

(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 (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 氏名) 高度感染症診断部 統括部長 今留 謙一

(研究成果の要約) 本年度は 1.EBV 抗原発現樹状細胞(EBV-DC)の作製 2.EBVag-DC と T 細胞の共培養による EBV-CTL の誘導 3.ヒト化マウスにおける EBV-CTL の評価の 3つを実施した。EBV-DC は EBV 遺伝子を抗原提示する樹状細胞を指し、EBVag-DC は EBV 膜遺伝子 LMP2A を抗原提示する樹状細胞である。同じ臍帯血から分離された DC と CD8⁺T 細胞を用い EBV 特異的(LMP2A 特異的)CTL を作成することを目指した。EBVag-DC を臍帯血から誘導することには成功したが、DC から EBVag-DC を誘導する過程で誘導効率が低いことが今後の課題である。EBVag-DC と CD8⁺T 細胞を co-culture し EBV-CTL の誘導に成功した。EBV 感染細胞株 LCL と EBV-CTL を co-culture すると感染細胞が 1 週間で 1/10 まで減少した。LCL の細胞数に対し EBV-CTL 細胞数が 100:1 と少ないことを考慮すると、細胞障害活性は満足するレベルと言える。現在 EBV 感染モデルマウス (ヒト型) で検討を進めている。

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において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難治性ウイルス感染症の臨床サポートを行ってきたことである。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高度感染症診断部
内山 徹	成育医療研究センター成育遺伝研究部

3. 研究成果

本年度の研究は、

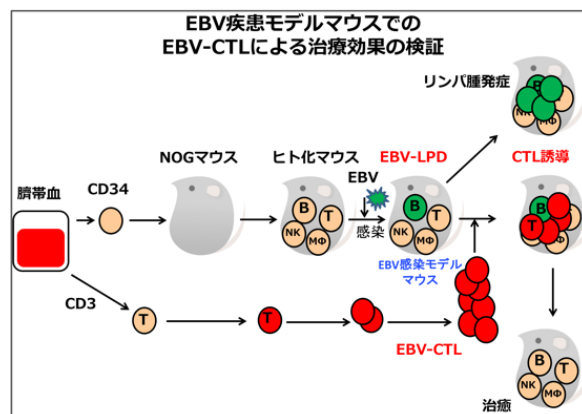
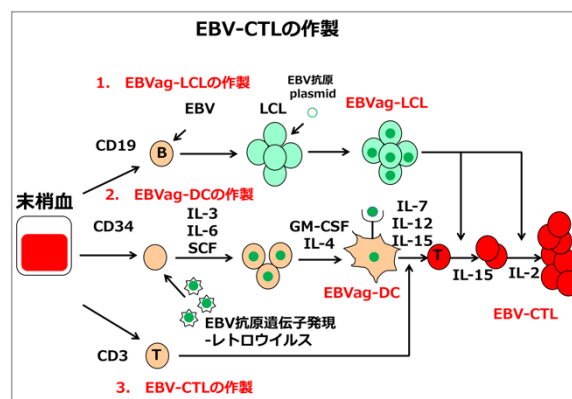
1. EBV 抗原発現樹状細胞(EBV-DC)の作製：臍帯血から分離した CD34⁺細胞に EBVag-ウイルスを感染させ、その後 IL-3/IL-6/SCF を作用させた後 GM-CSF/IL-4 を添加し樹状細胞(DC)を分化誘導させた。この DC は目的の EBV 抗原(LMP2A)を提示する EBVag-DC である。EBVag-DC の誘導効率が開始時 DC 数の 2%と低く、今後の課題である。

2. 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ションし、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 と共培養した。この時、IL-7, IL-12, IL-15 を添加し 3-6 日培養した。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 日培養した。この後 CD8⁺T 細胞をポジティブセレクションで回収した(EBV-CTL)。開始時の CD8⁺T 細胞から EBV-CTL-CD8 へ誘導された細胞は開始時細胞数の 5.7%であった。EBVag-DC の抗原提示率が co-culture 中でも低下していくことが明らかとなり、このことが EBV-CTL-CD8 誘導率の低下を引き起こしていると考えられる。

3. ヒト化マウスにおける EBV-CTL の評価：H30, H31 で使用した臍帯血から CD34⁺細胞を分離し、NOG マウス(NOD/Shi-scid/IL-2R^{null})に移植する。およそ 6 ヶ月後に B 細胞, T 細胞, NK 細胞, DC 細胞, マクロファージなどのヒト主要免疫細胞が NOG マウス内で

構築されヒト化が完了する。ヒト化完了後 EBV 感染させ PTLD と同様の病態である EBV-LPD モデルマウスを作製する。マウス末梢血中の EBV-DNA 量が 10⁴ copies/μgDNA 以上になった時、EBV-CTL をマウス尾静脈から移植し、1 週間ごとに尾静脈から 100μl 採血し 40μl を使い EBV-DNA 定量解析により EBV-CTL による感染細胞破壊の効果の評価を行う。末梢血 60μl でフローサイトメトリー解析(FCM 解析)による CTL の活性化と感染細胞の動態を検討する。現在マウスによる in vivo 評価を進めている。



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、採取してから10年間保存されるが、その後に廃棄する。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。