胞療法のプロトコル

作成と臨床応用に向けての培養条件改変

・培地検討

NS-A2® を用いて作成した T 細胞は TexMACS® を用いて作成した T 細胞と比較して遜色ないことが確認できた。培養された T 細胞は >95% が CD3 陽性であり、CD4 が優位である場合が多かった。T 細胞は CD45RO+CD62L+ の central memory が主体で、一部 CD62L- の effector memory であった。ウイルス特異的 T 細胞が産生する IFN- γ を ELLISpot 法と flow cytometry 法にて解析したが、TexMACS® を用いて作成したものと遜色のない結果であった。細胞傷害活性についても同等であることを検証する予定である。

容器については一貫してガス透過性プラスチックである G-Rex を用いた。

・プロトコル (標準作業手順書等) 策定

具体的な調製試薬や培地などを入れ込む形で、標準作業手順書 (兼記録書) を作成した。特に細胞を調製する東京医科歯科大学におい

ては、細胞治療センター Annex と、5 部屋の open system を有する細胞治療センター (病院) の renovation となり、施設に合わせた形での書類作成を行った。

3. 臓器移植後のウイルス感染症の把握

小児腎移植患者 9 名での検討では、血液検体において 5 名で HHV7 を、4 名で CMV を、3 名で HHV6 を、そして 2 名で BKV を検出した。6 名では、同時期に複数のウイルスが検出された。尿では、7 名で BKV を、6 名で JCV を、3 名で CMV を検出した。5 名では、同時期に複数のウイルスが検出された。

小児肝移植患者 14 名においては、肝移植後 CMV 感染 (CMV アンチゲネミア陽性) を 57% に、感染症 36% に認めた。また EBV 感染 (EBV-DNA \geq 5000) を 14% に認めた。

4. 7 ウイルス (EBV, CMV, HHV6, ADV, BKV, JCV, VZV) 15 抗原特異的 T 細胞調製

抗原の種類 (overlapping peptide の種類) を増やして、通常量のペプチド濃度、IL-4, IL-7 濃度を用いて培養し、培養産物の特性を検討した。7 ウイルス 15 抗原での作成では、3 ウイルス・5 ウイルス特異的 T 細胞に比して、より安定して T 細胞を培養可能であることが明らかになった。各抗原に対する IFN γ 産生能も 3 ウイルス、5 ウイルス特異的 T 細胞調製とほぼ同等であり、結果として総特異度は上昇することとなった。

5. 第一世代特異的 T 細胞の臨床研究

難治性 CMV 感染に対して CMV 特異的 CTL を 3 例に投与し、1 例に有効で、1 例が末梢血中 CMV-DNA は消失したものの、その後 CMV 脳炎を発症し、亡くなった。リツキシマブ抵抗性 CD20 陰性 EBV-PTLD 1 例に対して EBV 特異的 CTL を投与し有効であった。

D. 考察

実臨床応用に向けた検討および書類整備が行われた。細胞培養に当たっては無血清培地の選定が重要と考えており、今後も詳細な比較検討を続ける必要がある。いずれにせよ最終的にマスターファイル登録されたものを使用することが肝要と考えている。

ウイルス特異的 T 細胞の質の担保 (規格策

定)としては、本大学が先進的に行う微生物検討法を中核に添えた一般検査を実施できるものと考えている。そのほかの T 細胞純度、生細胞率等については、ほぼ基準が確定した。合致した HLA に拘束された抗原に対する特異的 T 細胞の存在の証明方法や、アロ細胞に対する免疫応答などの評価系が整備された。後者については比較的鋭敏な試験であることから、標準規格への取り入れについては今後の検討が必要である。発展的な課題としてより 1) より簡便に(すくないペプチドで)多ウイルス特異的 T 細胞を作成するため、2) HLA 拘束性特異的 T 細胞を簡便に検出するため、また 3) 特異性の高い T 細胞を培養するためにエピトープマッピングも重要と考えている。

臓器移植後のウイルス感染についてはデータが蓄積しつつある。将来的なウイルス特異的 T 細胞治療については引き続いて議論を深めたいと考えている。

一方先行している単ウイルス特異的 T 細胞については、有効性や培養上の改良必要事項等が明らかになりつつあり、今後は第三者からの特異的 T 細胞治療についても検討が進められる。一方副作用に対する対策、GVHD に対する対策として間葉系幹細胞を用いた rescue 治療も検討、実施される状況であり、今後多様な免疫細胞療法の現実化が期待される。

東京医科歯科大学での細胞治療施設の改修(改良)は 2015 年 3 月末で完成する。3 年目には臨床研究の開始が実現するものと考えている。

E. 結論

3 ウイルス特異的 T 細胞、7 ウイルス特異的 T 細胞の調製の検証が進み、無血清培地、ガス透過性 GMP grade フラスコを用いて、7 名以上の健常人ドナーにて、その特性、細胞傷害活性を明らかにした。培養加工細胞の規格として、

特定の HLA に拘束された特異的 T 細胞の存在を明らかにできる系を作成し、またアロ反応性を鋭敏に評価できる系を確立した。それぞれの HLA に対する各ウイルス抗原のエピトープについても、綿密な検討を行い、将来的なより確実で安全な治療法に結びつける方策として期待される。来年度の臨床試験に向けて、再生医療新法のもとで細胞培養や患者への投与が行えるように、製品標準書を策定し、標準作業手順書案を作成した。来年度の(細胞治療センター改修工事終了後の)臨床研究開始に向けて道筋がついたものと考えている。臓器移植後のウイルス動態についてもデータが蓄積しつつあり、また先行する単ウイルス特異的 T 細胞治療はその有効性が明らかになりつつある。

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

Ⅲ 分担研究報告

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)

分担研究報告書

－移植後日和見感染症に対する多ウイルス特異的 T 細胞調製－

研究代表者	森尾友宏	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 教授
研究協力者	藤田由利子	東京大学医科学研究所 研究レジデント
	田中ゆきえ	東京大学医科学研究所 研究補助員
	小野敏明	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 大学院生
	熊木恵里	東京医科歯科大学大学院発生発達病態学分野 大学院生
	清水則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所ウイルス治療学分野 准教授

研究要旨

近年、同種造血幹細胞移植は移植前処置や補助療法などの発展により治療成績が良くなっている。特に移植後早期の細菌感染症の制御や、免疫抑制薬の進歩による合併症の減少、前処置の改良などが、移植治療の生存率改善に寄与している。反面、ウイルス感染症については抗ウイルス薬の種類も少なく、副作用等の問題も内包する。また、移植後早期の免疫不全状態の場合には治療効果が不十分であったり、移植後合併症により抗ウイルス薬が使用できなかつたりすることも多い。

本研究においては、今まで peptide を用いて簡便にサイトメガロウイルス、EB ウイルス、アデノウイルスの 3 ウイルス特異的 T 細胞を作成してきたが、さらに造血幹細胞移植後に問題となる 7 ウイルス(サイトメガロウイルス(CMV)、EB ウイルス(EBV)、アデノウイルス(AdV)、BK ウイルス、JC ウイルス、ヒトヘルペスウイルス-6(HHV-6)、水痘帯状疱疹ウイルス(VZV))特異的 T 細胞を作成している。今年度は各ウイルスに対しての細胞傷害活性を検討すると共に、同時に IFN γ 産生能力も検討した。

ベイラー大学の方法に改変を加え、より臨床に使用しやすいように血清を用いない培地での作成も検討した。具体的には増殖率、調製されたリンパ球亜群、特異性、IFN γ 産生能などを検討し、血清入りのものと遜色がないことを明らかにした。

A. 研究目的

1. 昨年度はベイラー医科大学での作成法に準拠し、我々独自の方法として無血清培地 (TexMACS®)を用いること、7 ウイルス 15 抗原の peptide を用いての多ウイルス特異的 T 細胞が作成できることを確認した。

抗原 peptide に関してはベイラー医科大学ではドイツ JPT 社製の peptide を用いており、我々も JPT 社製のものの作成が可能であった。やや製品ラインアップは異なるものの、ドイツ Miltenyl 社も同様の peptide を販売しており、Miltenyl 社製のものでも同等のものを作成する

ことは可能であることは確認していたが、無血清培地に関しては、昨年度は Miltenyl 社の TexMACS®のみでしか検討してこなかった。

今年度は不測の事態にも対応できるよう日水製薬の NS-A2®という無血清培地で同等のものが作成できるかどうかを検討した。

2. 昨年度再現性が不十分であった基礎的検討、特に細胞傷害性に関して引き続き検討を行う。

B. 研究方法

健康人ボランティアから末梢血単核球を分離し、11 アミノ酸ずつ overlap した 15 アミノ酸長のペプチド混合物を、EBV (LMP2, EBNA1, BZLF1), CMV (pp65, IE1), AdV (penton, hexon), BKV (LargeT, VP1), JCV(LargeT, VP1), HHV6 (u54, u90), VZV (IE62, IE63)に対して用意し、IL-4, IL-7 存在下に 9-14 日間培養を行った。(補足 EBV, CMV, AdV, BKV, JCV に関しては Miltenyl 社製のものを、HHV6, VZV に関しては現時点で Miltenyl 社から製品化されていないため JPT 社製のものを使用)

培地には無血清培地である Miltenyl 社製の TexMACS®もしくは日水製薬の NS-A2®を使用。培養容器に密閉型のガス透過性培養容器 (G-Rex®)を用いて培養した。

- 1) 作成された特異的 T 細胞に対して flowcytometry 法を用いて T 細胞の表面抗原解析を行う。
- 2) flowcytometry 法や ELISpot assay を用いて、特異的 T 細胞の IFN γ 産生能を検討。
- 3) 特異的細胞傷害活性については、⁵¹Cr 遊離試験を用いて解析。標的細胞に関してはベイラー医科大学の手法に準拠し、PHA-bast を作成し、その細胞にウイルス特異的 T 細胞を作製した時と同じ peptide で刺激して疑似的な感染細胞とした。

(倫理面の配慮)

本研究ではヒト検体を扱い、また健康者から 20-50mL 程度の採血を行う。研究に関しては東京医科歯科大学及び東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て行った。また採血や検査に際しては十分な説明のもと、被験者の同意を得て実施する。

C. 研究結果

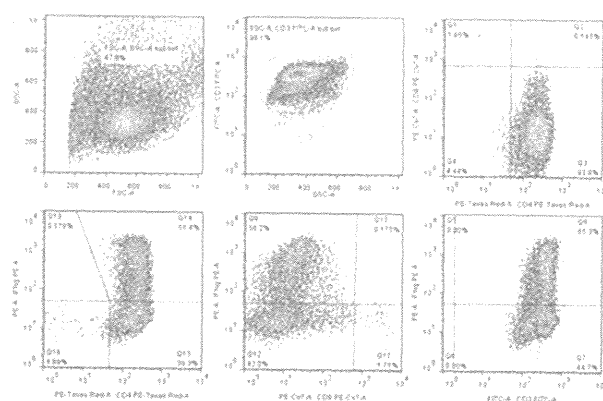
1. 日水製薬の NS-A2®を用いて作成した T 細胞は Miltenyl 社の TexMACS®を用いて作成した T 細胞と比較して遜色ないことが確認できた。

培養された T 細胞は TexMACS®で作成した時と同様に >95% が CD3 陽性の T 細胞であり、CD4 が優位である場合が多かった。T 細胞は CD45RO+CD62L+ の central memory が主体で、

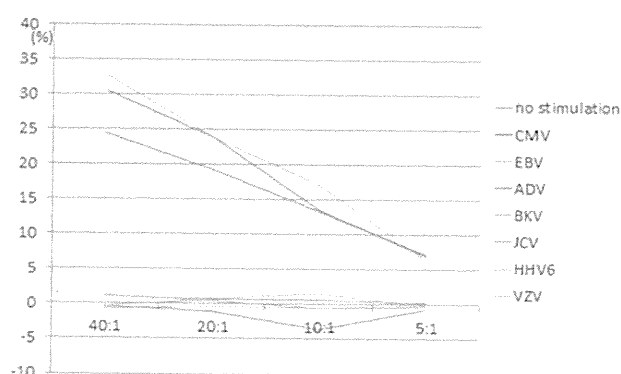
一部 CD62L- の effector memory であった。

ウイルス特異的 T 細胞が産生する IFN- γ を ELISpot 法と flowcytometry 法にて解析したが、TexMACS®を用いて作成したものと遜色のない結果であった。

以下にあるドナーから NS-A2®を用いて作成した flowcytometry 法の結果の 1 例を示す。



我々の作成したウイルス特異的 T 細胞では CD4+細胞が多いため、細胞傷害活性を持たない可能性も懸念されたが、昨年度の検討で細胞傷害活性が証明された。再現性の確認のため、今年度も引き続き細胞傷害性の検討を行っていたが、ドナーによっては良好な細胞傷害活性を期待できることが証明された。以下にそのドナーにおける ⁵¹Cr release assay の結果を示す。



昨年度の検討では 7 ウイルス 15 抗原での作成は 3 ウイルス 7 抗原での作成に比べ劣ると考えられたが、培養法を検討しなおした結果 7 ウイルス 15 抗原のほうがより安定して T 細胞を培養可能であることが分かった。各抗原に対する IFN γ 産生能も悪くなかった。

D. 考察

ドナーに依存すると思われるが、本年度の検討において我々の作成した T 細胞で良好な細胞傷害性が確認できたことは、今後第三者からの投与を考慮した時、ドナー選定の選択肢の条件となりうると思われる。まだどのようなドナーから投与すればよいかはわかっていないが、米国ではすでに第三者からの投与による臨床試験の結果が報告され始めているので、アロ反応性の検討とともにどのようなドナーから作成するのが好ましいのか、更なる検討が必要である。

昨年度からの検討で、臨床試験を行うための基本的な裏付けは達成されたと思われる。臨床試験を行う上で実際の培養施設となる予定の東京医科歯科大学附属病院の細胞治療センターは現在改修中であるが、センターが再開され次第実際に行う予定の手順にのっとった試験培養や、細胞の品質保証の検討に入りたい。

E. 結論

本年度は、昨年度の 3 ウイルス 7 抗原特異的 T 細胞調製にひきつづき、7 ウイルス 15 抗原特異的 T 細胞の調製を安定化させることができた。培地に関しても 2 種類の無血清培地での検討ができ、不測の事態により培地が供給されないときの代替案を確保した。昨年度からの検討により臨床試験を行うための基礎的検討は達成できたと思わる。来年度には臨床試験を開始する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Koura U, Sakaki-Nakatsubo H, Otsubo K, Nomura K, Oshima K, Ohara O, Wada T, Yachie A, Imai K, **Morio T**, Miyawaki T, Kanegane H. Successful treatment of systemic cytomegalovirus infection in severe combined immunodeficiency using allogeneic bone marrow transplantation followed by adoptive immunotherapy. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 24:200-2, 2014.

2. Matsubara Y, Chiba T, Kashimada K, **Morio T**, Takada S, Mizutani S, Asahara H. Transcription activator-like effector nuclease-mediated transduction of exogenous gene into *IL2RG* locus. *Scientific Reports*. 4:5043, 2014.
 3. Endo A, Watanabe K, Ohye T, Matsubara T, Shimizu N, Kurahashi H, Yoshikawa T, Katano H, Inoue N, Imai K, Takagi M, **Morio T**, Mizutani S. Molecular and virological evidence of viral activation from chromosomally integrated HHV-6A in a patient with X-SCID. *Clin. Infect. Dis*. 59:545-8, 2014.
 4. Nakatani K, Imai K, Shigeno M, Sato H, Tezuka M, Okawa T, Mitsui N, Isoda T, Tomizawa D, Takagi M, Nagasawa M, Kajiwara M, Yamamoto M, Arai A, Miura O, Kamae C, Nakagawa N, Homma K, Nonoyama S, Mizutani S, **Morio T**. Cord blood transplantation is associated with rapid B cell neogenesis compared with bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 49:1155-61, 2014.
- ##### 2. 学会発表
1. **Morio T**, Fujita Y, Ono T, Ochiai N, Leen A.M, and Takahashi S. Development of simplified method for generation of multivirus-specific T cells. 2014 International Symposium and Annual Meeting of Korean Society of Microbiology and Biotechnology. Busan, Korea. June 2014.
 2. 小野敏明、藤田由利子、立川（川名）愛、高橋 聡、森尾友宏：臨床応用に向けた多ウイルス特異的 T 細胞培養法の確立とその特性解析、第 42 回日本臨床免疫学会総会、東京、2014 年 9 月 25 日
 3. 藤田由利子、小野敏明、落合央、立川（川名）愛、Ann M. Leen、Helen E. Heslop、森尾友宏、高橋聡：実臨床応用に向けたウイルス特異的 T 細胞療法の開発、第 6 回血液疾患免疫療法研究会学術集会、京都、2014 年 9 月 6 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他
特記事項なし

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)

分担研究報告書

—多ウイルス特異的 T 細胞の規格策定および臨床応用に関する研究—

研究代表者	高橋 聡	東京大学医科学研究所	准教授
研究協力者	藤田由利子	東京大学医科学研究所	研究レジデント
研究協力者	田中ゆきえ	東京大学医科学研究所	研究補助員

研究要旨

本研究においては、多ウイルス特異的T細胞療法の臨床展開に向けて、1) 標準作業手順書の策定、2) 調製したT細胞の示すべき特性の検討（製品標準書の検討）、および3) 多ウイルス特異的T細胞のアロ反応性の検証、4) HLA拘束性目的ウイルス特異的T細胞の検証方法について検討を加えた。

本年度の成果としては、再生医療等の安全性の確保等に関する法案・省令・通知に従い、各種手順書を用意した。また調製した細胞においては、レシピエントとドナーの合致するHLAに拘束されたウイルス特異的T細胞が存在することを証明する方法を開発した。この証明は、通常が生細胞率、T細胞比率、IFN γ 産生細胞の比率、などに加えて、2) の製品（実際には特定細胞培養加工物）の標準となる。また多ウイルス特異的T細胞はアロの細胞に対して細胞傷害活性は示さないが、共培養においてCFSE assayを行うと、実際にはHLA合致の場合には増殖せず、不一致の場合には15-60%程度の細胞が増殖することが明らかになった。

A. 研究目的

1. 再生医療等の安全性の確保等に関する法案・省令・通知に準拠した標準作業手順書の策定
2. 調製した T 細胞の示すべき特性の検討（製品標準書の検討）
3. 多ウイルス特異的 T 細胞（3 ウイルス 7 抗原特異的 T 細胞）のアロ反応性の検証
4. HLA 拘束性目的ウイルス特異的 T 細胞の検証方法の開発を目的として検討を行った。

より、CD4, CD8 比率、naïve, central memory, effector memory, NK 細胞, B 細胞の比率を検討し、また trypan blue 法あるいは PI 法により生細胞比率を検証した。

3. 培養した特異的 T 細胞アロ反応性を検証するために、細胞増殖を CFSE 法で検証した。
4. EBV で形質転換した B 細胞（レシピエント）に目的のウイルス抗原由来 overlapping peptide をパルスし、HLA の合致、不一致のドナー由来特異的 T 細胞と共培養して、IFN- γ 細胞内染色を行った。

B. 研究方法

1. 11 月に交付された法案やそれに規定される文書に基づいて、特定細胞培養加工物概要書や標準作業手順書を作成した。
2. 特性に関しては 3、4 とともに連動して検討を進めた。それに加えて、CD3/CD4/CD8/CD62L/CD45RO/CD16/CD56/CD19 染色に

(倫理面の配慮)

本研究ではヒト検体を扱う。健常者からの採血に際しては、十分な説明のもと、被験者の同意を得て実施した。また本研究は東京医科歯科大学及び東京大学医科学研究所倫理審査委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. 再生医療等の安全性の確保等に関する法案・省令・通知に準拠した標準作業手順書の策定

具体的な調製試薬や培地などを入れ込む形で、標準作業手順書（兼記録書）を作成した。特に細胞を調製する東京医科歯科大学においては、open system および closed system の両者を有する小規模な細胞治療センター Annex と、5 部屋の open system を有する細胞治療センター（病院）の renovation となり、施設に合わせた形での書類作成を行った。

2(3). 細胞特性については通常の生細胞比率 (>90%)、エンドトキシン陰性、培養陰性、ウイルス増殖なし、などに加え、CD3 陽性細胞比率、B/NK 細胞の混入を規定することとした。一方、アロ反応性を基準として入れるかどうかについても、検討を行った。今まで作成した多ウイルス特異的 T 細胞を用いて、アロの PHA 芽球（PHA 添加により芽球化した T 細胞）を標的として、51Cr 放出試験で、細胞傷害活性を評価していたが、HLA 不一致(0/8)でも細胞傷害は認めなかった。今回は HLA 合致、不一致の細胞を標的として、また増殖しないように放射線照射をした後に、多ウイルス特異的 T 細胞と混合し、その分裂を CFSE アッセイにて検討した。その結果、図 1 に一例を示すが、フルマッチでは増殖しないが、2 座不一致でも全不一致でもほぼ同程度に 15-60%程度の細胞が増殖することが明らかになった。

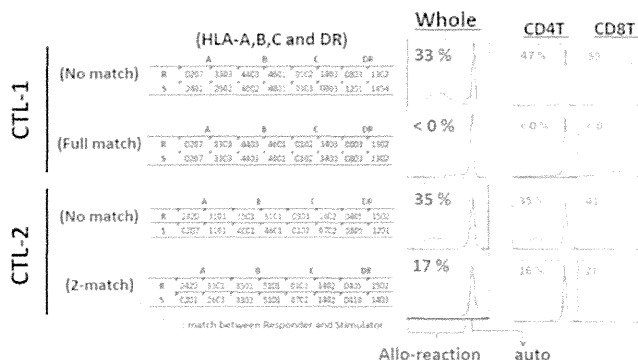


図 1 CFSE アッセイによるアロ反応の評価

4. 図 2 に示すように HLA 一致がたとえば 1/6 ~ 3/6 (1/8 ~ 4/8) 一致のドナーが 4 名いて、それぞれのウイルスに対する特異的 T 細胞の比率が既知の場合、たとえば患者が EBV, HHV6 感染症のときにどのドナーからの T 細胞を用いるかという選択が必要になる。TP-T02 が最も合致度が高いが EBV に対する T 細胞は 0.5% である。また合致した HLA に拘束された EBV 特異的 T があるかどうかという情報もない。このような事態を想定して、レシピエントの感染細胞を調製したドナー細胞が特異的に傷害するのを測定できる系の開発が必要である。ここでは、EBV で形質転換した B 細胞に目的のウイルス抗原由来 overlapping peptide をパルスし、HLA の合致、不一致のドナー由来特異的 T 細胞と共培養する形で、その抗原提示 B 細胞を認識できるかを細胞内 IFN- γ 染色で同定した。その結果、HLA0 合致では反応を認めず、1 座、2 座一致では認めるなど、大まかに HLA 拘束性特異的 T 細胞の存在を検証できる系が確立した。

	PT	TP-T01	TP-T02	TP-T03	TP-T04
HLA-A	2402/2601	2402/2602	2402/3101	0210/2402	2601/2603
HLA-B	0702/3501	4002/4801	3501/5101	4006/5201	1501/3501
HLA-Cw	0303/0702	0303/0803	0303/1402	0801/1202	0303/1502
HLA-DRB1	0405/0901	0901/1454	0405/1502	0405/1502	1101/1406
HLA-DPB1	0501/0501	0202/0501	0501/0901	0201/0901	0201/1301
HLA-DQB1	0303/0401	0303/0502	0401/0601	0401/0601	0301/0301
		2/6 (3/8)	3/6 (4/8)	1/6 (1/8)	2/6 (2/8)

調製された T 細胞 (特異的 T の%)

ウイルス	PT	TP-T01	TP-T02	TP-T03	TP-T04
EBV	●	8%	0.5%	2%	10%
CMV		3%	9%	5%	6%
HHV6	●	0.3%	4%	9%	10%
Adv		12%	8%	1%	14%
BKV		5%	0.5%	11%	15%

図 2 患者 (PT) とドナー候補 (TP-T01-04) の HLA 情報
それぞれのドナーから調製された多ウイルス特異的 T 細胞について、それぞれのウイルスに対する特異的 T 細胞比率を示す。

D. 考察

実臨床応用に向けた検討および書類整備が行われた。ウイルス特異的 T 細胞の質の担保としては、合致した HLA に拘束された抗原に

対する特異的 T 細胞の存在の証明方法や、アロ細胞に対する免疫応答などの評価系が整備された。後者の検査に関しては、用意した多ウイルス特異的 T 細胞の総特異度（合計の%）にも影響を受けるものと思われ、純度をあげた特異的 T 細胞でも検証を行うこととしたい。一方、今後の細胞の規格策定に当たっては、増殖細胞の%のみでは可・不可を検討できないことが予想される。付随した重要情報の収集等にもつとめたい。

E. 結論

本年度は、多ウイルス特異的 T 細胞の臨床応用に向けて、再生医療新法下で必要とされる書類を整備した。また細胞の標準規格を設定するために、作成した細胞すべてにおいて表面抗原分析を行い、また今まで東京医科歯科大学医学部附属病院細胞治療センターで行ってきた先端的微生物検査を投入することで、一般的規格を設定した。また合致した HLA に拘束された特異的 T 細胞の存在を見分ける手法も確立した。アロ反応を CFSE を用いた増殖を指標として検討する方法も確定した。来年度の（細胞治療センター改修工事終了後の）臨床研究開始に向けて道筋がついたものと考えている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato A, Nishida C, Sato-Kusubata K, Ishihara M, Tashiro Y, Gritli I, Shimazu H, Munakata S, Yagita H, Okumura K, Tsuda Y, Okada Y, Tojo A, Nakauchi H, **Takahashi S**, Heissig B and Hattori K. Inhibition of plasmin attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality by suppressing the matrix metalloproteinase-9-dependent inflammatory cytokine storm and effector cell trafficking. *Leukemia*. **29**:145-56, 2015.
2. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Tojo A, **Takahashi S**. Myeloablative unrelated cord blood transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: comparison with other graft sources from related and unrelated

- donors. *Ann Hematology*. **94**:289-96, 2015.
3. Nakauchi Y, Yamazaki S, Napier SC, Usui JI, Ota Y, **Takahashi S**, Watanabe N, Nakauchi H. Effective treatment against severe Graft-versus-Host Disease with allele-specific anti-HLA monoclonal antibody in a humanized-mouse model. *Exp Hematol*. **43**:79-88e4, 2015.
4. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, **Takahashi S**. Single-unit cord blood transplant for acute lymphoblastic leukemia and lymphoma using an intensified conditioning regimen of total body irradiation, high-dose cytarabine and cyclophosphamide. *Leuk Lymphoma*. 2014. [Epub ahead of print]
5. Atsuta Y, Suzuki R, Yamashita T, Fukuda T, Miyamura K, Taniguchi S, Iida H, Uchida T, Ikegame K, **Takahashi S**, Kato K, Kawa K, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Sakamaki H, Kodera Y; Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Continuing increased risk of oral/esophageal cancer after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults in association with chronic graft-versus-host disease. *Ann Oncol*. **25**:435-41, 2014.
6. Mizuta S, Matsuo K, Nishiwaki S, Imai K, Kanamori H, Ohashi K, Fukuda T, Yasushi O, Miyamura K, **Takahashi S**, Onizuka M, Atsuta Y, Suzuki R, Morishima Y, Kato K, Sakamaki H, Tanaka J. Pre-transplant administration of imatinib for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. **123**:2325-32, 2014.
7. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Ebihara Y, Mochizuki S, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, **Takahashi S**. Impact of sex incompatibility on the outcome of single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant*. **49**:634-9, 2014.
8. Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M,

- Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, **Takahashi S**. Comparable long-term outcome of unrelated cord blood transplantation with related bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation for patients aged 45 years or older with hematologic malignancies after myeloablative conditioning. *Biol Blood Marrow Transplant.* **20**:1150-5, 2014.
9. Nakaya A, Mori T, Tanaka M, Tomita N, Nakaseko C, Yano S, Fujisawa S, Sakamaki H, Aotsuka N, Yokota A, Kanda Y, Sakura T, Nanya Y, Saitoh T, Kanamori H, **Takahashi S**, Okamoto S. Does the hematopoietic cell transplantation specific comorbidity index (HCT-CI) predict transplantation outcomes? A prospective multicenter validation study of the Kanto Study Group for Cell Therapy. *Biol Blood Marrow Transplant.* **20**:1553-9, 2014.
10. Konuma T, Ooi J, Uchida N, Ogawa H, Ohashi K, Kanamori H, Aotsuka N, Onishi Y, Yamaguchi H, Kozai Y, Nagamura-Inoue T, Kato K, Suzuki R, Atsuta Y, Kato S, Asano S, **Takahashi S**. Granulocyte colony-stimulating factor combined regimen in cord blood transplantation for acute myeloid leukemia: a nationwide retrospective analysis in Japan. *Haematologica.* **99**:e264-8, 2014.
11. Kato S, Konuma T, Tojo A, **Takahashi S**. Hemorrhagic hepatic cyst after allogeneic bone marrow transplantation. *Int J Hematol.* **100**:214-5, 2014.
12. **Takahashi S**. Here comes the cord. *Blood Res.* **49**:209-10, 2014.
2. 学会発表
なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
特記事項なし
2. 実用新案登録
特記事項なし
3. その他
特記事項なし

分担研究報告書

EBV・CMV特異的T細胞治療の臨床研究

研究分担者 高橋 義行 名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 准教授

研究要旨

ウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)による臨床第 1 相試験を行った。造血細胞移植の HLA-A2 または A24 陽性ドナー末梢血よりサイトメガロウイルス(CMV)、EB ウイルス(EBV)に対する特異的 CTL を誘導した。HLA ハプロ一致移植 27 例中 3 例において、ドナー由来ウイルス特異的 T 細胞(CTL)療法を行った。投与後の発熱、発疹などの急性反応はなく、3 例中 3 例で投与後末梢血からウイルス DNA の低下、消失を認めた。リツキシマブ無効の移植後 CD20 陰性 EBV-LPD に対して EBV 特異的 CTL 療法を行い、ウイルス血症、PET/CT での腫瘍取り込みは消失した。ドナー由来ウイルス特異的 CTL 療法の併用は、より安全な移植に寄与した。

A. 研究目的

名古屋大学小児科では、HLAハプロ一致移植において、急性GVHDや生着不全に対する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) および難治性ウイルス感染に対するウイルス特異的T細胞(CTL)療法といったドナー由来細胞療法を併用することで合併症の克服を目指した研究をすすめている。

B. 研究方法

対象は2004年5月から2014年6月までに当科で行ったHLAハプロ一致移植27例を後方視的に解析した。年齢中央値は9歳(0-15歳)、疾患はAML6例、ALL6例、aplastic anemia7例、JMML2例、CMML2例、RAEB2例、CAEBV1例、LCH1例で、うち13例が非寛解期白血病、移植後拒絶または好中球0で感染を伴う再生不良性貧血といった緊急移植として行われた。骨髄および末梢血幹細胞を併用し、GVHD 予防はFK506およびshort term MTX、ヒト胸腺グロブリンを計15mg/kg投与した。ドナーがCMVまたはEBVが既感染でHLA-A2またはA24を持つ場合には、同意を得て移植前に末梢

血50mlよりウイルス特異的CTLを、また骨髄30mlより牛胎児血清の代わりにヒト由来の血小板融解産物を用いてMSCを培養、凍結保存した。移植後リツキシマブ抵抗性EBV-LPDまたは、抗ウイルス剤抵抗性CMV感染に対して、ウイルス特異的CTLを初回量2X10⁵/kgより投与し、GVHD Grade II以上と診断され、methylprednisolone (mPSL) 2mg/kg/day治療開始3日間で病態の悪化を認めるかまたは1週間の時点でGrade II以上のGVHDが不変である場合に、患者体重1kg当たり1×10⁶個のMSCを静脈内に投与した。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学医学部バイオ先端臨床研究審査委員会の承認後、ドナーから文書による同意を得ておこなう。

C. 研究結果

27例全例で生着が得られ(中央値20日(14-29日))、Day100における死亡率は0%であった。3年無病生存率は、再生不良性貧血で100%、寛解期急性白血病または慢性白血病で57%であったが8例の非寛解期急性白血病患者は全例再