

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 (移植医療技術開発研究分野)
(英語) Practical Research Project for Allergic Diseases and Immunology
(Research on Technology of Medical Transplantation)

研究開発課題名： (日本語) 移植後日和見感染症に対する特異的 T 細胞療法の開発と
臨床応用に関する研究
(英語) Research on development of antigen-specific T cell therapy
for post-transplant opportunistic infections and its clinical application

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学大学院 教授 森尾友宏
所属 役職 氏名： (英語) Tomohiro Morio Professor, Tokyo Medical and Dental University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

実施期間： 平成 28 年 04 月 01 日 ～ 平成 29 年 03 月 31 日

分担研究 (日本語) 造血細胞移植後ウイルス感染症に対する特異的 T 細胞治療法の開発と臨床
応用
開発課題名： (英語) Development and clinical application of virus-specific T cell therapy
after hematopoietic cell transplantation

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医科学研究所 分子療法分野 准教授 高橋 聡
所属 役職 氏名： (英語) Satoshi Takahashi, Associate Professor, Division of Molecular Therapy,
Institute of Medical Science, University of Tokyo

分担研究 (日本語) 臨床研究準備と実施支援
開発課題名： (英語) Preparation and support of conduct to perform clinical study.

研究開発分担者 (日本語) 東京大学医科学研究所 先端医療開発推進分野 教授 長村文孝
所属 役職 氏名： (英語) Fumitaka Nagamura, Professor, Division of Advanced Medicine Promotion,
The Advanced Clinical Center, IMSUT

分担研究 (日本語) 臨床試験支援及び統計解析
開発課題名 : (英語) Support for clinical study and statistical analysis

研究開発分担者 (日本語) 東北大学大学院医学系研究科医学統計学分野 教授 山口 拓洋
所属 役職 氏名 : (英語) Takuhiro Yamaguchi, Ph.D. Professor, Division of Biostatistics
Tohoku University Graduate School of Medicine

分担研究 (日本語) EBV・CMV 特異的 T 細胞治療の臨床研究
開発課題名 : (英語) phase I clinical study of EBV and CMV specific cytotoxic T lymphocyte
(CTL) therapy

研究開発分担者 (日本語) 名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授 高橋 義行
所属 役職 氏名 : (英語) Yoshiyuki Takahashi, Professor and Chairman,
Department of Pediatrics, Nagoya University Graduate School of Medicine

II. 成果の概要（総括研究報告）

本年度は特定認定再生医療等委員会に提出する書類及び臨床試験実施計画書を作成し、東京医科歯科大学内の IRB の承認を受け、さらに6月30日に東京医科歯科大学特定認定再生医療等委員会の承認を得、11月28日に厚生科学審議会再生医療等評価部会から第一種再生医療等技術として実施の承認を得た。血縁ドナー由来多ウイルス特異的 T 細胞治療から開始することを予定していたが、登録者数が多くないと予測し、計画を前倒しして、HLA ハプロ合致以上血縁ドナー由来多ウイルス特異的 T 細胞治療を計画した。

細胞培養液については比較検証を行い、特定の無血清培地に固定した形でデータを蓄積することとした。TexMACS と NS-A2 との比較試験を行った結果、性能はほぼ同等であり、TexMACS は増殖能において優位を示す傾向であった。一方含有血清由来産物等から、TexMACS は原薬マスター登録が困難であり、NS-A2 の生産ラインが安定し、秋から十分量の供給体制が整い、またマスター登録をクリアする条件を満たしていることから、NS-A2 を用いた臨床試験実施計画を立て、特定認定再生医療等委員会での再審議を経てから、厚生科学審議会での審査に至ることになった。

その後も試験培養を繰り返し、出荷早期判定（ELISpot による検査を最終の細胞培養加工物：特定細胞加工物ではなく、最終拡大培養前に実施）を行うこととした。Cold run は6, 7回実施し、2名（あるいは3名）体制での培養を確定とした。品質検査は多岐にわたり、特定細胞加工物については、1. DNA ウイルス検査、2. RNA ウイルス検査、3. エンドトキシン検査及び培養、4. 細胞表面抗原分析、5. ELISpot 解析、6. 細胞傷害活性測定、7. アロ反応解析を分かれて検査するために、培養者と合わせて10名前後の人員を要する。そのために、2月に検査講習会を開催し、手順の確認を行った。

基礎的な検討としては、将来的な品質評価及び製造方法の改良に向けて、ウイルス特異的 T 細胞の特性解析も実施した。特にウイルス特異的 CD4 陽性 T 細胞についても注目し、そのエピトープや HLA 拘束性を明らかにするための実験系を構築し、CMV にてエピトープの絞り込みを行った。並行して、フローサイトメトリーを用いた細胞内外抗原染色による多種類の機能評価系を構築した。

また将来的な第三者由来 T 細胞治療に向け、大量培養系確立及び再増幅効率の向上を目的として、増幅における培養 $\gamma\delta$ T 細胞の導入につき検討を開始した。さらに、低コスト化を目的として、海外産のプラスチックである G-Rex から、ガス透過性バッグに培養容器を変更して、増幅効率や T 細胞亜群組成などについての検討を行った。

これらの検討は、将来的な細胞培養加工受託の実現という点から、共同研究企業とも協議を重ねながら、コストダウンへの方策や、有効な治療として展開していくための方略について議論を重ねた。様々な培養方法や資材に変更を加えていることから PMDA への事前面談は行っていないが、その準備は整ったと判断している。

さらに本年度は調整費の配分を受け、真菌（アスペルギルス、カンジダ）に対する特異的 T 細胞誘導について予定を前倒しして、検討を開始した。具体的には *Aspergillus fumigatus* の複数抗原及び *Candida albicans* の MP65 を標的として overlapping peptide を用意し、健常者の末梢血単核球を刺激して、IFN- γ 産生を細胞内染色（FACS）及び ELISpot アッセイで検討した。細胞の頻度としては 0.5%未満ではあるが明らかなる集団が検知され、これらと単球の共培養により、単球の活性化が認められるかについての検証を開始している。

(English version)

We prepared protocol for clinical trial that should be submitted to the certified special committees for regenerative medicine (CSCRM) at Tokyo Medical and Dental University (TMDU). The protocol was approved first by the Institutional Review Board (IRB) at TMDU and by the CSCRM on June the 30th, and then by Subcommittee for Regenerative Medicine of the Health Sciences Council of MHLW on November the 28th, 2016. We were planning to start multivirus-specific T cells (MSVT) prepared from matched related donor, but thought we might have difficulty in recruiting adequate number of subjects, and then elected to initiate MSVT from HLA-matched or HLA-haploidentical related donor.

We also compared a couple of serum-free medium and accumulated basic data. We checked both TexMACS and NS-A2 and found that cells proliferated more vigorously with using TexMACS, but overall performance was comparable. On the other hand, with Albumin from foreign origin, it was found difficult for TexMACS to register the medium in master file. NS-A2 is a novel medium with known ingredient that can be applied for master file registration. Production line for the medium became ready in autumn. With this reason, we revised the clinical trial protocol, and then went for re-evaluation at the CSCRM at TMDU.

We repeated cold run at least six to seven times for the MSVT, revised the manufacturing process adequately, and established the production line with two or three cell culture specialists. We employ various quality check including virus PCR (DNA and RNA), endotoxin test, bacterial/fungal culture, surface antigen profiling, ELISpot analysis, cellular cytotoxicity assay, and allo-reactivity test. We need close to 10 participants for culture and for quality examination. To that end, we had an opportunity of training session for all the participants.

We also have characterized the MSVT to improve manufacturing process and quality assurance test. We focused on virus-specific CD4 T cells and established an evaluation system for epitope mapping and HLA-restriction. With the method, we identified a few epitopes of CMV. The virus specific T cells were further evaluated for production of other cytokines and lysosomal associated membrane protein by multicolor analysis.

We started to work on re-expansion system considering future third-party MVST for generation of cells of 10^{10} level. To that end, T cells were evaluated as candidate antigen presentation cells. Cost-reduction is an issue when going for regenerative cell therapy product. We therefore evaluated gas-permeable bag instead of G-Rex of foreign origin for their efficacy in cell expansion and change in cell surface antigens. These research was carried out through discussion with companies conducting joint research on different project. We are planning to visit PMDA for interview before initiating clinical trial (for cellular and tissue based product).

Expansion of fungi-specific T cells was also evaluated with additional grant awarded this year from AMED. We prepared overlapping peptides from a few antigens of *Aspergillus fumigatus* and from MP65 of *Candida albicans* and examined expansion of the specific T cells by intracellular IFN- γ staining. The results showed that distinct specific subsets were detected though in low frequency (<0.5%). We are in a process of evaluating activation of monocytes by co-culture of the expanded cells with monocytes.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 2件、国際誌 16件)

1. Konuma T, Kato S, Ooi J, Ebihara Y, Mochizuki S, Ishii H, Takei T, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Second allogeneic transplantation using unrelated cord blood for relapsed hematological malignancies after allogeneic transplantation. *Leuk Lymphoma*. 2016, 57:103-9.
2. Ishii H, Konuma T, Ohnuma K, Hosono O, Tanaka H, Kato S, Tojo A, Takahashi S. Remission of remitting seronegative symmetrical synovitis with pitting edema after unrelated cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol*. 2016, 95:523-4.
3. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Ishii H, Tojo A, Takahashi S. Comparison of graft-versus-host disease-free, relapse-free survival of transplantation using matched sibling donor, matched unrelated donor or unrelated cord blood after myeloablative conditioning for adult patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2016, 57:2126-32.
4. Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Ishii H, Tojo A, Takahashi S. Early phase mixed chimerism in bone marrow does not affect long-term outcomes of myeloablative single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2016, 57:2848-2854.
5. Ishii H, Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Tojo A, Takahashi S. Impact of hematogones on the long-term outcomes of single-unit cord blood transplantation for adult patients. *Leuk Lymphoma*. 2016, 17:1-9.
6. Ishida T, Takahashi S, Lai CY, Nojima M, Yamamoto R, Takeuchi E, Takeuchi Y, Higashihara M, Nakauchi H, Otsu M. Multiple allogeneic progenitors in combination function as a unit to support early transient hematopoiesis in transplantation. *J Exp Med*. 2016, 213:1865-80.
7. Yasu T, Konuma T, Kato S, Kurokawa Y, Takahashi S, Tojo A. Different effects of lansoprazole and rabeprazole on the plasma voriconazole trough levels in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients. *Ann Hematol*. 2016, 95:1845-51.
8. Mitsushashi K, Kako S, Shigematsu A, Atsuta Y, Doki N, Fukuda T, Kanamori H, Onizuka M, Takahashi S, Ozawa Y, Kurokawa M, Inoue Y, Nagamura-Inoue T, Morishima Y, Mizuta S, Tanaka J; Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Comparison of Cyclophosphamide Combined with TBI, Oral Busulfan, or Intravenous Busulfan for Allogeneic Transplantation in Adult Patients with ALL. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016, 22:2194-2200.
9. Arai Y, Kondo T, Shigematsu A, Tanaka J, Takahashi S, Kobayashi T, Uchida N, Onishi Y, Ishikawa J, Kanamori H, Sawa M, Yokota A, Kouzai Y, Takanashi M, Ichinohe T, Atsuta Y, Mizuta S. High-dose cytarabine added to CY/TBI improves the prognosis of cord blood transplantation for acute lymphoblastic leukemia in adults: a retrospective cohort study. *Bone Marrow Transplant*. 2016, 51:1636-1639.
10. Yoshikawa N, Shimizu N, Uehara M, Oda A, Matsumiya R, Matsubara E, Kobayashi H, Hosono O, Kuribara-Souta A, Baba H, Nagamura F, Kiryu S, Tanaka H. The effects of bolus supplementation of branched-chain amino acids on skeletal muscle mass, strength, and function in patients with rheumatic disorders during glucocorticoid treatment. *Mod Rheumatol*. 2016, 28, 1-10.

11. Nagamura F. The Importance of Recruiting a Diverse Population for Stem Cell Clinical Trials. *Current Stem Cell Reports*. 2016, 2, 321-327.
12. 長村文孝, ウイルス療法のガイドライン・ガイドランスについて. *実験医学*, 2016, 34, 53-54.
13. 長村文孝, ウイルスを用いたがん治療における治験に向けたガイドライン作成の取り組み, 次世代がん治療研究最前線, 印刷中
14. Arai Y, Kondo T, Yamazaki H, Takenaka K, Sugita J, Kobayashi T, Ozawa Y, Uchida N, Iwato K, Kobayashi N, Takahashi Y, Ishiyama K, Fukuda T, Ichinohe T, Atsuta Y, Mori T, Teshima T, Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. Allogeneic unrelated bone marrow transplantation from older donors results in worse prognosis in recipients with aplastic anemia. *Haematologica*. 2016, 101(5), 644-52.
15. Suzuki K, Okuno Y, Kawashima N, Muramatsu H, Okuno T, Wang X, Kataoka S, Sekiya Y, Hamada M, Murakami N, Kojima D, Narita K, Narita A, Sakaguchi H, Sakaguchi K, Yoshida N, Nishio N, Hama A, Takahashi Y, Kudo K, Kato K, Kojima S. MEF2D-BCL9 Fusion Gene Is Associated With High-Risk Acute B-Cell Precursor Lymphoblastic Leukemia in Adolescents. *J Clin Oncol*. 2016, 34(28), 3451-9.
16. Kuwatsuka Y, Kanda J, Yamazaki H, Mori T, Miyamura K, Kako S, Uchida N, Ohashi K, Ozawa Y, Takahashi Y, Kato C, Iwato K, Ishiyama K, Kobayashi H, Eto T, Kahata K, Kato J, Miyamoto T, Kato K, Mori S, Atsuta Y, Kimura F, Kanda Y, Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation. A Comparison of Outcomes for Cord Blood Transplantation and Unrelated Bone Marrow Transplantation in Adult Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016, 22(10), 1836-43.
17. Kojima D, Muramatsu H, Okuno Y, Kataoka S, Murakami N, Tanahashi Y, Suzuki K, Kato T, Sekiya Y, Kawashima N, Narita A, Nishio N, Hama A, Imai K, Nonoyama S, Takahashi Y, Kojima S. Successful T-cell reconstitution after unrelated cord blood transplantation in a patient with complete DiGeorge syndrome. *J Allergy Clin Immunol*. 2016, 138(5), 1471-3.
18. Sekiya Y, Xu Y, Muramatsu H, Okuno Y, Narita A, Suzuki K, Wang X, Kawashima N, Sakaguchi H, Yoshida N, Hama A, Takahashi Y, Kato K, Kojima S. Clinical utility of next-generation sequencing-based minimal residual disease in paediatric B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2017, 176(2), 248-57.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Clinical impact of HLA disparity and anti-HLA antibody in cord blood transplants、Satoshi Takahashi、2016 European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) Meeting. (Valencia, Spain. 4 April 2016), 国外
2. Clinical impact of HLA disparity and anti-HLA antibody in cord blood transplants、Satoshi Takahashi、The 4th International CBT Summit and the National CME of the Advance of Unrelated CBT (June 24-26, 2016 at Hefei, China), 国外
3. 再生医療とバンキング（臍帯由来間葉系細胞）～アカデミアにおける開発、口演、長村文孝、細胞再生医療研究会, 2016/07/30, 国内

4. AROを担う人材教育, 口演, 長村文孝, ARO協議会総会、2016/08/30, 国内
5. 健常人末梢血を用いた腫瘍関連多抗原特異的 CTL 誘導法の開発, ポスター, 田中ゆきえ, 藤田由利子, 小野敏明, 立川(川名)愛, 森尾友宏, 高橋 聡, 第8回血液疾患免疫療法学会、北海道、2016/09/03, 年9月3日, 国内
6. Anti-inflammatory effect of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells through IDO and PGE2, Tokiko Nagamura-Inoue, Yuka Mori, Atsuko Takahashi, Takahisa Shimazu, Takeo Mukai, Hitomi Nagayama, Fumitaka Nagamura, Arinobu Tojo, 日本血液学会, 2016/10/14、国内
7. 多変量解析の不適切利用是正に向けた医学論文サーベイランス, 口頭, 野島正寛, 徳永睦, 長村文孝, 日本疫学会学術総会, 2017/1/27, 国内
8. 再生医療臨床研究における研究者向けインフォームド・コンセント教育用DVD開発の試み, 口演, 楠瀬まゆみ, 長村文孝, 中澤栄輔, 田代志門, 武藤香織, 日本再生医療学会総会, 2017/03/09, 国内.
9. アカデミア発治験薬を用いた医師主導治験(第I相)のTRC業務における現状と課題, ポスター, 大和田 理代、河野美那子、柳真志帆、堀部恵梨佳、蓑手沙織、長村文孝, CRCの在り方を考える会議, 2016/09/18, 国内
10. 文書処理手順の見直しによる治験開始手続きに要する日数の短縮, ポスター, 岡田美和子、米富さつき、武藤美和子、金沢敬子、長村文孝, 日本臨床試験学会, 2017/01/27, 国内
11. Excellent outcome of Hematopoietic stem cell transplantation in children with acquired aplastic anemia from alternative donor, 口頭, Yoshiyuki Takahashi, 42nd Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (Valencia, Spain), 2016/4/6, 国際.
12. Phase I study of anti-GD2 antibody ch14.18/CHO long term infusion in recurrent or refractory neuroblastoma patients in Japan, ポスター, Yoshiyuki Takahashi, Atsushi Narita, Nikolai Siebert, Nobuhiro Nishio, Yinyan Xu, Hideki Muramatsu, Asahito Hama, Takehiko Kamijo, Atsuko Nakazawa, Hajime Hosoi, Yoshiaki Kinoshita, Shinobu Shimizu, Katsuyoshi Kato, Masaaki Mizuno, Hans Loibner, Tatsuro Tajiri, Akira Nakagawara, Ruth Ladenstein, Holger N, Lode, Seiji Kojima, 2016ASCO Annual Meeting(Chicago, USA), 2016/6/6, 国際.
13. MEF2D-BCL9 fusion associated with high-risk acute B-precursor lymphoblastic leukemia in adolescents, 口頭, Kyogo Suzuki, Yusuke Okuno, Nozomu Kawashima, Hideki Muramatsu, Tatsuya Okuno, Yuko Sekiya, Shinsuke Kataoka, Motoharu Hamada, Norihiro Murakami, Daiei Kojima, Kotaro Narita, Atsushi Narita, Hirotohi Sakaguchi, Kimiyoshi Sakaguchi, Nao Yoshida, Nobuhiro Nishio, Asahito Hama, Yoshiyuki Takahashi, Kazuko Kudo, Koji Kato, Seiji Kojima, 第78回日本血液学会学術集会, 2016/10/13, 国際.
14. PiggyBac transposon, a non-viral gene transfer system, mediated T cells expressing CD19 chimeric antigen receptor for a "first in human" clinical trial, ポスター, Yoshiyuki Takahashi, Nobuhiro Nishio, Motoharu Hamada, Miyuki Takana, Daisuke Morita, Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Atsushi Narita, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Gianpietro Dotti, Seiji Kojima, Yoza Nakazawa, EBMT(Marseille, France), 2017/3/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
無し

(4) 特許出願
無し

平成28年度医療研究開発推進事業費補助金

(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業(移植医療技術開発研究分野)) 成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 移植医療技術開発分野
(英語) Practical Research Project for Allergic Diseases and Immunology
(Research on Technology of Medical Transplantation)

補助事業課題名： (日本語) 移植後日和見感染症に対する特異的T細胞療法の開発と
臨床応用に関する研究
(英語) Research on development of antigen-specific T cell therapy for
post-transplant opportunistic infections and its clinical
application

補助事業担当者 (日本語) 国立感染症研究所 室長 立川 愛
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Infectious Diseases, Division leader,
Ai Tachikawa

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

分担研究 (日本語) 多ウイルス特異的T細胞の特性解析
分担課題名： (英語) Analysis of multi-virus specific T cells

II. 成果の概要(総括研究報告)

- ・ 補助事業代表者による報告の場合
- ・ 補助事業分担者による報告の場合
補助事業代表者： 東京医科歯科大学大学院・教授・森尾 友宏 総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表
該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし