

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461580

研究課題名(和文)造血幹細胞移植後EBV関連リンパ増殖症に対するEBV特異的CTL療法の最適化

研究課題名(英文) Development of Epstein-Barr virus (EBV) specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) therapy for EBV-LPD after hematopoietic stem cell transplantation

研究代表者

高橋 義行 (Takahashi, Yoshiyuki)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40432273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：90例の移植後患者末梢血液中EBV-DNA定量を行い、ATG血中濃度をELISA法により測定し、EBV再活性化との関連を検討した。フローサイトメトリー法によりCD20陰性CD19陽性細胞の有無を同定した。当院で行っているEBV抗原特異的CTLを用いた臨床第I相試験で用いられているEBV抗原ペプチドはHLA-A0201/0206, A2402拘束性であったが、HLA-A11拘束性ペプチドを合成し、新たにEBV特異的CTLとして培養可能であった。第3者由来末梢血からEBV特異的CTLを培養し、移植後リツキシマブ抵抗性EB-LPDに投与する第I相試験が再生医療新法に基づいて承認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the relation of EBV reactivation and Anti-thymocyte globulin (ATG) blood concentration in 90 cases and revealed that EBV reactivation was significantly more in high ATG concentration group. We could successfully developed EBV specific CTLs from 3rd party donors using not only HLA A2402/A0201 peptides but also HLA-A11 restricted peptides. We started the phase 1 clinical trial of EBV specific CTL therapy from the 3rd party donors.

研究分野：血液学

キーワード：EBウイルス 造血幹細胞移植 CTL

1. 研究開始当初の背景

健康人ではその90%においてEpstein-Barr virus (EBV) の感染がみられ、EBV に対する免疫が成立している。一方、造血幹細胞移植後の免疫抑制状態にある患者ではEBVの再活性化による、EBV 関連リンパ球増殖症(EB-LPD)を発症するが、連携研究者の木村らと申請者のグループは、世界で初めて定量PCR法によるEBV定量法を報告し (Kimura H, Kojima S et al. JCM 1999)。このEBV定量法を利用して抗ヒト胸腺グロブリン(ATG)の使用が造血細胞移植後EB-LPD発症の有意な危険因子であることなどを報告している (Hoshino Y, Kimura H, Kojima S et al. BJH 2001)。EB-LPDはガンシクロビルなどの抗ウイルス剤に効果がないが、EBVがB細胞に感染しやすいことから、B細胞に発現するCD20抗原に対するヒトモノクローナル抗体であるRituxanが臨床応用されている。しかしながら、正常のB細胞も同時に傷害してしまうため、免疫が正常化するまでに数ヶ月を要するといった問題があり、また、申請者はCD20陰性Rituxan抵抗性EB-LPDと患者体内のEBV特異的CTLの重要性を報告している (Muramatsu H, Takahashi Y et al. IJH 2010)。EBVはT細胞やNK細胞に感染することも報告されており、Rituxan抵抗性EB-LPDは造血細胞移植後の致命的合併症として問題となっている。

造血幹細胞移植後に発症したCD20陰性EB-LPDや、T細胞またはNK細胞にEBVが感染して成立したEB-LPDでは、ヒト抗CD20モノクローナル抗体であるRituxanに抵抗性のため多くが致死である。EBウイルス特異的CTL療法は比較的安全に投与可能で、一定の効果が期待できる (Melenhorst JJ, Leen AM et al. Blood 2010)。しかしながら体内にすでにEBV特異的CTLが存在し、免疫抑制剤を中止した症例でも効果が見られない場合があることはCTLからのエスケープメカニズムの存在が推定される。効果が乏しく副作用であるGVHDの危険が相対的に高くなるため、CTLの効果発現に影響を及ぼす因子の同定は患者に不適切な治療を避ける意味で重要である。

また、現在行っている臨床試験ではHLA-A0201/0206, A2402を持たない患者さんは適応とならないため、上記以外のHLA拘束性ペプチドの同定と臨床応用はより多くの患者さんに適応となるために重要である。本研究は、造血幹細胞移植後の致命的なEB-LPDに対するEB特異的CTL療法の最適化を通じて、他のウイルス感染に対するCTL療法の開発・最適化にもつながるものと期待できる。

2. 研究の目的

欧米においてはすでに骨髄移植後EBV関連リンパ球増殖症に対し、EBV抗原特異的CTLによる予防、治療が試みられており、研究協力者である米国ベイラー医科大学のLeenら

は、造血幹細胞移植ドナーおよび第三者から培養したウイルス特異的CTL療法が造血幹細胞移植後のEB-LPDを含む難治性ウイルス感染の予防および治療に有用であることを報告している (Leen A.M. et al. Nature Medicine 2006, Blood 2009, Blood 2013)。欧米におけるウイルス特異的CTLを用いた臨床試験においては投与されたウイルス抗原特異的CTLによりGVHDの副作用を起こす例は限られており、その安全性が報告されている (Melenhorst JJ, Leen AM et al. Blood 2010)。一方、国内においては、これまで造血幹細胞移植後にウイルス特異的CTL療法がおこなわれた例はなかったが、申請者らは、造血幹細胞移植後の抗ウイルス剤抵抗性サイトメガロウイルス(CMV)感染およびEB-LPDを対象としたウイルス抗原特異的CTLを用いた臨床第1相試験を開始し、我が国で初めて造血幹細胞移植後にウイルス抗原特異的CTLを投与している。すでにCMV特異的CTLの第1相試験が終了し、投与された5例全例でCTL輸注に関連した重篤な副作用は認めず、5例中4例に体内のウイルス特異的CTLの増加が観察され、5例中4例に血液中からウイルスDNAの消失が得られている。造血幹細胞移植後に発症したEB-LPDに対しても1例でEBV特異的CTLが投与され、体内のEBV特異的CTLの増加とEBV-DNAの消失(図1)、PET/CTにおいてEB-LPDの消失が得られている(図2)。

図1: EBV特異的CTL療法後のEBV-DNA推移

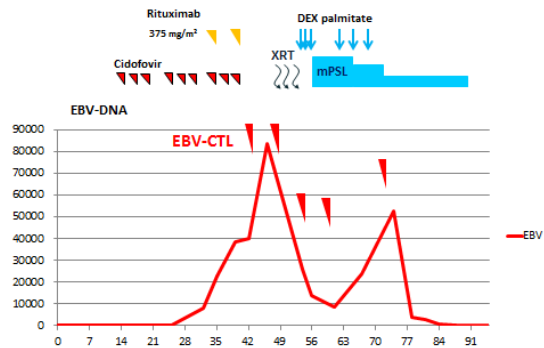
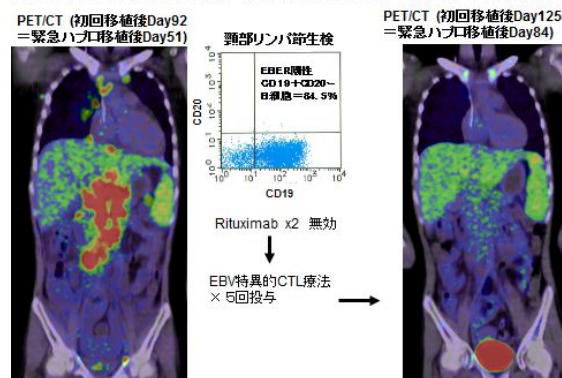


図2: 移植後CD20陰性EBV-LPDに対するEBV特異的CTL療法の効果



このように、造血幹細胞移植後に免疫抑制状態にある患者では Epstein-Barr virus

(EBV)の再活性化により、EBV 関連リンパ球増殖症(EB-LPD)を発症するが、CD20 陰性 B 細胞や、T 細胞またはNK 細胞に EBV が感染して成立した EB-LPD では、ヒト抗 CD20 モノクローナル抗体である Rituxan に抵抗性で多くが致死的である。我々は、「同種造血幹細胞移植後において生じる EBV 関連リンパ球増殖症に対する EBV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験」を実施し、我が国で初めて造血細胞移植後 EB-LPD に EBV 抗原特異的 CTL を投与し効果を観察している。しかしながら、移植ドナーからウイルス特異的 CTL を培養する場合に、骨髄バンクドナーからはあらかじめ培養しておくことができず、治療が間に合わない場合や、臍帯血移植ドナーからは培養できない。今回、患者体内の EBV-DNA 定量、ATG 血中濃度、EBV 特異的 CTL の有無、EB-LPD 組織における HLA 欠失、EBV 抗原欠失などの因子による CTL 療法の最適化および第 3 者由来ウイルス特異的 CTL 療法の第 I 相臨床研究を立案した。

3. 研究の方法

(1) 造血幹細胞移植後に EBV 再活性化およびウイルス特異的 CTL 体内動態の観察：名古屋大学病院小児科ではこれまで約 90 例の移植後の患者末梢血液中において EBV-DNA 定量を行っており、ATG 使用例において Day 7、Day14、Day28 の保存血清中の ATG 血中濃度を ELISA 法により測定し、EBV 再活性化との関連を検討する。また EBV 再活性化の新規症例においては、Rituxan 投与前後にフローサイトメトリー法による末梢血中のリンパ球サブセットの解析を行い、CD20 陰性 CD19 陽性細胞の有無を同定する。Rituxan 投与後に EBV-DNA 増加症例においては、EBER に対するプローブを用いたフローサイトメトリー FISH 法を用いて EBV 感染細胞の同定を行い (Kimura H, Kojima S. et al. JID 2009)、EBV 特異的 CTL テトラマー染色により患者体内の EBV 特異的 CTL のモニタリングを行う (Muramatsu H, Takahashi Y et al. IJH 2010)。これらの因子が EB-LPD の発症予測、および治療の有効性予測に有用であるかどうかを明らかにする。

(2) EBV 特異的 CTL 存在下で発症する EB-LPD におけるエスケープメカニズムの検討：造血幹細胞移植後に体内に EBV 特異的 CTL が存在しながら免疫抑制剤を中止しても EB-LPD が縮小しない 2 例を経験しており、EB-LPD と診断されたリンパ節生検から DNA を抽出し、HLA をタイピングし、HLA-LOH について同定し、SNP アレイ法により HLA をコードする 6 番染色体短腕上の Uniparental disomy (UPD) について検討する (Villalobos, I.B., Takahashi Y. et al. Blood 2010)。HLA 欠失のない症例では LMP2, EBNA3A, EBNA3B といった EBV 抗原発現について RT-PCR 法を用いて検討する。

(3) HLA-A0201/0206, A2402 以外の HLA 拘

束性 EBV 抗原ペプチドによる対象 HLA の拡大：当院で行っている「同種造血幹細胞移植後において生じる EBV 関連リンパ球増殖症に対する EBV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験」で用いられている EBV 抗原ペプチドは HLA-A0201/0206, A2402 拘束性であるため、日本人で頻度の高い HLA-A3, A11 における HLA 拘束性ペプチドを既に報告されたペプチドまたは、抗原タンパクのアミノ酸配列から候補ペプチドを合成し、CTL 培養とその機能解析を検討する。

(4) 移植後 Rituxan 抵抗性 EB-LPD に対する第 3 者由来 EBV 特異的 CTL の第 I 相試験を再生医療新法に基づいて申し、承認を得て開始する。

4. 研究成果

(1) 造血幹細胞移植後に EBV 再活性化およびウイルス特異的 CTL 体内動態の観察

90 例以上の移植後患者末梢血液中 EBV-DNA 定量を行い、ATG 血中濃度を ELISA 法により測定し、EBV 再活性化との関連を検討した。また EBV 再活性化の新規症例においては、Rituxan 投与前後にフローサイトメトリー法による末梢血中のリンパ球サブセットの解析を行い、CD20 陰性 CD19 陽性細胞の有無を同定した。Rituxan 投与後に EBV-DNA 増加症例においては、EBER に対するプローブを用いたフローサイトメトリー FISH 法を用いて EBV 感染細胞の同定、EBV 特異的 CTL テトラマー染色により EBV 特異的 CTL のモニタリングが可能となった。

(2) EBV 特異的 CTL 存在下で発症する EB-LPD におけるエスケープメカニズムの検討

造血幹細胞移植後に体内に EBV 特異的 CTL が存在しながら免疫抑制剤を中止しても EB-LPD が縮小しない症例を経験し、LMP2, EBNA3A, EBNA3B といった EBV 抗原発現について発現が消失していることを確認した。(亀井、高橋ら、日本血液学会東海地方会、名古屋、2015 年 5 月 23 日報告した)

(3) HLA-A0201/0206, A2402 以外の HLA 拘束性 EBV 抗原ペプチドによる対象 HLA の拡大

当院で行っている「同種造血幹細胞移植後において生じる EBV 関連リンパ球増殖症に対する EBV 抗原特異的 CTL を用いた治療の安全性に関する臨床第 I 相試験」で用いられている EBV 抗原ペプチドは HLA-A0201/0206, A2402 拘束性であるが、HLA-A11 拘束性ペプチドを合成し、新たに EBV 特異的 CTL として培養可能であった。

(4) 第 3 者由来末梢血から EBV 特異的 CTL を培養し、凍結保存しておき、移植後リツキシマブ抵抗性 EB-LPD に投与する第 I 相試験が再生医療新法に基づいて承認された。

同種造血幹細胞移植後の抗ウイルス薬抵抗性 CMV または EBV 感染に対して、第三者から培養、調製した CMV または EBV 抗原特異的

CTL を用いた臨床第 I 相試験が再生医療新法に基づいて申請、承認され、ボランティアドナーから CTL の培養、凍結保存、CTL バンクの作成を行った。CMV 特異的 CTL を 2 例、EBV 特異的 CTL を 1 例登録し、実際に投与を行った。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

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*, 査読有, 2017, 176 巻, 248-57
DOI: 10.1111/bjh.14420

Cherkasova E, Scrivani C, Doh S, Weisman Q, Takahashi Y, Harashima N, Yokoyama H, Srinivasan R, Linehan WM, Lerman MI, Childs RW, Detection of an Immunogenic HERV-E Envelope with Selective Expression in Clear Cell Kidney Cancer, *Cancer Res*, 査読有, 76 巻, 2016, 2177-85
DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3139

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*, 査読有, 101 巻, 2016, 644-52
DOI: 10.3324/haematol.2015.139469

Kojima D, Wang X, Muramatsu H, Okuno Y, Nishio N, Hama A, Tsuge I, Takahashi Y, Kojima S, Application of extensively targeted next-generation sequencing for the diagnosis of primary Kurahashi immunodeficiencies, *J Allergy Clin Immunol*, 査読有, 138 巻, 2016, 303-5
DOI: 10.1016/j.jaci.2016.01.012

Suzuki K, Muramatsu H, Okuno Y, Narita A, Hama A, Takahashi Y, Yoshida M, Horikoshi Y, Watanabe K, Kudo K, Kojima S, Immunosuppressive

therapy for patients with Down syndrome and idiopathic aplastic anemia, *Int J Hematol*, 査読有, 104 巻, 2016, 130-3
DOI: 10.1007/s12185-016-1997-z

Sekiya Y, Okuno Y, Muramatsu H, Ismael O, Kawashima N, Narita A, Wang X, Xu Y, Hama A, Fujisaki H, Imamura T, Hasegawa D, Kosaka Y, Sunami S, Ohtsuka Y, Ohga S, Takahashi Y, Kojima S, Shimada A, JAK2, MPL, and CALR mutations in children with essential thrombocythemia, *Int J Hematol*, 査読有, 2016, 104 巻, 266-7
DOI: 10.1007/s12185-016-2022-2

Kawashima N, Sekiya Y, Narita A, Kamei M, Muramatsu H, Nishio N, Hama A, Ito Y, Takahashi Y, Kojima S, Kampo patterns and radiology in children receiving choreito for hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation, *Trad Kampo Med*, 査読有, 2016, 3 巻, 136-44
DOI: 10.1002/tkm2.1053

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*, 査読有, 2016, 34 巻, 3451-9
DOI: 10.1200/JCO.2016.66.5547

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*, 査読有, 2016, 22 巻, 1836-43
DOI: 106/j.bbmt.2016.07.002.101

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, 査読有, 2016, 138 巻, 1471-3
DOI: 10.1016/j.jaci.2016.04.048

Sakaguchi H, Watanabe N, Matsumoto K, Yabe H, Kato S, Ogawa A, Inagaki J, Goto H, Koh K, Yoshida N, Kato K, Cho Y, Kosaka Y, Takahashi Y, Inoue M, Kato K, Atsuta Y, Miyamura K, Donor/Source Working Group of Japan Society of Hematopoietic Cell Transplantation, Comparison of Donor Sources in Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Childhood Acute Leukemia: A Nationwide Retrospective Study, Biol Blood Marrow Transplant, 査読有, 2016, 22 巻, 2226-34
DOI: 10.1016/j.bbmt.2016.09.020

Miura H, Kawamura Y, Kudo K, Ihira M, Ohye T, H, Kawashima N, Miyamura K, Yoshida N, Kato K, Takahashi Y, Kojima S, Yoshikawa T, Virological analysis of inherited chromosomally integrated human herpesvirus-6 in three hematopoietic stem cell transplant patients, Transpl Infect Dis, 査読有, 17 巻, 2015, 728-31
DOI:10.1111/tid.12419

Kawashima N, Muramatsu H, Okuno Y, Torii Y, Kawada JI, Narita A, Nakanishi K, Hama A, Kitamura A, Asai N, Nakamura S, Takahashi Y, Ito Y, Kojima S, Fulminant adenovirus hepatitis after hematopoietic stem cell transplant: Retrospective real-time PCR analysis for adenovirus DNA in two cases, J Infect Chemother, 査読有, 21 巻, 2015, 857-63
DOI:10.1016/j.jiac.2015.08.018

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 stem cell transplantation, Biol Blood Marrow Transplant, 査読有, 21 巻, 2015, 319-25
DOI:10.1016/j.bbmt.2014.10.018

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, 査読有, 20 巻, 2014, 1145-49
DOI:10.1016/j.bbmt.2014.04.006

[学会発表](計 7 件)

Yoshiyuki Takahashi, Nobuhiro Nishio, Motoharu Hamada, Miyuki Takana, Daisuke Morita, Nozomu Kawashima, Yusuke Okuno, Atsushi Narita, Asahito Hama, Hideki Muramatsu, Gianpietro Dotti, Seiji Kojima, Yozo Nakazawa, PiggyBac transposon, a non-viral gene transfer system, mediated T cells expressing CD19 chimeric antigen receptor for a "first in human" clinical trial, EBMT(Marseille, France), 2017/3/27

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, Phase I bridging study of ch14.18/CHO long-term infusion in recurrent or refractory neuroblastoma patients in Japan, 2016ASCO Annual Meeting(Chicago, USA), 2016/6/6

Yoshiyuki Takahashi, Excellent outcome of Hematopoietic stem cell transplantation in children with acquired aplastic anemia from alternative donor, 42nd Annual Meeting of the European Society for Blood and Marrow Transplantation(Valencia, Spain), 2016/4/6

高橋 義行、小島 大英、村上 典寛、鈴木 喬悟、関屋 由子、川島 希、亀井 美智、西尾 信博、奥野 友介、成田 敦、村松 秀城、濱 麻人、小島 勢二、小児後天性再生不良性貧血 67 例に対する同種造血細胞移植, 第 38 回日本造血細胞移植学会総会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 2016/3/3-5

Yoshiyuki Takahashi, Ho Joon Im, Kyung Nam Koh, Chengjuan Luo, Jing Chen, Hideki Muramatsu, Asahito Hama, Jong Jin Seo and Seiji Kojima, Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Children and Adolescents with Acquired Severe Aplastic Anemia, The 6th JSH International Symposium 2015, 軽井沢プリンスホテルウエスト(長野県・北佐久郡), 2015/5/22-23

西尾 信博、鈴木 哲、鎌塚 八千代、西田 徹也、村田 誠、清井 仁、高橋 義行、小島 勢二、長期保存されたウイルス特異的細胞傷害性 T 細胞の安定性に関する検討, 第 37 回日本造血細胞移植学会総会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2015/3/6

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, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市), 2014/10/31

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 義行 (TAKAHASHI, Yoshiyuki)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40432273

(2) 研究分担者

小島 勢二 (KOJIMA, Seiji)
名古屋大学・名誉教授
研究者番号: 20313992

(3) 連携研究者

木村 宏 (KIMURA, Hiroshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 30303621

水野 正明 (MIZUNO, Masaaki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院教授
研究者番号: 70283439

(4) 研究協力者

Leen, Ann (LEEN, Ann)
米国ペイラー医科大学・Pediatrics-Hem-Onc
Cell & Gene・助教

佐治 博夫 (SAJI, Hiroo)
HLA 研究所・所長