

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、新しい手順書の元で、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 アッセイにてエピソード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- 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- 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 ELISpot 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 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-PTLD1 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