

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

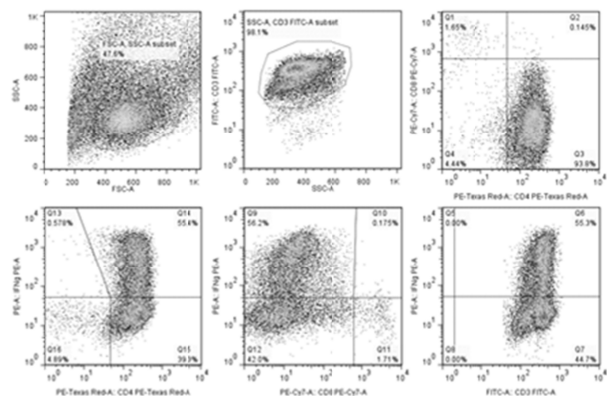
1. 日水製薬の NS-A2®を用いて作成した T 細胞は Miltenyl 社の TexMACS®を用いて作成した T 細胞と比較して遜色ないことが確認できた。

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、

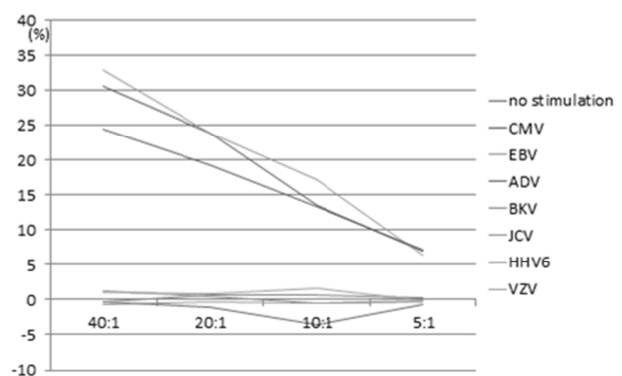
一部 CD62L- の effector memory であった。

ウイルス特異的 T 細胞が産生する IFN- γ を ELLISpot 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 Investig 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, Mitsuiki 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 | 特記事項なし |
| 2. 実用新案登録 | 3. その他
特記事項なし |