

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号：30-8

課題名：難治性ウイルス感染症に対する免疫細胞療法の開発と効果評価及び治療適応評価
プラットフォームの開発研究

主任研究者名（所属施設） 国立研究開発法人国立成育医療研究センター
（所属・職名） 高度感染症診断部 統括部長 今留 謙一

（研究成果の要約）成育医療においてウイルス感染症への対応は重要課題といえる。とりわけ小児における移植治療後の感染症対策は最重要課題の一つで、治療成績のみならず患児の予後への影響を及ぼす。移植後の難治性ウイルス感染症の一つとして移植後リンパ増殖症（PTLD）がある。移植後の強力な免疫抑制により、それまで感染細胞を押さえ込んでいた免疫細胞の監視が不十分となりウイルスの再活性によるウイルス感染リンパ球の増殖が原因で PTLD は発症する。小児移植治療の PTLD 発症リスクは成人の移植治療と比較して 5-8 倍高い（Green et al. 2013 American Journal of Transplantation/ 『移植』 Vol. 44 No. 4 2009 臓器移植と PTLD）。本研究班では(1)個々の患者に特化した EBV 特異的細胞障害性 T 細胞（EBV-CTL）をフラスコ内で大量作製するシステム構築 (2)作製した EBV-CTL の効果評価システム構築 (3)製品管理システム構築(バリデーション構築) を目指す。このシステムの構築により拒絶や薬剤耐性を含めた副作用の最も少ない治療法が可能になると考えている。効果評価システム構築にはヒト化マウスを利用した in vivo 評価システムを導入することで非臨床 POC 取得後、速やかな臨床研究への移行が可能となる。これまでの細胞免疫療法開発を始めとした EBV に対する新規治療法の開発が進んでいなかった原因の一つに、EBV がヒトにしか感染しないため有効な動物評価系が存在しなかったことがある。申請者らはヒト化マウスを作製し、マウスの免疫細胞をヒトの免疫細胞に置き換えたヒト化マウスを利用することで EBV 感染モデルマウスを作製し in vivo 評価系の構築を成功させた。

本年度は(1)センダイウイルスを用いた EBV 抗原高発現組み換えウイルスの作製と遺伝子導入効率の検討 (2)CD34⁺細胞への組み換えウイルスの感染による遺伝子導入と DC への分化を進めた。

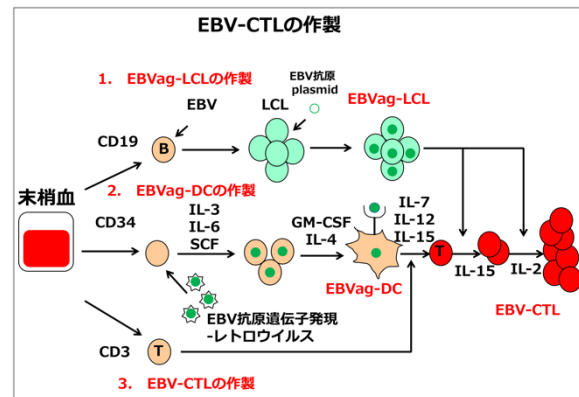
1. 研究目的

本研究の目的は成育医療研究センター高度感染症診断部では移植治療後のリンパ増殖症（PTLD）や難治性ウイルス感染症である慢性活動性 EB ウイルス感染症（CAEBV）や血球貪食性リンパ組織球症（HLH）などの診断・治療方針サポート・治療評価を行い成育のみならず全国の中央診断センターとしての難治性ウイルス感染症の臨床サポートを行ってきた。その中で、疾患の発見や治療の遅

れが原因の死亡例は少なくない。特に EB ウイルス（EBV）に対する治療は施設間でバラつきがあり、治療が後手に回っている印象は否めない。その原因の第一は抗ウイルス薬がないこと、治療法が確立されていないことに尽きる。現在、多くの国で抗 EBV 治療薬や EBV ワクチンの開発を試みているが効果や副作用の問題から実用化にはまだ時間がかかると言わざるを得ないのが現状である。

成育では骨髄、臓器移植が盛んにおこなわれ、小児肝移植は年間 50 例におよび世界の実施数である。移植医療における術後のウイルス感染症制御は移植成績のみならず患児の予後も左右する重要なテーマである。成育で小児移植後の難治性ウイルス感染症に対する治療法の開発は責務と言える。本研究では(1)個々の患者に特化した EBV 特異的細胞障害性 T 細胞 (EBV-CTL) をフラスコ内で大量作製するシステム構築 (2)作製した EBV-CTL の効果評価システム構築 (3)製品管理システム構築(バリデーション構築) を目指す。このシステムの構築により拒絶や薬剤耐性を含めた副作用の最も少ない治療法が可能になると考えている。効果評価システム構築にはヒト化マウスを利用した in vivo 評価システムを導入する。移植後の多量の免疫抑制剤投与中では患者体内で CTL 誘導ができて十分な機能は発揮できないことが予想される。そのため体外で作製した多量の EBV-CTL を投与することで免疫抑制下(もちろん拒絶しない程度の減量はする)でも短期間に感染細胞を排除できると考えている。実際、ヒト化マウスを用いた EBV 感染モデルを用いた予備実験でその可能性を確認している。免疫抑制剤投与により PTLD を発症した EBV 感染ヒト化モデルマウスに、免疫抑制剤非投与の別の EBV 感染ヒト化モデルマウスで誘導された CTL を回収し移植したところ、CTL の一部は免疫抑制剤の影響を受けたが、残りの CTL は感染細胞の排除に成功した。CTL を大量に作製し、移植できれば PTLD や難治性 EBV 感染症の治療を可能にできることが示されている。臍帯血を使用してフラスコ内 CTL 誘導システムの完成をまず目指し、この段階でシステムの知財獲得準備が整い次第直ちに競争的研究資金の獲得を進め、患者 T 細胞を CTL へ誘導するシステムの構築を目指す。このシステムは小児がんや他の難治

性ウイルス感染症へも応用可能と考えている。



2. 研究組織

研究者	所属施設
今留謙一	成育医療研究センター
内山徹	成育医療研究センター
石川百合子	成育医療研究センター

3. 研究成果

本年度の研究は、(令和元年度)

1. EBV 抗原発現樹状細胞 (EBV-DC) の作製
臍帯血から分離した CD34+細胞に EBVag-ウイルスを感染させ、その後 IL-3/IL-6/SCF を作用させた後 GM-CSF/IL-4 を添加し樹状細胞 (DC) を分化誘導させる。この DC は目的の EBV 抗原を提示する EBVag-DC である。現在の分化効率が 20%と低いいため、IL-3/IL-6/SCF の配合割合を条件設定し、この実験系に対しサイトカイン配合を最適化しているところである。

2. EBV 抗原遺伝子導入 LCL の作製 (EBVag-LCL)

臍帯血から CD19+B 細胞をポジティブセレクションし、EBV を感染させ EBV 感染 B 細胞株 (LCL) を樹立する。次に LCL に EBV 抗原プラスミド (H30-1 で作製した抗原と同様のもの) を遺伝子導入し EBV 抗原強発現 LCL (EBVag-LCL) を作製する。EBVag-LCL はブースター効果のために使用する。

1. で用いる CD34+細胞はすでに十分量凍

結保存しており、こちらの CD34+細胞を分離した残りの細胞から EBVag-LCL 作製を進めている。現在、樹立1 けが越経過しており、今年度中に樹立完了する見通しである。

3. EBVag-DC と T 細胞の共培養による EBV-CTL の誘導

臍帯血から CD3+T 細胞をポジティブセレクトし、RPMI1640+7/10%ヒト血清/IL-2 700 U/ml (T 細胞専用培地)、CD3 抗体固相化プレート上で培養し、T 細胞を増やした後 EBVag-DC と共培養させる。この時、IL-7, IL-12, IL-15 を添加し 3-6 日培養する。その後 EBVag-LCL と IL-15 を添加し 2-5 日培養し、その後更に EBVag-LCL と IL-2 を添加し 2-5 日培養する。この後 CD8+T 細胞をポジティブセレクトで回収する (EBV-CTL)。実際の本実験は上記 1. 2. の細胞を使用するが、予備実験としてすでに凍結保存している CD3+T 細胞の一部と 1. で分化誘導された DC と 2. で作製途中の LCL を使用し、CTL 誘導の効率・機能 (IFN- γ 誘導や killing 解析など) の解析を進めている。

4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の検体採取の際には、患者、または保護者から同意書を得た上で検査を行う。得られたサンプルにおいては、プライバシーの保護には十分配慮をし、成果を公表する場合には患者を同定できるような情報を一切含めず個人情報保護を行う。その方法として、患者の情報と検体番号は、患者識別対応表を作ることによって、個人が特定できないようにし、その対応表は、当院の個人情報管理者によって管理され、他の人がアクセス出来ないようにする。研究終了後の検体は、今後発見される可能性のあるウイ

ルスに対しての検索を行うために、採取されてから 10 年間、保存されるが、その後に廃棄される。その確認方法として、検体採取を始めた 10 年後の 6 月と 12 月に、保管されている検体のリストを確認し、10 年経過したサンプルを廃棄する。

学会、論文発表に際しては同意書記入時に患者本人もしくは保護者からの承諾を得、さらに氏名は非公開とし、生年月日は非公開で年齢のみを表記し、住所は表記しない。個人情報については、院内の医療情報管理に従い、プライバシーの損害を招かないように配慮する。

ヒト化マウス実験においては使用匹数を必要最小限になるよう工夫し、頻繁に観察することで、死亡することが予測できる場合は死亡するまで待たずに安楽死処置を施し苦痛軽減措置を図る。