

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 現・国立感染症研究所エイズ研究センター）.....	19
	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

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	

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 GMP grade 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 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変更

・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き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、将来的なより確実に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

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

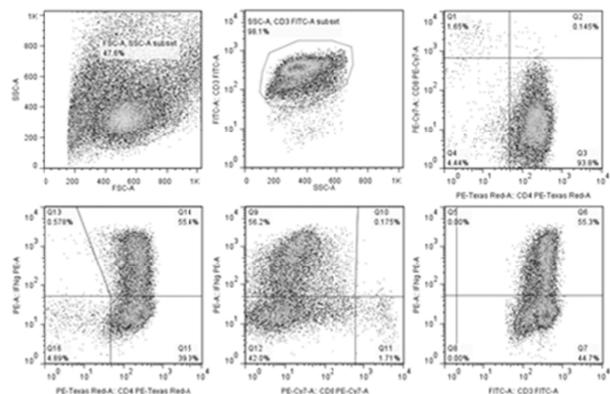
1. 日水製薬の NS-A2®を用いて作成した T 細胞は Miltenyl 社の TexMACS®を用いて作成した T 細胞と比較して遜色ないことが確認できた。

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、

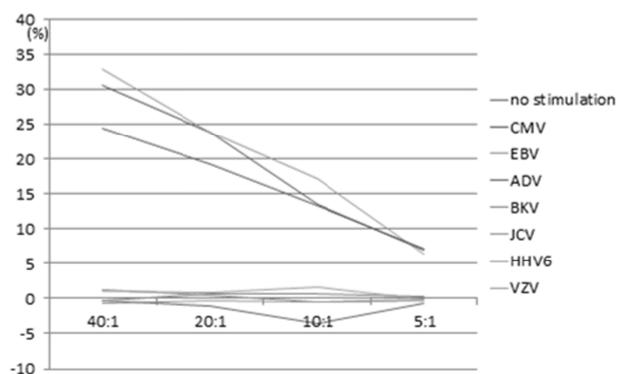
一部 CD62L- の effector memory であった。

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
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、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。

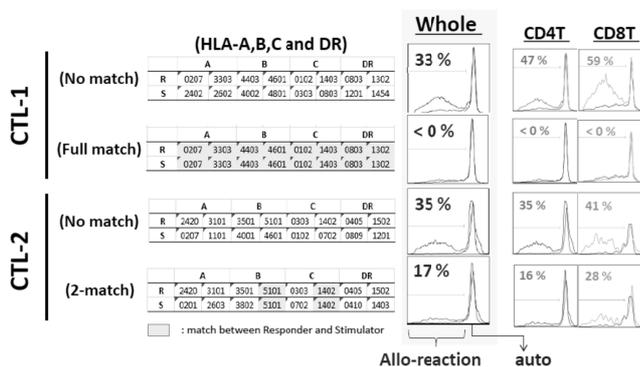


図 1 CFSE アッセイによるアロ反応の評価

- 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%)					
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

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

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 $2 \times 10^5 / \text{kg}$ より投与し、GVHD Grade 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 以上の GVHD が不変である場合に、患者体重 1kg 当たり 1×10^6 個の MSC を静脈内に投与した。

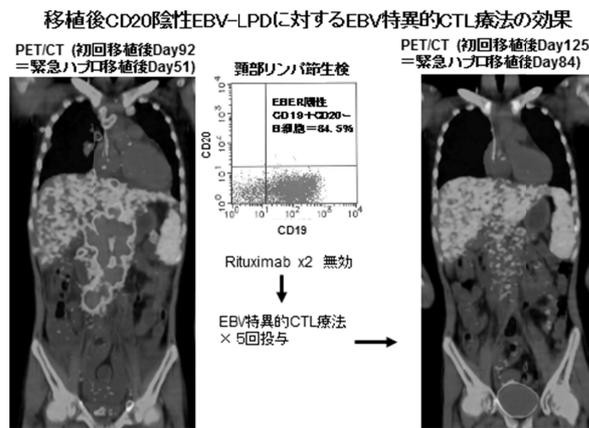
(倫理面への配慮)

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

発し、うち4例で白血病細胞表面に不一致HLA発現を消失していた。5例でステロイド抵抗性GVHDを発症したが、全例に抗体療法が、さらに2例にMSCが投与され、急性GVHDによる死亡はなかった。難治性CMV感染に対して特異的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(下図)。



D . 考察

骨髓移植ドナーから 3-4 週間の培養期間で CMV または EBV 特異的 CTL を臨床応用可能なレベルまで培養増幅することができた。

当院倫理委員会での承認後、臨床第1,2相試験が開始された。5名の投与はいずれも安全に投与でき、うち4名で効果が見られた。培養に3-4週間かかること、投与基準をみたくCTLが得られるのはCMV特異的CTLで約50%、EBV特異的CTLでは約30%であることから、EBV特異的CTLの誘導ペプチドの追加など培養法の改善が必要と考えられ、またリスクの高い移植患者ではあらかじめドナーより培養し凍結しておくか、第3者からウイルス特異的CTLを培養し保存しておくCTLバンクの作成、運用が望ましいと考えられた。

E . 結論

臨床第1相試験が開始された。まだ投与例が少なく、今後さらにCTL培養条件を改善し、症例数を増やす必要があるものの、いずれも安全に投与可能であり、明らかな効果の見られた症

例も認められた。HLAハプロ一致移植において、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ている。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, **Takahashi Y**, Kojima S. Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 21:319-25, 2015.
2. Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, **Takahashi Y**, Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S. Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* 20:1145-9, 2014.
3. Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, **Takahashi Y**, Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H. Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6. *Sci Rep.* 4:4559, 2014.
4. Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, **Takahashi Y**, Kimura H, Kojima S. Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 36:e65-8, 2014.

2. 学会発表

1. **Takahashi Y**. Hematopoietic stem cell transplantation from an alternative donor for childhood aplastic anemia: HLA haploidentical family donor vs HLA mismatched unrelated donor. **40th Annual Meeting of the EBMT.** Milano, Italia. April 2014.

2. Muramatsu H, **Takahashi Y**, Nishikawa E, Sekiya Y, Kawashima N, Okuno Y, Narita A, Doisaki S, Irie M, Hama A, Kojima S. CD20-negative Epstein-Barr Virus-Associated Post-transplant Lymphoproliferative Disease. **The 19th congress of APBMT**. Hangzhou, China. October 2014.
3. **高橋 義行**、関屋 由子、川島 希、成田 敦、土居崎 小夜子、奥野 友介、入江 正寛、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二： Unmanipulated HLA haploidentical bone

marrow transplantation combined with PBSC using high dose ATG. **第76回日本血液学会 学術集会**、大阪、2014年10月31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

ウイルス特異的 T 細胞療法における標的部位の同定 (エピトープマッピング)
に関する研究

研究分担者 立川 愛 国立感染症研究所エイズ研究センター第二室 室長
(東京大学医科学研究所 (~平成27年1月31日))
研究協力者 小野敏明 東京医科歯科大学大学院 大学院生

研究要旨

多ウイルス特異的 T 細胞療法の実臨床化に向けて、ウイルス特異的 T 細胞の品質評価法として標的
部位の同定法 (エピトープマッピング) を確立した。OLP マトリックスを用いた ELISpot assay によ
るエピトープマッピング法を構築し、健常成人の末梢血単核球より増幅した CMV, EBV, AdV 特異
的 T 細胞を用いて、標的部位の同定を行った。各 OLP に対する T 細胞応答を、高感度に定量する
ことが可能となり、ウイルス特異的 T 細胞の質的評価系として有用であることが示唆された。

A . 研究目的

移植後免疫不全状態におけるウイルス感染症は、
患者の生命予後を脅かす要因の一つとなっている。
サイトメガロウイルス(CMV)、Epstein-Barrウイル
ス(EBV)、アデノウイルス(AdV)等の日和見感染症
では、有効な治療法が存在しないか、あるいは副
作用、費用対効果等の問題点があり、抗ウイルス
薬以外の治療法が求められている。

近年、移植後ウイルス感染症に対して試験管内
で増幅したドナーあるいはアロ由来のウイルス特
異的CTLを用いた免疫療法が行われる様になり、
劇的な成果を挙げている。特に、ウイルスタンパ
ク質全体をカバーするオーバーラップペプチド
(OLP)を抗原とした刺激培養による多ウイルス特
異的T細胞の増幅法が確立され、その安全性と有用
性が明らかとなりつつある。一つのウイルスタン
パク質においても多様なエピトープに特異的なT
細胞を増幅することが可能であるため、より多数
のウイルス特異的T細胞が増幅され、より高い抗ウ
イルス効果を発揮することが期待される。

本研究では、増幅されたウイルス特異的 T 細胞
の標的部位を同定するために、IFN- γ ELISpot

assay を用いたエピトープマッピングシステムの
構築を目的とする。

B . 研究方法

対象 :

書面にて研究参加の同意が得られた日本人の
健常成人を対象とした。

ウイルス特異的 T 細胞の培養 :

CMV (pp65, IE1)、EBV (EBNA1, LMP2,
BZLF1)、AdV (Penton, Hexon)の 3 ウイルス 7
タンパク質の OLP を抗原として、末梢血単核球
(PBMC)を IL-4/IL-7 存在下で 2-3 週間培養し、ウ
イルス特異的 T 細胞を増幅した。本研究では 10
アミノ酸重複する 15 アミノ酸長の OLP を使用し
た。

**フローサイトメトリーによるウイルス特異的 T
細胞の解析 :**

CMV, EBV, AdV-OLP で 6 時間刺激後、IFN- γ
の細胞内染色を行い、FACS Aria にて解析した。

標的部位の特定：

3 ウイルス 6 タンパク質 (CMV-pp65/IE1, EBV-EBNA1/LMP2/BZLF1, AdV-Penton) をカバーする 718 種類の OLP を用いて、16x16 方陣を基本とした 3 つのマトリックス (計 92 pool) を作成した。1 pool に最大 17 種類の OLP を含む。陰性対象を 3well、陽性対照を 1well 設定し、96 穴プレート 1 枚にて IFN- γ ELISpot assay を行い (Matrix-ELISpot)、候補 OLP を決定した。その後、各候補 OLP を用いて ELISpot assay を行い (Deconvolution - ELISpot)、反応性 OLP を決定した。

(倫理面への配慮)

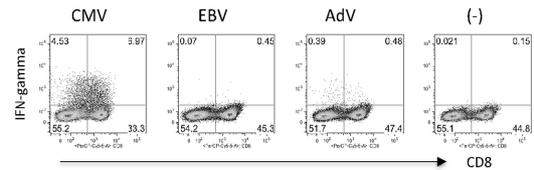
研究対象者には研究目的や不利益、危険性など必要事項に関して文書を用いて説明し、書面でインフォームドコンセントを得た。本研究内容は、東京大学医科学研究所および東京医科歯科大学の倫理審査委員会により承認済みである。

C . 研究結果

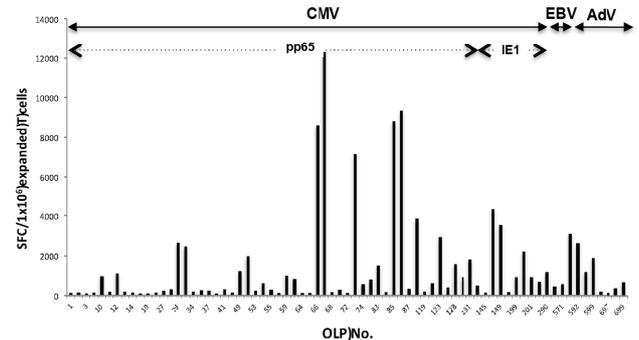
日本人健常成人 1 名の PBMC を用いて、3 ウイルス 7 抗原をカバーする OLP を抗原として T 細胞の刺激培養を行った。まず、フローサイトメトリーにより各ウイルス特異的 T 細胞の頻度を、IFN- γ 産生解析の結果、CMV 特異的 T 細胞が最も多く存在しており、T 細胞中の 6.97% が CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞、4.53% が CMV 特異的 CD4 陽性 T 細胞であった (図)。低頻度ではあったが、EBV, AdV 特異的 T 細胞も検出された。続いて、同一の細胞を用いて、Matrix-ELISpot を行い、198 種類の候補 OLP を決定し、さらに各 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。多くの場合、隣り合う 2 種類の OLP に反応が見られているが、10 アミノ酸ずつ重複する OLP を使用しているため、同一エピトープに対する反応と考えられるため、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 (図)。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。本結果は、CMV に対する T 細胞が高頻度に検出されたフローサイトメトリー解析結果と合致するものであった。

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。

<フローサイトメトリーによるウイルス特異的 T 細胞の検出>



<ELISpot assayによる標的部位の同定>



D . 考察

OLP マトリックスを用いた ELISpot assay を構築し、増幅培養されたウイルス特異的 T 細胞中に存在する各エピトープ特異的 T 細胞の頻度を正確に検出することに成功した。本法を用いれば、細胞製剤としてのウイルス特異的 T 細胞の品質管理上重要な情報を得ることが可能となる。さらに、ウイルス特異的 T 細胞を CD4、CD8 陽性 T 細胞に分画後、本法により標的部位を同定することで、HLA class I 拘束性に作用する CD8+T 細胞応答と、HLA class II 拘束性に作用する CD4+T 細胞応答をそれぞれ評価することも可能となる。

ウイルス特異的 T 細胞は HLA 拘束性に機能を発揮するため、レシピエントと適合する HLA に提示されるエピトープ特異的 T 細胞のみが効果を発揮する。そのため、増幅したウイルス特異的 T 細胞中の、真に抗ウイルス効果を発揮する T 細胞、すなわちレシピエントと T 細胞ドナー間で共有する HLA に拘束性のエピトープ特異的 T 細胞の頻度を明らかにすることは、細胞製剤としての品質評価として重要である。今後、HLA 遺伝子型の明らかとなっている対象者についてエピトープマッピングを行い、各 T 細胞応答の HLA 拘束性を明らかにする。

E . 結論

3ウイルス6タンパク質におけるウイルス特異的T細胞の標的部位同定のためのエピトープマッピング法の確立に成功した。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Nakayama-Hosoya K, Ishida T, Youngblood B, Nakamura H, Hosoya N, Koga M, Koibuchi T, Iwamoto A, **Kawana-Tachikawa A**. Epigenetic repression of interleukin-2 expression in senescent CD4+ T cells during chronic human immunodeficiency virus type-1 infection. *J Infect Dis*. **211**:28-39, 2015.
2. Gu L, **Kawana-Tachikawa A**, Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N. Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase. *PLoS One*. **9**:e109823, 2014.
3. Han C, **Kawana-Tachikawa A**, Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A. Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection. *Retrovirology*. **11**:38, 2014.
4. **Kawana-Tachikawa A**, Llibre JM, Bravo I, Escrig R, Mothe B, Puig J, Puertas MC, Martinez-Picado J, Blanco J, Manzardo C, Miro JM, Iwamoto A, Pozniak AL, Gatell JM, Clotet B, Brander C; MARAVIBOOST investigators. Effect of Maraviroc Intensification on HIV-1-Specific T Cell Immunity in Recently HIV-1-Infected Individuals. *PLoS One*. **9**:e87334, 2014.

2. 学会発表

1. **Kawana-Tachikawa A**. Disruption of T cell immunity during chronic HIV-1 infection. **The 21st East Asia Joint Symposium on Biomedical Research**. Seoul, Korea. Jul 2014.

2. Hirao M, Suzuki K, **Kawana-Tachikawa A**, Nakauchi H, Cooper DA, Kelleher AD, Kaneko S. Proposal of new immune cell source for HIV-1 infection study based on iPSCs and evaluation of impact of viral replication in iPSCs-derived macrophage expressing shRNAs targeting HIV-1 promoter. **20th International AIDS Conference**. Melbourne, Australia. Jul 2014.
3. Kamori D, 村上知行, Hasan Z, Meribe S, Carlson J, Siarot L, 三浦聡之, **立川(川名)愛**, 岩本愛吉, 湯永博之, 岡慎一, 間陽子, 上野貴将 : Effects of natural variability of an immunodominant Vpr region on immunological footprints, clinical outcome and protein functions. **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
4. 細谷(中山)香, 石田尚臣, 中村仁美, 細谷紀彰, 古賀道子, 鯉淵智彦, 岩本愛吉, **立川(川名)愛** : HIV-1 感染における CD4 陽性 T 細胞の IL2 遺伝子発現低下分子メカニズムの解明, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
5. Gu L, Han Y, Guan S, Yang F, Zhu T, 合田仁, Cao Y, **立川(川名)愛**, 細谷紀彰, Gao FG, 岩本愛吉, Li T, 石田尚臣 : 中国 HIV-1 感染者の未治療検体における副受容体指向性の検査, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
6. 佐藤秀憲, 細谷(中山)香, 菊地正, 安達英輔, 古賀道子, 中村仁美, 鯉淵智彦, 岩本愛吉, **立川(川名)愛** : HIV 感染者の CD8 陽性 T 細胞における補助刺激分子 OX40 の検討, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
7. 石坂彩, 佐藤秀憲, **立川(川名)愛**, 中村仁美, 古賀道子, 細谷紀彰, 鯉淵智彦, 野本明男, 岩本愛吉, 水谷壮利 : HIV-1 残存感染細胞の活性と免疫活性化の相関, **第 62 回日本ウイルス学会学術集会**, 横浜, 2014 年 11 月
8. 藤田由利子, 小野敏明, 落合央, **立川(川名)愛**, Leen AM, Heslop HE, 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

9. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
国内特許出願（申請中）

出願人：公益財団法人微生物化学研究会、発明者：水谷壮利、石坂彩、立川愛 「免疫状態

の判定方法、CD4+ T 細胞数の増加予測方法、及び CD4+ T 細胞数の減少予測方法、並びにそれらのためのキット」特願 2014-128028、出願日：2014 年 6 月 23 日

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

小児腎移植患者の移植後ウイルス感染プロファイル：
高感度多項目迅速微生物検査法を用いた検討

研究分担者	服部 元史	東京女子医科大学 腎臓小児科	教授
研究協力者	多田 憲正	東京女子医科大学 腎臓小児科	助教
研究協力者	清水 則夫	東京医科歯科大学難治疾患研究所	准教授

研究要旨

腎移植後日和見ウイルス感染症は、腎移植患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症である。とくに小児腎移植患者は移植後日和見ウイルス感染症を合併するリスクが高いため、有用なモニタリング方法の確立が望まれてきた。そこで、12種類のウイルス(HSV1/2、VZV、EBV、CMV、HHV6/7/8、ADV、BKV、JCV、parvovirus B19)を同時に測定する高感度多項目迅速微生物検査法を用いて小児腎移植患者の腎移植後感染プロファイルを検討した。対象は、2014年4月から2015年1月までの期間中に自施設で腎移植を行った9名の小児患者で、これら患者の血液と尿検体における腎移植後の経時的なウイルスプロファイルを検討した。その結果、血液では、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、6名では同時期に複数のウイルスが検出された。また、尿では、7名でBKVを、6名でJCVを、3名でCMVを検出し、5名では同時期に複数のウイルスが検出された。また、従来CMVアンチゲネミア法よりも早期にCMV感染症を診断することが可能であった。さらに、BKV感染症のスクリーニングとして使用される尿中封入体細胞よりも鋭敏にBKV感染を把握することが可能であった。12種類のウイルスを同時に測定する高感度多項目迅速微生物検査法は、小児腎移植患者のウイルス感染プロファイルを検討するうえで有用な方法と考えられた。

キーワード：小児 / 腎移植 / 日和見ウイルス感染症 / 高感度多項目迅速微生物検査法

A . 研究目的

腎移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症である。とくに小児腎移植患者は移植後日和見ウイルス感染症を合併するリスクが高いため、有用なモニタリング方法の確立とその臨床応用が望まれてきた。

ウイルス感染症の診断は、サイトメガロウイルス(CMV)アンチゲネミア法や Epstein-Barr ウイルス(EBV)など個々のウイルスに対する PCR 法で検査されているが、複数のウイルス

を同時に検査することは困難であった。

高感度多項目迅速微生物検査法(以下多項目 PCR 法)は少量の検体で一度に12種類のウイルスを高感度かつ定量的に評価することができる測定系で、造血幹細胞移植では既に臨床的に検討され、その有用性が示されている。

今回、上記の多項目 PCR 法を用いて、小児腎移植患者の腎移植後感染プロファイルを検討した。

B . 研究方法

自施設で腎移植を行った 9 名の小児患者を対象として、これら患者の血液と尿検体における腎移植後の経時的なウイルスプロファイルを検討した。

検討したウイルスは、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、これら 12 種類のウイルスについて多項目 PCR 法を用いて同時に測定した。なお、本検査は東京医科歯科大学にて実施された。

基本的な免疫抑制プロトコールは、シクロスポリン(CYA)またはタクロリムス(FK) + ミコフェノール酸モフェチル(MMF) + ステロイド + バシリキシマブの 4 剤併用療法で、術後 4 ~ 6 か月の時点における CYA と F K の目標トラフ濃度は、それぞれ 100 ~ 120 ng/ml、6 ~ 8 ng/ml とした。なお、ABO 血液型不適合腎移植では、術前 3 週前にリツキシマブを単回投与し、血液型抗体の除去を目的として血漿交換療法を術前に 1 ~ 4 回実施した。

(倫理面の配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」および「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。

C . 研究結果

1. 血中ウイルスの検出

小児腎移植患者 9 名のうち、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。

2. 尿中ウイルスの検出

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。

3. CMV アンチゲネミア法との比較

血中 CMV を検出した 4 名のうち 1 名は CMV アンチゲネミア法では検出されなかった。また、別の 1 名は CMV アンチゲネミア法よりも早期に CMV ウイルス血症が検出された。

4. BKV 血症と尿中封入体細胞との関係

2014 年 4 月から 2015 年 1 月までの期間中に 4 名で尿中封入体細胞が認められたが、BKV 血症を認めたのは 2 名で、そのうち 1 名では BKV 腎症が疑われた。

D . 考察

小児腎移植患者では、CMV 感染症、EBV 関連移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)、水痘、ADV による出血性膀胱炎、BKV 腎症などの腎移植後日和見ウイルス感染症が大きな問題となる。

CMV 感染症に関しては、CMV アンチゲネミア法を用いたモニタリングにより、preemptive な抗ウイルス薬の投与や免疫抑制薬の減量などにより、以前と比べて重症例は減少している。しかし、CMV 感染に伴う拒絶反応の合併など、CMV アンチゲネミア法よりも鋭敏な CMV 感染モニタリング方法を必要とする症例が少なからず存在する。EBV の場合には、ウイルス量のモニタリングのみでは限界があることが知られており、また有効な抗ウイルス薬がないことが問題である。BKV に関しては、BKV 腎症を合併した場合に移植腎機能予後は明らかに不良(約 50%の症例が 5 年以内に移植腎を喪失する)なことが知られている。

このように、腎移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症である。小児の場合には、CMV、EBV、BKV も含め各種ウイルスがドナー陽性(D+)/レシピエント陰性(R-)の組み合わせが多いため、小児腎移植患は移植後日和見ウイルス感染症を合併するリスクが高い。そのため、腎移植後ウイルス感染症に対する有用なモニタリング方法の確立とその臨床応用が望まれていた。

今回、12 種類のウイルス(HSV1/2、VZV、EBV、CMV、HHV6/7/8、ADV、BKV、JCV、parvovirus B19)を同時に測定する高感度多項目迅速微生物検査法(多項目 PCR 法)を用いて小児腎移植患者の腎移植後感染プロファイルを検討した。

本法は 1 回の検査での必要血液量が 0.5mL と患者の負担が少ないことが小児にとって有用と考えられた。また、従来 CMV アンチゲネミア法よりも早期に CMV 感染症を診断する

ことが可能であった。さらに、BKV 感染症のスクリーニングとして使用される尿中封入体細胞よりも鋭敏に BKV 感染を把握することが可能であった。

これまで腎移植患者において 4 種類以上のウイルスを同時にスクリーニングした報告はない。今回の検討では、半数以上の症例で、血中・尿中ともに、同時期に複数のウイルスが検出された。現時点での検討症例数は 9 例と少ないため、今後さらに症例を重ね、腎移植後ウイルス感染プロファイルを検討する意義は高いものと思われる。

E . 結論

小児腎移植患者の移植後日和見ウイルス感染症は、患者の生命予後のみならず移植腎機能予後を左右する重大な合併症であり、有用なモニタリング方法の確立が望まれてきた。今回、12 種類のウイルスを同時に測定する高感度多項目迅速微生物検査法を用いて小児腎移植患者の腎移植後感染プロファイルを検討したが、本法は、小児腎移植患者のウイルス感染プロファイルを検討するうえで有用な方法と考えられた。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. **Hattori M**, Sako M, Kaneko T, Ashida A, Matsunaga A, Igarashi T, Itami N, Ohta T, Gotoh Y, Satomura K, Honda M, Igarashi T. End-stage renal disease in Japanese children: a nationwide survey during 2006-2011. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2015. [Epub ahead of print]
2. Hisano M, Ashida A, Nakano E, Suehiro M, Yoshida Y, Matsumoto M, Miyata T, Fujimura Y, **Hattori M**. Autoimmune-type HUS treated with eculizumab as first-line therapy. *Pediatric International*. (in press)
3. Muso E, Mune M, Hirano T, **Hattori M**, Kimura K, Watanabe T, Yokoyama H, Sato H, Uchida S, Wada T, Shoji T, Yuzawa Y, Takemura T, Sugiyama S, Nishizawa Y, Ogahara S, Yorioka N, Sakai S, Ogura Y, Yukawa S, Inno Y, Imai E, Matsuno S, Saito T. Immediate therapeutic efficacy of low-density lipoprotein apheresis for drug-resistant nephrotic syndrome: evidence from the short-term results from the POLARIS Study. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2014. [Epub ahead of print]
4. Uemura O, **Hattori M**, Hataya H, Ito S, Ito N, Akizawa T. Pharmacokinetics of darbepoetin alfa after single, intravenous or subcutaneous administration in Japanese pediatric patients with chronic kidney disease. *Clinical and Experimental Nephrology*. **18**:932-8, 2014.
5. Yamagata K, Yagisawa T, Nakayama M, Imai E, **Hattori M**, Iseki K, Takashi A. Prevalence and incidence of chronic kidney disease stage G5 in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology*. 2014. [Epub ahead of print]
6. Miyazaki Y, Kawamura T, Joh K, Okonogi H, Koike K, Utsunomiya Y, Ogura M, Matsushima M, Yoshimura M, Horikoshi S, Suzuki Y, Furusu A, Yasuda T, Shirai S, Shibata T, Endoh M, **Hattori M**, Akioka Y, Katafuti R, Hashiguchi A, Kimura K, Matsuo S, Tomino Y. Overestimation of the risk of progression to end-stage renal disease in the poor prognosis' group according to the 2002 Japanese histological classification for immunoglobulin A nephropathy. *Clinical and Experimental Nephrology*. **18**:475-80, 2014.
7. Harita Y, Ishizuka K, Tanego A, Sugawara N, Chikamoto H, Akioka Y, Tsurumi H, Miura K, Gotoh Y, Tsujita M, Yamamoto T, Horiike K, Takeda A, Oka A, Igarashi T, **Hattori M**. Decreased glomerular filtration as the primary factor of elevated circulating suPAR levels in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatric Nephrology*. **29**:1553-60, 2014.
8. Tsurumi H, Harita Y, Kurihara H, Kosako H, Hayashi K, Matsunaga A, Kajihyo Y, Kanda S, Miura K, Sekine T, Oka A, Ishiduka K, Horita S, **Hattori M**, Hattori S, Igarashi T : Epithelial protein lost in neoplasm modulates

- platelet-derived growth factor-mediated adhesion and motility of mesangial cells. *Kidney International*. **86**:548-57, 2014.
9. **Hattori M**, Uemura O, Hataya H, Ito S, Ohta T, Fujinaga S, Gotoh Y, Kise T, Hisano M, Matsunaga A, Ito N, Akizawa T. Efficacy and safety of darbepoetin alfa for anemia in children with chronic kidney disease: a multicenter prospective study in Japan. *Clinical and Experimental Nephrology*. **18**:634-41, 2014.
 10. Hamatani R, Otsu M, Chikamoto H, Akioka Y, **Hattori M**. Plasma homocysteine and folate levels and dietary folate intake in adolescents and young adults who underwent kidney transplantation during childhood. *Clinical and Experimental Nephrology*. **18**:151-6, 2014.
 11. Fujii H, Chikamoto H, Akioka Y, **Hattori M**. Final adult height in kidney recipients who underwent highly successful transplantation as children: a single-center experience. *Clinical and Experimental Nephrology*. **18**:515-20, 2014.
 12. Isojima T, Harita Y, Furuyama M, Sugawara N, Ishizuka K, Horita S, Kajiho Y, Miura K, Igarashi T, **Hattori M**, Kitanaka S. LMX1B mutation with residual transcriptional activity as a cause of isolated glomerulopathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **29**:81-8, 2014.
 13. Sawai T, Nangaku M, Ashida A, Fujimaru R, Hataya H, Hidaka Y, Kaname S, Okada H, Sato W, Yasuda T, Yoshida Y, Fujimura Y, **Hattori M**, Kagami S. Diagnostic criteria for atypical hemolytic uremic syndrome proposed by the Joint Committee of the Japanese Society of Nephrology and the Japan Pediatric Society. *Pediatrics International*. **56**:1-5, 2014.
 14. Ishikura K, Uemura O, Hamasaki Y, Ito S, Wada N, **Hattori M**, Ohashi Y, Tanaka R, Nakanishi K, Kaneko T, Honda M and on behalf of the Pediatric CKD Study Group in Japan in conjunction with the Committee of Measures for Pediatric CKD of the Japanese Society of Pediatric Nephrology. Progression to end-stage kidney disease in Japanese children with chronic kidney disease: results of a nationwide prospective cohort study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. **29**:878-84, 2014.
 15. 石塚喜世伸、浅野達雄、西山慶、宮井貴之、神田祥一郎、菅原典子、近本裕子、秋岡祐子、堀田茂、小池淳樹、本田一穂、**服部元史**：BK ウイルス腎症の診断と治療に苦慮した小児腎移植の1例。 *日本臨床腎移植学会雑誌* **2**:225-229, 2014.
 16. **服部元史**：HUS・aHUSの病態と臨床像。 *日本腎臓学会誌* **56**:1052-1057, 2014.
 17. **服部元史**：小児腎疾患と脂質異常。 *腎と透析* **77**:343-347, 2014.
 18. **服部元史**：腎臓移植。 *小児科* **55**:1269-1274, 2014.
 19. **服部元史**：わが国の小児腎移植の現況と治療管理上の要点。 *小児科診療* **77**:95-99, 2014.
 20. **服部元史**：小児腎移植の現況。 *移植* **49**:209-214, 2014.
 21. **服部元史**：小児巣状分節性糸球体硬化症。 *腎と透析* **76**:897-900, 2014.
 22. **服部元史**：腎疾患(特に微小変化型ネフロ一ゼ症候群)。 *思春期学* **32**:228-231, 2014.
 23. **服部元史**：巣状分節性糸球体硬化症の腎移植後再発。 *腎と透析* **76**:639-641, 2014.
 24. **服部元史**：腎小児末期腎不全患者の腎代替療法：選択と導入と透析。 *腎と透析* **76**:75-79, 2014.
 25. **服部元史**、相馬 泉：小児患者に対する急性血液浄化。 *救急・集中治療* **26**:432-442, 2014.
 26. **服部元史**：非典型溶血性尿毒症症候群(aHUS)。 *医学のあゆみ* **249**:859-863, 2014.
 27. **服部元史**：小児の維持血液透析導入。 *腎と透析* **76**:676-681, 2014.

28. **服部元史**、佐古まゆみ、金子徹治、松永明、芦田明、五十嵐徹、伊丹儀友、上田善彦、大田敏之、後藤芳充、里村憲一、平松美佐子、伊藤秀一、上村治、佐々木聡、波多江健、幡谷浩史、藤枝幹也、吉村仁志、秋岡祐子、石倉健司、濱崎祐子、大橋靖雄、本田雅敬：本邦小児末期腎不全患者の疫学調査報告：とくに透析療法に関して．**日本透析医学会雑誌** 47:167-174, 2014.
2. **著書**
 1. **服部元史**：急性腎障害、**NICU マニュアル**（新生児医療連絡会編）、p347-350、金原出版株式会社、2014年
 2. **服部元史**、芦田明：小児患者の腎性貧血治療ガイドラインの改訂に向けて、**透析医学**（平方秀樹監修、鶴屋和彦、満生浩司、升谷耕介、谷口正智編）、p406-409、医薬ジャーナル社、2014年
 3. **服部元史**：紫斑病性腎炎、小児、**腎疾患・透析最新の治療**（榎野博、秋澤忠雄、山縣邦弘編集）、p47-148、南江堂、2014年
 4. **服部元史**：小児患者に対する透析、**血液浄化療法ハンドブック[2014]**（透析療法合同専門委員会企画・編集）、p255-274、共同医書出版社、2014年
 3. **学会発表**
 1. **Hattori M**. Pediatric end-stage kidney disease (ESKD) patients in Japan. **The 14th Asian Pacific Congress of Nephrology, Symposium 9 Renal replacement therapy.** 2014.
 2. **服部元史**：小児末期腎不全診療の現況とこれから、**第48回広島血液浄化カンファレンス 特別講演**、2014
 3. **服部元史**：本邦における非典型溶血性尿毒症症候群の診断基準及びエクリズマブの適正使用について、**首都圏 Atypical HUS 講演会**、2014
 4. **服部元史**：小児腎臓病診療の進歩、**第80回東京女子医科大学学会総会シンポジウム**、2014
 5. **服部元史**：腎移植患児の Life Stage に応じた免疫抑制剤の選択、**小児腎移植 Meet the Expert（特別講演）**、2014
 6. **服部元史**：小児腎不全の治療、**平成26年度透析療法従事職員研修**、2014
 7. **服部元史**：TTP/HUS、**第57回日本腎臓学会総会 特別企画 よくわかるシリーズ 21**、2014
 8. **服部元史**：小児腎泌尿器疾患：移行（transition）の現状と課題、**第26回栃木腎フォーラム**、2014
 9. **服部元史**、芦田明：腎性貧血治療ガイドラインの改訂：小児、**第59回日本透析医学会学術集会・総会 学会・委員会企画 7**、2014
 10. **服部元史**、佐古まゆみ、本田雅敬：小児末期腎不全、**第59回日本透析医学会学術集会・総会 学会・委員会企画 5**、2014
 11. **服部元史**：難治性ネフローゼ症候群（とくにFSGS）に対するLDL吸着療法と血漿交換療法、**日本医工学治療学会第30回学術大会 シンポジウム 4 LDL アフェレシスの新たな作用機序と臨床応用**、2014
 12. **服部元史**：小児腎不全の現況、**第7回神戸腎疾患研究会 特別講演**、2014
 13. **服部元史**：腸管出血性大腸菌による溶血性尿毒症症候群の臨床—腎臓専門医の立場から、**第10回日本小児消化管感染症研究会 特別講演**、2014
- ## 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

小児肝移植患者の移植後日和見感染症の実態に関する検討

研究分担者 水田 耕一 自治医科大学 移植外科 准教授

研究要旨

肝移植患者は、術前は肝不全による免疫低下状態にあり、術後は免疫抑制薬の使用による二次性の免疫抑制状態となるため、ウイルス感染症のハイリスク状態にある。小児肝移植患者の免疫能と日和見感染症の関係を把握するため、平成 26 年度に当施設で実施した小児肝移植患者における術前免疫能と術後のウイルス感染症の発症状況を前向きに検討した。その結果、CMV 感染 57%、CMV 感染症 36%、EBV 感染 14%、その他のウイルス感染症 29%を認めた。CMV 感染は術前 CD56 低値群に多く発症し、発症抑制に NK 細胞の重要性が示唆された。EBV 感染症は、術前 CD8 低値かつ IgG 低値群に有意に発症した。術前から細胞性免疫と液性免疫がともに低下している症例は、肝移植後 EBV 感染のハイリスクであり、ウイルス特異的 T 細胞療法を優先すべき患者群と考えられた。CMV 感染は術後 1~2 ヶ月、EBV 感染は術後 5 ヶ月が好発時期であった。小児肝移植患者においては、術後 6 ヶ月間は日和見感染症の好発時期であり、細胞療法の適切な時期を検討する必要がある。
キーワード：小児 / 生体肝移植 / 移植後日和見感染症

A . 研究目的

肝移植患者は、術前は肝不全による免疫低下状態にあり、術後は免疫抑制薬の使用による二次性の免疫抑制状態となるため、ウイルス感染症のハイリスク状態にある。

本年度は、小児生体肝移植患者の術前の免疫状態と術後のウイルス感染症の発症状況を前向きに検討した。

B . 研究方法

2014 年 5 月から 2015 年 2 月までの期間中に自施設で生体肝移植を施行した 14 例を対象とした。肝移植時の平均年齢は 2.5±3.9 歳であった。疾患は胆道閉鎖症 8 例、メープルシロップ尿症 2 例、アラジール症候群 1 例、原発性硬化性胆管炎 1 例、肝硬変 1 例、新生児ヘモクロマトーシス 1 例であった。移植後の免疫抑制薬は、タクロリムス (FK) + メチルプレドニゾロン (MP) の 2 剤を基本とした。FK の目標トラフ

濃度は、術後 2 週間は 15~20ng/ml、術後 1 か月時は 10ng/ml、術後 6 か月時は 6ng/ml、術後 1 年時は 3~5ng/ml とした。

術前の免疫能評価として、対象におけるリンパ球表面マーカー検査、T 細胞サブセット、免疫グロブリン (IgG)、術前サイトメガロウイルス (CMV)、EB ウイルス (EBV) の抗体価を測定し、術後のウイルス感染症の発症状況と比較検討した。

(倫理面への配慮)

本研究は「ヘルシンキ宣言」および「疫学研究に関する倫理指針」に従って実施した。

C . 研究結果

1. 術前免疫能評価

対象 14 例における術前の免疫能評価では、CD3 が 64.4±10.6% (正常値 66-83) と低値、CD19 が 28.9±15.6% (正常値 10-19) と高値であり、T 細胞の低下、B 細胞の増加を認めた。

CD4/CD8比は、 1.9 ± 0.8 (正常値 1.0-2.2) と正常であったが、CD4異常値が33% (低値2例、高値2例、未検査2例)、CD8異常値が75% (低値6例、高値3例、未検査2例) に認められた。CD56は、 8.4 ± 4.2 (正常値 9-43) であり、術前のNK細胞は低下していた。

また、術前IgGは、 1023 ± 832 mg/dl (正常値 870-1700mg/dl) と正常範囲内であったが、64% に異常値 (低値9例、高値1例) を認めていた。

2. 肝移植後ウイルス感染症

1) CMV感染症

対象において、肝移植後CMV感染 (CMVアンチゲネミア陽性) を57% に、感染症36% に認められた。発症日は術後 50 ± 47 日であった。術前状態との検討では、CD3低値群 (発症率50%)、CD56低値群 (発症率70%) にCMV感染が多い傾向があった。治療はガンシクロビル、バルガンシクロビル、ホスカルネットによる治療を行い、CMVが原因のグラフト喪失や患者死亡は認めなかった。

2) EBV感染症

対象において、EBV感染 (EBV-DNA 5000) を14% に認められた。発症日は術後 153 ± 35 日であった。EBV関連移植後リンパ増殖性疾患 (PTLD) の症例は認めなかった。術前状態との検討では、CD8低値群 (発症率33%)、術前IgG低値群 (発症率25%) にEBV感染が多い傾向があり、CD8低値かつ術前IgG低値群では発症が67% と有意に高値だった。治療は免疫抑制薬の減量、 γ グロブリン製剤による対症療法を中心に行い、EBVが原因のグラフト喪失や患者死亡は認めなかった。

3) その他ウイルス感染症

対象において、RSV2例、インフルエンザウイルス1例、ノロウイルス1例によるウイルス感染症を認められた。発症日は、それぞれ、術後179 \pm 7日、術後170日、術後181日であった。

いずれも抗ウイルス薬、 γ グロブリン製剤による対症療法で軽快し重症化は認めなかった。

D. 考察

本研究では、小児肝移植患者の免疫能と日和見感染症の関係を把握する目的で、平成26年度に当施設で実施した小児肝移植患者における

術前免疫能と術後のウイルス感染症の発症状況を前向きに検討した。

その結果、CMV感染57%、CMV感染症36%、EBV感染14%、その他のウイルス感染症29%のウイルス感染・感染症を認められた。CMV感染では術前CD56低値群が最も発症率が高かった。NK細胞はCMVの感染防御に重要との報告があり、本研究はそれを示唆する結果であった。これはCMVにおける特異的T細胞療法の開発・導入においても、自然免疫の重症性を一考させる結果であった。

EBV感染症では、術前CD8低値かつ術前IgG低値群で発症率に有意差を認められた。CD8の低下は細胞障害性T細胞の低下を意味する。術前から細胞性免疫と液性免疫がともに低下している症例においては、肝移植後EBV感染のハイリスクであり、T細胞療法を優先すべき患者群と考えられた。

ウイルス感染症の発症は、CMVでは術後1~2ヶ月、EBVは術後5ヶ月、RSV、インフルエンザウイルス、ノロウイルス感染症は、術後6ヶ月頃に集中していた。小児肝移植患者においては、術後6ヶ月間は日和見感染症、流行性ウイルス感染症の好発時期であり、細胞療法の適切な時期を検討する必要がある。

E. 結論

小児肝移植患者のCMV、EBVなどの日和見感染症は依然として頻度は高く、その対応は重要である。重症例においては、患者の生命予後に直結する合併症であるため、治療困難例におけるウイルス特異的T細胞療法などの新たな治療法の開発が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamada N, Sanada Y, Hirata Y, Okada N, Wakiya T, Ihara Y, Miki A, Kaneda Y, Sasanuma H, Urahashi T, Sakuma Y, Yasuda Y, **Mizuta K**. Selection of living donor liver grafts for patients weighing less than 6kg. *Liver Transpl.* 21:233-8, 2015.
2. Kawano Y, **Mizuta K**, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Okada N, Yamada N, Sasanuma H,

- Sakuma Y, Taniai N, Yoshida H, Kawarasaki H, Yasuda Y, Uchida E. Risk factors of cytomegalovirus infection after pediatric liver transplantation. *Transplant Proc.* **46**:3543-7, 2014.
3. Mori M, Morio T, Ito S, Morimoto A, Ota S, **Mizuta K**, Iwata T, Hara T, Saji T. Risks and prevention of severe RS virus infection among children with immunodeficiency and Down's syndrome. *J Infect Chemother.* **20**:455-9, 2014.
 4. Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, Hirata Y, **Mizuta K**. Impact of 3-D glucan during liver transplantation. *Hepatogastroenterology.* **61**:1368-73, 2014.
 5. Sanada Y, Matsumoto K, Urahashi T, Ihara Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, Hirata Y, **Mizuta K**. Protocol liver biopsy is the only examination that can detect mid-term graft fibrosis after pediatric liver transplantation. *World J Gastroenterol.* **20**:6638-50, 2014.
 6. Shimizu T, Urahashi T, Ihara Y, Kaneda Y, Miki A, Sanada Y, Wakiya T, Okada N, Yamada N, **Mizuta K**. Successful treatment of severe anastomotic stricture of a choledochojejunostomy after living donor liver transplantation with transhepatic cholangioscopy-guided balloon dilatation. *Transplant Proc.* **46**:999-1000, 2014.
 7. Wakiya T, Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Yamada N, Okada N, Toyoki Y, Hakamada K, **Mizuta K**. Iron overload after pediatric liver transplantation: a case report. *Transplant Proc.* **46**:973-6, 2014.
 8. Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Okada N, Yamada N, Hirata Y, **Mizuta K**. Pretransplant Levels of Endotoxin Can Predict the Risk of Bacterial Infections and Graft Liver Function after Liver Transplantation. *Eur J Pediatr Surg.* 2014 [Epub ahead of print]
 9. Sanada Y, Kawano Y, Miki A, Aida J, Nakamura K, Shimomura N, Ishikawa N, Arai T, Hirata Y, Yamada N, Okada N, Wakiya T, Ihara Y, Urahashi T, Yasuda Y, Takubo K, **Mizuta K**. Maternal grafts protect daughter recipients from acute cellular rejection after pediatric living donor liver transplantation for biliary atresia. *Transpl Int.* **27**:383-90, 2014.
 10. Urahashi T, **Mizuta K**, Ihara Y, Sanada Y, Wakiya T, Yamada N, Okada N. Impact of post-transplant flow cytometric panel-reactive antibodies on late-onset hepatic venous outflow obstruction following pediatric living donor liver transplantation. *Transpl Int.* **27**:322-9, 2014.
- ## 2. 学会発表
1. **水田耕一**、他：胆道閉鎖症における生体肝移植レシピエント手術 - 当科の標準術式から葛西手術へのフィードバック -、**第41回日本胆道閉鎖症研究会**、熊本、2014年11月15日
 2. **水田耕一**、他：小児肝移植後CMV感染症の治療戦略、**第50回日本移植学会総会**、東京、2014年9月12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

ウイルス特異的 T 細胞治療の規制に関する研究

研究分担者 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

研究要旨

再生医療等の安全性の確保等に関する法律が平成 26 年 11 月に施行され、従来は治験以外の臨床試験は「臨床研究に関する倫理指針」で実施されていたが、同法律および省令等の関連法規で実施されることとなった。これに伴い、臨床試験の審査は特定認定再生医療等委員会もしくは認定再生医療等委員会で実施されることになり、いずれも厚生労働大臣に報告される事となったが、他家の細胞を用いる場合には第一種再生医療等技術に分類され、厚生科学審議会でも審議されることとなった。このような大きな変革期にあたり、事業を円滑かつ適切に進めるために規制について検討を行った。

A．研究目的

本事業が臨床展開をするうえで今後規定されるのは再生医療等の安全性の確保等の法律であり、治験で実施される場合には、「医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律（薬機法）」であるが、前者は平成26年度より、後者は製造および品質管理に係わるGCTP省令（再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令）が同じく平成26年度に発出された。このように大きく変わる法制度において、本事業を円滑にすすめるための対応方法を本研究では検討する。

B．研究方法

再生医療等の安全性の確保等に関する法律およびその関連法規、薬機法およびその関連法規を収集し、内容を対比検討する。また、厚生労働省と医薬品医療機器総合機構より発出されているガイドライン、情報等を収集し、上記法規と合わせて内容を検討する。

(倫理面への配慮)

法規等の公開情報のみを取り扱うため該当せず。

C．研究結果

再生医療等の安全性の確保等に関する法律は、「法律」、「法律施行令」、医政局長通知である「再生医療等の安全性の確保等に関する法律の施行等について」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則（厚生労働省令第110号）」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて(平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知)等から成り立ち、それぞれの相互関係を把握することは容易ではない。この法律下では、再生医療等は「特定認定再生医療等委員会」もしくは「認定再生医療等委員会」で審議され、各地区の厚生局に申請し、許可後に活動が可能となる。

被験者の人権を守り、科学的妥当性を保証するためにこれら法規は制定されたが、実際の運用となると幾つか問題点が存在する。従来のヒト幹細胞臨床研究に関する指針では「用語の定義等」と記載され、「ヒト幹細胞臨床研究の実施、継続又は変更の適否その他ヒト幹細胞臨床研究に必要な事項について、倫理的及び科学的

観点から審議するため」と定義されていた。しかし、関連法規では倫理面の審査が明記されておらず、法律的な観点からの方への適合と、倫理的規範であるヘルシンキ宣言における倫理面の保証との整合性をどのようにとるのは明らかにされていない。特に特定認定再生医療等委員会は、設置に困難をきたしている機関が多く、構成あるいは成立要件を満たすための委員の確保、特に当該の研究に係わらない細胞培養加工に関する識見を有する者、生命倫理に関する識見を有する者、生物統計その他の臨床研究に関する識見を有する者、についての委員の任命と、手数料の算定が大きな障壁となっている実態があった。また、実施計画書は、科学的妥当性の担保のために必須であり、薬機法下では医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令(GCP)等によって詳細に規定されているが、再生医療等の安全性の確保等に関する法律では省令に「研究計画書等には「提供する再生医療等の詳細」が含まれている」と記載されているのみで厚生局への申請の際の記載要項に「研究計画書に含まれる項目」として7項目が挙げられているのみである。これは研究の種類あるいはリスク等に応じて必要項目が大きく違うであろうことによると考えられるが、これら項目の必要性について研究者が判断する必要がある。

薬機法では、従来の薬事法が医薬品と医療機器が対象であったが、「再生医療等製品」が独立したカテゴリーになり、個々の製剤によって医薬品か医療機器かに分類されていた状況とは一変した。この薬事法の改正に伴い、GCPは「再生医療等製品の臨床試験の実施の基準に関する省令」として、「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令(GLP)」は「再生医療等製品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準に関する省令」として、それぞれ再生医療等製品に特化した省令が発出された。両者共に対象とした製品を規定する文言が異なる程度で大きな差はなかった。一方、「医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理の基準(GMP)」は、化合物等の製造と細胞等の調製の違いを反映して、「再生医療等製品の製造管理及び品質管理の基準に関する省令(GCTP)」として発出された。GCTPは承

認後の製造販売にかかる省令であり、治験段階は規定していない。再生医療等の安全性の確保等に関する法律では細胞調製については省令第110号と法律施行規則に主として規定されているが、当然製造販売は念頭に置かれていない。アカデミアでの細胞調製施設は後者に準拠し、前者に可及的に準拠することとなる。両法規は、構成が著しく異なっているが、各条項を内容に合わせて対比すると違いはそれほど大きくないことがわかる。治験薬であっても承認後と連続性を持たせるためには可能な限りGCTPに沿うことが必要と考えられ、多くのアカデミアの細胞調製施設では、体制や手順書の整備について適合させることが必要となっている。

D．考察

本事業では、臨床試験を実施する施設は複数存在しており、特定の施設での問題点や対応を目的とはせず、全体としての問題点あるいは対応を検討すべく、法規等を取りまとめた。その結果、審査面、あるいは製造施設、実施の資料の作成等について、必ずしも見解が一致する項目だけではなく、解釈が分かれたり、研究者が自立的に判断すべき項目が存在することが判明した。今回、対照表や体系的な取り纏めの資料作成を本研究では主として行ったが、これらの資料は今後の臨床試験準備、あるいは研究者の理解促進のためには有益な情報であると考えられる。今後、特定認定再生医療等委員会への申請準備に際してはより詳細な資料の作成が必要と考えられるが、この研究を通じて円滑な事業遂行を目指すことが必要と考えられた。

E．結論

再生医療等の科学性と倫理性に配慮した臨床試験の実施は、法律の制定・整備により平成26年度は大きな転換期となった。実際の施行にはまだ法律論として、あるいは実務面での解釈として完全には定まったとは言えず円滑な実施には多くの施設で至っていない。今回の研究では対比表あるいは法の体系的まとめ等の資料を作成し、検討してきており、これらを活用し本事業での臨床試験の遂行を速やかに実

施できる検討を行った。

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol*. **100**:296-306, 2014.
2. **長村文孝**: トランスレーショナルリサーチの重要性. *病院* **73**:540-544, 2014.

2. 著書

1. **長村文孝**: 米国 FDA における抗がん剤の審査. **医薬品/医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方**, p216-219, 技術情報協会、2014年6月30日

3. 学会発表

1. Noriko Fujiwara, Fumitaka Nagamura, Kazufumi Matsumoto, Naohide Yamashita, Yukie Takemura, Kiyoko Kamibeppu. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. **International Association of Clinical Research Nurses**. 2014

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

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(移植医療技術開発研究分野))

「臓器移植・造血幹細胞移植後の日和見感染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」

(H25-難治等(免)-一般-105:研究代表者 森尾 友宏)

「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

(H24-難治等(免)-一般-008:研究代表者 高橋 聡)

平成 26 年度 第 1 回合同研究者間会議

日時: 2014 年 7 月 2 日(水) 17 時 ~ 20 時 30 分

場所: 東大医科研 1 号館 2 階会議室

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/access/access/>

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/access/campus/>

17:00 ~ 17:15	進捗状況と今年度の目標	高橋 聡(医科研)
17:15 ~ 17:30	ウイルス特異的 T 細胞療法の審査に向けて	長村 文孝(医科研)
17:30 ~ 17:45	凝固・線溶系を介した造血回復促進法の開発	安藤 潔(東海大) 宮田 敏男(東北大)
17:45 ~ 18:00	新規造血幹細胞増幅法の開発	岩間 厚志(千葉大)
18:00 ~ 18:15	改良型複数臍帯血移植法の開発	大津 真・石田 隆(医科研)
18:15 ~ 18:30	GVHD に対する新規分子標的療法とその白血病抑制作用	服部 浩一(順天堂大/医科研)
18:30 ~ 18:45	臍帯血バンク運営における問題整理	高梨 美乃子(日赤)
18:45 ~ 19:00	寛解導入不応骨髄性白血病に対する臍帯血移植の治療成績	山本 久史(虎の門病院)
19:00 ~ 19:15	cord colitis syndrome の遺伝子解析(中間報告) (仮)	大田 泰徳(医科研)
19:15 ~ 19:30	非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体遺伝子導入 T 細胞療法の開発	高橋 義行・小島 勢二(名古屋大)
19:30 ~ 19:45	複数ウイルス特異的細胞性免疫療法の開発	藤田 由利子(医科研)
19:45 ~ 20:00	多ウイルス特異的 T 細胞の機能評価	小野 敏明(医科歯科大)
20:00 ~ 20:15	ウイルス特異的 T 細胞のエピトープマッピングと HLA 拘束性の特定に関する研究	立川 愛(医科研)
20:15 ~ 20:30	多ウイルス特異的 T 細胞の臨床応用に向けて	森尾 友宏(医科歯科大)

「臓器移植・造血幹細胞移植後の日和見感染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」

(H25-難治等(免)-一般-105:研究代表者 森尾 友宏)

「適応拡大に向けた臍帯血移植の先進化による成績向上と普及に関する研究」

(H24-難治等(免)-一般-008:研究代表者 高橋 聡)

平成 26 年度 第 2 回合同研究者間会議

日時: 2014 年 12 月 25 日(木) 17 時 ~ 20 時 30 分

場所: 東大医科研 1 号館 2 階会議室

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/access/access/>

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/imsut/jp/access/campus/>

- | | | |
|---------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| 17:00 ~ 17:20 | 本研究班最終年度におけるまとめ | 高橋 聡 (医科研) |
| 17:20 ~ 17:30 | 臍帯血移植・臨床研究 | 寺倉 精太郎(名古屋大)
・小沼 貴晶(医科研)・高橋 聡 |
| 17:30 ~ 17:45 | 同種臍帯血移植における至適免疫抑制療法に関する後方視的検討 | 山口 拓洋 (東北大) |
| 17:45 ~ 18:00 | 同種移植後再発白血病に対する臍帯血移植の可能性 | 山本 久史 (虎の門病院) |
| 18:00 ~ 18:15 | TNF- 関連移植後合併症に対する新規分子標的療法の基礎研究 | 服部 浩一 (順天堂大 / 医科研) |
| 18:15 ~ 18:30 | 複数臍帯血ユニットを活用した新規造血細胞移植法の確立 | 大津 真・石田 隆(医科研) |
| 18:30 ~ 18:45 | 低分子化合物による臍帯血造血幹・前駆細胞増幅 | 岩間 厚志 (千葉大) |
| 18:45 ~ 19:00 | PAI-1 阻害薬の第 II 相試験に向けて | 安藤 潔(東海大)・宮田 敏男(東北大) |
| 19:15 ~ 19:30 | 長期に凍結保存されたウイルス特異的CTLの安定性に関する検討 | 高橋 義行・西尾 信博・小島 勢二 (名古屋大) |
| 19:30 ~ 19:45 | 多ウイルス特異的 T 細胞における epitope mapping の検討 | 小野 敏明(医科歯科大)・立川 愛(医科研) |
| 19:45 ~ 20:00 | 再生医療等の安全性の確保等に関する法律への施設対応 | 長村 文孝 (医科研) |
| 20:10 ~ 20:20 | 多ウイルス特異的 T 細胞療法の臨床応用 | 森尾 友宏 (医科歯科大) |
| 20:20 ~ 20:30 | 総合討論 ・ 事務連絡 | |

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・造血幹細胞移植後の日和見感染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)**

平成 26 年度 第 1 回造血細胞移植合同班会議

期日:平成 26 年 7 月 5 日(土)14 時 30 分～15 時 15 分

会場:名古屋第一赤十字病院 内ヶ島講堂

14:30～14:33 イン트로ダクション

東京医科歯科大学・発生発達病態学分野 森尾友宏

14:33～14:45 非ウイルスベクターを用いたキメラ抗原受容体遺伝子導入T細胞療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科・成長発達医学 高橋義行

14:45～14:57 多ウイルス特異的 T 細胞の機能評価

東京医科歯科大学・発生発達病態学分野 森尾友宏

東京医科歯科大学・発生発達病態学分野 小野敏明

東京大学医科学研究所 藤田由利子

東京大学医科学研究所 高橋 聡

14:57～15:09 ウイルス特異的 T 細胞のエピトープマッピングと HLA 拘束性の特定に関する研究

東京大学医科学研究所 立川 愛

15:09～15:15 多ウイルス特異的 T 細胞の臨床応用に向けて

東京医科歯科大学・発生発達病態学分野 森尾友宏

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・造血幹細胞移植後の日和見感染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)**

平成 26 年度 第 2 回造血細胞移植合同班会議

期日:平成 27 年 1 月 10 日(土)10 時 00 分～10 時 45 分

会場:独立行政法人 国立がん研究センター中央病院 国際会議室・研究所セミナールーム

- 10:00 ～ 10:10 長期に凍結保存されたウイルス特異的CTLの安定性に関する検討
名古屋大学医学部附属病院 先端医療・臨床研究支援センター 西尾信博
名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 小島勢二
名古屋大学大学院医学系研究科成長発達医学 高橋義行
- 10:10 ～ 10:20 実臨床応用に向けたウイルス特異的T細胞療法の開発
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 藤田由利子
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 田中ゆきえ
- 10:20 ～ 10:30 多ウイルス特異的T細胞におけるepitope mappingの検討
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 立川 愛
東京医科歯科大学発生発達病態学分野 小野敏明
- 10:30 ～ 10:40 多ウイルス特異的T細胞療法の臨床応用
東京医科歯科大学発生発達病態学分野・細胞治療センター 森尾友宏
- 10:40 ～ 10:45 総合討論

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
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
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
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
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

Konuma T, Kato S, Ooi J, Oiwa-Monna M, Yuji K, Ohno N, Kawamata T, Jo N, Yokoyama K, Uchimaru K, Tojo A, <u>Takahashi S.</u>	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
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, <u>Takahashi S.</u> 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
<u>Takahashi S.</u>	Here comes the cord.	Blood Res.	49	209-10	2014
Kawashima N, Ito Y, Sekiya Y, Narita A, Okuno Y, Muramatsu H, Irie M, Hama A, <u>Takahashi Y.</u> Kojima S.	Choreito formula for BK virus-associated hemorrhagic cystitis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Biol Blood Marrow Transplant.	21	319-25	2015
Kobayashi R, Yabe H, Kikuchi A, Kudo K, Yoshida N, Watanabe K, Muramatsu H, <u>Takahashi Y.</u> Inoue M, Koh K, Inagaki J, Okamoto Y, Sakamaki H, Kawa K, Kato K, Suzuki R, Kojima S.	Bloodstream infection after stem cell transplantation in children with idiopathic aplastic anemia.	Biol Blood Marrow Transplant.	20	1145-9	2014

Ohye T, Inagaki H, Ihira M, Higashimoto Y, Kato K, Oikawa J, Yagasaki H, Niizuma T, <u>Takahashi Y</u> , Kojima S, Yoshikawa T, Kurahashi H.	Dual roles for the telomeric repeats in chromosomally integrated human herpesvirus-6.	Sci Rep.	4	4559	2014
Suzuki M, Ito Y, Shimada A, Saito M, Muramatsu H, Hama A, <u>Takahashi Y</u> , Kimura H, Kojima S.	Long-term parvovirus B19 infections with genetic drift after cord blood transplantation complicated by persistent CD4+ lymphocytopenia.	J Pediatr Hematol Oncol.	36	e65-8	2014
Gu L, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Shiino T, Nakamura H, Koga M, Kikuchi T, Adachi E, Koibuchi T, Ishida T, Gao GF, Matsushita M, Sugiura W, Iwamoto A, Hosoya N.	Development and Customization of a Color-Coded Microbeads-Based Assay for Drug Resistance in HIV-1 Reverse Transcriptase.	PLoS One.	9	e109823	2014
Han C, <u>Kawana-Tachikawa A</u> , Shimizu A, Zhu D, Nakamura H, Adachi E, Kikuchi T, Koga M, Koibuchi T, Gao GF, Sat Y, Yamagata A, Martin E, Fukai S, Brumme ZL, Iwamoto A.	Switching and emergence of CTL epitopes in HIV-1 infection.	Retrovirology.	11	38	2014
石塚喜世伸、浅野達雄、西山慶、宮井貴之、神田祥一郎、菅原典子、近本裕子、秋岡祐子、堀田茂、小池淳樹、本田一穂、 <u>服部元史</u>	BK ウイルス腎症の診断と治療に苦慮した小児腎移植の 1 例.	日本臨床腎移植学会雑誌	2	225-229	2014

Kawano Y, <u>Mizuta</u> <u>K</u> , Sanada Y, Urahashi T, Ihara Y, Okada N, Yamada N, Sasanuma H, Sakuma Y, Taniai N, Yoshida H, Kawarasaki H, Yasuda Y, Uchida E.	Risk factors of cytomegalovirus infection after pediatric liver transplantation.	Transplant Proc.	46	3543-47	2014
長村文孝	トランスレーショナル リサーチの重要性.	病院	73	540-544	2014