

**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 -**

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

**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、通常の生細胞率、T細胞比率、IFN 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- 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 とも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

- 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。

- 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、<sup>51</sup>Cr 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。

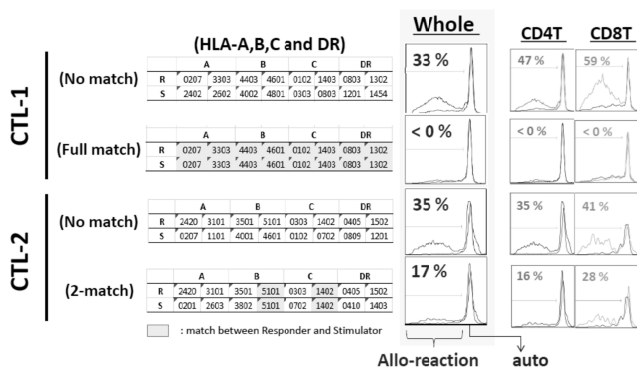


図 1 CFSE アッセイによるアロ反応の評価

- 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ipient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- $\gamma$  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%)					
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, Koderia 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, Uchimar 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