

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390243

研究課題名(和文) 個人差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムの開発

研究課題名(英文) Development of quality prediction / rationalization system in autologous cell therapy which can conquer individual difference

研究代表者

片野 尚子 (KATANO, HISAKO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：50376620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円、(間接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：自家細胞治療は、患者自身から調製した細胞試験薬の品質が症例ごとに異なることが、治療の奏功に直結する高品質な細胞の安定供給を困難とし、しいては円滑な臨床試験の実施の妨げとなっている。本研究では、患者由来細胞を用いることによって生じやすい、調製細胞の品質における個体差を補正し、患者個人のウイルス疾患罹患歴に起因する潜伏ウイルスの再活性化など、試験薬の安全性や投与後動態に影響を与えるリスクを最小化することによって、個体差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムの開発を検討した。

研究成果の概要(英文)：Autologous cell therapy serves as hindrance to implement a smooth clinical test, if that the quality of the cells as test medicine prepared from the patient itself differs for every case makes difficult the stable supply of the quality cell linking directly to a success of medical treatment. In this research, development of quality prediction / rationalization system in the private cell therapy which can conquer individual specificity by using more appropriated patient origin cell was considered by minimizing a risk of affecting the safety of trial drugs, such as revitalization of the incubation virus resulting from a patient individual's virus disease history, and an after-medication dynamic state.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：トランスレーショナル・リサーチ 再生医療 細胞医療

1. 研究開始当初の背景

自家細胞を用いた治療は、再生医療・移植・細胞療法のいずれの分野においても有望であるが、基礎実験で得られたほどの効果が臨床応用でも発揮されるとは限らない。その理由の1つは治療の対象である患者個人が治療薬となる細胞の提供者であることに起因する。すなわち、自家細胞が患者生体より得られるものであるため、細胞品質にばらつきを生じやすいこと、また、年齢・疾患等の個人の生体環境により、細胞試験薬の体内動態が同一とは限らないこと、さらに、潜伏ウイルスの再活性化など患者個人のウイルス性疾患罹患歴によるリスクの増大といった問題は、画一的基準に基づいて大量調製された細胞をそのまま投与して治療効果を判定するという方法には限界があることを示している。しかし、単なる調製細胞規格の厳格化やウイルス疾患罹患歴による対象患者の極端な絞り込みは、臨床試験実施をより困難にすることが予想され、細胞治療の質を上げるためには個体差への対応こそが急務となっている。

以上の点から、個体差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムの開発が必須となった。

2. 研究の目的

自家細胞治療は、患者自身から調製した細胞試験薬の品質が症例ごとに異なることが、治療の奏功に直結する高品質な細胞の安定供給を困難とし、しいては円滑な臨床試験の実施の妨げとなっている。そこで、本研究では、患者由来細胞を用いることによって生じやすい、調製細胞の品質における個体差を補正し、患者個人のウイルス疾患罹患歴に起因する潜伏ウイルスの再活性化など、試験薬の安全性や投与後動態に影響を与えるリスクを最小化することによって、個体差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

個体差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムを開発するために、ex vivo 遺伝子導入細胞を用いた癌免疫治療をモデルとして、細胞調製においては少量採血による予測のための細胞調製法を設計し、抗腫瘍免疫反応においては、少量細胞を対象とした測定法を開発する。さらに、これらの手法によって健常者・患者由来の調製細胞から細胞品質ならびに免疫反応を測定し、予測と検証を行う。一方、ウイルスモニタリングについては、血液細胞を対象とした高感度ウイルス検出系を確立し、培養工程でのウイルスモニタリング法を設計する。以上の結果を統合し、臨床試験研究モデルの実践を通してシステムの稼働性を確認する。

また実験モデルとして再生角膜上皮移植を検討し、研究活動の内容や成果を社会・国民に対して分かりやすく説明する、未来への希望を抱かせる心の通った双方向コミュニケーション活動(「国民との科学・技術対話」)にも活用する方法についても探索、ならびに検討を行う。

4. 研究成果

始めに健常人ボランティアから得られた少量採血検体を用いて、細胞調製法・免疫反応測定法・ウイルスの検出系など品質予測の基礎となる手法の開発を行った。はじめに、レポーターとしてEGFP 遺伝子を搭載した2種のアデノウイルスベクター、すなわちファイバー領域に RGD ペプチド配列を挿入した RGD 改変型(Ad-EGFP-RGD)と従来の非改変型(Ad-EGFP-Fwt)を用いて、 $1 \times 10^5$ 細胞数でのヒト末梢血由来樹状細胞への遺伝子導入効率・発現強度・生存率などの検討を行い、遠心力を併用した遺伝子導入法の至適条件を確立した。次いで、この条件が IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター Ad-IL12-RGD に対しても適用可能であることを確認した。一方、培地に添加する患者自己血漿には抗アデノウイルス中和抗体が含まれている可能性が十分に考えられることから、それがアデノウイルスベクターを介した細胞への遺伝子導入にどの程度影響を与えるかを確認するため、既に完了した細胞療法臨床研究にて採取された患者由来血漿を用いて RGD 改変型ベクターに対する中和抗体価を測定したところ、6 例中 4 例で抗体価が認められた(図1)。

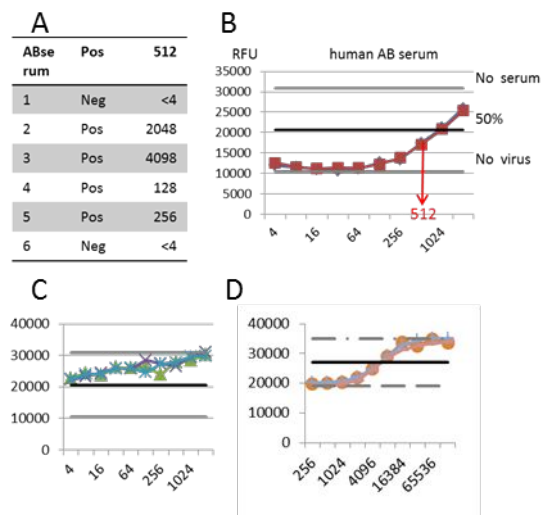


図1 RGD 改変型ベクターに対する中和抗体価測定  
 A 結果 B 市販 AB 血清では RFD 改変型ベクターに対する中和抗体値が求められた。C 抗体値が求められない例(#1) D 最も抗体値が高かった例(#3)

また、ヒトに病原性のある 163 種類のウイルスを同時に、かつ高感度に検出できる定量的 PCR をヒト由来細胞を原料とする培養細胞検体に応用するため、試料調製法、核酸抽

出法、試料保存法、輸送法などの検討を行い、目的試料からウイルス検出を行う至適条件を確立した。

次いで、ウイルス感染履歴が極めて少ないと考えられる研究用臍帯血 11 例から DNA/RNA を抽出し定量的 PCR による網羅的ウイルス検出を行った。その結果、全例でその存在否定が細胞・組織提供の的確性に挙げられている HBV、HCV、HIV、HTLV、parvovirus B19、サイトメガロウイルス、EB virus に加え、Adenovirus 等のヒトに病原性がある約 100 種のウイルスは検出されず、臍帯血がウイルス疾患罹患歴に対応した細胞試験薬の安全性リスクの予測と検証を行うための比較対照用試料として適格であることが示された。一方、同じ検体に由来する血漿中の抗アデノウイルス中和抗体価を測定したところ、市販の正常ヒト血清 AB 型と同程度以上の抗体価が得られるものが 11 例中数例みられた。このことはヒト臍帯血由来細胞にアデノウイルスベクターを介した遺伝子導入を行う場合に培地に含まれる血漿成分によって遺伝子導入が妨げられる可能性が示唆された。

以上、血液細胞を加工するがん免疫治療においては、調製細胞の品質における個体差を補正し、その個体差を克服しうる自家細胞治療における品質予測・適正化システムが必要であると考えられたが、再生医療においても同様の課題がありうるかどうかについて再生角膜上皮移植を例に取って、その前臨床研究から臨床研究計画実施までの過程を追って検討したところ、再生角膜上皮移植臨床研究にはがん免疫治療同様に調製細胞の品質における個体差の問題が存在すること、ならびに個体差を克服しうるシステム開発のより適切なモデルとなる可能性が判明した。そこで、本研究で対象としている実験モデルが注目を浴びている再生角膜の臨床研究であることから、研究活動の内容や成果を社会・国民に対して分かりやすく説明する、双方向コミュニケーション活動(「国民との科学・技術対話」)にも活用する方法についても探索、ならびに検討を行い、高校生を対象とした再生医療研究を学ぶ特別授業プログラムを開発し、授業実践を行った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 片野尚子、横尾誠一、山上聡、樋口桂、棚橋信雄、水上俊子. 角膜再生医療研究の最先端を高校生に伝える大学出張授業の開発と実践、第 118 回日本眼科学会総会 2014 (東京)

2. 片野尚子、天野史郎、横尾誠一、山上聡、島伸行、星和人、藤原夕子、高戸毅、小室美子、黒川峰夫、西澤悟、小山博之、荒川義弘、赤堀眞、飯室聡、小林真紀、山崎力、上竹勇三郎. 再生医療の実現を加速するシームレスな学内連携支援体制の構築 東京大学医学部附属病院の場合 日本臨床試験研究会第 5 回学術集会総会(東京)

3. 片野尚子、横尾誠一、山上聡、樋口桂、棚橋信雄、水上俊子. 再生医療研究の内容や成果を社会・国民にどのように発信するか：高校生向け大学出張授業の開発と実践、第 13 回日本再生医療学会 2014 (京都)

4. 片野尚子、樋口桂、棚橋信雄、水上俊子、横尾誠一、山上聡. 科学体験実習を中心に ICT 活用による協調学習を取り入れた高大連携授業の設計と実践、日本教育工学会第 29 回全国大会 (秋田)

5. 片野尚子、樋口桂、棚橋信雄、水上俊子、横尾誠一、山上聡. SSH 先端科学講座「再生医療の最前線」：大学/高校が協働して作り上げる高校が主役となる大学出張授業の開発、日本科学教育学会第 37 回年会 2013 (三重)

6. 片野尚子、天野史郎、横尾誠一、山上聡、島伸行、星和人、藤原夕子、高戸毅、小室美子、黒川峰夫、西澤悟、小山博之、荒川義弘、山崎力、上竹勇三郎、再生医療臨床研究の実現を加速する学内連携支援体制の構築 第 12 回日本再生医療学会総会 2013 (横浜)

〔図書〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

片野尚子 (KATANO HISAKO)  
東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：50376620

##### (2)研究分担者

田原秀晃 (TAHARA HIDEAKI)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：70322071

松下(佐藤)まりも (MATSUSHITA SATO MARIMO)

東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：50401253

金本 彰 (KANAMOTO AKIRA)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：10386021

(平成22年度から平成23年度まで)

中村 貴史 (NAKAMUTA TAKAHUMI)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号：70432911

片野 晴隆 (KATANO HARUTAKA)  
国立感染症研究所・感染病理部・室長  
研究者番号：70321867  
(平成23年度からは連携研究者)