

遺伝子治療臨床研究実施計画について (国立がんセンター)

- 国立がんセンターから申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について (がん遺伝子治療臨床研究作業委員会) P1
- がん遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿 P7
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書及び概要書 (改訂後) P8
- 遺伝子治療臨床研究実施計画 (改訂後) P36

平成21年3月19日

**国立がんセンターから申請のあった
遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について**

がん遺伝子治療臨床研究
作業委員会
委員長 笹月 健彦

国立がんセンターから申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法
申請者：国立がんセンター 総長 廣橋 説雄
申請日：平成20年6月9日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

- (1) 研究課題名: ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法
- (2) 申請年月日: 平成 20 年 6 月 9 日
- (3) 実施施設: 国立がんセンター
代表者: 国立がんセンター 総長 廣橋 説雄
- (4) 総括責任者: 国立がんセンター中央病院・薬物療法部・幹細胞移植療法室
医長 平家 勇司
- (5) 対象疾患: 造血器悪性腫瘍
導入遺伝子: 単純ヘルペスウイルス 1 型・チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (Δ LNGFR) 遺伝子
ベクターの種類: 非増殖性レトロウイルスベクター
用法・用量: ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後、免疫系再構築の開始が確認されず、かつ Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合、移植 42 日後に 1×10^6 個/kg の遺伝子導入ドナー T リンパ球を追加輸注 (Add-back) する。Add-back 後も免疫系再構築が確認されず、かつ Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合、移植後 72 日目及び 102 日目にそれぞれ 1×10^7 個/kg の遺伝子導入ドナー T リンパ球を Add-back する。
研究実施期間: 厚生労働大臣より了承された日から 3 年間
目標症例数: 10 例 (5 例終了時点で遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会にて目的が十分に評価されうると判断された場合は 5 例で終了)

(6) 研究の概略:

本研究は、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen; HLA) 適合又は 1 抗原不一致 (血清型) の適切なドナーのいない、早期に移植治療を必要とする高リスク造血器悪性腫瘍患者に対して、HLA ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞の移植を施行した後、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いて HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子を導入した同一ドナー由来の T リンパ球を Add-back する治療法の安全性の評価と Add-back 後の免疫系再構築並びに GVHD 発症頻度及び制御能の評価を主要エンドポイントとする。また本治療法における感染症頻度、無病生存率及び全般生存率等の有効性を検討することを副次的エンドポイントとする。

(7) その他（外国での状況等）：

イタリアのモルメド社により欧州で同一のベクターを用いた同様の第Ⅰ/Ⅱ相臨床試験が実施され、イタリアで第Ⅲ相臨床試験が開始されている。また、筑波大では、同種造血幹細胞移植後の再発白血病を対象として、同一のベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を実施中である。タカラバイオ（株）では、同種造血幹細胞移植後の再発した造血器悪性腫瘍患者を対象として、同一のベクターを用いた治療が計画されている。

2. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議概要

1) 第1回審議

① 開催日時：平成20年7月15日(火) 10:00～12:30

② 議事概要：

平成20年6月9日付けで国立がんセンターより申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：造血器悪性腫瘍）について第1回目の審議を行った。

まず、研究実施計画について同センター中央病院の総括責任者らから説明を受けた後、説明及び提出資料を基に、委員間で実施計画の妥当性等について審議を行った。

各委員の意見については、事務局で整理の上、本作業委員会の意見として申請者に検討を依頼することとし、その結果を基に再度審議することとした。

（本作業委員会の意見）

1. モルメド社の欧州での臨床試験（Phase I/II）について、最新の詳細なデータを入手し、以下の点について説明すること。
 - ・ Add-back 2回目までの投与における免疫系再構築の頻度
 - ・ 3回以上の Add-back 例、及び IL-2 投与がなされた例についての詳細な情報
 - ・ 免疫系の再構築が見られなかった例について、その理由の解析が行われたかどうか
 - ・ 遺伝子導入細胞の動態と長期的な免疫系再構築に関する情報
2. モルメド社がイタリアで開始した Phase III のプロトコールに関し、IL-2 の使用の有無、Add-back の量、投与回数等について説明すること。
3. GCV 投与による HSV-TK 遺伝子導入細胞の殺細胞効果の確実性について、動物実験及びモルメド社の臨床データ等に基づき説明すること。なお、GCV 投与の回数、タイミングと殺細胞効果との関係について、モルメド社のデータ及び他のデータを確認すること。また、GCV 投与に関するモルメド社のプロトコールと本臨床研究のプロトコールに相違があれば相違点を明確にすること。モルメド社以外にも GCV 投与に関するデータが入手できれば参考データとして提出すること。

4. 被験者の選択基準について、最近の知見を踏まえて再検討した上で修正すること。
5. これまでの T 細胞への遺伝子導入効率について説明すること。
6. 遺伝子を導入した T 細胞が投与された後、どういう表現型のものが生体内で寄与すると考えられているのか説明すること。
7. 被験者用の同意説明文書に関し、プロトコルが複雑なので丁寧な説明が必要であることを踏まえ、以下について検討すること。
 - ・導入している HSV-TK は治療そのものではなく GVHD に対する介入措置であることを分かりやすく説明すること。
 - ・被験者への Add-back 投与が複数回になる可能性があるということについて、同意説明文書 22 頁（計画書 157 頁）の図や文章での説明ではわかりにくいので、計画書 83 頁の図を参考に説明を修正すること。
 - ・遺伝子導入細胞を投与後、一定期間被験者を個室管理することについて、同意説明文書に記載すること。
 - ・本遺伝子治療は、既存の方法ではドナーが得られない患者を対象とすることを同意説明文書でより明確に説明し、ハプロタイプ一致移植は我が国においては必ずしも確立している治療方法ではないことがわかりやすいように記載を再検討すること。なお、海外のデータを提示する場合には、我が国との状況の相違についても十分説明すること。
 - ・モルメド社の成績については、HSV-TK 遺伝子導入細胞投与前に死亡した 10 例を含めて生存率を解析し、臍帯血移植、骨髄移植と比較した結果について同意説明文書で説明すること。また、同意説明文書 19 頁（計画書 154 頁）には 2006 年 11 月で 21 例登録とあるが、説明資料には 2006 年 1 月時点で 29 名とあり、最新の情報を得た上で、正確な記載とすること。
 - ・HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験に関し、Add-back 後に試験結果が判明するものがあること、及びその場合の対応について、同意説明文書にわかりやすく記載すること。

2) 第 2 回審議

① 開催日時： 平成 21 年 1 月 23 日(金) 10:00~12:00

② 議事概要：

前回の審議における本作業委員会の意見に対し、国立がんセンターから回答書及び追加資料が提出されたことを受けて、第 2 回目の審議を行った。

まず、回答書及び追加資料について同センター中央病院の総括責任者らより説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性等について審議を行った。

その結果、本実施計画を概ね了承することとしたが、遺伝子導入細胞のクローナリティー検査等に関して委員より指摘のあった点については、申請者と事務局との間で整備の上、委員長が確認した後に、次回以降の科学技術部会に報告することとした。
(なお、これら実施計画書等の整備については、平成 21 年 3 月 19 日に委員長了承。)

(各委員からの主な指摘の内容)

1. 血液中の遺伝子導入 T リンパ球の動態について、臨床研究終了後もフォローアップを実施すること。また、経過観察により遺伝子導入細胞の増加が観察された場合等においては、LNGFR 陽性細胞を分画してクローナリティー解析を追加実施することにより、遺伝子導入細胞の増加は何らかの抗原刺激を受けてポリクローナルに増殖したことによるものなのか、あるいは、遺伝子導入に伴う挿入変異を契機に T リンパ球が単クローン性増殖を起こしたことによるものなのかを検討すること。
 2. 申請書の「がん原性の有無」及び同意説明書の「レトロウイルスベクターを用いることによる危険性」の項に、XSCID での白血病の発症例だけではなく、CGD での MDS の発症例や、ADA 欠損症での成功例などの最新の情報も追記すること。その上で、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで白血病化の報告がないことも追記すること。
- 3. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議を踏まえた第 1 回審議時からの実施計画及び被験者への同意説明文書の主な変更内容**

(実施計画)

- ・ 本作業委員会の意見を踏まえ、被験者の仮登録時選択基準について、臍帯血移植を優先する場合の具体的なデータが明記され、また、最近の知見を踏まえ、「3 回目又はそれ以降の寛解期にある悪性リンパ腫の患者」及び「自家移植後に再発、あるいは悪化した多発性骨髄腫の患者」は選択基準から削除された。
- ・ モルメド社の臨床試験について、本作業委員会の意見を踏まえ、実施計画書に最新の状況が追記された。同意説明文書にも説明が追記された。
- ・ レトロウイルスベクターのがん原性について、実施計画書に最新の情報が追記されるとともに、レトロウイルスベクターによるがん化の頻度は、対照疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なることが追記された。同意説明文書にも説明が追記された。
- ・ 臨床研究終了後の追跡調査について、本作業委員会の意見を踏まえ、血液中の遺伝

子導入 T リンパ球比率測定が 1 年毎のフォローアップ検査項目として追加された。

(患者への同意説明文書)

- ・ 本作業委員会の意見を踏まえ、本臨床研究の対象患者は、既存の方法ではドナーが得られない患者であること、及びハプロタイプ一致移植は我が国では必ずしも確立している治療方法ではないことについて、より明確な記載に改められた。
- ・ HSV-TK 遺伝子について、悪性腫瘍に対する治療効果があるものではなく、GVHD に対する安全性を高めるために導入されているものであることが明記された。
- ・ 遺伝子導入リンパ球の品質試験について、Add-back 後に試験結果が判明するものがあることの説明、及び投与後に不合格であることが判明した場合の対応と予測される危険（副作用）に関する説明が追記された。
- ・ 臨床研究のスケジュールについて、Add-back が複数回になる可能性があることが分かりやすく記載され、治療スケジュールを説明する図も改訂された。
- ・ 臨床研究中に個室管理が行なわれることに関する説明が追加された。

4. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会の検討結果

国立がんセンターから申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：造血器悪性腫瘍）に関して、がん遺伝子治療臨床研究作業委員会は、主として科学的観点から以上のとおり論点整理を進めて、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。その上で、本作業委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

次回以降の科学技術部会に報告する。

**厚生科学審議会科学技術部会
がん遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿**

氏 名	所 属
浅野 茂隆	早稲田大学理工学術院特任教授
荒戸 照世	独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査部審査役
上田 龍三	名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子内科学教授
小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
金子 周一	金沢大学医学部長
金田 安史	大阪大学大学院医学系研究科教授
○笹月 健彦	国立国際医療センター名誉総長
島田 隆	日本医科大学医学部教授
濱田 洋文	札幌医科大学教授
早川 堯夫	独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問
吉倉 廣	厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課参与

(がん化学療法、造血器)

兼任 上田 龍三 名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子内科学教授

○委員長 (五十音順 敬省略)

(平成 21 年 3 月 29 日現在)

別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 20 年 6 月 9 日

厚生労働大臣 殿

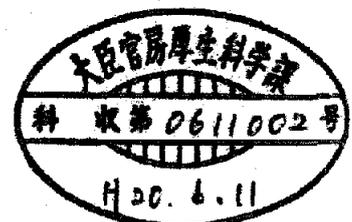
実 施 設	所在地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号
	名称	国立がんセンター (電話番号) 03-3542-2511 (FAX 番号) 03-3545-3567
	代表者 役職名・氏名	国立がんセンター 総長 廣橋 毅雄



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 "Add-back" 療法	国立がんセンター中央病院 薬物療法部・幹細胞移植療法室 医長 平家 勇司



遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成 20 年 6 月 9 日	(申請年月日)
-----------------	---------

研究の名称	ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 "Add-back" 療法
研究実施期間	年 月 日 (承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目1番1号	
	所属機関・部局・職	国立がんセンター中央病院・薬物療法部・幹細胞移植療法室・医長	
	氏名	平家 勇司 	
実施の場所	所在地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目1番1号	
	名称	国立がんセンター中央病院	
	連絡先	(電話番号) 03-3542-2511	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	吉田輝彦	国立がんセンター研究所 ・腫瘍ゲノム解析・情報研究部・部長	遺伝子導入細胞製剤の製造管理責任者
	青木一教	国立がんセンター研究所 ・がん宿主免疫研究室・室長	遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者
	高上洋一	国立がんセンター中央病院 ・薬物療法部・薬物療法部長	臨床効果の評価
	飛内賢正	国立がんセンター中央病院 ・第一領域外来部・第一領域外来部長	臨床効果の評価
	森慎一郎	国立がんセンター中央病院 ・臨床検査部・細菌検査室医長	投与患者の診療
金 成元	国立がんセンター中央病院	投与患者の診療	

	福田隆浩	・特殊病棟部・13B 病棟医師 国立がんセンター中央病院	投与患者の診療
	田野崎隆二	・特殊病棟部・12B 病棟医長 国立がんセンター中央病院	投与患者の診療
外部共同研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	峰野純一	タカラバイオ株式会社 ・細胞・遺伝子治療センター ・センター長	遺伝子導入用レトロウイルスベクター SFCMM-3 に関する基礎的助言及び遺伝子導入 T リンパ球調製技術の提供と助言
審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由		<p>審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実施計画は平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号「遺伝子治療臨床研究に関する指針」平成 14 年 3 月 27 日告示(平成 16 年 12 月 28 日全部改正)の必要条件を満たしていると認めた。</p> <p>さらに先行する海外での臨床研究での成績から、従来の治療法では対処困難である HLA 適合ドナーを持たない高リスク造血器悪性腫瘍患者に対するハプロタイプ一致(HLA2~3 座不一致)血縁ドナーからの移植において有効な治療法となること、本研究で輸注する遺伝子導入 T リンパ球の品質および安全性は十分に保証されるものと認められたため、所轄官庁への臨床研究実施計画申請を承認することを差しつかえないものと判断した。</p> <p>国立がんセンター遺伝子治療臨床研究審査委員会・委員長 国立がんセンター中央病院・院長</p> <p style="text-align: right;">土屋 了介 </p>	

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標的臨床研究
研究の目的	<p>高リスク造血器悪性腫瘍患者に対して、ヒト白血球抗原(human leukocyte antigen: HLA)ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞の移植を施行した後、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いて単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ(herpes simplex virus 1-thymidine kinase: HSV-TK)遺伝子を導入した同一ドナー由来の T リンパ球を追加輸注(Add-back)する治療法の全体としての安全性及び有効性について検討する。</p> <p><主要エンドポイント></p> <ul style="list-style-type: none"> ・「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球「Add-back」療法」の安全性 ・ HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 後の免疫系再構築並びに GVHD 発症頻度及び制御能 <p><副次的エンドポイント></p> <ul style="list-style-type: none"> ・「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球「Add-back」療法」における感染症頻度、無病生存率、及び全般的生存率 	

<p>対象疾患及びその選定理由</p>	<p>1. 対象疾患 ヒト白血球抗原(HLA)適合又は1抗原不一致(血清型)の適切なドナーのいない、早期に移植治療を必要とする高リスク造血器悪性腫瘍患者。</p> <p>2. 対象疾患に対する現時点での知見 【造血器悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植の現状】 HLA 適合血縁者間での造血幹細胞移植は確立された治療手段であるが、約60%の患者はHLA 適合ドナーが存在しない。この場合、骨髄バンクを介して、非血縁者ドナーを探すこととなるが、ドナーが存在しない可能性及びコーディネートに時間を要するという問題がある。</p> <p>【本邦における成人に対する臍帯血移植の現状】 本邦では、1994年に最初の同胞間臍帯血移植、1997年に非血縁者間臍帯血移植が行われて以来、緊急的移植にも迅速に対応可能であること、ドナーの負担がないこと、HLA 2座不一致まで移植可能であること等の利点があり、増加の一途を辿っている。2002年以降は成人における移植件数が小児のそれを上回るようになった。</p> <p>【当施設における臍帯血移植の経緯】 国立がんセンター中央病院では複数の臨床研究において症例登録を行い臍帯血移植を実施、着実に経験を蓄積している。</p> <p>【日米欧から報告された成人に対する臍帯血移植の成績】 今までに報告された日米欧の多施設あるいは単施設からの成人に対する臍帯血移植の成績から、以下が明らかにされた。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 成人に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植においても、造血の再構築が得られること。 ・ 発症する急性・慢性 GVHD は許容できるものであること。 ・ ハイリスク患者を対象とした場合でも10~20数%の長期生存が得られること。 ・ 患者の年齢、移植された CD34 陽性細胞数が成績に相関すること。 ・ 移植後100日以内の早期死亡例では感染症や前処置関連毒性が多いこと。 <p>また、日本国内では、学会を中心に継続して成績の集積が行われている。</p> <p>【日米欧から報告された成人における非血縁者骨髄移植と非血縁者臍帯血移植の成績の比較】 2004年末に欧米及び本邦から成人に対する非血縁臍帯血移植と非血縁者骨髄移植の治療成績が報告された。</p> <p>欧米からの2つの報告の結果は、いずれも、HLA 一致ドナーが見つからない場合には臍帯血は許容できる幹細胞ソースであると結論されており、類似していた。</p> <p>本邦からの報告(単一施設による)では、血縁者ドナーが存在しない場合には、臍帯血が第一の幹細胞ソースであると結論されていた。臍帯血移植の成績としては、極めて優れていると評価されており、欧米からの報告とは異なっている。</p> <p>【成人に対する臍帯血移植の課題】 現時点では、成人に対する臍帯血移植は、造血幹細胞移植の中の一つの選択肢として捉えられているが、体重あたりの移植細胞数が少ない場合には、生着不全の頻度が高い、生着までに時間を要する、移植後の重症感染症による治療関連死が多いといった点が指摘されている。</p> <p>【ミスマッチ移植の現状と課題】 ミスマッチ移植は100%に近い確率でドナーを見つけることが可能である。しかし、移植片が非自己を認識する作用が強いため、そのままでは生着しにくく、拒絶のリスク及び重篤な急性 GVHD 発症のリスクが問題となる。G-CSF により動員した末梢血幹細胞(peripheral blood stem cell; PBSC)からT細胞を除去した大量の造血幹細胞を急性白血病患者に移植することで、造血幹細胞を高率に生着させ、かつ重篤な GVHD を回避する手法も確立されているが、非血液疾患死亡率及び白血病再発率は依然として高く、この</p>
---------------------	---

観点でのより有効な治療法の開発が必須となっている。

【本邦におけるミスマッチ移植の現状と課題】

近年行われた調査によると、HLA 2 座以上の不一致を伴う移植においては、通常のGVHD 予防のみを行った場合には生存率が大きく低下した。HLA 2 座以上の不一致血縁者間移植を成功させるために、体外での T 細胞除去又は CD34 陽性細胞純化を行うミスマッチ移植、母子間免疫寛容の仮説に基づいたミスマッチ移植、強力なGVHD 予防法を用いたミスマッチ移植、及びアテムツズマブを用いた in vivo での T 細胞除去によるミスマッチ移植などの応用・研究が進んでいる。

【T 細胞除去ミスマッチ移植における課題に対する対策】

ドナー由来の T 細胞は造血幹細胞の生着及び宿主免疫再構築を促進しており、移植患者から日和見感染を予防し、GVM 効果による再発防止に寄与している。したがって、T 細胞除去ミスマッチ移植では、移植後早期に免疫系を再構築する手立てが必須である。

イタリアのモルメド社は、自殺遺伝子である HSV-TK 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入したドナー T リンパ球を調製し、これを T 細胞除去ミスマッチ移植後に Add-back することで、早期に免疫系を再構築する臨床試験を実施している。HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球には重篤な GVHD 発症時に GCV 製剤投与により当該細胞を抹消して沈静化する安全装置としての機能が付与されており、大量に Add-back することにより早期の免疫系再構築、感染症を含む治療関連死の発生率低下、及び GVM 効果による疾患再発阻止が期待できる。

【モルメド社の臨床試験概要】

現在、「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 療法」による第 I / II 相臨床試験 (TK007) を欧州 4 施設において実施している。第 47 回米国血液学会において発表された本試験の途中経過では、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の Add-back が、早期免疫系再構築を促進し、移植後の感染死を含む治療関連死を予防し、全体としての生存率を上げることが確認された。

【タカラバイオ株式会社の治験概要(予定)】

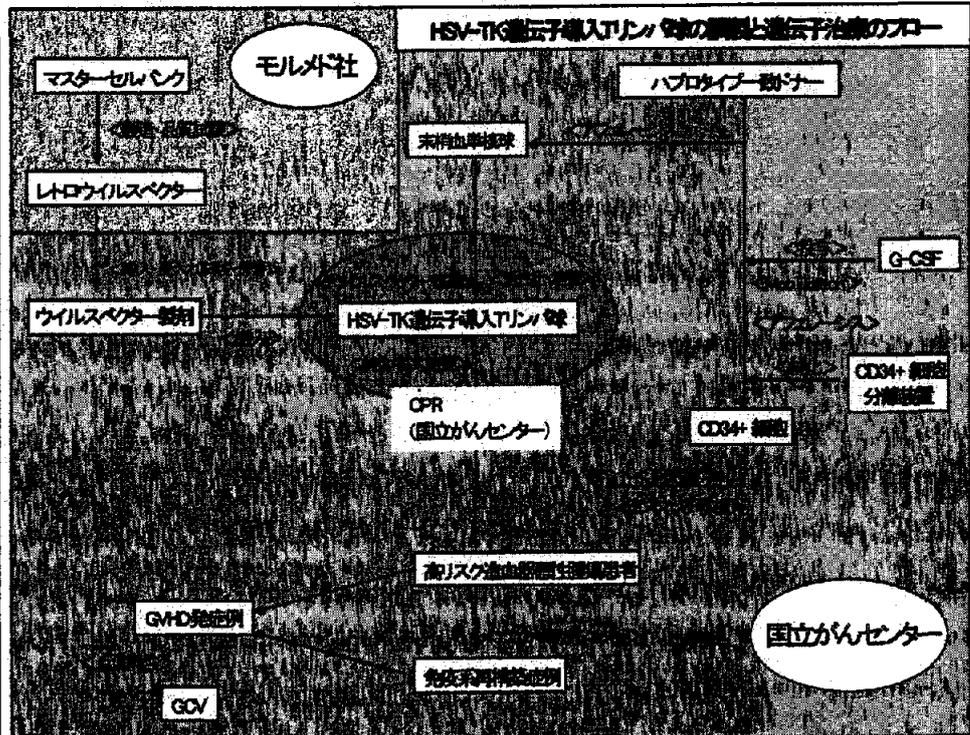
モルメド社から輸入した本臨床研究と同一のレトロウイルスベクターを用いた治験が、タカラバイオ(株)により計画されている。この治験では、同種造血幹細胞移植後に再発をきたした造血器悪性腫瘍患者を対象として、遺伝子導入 T リンパ球がドナーリンパ球輸注療法において投与される。タカラバイオ(株)は第 I 相試験を国立がんセンター中央病院で平成 20 年度に開始する予定である。

3. 本遺伝子治療臨床研究の概要

【本遺伝子治療臨床研究の全体フロー】

以上の状況を踏まえ、モルメド社が実施した臨床試験と同様のプロトコールによる遺伝子治療臨床研究を実施計画することとした。

本遺伝子治療臨床研究を実施するにあたっては、病院内に設置された無菌細胞調整施設(CPR)にて、モルメド社から輸入したレトロウイルスベクターを用いてHSV-TK遺伝子導入細胞をGMP基準に準拠して調製し、品質試験を行う。



【患者仮登録時選択基準の概要】

- 1) 予後不良の高リスク造血器悪性腫瘍患者(詳細は別途規定)
- 2) HLA 適合又はHLA 1座不一致の適切なドナーがいない
- 3) 末梢血幹細胞提供可能なHLA 2~3座不一致の血縁ドナーがいる
- 4) 年齢が20歳以上60歳以下
- 5) ECOGのPerformance Statusが0又は1
- 6) 主要臓器の機能が保たれている(詳細は別途規定)
- 7) ドナー及び患者の両者から文書での同意が得られている

【HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球の調製】

使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3は、モルメド社でGMP基準に則って作製され、品質規格に適合したものを輸入して受け入れる。なお、当該レトロウイルスベクターは、モルメド社が欧州で実施中の臨床試験(TK007)及び本邦における筑波大学付属病院での遺伝子治療臨床研究で使用されているものと同一である。

T細胞除去ミスマッチ移植ドナーと同一のドナーに由来するPBMCをアフレーションにより採取する。IL-2存在下で抗CD3抗体によりPBMCを刺激して活性化し、SFCMM-3によりHSV-TK遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体(Δ LNGFR)遺伝子をex vivo遠心法により導入する。その後、抗LNGFR抗体と二次抗体結合磁気ビーズ及び細胞分離装置による純化、並びにIL-2存在下での拡大培養を経て遺伝子導入Tリンパ球を調製し、品質試験に合格した後に用いる。一部の品質試験項目については、Add-back後に試験を実施することとし、万一不合格となった項目があればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。つまり、化学療法や移植幹細胞ソースの再検索といった臨床現場において現時点でHLA適合又はHLA一座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者に行われている中で、患者の状態に応じ

総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が最も適切と考える治療法を行う。

【T細胞除去ミスマッチ移植】

ドナーからの末梢血幹細胞は、G-CSF 製剤投与により動員し、アフエーシスにより採取する。その後、CD34 陽性細胞を分取し、 4×10^6 個/kg を最少量として患者に移植する。

前処置は、モルメド社の臨床試験(TK007)と同様の内容で実施する計画である。アシクロビル(ACV)製剤及びGCV製剤は、後にAdd-backするHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球の自殺機能を惹起することから、本臨床研究で感染予防・治療には使用しないこととする。サイトメガロウイルス(CMV)感染が問題となった場合には、ホスカルネットナトリウム製剤を使用する予定である。

【HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 及びフォローアップ】

T細胞除去ミスマッチ移植後、免疫系再構築の開始が確認されない場合には、造血幹細胞の生着が見込まれる移植後 42 日目の時点で、HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 1×10^6 個/kg を Add-back する。その後、免疫系再構築が認められず、かつ Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合は、移植後 72 日目及び 102 日目の時点で、それぞれ 1×10^7 個/kg の HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球を Add-back する。最終の Add-back 実施の 6 カ月後に本臨床研究のフォローアップを終了する。Grade II ~ IV の GVHD の発症が認められた場合には、通常の CMV 感染症治療に用いられる用法・用量に従って GCV 製剤を投与する。この場合、患者の状態によっては、それまでの Add-back の回数が 1 回または 2 回の場合、医師の判断により、GCV 製剤投与後に 1 回のみ HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 (1×10^6 個/kg) の Add-back を許すものとする。

4. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

①ミスマッチ移植

ミスマッチ移植の課題の解決策を他の治療手段との比較をしながら段階的に示す。

【ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植】

ミスマッチ移植における T細胞除去は重篤な GVHD 予防に最も有効な手段であるが、移植後の免疫抑制状態が感染症を引き起こすリスクを高めており、また再発などの問題も指摘されているため、早期の免疫系再構築、及び GVM 効果が課題となる。

【T細胞除去ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植+Tリンパ球 Add-back】

T細胞除去ミスマッチ移植後の早期免疫系再構築においては、移植時と同じドナーに由来する Tリンパ球の Add-back は、理論的に有効な手段と考えられる。しかし、少量の Tリンパ球の Add-back でも致死的な GVHD を発症した例があり、改善が必須である。

【Tリンパ球 Add-back vs HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back】

本遺伝子治療では、T細胞除去ミスマッチ移植後の早期に免疫系を再構築するために、同一ドナー由来の HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球を Add-back する計画である。これは Add-back した Tリンパ球が直接要因となる致死的な GVHD 発症に対する対策として、安全装置としての自殺機能を当該 Tリンパ球に付与するという考えに基づき、理論的には移植した造血幹細胞由来の免疫系には影響を与えずに GVHD を選択的に沈静化することが期待される。

②臍帯血移植

臍帯血移植については、近年、その評価は定まりつつあるが、成人に適用する場合の細胞数不足及び移植後療法としてのドナーリンパ球輸注などの細胞療法が不可能であることなどが問題点として挙げられている。臍帯血移植の利点である「ドナーの負担がない」という点では、本遺伝子治療は通常の移植以上にドナーの負担が大きいことから、臍帯血移植の方が優れているが、代表的な問題点である移植細胞数の不足、造血回復の遅延、生着不全の頻度の高さについては、本遺伝子治療により解決策を見出せる可能性がある。

	<p>ドナーの負担という点では、本遺伝子治療の個々の症例への適応については、慎重かつじゅうぶんな検討が必要である。しかしながら、本遺伝子治療は、一連の治療法の課題に対する解決策を模索した上で計画されたものであり、これまでの海外での臨床実績からも安全性及び有効性が見込まれるものとして妥当な手法と考え選択した。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>1. 人に導入する遺伝子の構造と性質 本臨床研究において発現する遺伝子はΔLNGFR 遺伝子と HSV-TK 遺伝子である。</p> <p>①人に導入する遺伝子の構造 ・細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子(ΔLNGFR 遺伝子) 使用するΔLNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子の細胞内領域をコードする塩基対を除去したもので、翻訳開始コドン ATG の上流に 113 塩基対の非翻訳領域を有し、ΔLNGFR をコードする 956 塩基対の遺伝子である。 ・単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK 遺伝子) 使用する HSV-TK 遺伝子は、CL101 株 DNA 由来の HSV-TK をコードする 1,131 塩基対及び翻訳開始コドン ATG の上流に位置する 14 塩基対の非翻訳領域からなる。</p> <p>②人に導入する遺伝子の性質 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 に含まれるΔLNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子は細胞内に侵入した後、逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA から 2 本鎖 DNA が合成され、核内に移行する。5'-LTR と 3'-LTR では含まれた DNA はウイルスが持っているインテグラーゼによって細胞染色体に組み込まれ(プロウイルス)、細胞ゲノムの複製に伴って複製されて安定的に娘細胞へ受け継がれる。このために継続的な遺伝子発現が可能である。</p> <p>③導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 ・ΔLNGFR の生物活性 ΔLNGFR は、細胞内領域のほとんどが除去されているため、シグナルを細胞内に伝達することはない。in vitro 及び in vivo において、ΔLNGFR の機能活性は観察されない。ΔLNGFR は細胞膜でたん白発現するため細胞表面マーカーとして利用され、特異的抗体を用いて in vitro で発現細胞を迅速に分離することができ、ex vivo での発現細胞の検出や生存状態、増殖状態等のキャラクタリゼーションを行うことができる。 ・HSV-TK の生物活性 HSV-TK は、遺伝子導入された細胞において自殺遺伝子産物として機能する。自殺遺伝子が導入された細胞では、その遺伝子産物により非毒性のプロドラッグである GCV が毒性型ドラッグに変換され、細胞が傷害を受ける。</p> <p>2. 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質 本計画では使用しない。</p> <p>3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由 GVM 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T リンパ球であること、及び当該細胞が GVHD の原因となることが知られている。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は増殖中の細胞を標的としており、組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) 存在下、抗 CD3 抗体で刺激することにより活性化された T リンパ球に対しても高い遺伝子導入効率が見られることが証明されている。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いた遺伝子治療においては、ドナーリンパ球から得られる活性化 T リンパ球が標的細胞として使用される。</p> <p>4. 遺伝子導入方法の概略及び当該遺伝子導入法を選択した理由 ①遺伝子導入方法の概略 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を含むウイルス産生細胞の培養上清中にドナー末梢血リンパ球を加え、遠心することで行う。 ②当該遺伝子導入法を選択した理由</p>

当該遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを用いた遠心法を選択した理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されていること、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。

③レトロウイルスベクターの選択根拠

レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行うことにより、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の基になる SFCMM-3 DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag, pol, env をコードする遺伝子の全てもしくは一部を欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12, ATCC CRL-9641) は、gag, pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて導入されているため、増殖性レトロウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて低いと考えられており、すでに世界的に広く使用されている。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

①野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

MoMLV はマウス白血病ウイルス (MLV) を実験室で継代して高病原性株として単離された。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであり、オンコウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好性ウイルスも知られているが、MoMLV は細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。ヒトへの感染の報告はない。

②ウイルスベクターの作製方法

・SFCMM-3 DNA ベクターの構築

pLXSN からネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除いて SV40 初期プロモーターの下流に Δ LNGFR 遺伝子を、パッケージングシグナルの下流に HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。

・パッケージング細胞株の構築

本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、Am12 である。本細胞株は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (ひとつは gag 遺伝子と pol 遺伝子で、もうひとつはマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の env 遺伝子) で別々にマウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 に導入したアンフォトロピックパッケージング細胞株である。また、gag 遺伝子と pol 遺伝子を含むプラスミド及び MoMLV の env 遺伝子を含むプラスミドによりこれらの遺伝子を NIH 3T3 に導入して作製されたエコトロピックパッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) をウイルス産生細胞の構築に用いた。

・ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 を含む培養上清を回収した。この上清を Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞を構築した。

SFCMM-3 産生細胞から、良好な生育性と T リンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、MCB を作製した。

・レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、バンキングされたウイルス産生細胞株の培養上

	<p>液中にウイルス粒子の状態が存在する。 製造は全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。</p> <p>③ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 はパッケージングシグナルとしてΨ^+を有し、gag、pol、env をコードする遺伝子は除かれている。</p> <p>④ウイルスベクターの生物学的特徴 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 はアンフォトロピックパッケージング細胞株 Am12 により産生されるので、マウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
安全性についての評価	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>①遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造は、モルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。製剤は、ロットごとにウイルス安全性を含め品質試験を行う。</p> <p>②患者に投与する物質の純度及びその安全性 患者に投与する物質は、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球及びその懸濁液である RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液 (CP-1) である。細胞調製の際に用いられる培地、試薬等に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に生理食塩水でじゅうぶんに洗浄されるので、患者に影響を及ぼすことはないと考えられる。</p> <p>③増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の可能性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・レトロウイルスベクターの安全性 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のゲノムは gag、pol、env をコードする遺伝子の全部、若しくは一部を欠如しているため、パッケージング細胞内ではしか増殖できない。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 上清の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性の製剤だけを臨床使用する。 ・パッケージング細胞の安全性 Am12 は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミドで別々に導入した第 3 世代のパッケージング細胞株であり、RCR を産生する可能性は、第 1 世代及び第 2 世代パッケージング細胞株と比較して極めて低い。従って、SFCMM-3 DNA ベクターと Am12 の組み合わせにより作製されたウイルス産生細胞株を使用してレトロウイルスベクター-SFCMM-3 を製造する過程で RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。 Am12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したという報告があり、Am12 を用いても RCR 出現の可能性を完全には否定できないことを示唆している。一方、Am12 を用いて多種類のウイルスの RCR チェックを試みたが検出されなかったという報告がある。 ・HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の安全性 HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の調製完了後、RT-PCR 法及び Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S+L-テスト (以下、増幅法) による RCR 試験を行う。RT-PCR 法による試験の結果、RCR 陰性であった細胞だけが患者に投与される。増幅法による試験は日数を要するために患者への投与後に結果が判明する場合も考えられるが、万一不合格となればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずる。 <p>④遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうるが、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。</p> <p>⑤体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性</p>

本遺伝子治療臨床研究では、ドナーTリンパ球に *ex vivo* で HSV-TK 遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経たあと患者に投与するので、感染性を持ったレトロウイルスベクター-SFCMM-3 が患者に投与される可能性は低い。また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入されることはない。

⑥患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作にじゅうぶんな知識と経験を有する研究者のみが行い、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。遺伝子導入操作は P2 レベルの細胞調製施設において行い、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の環境中への拡散を防止する。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

⑦染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合にはその細胞は死に至る可能性があるが、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の近傍に挿入され、これらの遺伝子の発現量が変化することにより当該細胞が無限増殖する可能性がある。

⑧がん原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、がん原性の問題が出現するが、本遺伝子治療は、1) 対象が造血幹細胞移植を要する成人の白血病患者であること、2) 分化した成熟リンパ球への遺伝子導入であること、3) 導入遺伝子 (HSV-TK 及び Δ LNGFR) は安全装置及びマーカーであること、から安全性が高い臨床計画と考えられている。遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖性については linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) によってモニタリングすることにより、評価する予定である。

2. 遺伝子産物の安全性

①HSV-TK 遺伝子の異常発現

HSV-TK は、GCV との組み合わせにより選択的自殺作用 (HSV-TK/GCV 自殺システム) を示す。一方、GCV 非存在下、HSV-TK が触媒する反応は通常の細胞内で行われている代謝反応であり、過剰発現による体細胞への影響は小さいものと思われる。ただし、HSV-TK 遺伝子発現細胞が免疫原となり、患者体内で当該細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることが過去の遺伝子治療臨床研究で示唆されている。このことは、GVM 効果の長期継続に対する障害となっている。HSV-TK/GCV 自殺システムを利用した遺伝子治療臨床試験において、本自殺システムに関連する有害事象は報告されていない。

② Δ LNGFR 遺伝子の異常発現

Δ LNGFR は細胞内領域を欠損させており、細胞外領域及び細胞膜貫通領域を有するたん白質であり、 Δ LNGFR 遺伝子を導入した Tリンパ球は NGF に対する反応を示さないことが報告されている。

3. 細胞の安全性

①遺伝子導入細胞の調製方法

ドナーリンパ球を抗 CD3 抗体で刺激した後、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 に懸濁し、遠心法により遺伝子導入を行う。抗 LNGFR 抗体及び磁気ビーズを用いて遺伝子導入細胞を選択し、拡大培養を行う。培養終了後の細胞を洗浄し、RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液 (CP-1) に懸濁して一旦凍結し、輸注時に解凍後、そのまま患者に投与する。

	<p>②培養細胞の純度 全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置したP2レベルの無菌細胞調整施設内にて行われる。培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、異なるドナー細胞への遺伝子導入を同時には行わない。また、細胞の取扱いはクラスⅡの安全キャビネット内で行い、感染性微生物の混入を防ぐ。</p> <p>③細胞の遺伝子型、表現型の安全性 抗LNGFR抗体及び磁気ビーズを用いた遺伝子導入細胞の選択により、ΔLNGFR陽性率が90%以上のTリンパ球が得られることが知られている。過去の実績から、レトロウイルスベクター-SFCMM-3により遺伝子導入したTリンパ球は非導入細胞と同様に、Tリンパ球としての機能を保持していることが確認されている。</p> <p>④被験者に投与する細胞の安全性 投与する細胞はレトロウイルスベクター-SFCMM-3により遺伝子導入したドナーTリンパ球である。現在、白血病に対するドナーリンパ球輸注は広く行われており、ドナーTリンパ球の投与がGVHD以外に患者に重大な影響を及ぼすことはない。遺伝子導入細胞の品質は、品質試験によって担保される。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>以下の理由により、本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本臨床研究で使用されるレトロウイルスベクター-SFCMM-3はイタリアのモルメド社によりGMPに従って製造され、本邦では筑波大学附属病院における臨床研究に使用された実績がある。またモルメド社は、これを用いて調製したHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球に対して、造血幹細胞移植における付加的治療として、2003年に欧州におけるオーファン医薬品の指定を受けており、現在、同ベクターを用いて本臨床研究と同様の治験を欧州4施設において実施している。2005年12月に開催された米国血液学会における発表では、途中経過として、その良好な経緯が報告された。 このことから、ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球“Add-back”療法は、非常に有望であり、T細胞除去ミスマッチ移植を安全かつ有効に行える可能性が示唆されている。 2. 国立がんセンター中央病院は我が国の悪性腫瘍治療の基幹病院である。本臨床研究対象疾患の診療では、設立以来の豊富な経験を有し、経験豊富なスタッフを擁している。また、本臨床研究対象疾患に合致する患者が多く受診している。 3. 総括責任者である平家勇司は、国立がんセンター研究所並びに中央病院において、細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究を行ってきた。1997～1998年にかけて、米国アラバマ大学遺伝子治療センターにおいて、アデノウイルスベクター開発に携わると共に遺伝子治療臨床研究の研修を行った。前勤務地である国立病院四国がんセンター（現独立行政法人国立病院機構四国がんセンター）では、治験を含む複数の臨床研究に携わった。現在、国立がんセンター中央病院・薬物療法部遺伝子免疫療法室において細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究及び固形腫瘍に対する骨髄非破壊的前処置による同種造血幹細胞移植療法の臨床開発に従事している。分担研究者である、吉田輝彦並びに青木一教はベクター開発を含む遺伝子治療開発研究を行っている。高上洋一、飛内賢正、森慎一郎、金成元、福田隆浩、田野崎隆二は、造血幹細胞移植の専門家であり、多くの治験並びに医師主導の臨床試験の実績がある。

実 施 計 画

1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

①本臨床研究の実施に際し国立がんセンター中央病院内に設置される委員会・事務局
本遺伝子治療臨床研究実施計画が了承された後に、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会及び遺伝子治療臨床研究実施事務局を国立がんセンター中央病院内に設置する。

遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会及び遺伝子治療臨床研究実施事務局は遺伝子治療臨床研究審査委員会からは独立しており、それぞれ次に示す役割を担う。

遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会は、被験者選定の適格性確認の妥当性の判定、臨床研究の安全性の客観的な判定、臨床効果の客観的な判定、プロトコルの変更の妥当性確認、5例終了時点での臨床研究の目的が評価できたかについての判定等を行う。

遺伝子治療臨床研究実施事務局は、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会との連絡等事務局業務、症例登録業務等の本遺伝子治療臨床研究を適切に実施するための支援業務を行う。

②本臨床研究の実施手順

被験者・ドナー選定、登録～遺伝子導入Tリンパ球調製・移植細胞の分離・移植前処置

適応が予測される被験者及びそのドナーに対し、文書によるインフォームドコンセントを行い、文書による同意が得られた場合、適格性を確認する。適格性が確認できた被験者及びそのドナーについて、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への仮登録及び登録をそれぞれ依頼する。ドナーより、血漿、末梢血単核球(PBMC)画分及び末梢血幹細胞(PBSC)の採取を行い、一連の細胞調製を行う。遺伝子導入Tリンパ球は、品質を確認した後に Add-back に用いる。PBSC については、専用の細胞分離装置を用いて CD34 陽性細胞の分離を行い、この分離細胞を移植細胞とする。

遺伝子導入Tリンパ球の調製及び移植細胞の採取後、被験者の適格性を確認し、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への本登録を依頼する。被験者が本登録となったことを確認した後、Fludarabine 製剤、Thiotepa 製剤、Thymoglobulin 製剤、及び放射線全身照射(TBI)による骨髄破壊的前処置を移植前処置として施行し、移植前処置の安全性及び原疾患の状態を確認する。

造血幹細胞移植

移植前処置後、CD34 陽性細胞の分離細胞 4.0×10^6 個/kg 以上を移植細胞として造血幹細胞移植を行う。

造血幹細胞移植後～遺伝子導入Tリンパ球 Add-back

移植直後の転帰の確認及び自発的な免疫系再構築の開始の確認を目的に造血幹細胞移植 30 日後から 40 日後の間に被験者の検査・観察を行う。遺伝子導入Tリンパ球 Add-back は以下に従い、免疫再構築の確認が得られるまで最大3回、それぞれ定められた日から7日以内に行うものとする。

初回の遺伝子導入Tリンパ球 Add-back 以降、GVHD が発症した場合には「GVHD 発症時の対応」の項の記載に従い、治療を行う。

初回の Add-back: 自発的な免疫系再構築の開始が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には造血幹細胞移植日を 0 日として 42 日目に 1×10^6 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

2 回目の Add-back: 初回の Add-back 以降、免疫系再構築が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には初回の Add-back から 30 日後に 1×10^6 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

3 回目の Add-back: 2 回目の Add-back 以降、免疫系再構築が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には 2 回目の Add-back から 30 日後に 1×10^6 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

遺伝子導入Tリンパ球 Add-back 後のフォローアップ

安全性の判定に関する検査・観察、免疫系再構築の判定に関する検査・観察、GCV 製剤投与による GVHD 沈静化能の判定に関する検査・観察等を行う。

遺伝子導入Tリンパ球の Add-back に伴い、重篤な GVHD が発症した場合には、GCV 製剤を投与する。その場合、GCV 製剤投与による GVHD の沈静化能に関する検査・観察

を行う。

本研究終了後も、被験者の生存期間中にわたり、追跡調査を行う。

2. ドナー・被験者の選択基準及び除外基準

①ドナーの選択基準及び除外基準

・選択基準

- 1) 被験者の4親等以内の血縁者である者。4親等以内には、父母、兄弟姉妹、祖父母、孫、叔父叔母、甥姪、従兄弟などが含まれる。
- 2) 患者とのHLAが2抗原あるいは3抗原(血清型)不一致のドナーである者。なお、不一致の対象となるHLA抗原はHLA-A、B、DRとする。
- 3) 登録時の年齢が20歳以上65歳以下である者。
- 4) ECOG Performance Statusが0である者。
- 5) ドナーとしてじゅうぶんな心・肺・腎・肝機能を有する者。
 - ▷ 心電図上虚血性変化や治療を要する不整脈を認めない者。
 - ▷ 血清クレアチニン値が1.5 mg/dL未満及び血清総ビリルビン値が2.0 mg/dL以下の者。
 - ▷ 胸部X線写真で異常がなく、酸素非投与時の酸素飽和度が93%以上の者。
 - ▷ ASTが56 IU/L未満の者。
 - ▷ ALTが66 IU/L未満の者。
- 6) ドナーとしてじゅうぶんな造血能を有する者。
 - ▷ 白血球数が3,000/ μ L以上の者。
 - ▷ 血小板が130,000/ μ L以上の者。
 - ▷ ヘモグロビン濃度が13.0 g/dL以上の男性、又は11.0 g/dL以上(鉄剤服用後でも可)の女性。
- 7) 本臨床研究協力に対する自由意思による同意が本人から文書により得られている者。

・除外基準

- 1) 自己免疫疾患(膠原病を含む)の現有及び既往のある者。
- 2) 静脈血栓、動脈硬化性疾患の現有及び既往のある者。
- 3) うっ血性心不全、虚血性心疾患、脳血管病変の現有及び既往のある者。
- 4) 間質性肺炎の現有及び既往のある者。
- 5) 悪性腫瘍の現有及び既往のある者。
- 6) 薬物治療を必要とする高血圧、糖尿病を現有する者。
- 7) 脾腫を認める者。
- 8) 臨床研究参加に対する同意に影響を及ぼす精神的疾患、薬物依存がある者。
- 9) 重篤な薬剤アレルギーの既往がある者。
- 10) G-CSF製剤に対するアレルギーがある者。
- 11) 妊婦あるいは妊娠している可能性がある者及び授乳中である者。
- 12) HBs抗原、HIV抗体のいずれかが陽性の者。
- 13) 他の臨床試験・臨床研究に参加している者。
- 14) その他、総括責任者(又は、治療に当たる分担研究者)が不適当と認めた者。

②被験者の選択基準及び除外基準

・仮登録時の選択基準及び除外基準

仮登録時選択基準

造血器悪性腫瘍患者の診断及び分類は新WHO分類に従うものとし、本遺伝子治療臨床研究による治療効果が、現在可能な他の方法と比較して優れていることが予測され、かつ以下の1)~8)の全てを満たす患者を対象とする。

なお、選定にあたっては、提供可能なHLA適合または1抗原不一致(血清型)の適切な血縁ドナーの存在の確認及び骨髓バンクの検索サービスを用いての非血縁ドナーの存在の確認を行い、さらに日本さい帯血バンクネットワークの検索システムを用いての移植可能な臍帯血の存在を確認するものとする。なお、患者の疾患、病期、候補となる臍帯血ユニットの細胞数及びHLA等を慎重に検討した上で、選定の時点で得られている日本さい帯血バンクネットワークが公式に公開している最新の治療成績で、95%信頼下限が50%

を超えている疾患、病期の組み合わせについては、臍帯血移植を優先する。

- 1) 以下のいずれかを満たす患者
 - ▷高リスク急性骨髄性白血病の初回寛解期。高リスクとは、1回の寛解導入療法にて完全寛解が得られなかった、初発時白血球数が20,000/ μ l以上、二次性白血病、M0、M6、M7、又は予後不良染色体異常[複雑な異常、-7, -5, abn(3q), del(5q)]を有する、のうちいずれかの条件を満たす例とする。
 - ▷急性骨髄性白血病(二次性含む)の第二以上の寛解期。
 - ▷骨髄異形成症候群のうち、IPSS(International Prognosis Scoring System) Intermediate-2以上の予後不良群。
 - ▷骨髄異形成症候群であり、週10単位以上の血小板輸血、もしくは2週に2単位以上の赤血球輸血を要する輸血依存例。
 - ▷慢性骨髄性白血病の第一慢性期以降の慢性期、又は移行期。メシル酸イマチニブによる治療歴を有する例に限る。
 - ▷高リスク急性リンパ性白血病初回寛解期。高リスクとは、初発時年齢が30歳以上、初発時白血球数30,000/ μ l以上、表面形質がmature B-cell又はearly T-cellである、予後不良の染色体異常[t(9;22), t(4;11), t(1;19), hypodiploid, -7, +8]を有する例、寛解導入に4週間以上要した、のうちいずれかの条件を満たす例とする。
 - ▷急性リンパ性白血病の第二以上の寛解期。
- 2) 提供可能なHLA適合(1抗原不一致(血清型)含む)の適切な血縁ドナー及び非血縁ドナーがいない患者。
- 3) 選択基準に合致し、除外基準に抵触しないドナーを有している患者。
- 4) 造血幹細胞移植後9ヵ月以上の生存が可能であると思われる20歳以上60歳以下の患者。
- 5) ECOG Performance Status 0又は1の患者。
- 6) 以下の全ての主要臓器機能が保たれている患者。
 - ▷酸素非投与下での動脈血中酸素飽和度が93%以上(経皮的測定でも可)
 - ▷血清クレアチニン値が施設基準値上限(男性:1.1 mg/dL、女性:0.7 mg/dL)の2倍以内
 - ▷血清ビリルビン値が2.0 mg/dL以下
 - ▷ASTが施設基準値上限(33 IU/L)の3倍以内
 - ▷ALTが施設基準値上限(男性:42 IU/L、女性:27 IU/L)の3倍以内
 - ▷心電図上、治療を要する異常を認めない
- 7) 臨床研究参加期間中に安全性や免疫系再構築等、必要な評価が可能であると考えられる患者。
- 8) 治療開始にあたり、自由意思により文書で同意が得られた患者。

仮登録時除外基準

- 1) CMV感染症を発症、又はCMV抗原血症を呈し、ガンシクロビル製剤にて治療中の患者。
- 2) ACV製剤で治療中の患者。
- 3) 心エコーにて安静時の心駆出率が50%未満の患者。
- 4) インスリンの継続使用によってもコントロール不良の糖尿病を有する患者。
- 5) コントロール不良の高血圧症を合併する患者。
- 6) 本臨床研究の参加に対する同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症などの疾患を有する患者。
- 7) 治療を要するアレルギー、又は本臨床研究で用いられる薬剤に対してアレルギーのある患者。
- 8) 活動性の感染症を有する患者。
- 9) 中枢神経系にコントロール不能な明らかな腫瘍細胞の浸潤を認める患者。
- 10) 活動性の重複痛がある患者。
- 11) 過去にTBI、全身リンパ節照射(TLI)を実施した患者。
- 12) HIV抗体陽性、HBs抗原陽性、又はHCV抗体陽性の患者。
- 13) 妊婦、妊娠の可能性のある患者、授乳中の患者又は臨床研究終了後5年間の避妊に協力できない患者。
- 14) 他の臨床試験・臨床研究に参加している患者。

15) その他、総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が不適当と認めた患者。

・本登録時の選択基準及び除外基準

本登録時選択基準

- 1) 本臨床研究への参加の同意の撤回がない患者。
- 2) 本臨床研究における Add-back に必要な量の遺伝子導入 Tリンパ球が得られた患者
- 3) ドナーから採取された純化後の CD34 陽性細胞数が 4.0×10^6 個/kg 以上の患者。
- 4) 造血幹細胞移植後 9 ヶ月以上の生存が可能であると思われる患者。
- 5) ECOG Performance Status 0 又は 1 の患者。
- 6) 以下の全ての主要臓器機能が保たれている患者。
 - ▷ 酸素非投与下での動脈血中酸素飽和度が 93%以上(経皮的測定でも可)
 - ▷ 血清クレアチニン値が施設基準値上限(男性:1.1 mg/dL、女性:0.7 mg/dL)の 2 倍以内
 - ▷ 血清ビリルビン値が 2.0 mg/dL 以下
 - ▷ AST が施設基準値上限(33 IU/L)の 3 倍以内
 - ▷ ALT が施設基準値上限(男性:42 IU/L、女性:27 IU/L)の 3 倍以内
 - ▷ 心電図上、治療を要する異常を認めない
- 7) 臨床研究参加期間中に安全性や免疫系再構築等、必要な評価が可能であると考えられる患者。

本登録時除外基準

- 1) CMV 感染症を発症、又は CMV 抗原血症を呈し、ガンシクロビル製剤にて治療中の患者。
- 2) 移植した末梢血幹細胞の生着が確認できない患者。
- 3) 治療を必要とする GVHD が発症した患者。
- 4) ACV 製剤で治療中の患者。
- 5) 心エコーにて安静時の心駆出率が 50%未満の患者。
- 6) インスリンの継続使用によってもコントロール不良の糖尿病を有する患者。
- 7) コントロール不良の高血圧症を合併する患者。
- 8) 本臨床研究の参加に対する同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症などの疾患を有する患者。
- 9) 治療を要するアレルギー、又は本臨床研究で用いられる薬剤に対してアレルギーのある患者。
- 10) 体表面積当たりのクレアチニン・クリアランスが 20 mL/分/m^2 未満[標準体表面積 1.48 m^2 で算出した場合のクレアチニン・クリアランスが 30 mL/分 未満]。
- 11) 活動性の感染症を有する患者。
- 12) 中枢神経系にコントロール不能な明らかな腫瘍細胞の浸潤を認める患者。
- 13) 活動性の重複癌がある患者。
- 14) 過去に TBI、TLI を実施した患者。
- 15) HIV 抗体陽性、HBs 抗原陽性、又は HCV 抗体陽性の患者。
- 16) 妊婦、妊娠の可能性のある患者、授乳中の患者又は臨床研究終了後 5 年間の避妊に協力できない患者。
- 17) 他の臨床試験・臨床研究に参加している患者。
- 18) その他、総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が不適当と認めた患者。

3. 登録

①ドナーの登録

自由意思による文書同意を得た後、適格性確認に必要な検査・観察を行う。適格性が確認できた場合、遺伝子治療臨床研究実施事務局にドナーの登録を依頼する。

②被験者の仮登録

自由意思による文書同意を得た後、適格性確認に必要な検査・観察を行う。適格性が確認できた場合、遺伝子治療臨床研究実施事務局に被験者の仮登録を依頼する。

③被験者の本登録

遺伝子導入 Tリンパ球の調製及び移植細胞の採取後に、被験者の適格性を確認する。

遺伝子導入 Tリンパ球が調製後の品質試験に不合格となった場合、本臨床研究における Add-back に必要な細胞数の遺伝子導入 Tリンパ球の確保ができなかった場合、及び純化後の CD34 陽性細胞数が移植に必要な数に満たなかった場合には、本登録には移行せず、臨床研究は中止とする。適格性が確認できた場合は、遺伝子治療臨床研究実施事務局に被験者の本登録を依頼する。

4. ドナー・被験者に対する説明及びその同意の取得方法

①被験者に対する説明及びその同意の取得方法

開始に先立ち、被験者の同意を得るに際し、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意説明文書を説明の前、又は説明するときに渡し、内容にそって口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する。なお、同意を取得する前には、質問する機会と臨床研究に参加するか否かを判断するじゅうぶんな時間を被験者本人に与えることとし、質問についてはじゅうぶんに答える。

②ドナーに対する説明及びその同意の取得方法

ドナーより PBMC 及び血漿を採取するに先立ち、ドナーの同意を得るに際し、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意説明文書を説明の前、又は説明するときに渡し、内容にそって口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する。なお、同意を取得する前には、質問する機会と臨床研究に参加するか否かを判断するじゅうぶんな時間をドナー本人に与えることとし、質問についてはじゅうぶんに答える。

③ドナー・被験者に対する説明の体制

・被験者の同意を取得する前には、移植専門医に加えて血液科医師等が参加するカンファレンスにて当該被験者の症例を紹介し、客観的な判断に基づいた確認を得るものとする。被験者への説明の際には、総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)からの説明に加え、がん専門看護師から異なる立場で説明補助を行う。さらに、必要に応じ院内外の移植専門医が中立的立場での説明を行うものとする。

・ドナーに対する説明は、被験者と別に行うものとする。また、ドナーとなることに同意する以前に患者より有形・無形の圧力がかからないように配慮する。

5. 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から最長3年間である。各症例毎の実施期間は、最終の遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 後 6 カ月迄で、臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり長期追跡調査を実施する。

目標症例数は 10 例とする。なお 5 例終了時点で、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会にて、以降の研究の継続の可否について審議を行うものとする。審議により、当該遺伝子治療臨床研究の目的がじゅうぶんに評価されうると判断された場合には、その 5 例をもって当該遺伝子治療臨床研究は終了とする。

6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

①対照群の設定方法

特に設けない。

②遺伝子導入方法、遺伝子導入 Tリンパ球の追加輸注(Add-back)等

「ドナーからの PBMC の採取」～「CD34 陽性細胞採取」については別表に定めた「①臨床研究実施スケジュール(ドナー)」で実施する。

・ドナーからの PBMC の採取

ドナーの選択・除外基準に関する適否を確認した後、ドナーの健康診断を行い、異常がないことを確認する。同意取得日から採取当日までの使用薬剤についても確認する。血球分離装置にてドナーより PBMC 画分を採取する。採取する細胞数は、輸注に必要な遺伝子導入 Tリンパ球の必要量によって異なるが、 1×10^{10} 個を採取目標量の最大とし、1 回

のアフェレーシスにつき最大 200 mL/kg の血液を処理する。

ドナーからの PBMC 画分採取は、国立がんセンター中央病院内に設置する遺伝子治療臨床研究実施事務局での本臨床研究へのドナーの登録、被験者の仮登録後に行う。

・遺伝子導入 Tリンパ球の調製

採取されたドナー PBMC 画分を用いて、「安全性についての評価 3. 細胞の安全性 ① 遺伝子導入細胞の調製方法」の記載に従い、細胞調製を行う。細胞調製後、「安全性についての評価 3. 細胞の安全性 ④被験者に投与する細胞の安全性」の記載に従い、遺伝子導入 Tリンパ球としての品質を確認したうえで、Add-back に用いる。

・CD34 陽性細胞採取

CD34 陽性細胞の動員・採取は「同種末梢血幹細胞移植のための健康人からの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン(日本造血細胞移植学会・日本輸血学会、2003 年 4 月 21 日 改訂第 3 版)」に準じて行う。なお、動員・採取中はもとより採取終了後もドナーを慎重に観察し、安全の確保に努める。

・末梢血幹細胞移植

移植治療前に末梢ラインあるいは中心静脈ラインを確保し、移植日に用意した移植細胞(CD34 陽性細胞の分離細胞 4.0×10^6 個/kg 以上)を末梢ラインあるいは中心静脈ラインから患者に輸注する。

・遺伝子導入 Tリンパ球の Add-back

「実施計画 1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画 ②本臨床研究の実施手順 造血幹細胞移植後～遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back」の記載に従う。

GVHD 発症時の対応

GVHD に対する治療: 遺伝子導入 Tリンパ球の Add-back 後、GVHD 発症時には免疫系再構築の有無にかかわらず、以下に従う。

Grade I の急性 GVHD が発症した場合には、そのまま経過観察を行う。

Grade II の急性 GVHD 又は慢性 GVHD が発症した場合には、総括責任者の判断のもと、治療を行ってもよい。

Grade III 以上の急性 GVHD を発症した場合、又は Grade II の急性 GVHD 又は慢性 GVHD を発症しかつ総括責任者により治療が必要であると判断された場合、GCV 製剤 5 mg/kg/回を 1 日 2 回 7～14 日間点滴静注する。GVHD が改善しない場合は、免疫抑制剤(例、タクロリムス製剤、メチルプレドニゾン製剤及びシクロスポリン A 製剤)を総括責任者の判断により投与する。GVHD の改善の判断は、日本造血細胞移植学会の「造血細胞移植ガイドライン-GVHD の診断と治療に関するガイドライン」に示された「標準的な secondary treatment の治療適応」に記載の基準に従う。

重篤な GVHD が発症し、GCV 製剤を投与しても GVHD が改善しない場合の secondary treatment は本実施計画では規定しない。

GVHD 治療後の遺伝子導入 Tリンパ球の Add-back: 遺伝子導入 Tリンパ球の Add-back 後に、Grade II 以上の GVHD が発症し、GCV 製剤投与により、じゅうぶんに沈静化できた場合には、GCV 製剤投与直前の遺伝子導入 Tリンパ球の Add-back が初回あるいは 2 回目の場合に限り、GCV 製剤投与終了後、総括責任者の判断により 1×10^6 個/kg の細胞数の遺伝子導入 Tリンパ球を Add-back することができる。発症した GVHD が GCV 製剤投与に反応しない場合には、新たな遺伝子導入 Tリンパ球の輸注は行わず、本臨床研究を中止するものとし、以降の治療は規定しない。

CMV 感染症時の対応

適宜ホスカルネットナトリウム製剤を投与する。

細菌、真菌感染時の対応

本実施計画では規定しない。症状に応じて、適切な抗生剤、抗真菌剤を投与する。

再発時の対応

研究を中止し、以降の治療については規定しない。

③前処置及び併用療法の有無

・移植前処置

骨髄破壊的前処置法として、TBI(7.5 Gy 単回照射 Day -9)+ thiotepa 製剤(5 mg/kg/q12h Day -8)+ fludarabine phosphate 製剤(40 mg/m²/日 Day -7～Day -3)+ methylprednisolone 製剤(2 mg/kg/日)と併せて Thymoglobulin 製剤[3 mg/kg/日(Merieux) あるいは 5 mg/kg/日(Fresenius) Day -6～Day -2]+ 安静(Day -1)を用いる。

・許容される併用療法

メシル酸イマチニブ

慢性骨髄性白血病に対しては、前処置開始までに終了する。

感染症予防薬

細菌感染症予防: 前処置開始時から好中球の生着確認時までキノロン系経口薬を投与。

真菌感染症予防: フルコナゾール製剤 200 mg/日 を前処置開始時から免疫系再構築確認時まで投与。カリニ肺炎予防のため、Sulfamethoxazole/Trimethoprim 合剤を前処置開始前は連日少なくとも2週間、好中球の生着後から少なくとも免疫系再構築確認時まででは週に2回、1日4錠の2分割投与。

ウイルス感染症予防: 単純ヘルペス感染症及び帯状疱疹予防のため、ピダラビン製剤を Day -7 から Day 35 まで 1,500 mg/日、点滴静注で投与。CMV 感染予防として、CMV 抗原血症検査 (C7+HRP あるいは C10/C11) を生着後 Day 100 まで週に1回ずつ施行する。CMV 抗原血症検査の結果に基づいて適宜ホスカルネットナトリウム製剤を投与。

・併用禁止療法

▷ 移植前処置開始時以降、臨床研究参加期間中を通じ、移植前処置で用いる以外の抗がん剤治療は禁止。ただし、仮登録から移植前処置開始までの期間については、他の抗がん剤による治療を禁止しない。

▷ 末梢血幹細胞移植後のシクロスポリン A 製剤の使用は禁止。又、原則として G-CSF 製剤の投与も禁止。

▷ 初回の遺伝子導入 Tリンパ球の輸注以降は、GCV 製剤・ACV 製剤の投与は禁止。

④臨床検査項目及び観察項目

被験者の適格性他の確認、本臨床研究における安全性の判定、免疫系再構築の判定、GCV 製剤投与による GVHD 沈静化の判定、治療反応性の判定 等のために以下の検査・観察を別表に定めた「②臨床研究実施スケジュール(患者)」で実施する。

・被験者の適格性他の確認に関する検査・観察

ドナー背景: HLA の型、現有、既往、自覚症状、他覚所見 (Performance Status 等)、心電図、血液学的検査、血液生化学検査、感染症検査、胸部 X 線検査、動脈血液中酸素飽和度 等

被験者仮登録時: HLA の型、臨床診断名・病歴、現有、既往、HLA 適合又は1抗原不一致の血縁ドナーの有無、妊娠の有無、自覚症状、他覚所見 (Performance Status 等)、心エコー、心電図、動脈血液中酸素飽和度、胸部 X 線検査 (感染症の検査として)、血液学的検査、血液生化学、感染症検査 等

被験者本登録時: 現有、既往、妊娠の有無、自覚症状、他覚所見 (Performance Status 等)、心エコー、心電図、動脈血液中酸素飽和度、胸部 X 線検査 (感染症の検査として)、血液学的検査、血液生化学検査、感染症検査、ドナーからの採取 CD34 陽性細胞数、遺伝子導入 Tリンパ球数、クレアチニン・クリアランス、尿定性 等

・移植細胞数

移植された CD34 陽性細胞数、及びこれに含まれる CD3 陽性細胞数

・輸血状況

輸血日、血小板輸血量(単位)、赤血球輸血量(単位)

・併用薬剤使用状況

併用薬剤名、1日用法用量、併用期間、使用目的

・遺伝子導入 Tリンパ球数

輸注した遺伝子導入 Tリンパ球数

・原疾患に関する検査・観察

臨床検査〔芽球の有無、ヘモグロビン量、好中球数、血小板数、LDH、CRP、血清電解質 (Ca)、骨髓像 (有核細胞数、腫瘍細胞割合、骨髓球の成熟、形態学的異常、巨核球数、M/E 比)、細胞遺伝学的検査、分子学的検査、キメラズム解析、腫瘍関連症状 (発熱、盗汗、体重減少)、血清 M 蛋白・尿中 M 蛋白、画像診断

・安全性の判定に関する検査・観察

臨床検査 (血液学的検査、血液生化学検査、免疫学的検査、感染症検査、尿定性検査等)、有害事象 (感染事象、GVHD、臨床検査値異常変動含む)、RCR 発現の有無、LAM-PCR による遺伝子導入 Tリンパ球クローナリティー解析

・免疫系再構築の判定に関する検査・観察

末梢血中の CD3 陽性リンパ球数、末梢血中のリンパ球の免疫表現型、末梢血の免疫回復の細胞生物学的解析及び分子生物学的解析

・GCV 製剤投与による GVHD 沈静化能の判定に関する検査・観察

GVHD 症状評価、GCV 製剤投与無効時の免疫抑制剤使用頻度、GVHD 発症組織における遺伝子導入 T リンパ球の存在確認(実施可能な場合)

・その他の検査・観察

無病生存率

重症性疾患に関わる検査、転帰、最終確認日

全般生存率

転帰、最終確認日

感染症の頻度

治療を要した感染事象の頻度、事象確認日、転帰、最終確認日

輸注後血中動脈

抗 LINGFR 抗体を用いた FACS 解析、又は PCR 法を用いて測定された血中遺伝子導入 T リンパ球比率の推移

研究終了後の追跡調査

本臨床研究終了後も生存期間中にわたり、以下の項目について追跡調査を行う。

▷RCR 出現の有無

▷血中遺伝子導入 T リンパ球比率測定

▷LAM-PCR による遺伝子導入 T リンパ球クローナリティーの解析

▷転帰(原疾患評価、生死の別、最終転帰確認日)

⑤予測される副作用及びその対処方法

・ドナー末梢血リンパ球採取に伴うドナーへの危険性

ドナーからのリンパ球採取は基本的に安全性が確立した手技であるが、特に以下の 4 点には注意を払う。対処法については、下記の記載のほか、「日赤成分採血マニュアル」の記載に従うこととする。

▷低カルシウム血症

(対処法) 予防のため、カルシウムを補充。

▷中心静脈確保の必要性

(対処法) 習熟した医師が行う。合併症発生時には症状にあわせ薬剤投与・処置を行う。

▷リンパ球採取後の血球減少

(対処法) 原則的に経過観察する。血小板については、必要に応じて返血を行う。

▷一時的な血圧低下

(対処法) 生理食塩水の点滴により対処可能。

・ドナー末梢血幹細胞採取に伴うドナーへの危険性

「ドナー末梢血リンパ球採取に伴うドナーへの危険性」で示した以外に、以下の 2 点に注意を払う。

▷血管迷走神経反射を認めることがある。

(対処法) 必ず ECG モニターを用い、硫酸アトロピン、エチホール、エフェドリンなどを直ちに静注するための準備を行う。

▷採取後に血小板減少が高頻度(50%以上)に見られ、50,000/ μ L 未満の高度の血小板減少も少なからず見られる。

(対処法) 採取終了後 1 週間くらいは血小板数を確認し、採取前値への回復を確認する。

PBSC 動員から採取終了までアスピリン製剤は使用しない。

・T 細胞除去造血幹細胞移植に伴う被験者への危険性

▷感染症を主要因とする移植関連死

(対処法) 本遺伝子治療実施計画では規定しないが、医師の判断による適切な予防投薬等の徹底した予防策を実施し、早期発見により早期治療を行う。

▷原疾患の再発

(対処法) 本遺伝子治療臨床研究を中止し、以降の治療については規定しない。

・遺伝子導入 T リンパ球 Add-back に伴う被験者への危険性

▷投与時に被験者に発熱、悪寒、筋痛等を認めることがある。

(対処法) 鎮痛解熱剤等の適切な薬剤にて対処する。

▷重篤なアレルギー反応を認めることがある。

(対処法) 輸注速度を遅くし、経過観察を行う。

▷重症の GVHD を発症することがある。

(対処法)「実施計画 6. 遺伝子治療臨床研究の実施方法 ②遺伝子導入方法、遺伝子導入 T リンパ球の追加輸注(Add-back)等・遺伝子導入 T リンパ球の Add-back GVHD 発症時の対応」の記載に従う。

・**ガンシクロビル(GCV)製剤投与に伴う被験者への危険性**

遺伝子導入 T リンパ球を輸注した被験者における GVHD 発症に対する治療に使用される用量(10 mg/kg/日)は、CMV 感染に対する治療に使用される用量であり、腎機能に障害がある場合にはその程度に応じて適宜減量する。GCV 製剤の使用には、骨髄抑制、消化管障害、腎機能障害等の副作用を伴う可能性があるため、じょうぶな観察を行い、減量若しくは投与を中止する等の適切な処置を講じる。

・**RCR の危険性**

本臨床研究においては RCR が出現する可能性は極めて低いが、出現した場合、悪性リンパ腫を発症する可能性も否定できないので、被験者の経過を注意深く観察して対処するものとする。

⑥遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

安全性、免疫系再構築、GCV 製剤投与による GVHD 沈黙化能等に関する検査・観察スケジュールは、別表に定めた「②臨床研究実施スケジュール(患者)」に記載の通りである。

本臨床研究の主たる評価は遺伝子導入 T リンパ球最終 Add-back 後 6 カ月までのデータによって行われるが、遺伝子導入 T リンパ球のクローナルな増殖、RCR 出現の可能性を完全には否定できないため、遺伝子治療を受けた被験者については臨床研究終了後も生存期間中にわたり、以下の項目について年 1 回のフォローアップを行う。

▷RCR 出現の有無

▷LAM-PCR による遺伝子導入 T リンパ球クローナリティーの解析

▷転播(原疾患評価、生死の別、最終転播確認日)

・**安全性の判定方法、基準**

安全性に関する判定に必要な検査・観察項目

▷臨床検査

▷有害事象

▷RCR

▷LAM-PCR

安全性に関する判定基準・評価方法

▷臨床検査については、検査値の異常及び異常変動を判定する。

臨床検査値の異常の判定は、国立がんセンター中央病院の基準範囲を逸脱した場合とする。

異常変動「有」の判定は、正常値→異常値、もしくは異常値→異常値の増強がみられた場合に、その臨床的意義を考慮して判断する。これに該当しない場合においても、その変動の臨床的意義を考慮した結果、異常変動「有」と判断された場合も含まれる。

▷開始時より終了時までの臨床研究期間中を通して発生した有害事象について、その症状、発現時期、程度、臨床研究継続・中止の別、処置の有無及び内容、遺伝子導入 T リンパ球輸注との因果関係、転播(回復した場合にはその回復日)を調査し、そのグレード及び遺伝子導入 T リンパ球 Add-back との因果関係を判定する。

有害事象のグレードは、2003 年米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE v3.0)～日本語訳 JCOG/JSCO 版-2004 年 10 月 27 日～」に従い、判定を行う。

因果関係は、被験者の状態、既往歴、合併症、併用薬、Add-back と有害事象発現の時間的關係及び Add-back 自体の影響等を考慮し、「関連あり・関連があるかもしれない・おそらく関連なし・関連なし」の 4 分類で判定する。

▷末梢血中の RCR を RT-PCR 法により測定する。

▷LAM-PCR については、遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティーを検討する。

・**免疫系再構築の判定方法、基準**

免疫系再構築の判定に必要な検査・観察項目

▷末梢血中の CD3 陽性リンパ球数

▷末梢血中のリンパ球の免疫表現型

▷末梢血の免疫回復の細胞生物学的解析及び分子生物学的解析

免疫系再構築に関する判定基準・評価方法

▷別表に定めた「②臨床研究実施スケジュール(患者)」に従い、免疫表現型に関する検査を行い、「GVHD 発症の有無に関係なく、2 回の連続した検査で CD3 陽性細胞数が 1 μl あたり 100 を超えるとき免疫再構築が達成されたと判定する。」という基準に従い、免疫系再構築の達成を評価する。

▷末梢血中のリンパ球の免疫表現型をヒトリンパ球マーカーに対する各種抗体(CD3、CD4、CD8、CD11c、CD56、CD123 等)を用いた FACS 解析により評価する。

▷細胞内サイトカインの測定、Pentamer 解析、T 細胞受容体レパトア解析、TREC 法を用いた解析等により評価する。

・GCV 製剤投与による GVHD 沈静化能の判定方法、基準

GCV 製剤による GVHD 沈静化能の判定に必要な検査・観察項目

▷GVHD 症状評価

▷GCV 製剤投与無効時の免疫抑制剤使用頻度

▷GVHD 発症組織における遺伝子導入 Tリンパ球の存在確認(実施可能な場合)

GCV 製剤による GVHD 沈静化能に関する判定基準・評価項目

▷GCV 製剤投与による GVHD 沈静化の評価を行う。

▷GVHD に対し GCV 製剤を投与したが、GVHD が改善せず免疫抑制剤を投与した場合を集計し、その頻度を検討する。

▷組織診断用の検体採取が可能な場合、組織切片を作製し、抗 LNGFR 抗体を用いた免疫染色により遺伝子導入 Tリンパ球の存在を確認する。もしくは、検体から DNA を抽出してリアルタイム PCR を用いてレトロウイルスベクター-SFCMM-3 に特異的な領域を測定することにより遺伝子導入 Tリンパ球の存在を確認する。

・臨床研究の中止判定基準

個々の被験者での中止

同意取得から前処置までの開始前: 以下の場合には、遺伝子導入ドナー Tリンパ球の Add-back を行わず、臨床研究を中止し、以降の治療については規定しない。

▷被験者あるいはドナーの同意が撤回された場合

▷被験者あるいはドナーが選択基準に合致していないことが判明した場合

▷被験者あるいはドナーが除外基準に抵触していることが判明した場合

▷症状が悪化し、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

▷有害事象発生のため、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

▷その他、臨床研究の実施が適当でないと総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

前処置開始後から遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 前: 以下の場合には、臨床研究を中止し、以降の治療については規定しない。

▷被験者の同意が撤回された場合

▷重篤な CMV 感染症が発症し、GCV 製剤を投与するに至った時

▷移植した末梢血幹細胞の生着が確認できない場合

▷初回の遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back より前に、治療を必要とする GVHD が発症した場合

▷有害事象発生のため、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

▷症状が悪化し、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

▷その他、臨床研究の実施が適当でないと総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 後: 以下の場合には、臨床研究を中止し、以降の治療については規定しない。

▷被験者の同意が撤回された場合

▷重篤な GVHD が発症し、免疫抑制剤を投与するに至った時

▷重篤な CMV 感染症が発症し、GCV 製剤を投与するに至った時

- ▷RCRの出現が認められた時
- ▷有害事象発生のため、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合
- ▷症状が悪化し、臨床研究の実施が困難と総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合
- ▷その他、臨床研究の実施が適当でないと総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が判断した場合

臨床研究全体の中止

以下に該当する被験者の安全性に重大な影響を及ぼし、臨床研究の実施に影響を与え、又は臨床研究継続に関する遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を変更する可能性がある情報を得た場合は、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会に意見を求め、その提言を参考にして分担研究者と協議し、本臨床研究の中止を決定することができる。

- ▷最初の5例の遺伝子治療実施例に、免疫系再構築を確認できた症例がなかった旨の情報
- ▷最終 Add-back 後6ヵ月以内の被験者の死亡に関する情報
- ▷重篤な有害事象に関する情報
- ▷遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back との因果関係を否定できない grade IV以上の有害事象(副作用)に関する情報
- ▷遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 後の GCV 製剤投与により沈静化できない GVHD 発症例に関する情報
- ▷その他、総括責任者並びに分担研究者が中止すべきと判断する情報

⑦重篤な有害事象が発現した場合の措置

臨床研究との因果関係の有無に関わらず、重篤な有害事象が発現した場合は、適切な処置を行うとともに、国立がんセンター中央病院の規定に従い、国立がんセンター総長に報告する。国立がんセンター総長はその旨を速やかに厚生労働省に報告する。

⑧症例記録に関する記録用紙等の様式

カルテとは別に本臨床研究専用の症例報告書を作成する。

⑨記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は、国立がんセンター総長が指名した保管責任者が適切に行う。

成績の公表は、ドナー・被験者本人の同意のもと、研究者全員の合意を得て行う。公表の際には、被験者のプライバシーにじゅうぶんに配慮し、個人情報が入り込まないよう必要な措置を行う。

⑩個人情報の保護の徹底

・個人情報保護に関する責務

国立がんセンターの保有する個人情報の適切な管理のために必要な措置について定めた国立がんセンター保有個人情報管理規程に従い、保有する個人情報の漏洩、毀損などを防止し、適正な管理を図る。

・個人情報の取得と利用に関する制限

▷診療・研究機関としての国立がんセンター中央病院における一般的な取扱い

国立がんセンター中央病院は、社会的な使命の実現に向けて、一般的な診療行為等に関する限定された目的に限り、患者の個人情報を使用する。

▷その他本遺伝子治療臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取扱い

本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取扱いについては、総括責任者はあらかじめ被験者の個人情報の利用を公開している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者等に通知し、又は公表しなければならない。

特別の目的で使用する場合は、事前に被験者に再度説明し了解を得てから使用する。

また、本臨床研究の成績などを公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。

・個人情報保護に関する安全管理措置

国立がんセンター総長は国立がんセンター保有個人情報管理規程に従い、個人情報保

	<p>議に関して、組織的に安全管理措置を実施し、個人情報漏洩、滅失又は棄損の防止に関する措置を講じている。さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報をも生存する個人と同様に死者に関する個人情報についても同様の管理下で取り扱う。</p> <p>▷外部共同研究者が閲覧可能なデータ 遺伝子導入 T リンパ球の安全性や機能に関する客観的な記録を外部共同研究者が閲覧することを可能とするが、遺伝子導入用レトロウイルスベクター-SFCMM-3 及び遺伝子導入 T リンパ球の調製に限定されたものであり、本臨床研究のデータの客観的かつ公正な記録はその意向に影響を受けることはない。 閲覧目的を限定した上で外部共同研究者がデータを閲覧する場合でも、治験と同様に被験者識別コードを用いることにより、個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。</p> <p>▷第三者提供の制限 総括責任者は、あらかじめ被験者等の同意を得ないで個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、外部共同研究者が個人情報を保護した上で一部データの閲覧を行う予定であるが、あらかじめ、その旨を被験者等に通知し同意を得る。</p> <p>▷個人情報の開示、訂正、利用停止等 本臨床研究においては、「臨床研究実施機関の名称」、「個人情報の利用目的」、「苦情の申出先」について同意説明文書に明記した。また、「個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き」については、それらの手続きができることを同意説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を国立がんセンター個人情報開示等取扱規程に従い、被験者に説明する。</p>
備考	<p>1. 本遺伝子治療臨床研究実施計画については、平成 18 年 8 月 15 日から国立がんセンター遺伝子治療臨床研究審査委員会で慎重な審議がなされ、その科学的および倫理的妥当性について平成 19 年 3 月 30 日付けで承認されている。</p> <p>2. 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果 国立がんセンター中央病院 11 階に設置された P2 レベル、クラス 10,000 の無菌細胞調整施設において、3 バッチの HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の試験調製を行った。閉鎖系での作業が可能な工程については閉鎖系で行い、それ以外の作業は無菌細胞調整施設内に設置したクラス II 安全キャビネット内で行った。 品質試験結果は、3 バッチとも、あらかじめ定めた規格に合格するものであった。</p> <p>3. 当該遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況 HSV-TK 遺伝子及び ΔLNGFR 遺伝子を含むレトロウイルスベクターで遺伝子導入されたヒト T リンパ球を用いた、造血器悪性腫瘍に対する臨床研究・治験としては、イタリアで 2 件の臨床研究、イタリアで 1 件の治験、日本で 1 件の臨床研究、及びイタリアで 1 件の治験(モルメド社の臨床第 I / II 相試験)が実施されている。 イタリアの DL1 としての臨床研究では、遺伝子治療を受けた患者 23 例中、解析可能な患者が 17 例あり、その内 3 例に Grade II 以上の急性 GVHD が発症し、1 例に慢性 GVHD が発症した。これら 4 例に GCV が投与され、急性 GVHD の 3 例では完全な沈静化が認められ、慢性 GVHD の 1 例では部分的な沈静化が認められた。造血器悪性腫瘍に対する治療効果としては、解析可能であった 17 例中、完全寛解は 6 例、部分寛解は 5 例であった。 イタリアの add-back としての臨床研究では、8 例の患者に造血幹細胞移植後、Add-back にて漸増用量で遺伝子導入リンパ球が輸注された。1 × 10⁷ 個/kg の HSV-TK 遺伝子導入ドナーリンパ球を投与された 1 例に急性 GVHD が発症し、GCV の投与により GVHD の症状は完全に沈静化された。Add-back による免疫系再構築に有効な遺伝子導入リンパ球の用量としては、1 × 10⁷ 個/kg が有望であることが示された。 日本での臨床研究としては、筑波大学附属病院での DL1 としての臨床研究が実施されており、9 例の症例に対して遺伝子導入細胞が調製され、5 例に計 8 回の遺伝子導入細胞の投与が行われた(3 例では 2 回投与)。このうち 1 例で急性 GVHD を発症し、GCV を投与することによって末梢血中の遺伝子導入リンパ球は減少して GVHD は沈静化した。</p>

原疾患の進行により GCV 投与後 38 日に死亡した。残り 4 例は、遺伝子治療実施から約 4 ヶ月～2 年の時点でいずれも生存中である。

モルメド社の臨床第 I / II 相試験では、登録患者 29 例の内 17 例に遺伝子導入 T リンパ球が Add-back され、その 14 例に免疫系再構築が確認された。また、14 例中 6 例に Add-back 後の急性 GVHD が発症したが、その内の 5 例に GCV 製剤が投与されいずれも GVHD 症状が完全に沈静化した。登録された患者は高リスク造血器悪性腫瘍患者にもかかわらず、Add-back を受けた 17 例中 7 例に再発を認めたに過ぎなかった。免疫系再構築に至った 14 例では、その後の感染症エピソード及び治療関連死が極端に少なくなっており、特に CMV 感染による死亡例は、評価対象 16 例中わずか 1 例であった。以上より、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の Add-back により、早期免疫系再構築を促進し、移植後の感染死を含む治療関連死を予防し、全体としての生存率を上げることが確認された。

これらの臨床研究・治験の結果から、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入したヒト T リンパ球について、ヒト体内において遺伝子治療に関連する重篤な副作用報告はなく、その免疫機能により発症した GVHD 症状は、HSV-TK の自殺機能により期待通り沈静化している状況である。

モルメド社の臨床第 I / II 相試験実施計画と本臨床研究実施計画は類似するものである。主要評価項目及び副次的評価項目に含まれる項目はほぼ同様であるが、安全性については本臨床研究では主要評価項目であるのに対し、モルメド社の臨床第 I / II 相試験では副次的評価項目である。これに関連して、本臨床研究では治療効果を期待しつつ安全性の評価を行うことを目的とするために、IL-2 を併用することなく、短期間により多くの遺伝子導入リンパ球を Add-back する用法・用量とした。その他、適格性確認の時点、再発時の対応等に相違があるが、評価に大きな影響を及ぼすものではなく計画全体としてはほぼ同様であると考えられる。一方で、筑波大学附属病院の臨床研究とは同一の遺伝子ベクターを用いるという点を除いて対象・治療法が大きく異なり、計画全体としては類似するものではない。

モルメド社の臨床第 I / II 相試験実施計画との主な異同

	モルメド社の 臨床第 I / II 相試験	本遺伝子治療
遺伝子ベクター	● モルメド社由来 SFCMM-3	● モルメド社由来 SFCMM-3
細胞調製法	● 遠心法による遺伝子導入 ● 培養期間が 10 日間	● 遠心法による遺伝子導入 ● 培養期間が 10 日間
対象疾患	● 移植が適応となる高リスク白血病	● 移植が適応となる高リスク白血病
実施期間	● 当初計画では 2 年間	● 3 年間
目標症例数	● 18 症例	● 10 症例
治療概要	● ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去移植 42 日後に遺伝子導入リンパ球を Add-back する療法	● ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去移植 42 日後に遺伝子導入リンパ球を Add-back する療法
用法・用量	● 1×10^6 /kg (Day 42) → 1×10^7 /kg (Day 72) → 1×10^6 /kg + IL-2 (Day 102) → 1×10^7 /kg + IL-2 (Day 132) の 4 回の Add-back	● 1×10^6 /kg (Day 42) → 1×10^7 /kg (Day 72) → 1×10^7 /kg (Day 102) の 3 回の Add-back
主要評価項目	● 免疫系再構築 ● GCV 製剤投与による GVHD 沈静化	● 安全性 ● 免疫系再構築 ● GCV 製剤投与による GVHD 沈

	<ul style="list-style-type: none"> ● GVL 効果 ● (安全性は副次的評価項目) 	静化
GVHD 対応	<ul style="list-style-type: none"> ● GCV を 14 日間点滴静注 	<ul style="list-style-type: none"> ● GCV を 7~14 日間点滴静注

4. 類似の遺伝子治療臨床研究の成果
 HSV-TK 遺伝子を含むレトロウイルスベクター(ΔLNGFR を含まず)により遺伝子導入されたTリンパ球を用いた造血器悪性腫瘍に対する臨床研究・治験としては、フランスで1件の臨床研究、ドイツで1件の臨床研究、アメリカで2件の臨床研究について、学術論文が発表されている。
 これらの結果から、HSV-TK の自殺機能による遺伝子導入リンパ球の消失及び GVHD の沈静化が確認されている。

5. 本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

①「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日)

②「臨床研究に関する倫理指針」
 (厚生労働省告示第四百五十九号、平成 16 年 12 月 28 日)

③「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」
 (薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月 19 日)

④「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」
 (薬発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)

⑤「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」
 (医薬発第 329004 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成 14 年 3 月 29 日)

⑥「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」
 (平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)

⑦行政機関の保有する個人情報の保護に関する法律
 (平成 15 年 5 月 30 日法律第 58 号)

⑧厚生労働省保有個人情報管理規程
 (平成 17 年 3 月 23 日厚生労働省訓令第 3 号)

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この申請書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は黒・インクを用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙()のとおり」と記載し、別紙を送付すること。
5. 備考欄には、「第4その他」に掲げる各種指針への適合状況等、特記すべき事項について記載すること。
6. 大学等にあつては、この申請書の写しを文部科学大臣にも送付すること。

②臨床研究実施スケジュール(患者)

	幹細胞移植前			幹細胞移植日	幹細胞移植後 (移植日を0として)				最終 Add-back ¹ 後 (最終 Add-back ¹ 日を0として)								患者生存期間中	
	仮登録時以前	本登録時以前	本登録後	0	42日以前	42日	72日	102日	1週	2週	3週	4週	6週	10週	14週	18週	24週	1年毎
同意取得	○																	
仮登録	○																	
本登録		○																
患者背景	○																	
自覚症状・他覚所見 (PS 等)	○	○		○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液学的検査	○	○		○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液生化学的検査	○	○		○	○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫学的検査	○	○							○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○	○			○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿定性		○			○							○	○	○	○	○	○	○
カテチン・グリタム		○																
動脈血液中酸素飽和度	○	○																
心電図	○	○																
心口-	○	○																
胸部 X 線検査	○	○																
原疾患に関する検査・観察	○	○							4週に1回、中止あるいは終了時他、治療上で必要な時期									
移植前処置			○															
造血幹細胞移植				○														
遺伝子導入 T リンパ球 Add-back						○	○	○										
輸血・併用療法状況確認					実施期間を通して確認													
ROR									○			○		○				○
LAM-PCR ²												○	○	○	○	○	○	○
免疫系再構築の判定に関する検査・観察					○	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GVHD 評価 ⁶					○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
GVHD 発症組織の遺伝子導入 T リンパ球の存在確認					GVHD 発症時、GCV 製剤投与前、4日後、終了あるいは中止の翌日													
血中遺伝子導入 T リンパ球比率測定					○				○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
有害事象					実施期間を通して確認													

- 1: 診察日時点から見て最終(直近)の遺伝子導入 T リンパ球の Add-back をさし、初回あるいは 2 回目の Add-back が最終(直近)の場合にも上記スケジュールに従う
 - 2: 造血の確認(生着)が確認されるまでの毎日と造血幹細胞移植後 30 日から 40 日の間に 1 回
 - 3: 造血の確認(生着)が確認されるまでは週3回と造血幹細胞移植後 30 日から 40 日の間に 1 回
 - 4: 造血幹細胞移植後 30 日から 40 日の間に 1 回
 - 5: 検査検体採取を行う。検査実施は必要時
 - 6: GVHD 発症時等、必要時にはスケジュールに定められた以外でも実施する
 - 7: 最終 Add-back 後、1~3 日の間に 1 回
- ・ 造血幹細胞移植は臨床研究実施スケジュールに定められた日から 7 日以内に実施する。
 - ・ 最終 Add-back 後の検査・観察は定められた週のいずれかの日に実施する。

ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去
造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入
T リンパ球 “Add-back” 療法

遺伝子治療臨床研究実施計画書

国立がんセンター

中央病院

作成年月日：平成 21 年 2 月 日

版 番 号：4.7

記号・略号一覧表

記号・略号	一般名等
ACV	aciclovir (アシクロビル)
Add-back	(追加輸注)
ALL	acute lymphoblastic leukemia (急性リンパ性白血病)
AML	acute myelogenous leukemia (急性骨髄性白血病)
CMV	cytomegalovirus (サイトメガロウイルス)
CTL	cytotoxic T lymphocyte (細胞傷害性T細胞)
ΔLNGFR	truncated low-affinity nerve growth factor receptor (細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体)
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor (顆粒球コロニー刺激因子)
GCV	ganciclovir (ガンシクロビル)
GVHD	graft-versus-host disease (移植片対宿主病)
GVL	graft-versus-leukemia (移植片対白血病作用)
GVM	graft-versus-malignancy (移植片対悪性腫瘍)
HLA	human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
HSV-TK	herpes simplex virus 1-thymidine kinase (単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ)
LAM	linear amplification-mediated PCR
LNGFR	human low affinity nerve growth factor receptor (ヒト低親和性神経成長因子受容体)
LTR	long terminal repeat (末端反復配列)
MCB	master cell bank (マスターセルバンク)
MoMLV	Molony murine leukemia virus (モロニーマウス白血病ウイルス)
NGF	nerve growth factor (神経成長因子)
OKT3	Orthoclone OKT3 (オルソクローン OKT3:抗 CD3 抗体)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PBSC	peripheral blood stem cell (末梢血幹細胞)
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
RCR	replication competent retrovirus (増殖性レトロウイルス)
rhIL-2	recombinant human interleukin 2 (組換えヒトインターロイキン2)
WCB	working cell bank (ワーキングセルバンク)

目 次

	頁
I. 遺伝子治療臨床研究の名称	6
II. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	7
II.1 総括責任者の氏名	7
II.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割	7
III. 実施施設の名称及びその所在地	8
IV. 遺伝子治療臨床研究の目的	9
V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	12
V.1 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合	12
V.1.1 対象疾患に関する現時点での知見	12
V.1.2 当該遺伝子治療臨床研究の概要	35
V.1.3 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	39
VI. 遺伝子の種類及びその導入方法	43
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	43
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造	43
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	49
VI.1.3 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性	49
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	50
VI.3 標識細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由	50
VI.4 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由	50
VI.4.1 遺伝子導入方法の概略	50
VI.4.2 当該導入法を選択した理由	50
VI.4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠	51
VI.5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	51
VI.5.1 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響	51
VI.5.2 ウイルスベクターの作製方法	52
VI.5.3 ウイルスベクターの構造	55
VI.5.4 ウイルスベクターの生物学的特徴	60
VII. 安全性についての評価	61
VII.1 遺伝子導入方法の安全性	61
VII.1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	61
VII.1.2 患者に投与する物質の純度及びその安全性	63

VII. 1. 3 増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の可能性	64
VII. 1. 4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	68
VII. 1. 5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	68
VII. 1. 6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	69
VII. 1. 7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	69
VII. 1. 8 がん原性の有無	69
VII. 2 遺伝子産物の安全性	70
VII. 2. 1 HSV-TK 遺伝子の異常発現	70
VII. 2. 2 HSV-TK/GCV 自殺システムの臨床実績	71
VII. 2. 3 ΔLNGFR 遺伝子の異常発現	72
VII. 3 細胞の安全性	72
VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法	72
VII. 3. 2 培養細胞の純度	74
VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	74
VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性	75
VIII. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	77
IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	79
IX. 1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	79
IX. 1. 1 本研究の実施に際し国立がんセンター中央病院に設置される委員会・事務局	79
IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順	80
IX. 2 ドナー・被験者の選択基準及び除外基準	84
IX. 2. 1 ドナーの選択基準及び除外基準	84
IX. 2. 2 被験者の選択基準及び除外基準	85
IX. 3 登録	88
IX. 3. 1 ドナーの登録	88
IX. 3. 2 被験者の仮登録	89
IX. 3. 3 被験者の本登録	89
IX. 4 ドナー・被験者に対する説明及びその同意の取得方法	89
IX. 4. 1 被験者に対する説明及びその同意の取得方法	89
IX. 4. 2 ドナーに対する説明及びその同意の取得方法	90
IX. 4. 3 ドナー・被験者に対する説明の体制	90
IX. 5 実施期間及び目標症例数	91
IX. 6 遺伝子治療臨床研究の実施方法	91
IX. 6. 1 対照群の設定方法	91

IX. 6. 2 遺伝子導入方法、遺伝子導入 T リンパ球の追加輸注 (Add-back) 等	91
IX. 6. 3 前処置及び併用療法の有無	95
IX. 6. 4 臨床検査項目及び観察項目	99
IX. 6. 5 予測される副作用及びその対処方法	102
IX. 6. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	104
IX. 6. 7 重篤な有害事象が発現した場合の措置	111
IX. 6. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式	111
IX. 6. 9 記録の保存及び成績の公表の方法	111
IX. 6. 10 個人情報の保護の徹底	112
X. 用語説明	116
XI. その他の必要な事項	119
XI. 1 遵守する法令／省令など	119
XI. 2 引用文献	120
XI. 3 臨床研究実施スケジュール	127
XI. 4 Performance Status の Grade と判定基準	130
XI. 5 急性 GVHD の Grade	131
XI. 6 急性 GVHD の治療効果判定基準	132
XI. 7 同意説明文書及び同意文書 (被験者用)	135
XI. 8 同意説明文書及び同意文書 (ドナー用)	172

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法

II. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

II.1 総括責任者の氏名

平家勇司

国立がんセンター中央病院・薬物療法部・幹細胞移植療法室・医長

遺伝子治療臨床研究に関する資料・情報の収集、遺伝子治療臨床研究の科学的妥当性・倫理性の検討、実験計画の作成及び国立がんセンター総長への提出、遺伝子治療臨床研究の適正実施の確認、遺伝子治療臨床研究の開始・終了・予期せぬ事態等の国立がんセンター総長及び遺伝子治療臨床研究審査委員会への説明/報告等

II.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

表1 総括責任者以外の研究者・協力者と役割分担

	氏名	所属	役職	役割分担
分担研究者	吉田輝彦	国立がんセンター研究所 ・腫瘍ゲノム解析・情報研究部	部長	遺伝子導入細胞製剤の製造管理責任者
	青木一教	国立がんセンター研究所 ・がん宿主免疫研究室	室長	遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者
	高上洋一	国立がんセンター中央病院 ・薬物療法部	薬物療法部長	臨床効果の評価
	飛内賢正	国立がんセンター中央病院 ・第一領域外来部	第一領域外来部長	臨床効果の評価
	森慎一郎	国立がんセンター中央病院 ・臨床検査部	細菌検査室医長	投与患者の診療
	金成元	国立がんセンター中央病院 ・特殊病棟部	13B病棟医師	投与患者の診療
	福田隆浩	国立がんセンター中央病院 ・特殊病棟部	12B病棟医長	投与患者の診療
	田野崎隆二	国立がんセンター中央病院 ・臨床検査部	輸血管理室医長	投与患者の診療
外部共同研究者	峰野純一	タカラバイオ株式会社 ・細胞・遺伝子治療センター	センター長	遺伝子導入用レトロウイルスベクターSFCMM-3に関する基礎的助言及び遺伝子導入Tリンパ球調製技術の提供と助言

Ⅲ. 実施施設の名称及びその所在地

名称：国立がんセンター 中央病院

所在地：東京都中央区築地五丁目1番1号

TEL：03-3542-2511 FAX：03-3547-5228

IV. 遺伝子治療臨床研究の目的

本遺伝子治療臨床研究は、高リスク造血器悪性腫瘍患者に対して、ヒト白血球抗原 (human leukocyte antigen: HLA) ハプロタイプ¹一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞の移植を施行した後、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いて単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ (herpes simplex virus 1-thymidine kinase: HSV-TK) 遺伝子を導入した同一ドナー由来の T リンパ球を追加輸注 (Add-back²) する治療法の全体としての安全性及び有効性について検討することを目的とする。

早期に移植治療を必要とする高リスク造血器悪性腫瘍患者にとり、HLA 適合血縁ドナーが存在せず、バンクからの HLA 適合非血縁ドナーが存在しない、あるいはドナー検索にかかる時間的余裕が無い場合、ハプロタイプ一致 (HLA 2~3 座不一致) 血縁ドナーから移植を行うことが有効である。

しかしながら、HLA ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞の移植 (ミスマッチ移植) を行う上では、以下の 2 つの大きなバリアーにより、現時点、ミスマッチ移植は普及するに至っておらず、これらのバリアーの克服が課題となっている。

- 1) 拒絶頻度が高いこと (宿主対移植片方向のミスマッチ移植のバリアー)
- 2) 生着が得られたとしても、その後、重度の移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: GVHD) が発症すること (移植片対宿主方向のミスマッチ移植のバリアー)

バリアー 1) に対しては、前処置により宿主側のリンパ球をある程度減少又は抑制させた上で、十分量の造血幹細胞を移植することにより、移植片に対する拒絶の頻度を減少させ、移植片の生着が得られることが周知となってきた。

本臨床研究においても、同様の手法を用いることを予定しており、その効果を検討することとなる。

バリアー 2) に対しては、ミスマッチ移植に用いる移植片から T 細胞を除去 (CD34 陽性細胞選択) することにより、GVHD 発症頻度を減少させる試みがなされてきたが、これに伴い易感染性と再発の回避が、新たな課題として発生した。

本臨床研究では、T 細胞除去したハプロタイプ一致ドナー由来の造血幹細胞を移植し、その後の早期免疫系再構築と移植片対悪性腫瘍作用 (graft-versus-malignancy: GVM) 効果を期待した T リンパ球の追加輸注 (Add-back) を実施することで、これらの課題の克服を企図している。その際、この T リンパ球の Add-back に伴う重度又は致死的な GVHD の発症が懸念されることから、GVHD 発症時に T リンパ球の制御が可能なように、自殺遺伝子である HSV-TK 遺伝子を導入した遺伝子導入 T リンパ球を用いた Add-back を計画している。

すなわち、本臨床研究の操作ステップは、大きく以下のとおりとなる (図 1 参照)。

① ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植(T細胞除去ミスマッチ移植)

ドナーに顆粒球コロニー刺激因子 (granulocyte colony-stimulating factor: G-CSF) を投与して造血幹細胞を末梢血に動員し (mobilize)、造血幹細胞を含む末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) 画分を採取する。細胞分離装置により PBMC 画分からT細胞を除去してCD34陽性細胞を純化し、これを化学療法剤等による前処置後の対象患者に移植 (T細胞除去ミスマッチ移植) する。

② HSV-TK 遺伝子導入細胞の調製

同一ドナー由来Tリンパ球を採取し、これに自殺遺伝子としてのHSV-TK 遺伝子及び細胞表面マーカー遺伝子としての細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (truncated low-affinity nerve growth factor receptor: ΔLNGFR) 遺伝子をレトロウイルスベクター⁴³により導入し、ex vivo で拡大培養して遺伝子導入細胞を調製する。

③ HSV-TK 遺伝子導入Tリンパ球の Add-back

T細胞除去ミスマッチ移植した造血幹細胞が生着した時点以降で、遺伝子導入Tリンパ球を大量に Add-back する。

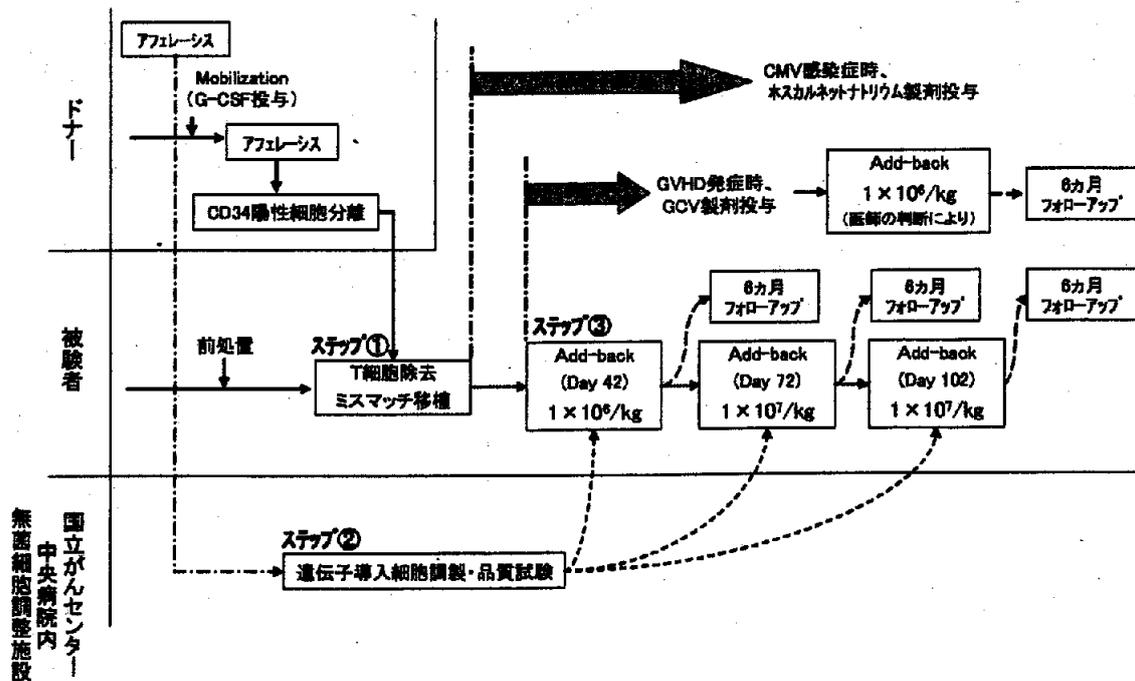


図1 本遺伝子治療臨床研究の全体計画フロー (プロトコール概要)

本臨床研究は、上記3ステップによる「HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の Add-back 療法を含む新規ミスマッチ移植法の確立」を最終的な目的とする。そのために、治療法全体としての安全性の評価のほか、ステップ③「HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の Add-back」における T リンパ球の Add-back による T 細胞除去ミスマッチ移植を受けた患者の早期の免疫系再構築、免疫系再構築により感染症等の治療関連有害事象が予防又は軽減できるか否か、また疾患再発・増悪を阻止できるか否かの評価を目的とする。また、もし遺伝子導入 T リンパ球の Add-back により重篤な GVHD が発症した場合には、ガンシクロビル (ganciclovir: GCV) 製剤を投与することにより、HSV-TK 遺伝子の自殺機能を発揮させ、当該細胞の選択的な抹消により GVHD 症状が沈静化できるか否かを評価することも目的とする。

<主要エンドポイント>

- ・ 「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法」の安全性
- ・ HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 後の免疫系再構築並びに GVHD 発症頻度及び制御能

<副次的エンドポイント>

- ・ 「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法」における感染症頻度、無病生存率、及び全般生存率

V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

V.1 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合

V.1.1 対象疾患に関する現時点での知見

【造血器悪性腫瘍患者に対する造血幹細胞移植の現状】

造血器悪性腫瘍の治療成績が、造血幹細胞移植の普及により格段に向上したことは周知であり、特に、HLA が適合した血縁者間での造血幹細胞移植は、既に確立した治療手段となっている。しかし、2人の兄弟姉妹間でHLA が一致する確率は1/4であり、患者の他に2人の兄弟姉妹が存在するとしても、約60%の患者は血縁者にHLA 適合ドナーが存在しない。このような場合、先ずは、骨髄バンクを介して、HLA が適合又は1座不適合の非血縁者ドナーを探すこととなる。日本骨髄バンク (<http://www.jmdp.or.jp/index.html>) は、全米骨髄バンク (NMDP)、台湾骨髄バンク (BTCSCC)、韓国骨髄バンク (KMDP) と相互検索を提携して、HLA 1座不適合までのドナーを高い確率で見出すシステムを充実させてきたが、非血縁ドナーが存在しない可能性、及びドナーコーディネートのものに時間を要するという最大の問題がある。実際、日本骨髄バンクの患者登録者のうち、約8割にドナー候補が見出せるが移植がなされているのは半数以下であるのが現状である(上記ホームページ、日本骨髄バンクニュース vol 26)。更に今後、本邦での少子高齢化は深刻であり、移植を急ぐ患者にとっては、早急に造血幹細胞を調達できる移植システムのニーズがますます高まっている。

このニーズに対しては、臍帯血由来の造血幹細胞移植(臍帯血移植)とハプロタイプ一致血縁ドナー由来造血幹細胞移植(ミスマッチ移植)の大きく2つの方策が検討されてきた。

【本邦における成人に対する臍帯血移植の現状】

1988年 Gluckman らが Fanconi 貧血患者に対する HLA 一致同胞間臍帯血移植に成功して以来(1)、臍帯血移植は、骨髄移植、末梢血幹細胞移植に次ぐ第3の造血幹細胞移植として1990年代に臨床応用が開始された。わが国においては、1994年に最初の同胞間臍帯血移植が東海大学で行われ(2)、以来2004年までに45例の同胞間臍帯血移植が実施された(3)。非血縁者間の臍帯血移植は1997年に神奈川県臍帯血バンクを通じて実施され、緊急的移植にも迅速に対応可能であること、ドナーの負担がないこと、HLA 2座不一致まで移植可能であること等の利点があり、増加の一途を辿っている。1997年以降、当初の数年は小児における移植が大半を占めていたが、2002年以降は成人における移植件数が小児のそれを上回るようになった。50歳以上の高齢者における移植は2003年を境に急増している(図2)。

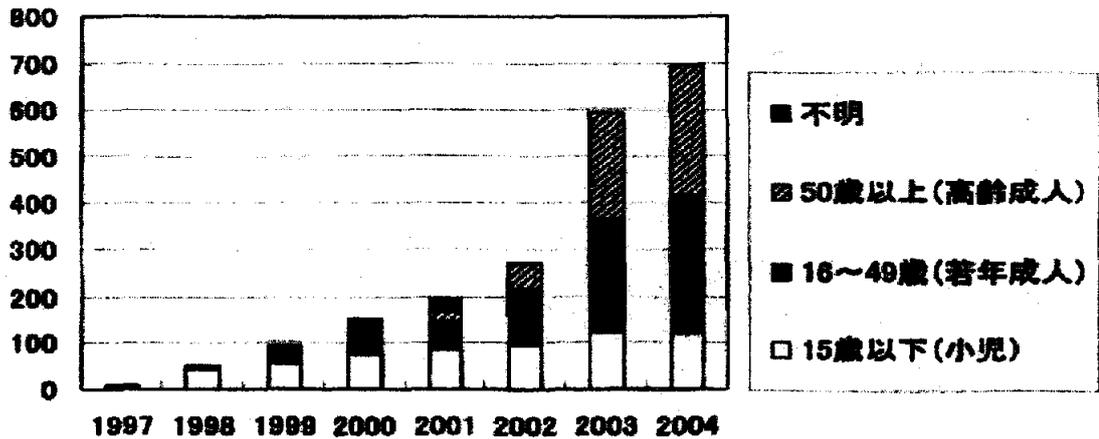


図2 わが国における非血縁者間臍帯血移植の年齢別実施数
(日本さい帯血バンクネットワークホームページより)

【当施設における臍帯血移植の経験】

国立がんセンター中央病院では、厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療研究事業（斎藤班および高上班）の援助を受け、2003年8月1日より「RIST0304 非血縁者間臍帯血移植の安全性の検討 リン酸フルダラビン、ブスルファン、全身放射線照射併用多施設共同臨床研究」を行った。左記研究においては6症例の登録を行ったが、生着前の高熱など予想しなかった合併症が現れたため、多施設で行う前に解決すべき問題点があると判断し、2004年8月31日に多施設共同研究を中止した。その治療経験を元に2005年6月1日から厚生科学研究ヒトゲノム・再生医療研究事業（斎藤班および高上班）並びに厚生労働省科学研究効果的医療技術の確立推進臨床研究事業（谷口班）の支援を受け、「RICBT0501 非血縁者間臍帯血移植の安全性の検討 リン酸フルダラビン、ブスルファン、全身放射線照射併用2施設共同臨床研究」を開始し現在に至っており、臍帯血移植においても着実に経験を蓄積している。

【日米欧から報告された成人に対する臍帯血移植の成績】

15頁の表2に今までに報告された日米欧の多施設あるいは単施設からの成人に対する臍帯血移植の成績を記す(4-7)。

多くがハイリスク造血器悪性腫瘍例に対して行われ、ごく一部のHLA一致例を除いてはほとんどの症例で2抗原以上の不一致移植である。前処置は施設毎、疾患毎にさまざまであるが、GVHD予防はシクロスポリン+プレドニゾロン、シクロスポリン+メソトレキサートの2剤で行われる場合が多かった。移植された有核細胞数は、中央値で $1.5\sim 2.47 \times 10^7/\text{kg}$ であった。4つの報告の患者背景はそれぞれに異なっているが、早期死亡率は4~14%、28あるいは42日以上生存した症例の好中球生着率は85~100%であり、好中球が $500/\mu\text{l}$ 以上に到達するのに中央値で22~27日を要している。血小板が $20,000/\mu\text{l}$ 以上に到達した症

例は 33～81%であり、中央値で 48～84 日を要した。急性 GVHD に関しては、Ⅱ度以上の発症頻度は 40～70%であるが、Ⅲ度以上の発症頻度は 7～32%とほとんどの症例で 2 抗原以上の不一致移植であるにもかかわらず高くない。慢性 GVHD の発症頻度は 32～90%と報告毎に大きく異なるが、限局型が多くを占めているという特徴がある。再発率に関しては、観察期間が短いため、ハイリスク症例を対象としているにもかかわらず高くない。移植関連死亡率、長期生存率に関しては、東京大学医科学研究所附属病院からの報告 (7) が他に比べて極めて良好である。これらの報告の結果から、以下が明らかにされた。

- ・ 成人に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植においても、造血の再構築が得られること。
- ・ 発症する急性・慢性 GVHD は許容できるものであること。
- ・ ハイリスク患者を対象とした場合でも 10～20 数%の長期生存が得られること。
- ・ 患者の年齢・移植された CD34 陽性細胞数が成績に相関すること。
- ・ 移植後 100 日以内の早期死亡例では感染症や前処置関連毒性が多いこと。

表2 日米欧の成人臍帯血移植成績

報告者	Laughlin M, et al. (4)	Sanz G, et al. (5)	Long GD, et al. (6)	Takahashi S, et al. (7)
症例数	68 非悪性疾患 14 例、 造血器悪性腫瘍 54 例うちハリスカ 50 例	22 ハリスカ 16 例	57 1996 年以降、非悪 性疾患 2 例含む、 ハリスカ造血器腫瘍	68 41 例がハリスカ症例
年齢 (歳)	31.4 (17.6~58.1)	29 (18~46)	31 (18~58)	36 (16~53)
体重 (kg)	69.2 (40.9~115)	69.5 (41~85)	70 (46~110)	55.1 (36.2~76.2)
HLA 適合度	4/6 ≥ : 48 (71%)	6/6:1 5/6:13 4/6:8 4/6 ≥ : 8 (36%)	3/6:3 4/6:44 5/6:8 6/6:2 4/6 ≥ : 47 (82%)	2/6:2 3/6:15 4/6:37 5/6:14 4/6 ≥ : 54 (79%)
移植前処置	TBI を基本 ; 51 例 BU を基本 ; 14 例 その他 ; 3 例	TEPA/BU/CY/ATG : 21 例 TEPA/FLU/ATG ; 1 例	TBI + LPAM + ATG : 29 例 BU + LPAM + ATG : 17 例 BU + CY + ATG ; 2 例 TAI + CY + ATG ; 1 例 TBI + CY + ATG ; 8 例	TBI + AraC /G-CSF + CY ; 49 例 TBI + CY ; 12 例 TBI + α ; 7 例
GVHD 予防法	CSA/PSL CSA 単独	CSA/PSL	CSA/PSL	CSA/sMTX (65) CSA (3)
移植有核 細胞数 ($\times 10^7$ /kg)	1.6 (0.6~4.0)	1.71 (1.01~4.96)	1.50 (0.54~2.78)	2.47 (1.1~5.29)
移植 CD34 陽性細胞数 ($\times 10^5$ /kg)	1.2 (0.2~16.7)	0.79 (0.27~2.60)	1.37 (0.02~12.45)	記載なし
早期死亡 例数 (%)	8 (12.5%)	2 (9%)	8 (14%)	3 (4%)
好中球生着率 ($>0.5 \times 10^9$ /l) 到達日数	55/60 (92%)* 27 日 (13~59)	20/20 (100%)** 22 日 (13~59)	41/49 (84%)# 26 日 (12~55)	60/65 (92%)## 22 日 (16~41)
血小板生着率 ($>20 \times 10^9$ /l) 到達日数	30 (44%) 58 日 (35~142 日)	12 (55%) 69 日 (49~153 日)	19 (33%) 84 日 (35~167 日)	55 (81%) 48 日 (30~263 日)
急性 GVHD 発症例 /評価可能例 II-IV 度 (III-IV 度)	33/55:60% (11/55:20%)	16/22:73% (7/22:32%)	17/41:41% (8/41:20%)	30/60:50% (4/60:7%)
慢性 GVHD 発症例 /評価可能例	12/33	9/10	8/25	42/54
移植関連死	32 例が 3 ヶ月以内 に死亡	43% (100 日)	50% (100 日)	9% (1 年)
再発	4 例 ; 1 年以内 の再発	0%	記載なし	16% (2 年)
生存率	26% ; 40 ヶ月 (無イベント生存率)	53% ; 1 年 (無病生存率)	15% ; 3 年 (無イベント生存率) 19% ; 3 年 (粗生存率)	74% ; 2 年 (無病生存率)

* : 28 日以内の早期死亡 8 例を除く 60 例中 5 例が生着不全

** : 30 日以内の早期死亡 2 例を除く全例が生着

: 42 日以上生存した 49 例中 41 例に好中球生着

: 28 日以内の早期死亡 3 例を除く 65 例中 5 例が生着不全

2004年に発表された日本さい帯血バンクネットワーク・データ管理委員会による骨髓破壊的前処置で移植された成人悪性腫瘍例361例のPreliminaryな解析結果を表3に記す(8)。

表3 日本さい帯血バンクネットワークの成績(8)

症例数	361(初回移植例は329例)
年齢(歳)	36(16~60)
体重(kg)	55(23.5~95)
HLA適合度	4/6 \geq ;65%
移植有核細胞数($\times 10^7$ /kg)	2.51(1.15~6.0)
移植CD34陽性細胞数($\times 10^5$ /kg)	0.82(0.09~9.07)
早期死亡(%)	9
移植後90日の好中球($500/\mu\text{l}$ 以上)の予測回復率(%),到達日数	90(Kaplan-Meier法による),23日(11~48日)
移植後180日の血小板($50,000/\mu\text{l}$ 以上)の予測回復率(%),到達日数	81(Kaplan-Meier法による),46日(17~263日)
急性GVHD II度以上発症率(%)(III度以上発症率(%))	43(14)
慢性GVHD 発症例/評価可能例	69/212
移植関連死	38%(1年)
生存率	22%(標準リスク群;40%,ハイス群;15%);3年(無イベント生存率)

また、1997年の1例目から2005年10月末までに日本国内でさい帯血バンクを通じて移植が行われた2,600例以上のうち、調査票が報告された1,860例の移植成績が2006年1月に日本さい帯血バンクネットワーク移植データ管理委員会から発表された(9)。1,860例の内訳は小児例が663例、16歳以上の成人例が1,197例(50歳以上が全体の27%)、疾患別では、血液悪性疾患が大多数を占め、急性リンパ性および骨髄性白血病が全体の54%、続いて骨髄異形成症候群14%、悪性リンパ腫12%に施行されていた。その他、全体の5%以下であるが、成人T細胞性白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫と続いていた。骨髓破壊的前処置による急性白血病初回移植の移植後3年の無イベント生存率は初回寛解期移植、第2寛解期移植でそれぞれ40%、56%、非寛解期移植で18%であった(図3A)。また、骨髄異形成症候群に対する成績は良好で、長期生存率は約50%、そのうち標準危険群(不応性貧血、および白血病化後の初回寛解期)では79%、高度危険群(標準危険群以外の病期の移植)でも43%の無イベント生存率が得られている。(図3B)

臍帯血移植の成績については、学会を中心に追加集積が行われている。

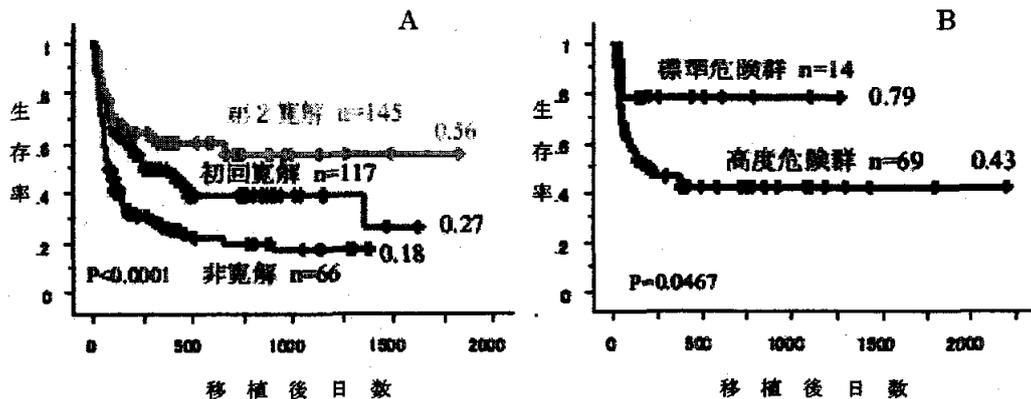


図3 骨髄破壊的前処置による成人臍帯血移植の成績
急性白血病 (A)、および骨髄異形成症候群 (B) における移植病期と無イベント生存率

【日米欧から報告された成人における非血縁者骨髄移植と非血縁者臍帯血移植の成績の比較】

表4に、2004年末に欧米及び本邦から報告された成人に対する非血縁臍帯血移植と非血縁者骨髄移植の治療成績の比較検討結果を示す(7, 10, 11)。欧州の報告(10)はEBMT(European Blood and Marrow Transplant Group)とEUROCORD、米国の報告(11)はIBMTR(International Bone Marrow Transplant Registry)とNew York Cord Blood Bankの共同による研究であり、本邦の報告(7)は東京大学医科学研究所附属病院単独の研究である。

欧米からの2つの報告の結果は以下のとおりで、類似していた。いずれの報告も、HLA一致ドナーが見つからない場合には、臍帯血は許容できる幹細胞ソースであると結論している。

- ・ 臍帯血移植を受けた患者は骨髄移植を受けた患者と比べて低年齢、低体重、高リスクが多かった。
- ・ 移植された有核細胞数は、骨髄移植を受けた患者よりも臍帯血移植を受けた患者のほうが少なかった。
- ・ II度以上の急性GVHDの発症頻度は、骨髄移植を受けた患者群に比べ臍帯血移植を受けた患者群で有意に低かった。
- ・ 好中球回復は、骨髄移植を受けた患者群に比べ臍帯血移植を受けた患者群で有意に遅かった。
- ・ 慢性GVHD発症頻度、治療関連死亡率、再発率、無再発生存率などは有意な差を認めなかった。

本邦からの報告は以下のとおりで、血縁者ドナーが存在しない場合には、臍帯血を第一の幹細胞ソースであると結論している。単一施設の結果としては極めて優れた成績であると評価されており、欧米からの報告とは異なっている。まとめると以下のとおりであった。

- ・ ドナー検索期間は、骨髄移植よりも臍帯血移植で圧倒的に短かった。
- ・ 移植された細胞数は臍帯血移植のほうが少なかった。
- ・ HLA の適合度は臍帯血移植のほうが低かった。
- ・ 免疫抑制剤を早期に中止、ステロイドの使用を控えたにも関わらず、臍帯血移植では GVHD による死亡はなかった。
- ・ 骨髄移植と比較すると臍帯血移植では有意に治療関連死が少なく、無病生存率が良好であった。

本邦からの東京大学医科学研究所附属病院の報告は、単一施設の成績としては極めて優れた成績であると評価されており、欧米からの報告とは異なっている。この点については、前処置、GVHD 予防・治療、感染症対策等種々の面からの検討が必要と考えられる。

表4 成人に対する非血縁臍帯血移植と骨髄移植の比較検討

報告者	Rocha V, et al. (10)		Laughlin M, et al. (11)			Takahashi S, et al. (7)	
移植種類; 症例数	臍帯血移植 ; 98	骨髄移植 ; 684	(a) 臍帯血 移植 ; 150	(b) HLA 1抗原 不一致 骨髄 移植 ; 83	(c) HLA 一致 骨髄 移植 ; 367	臍帯血移植 ; 68	骨髄移植 ; 45
年齢(歳)	24.5	32	NA	NA	NA	36	26
好中球生着率 ($>0.5 \times 10^9/l$)	75%# 26日	89% 19日	中央値 ; 27日	中央値 ; 20日	中央値 ; 18日	92%* 22日	100%* 18日
到達日数	(14~80)	(5~72)				(16~41)	(12~33)
p値	<0.001		<0.001			<0.01	
血小板生着率 ($>20 \times 10^9/l$)	NA	NA	中央値 ; 60日	中央値 ; 29日	中央値 ; 29日	90%** 40日	91%** 25日
到達日数						(13~99)	(10~172)
p値	-		<0.001			<0.01	
II-IV度 急性GVHD 発症例数	25	232	61	43	176	30/60	30/45
p値	0.02		(a) vs (c); 0.17 (a) vs (b); 0.04			0.05	
慢性GVHD 発症例数	18	94	35/69	17/43	86/243	42/54	26/35
p値	0.02		(a) vs (c); 0.02 (a) vs (b); 0.69			0.21	
移植関連死亡率 (%, 症例数)	44% (2年)	38% (2年)	95例	54例	169例	9% (1年)	29% (1年)
p値	0.13		(b) vs (c); <0.001 (a) vs (c); <0.001 (a) vs (b); 0.96			0.02	
再発率 (%, 症例数)	23% (2例)	23% (2例)	26例	12例	83例	16% (2年)	25% (2年)
p値	0.71		(b) vs (c); 0.61 (a) vs (c); 0.16 (a) vs (b); 0.65			0.73	
無病生存率 (%)	AML 32% ALL 34% (2年)	AML 42% ALL 33% (2年)	23% (3年)	19% (3年)	33% (3年)	74% (2年)	44% (2年)
p値	AML 0.18 ALL 0.21		(a) vs (b); 0.69 (b) vs (c); 0.001			0.01	

#60日および*42日における好中球数 $0.5 \times 10^9/l$ 以上の到達率

**100日における血小板数 $20 \times 10^9/l$ 以上の到達率

NA データなし

【成人に対する臍帯血移植の課題】

成人に対する臍帯血移植の適応を考慮する場合には他の造血幹細胞移植と同様の検討が必要である。具体的には、他の治療法では治療が困難であるか、臍帯血移植により他の治療法より良好な結果が期待できるか、原疾患以外の患者背景（患者の年齢、全身状態、感染症をはじめとする合併症の有無等）が移植の適応であるか等である。

本邦においては、成人に対する臍帯血移植の適応を検討する際、日本さい帯血バンクネットワーク、New York 血液センター、EUROCORD の日米欧の臍帯血バンク及び関連するネットワークからの多数例の報告と東京大学医科学研究所附属病院をはじめとする単施設からの報告が参考とされる。それぞれの成績は同様ではなくその解釈には注意を要するが、他の造血細胞移植と比較すると臍帯血移植では造血回復が遅延すること、非血縁者間 HLA 不一致であっても重症 GVHD 発症は低頻度であることは共通の特徴として挙げられている。また、生着すれば長期間の造血能を維持すること、ある程度の GVM 効果を有することも分かっていたが、移植後再発を来した場合のドナーリンパ球輸注⁴は行うことができない。

New York 血液センターや EUROCORD からの報告では、移植成績と移植細胞数には関連があると考えられている。すなわち、細胞数が限られている臍帯血移植では、成人を対象とする場合、体重当りの細胞数が確保しにくく、造血回復が遅延し生着不全や好中球回復の遅延が高い頻度で見られる。移植有核細胞数や移植 CD34 陽性細胞数が多くなるにつれ生着率が高まり、生着までの期間（好中球数が $500/\mu\text{l}$ 以上あるいは血小板数が $20,000/\mu\text{l}$ に到達するまでの期間）も早まり、移植関連死亡率・生存率が改善される(4-6)。日本さい帯血バンクネットワークからの報告では生着不全や移植関連死亡率は欧米の報告と比較すると低いが、移植成績と移植 CD34 陽性細胞数との関連性は同様とされている(12)。

一方で、東京大学医科学研究所附属病院などの単施設からの報告は、生着不全、移植関連死、生存率など、多くの点で日米欧の各臍帯血バンクからの報告と比較すると概ね良好である。単施設からの報告では、各骨髓バンクからの報告よりも移植有核細胞数が多くかつ狭い範囲におさまっているなど条件が異なり、単純な比較は困難でありその解釈には注意を要する。

現時点では、成人に対する臍帯血移植は、造血幹細胞移植の中の一つの選択肢として捉えられており、同種造血幹細胞移植を考慮しなければならない腫瘍性疾患患者で、適切なドナーがみつからず、適した臍帯血を見出せる場合に治療法として選択する移植医が多い状況と考えられる。さらに、保険診療が承認され急速な移植数の増加により症例数が蓄積されており、その評価は定まりつつある。しかしながら、体重あたりの移植細胞数が少ない成人に対する臍帯血移植では、生着不全の頻度が高い、生着までに時間を要する、移植後の重症感染症による治療関連死が多いといった点も指摘されている。その解決策として、欧米及びわが国で複数臍帯血移植の試みが開始されている(13, 14)が未だ検討段階にあり、現在、厚生労働省科学研究費（加藤俊一班長）に基づく前向き臨床試験が計画されている。その他にも、臍帯血移植後の免疫系再構築に関する解析が今後の課題として考えられてお

り、検討すべき点は残されている。

【ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植（ミスマッチ移植）の現状と課題】

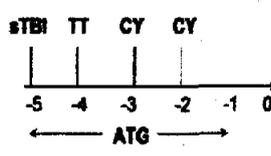
ミスマッチ移植は、通常 HLA 2～3 座不一致の親、子供又は兄弟をドナーとすることができ、100%に近い確率でドナーを見出すことが可能となる。しかし、非自己を認識する作用が強いため、そのままでは移植片が生着しにくく、拒絶のリスク(15)及び重篤な急性 GVHD 発症のリスクが問題となる(16)。ちなみに、移植前処置として全身放射線照射とシクロスポリン製剤投与を行った初期の臨床試験では、移植片から T 細胞の機能を様々な手法で抑制しても 60～100%が生着不全を起こしている(17)。この拒絶のリスクに関しては、G-CSF 製剤により動員した末梢血幹細胞 (peripheral blood stem cell: PBSC) を大量に投与することで回避することが可能となった(18-20)。また、重篤な GVHD 発症を回避する目的では、強い免疫抑制剤の使用や抗 CD52 抗体 (Campath-1H) の使用、又は T 細胞を選択的に除去する等の試みがなされている。特に、T 細胞の選択的除去は、重篤な GVHD に対する最強の予防手段であり、これによる臨床研究が進んできている。その中で、1993 年以降、ペルージャ大学 (イタリア) の Aversa F らが中心となり、G-CSF により動員した PBSC から T 細胞を除去した大量の幹細胞を急性白血病患者に移植する 2 つのパイロット臨床試験 (21, 22) を進め、造血幹細胞を高率に生着させ、かつ重篤な GVHD を回避する手法を確立した(23)。

すなわち、最初のパイロット臨床試験(21)の症例及びその後の追加症例を含めた計 36 例の患者に対して、骨髓破壊的前処置後、患者体重 1kg あたり 10.8×10^6 個 (以下 /kg と記す) の CD34 陽性細胞と 2.2×10^6 個/kg の CD3 陽性細胞を含むハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞が移植され、高率 (92%) に生着することが示された(24)。この時の Grade II～IV の急性 GVHD 発症頻度は、移植後に免疫抑制剤を使用せずともわずか 18%であった。以上のパイロット試験の概要を「ペルージャ大学の第 1 回パイロット臨床試験」として表 5 に示す(24)。

表 5 ペルージャ大学の第 1 回パイロット臨床試験 (1993-1995)

(Aversa F の論文 24 の Table 1 を転載)

Table 1
The first pilot study (1993-1995)

Conditioning regimen	T-cell depletion:	SBA and E-rosette
 <p>TBI 8 Gy in single dose at 16 cGy/m Thiotepa 10 mg/kg Cyclophosphamide 50 mg/kg × 2 Rabbit ATG 5 mg/kg × 5</p>	<p>Graft composition: CD34⁺ CD3⁺</p> <p>Results Primary engraftment Secondary engraftment Overall engraftment Acute GvHD II-IV Chronic GvHD</p>	<p>BM + PBPC 10.8 × 10⁶ kg⁻¹ 2.2 × 10⁵ kg⁻¹</p> <p>29 (80%) 4 33 (92%) 6/32 (18%) 1/23 (4%)</p>
	Disease-free survivors:	
	AML	5/12
	All	1/24
Patients	12	24
Median age	26	22
CR ≥ II	3	14
Relapse	9	10

移植3ヵ月後にドナーTリンパ球をAdd-backしているが、Tリンパ球Add-back量が少量(3×10^4 個/kg)であったにもかかわらず1例でGrade IVの急性GVHDが発症し、死亡に至っている(22)。したがって、上記第II相臨床試験(27)においては、ミスマッチ移植における移植片に含まれるCD3陽性細胞の閾値として、 3×10^4 個/kgが採用されており、これが以降のT細胞除去ミスマッチ移植における目指すべき閾値と考えられている。

以上、2つのパイロット臨床試験及び上記第II相臨床試験の全ての解析において、ミスマッチ移植における生着率とGVHD発症の課題は克服されたが、非血液疾患死亡率[全183例において、移植時完全寛解(CR)例では47%、再発例では62%にのぼり、それら死亡例の70%が感染症による]、及び白血病再発率[全183例において、移植時にCR1の急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia: AML)又は急性リンパ性白血病(acute lymphoblastic leukemia: ALL)患者では19%又は22%、CR2以上では36%又は56%、再発例では49%又は90%]は依然として高く、この観点でのより有効な治療戦略の開発が必須となっている(23)。

表7 再発高リスク急性白血病患者におけるフルハプロタイプ
ミスマッチ移植による第II相臨床試験(27)

患者及び方法	概要
対象患者	AML: 67例 (CR 1: 19, CR 2: 14, CR>2: 9, 再発: 25) ALL: 37例 (CR 1: 14, CR 2: 8, CR>2: 2, 再発: 13)
前処置	全身照射 + Thiotepa + Fludarabine + ATG
アフエレーシス	末梢血造血幹細胞はG-CSF製剤により動員して採取
CD34陽性細胞分離装置	CliniMACS 使用例: 88例 (回収率中央値: 79%、純度: 90%) Isoplex 使用例: 16例 (回収率中央値: 71%、純度: 95%)
移植後のGVHD予防	免疫抑制剤は使用せず
結果	概要
移植細胞数	CD34陽性細胞数中央値: 13.8×10^6 個/kg [(5.1~29.7) $\times 10^6$ 個/kg] CD3陽性細胞数中央値: 1×10^4 個/kg [(0.04~3.0) $\times 10^4$ 個/kg]
生着率	Overall: 100/101 (Primary: 94/101, Secondary: 6/7)
GVHD発症率	急性GVHD: 8/100、慢性GVHD: 5/70
非血液疾患死亡率	38/104例 (CMV感染死: 14例、Aspergillus感染死: 4例)
再発率(2年後)	移植時CR例: 9/66 (AML: 7/42, ALL: 2/24) 移植時再発例: 17/38 (AML: 10/25, ALL: 7/13)
無病生存率(中央値22ヵ月)	AML患者42例: 48%、ALL患者24例: 46%

【本邦におけるミスマッチ移植の現状と課題】

近年行われた日本国内の調査によると、HLA 1 座不一致血縁者間移植は特殊な GVHD 予防を実施しなくても移植が可能であったが、2 座以上の不一致を伴う移植においては通常の GVHD 予防のみを行った場合には生存率が大きく低下した (図 4) (28)。

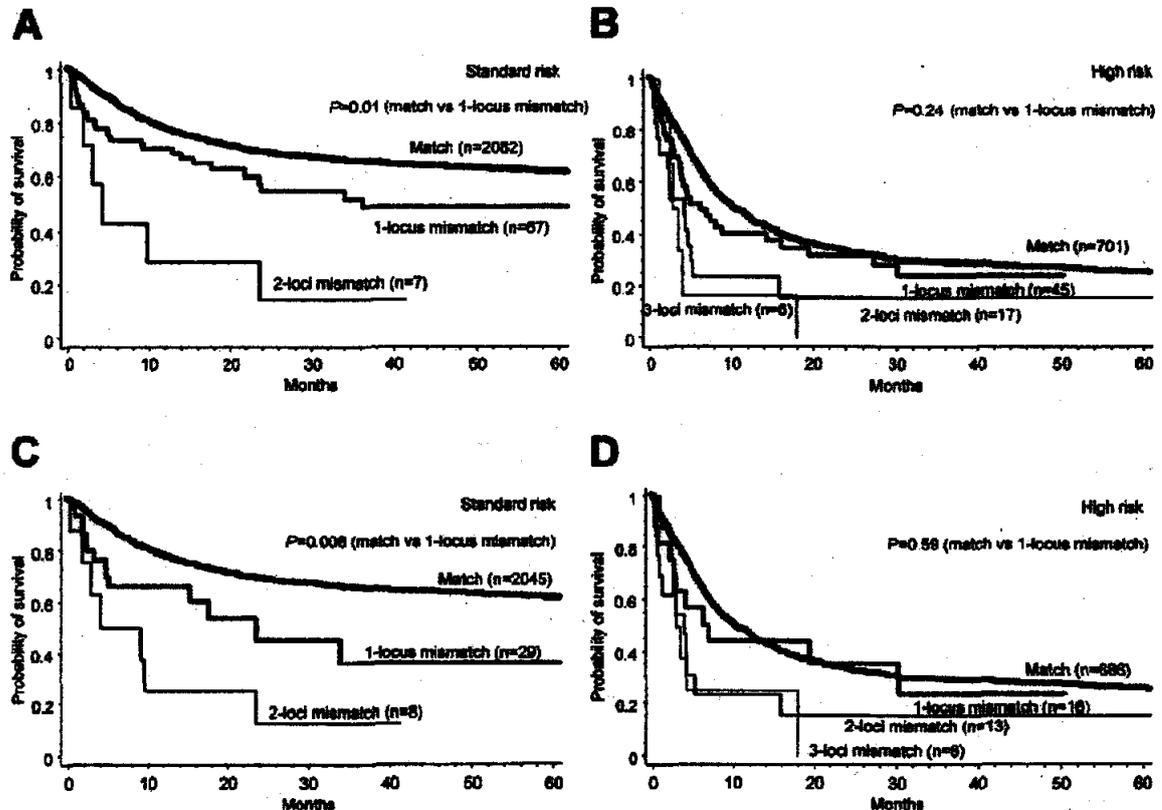


図 4 血縁者間移植の HLA 不一致度と全生存率 (28)

移植後の全生存率を血清レベルでの不一致度 (A-B) 及び DNA レベルでの不一致度 (C-D)、並びに病期 (A, C: スタンダードリスク、B, D: ハイリスク) に従い分類した。HLA 一致と HLA 1 座不一致群間での P 値を示した。

HLA 2 座以上の不一致血縁者間移植を成功させるために様々な試みが行われているが、日本国内では、体外での T 細胞除去又は CD34 陽性細胞純化を用いたミスマッチ移植、母子間免疫寛容の仮説に基づいたミスマッチ移植、強力な GVHD 予防法を用いたミスマッチ移植、及びアレムツズマブ (CAMPATH-1H) を用いた in vivo での T 細胞除去によるミスマッチ移植の応用・研究が進んでいる。

①体外での T 細胞除去又は CD34 陽性細胞純化を用いたミスマッチ移植

本邦では、Yamasaki S らが、1996～2002 年に 20 の施設において、HLA 2～3 座不一致血縁ドナー由来 PBSC 移植を受けた 50 例の高リスク造血器悪性腫瘍患者の臨床成績をレトロスペクティブに解析した結果を報告している (29)。これによると、18 例は PBSC をそのまま移植されており、残りの 32 例は CD34 陽性細胞を分離して移植されている (表 8)。また、骨髄破壊的前処置例が 31 例であるのに対して、骨髄非破壊的前処置が 19 例に施された (表 9)。解析の結果、移植後 28 日以上生存した 39 例の内、好中球生着に至った症例は 37 例 (95%) であり、生着しなかった例は 39 例中 2 例 (5%) 及び生着後に拒絶された例は 37 例中 3 例 (8%) であった (表 10)。CD34 陽性細胞を分離して移植した症例では、Grade II～IV の急性 GVHD の発症が、PBSC 投与症例に比し、有意に低かった (表 10)。一方、移植後 1 年までに 28 例 (56%) が移植関連合併症による死亡に至り、その中では感染症によるものが 30% と主要因であった (表 11)。以上から、本邦においても、ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植の治療法を確立する上で、特に感染症を含む治療関連死の回避が重要課題であることが示されている。

表 8 患者及びドナー背景と造血幹細胞移植の実態

(Yamasaki S らの論文 29 の Table 1 を改変)

(n=50)	細胞分離無し (n=18)	CD34 陽性細胞分離 (n=32)	
		CliniMACS (n=17)	Isolex (n=15)
Relationship of donor to patient			
Father/mother	1/7	2/2	3/2
Sibling	5	9	9
Son/daughter	0/5	3/1	0/0
Aunt	0	0	1
Disease at transplant			
AML	2	9	6
ALL	1	2	3
MDS	4	0	2
CML	4	3	1
NHL	6	2	3
MM	1	1	0
Prior autologous PBSC/allogeic HSCT	3/4	2/3	5/0
Median graft size (range)			
Nucleated cell dose ($\times 10^7$ /kg)	78.2 (11.3-324.0)	0.71 (0.36-1.4)	0.38 (0.19-0.56)
CD34+ cell dose ($\times 10^6$ /kg)	4.2 (1.5-9.5)	6.8 (2.9-13.5)	4.4 (0.67-9.8)
CD3+ cell dose (/kg)	2.7×10^8 (1.3-5.4)	2.8×10^4 (0.30-5.0)	4.9×10^4 (1.7-24.7)
Median follow-up (range) (months)	2.5(0.10-15.4)	3.8(0.20-16.8)	2.7(0.30-35.5)

表9 前処置の詳細 (Yamasaki Sらの論文29のTable 2を転載)

Table 2 Treatment characteristics

	No. (n=18)	Manipulation	
		CD34+ cell selection (n=32)	
		CliniMACS (n=17)	Isolux (n=15)
Conventional conditioning regimen	7 (39%)*	9 (53%)	15 (100%)
TBI + CY + others ^b /TBI + melphalan	3/0	8/1	14/0
BU + CY + others ^c	4	0	1
ATG-containing	1 (6%)	0	7 (47%)
GVHD prophylaxis			
CYA + MTX/CYA + prednisolone/CYA	1/0/0	5/0/1	7/2/2
FK506 + MTX/FK506	6/0	3/0	0/4
Reduced-intensity conditioning regimen	11 (61%)	8 (47%)	0
TBI + CY/TBI + Flu + BU/TBI + Flu + ATG + others ^d /TBI + BU + ATG	1/0/0/0	0/2/4/1	0/0/0/0
Flu + others ^e	10	1	0
ATG-containing	6 (33%)	5 (29%)	0
GVHD prophylaxis			
CYA + MTX/CYA + prednisolone/CYA + MMF/CYA	1/1/0/1	0/0/3/2	0/0/0/0
FK506 + MTX/FK506 + prednisolone + MMF/FK506 + prednisolone/FK506	6/1/1/0	0/0/0/1	0/0/0/0
Prednisolone/none	0/0	1/1	0/0
G-CSF after transplant	12 (67%)	16 (94%)	14 (93%)

*Number of patients (%) unless indicated otherwise.

^bOthers = ATG, BU, Ara-C, thiotepe or VP-16.

^cOthers = ATG, Ara-C, Flu or melphalan.

^dOthers = BU, CY or thiotepe.

^eOthers = BU, CY, Ara-C, idarubicin or melphalan.

ATG, antithymocyte globulin; Flu, fludarabine; MMF, mycophenolate mofetil.

表10 生着、GVHD 及び治療関連毒性 (Yamasaki Sらの論文29のTable 3を転載)

Table 3 Engraftment, GVHD and regimen-related toxicity

	No. (n=18)	Manipulation	
		CD34+ cell selection (n=32)	
		CliniMACS (n=17)	Isolux (n=15)
Median time of engraftment (range) (days)			
Neutrophil	14 (10-27)	14 (9-20)	12 (9-20)
Platelet	18.5 (0-46)	14 (9-23)	16 (12-37)
Graft failure/rejection	0/0	1/3	1/0
Acute GVHD^a			
0/I	3/2	9/3	5/4
II/III/IV	1/6/2	2/0/1	2/2/1
Median onset (range) (days) of ≥II acute GVHD	14 (6-77)	26.5 (3-50)	12.5 (5-32)
Chronic GVHD^b (onset, days)			
None/limited/extensive	7/1 (105)/0	9/0/1 (112)	6/1 (101)/0
RRT ^c II/III/IV	2/2/2	1/1/2	2/6/1
VOD/TMA	2/5	1/1	0/2

*Number of patients unless indicated otherwise.

^aA total of 43 patients who developed acute GVHD within 28 days or who survived ≥28 days after transplant were evaluated for acute GVHD.

^bA total of 25 patients who engrafted and survived ≥100 days after transplant were evaluated for chronic GVHD.

^cMaximum early RRT was graded according to the criteria documented by Bearman *et al.* RRT, regimen-related toxicity; VOD, veno-occlusive disease; TMA, thrombotic microangiopathy; ≥II acute GVHD, grades II-IV acute GVHD.

表 11 移植 1 年後までの死亡例の原因 (Yamasaki S らの論文 29 の Table 5 を転載)

Table 5 Causes of death before 1 year post transplant

	Manipulation	
	No. (n=18)	CD34+ cell selection (n=32)
Relapse/progressive disease	2 (11%)	9 (28%)
Treatment-related problem	11 (61%)	17 (53%)
Infectious complication	5 (28%)	10 (31%)
Organ toxicity*	5 (28%)	5 (16%)
Acute GVHD+infectious complication	1 (5%)	2 (6%)

*Organ toxicity = pulmonary hemorrhage (n=2), VOD (n=2), TMA (n=2), interstitial pneumonia (n=2), intracerebral hemorrhage (n=1) and asphyxia due to oral hematoma (n=1).

②母子間免疫寛容の仮説に基づいたミスマッチ移植

両親から子へは 1 組の HLA ハプロタイプが受け継がれる。受け継がれなかった HLA ハプロタイプのうち、母親の HLA ハプロタイプ由来の非遺伝母親由来 HLA 抗原 (NIMA) に対し、免疫学的寛容が成立していることが提唱されている(30)。

本邦では、ドナー末梢血における母子間マイクロキメリズムの存在を免疫寛容の指標として、進行期の造血器腫瘍を対象に HLA 不一致血縁者から T 細胞除去を行わずに移植を行い、このようなドナー選択を行うことにより急性 GVHD の重症化を起こすことなく移植が可能であることが示された(31)。その後、2001 年から 2004 年まで厚生労働省の研究班で実施された調査研究では、NIMA の不一致例 (NIMA 不一致同胞間での移植及び子供から母親に対して実施される移植) では、父親由来 HLA 抗原 (IPA) の不一致例 (母親から子供への移植) と比較して、Grade III 以上の急性 GVHD の発症頻度が低い結果が報告されている (図 5) (32)。

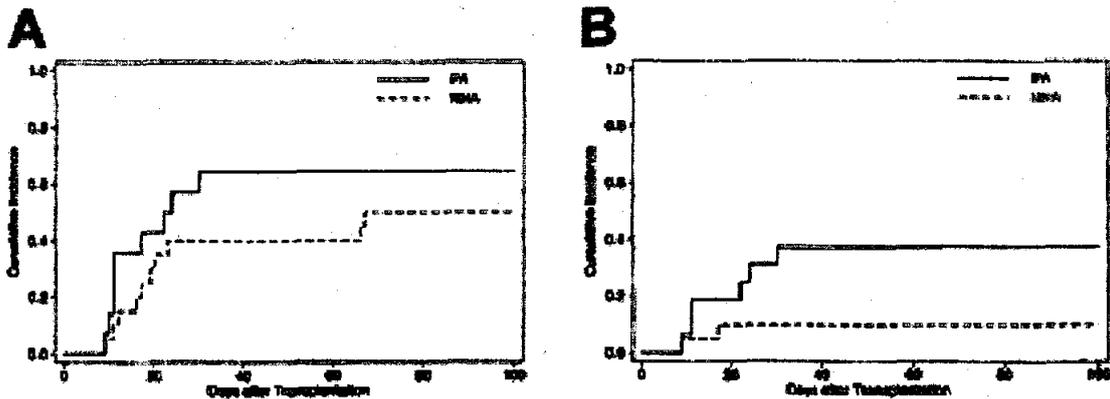


図5 T細胞非除去NIMA相補的造血幹細胞移植を受けた患者における急性GVHDの累積発生率(32)

NIMA相補的造血幹細胞移植を受けた評価可能34症例中の、GVH標的に従ったGradeII-IV(A)及びIII-IV(B)の急性GVHDの累積発生率。実線が母から子への移植(GVH標的;IPA)を示し、点線が子又はNIMA不一致同胞からの移植(GVH標的;NIMA)を示す。

③強力なGVHD予防法を用いたミスマッチ移植

HLA一致移植で用いられるメトトレキサート(MTX)とシクロスポリン(CYA)の組み合わせによるGVHD予防のみでは、HLA不一致移植の際のGVHDを抑制することは困難である。しかし、タクロリムス(FK506)、ミコフェノール酸モフェチル(MMF)などの免疫抑制剤が使用できるようになり、現在では強力なGVHD予防が可能になってきている。

FK506、MTX、メチルプレドニゾン(mPSL)の3剤、又はMMFを加えた4剤によるGVHD予防により、HLA2、3座不一致血縁ドナーからのT細胞非除去移植が試みられ、無病長期生存が得られる症例がみられている(33,34)。

GVHDを強力に予防することでHLAのバリアを越えることは可能であることが示されたが、慢性GVHD、血栓性微小血管障害(TMA)、ウイルス感染症などの移植関連合併症の頻度が高いのが問題である。

④アレムツズマブ(Campath-1H)を用いたin vivoでのT細胞除去によるミスマッチ移植

Campath-1Hはリンパ球などの細胞表面に存在するCD52に対するモノクローナル抗体である。移植前に投与してホストのリンパ球を抑制することによって拒絶を予防し、移植後も2~3週間という長い体内半減期を有することからドナーのリンパ球を抑制してGVHD発症を抑制する効果を有することが知られている。

東京大学で行われたHLA不一致移植の臨床試験では、HLA2座不一致の5名、3座不一致の7名の合計12名のハイリスク又は進行期の造血器腫瘍患者に移植が行われた(35)。全例にドナー細胞の生着が得られ、好中球回復($> 500/\text{mm}^3$)、血小板回復($> 20,000/\text{mm}^3$)までの期間の中央値はそれぞれ17.5日(12~29日)と16日(12~27日)であった。GradeIII

以上のGVHDは1名だけに認められ、移植合併症による死亡はGVHDによる1名（移植後66日）と、間質性肺炎による1名（197日）であった。症例数と評価期間は少ないものの、拒絶やGVHDは抑制され、新たなHLA 2座以上不一致の血縁者間移植と成り得ることが示唆された。

一方、Campath-1H投与に関連する心毒性の報告がなされており、移植前処置にCampath-1Hを使用することが同様に心毒性出現のリスクを高めることが報告されている(36)。

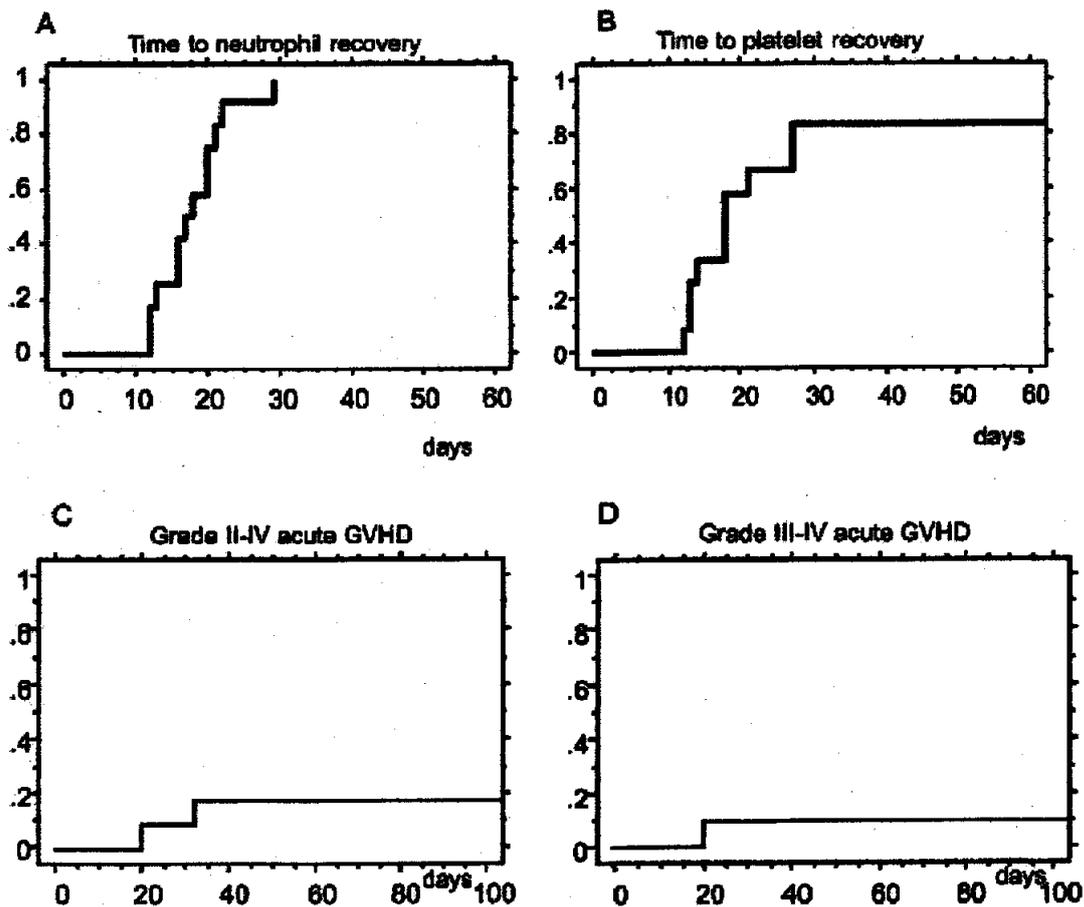


図6 Campath-1Hを使用したHLA不一致移植の結果(35)

移植後の好中球(A)及び血小板(B)回復までの日数、並びにGrade II-IV(C)及びIII-IV(D)の累積発生率を示す。

【T細胞除去ミスマッチ移植における課題に対する対策】

ミスマッチ移植は、HLA適合血縁ドナーが見つからない場合において、骨髄バンクを介した非血縁ドナーとの調整にかかる手間や時間及び臍帯血移植における種々の問題を回避する有望な移植法である。これまでに、種々の検討がなされ、治療成績の向上が報告されて

きているものの、未だ確立された治療法とは言い難い状況である。

ミスマッチ移植における、造血幹細胞の生着、拒絶阻止及び重篤な GVHD 発症回避という課題の解決策の一つとして、G-CSF により動員した末梢血幹細胞の大量移植と T 細胞の選択的除去を用いての実施が検討されてきた。しかしながら、特に再発高リスク患者においては、移植後の感染症を主要因とする移植関連死や造血器悪性腫瘍の再発が、依然、大きな課題として残されており、この解決なくしては確立した移植法になり得ない。すなわち、ドナー由来の T 細胞は造血幹細胞の生着及び宿主免疫再構築を促進しており、これにより移植患者から日和見感染を予防するとともに、GVM 効果による再発防止に寄与している。したがって、T 細胞除去ミスマッチ移植では、移植後早期に免疫系を再構築する手立てが必須である。

モルメド社⁶⁶（イタリア）は、自殺遺伝子である HSV-TK 遺伝子及び表面マーカーとしての ΔLNGFR 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入したドナー T リンパ球を調製し、これを T 細胞除去ミスマッチ移植後に追加輸注（Add-back）することで、早期に免疫系を再構築する臨床試験を実施している。これは、ドナー T リンパ球をそのまま Add-back した場合、重篤な急性 GVHD を発症するケースがあり（上記 Aversa F らの論文 22 に記載されている 1 例）、そのリスクを回避する為に Add-back 量をどうしても下げざるを得ず、その結果免疫系再構築への寄与が低下する。一方、抗 LNGFR 抗体で高度に純化した HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を用いた場合、重篤な GVHD 発症時に GCV 製剤投与により当該細胞を抹消して沈静化する機能が付与され、これらが安全装置となる。すなわち、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を大量に Add-back することにより早期に免疫系を再構築でき、感染症を含む治療関連死の発生率低下や GVM 効果による疾患再発阻止が期待できる。したがって、この手法により、高リスク造血器悪性腫瘍患者に対して、T 細胞除去ミスマッチ移植をより安全かつ有効なものとするのが可能と考えられる。

【モルメド社の臨床試験概要】

造血幹細胞移植後の付加的治療 (add-back 療法) として用いられる HSV-TK 遺伝子導入ドナーTリンパ球に対して、モルメド社は2003年に欧州医薬品審査庁 (European Medicines Agency: EMA) からオーファンドラッグの指定を受けており、現在、高リスク造血器悪性腫瘍患者を対象とした「ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK 遺伝子導入Tリンパ球 Add-back 療法」による第I/II相臨床試験 (TK007) を欧州4施設において実施している。2005年12月に開催された第47回米国血液学会における発表では、登録患者29例の内17例に遺伝子導入Tリンパ球 (1×10^7 個/kg オーダー) が Add-back され、その14例 (82%) に免疫系再構築を確認している。また、14例中6例 (43%) に Add-back 後の急性GVHDが発症したが、その内の5例にGCV製剤が投与され、いずれもGVHD症状が完全に沈静化している。したがって、導入したHSV-TK遺伝子は、意図したとおり、自殺機能をヒト体内で発揮していることが確認されている。また、登録症例は高リスク造血器悪性腫瘍患者にもかかわらず、Add-backを受けた17例中7例に再発が認められたに過ぎない。更に、免疫系再構築に至った14例では、その後の感染症エピソード及び治療関連死が有意に少なくなっており (免疫系再構築前が87%に対して13%)、特にサイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 感染による死亡例は、評価対象16例中わずか1例 (6%) に留まり、Perruccio Kらが発表したハプロタイプ一致T細胞除去造血幹細胞移植のみを実施したコントロール症例33例中の9例 (27%) (37) に比し、有意に低下していると報告している。途中経過としての全体生存率は、移植後800日時点で46%に上り、European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) が集計したハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植のみの場合に比し、有意に高い推移を示している (図7)。

その後、臨床プロトコルの改訂により目標症例数が30症例に増加されており、2008年3月時点で進行中である。2008年3月～4月に行なわれた欧州骨髄移植学会での発表及びモルメド社から入手した情報によると、2007年9月時点で、51例の症例登録が完了している。そのうち27例に遺伝子導入ドナーTリンパ球が Add-back され、22例で免疫系再構築が達成された。

以上より、HSV-TK 遺伝子導入ドナーTリンパ球の Add-back が、早期免疫系再構築を促進し、移植後の感染死を含む治療関連死を予防し、全体としての生存率を上げることが確認された。すなわち、HSV-TK 遺伝子導入ドナーTリンパ球を大量に Add-back する手法は非常に有用で、T細胞除去ミスマッチ移植を安全かつ有効に行える可能性が示唆されている。

【タカラバイオ株式会社の治験概要 (予定)】

モルメド社から輸入した本臨床研究と同一のレトロウイルスベクターを用いた治験が、タカラバイオ (株) により計画されている。この治験では、同種造血幹細胞移植後に再発をきたした造血器悪性腫瘍患者を対象として、遺伝子導入Tリンパ球がドナーリンパ球輸注療法において投与される。タカラバイオ (株) は第I相試験を国立がんセンター中央病

院で平成 20 年度に開始する予定である。

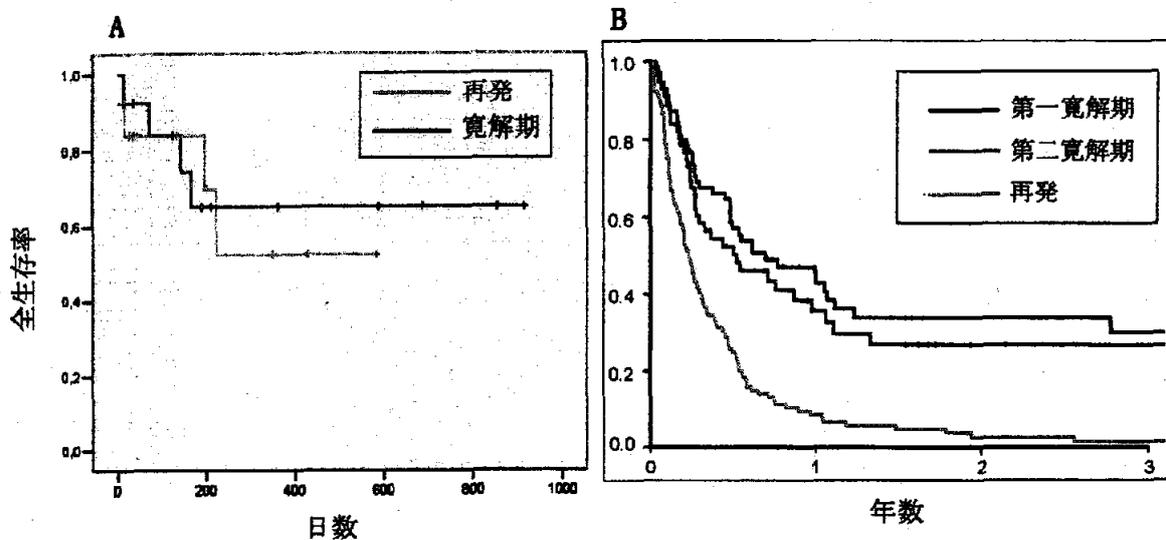


図7 ハプロタイプ一致Tリンパ球除去造血幹細胞移植の全生存率
(モルメド社より入手)

AがTK007 (HSV-TK 遺伝子導入Tリンパ球をAdd-back) の結果、BがEBMT (Add-back 無し) の結果を示す。グラフの凡例は、移植時の患者の状態を示す。

【本遺伝子治療臨床研究の全体フロー】

以上の状況を踏まえ、国立がんセンター中央病院において、モルメド社が実施した臨床試験 (TK007) と同様のプロトコールによる遺伝子治療臨床研究を実施計画することとした (添付資料 表7参照)。対象患者は高リスク造血器悪性腫瘍患者であり、移植前の前処置、ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞からの CD34 陽性細胞の分離装置、HSV-TK 遺伝子及び Δ LNGFR 遺伝子を含む遺伝子導入用レトロウイルスベクター、遺伝子導入細胞の調製法、及び Add-back する際の細胞数は、モルメド社の TK007 の場合と同様とする計画である。主要評価項目及び副次的評価項目に含まれる項目はほぼ同様であるが、安全性については今回の臨床研究では主要評価項目であるのに対し、モルメド社の臨床第 I / II 相試験では副次的評価項目である。これに関連して、本臨床研究では治療効果を期待しつつ安全性の評価を行うことを目的とするために、IL-2 を併用することなく、短期間により多くの遺伝子導入リンパ球を Add-back する用法・用量とした。その他、適格性確認の時点、再発時の対応等に相違があるが、評価に大きな影響を及ぼすものではなく計画全体としてはほぼ同様であると考えられる。

本遺伝子治療臨床研究を実施するにあたっては、国立がんセンター中央病院内に設置された無菌細胞調整施設 (CPR) にて、タカラバイオ(株)からの技術提供と助言を受け、モル

メド社から輸入したレトロウイルスベクターを用いて HSV-TK 遺伝子導入細胞を GMP 基準に準拠して調製し、品質試験を行う (図 8)。また、ハプロタイプ一致ドナーからの造血幹細胞の G-CSF 製剤による動員 (mobilization) 後のアフエレーシス[®]及び同一ドナーからの遺伝子導入用リンパ球アフエレーシスは、国立がんセンター中央病院で行われる計画である (図 8)。

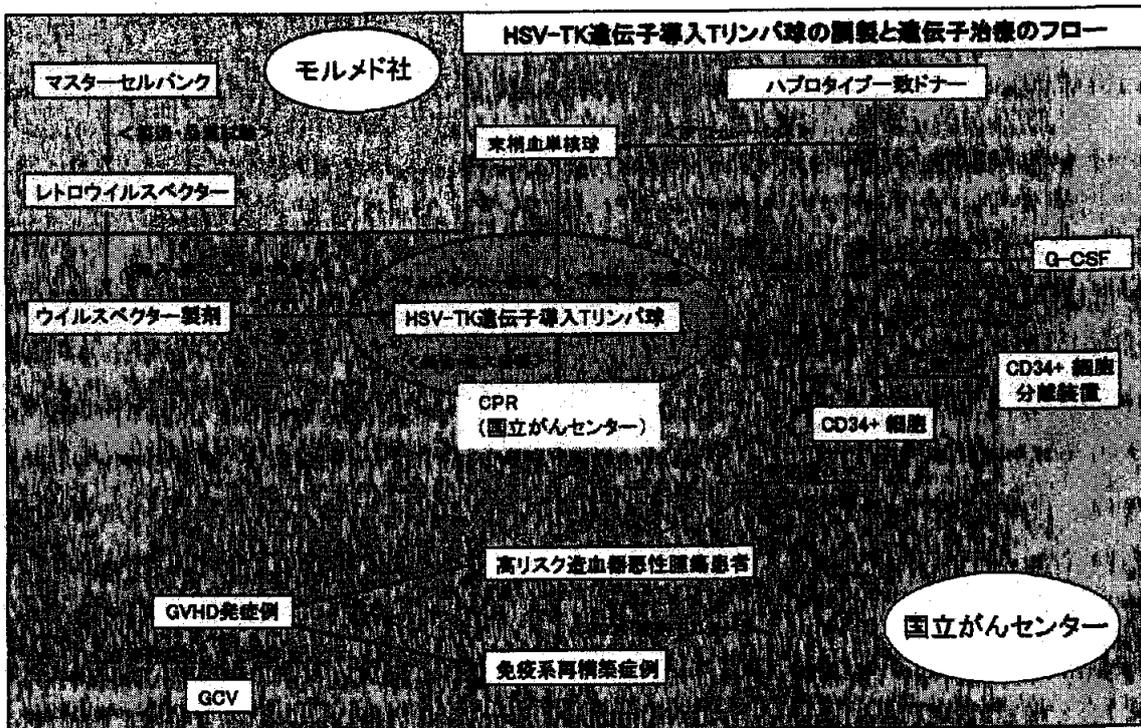


図 8 HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の調製と遺伝子治療のフロー

V.1.2 当該遺伝子治療臨床研究の概要

当該遺伝子治療臨床研究は、以下の選択基準に合致した患者を対象とし、前出図1に示した全体計画フロー（プロトコール概要）に基づいて行われる。

<患者仮登録時選択基準の概要>

- 1) 予後不良の高リスク造血器悪性腫瘍患者（詳細は別途規定）
- 2) HLA 適合又は HLA 1 座不一致の適切なドナーがいない
- 3) 末梢血幹細胞提供可能な HLA 2~3 座不一致の血縁ドナーがいる
- 4) 年齢が 20 歳以上 60 歳以下
- 5) ECOG の Performance Status が 0 又は 1
- 6) 主要臓器の機能が保たれている（詳細は別途規定）
- 7) ドナー及び患者の両者から文書での同意が得られている

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の調製】

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターSFCMM-3は、モルメド社でGMP基準に則って作製され、品質規格に適合したものを輸入して受け入れ、国立がんセンター中央病院内のCPRに搬入する。なお、当該レトロウイルスベクターは、モルメド社が実施中の治験（TK007）及び本邦における筑波大学付属病院での遺伝子治療臨床研究で使用されているのと同じベクター¹⁷である。

国立がんセンター中央病院内において、T細胞除去ミスマッチ移植ドナーと同一のドナーに由来するPBMCをアフエレーシスにより採取する。IL-2存在下で抗CD3抗体によりPBMCを刺激して活性化し、当該レトロウイルスベクターによりHSV-TK遺伝子及びΔLNGFR遺伝子をex vivo遠心法により導入する。その後、抗LNGFR抗体と二次抗体結合磁気ビーズ及び細胞分離装置による純化、IL-2存在下での拡大培養を経てHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球Add-back液を調製する。当該Add-back液の品質試験項目は次頁のとおりであり、HSV-TK遺伝子導入Tリンパ球の<品質試験項目-1>に合格したことを確認した後に用いる。また、HSV-TK遺伝子導入Tリンパ球の<品質試験項目-2>はAdd-back後に試験を開始するが、試験に日数を要するために結果の判明がAdd-back後になる場合がある。万一、Add-back後に不合格であることが判明した項目があればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。つまり、化学療法や移植幹細胞ソースの再検索といった臨床現場において現時点でHLA適合又はHLA一座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者に行われている治療法の中で、患者の状態に応じ総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）が最も適切と考える治療法を行う。なお、ドナーアフエレーシスに際しては、担当医師からドナーへのじゅうぶんなインフォームドコンセントを行い、文書による同意を取得する。

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-1>

- ・ 細胞生存率
- ・ エンドトキシン試験 (日本薬局方)
- ・ ΔLNGFR 発現試験
- ・ 増殖性レトロウイルス (replication competent retrovirus: RCR) ⁴⁶ 試験 (RT-PCR 法)
- ・ マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-2>

- ・ 無菌試験 (日本薬局方)
- ・ RCR 試験 (増幅法)
- ・ マイコプラズマ否定試験 (日本薬局方、培養法)
- ・ GCV 感受性試験
- ・ IL-2 依存的増殖試験

【T 細胞除去ミスマッチ移植】

ハプロタイプ一致ドナーからの末梢血幹細胞は、G-CSF 製剤投与により動員し、10 L 規模で2~3回アフエレーシスをすることにより採取する。その後、CD34 陽性細胞分離装置 (ミルテニーバイオテク社製 CliniMACS 又は同等のもの) を用いて CD34 陽性細胞を分取し、 4×10^6 個/kg を最少量として患者に移植する。その際、CD3 陽性細胞の混入量についても確認する。

T 細胞除去ミスマッチ移植時の前処置は、モルメド社の治験 (TK007) と同様の内容で実施する計画である (図9)。また、移植後のGVHD 予防に対する処置は行わないものとし、感染時には速やかに抗ウイルス剤や抗菌剤を処方することとする。なお、アシクロビル (aciclovir: ACV) 製剤及び GCV 製剤は、後に Add-back する HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の自殺機能を惹起することから、本臨床研究で感染予防・治療には使用しないこととする。もし、CMV 感染が問題となった場合には、ホスカルネットナトリウム製剤を使用する予定である。

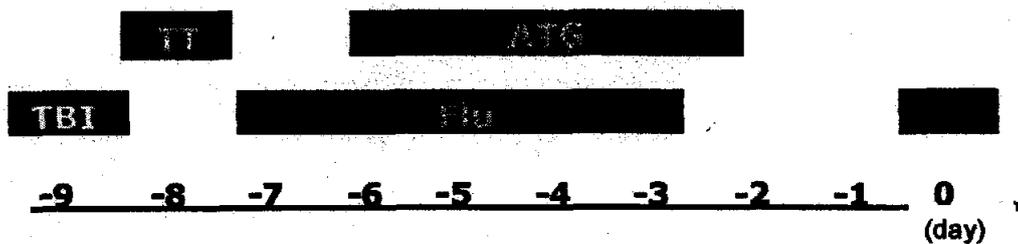
Conditioning regimen

• TBI: Total Body Irradiation 7.5 Gy

• TT: Thiotepa 13mg/kg

• Flu: Fludarabine 40mg/m²

• ATG: Anti-Thymocyte Globuline(Fresenius®) 5 mg/kg



• HCT: hematopoietic cell transplantation

図9 T細胞除去ミスマッチ移植における前処置

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 及びフォローアップ】

自発的な免疫系再構築の開始が確認されない場合には、T細胞除去ミスマッチ移植後の造血幹細胞の生着が見込まれる移植後42日目に、上記により調製したHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球 1×10^6 個/kgを追加輸注(Add-back)する。その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後72日目の時点で、 1×10^7 個/kgのHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球を再度Add-backする。更に、その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後102日目の時点で 1×10^7 個/kgをAdd-backする。最終のAdd-back実施の6ヵ月後に本臨床研究のフォローアップを終了する。Grade II~IVのGVHDの発症が認められた場合には、通常のCMV感染症治療に用いられる用法・用量に従ってGCV製剤を投与し、末梢血中のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球をモニターすると共にGVHD症状の沈静化能を評価する。この場合、患者の状態によっては、それまでのAdd-backの回数が1回または2回の場合、医師の判断により、GCV製剤投与後に1回のみHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球(1×10^6 個/kg)のAdd-backを許すものとする。

フォローアップ期間における臨床モニタリング実施項目は、表12に示すとおりである。

表 12 臨床モニタリング実施項目

評価事項	モニタリング実施項目
治療全体の安全性	血液学的検査、血液生化学検査、免疫学的検査、感染症検査、尿定性検査、有害事象
遺伝子治療安全性	RCR、LAM (linear amplification-mediated)-PCR (polymerase chain reaction)
移植生着	骨髄像、キメリズム
免疫系再構築	リンパ球免疫表現型 (CD3+、CD4+、CD8+等)
血中動態	フローサイトメトリー解析、PCR
GVHD 発症に対する GCV 製剤による鎮静効果	GVHD 症状、血中動態、免疫組織染色
副次的エンドポイント	再発までの時間、死亡に至るまでの時間、感染症の種類・発症件数・発症時期

V.1.3 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

本遺伝子治療の対象患者は、HLA 適合又は HLA 1 座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者である。この患者においては、移植治療は必須かつ急務であり、ミスマッチ移植および臍帯血移植が候補として考えられる。

① ミスマッチ移植

以下に、ミスマッチ移植の課題の解決策を段階的に、他の治療手段との比較を示しながら示す。

【ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植】

ミスマッチ移植における T 細胞除去の利点は、上述のとおり【V.1.1「対象疾患に関する現時点での知見」【ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植（ミスマッチ移植）の現状と課題】の項参照）、重篤な GVHD 予防に最も有効な手段であり、近年の細胞分離装置の進歩により混入する CD3 陽性細胞の少ない高純度の CD34 陽性細胞が得られるようになったため、移植後の重篤な GVHD 発症をほぼ完全に回避できるまでになっている。ただし、その反面、移植後の免疫抑制状態が感染症を引き起こすリスクを高めており、また再発などの問題も指摘されているため、早期の免疫系再構築、及び GVM 効果が課題となる。

【T細胞除去ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植+Tリンパ球 Add-back】

前項に記載のとおり、T 細胞除去ミスマッチ移植においては、移植後の早期免疫系再構築が、重篤な感染症等による移植関連死を防御する上で最大の課題であり、T 細胞除去ミスマッチ移植時と同じドナーに由来する T リンパ球の Add-back は、理論的に有効な手段と考えられる。しかし、Aversa F らの報告(22)にあるとおり、少量の T リンパ球の Add-back でも致死的な GVHD を発症した例があり、この点での改善が必須である。

【Tリンパ球 Add-back vs HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back】

本遺伝子治療では、T細胞除去ミスマッチ移植後の早期に免疫系を再構築するために、同一ドナー由来の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する計画である。これは、前項に示したとおり、Add-back した T リンパ球が直接要因となる致死性 GVHD 発症に対する対策として、安全装置である自殺機能を当該 T リンパ球に付与するという考えに基づく。GVHD 発症に対する治療手段としては、シクロスポリン製剤又はタクロリムス製剤といった免疫抑制剤や副腎皮質ステロイド製剤の併用が考えられるが、移植後の Grade II 以上の急性 GVHD に対して標準的なステロイド治療を含む種々の治療法を行っても、部分反応 (PR) 以上の効果が認められる確率は 50%に達していない(38, 39)。また、いずれも非特異的に免疫系を抑制することから、急速に易感染性を高め、重度の感染症頻度が

顕著に増加するリスクを伴う。一方、本遺伝子治療では、GCV 製剤投与により HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球のみを選択的に抹消でき、理論的には移植した造血幹細胞由来の免疫系には影響を与えずに GVHD を選択的に沈静化できる可能性が期待される。実際、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を移入した後に GCV 製剤が投与された臨床試験例では、ほぼ全例で自殺機能が確認され、GVHD 沈静化に至っている。また、遺伝子治療に関連する有害事象報告は皆無である(40-42)。

② 臍帯血移植

臍帯血移植については、上述したとおり(「V.1.1 対象疾患に関する現時点での知見」【造血器悪性腫瘍患者に対する造血幹細胞移植の現状】の項参照)、近年、その件数が増大し、その評価は定まりつつある。事実、国立がんセンター中央病院においても、2006 年度に適応があると判断された患者計 8 例の臍帯血移植を施行している、しかし一方では、成人に適用する場合の細胞数不足及び移植後療法としてのドナーリンパ球輸注などの細胞療法が不可能であることなどが問題点として挙げられている。細胞数不足に対しては複数臍帯血移植や臍帯血体外増幅といった試みもなされているが、未だ研究段階であり最終的な評価は定まっていない。臍帯血移植と HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 療法である本遺伝子治療の比較を表 13 に示す。

表 13 臍帯血移植と本遺伝子治療の比較

視点	臍帯血移植	本遺伝子治療
<ul style="list-style-type: none"> ●HLA 一致度 ●GVHD によるリスク ●移植までの時間 ●ドナーの負担 	<ul style="list-style-type: none"> ●1-2 座の HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、重症例は少ない。 ●ドナープールに適合するものがあれば、検索開始から最短 7~10 日間で施行することが可能。 ●なし。 	<ul style="list-style-type: none"> ●3 座までの HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、自殺機能で制御可能。 ●血縁ドナーが原則であるため、遺伝子導入 T リンパ球の調製期間も含め、最短 2~3 週間で施行することが可能。 ●他の移植*と同等の負担に加え、遺伝子導入 T リンパ球調製のための末梢血単核球及び血漿の採取が行われる。遺伝子導入 T リンパ球調製後に、細胞が規格を満たさないことが判明した場合、本遺伝子治療が行えない可能性がある。
<ul style="list-style-type: none"> ●移植スケジュールの調整 ●ドナーからの感染症 ●GVM 効果 ●拒絶・生着不全 	<ul style="list-style-type: none"> ●患者の都合のみで調整可能。 ●リスクは低い。 ●期待できる。 ●報告によっては 15%前後の症例で見られ、移植する細胞数の不足に関連して不全の頻度が高まる。生着しても時間のかかる場合が多い。 ●複数臍帯血移植の検討が開始されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ●ドナー、患者の双方の都合を調整する必要がある。 ●他の移植*と同等であるが、事前に確認することで回避可能。 ●期待できる。 ●他の移植*と同等。
<ul style="list-style-type: none"> ●治療関連毒性 ●再発時の対応 ●遺伝性疾患伝播 	<ul style="list-style-type: none"> ●生着不全・造血回復の遅延に伴う、治療関連毒性が多い。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注ができない。 ●可能性は否定できない。 	<ul style="list-style-type: none"> ●移植後、免疫系再構築までの期間は感染症のリスクが高まる。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注が可能。 ●可能性は否定できないが、血縁ドナーが原則ゆえに排除しやすい。

*：臍帯血移植を除く

参考資料：・高橋 聡. 成人に対する臍帯血移植の現況. 医学のあゆみ, 218(4):271-275, 2006.

・甲斐俊朗. 成人への臍帯血移植. 今日の移植, 19(3):250-255, 2006.

・高橋 聡, 浅野茂隆. 臍帯血移植. 癌と化学療法, 31(3):307-313, 2004.

・加藤俊一. 臍帯血移植, 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会教育講演 5, 2006.

臍帯血移植の利点である「ドナーの負担がない」という点では、本遺伝子治療は通常の移植以上にドナーへの負担を強いるものであり、臍帯血移植のほうが優れている。しかしながら、臍帯血移植の代表的な問題点である移植細胞数の不足、造血回復の遅延、生着不全の頻度の高さについては、本遺伝子治療では解決策を見出せる可能性がある。その他にも、特に高リスク造血器悪性腫瘍患者を対象とする場合には、GVM 効果を有することやドナーリンパ球輸注が可能であることは重要であると考えられる。臍帯血移植と比較すると本遺伝子治療では GVM 効果の発現が早期に期待できると考えられ、かつ状況に応じてドナーリンパ球輸注が実施可能であり、これらの点においても本遺伝子治療は有効な治療となりうる。

以上から、臍帯血移植と本遺伝子治療を比較した場合、本遺伝子治療は悪性度の高い疾患において、臍帯血移植を凌駕する可能性のある治療法になりうると考えられる。

ドナーの負担という点では、本遺伝子治療の個々の症例への適応については、治療効果や得られる利益等について慎重かつじゅうぶんな検討が必要である。しかしながら、本遺伝子治療は、一連の治療法の課題に対する解決策を模索した上で計画されたものであり、これまでの臨床実績からも安全性及び有効性が見込まれるものとして妥当な手法と考え選択した。

VI. 遺伝子の種類及びその導入方法

VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質

本臨床研究において発現する遺伝子は Δ LNGFR 遺伝子と HSV-TK 遺伝子である。導入されるが発現しないベクターDNA等の構造と性質は、VI.5「ウイルスベクター⁹⁹を用いた遺伝子導入」の項で述べられている。

VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造

VI.1.1.1 細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子 (Δ LNGFR 遺伝子)

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (truncated low-affinity nerve growth factor receptor: Δ LNGFR) をコードする遺伝子である(43-45)。ヒト低親和性神経成長因子受容体 (human low affinity nerve growth factor receptor: LNGFR) 遺伝子は、1986年 Johnsonらによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離され(43)、427アミノ酸からなるポリペプチドをコードする1,281塩基対と終止コドンTAGより成り立っている。N末端から、28アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして6個のシステイン残基を保存位置とする40アミノ酸からなるポリペプチドの4回繰り返し配列、セリン/スレオニンリッチ領域、1回膜貫通領域、及び155アミノ酸を有する細胞内領域という構造からなっている。今回使用する Δ LNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子の cDNA から細胞内領域をコードする塩基対を除去したもので、翻訳開始コドンATGの上流に113塩基対の非翻訳領域を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の280アミノ酸からなるポリペプチドをコードする956塩基対の遺伝子である。図10に Δ LNGFR 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。下線部分が細胞内領域の変更部位である。

LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA	
Δ LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA	
LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG	
Δ LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG	
LNGFR	CTGCCGCGGGAGGGCGGGCG	M G A G A T G R 8 AA
Δ LNGFR	CTGCCGCGGGAGGGCGGGCG	ATG GGG GCA GGT GCC ACC GGC CGC 137 b
		ATG GGG GCA GGT GCC ACC GGC CGC 137 b
		M G A G A T G R 8 AA
LNGFR	A M D G P R L L L L L L L G V	23 AA
Δ LNGFR	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG	182 b
	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG	182 b
	A M D G P R L L L L L L L G V	23 AA
LNGFR	S L G G A K E A C P T G L Y T	38 AA
Δ LNGFR	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA	227 b
	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA	227 b
	S L G G A K E A C P T G L Y T	38 AA
LNGFR	H S G E C C K A C N L G E G V	53 AA
Δ LNGFR	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG	272 b
	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG	272 b
	H S G E C C K A C N L G E G V	53 AA
LNGFR	A Q P C G A N Q T V C E P C L	68 AA
Δ LNGFR	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG	317 b
	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG	317 b
	A Q P C G A N Q T V C E P C L	68 AA
LNGFR	D S V T F S D V V S A T E P C	83 AA
Δ LNGFR	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC	362 b
	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC	362 b
	D S V T F S D V V S A T E P C	83 AA
LNGFR	K P C T E C V G L Q S M S A P	98 AA
Δ LNGFR	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG	407 b
	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG	407 b
	K P C T E C V G L Q S M S A P	98 AA
LNGFR	C V E A D D A V C R C A Y G Y	113 AA
Δ LNGFR	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC	452 b
	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC	452 b
	C V E A D D A V C R C A Y G Y	113 AA
LNGFR	Y Q D E T T G R C E A C R V C	128 AA
Δ LNGFR	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC	497 b
	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC	497 b
	Y Q D E T T G R C E A C R V C	128 AA
LNGFR	E A G S G L V F S C Q D K Q N	143 AA
Δ LNGFR	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC	542 b
	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC	542 b
	E A G S G L V F S C Q D K Q N	143 AA

	T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA	
LNGFR	ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b	
Δ LNGFR	ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b	
	T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA	
	N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA	
LNGFR	AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b	
Δ LNGFR	AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b	
	N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA	
	E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA	
LNGFR	GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b	
Δ LNGFR	GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b	
	E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA	
	E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA	
LNGFR	GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b	
Δ LNGFR	GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b	
	E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA	
	G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA	
LNGFR	GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b	
Δ LNGFR	GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b	
	G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA	
	P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA	
LNGFR	CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b	
Δ LNGFR	CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b	
	P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA	
	T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA	
LNGFR	ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b	
Δ LNGFR	ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b	
	T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA	
	D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA	
LNGFR	GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b	
Δ LNGFR	GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b	
	D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA	
	細胞外領域 ←			1回膜貫通領域										細胞内領域 →			
	V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	S	C	278 AA	
LNGFR	GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGC	TGC	947 b	
Δ LNGFR	GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGG	GGG	947 b	
	V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	<u>R</u>	<u>G</u>	278 AA	
	K	Q	N	K	Q	G	A	N	S	R	P	V	N	Q	T	293 AA	
LNGFR	AAG	CAG	AAC	AAG	CAA	GGA	GCC	AAC	AGC	CGG	CCA	GTG	AAC	CAG	ACG	992 b	
Δ LNGFR	<u>A</u> T <u>C</u>	<u>C</u> T <u>C</u>	<u>T</u> A <u>G</u>													956 b	
	<u>I</u>	<u>L</u>	<u>*</u>													280 AA	
	P	P	P	E	G	E	K	L	H	S	D	S	G	I	S	308 AA	
LNGFR	CCC	CCA	CCA	GAG	GGA	GAA	AAA	CTC	CAC	AGC	GAC	AGT	GGC	ATC	TCC	1037 b	
	V	D	S	Q	S	L	H	D	Q	Q	P	H	T	Q	T	323 AA	
LNGFR	GTG	GAC	AGC	CAG	AGC	CTG	CAT	GAC	CAG	CAG	CCC	CAC	ACG	CAG	ACA	1082 b	

LNGFR	A	S	G	Q	A	L	K	G	D	G	G	L	Y	S	S	338 AA
	GCC	TCG	GGC	CAG	GCC	CTC	AAG	GGT	GAC	GGA	GGC	CTC	TAC	AGC	AGC	1127 b
LNGFR	L	P	P	A	K	R	E	E	V	E	K	L	L	N	G	353 AA
	CTG	CCC	CCA	GCC	AAG	CGG	GAG	GAG	GTG	GAG	AAG	CTT	CTC	AAC	GGC	1172 b
LNGFR	S	A	G	D	T	W	R	H	L	A	G	E	L	G	Y	368 AA
	TCT	GCG	GGG	GAC	ACC	TGG	CGG	CAC	CTG	GCG	GGC	GAG	CTG	GGC	TAC	1217 b
LNGFR	Q	P	E	H	I	D	S	F	T	H	E	A	C	P	V	383 AA
	CAG	CCC	GAG	CAC	ATA	GAC	TCC	TTT	ACC	CAT	GAG	GCC	TGC	CCC	GTT	1262 b
LNGFR	R	A	L	L	A	S	W	A	T	Q	D	S	A	T	L	398 AA
	CGC	GCC	CTG	CTT	GCA	AGC	TGG	GCC	ACC	CAG	GAC	AGC	GCC	ACA	CTG	1307 b
LNGFR	D	A	L	L	A	A	L	R	R	I	Q	R	A	D	L	413 AA
	GAC	GCC	CTC	CTG	GCC	GCC	CTG	CGC	CGC	ATC	CAG	CGA	GCC	GAC	CTC	1352 b
LNGFR	V	E	S	L	C	S	E	S	T	A	T	S	P	V	*	427 AA
	GTG	GAG	AGT	CTG	TGC	AGT	GAG	TCC	ACT	GCC	ACA	TCC	CCG	GTG	TGA	1397 b

図 10 LNGFR 遺伝子と ΔLNGFR 遺伝子の塩基配列比較

下線部分は細胞内領域の変更部位

VI.1.1.2 単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK 遺伝子)

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ (herpes simplex virus 1-thymidine kinase: HSV-TK) をコードする遺伝子であり、1981年、Wagner MJ らによりヒト単純ヘルペス1型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされた(46)。単一エクソンからなり、翻訳開始コドン ATG の上流に 107 塩基対の非翻訳領域を有し、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。今回使用する HSV-TK 遺伝子は、CL101 株の DNA を BamH I と EcoR I で処理した後平滑末端化して LXS の Hpa I サイトにクローニングされた 1,128 塩基対を含む 1,131 塩基対の遺伝子であり、翻訳開始コドン ATG の上流に 14 塩基対の非翻訳領域を有する。図 11 に HSV-TK 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

GATCCGCCGCCACC	ATG	GCT	TCG	TAC	CCC	TGC	CAT	CAA	CAC	GCG	TCT	47
	M	A	S	Y	P	C	H	Q	H	A	S	
GCG	TTC	GAC	CAG	GCT	GCG	CGT	TCT	CGC	GGC	CAT	AGC	92
A	F	D	Q	A	A	R	S	R	G	H	S	
ACG	GCG	TTG	CGC	CCT	CGC	CGG	CAG	CAA	GAA	GCC	ACG	137
T	A	L	R	P	R	R	Q	Q	E	A	T	
CTG	GAG	CAG	AAA	ATG	CCC	ACG	CTA	CTG	CGG	GTT	TAT	182
L	E	Q	K	M	P	T	L	L	R	V	Y	
CCT	CAC	GGG	ATG	GGG	AAA	ACC	ACC	ACC	ACG	CAA	CTG	227
P	H	G	M	G	K	T	T	T	T	Q	L	
CTG	GGT	TCG	CGC	GAC	GAT	ATC	GTC	TAC	GTA	CCC	GAG	272
L	G	S	R	D	D	I	V	Y	V	P	E	
TAC	TGG	CAG	GTG	CTG	GGG	GCT	TCC	GAG	ACA	ATC	GCG	317
Y	W	Q	V	L	G	A	S	E	T	I	A	
ACC	ACA	CAA	CAC	CGC	CTC	GAC	CAG	GGT	GAG	ATA	TCG	362
T	T	Q	H	R	L	D	Q	G	E	I	S	
GCG	GCG	GTG	GTA	ATG	ACA	AGC	GCC	CAG	ATA	ACA	ATG	407
A	A	V	V	M	T	S	A	Q	I	T	M	
TAT	GCC	GTG	ACC	GAC	GCC	GTT	CTG	GCT	CCT	CAT	GTC	452
Y	A	V	T	D	A	V	L	A	P	H	V	
GCT	GGG	AGT	TCA	CAT	GCC	CCG	CCC	CCG	GCC	CTC	ACC	497
A	G	S	S	H	A	P	P	P	A	L	T	
GAC	CGC	CAT	CCC	ATC	GCC	GCC	CTC	CTG	TGC	TAC	CCG	542
D	R	H	P	I	A	A	L	L	C	Y	P	
TAC	CTT	ATG	GGC	AGC	ATG	ACC	CCC	CAG	GCC	GTG	CTG	587
Y	L	M	G	S	M	T	P	Q	A	V	L	
GCC	CTC	ATC	CCG	CCG	ACC	TTG	CCC	GGC	ACA	AAC	ATC	632
A	L	I	P	P	T	L	P	G	T	N	I	
GCC	CTT	CCG	GAG	GAC	AGA	CAC	ATC	GAC	CGC	CTG	GCC	677
A	L	P	E	D	R	H	I	D	R	L	A	
CGC	CCC	GGC	GAG	CGG	CTT	GAC	CTG	GCT	ATG	CTG	GCC	722
R	P	G	E	R	L	D	L	A	M	L	A	
CGC	GTT	TAC	GGG	CTG	CTT	GCC	AAT	ACG	GTG	CGG	TAT	767
R	V	Y	G	L	L	A	N	T	V	R	Y	
GGC	GGG	TCG	TGG	TGG	GAG	GAT	TGG	GGA	CAG	CTT	TCG	812
G	G	S	W	W	E	D	W	G	Q	L	S	
GTG	CCG	CCC	CAG	GGT	GCC	GAG	CCC	CAG	AGC	AAC	GCG	857
V	P	P	Q	G	A	E	P	Q	S	N	A	
CCC	CAT	ATC	GGG	GAC	ACG	TTA	TTT	ACC	CTG	TTT	CGG	902
P	H	I	G	D	T	L	F	T	L	F	R	
TTG	CTG	GCC	CCC	AAC	GGC	GAC	CTG	TAT	AAC	GTG	TTT	947
L	L	A	P	N	G	D	L	Y	N	V	F	
TTG	GAC	GTC	TTG	GCC	AAA	CGC	CTC	CGT	CCC	ATG	CAC	992
L	D	V	L	A	K	R	L	R	P	M	H	
CTG	GAT	TAC	GAC	CAA	TCG	CCC	GCC	GGC	TGC	CGG	GAC	1037
L	D	Y	D	Q	S	P	A	G	C	R	D	
CAA	CTT	ACC	TCC	GGG	ATG	GTC	CAG	ACC	CAC	GTC	ACC	1082
Q	L	T	S	G	M	V	Q	T	H	V	T	
TCC	ATA	CCG	ACG	ATC	TGC	GAC	CTG	GCG	CGC	ACG	TTT	1127
S	I	P	T	I	C	D	L	A	R	T	F	
ATG	GGG	GAG	GCT	AAC	TGA	1145						
M	G	E	A	N	*							

図 11 HSV-TK 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI. 1. 2 人に導入する遺伝子の性質

LNGFR は主に神経系細胞に発現する膜貫通型の神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) に対する受容体で、神経細胞以外では筋肉、精巣で発現しているが、ほとんどの造血系細胞には発現していない(47)。現在、tropomyosin-related kinase (Trk) と結合することで高親和性の神経成長因子受容体を形成すると報告されており、LNGFR 単独では NGF の刺激を細胞内に伝播することはない(48)。

HSV-TK はウイルス特有のチミジンキナーゼで、ヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なった基質特異性を有し、グアノシンの類似物質である ACV や GCV をリン酸化することが可能である(49, 50)。ACV や GCV は生物活性が低いプロドラッグ (prodrug) と呼ばれ、HSV-TK を発現していない細胞に対しては何ら毒性を示さないが、ウイルス感染等により HSV-TK が発現している細胞では ACV や GCV がリン酸化され、最終的に細胞を死に至らしめる。このように HSV-TK は ACV や GCV との組み合わせにより生物活性を示す特異な酵素である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、標的細胞上の受容体にウイルス粒子の外皮表面に存在するエンベロープが結合することにより、ウイルスと細胞の膜融合が起こり、ウイルスゲノム RNA 及び逆転写酵素等のウイルスの感染に必要な酵素が細胞内へ侵入する。細胞内に入った後、逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA から 2 本鎖 DNA が合成され、核内に移行する。5' -LTR と 3' -LTR ではさまれた DNA はウイルスが持っているインテグラーゼによって細胞染色体に組み込まれ (プロウイルス)、細胞ゲノムの複製に伴って複製されて安定的に娘細胞へ受け継がれる。このために継続的な遺伝子発現が可能である。

細胞染色体に組み込まれた Δ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子は、SFCMM-3 内部のプロモーターである SV40 初期プロモーター及びウイルス末端反復配列 (long terminal repeat: LTR) プロモーターによってそれぞれ発現し、その発現はいずれも持続的である。

VI. 1. 3 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性

VI. 1. 3. 1 Δ LNGFR の生物活性

Δ LNGFR は、細胞内領域のほとんど (LNGFR の第 277 アミノ酸から最終第 427 アミノ酸まで) が除去されているため、シグナルを細胞内に伝達することはない。in vitro 及び in vivo において、 Δ LNGFR の機能活性は観察されず(45)、また Bonini C らの報告(51)により、本研究で用いるレトロウイルスベクター-SFCMM-3 と同じ Δ LNGFR 遺伝子を別のレトロウイルスベクター-SFCMM-2 により活性化ヒト T リンパ球に導入し、NGF 濃度依存的な、i) 細胞増殖、ii) CD25 発現、及び iii) 腫瘍壊死因子 (TNF) - α 産生による細胞傷害活性を経時的に調査した結果、遺伝子導入ヒトリンパ球は、遺伝子非導入ヒトリンパ球と同様に、NGF に対する反応を示さないことが確認された。なお、 Δ LNGFR 遺伝子が導入される T リンパ球は、通常、LNGFR を殆ど発現していないことが確認されている(45)。

Δ LNGFR は細胞膜でたん白発現するため細胞表面マーカーとして利用され、特異的抗体を用いて in vitro で発現細胞を迅速に分離することができ、ex vivo での発現細胞の検出や

生存状態、増殖状態等のキャラクタリゼーションを行うことができる。

VI. 1. 3. 2 HSV-TK の生物活性

HSV-TK は 376 アミノ酸からなるたん白質であり、本剤により遺伝子導入した細胞において自殺遺伝子産物として機能する。自殺遺伝子が導入された細胞では、その遺伝子産物により非毒性のプロドラッグが毒性型ドラッグに変換され、細胞が傷害を受ける。HSV-TK はガンシクロビル (GCV) をリン酸化することにより GCV 一リン酸を生成し、GCV 一リン酸は細胞由来のキナーゼにより GCV 三リン酸に変換される。GCV 三リン酸は dGTP に代わって合成中の DNA に取り込まれることにより DNA 合成を阻害し、細胞は死に至る (52)。ほ乳類のチミジンキナーゼで GCV はリン酸化されないが、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞では GCV 三リン酸が生成するので、HSV-TK 遺伝子導入細胞は *in vitro* 及び *in vivo* で選択的に死滅させることができる (53, 54)。

VI. 2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では使用しない。

VI. 3 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

移植片対悪性腫瘍 (graft-versus-malignancy: GVM) 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T リンパ球であることが多くの実験から支持されている一方、当該細胞が GVHD の原因となることが知られている。T リンパ球は組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) の存在下で培養可能であり、抗 CD3 抗体の刺激により活性化され、活発な増殖を開始する。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は増殖中の細胞を標的としており、活性化された T リンパ球に対しても高い遺伝子導入効率が得られることが過去の臨床研究により証明されている (55, 56)。したがって、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いた遺伝子治療においては、ドナーリンパ球を rhIL-2 存在下、抗 CD3 抗体で刺激することにより得られる活性化 T リンパ球が標的細胞として使用される。

VI. 4 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

VI. 4. 1 遺伝子導入方法の概略

ドナー末梢血リンパ球への Δ LNGFR 及び HSV-TK 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を含むウイルス産生細胞の培養上清中にドナー末梢血リンパ球を加え、遠心することで行う。遺伝子導入工程を含む遺伝子導入細胞の調製方法の詳細を VII. 3. 1 「遺伝子導入細胞の調製方法」に記載する。

VI. 4. 2 当該導入法を選択した理由

ドナー末梢血 T リンパ球への Δ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子を導入する方法としてレ

トロウイルスベクターを選択した理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: MoMLV) ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されていること(55-59)、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。また安全性に関して、CD34 陽性細胞を標的とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療では白血病発症の報告がされているが、過去の T 細胞遺伝子治療において重篤な副作用は報告されていない(55-58, 60)。

VI. 4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターや Naked DNA ベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。例えば、Naked DNA が細胞染色体に組み込まれる確率は $1.5/1 \times 10^4$ (61) 又は $1/1 \times 10^4$ (62) 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は $1/1 \times 10^{3-5}$ 程度であると報告されている(63)。すなわち、細胞染色体に組み込まれ、長期にわたって導入遺伝子が安定して発現する効率は、これらベクターでは非常に低いものである。

一方、レトロウイルスにより遺伝子導入された細胞において、導入遺伝子はすべて細胞染色体に組み込まれている。例えば、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が 50% 以上であるとの報告もあり、他の方法に比べると格段に高く(64)、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、基になる SFCMM-3 DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全てもしくは一部を欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞^{*10}株 GP+envAml2 は、すでに世界的に広く使用されているパッケージング細胞株であり、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である。本パッケージング細胞株は、gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて導入されているため、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる(65)。

VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

VI. 5.1 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、以下のようなウイルス学的特徴を持つ(66, 67)。

形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが

囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス (orthoretrovirus) 及びスプーマレトロウイルス (spumaretrovirus) の 2 つの亜科に分類される。MoMLV はオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血病ウイルスの一種である。

マウス白血病ウイルスは AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであるが、MoMLV は実験室内での継代により病原性の高いウイルス株として単離されたものである。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血病ウイルスはウイルスと細胞の間での遺伝子の組換えにより形成されるが、MoMLV は細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血病所見を示し、脾臓への浸潤が顕著に認められる。AKR マウスの自然発症白血病に対しては抗 AKR MLV 血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLV に対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法

VI. 5. 2. 1 SFCMM-3 DNA ベクターの構築

本臨床研究で用いられる SFCMM-3 DNA ベクターは、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。すなわち、ベースとなるレトロウイルスベクターは pLXSN(68)で、その遺伝子概略を図 12 に示す。

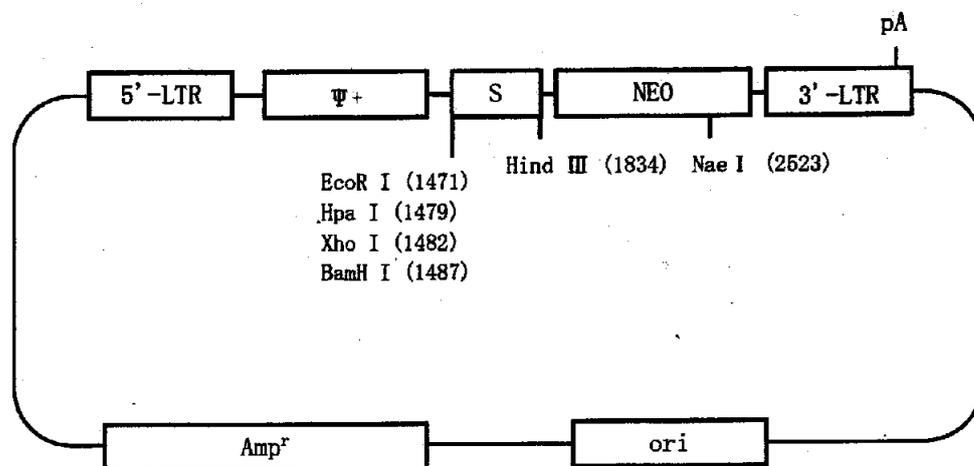


図 12 pLXSN の遺伝子構造の概略

LTR: Long Terminal Repeat、 $\Psi+$: パッケージングシグナル、S: SV40 初期プロモーター、NEO: ネオマイシン耐性遺伝子、pA: poly A 付加シグナル

このベクターから制限酵素 Hind III と Nae I を用いてネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除き、SV40 初期プロモーターの下流に Δ LNGFR 遺伝子を組み込み、さらに制限酵素 Hpa I で切断して HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。その遺伝子概略を図 13 に示す。SFCMM-3 DNA ベクターにおいて、LXSN 由来の配列部分は、5' -LTR 及び、パッケージングシグナル、SV40 初期プロモーター、3' -LTR、poly A 付加シグナルである。SFCMM-3 DNA ベクターはウイルス粒子形成に必要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、この DNA ベクターのみを通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。

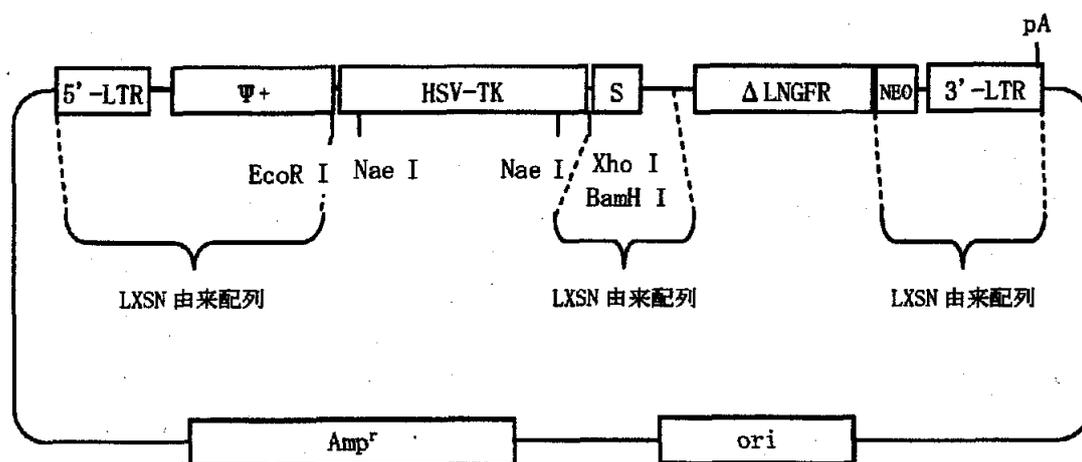


図 13 SFCMM-3 DNA ベクターの遺伝子構造の概略

配列名	塩基数	由来
5'-LTR : 5'-Long Terminal Repeat	(1 - 594)	MoMSV
Ψ+ : パッケージングシグナル	(664 - 1473)	MoMSV、 MoMLV
HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子	(1498 - 2628)	HSV
S : SV40 初期プロモーター	(2636 - 2992)	SV40
Δ LNGFR: 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子	(3113 - 3955)	ヒト
NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部	(3960 - 4123)	大腸菌
3'-LTR : 3'-Long Terminal Repeat	(4183 - 4776)	MoMLV
pA : poly A 付加シグナル	(4678)	MoMLV

VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築

SFCMM-3 DNA ベクターは、ウイルス粒子形成に必要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このベクターDNA のみではウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本臨床研究において使用する

パッケージング細胞株は、GP+envAm12 (ATCC CRL-9641) (65)で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を2種類のプラスミド(ひとつは gag と pol で、もうひとつは env 遺伝子)で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このアプローチはRCR出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

以下にパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12) 及び GP+E-86 (69)の構築手順を示す。

- 1) MoMLV の gag 遺伝子、pol 遺伝子及び選択マーカーの gpt 遺伝子配列を持ち、かつΨパッケージングシグナルと3'-LTRを持たないプラスミド pgag-polgpt を、マウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 にエレクトロポレーション法にてトランスフェクションし、薬剤(Hypoxanthine、Xanthine、Mycophenolic acid)で遺伝子導入細胞を選択した。
- 2) 選択した細胞株に、マウスアンフォトロピックウイルス¹¹4070A由来の env 遺伝子を持ち、かつΨパッケージングシグナルと3'-LTRを持たないプラスミド penvAm、及び Hygromycin 耐性遺伝子を持つプラスミド pRSVhyg を共にトランスフェクションし、Hygromycin B で env 遺伝子導入細胞を選択する。使用した全てのプラスミドは、Ψパッケージングシグナルと3'-LTRを持たないため、この方法により、ウイルス由来の gag、pol、env は発現するが RCR を産生しないアンフォトロピック(ヒトを含む多くの哺乳類に感染性を有する)パッケージング細胞株 Am12 を樹立した。
- 3) 前述の pgag-polgpt と、MoMLV の env を発現するプラスミド pEnv を NIH 3T3 細胞に導入することにより、エコトロピック(マウス細胞にのみ感染性を有する)パッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) を構築した。

VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、48時間後の培養上清を回収した。この培養上清には、効率よく Am12 に感染するレトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 が含まれる。回収した上清をアンフォトロピックパッケージング細胞株 Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞が構築され、ヒトを含む多くの哺乳類細胞に感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターが産生される。

レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 感染 Am12 細胞から、良好な生育性と Tリンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。これをマスターセルバンク(MCB)用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。

VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造

本遺伝子治療臨床研究において使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、バンキン

グされたウイルス産生細胞株〔MCB、又はワーキングセルバンク (WCB)〕を培養し、その上清中にウイルス粒子の状態が存在する。

製造は全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。

VL 5.3 ウイルスペクターの構造

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略を図 14 に、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 DNA の全塩基配列を図 15 に示す。HSV-TK は 5'-LTR により、 Δ LNGFR は内在性プロモーターである SV40 初期プロモーターにより転写が誘導される。SFCMM-3 はパッケージングシグナルとして Ψ^+ を有し、gag、pol、env をコードする遺伝子は除かれている。



図 14 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略

5' : 5'-LTR、 Ψ^+ : パッケージングシグナル、S : SV40 初期プロモーター、HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子、 Δ LNGFR : 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子、NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部、3' : 3'-LTR

LTR	
AATGAAAGAC CCCACCTGTA GGTITGGCAA GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC	60
ATGGAAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA AGGTCAGGAA CAGATGGAAC	120
AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT GGTAAGCAGT TCCTGCCCGG GCTCAGGGCC	180
AAGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC AACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG	240
CCCCGGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGTCC CCAGATGCGG TCCAGCCCTC AGCAGTTTCT	300
AGAGAACCAT CAGATGTTTC CAGGGTGCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT	360
TGAACTAACC AATCAGTTCG CTTCTCGCTT CTGTTGCGGC GCTTCTGCTC CCGAGCTCA	420
ATAAAAGAGC CCACAACCCC TCACTCGGGG CGCCAGTCTT CCGATAGACT GCGTCGCCCG	480
GGTACCCGTA TTCCCAATAA AGCCTCTTGC TGTTTGCATC CGAATCGTGG TCTCGCTGTT	540
CCTTGGGAGG GTCTCCTCTG AGTGATTGAC TACCCACGAC GGGGGTCTTT CATTTGGGGG	600
LTR	
CTCGTCCGGG ATTTGGAGAC CCCTGCCAG GGACCACCGA CCCACCACCG GGAGGTAAGC	660
Ψ+	
TGCCAGCAA CTTATCTGTG TCTGTCCGAT TGCTAGTGT CTATGTTGA TGTATGCCG	720
CTGGTCTGT ACTAGTTAGC TAACTAGCTC TGTATCTGGC GGACCCGTGG TGGAAGTAC	780
GAGTTCTGAA CACCCGGCCG CAACCCTGGG AGACGTCCA GGGACTTGG GGGCCGTTTT	840
TGTGGCCCGA CCTGAGGAAG GGAGTCGATG TGGAATCCGA CCCCGTCAGG ATATGTGGTT	900
CTGGTAGGAG ACGAGAACCT AAAACAGTTC CCGCCTCCGT CTGAATTTTT GCTTTCGGTT	960
TGGAACCGAA GCCCGCGTC TTGTCTGCTG CAGCGCTGCA GCATCGTTCT GTGTTGTCTC	1020
TGCTGACTG TGTTTCTGTA TTTGTCTGAA AATTAGGGCC AGACTGTTAC CACTCCCTTA	1080

AGTTTGAOCT TAGGTCAGTG GAAAGATGTC GAGCGGATCG CTCACAACCA GTCGGTAGAT	1140
GTCAAGAAGA GACGTTGGGT TACCTTCTGC TCTGCAGAAT GGCCAACTT TAACGTGGGA	1200
TGGCCGCGAG ACGGCACCTT TAACCGAGAC CTCATCACCC AGGTTAAGAT CAAGGTCTTT	1260
TCACCTGGCC CGCATGGACA CCCAGACCAG GTCCCCTACA TCGTGACCTG GGAAGCCTTG	1320
GCTTTTGACC CCCCTCCCTG GGTCAAGCCC TTTGTACACC CTAAGCCTCC GCCTCCTCTT	1380
CCTCCATCCG CCCCGTCTCT CCCCTTGAA CCTCCTCGTT CGACCCCGCC TCGATCCTCC	1440
Ψ+	
CYTTATCCAG CCTCACTCC TTCTTAGGC GCGGGAATC GTTGATCCGC CGCCACCATG	1500
HSV-TK	
GCTTCGTACC CCTGCCATCA ACACGGCTCT GCGTTCGACC AGGCTGCGCG TTCTCGCGGC	1560
CATAGCAACC GACGTACGGC GTTGGCCCTT CGCCGGCAGC AAGAAGCCAC GGAAGTCCGC	1620
CTGGAGCAGA AAATGCCAC GCTACTGCGG GTTTATATAG ACGTCTCA CGGGATGGGG	1680
AAAACCAACA CCACGCAACT GCTGGTGGCC CTGGTTTCGC GCGACGATAT CGTCTACGTA	1740
CCCGAGCCGA TGACTIONTGC GCAGGTGCTG GGGGCTTCCG AGACAATCGC GAACATCTAC	1800
ACCACACAAC ACCGCCTCGA CCAGGGTGAG ATATCGGCCG GGGACGCGGC GGTGGTAATG	1860
ACAAGCGCCC AGATAACAAT GGGCATGCCT TATGCCGTGA CCGACGCCGT TCTGGCTCCT	1920
CATGTGCGGG GGGAGGCTGG GAGTTCACAT GCCCGCCCC CGGCCCTCAC CCTCATCTTC	1980
GACCGCCATC CCATCGCCGC CCTCCTGTGC TACCCGGCCG CGCGATACTT TATGGGCAGC	2040
ATGACCCCCC AGGCCGTGCT GCGTTCGTG GCCCTCATCC CGCCGACCTT GCCCGGCACA	2100
AACATCGTGT TGGGGGCCCT TCCGGAGGAC AGACACATCG ACCGCCTGGC CAAACGCCAG	2160

CGCCCCGGCG AGCGGCTTGA OCTGGCTATG CTGGCCGCGA TTCGCCGCGT TTACGGGCTG	2220
CTTGCCAATA CGGTGCGGTA TCTGCAGGGC GCGGGTCTGT GGTGGGAGGA TTGGGGACAG	2280
CTTTCGGGGA CGGCCGTGCC GCCCCAGGGT GCCGAGCCCC AGAGCAAACGC GGGCCCACGA	2340
CCCCATATCG GGGACACGTT ATTTACCCTG TTTCGGGCCC CCGAGTTGCT GGCCCCAAC	2400
GGCGACCTGT ATAACGTGT TGCTGGGCC TTGGACGTCT TGGCCAAACG CCTCCGTCCC	2460
ATGCACGTCT TTATCCTGGA TTACGACCAA TCGCCCGCCG GCTGCCGGA CGCCTGCTG	2520
CAACTTAOCT CCGGGATGGT CCAGACCCAC GTCACCACCC CAGGCTCCAT ACCGACGATC	2580
TGCGACCTGG CGCGCACGTT TGCCCGGAG ATGGGGGAGG CTA <u>ACTGAGA</u> ATTA <u>ACTCGA</u>	2640
HSV-TK	
<u>GGATCCGGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCAGCAG</u>	2700
<u>GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG</u>	2760
<u>GTCOCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC</u>	2820
<u>CGCCCTAAC TCCGCCATC CGCCCCTAA CTCGCCAG TTCCGCCAT TCTCCGCC</u>	2880
<u>ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT</u>	2940
<u>TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTGGAG GCCTAGGCTT TGCAAAAAG CIAATTCGGG</u>	3000
<u>CCGCGCCAG CTCCGGCGG CAGGGGGGG GCTGAGCGC AGCGCAGCGC AGCCCCATCA</u>	3060
GTCGGCAAAG CGGACCGAGC TGAAGTGA GCGCTGCCG GGGAGGCGG CGATGGGGG	3120
Δ LNGFR	
<u>AGGTGCCACC GGCCGCGCA TGGACGGGCC GCGCTGCTG CTGTTGCTGC TTCTGGGGT</u>	3180
<u>GTCCCTTGA GGTGCCAAGG AGGCATGCC CACAGGCTG TACACACACA GCGTGAGTG</u>	3240

CTGCAAAGCC TGCAACCTGG GCGAGGGTGT GGCCAGCCT TGTGGAGCCA ACCAGACCGT	3300
GTGTGAGCCC TGCCTGGACA GCGTGACGTT CTCGACGTG GTGAGCGCGA CCGAGCCGTG	3360
CAAGCCGTGC ACCGAGTGG TGGGGCTCCA GAGCATGTG GCGCCGTGG TGGAGGCCGA	3420
CGACCCGTG TGCCGCTGG CCTACGGCTA CTACCAGGAT GAGACGACTG GCGCTGCGA	3480
GGCGTGCCG GTGTGCGAGG CGGGCTCGG CCTCGTGTT TCCTGCCAGG ACAAGCAGAA	3540
CACCGTGTGC GAGGAGTGCC CCGACGGCAC GTATCCGAC GAGGCCAACC ACGTGGACCC	3600
GTGCCTGCCC TGCACCGTGT GCGAGGACAC CGAGCGCCAG CTCGCGAGT GCACACGCTG	3660
GGCCGACGCC GAGTGGGAGG AGATCCCTGG CCGTTGGATT ACACGGTCCA CACCCCAGA	3720
GGGCTCGGAC AGCACAGCCC CCAGCACCCA GGAGCCTGAG GCACCTCCAG AACAAAGACT	3780
CATAGCCAGC ACGGTGGCAG GTGTGGTGAC CACAGTGATG GGCAGCTCCC AGCCCGTGGT	3840
GACCCGAGGC ACCACCGACA ACCTCATCCC TGTCTATTGC TCCATCCTGG CTGCTGTGGT	3900
TGTGGGCCCT GTGGCCTACA TAGCCTTCAA GAGGTGGAAC AGGGGGATCC TCTAGTCCG	3960
Δ LNGFR	
GCTGGGTGTG GCGGACCCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA	4020
GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCTT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTCGCGATTC	4080
GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTCTTC TGAGCGGGAC ICTGGGGTTC	4140
GATAAAATAA AAGATTTTAT TTAGTCTCCA GAAAAGGGG GGAATGAAAG ACCCCACCTG	4200
LTR	
TAGGTTTGGC AAGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGCAAG GCATGGAAAA ATACATAACT	4260
GAGAATAGAG AAGTTCAGAT CAAGGTCAGG AACAGATGGA ACAGCTGAAT ATGGGCCAAA	4320

CAGGATATCT GTGGAAGCA GTTCCTGCC CGGCTCAGGG CCAAGAACAG ATGGAACAGC	4380
TGAATATGGG CCAAACAGGA TATCTGTGGT AAGCAGITCC TGCCCCGGCT CAGGGCCAAG	4440
AACAGATGGT CCCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT	4500
TCCAGGGTGC CCCAAGGACC TGAATGACC CTGTGCCTTA TTTGAACTAA CCAATCAGTT	4560
CGCTTCTCGC TTCTGTTGCG GCGCTTCTGC TCCCCGAGCT CAATAAAGA GCCACAACC	4620
CCTCACTCGG GGGCCAGTC TTCCGATAGA CTGCGTCGCC CGGGTACCCG TATCCCAAT	4680
AAAGCCTCTT GCTGTTTGA TCCGAATCGT GGTCTCGCTG TTCCTTGGGA GGGTCTCCTC	4740
TGAGTGATTG ACTACCCACG ACGGGGTCT TTCATT	4776

LTR

図15 SFCMM-3 DNAの全塩基配列

LXSN と相同な配列を下線で示す。

VI. 5. 4 ウイルスペクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 GP+envAm12 は、アンフォトロピック系のパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。レトロウイルスは増殖中の細胞にのみ感染するので、遺伝子導入に先立って標的細胞を組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) と抗 CD3 抗体 (OKT3) で刺激する。これにより高い遺伝子導入効率が期待できる。また、レトロウイルスベクターSFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。

VI. 4. 3 「レトロウイルスベクターの選択根拠」の項で述べたように、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べてより効率よく遺伝子を導入し、細胞染色体に組み込むことが可能であると言える。

Ⅶ. 安全性についての評価

Ⅶ.1 遺伝子導入方法の安全性

Ⅶ.1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

ウイルス産生細胞には、セルバンクシステムを使用する。セルバンク作製に使用した培地及び試薬は、組成と品質の確認されたものを使用している。また、マスターセルバンク (MCB) は品質試験を行うことにより、バクテリア、真菌、マイコプラズマ及びウイルスの混入がないこと、並びにエコトロピックとアンフトロピックの RCR が無いことを確認している (MCB 及びワーキングセルバンク (WCB) の品質試験の詳細を参考資料 1 に、MCB、WCB の品質試験項目と保存中の監視計画を参考資料 2 に記載する)。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造フローを図 16 に示す。

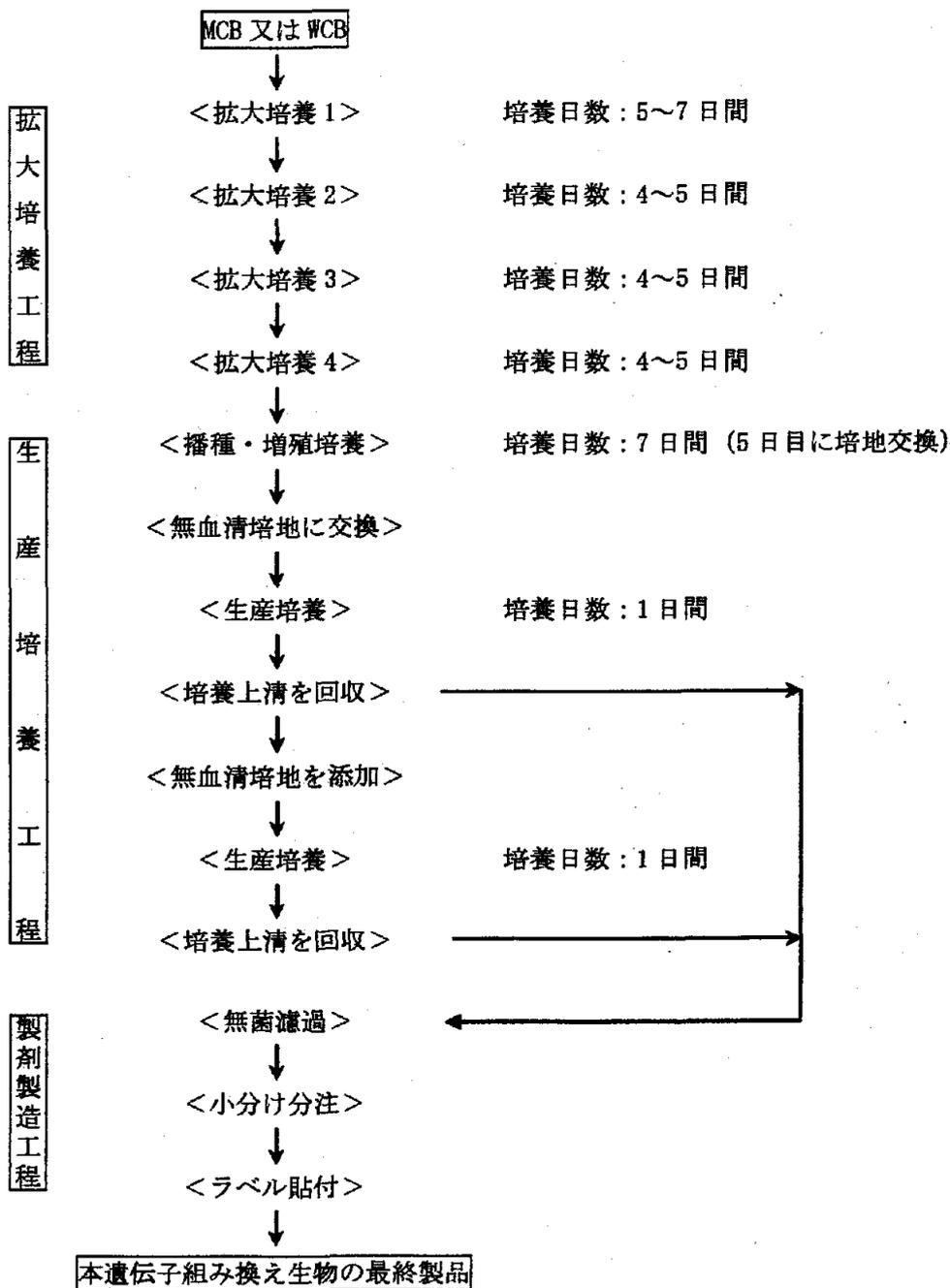


図 16 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造フロー

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、MCB 又は WCB から培養を開始し拡大培養した後、生産培養工程の培養上清に回収される。拡大培養工程及び生産培養工程の播種・増殖培養には 10%ウシ胎児血清含有培地を用い、生産培養には無血清培地を用いる。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造に使用する培地及び試薬並びにその規格を参考資料 3 に記載する。回

取した培養上清は、保管、また精製することなく引き続き製剤製造工程に用いる。製剤は、この培養上清を無菌ろ過した後、規定液量に小分け・ラベル貼付して製造する。製造は、全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。製剤は、ロットごとにウイルス安全性を含め品質試験を行う。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の品質は以下の試験を行うことにより確認する（レトロウイルスベクターの品質試験の詳細を参考資料 4 に記載する）。

1. 無菌試験（欧州薬局方）
2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
3. *in vitro* ウイルス試験
4. *in vivo* ウイルス試験
5. RCR 試験
6. エンドトキシン試験（欧州薬局方）
7. 感染効率試験
8. 組み込まれたベクター遺伝子の完全性試験
9. GCV 感受性試験
10. HSV-TK スプライス型否定試験

HSV-TK スプライス型否定試験は、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞において、227 塩基短くなっているスプライス型の HSV-TK 遺伝子を持つものがあり、GCV に対する感受性に影響を与えると報告されていることによる(70)。スプライシングに作用する酵素の基質となりうる潜在的なスプライスサイトが HSV-TK 遺伝子中に予測されており、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 により遺伝子導入したヒトリンパ球のゲノム DNA について、このサイトが正常であるものの割合を規格設定している。

本邦での臨床研究に使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、上記の品質を有し、感染性因子に対する危険性の低い生物由来成分をはじめとする培地、試薬等を用いていること、及び、モルメド社にて確立した製造方法により製造を行う予定であることから、その品質は、安全性の高いものとする。

VII. 1.2 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与する物質は、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球及びその懸濁媒である RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液 (CP-1) である。ウシ血清は患者にとっての異種たん白質を含有しており抗原性の問題が生じる可能性があるため使用せず、ドナー血漿を培地添加剤として用いる。細胞調製の際に用いられる培地の成分、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 懸濁液の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に生理食塩水でじゅうぶんに洗浄されるので、患者に影響を及ぼすことはない。

と考えられる。さらに懸濁媒である RPMI 1640 及び CP-1 については、本臨床研究と同様、細胞を凍結保存する目的で造血幹細胞移植等の臨床現場で広く使用されている。これらは医薬品としての承認は得ていないものの、CP-1 は移植用細胞の凍結用に使用され、また RPMI については、公式骨髄バンクレポート中に使用した浮遊液の一つとして記載されている。現時点ではこれらに由来する重篤な有害事象の報告は確認されておらず、本臨床研究における使用に関する安全性についても問題はないと考えられる。

細胞調製終了後、以下の試験を行うことにより品質を担保する。

1. 細胞生存率 (トリパンブルー)
2. エンドトキシン試験 (日本薬局方)
3. Δ LNGFR 発現試験
4. RCR 試験 (RT-PCR 法)
5. マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)
6. 無菌試験 (日本薬局方)
7. 細胞及び上清の RCR 試験 (Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S+L-テスト)
8. マイコプラズマ否定試験 (日本薬局方、培養法)
9. GCV 感受性試験
10. IL-2 依存的増殖試験

Ⅶ. 1. 3 増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の可能性

Ⅶ. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性

本研究で使用するレトロウイルスベクター SFCMM-3 のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全部、若しくは一部を欠如している。また、用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 において、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片とが染色体上の異なった位置に挿入されているので、RCR の出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクター SFCMM-3 上清の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性の製剤だけを臨床使用する。また、治療開始後には患者末梢血中の RCR を RT-PCR 法により、最終 add-back 後、1 ヶ月後の 14 日目及び 28 日目、3 ヶ月後の 14 日目、6 ヶ月後の 28 日目並びにそれ以後の患者生存期間中は 1 年ごとに測定する。

Ⅶ. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性

パッケージング細胞は一般に、ウイルス粒子を構成するたん白質の遺伝子を有さない増殖能欠損型レトロウイルスベクターを生産するために使用される。組換えレトロウイルスベクターを作製するために、パッケージングプラスミド (ウイルスたん白質をコードする gag、pol、env 遺伝子を含む) をあらかじめ NIH 3T3 細胞に組み込んだパッケージング細胞が作られている。この細胞に遺伝子治療用レトロウイルスベクターのゲノム配列を含む DNA

を導入したプロデューサー細胞を樹立することにより、高力価のレトロウイルスベクターを大量に調製することが可能になった(71)。図 17 にその概念図を示す。

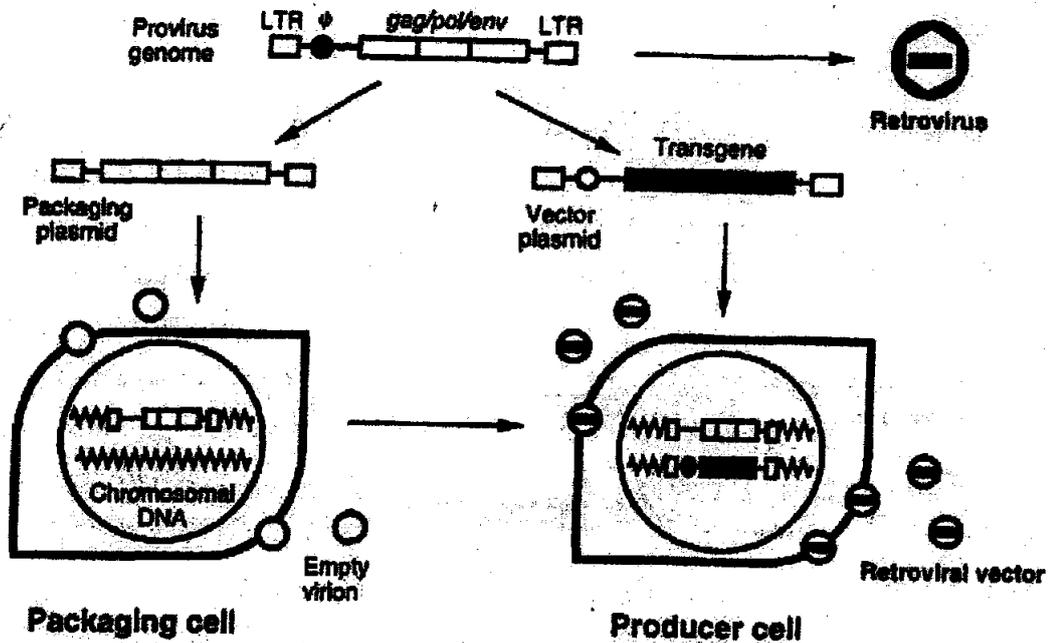


図 17 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 71 より転載)

SFCMM-3 DNA ベクターは、ウイルス粒子形成に必要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このプラスミドを通常の細胞に導入しただけではウイルス粒子を産生することはない。さらに、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を作製する際に使用されるパッケージング細胞 GP+envAm12 は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミドで別々に導入した第 3 世代のパッケージング細胞株であり、野生型レトロウイルスを産生する可能性は、第 1 世代及び第 2 世代パッケージング細胞株と比較して極めて低い。従って、SFCMM-3 DNA ベクターとパッケージング細胞株 GP+envAm12 の組み合わせにより作製されたウイルス産生細胞株を使用してレトロウイルスベクター-SFCMM-3 を製造する過程で RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。

表 14 に各世代のパッケージング細胞の特徴を、図 18 に各世代のパッケージング細胞と対応するレトロウイルスベクターの構造をそれぞれ記載する(71)。

表 14 各世代のパッケージング細胞の特徴

	パッケージングプラスミド の構造	RCR 出現の機構
第 1 世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の A)	パッケージングシグナルだけを除いたもの。効率よくベクターを作るために、ベクタープラスミド側に gag 遺伝子の一部を残しておく必要がある。	パッケージング配列とベクター配列に共通する gag 部分で相同組換えが起こると RCR が出現する。
第 2 世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の B)	パッケージングシグナルを除去し、さらに 3'-LTR をポリ A 付加シグナルで置換したもの。	RCR が出現するためには、gag 部分と 3'-LTR 部分の 2 ヶ所で同時に相同組換えが起こる必要があり、その可能性は非常に低いと考えられている。
第 3 世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造: 図 18 中の C)	パッケージングシグナルを除去して 3'-LTR をポリ A 付加シグナルで置換し、さらにウイルスタンパク質のコーディング領域を gag-pol と env の 2 種類に分割して発現させるようにしたもの。	RCR が出現するためには、gag 部分と pol 部分と 3'-LTR 部分の 3 回の相同組換えが同時に起こる必要があり、その可能性は極めて低いと考えられている。

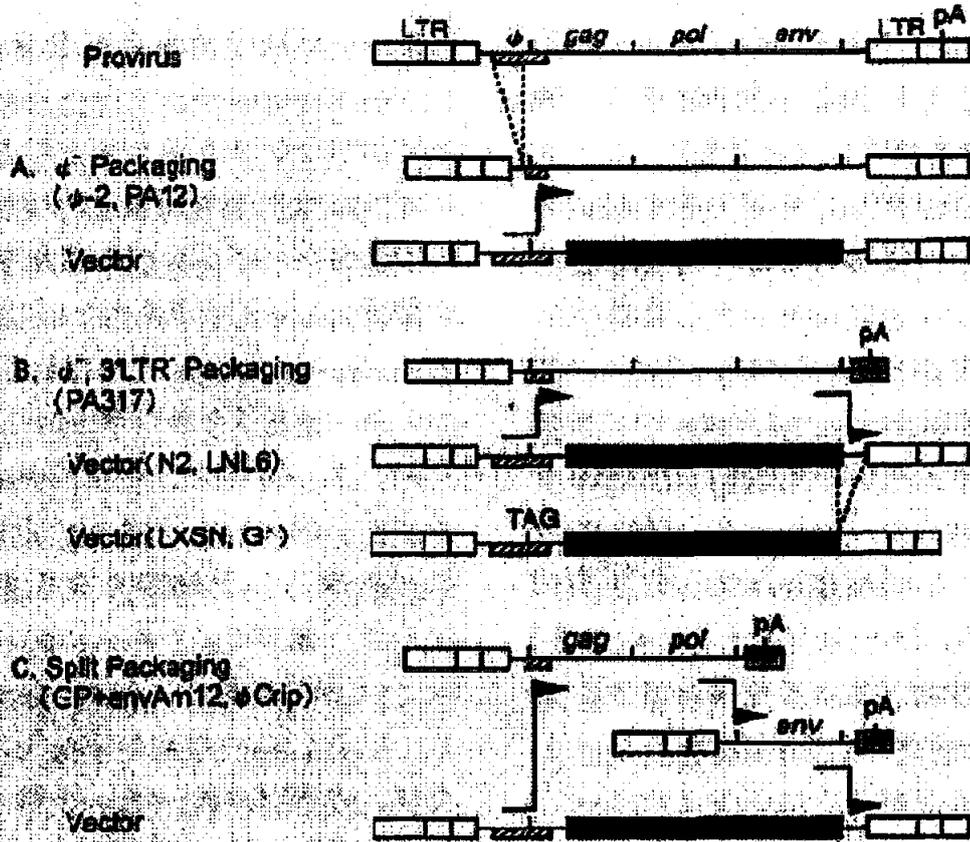


図 18 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 71 より転載)

続いて図 19 に、パッケージング細胞株 GP+envAm12 を作製するために用いた 2 種のプラスミド、pgag-polgpt と penvAm の構造、及び MoMLV ウイルス全塩基配列を含むプラスミド 3PO を示す。

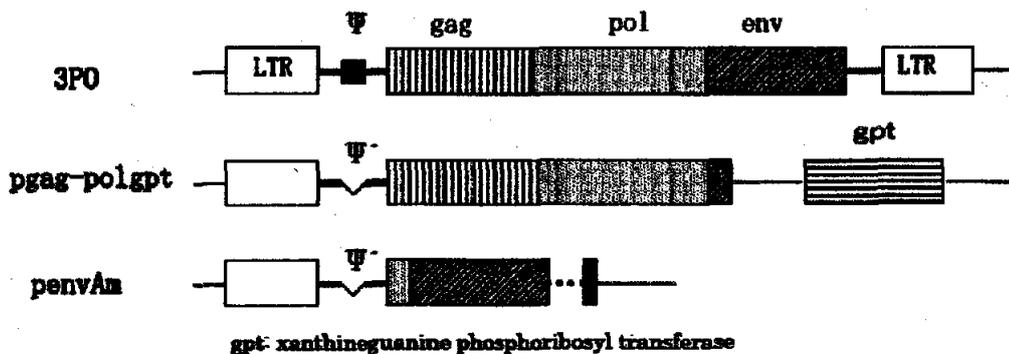


図 19 MoMLV ウイルス全塩基配列を含む 3PO プラスミドとパッケージング細胞構築用プラスミド pgag-polgpt 及び、penvAm の比較

pgag-polgpt と penvAm は、どちらも Ψ パッケージングシグナルと 3'-LTR を持たないので、GP+envAm12 細胞が内在性のパッケージングシグナルと 3'-LTR を持つことはなく、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞の作製途上で使用されるパッケージング細胞株 GP+E-86 も同様に、NIH 3T3 細胞に pgag-polgpt プラスミド DNA と pEnv プラスミド DNA をエレクトロポレーションにより遺伝子導入し、薬剤選択により株化して樹立されたものである。

以上のことから、パッケージング細胞株 GP+E-86 と GP+envAm12 で作製したウイルスが RCR を含む可能性は極めて低く、これらのパッケージング細胞株は安全であると考えられる。

1996 年に、Chong H ら (72) によりパッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが初めて報告された。このことは、GP+envAm12 を用いても RCR 出現の可能性を完全には否定できないことを示唆している。その頻度を正確に推定することは不可能であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されおらず、極めて低い頻度と考察されている (73)。

Ⅶ. 1.4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必要な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうる。しかしながら、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。

Ⅶ. 1.5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としてのドナー T リンパ球に *ex vivo* で HSV-TK 遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経たあと患者に投与する。使用したレトロウイルスベクター-SFCMM-3 はこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化されるため、たとえわずかに混入したレトロウイルスベクター粒子が患者体内に投与されたとしても、それが原因で患者体内において遺伝子が導入される蓋然性は低い。

また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入したドナー T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入されることはない。

Ⅶ.1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作にじゅうぶんな知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

遺伝子導入操作はP2レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で、また開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラスII安全キャビネット内で行う。更にレトロウイルスベクターを含む全廃液は高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクター-SFCMM-3の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3は、増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は、大量のRCRが患者体内に存在しない限り非常に低い。

Ⅶ.1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その位置によって生存や増殖等の細胞機能に影響を及ぼすことがある。挿入変異と呼ばれる事象で、細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合にはその細胞は死に至る可能性がある。しかしながらこのような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの末端反復配列(LTR)が有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、当該細胞が無限増殖する可能性がある。

Ⅶ.1.8 がん原性の有無

レトロウイルスベクターの組込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおりがん原性の問題が出現する。実際にCD34陽性細胞を標的としたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)のフランスでの遺伝子治療において合計4例のT細胞白血病の発症が報告されている(74-76)。報告された事象は、1)免疫系が未熟な幼少の患者を対象としていること、2)遺伝子導入細胞が、分化・増殖能が旺盛な造血幹細胞であること、3)導入遺伝子(IL-2受容体 γ_c)は細胞増殖に直接関与する機能を有すること、等、特殊な事情が重なって重篤な副作用を招いた可能性が示唆されている。このような背景より、欧米ではX-SCID以外のレトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療臨床応用は、既に再開されている。なお、同様にX-SCIDに対し、レトロウイルスベクターによりIL-2受容体 γ_c 鎖遺伝子をCD34陽性細胞に導入するイギリスでの遺伝子治療においても、10例中1例に白血病が発症したことが2007年12月に報告された(77,78)。また、CD34陽性細胞を標的とした慢性肉芽腫症(CGD)のド

イツでの遺伝子治療において、2例中2例の骨髓異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている(79, 80)。一方、CD34陽性細胞を標的としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10例中8例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいてがん化が見られなかったと報告されている(81)。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで白血病化の報告はない(55-58, 60)。

本遺伝子治療は、1) 対象が造血幹細胞移植を要する成人の白血病患者であること、2) 分化した成熟リンパ球への遺伝子導入であること、3) 導入遺伝子(HSV-TK 及び Δ LNGFR) は、安全装置及びマーカーであること、と言ったより安全性が高い臨床計画と考えられている。なお、本臨床研究の実際においては、IL-2 依存的増殖試験により遺伝子導入 T リンパ球が *in vitro* で異常増殖しないことを確認する。また、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖性を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) ^{*12} によってモニタリングすることにより、評価する予定である。

なおこれまでに 17 の独立した研究機関による動物モデル試験及び計 31 例の白血病又は再発白血病の患者を対象とした臨床研究の結果をまとめたレトロスペクティブなデータ解析により、 Δ LNGFR 遺伝子を導入した細胞を投与しても、がん化の誘導を支持するようなデータが得られなかったことが Bonini C らにより報告されている(51)。

Ⅶ.2 遺伝子産物の安全性

Ⅶ.2.1 HSV-TK 遺伝子の異常発現

導入遺伝子の構成分子である HSV-TK 遺伝子の発現産物である HSV-TK は、ウイルス特有のチミジンキナーゼで、ヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なった基質特異性を有している。すなわち、通常のヒト細胞内ではリン酸化されず、ヌクレオシドアナログとして既に臨床上の安全性が認められている GCV や ACV をリン酸化することが知られている。すなわち、GCV 又は ACV がプロドラッグとして投与された場合、HSV-TK 発現細胞では、GCV 又は ACV は細胞内でリン酸化され、更に内在性グアニル酸キナーゼとチミジンキナーゼにより二、三リン酸化物へと変換され、この最終産物の三リン酸化物が DNA ポリメラーゼ阻害や DNA 伸長傷害を起こし、細胞死を誘導する(49, 53)。図 20 に HSV-TK/GCV 自殺システムを図示する。

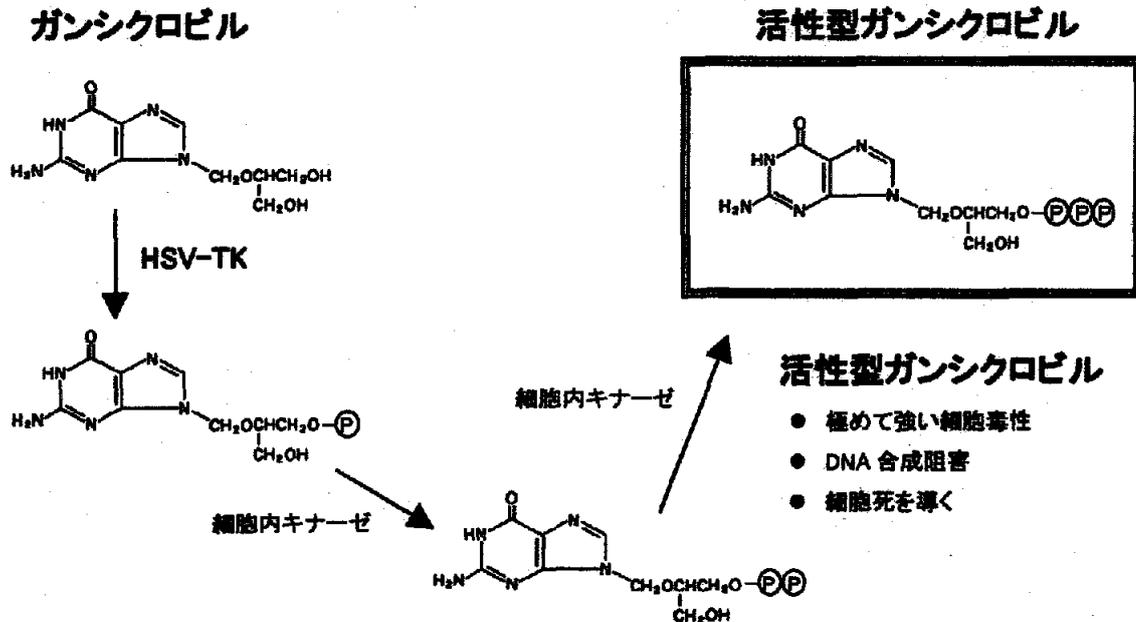


図 20 HSV-TK/GCV 自殺システム

一方、HSV-TK を発現しない細胞では、GCV 又は ACV は未変化のままであり、毒性を示さない。したがって、HSV-TK は、GCV との組み合わせにより選択的自殺作用 (HSV-TK/GCV 自殺システム) を示す分子であり、発現そのものの毒性はないと考えられる。

また、GCV 等のプロドラッグ非存在下、HSV-TK が触媒する反応は通常の細胞内で行われている代謝反応であり、遺伝子過剰発現による体細胞への影響は小さいものと思われる。ただし、HSV-TK がヒトにとって異種たん白質であることから、HSV-TK 遺伝子発現細胞の投与を受けた患者において免疫原となり、患者体内で HSV-TK 発現細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) が誘導されることが過去の遺伝子治療臨床研究で示唆されている (57)。実際、同遺伝子治療を行ったイタリアの症例においても、遺伝子治療を受けた患者において CTL の誘導が報告されている (82)。このことは CTL による患者体内からの HSV-TK 遺伝子発現ドナー T 細胞の排除を意味しており、GVM 効果の長期継続に対する障害となっている。過去の症例から遺伝子導入リンパ球の投与回数と CTL の出現頻度はある程度相関していることから、投与回数を減らすことで CTL の誘導を抑えられることができる可能性がある。また、イタリアの症例で観察された CTL は全て HSV-TK 発現細胞に対するものであり、この CTL が患者自身の細胞に影響を及ぼすことはないと思われるが、遺伝子治療後はこれら CTL の動態について注意深く観察する必要がある。

VII. 2.2 HSV-TK/GCV 自殺システムの臨床実績

HSV-TK/GCV 自殺システムに関しては、イタリアで 2 件、フランスで 1 件、アメリカで 1

件の臨床実績がある(42, 51, 82-87)。これらでは、遺伝子導入に用いられたレトロウイルスベクターや遺伝子導入細胞の調製法が一部異なるものの、GCV 製剤との組み合わせによる自殺機能は、いずれの臨床研究でも確認されている。

すなわち、計 52 例の HSV-TK 遺伝子導入細胞投与例のうち、急性 GVHD 発症に対して GCV 製剤が投与された症例が 8 例、慢性 GVHD 発症に対して GCV 製剤が投与された症例が 3 例、CMV 感染症で GCV 製剤が投与された症例が 8 例あるが、これら 19 例の症例では、GCV 製剤の投与により、慢性 GVHD で効果が部分的であった症例 1 例(イタリアの臨床研究)(51, 83)と、急性 GVHD を発症したものの最初から遺伝子導入細胞の血中レベルが低かった 1 例(フランスの臨床研究)(87)を除き、残りの 17 例において、HSV-TK 遺伝子導入細胞数が検出限界以下に又は顕著に減少しており、自殺機能がヒトにおいて発揮されることが確認されている。いずれにおいても、本自殺システムに関連する有害事象は報告されていない。

Ⅶ. 2. 3 ΔLNGFR 遺伝子の異常発現

LNGFRはNGFに対する膜貫通型の受容体である。LNGFRは主として神経系細胞で発現しているが、これ以外では筋肉、精巣で発現しており、殆どの造血系細胞には発現していない(45)。ΔLNGFRは細胞内領域を欠損させており、細胞外領域及び細胞膜貫通領域を有するたん白質であるため、内因性のNGFや抗体を含む外来性リガンドに反応して細胞内シグナル伝達を発揮することはなく、発現細胞に対して標識以外の影響を与える可能性は低い。実際、Bonini Cらの報告(51)により、今回の臨床研究で用いるレトロウイルスベクター-SFCMM-3と同じΔLNGFR遺伝子を別のレトロウイルスベクター-SFCMM-2により活性化ヒトTリンパ球に導入し、NGF濃度依存的な、i)細胞増殖、ii) CD25発現、及びiii) 腫瘍壊死因子(TNF)-α産生による細胞傷害活性を経時的に調査した結果、遺伝子導入ヒトリンパ球は、遺伝子非導入ヒトリンパ球と同様に、NGFに対する反応を示さないことが確認されている。また、SFCMM-3及び類似のベクターであるSFCMM-2を用いた遺伝子治療例においても細胞傷害性は報告されていない。ΔLNGFRマーカー遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入したマウス骨髓細胞を別のマウスに移植し、更に、再移植を繰り返して長期観察した結果、レトロウイルスベクターがEvi1遺伝子内に挿入されたことによるプロトオンコジーン¹³活性化が原因と考えられる白血病が高率に発症したとの報告(88)があるが、実際のメカニズムの詳細は明らかとされていない。

Ⅶ. 3 細胞の安全性

Ⅶ. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す遺伝子導入細胞の調製にかかわる全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置された P2 レベルの無菌細胞調整施設内にて、タカラバイオ(株)からの技術提供と助言を受け行われる。

本臨床研究に用いるレトロウイルスベクターSFCMM-3はイタリア・モルメド社により製造され、総括責任者が輸入して受入れ試験(参考資料5参照)を行い、国立がんセンター中央病院11階の施設可能な製剤保管室に設置した超低温フリーザー(-80℃)に保管する。レトロウイルスベクターSFCMM-3を用いたAdd-back用遺伝子導入Tリンパ球調製工程の概略を以下に、調製フローを参考資料6に示す。なお、本細胞調製工程は、第10日目の遺伝子導入細胞の濃縮・洗浄・懸濁液をRPMI 1640に変更している点のみが参考資料6に記載の調製フローと異なる。

第0日: Add-back 3回分に必要な遺伝子導入細胞数(2.1×10^7 個/kg)及び患者の体重から、培養ユニット数を決定し、培養ユニットに応じた以下の個数を満たすドナーリンパ球を採取し、遺伝子導入細胞の調製に使用する。

培養ユニット数	1	2	3	4
培養に必要な生細胞数(個)	1.5×10^9 以下	1.5×10^9 超 3.0×10^9 以下	3.0×10^9 超 4.5×10^9 以下	4.5×10^9 超 6.0×10^9 以下

セルプロセッサを用いてドナーリンパ球の濃縮とPBS/11.8% ACD-A液による洗浄を行ったあと、生細胞数及び細胞生存率を測定する。抗CD3抗体(30 ng/mL)を添加した培養用培地(基本培地GT-T503、620~720 IU/mL rhIL-2、1~3%非働化ドナー血漿、0.2%ヒト血清アルブミン及び2.5 µg/ml アムホテリシンB含有。)にドナーリンパ球を $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mLとなるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、37℃、5% CO₂インキュベーター内にて培養を開始する。

基本培地GT-T503の組成を参考資料7に示す。

第2日: 第0日から培養した活性化Tリンパ球の生細胞数及び細胞生存率を測定し、セルプロセッサを用いて細胞を濃縮し回収する。細胞濃縮液の濃度を 1×10^7 個/mLに調整した後、等量のレトロウイルスベクターSFCMM-3(感染タイター: 0.72~ 2.16×10^6 Infectious units; IFU/mL)と混合し、硫酸プロタミンを添加する(4 µg/mL)。これを遠心感染用バッグに移して1000×g、32±3℃で2時間遠心し、遺伝子導入を行う。次に、細胞を回収し、セルプロセッサで濃縮とPBSによる洗浄を行った後、新鮮な培養用培地に懸濁し、培養する。

第3日: 第2日と同様の遺伝子導入操作を行う。

第6日: 遺伝子導入率の測定を行う。遺伝子導入率は、マウス抗LNGFR抗体を用いたフローサイトメトリーにより測定した細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体(ΔLNGFR)陽性細胞の割合とする。セルプロセッサを用いて細胞の濃縮とSB[PBS+0.04 mL/mL プミネート(アルブミン最終濃度1.0%) + 0.01 mL/mL 輸血用チトラミン「フソー」(クエン酸Na最終濃度0.1%)]による洗浄を行った後、ヒトIgGでブロッキング(最大使用量を15 mLとして、 4×10^6 個の細胞あたり1 mLのガンマガードを使用)してから抗LNGFR抗体を添加(最大使用量を2.5 mgとして、

5×10⁶個の細胞あたり1μgの抗体)し、反応させる。細胞をSBで洗浄した後、MgSO₄液(0.3 mLのマグネゾール)、組換えヒトDNase(5 mLのPulmozyme)及びマウスIgGに対する二次抗体結合磁気ビーズ(最大使用量を20 mLとして、1×10⁶個の細胞あたり12.5 μLの磁気ビーズ)を加えて反応させ、磁気細胞分離装置を用いて磁気ビーズに結合したΔLNGFR陽性細胞を選択する。得られた細胞はセルプロセッサにより培養用培地に懸濁し、培養する。

第7日: 磁気細胞分離装置により細胞培養液中の磁気ビーズと遺伝子導入細胞を含む懸濁液を分離する。分離した遺伝子導入細胞は培養用培地に0.5(±0.05)×10⁶個/mLとなるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグにて37°C、5% CO₂インキュベーター内にて培養する。磁気ビーズ面分も培養用培地に懸濁し、ガス透過性培養用バッグにて37°C、5% CO₂インキュベーター内にて培養する。

第8日: 第7日に培養を開始した磁気ビーズ面分から、第7日と同様の操作により磁気ビーズを除去する。

第10日: セルプロセッサを用いて細胞の洗浄と濃縮をRPMI 1640で行い、0.5×10⁷細胞/mLから10×10⁷細胞/mLとなるようにRPMI 1640に懸濁する。その後、ヒト血清アルブミン(ブミネート)含細胞凍害保護液(CP-1)と1:1の割合で混合する。ヒト血清アルブミン含CP-1と混合した遺伝子導入Tリンパ球は、投与に必要な細胞数に相当する液量を凍結保存専用バッグに充填したのちに温度管理されたディープフリーザー(-80°C)にて凍結し使用時まで保存する。

RPMI 1640及びCP-1の組成を参考資料8及び9に示す。

投与日: 冷凍保存された遺伝子導入Tリンパ球を投与直前に37°C温浴にて急速に解凍し、投与する。

Ⅶ.3.2 培養細胞の純度

培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、各ドナー細胞への遺伝子導入は日時を変えて行う。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置したP2レベルの無菌細胞調整施設内にて、タカラバイオ(株)からの技術提供と助言を受け行われる。細胞の取扱いはクラスIIの安全キャビネット内で行われ、感染性微生物の混入を防ぐとともにレトロウイルスベクターSFCMM-3の環境中への拡散を防止する。

Ⅶ.3.3 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

遺伝子導入細胞の分離にあたっては、抗LNGFR抗体及び磁気ビーズを用いて遺伝子導入細胞を選択する。この選択によりΔLNGFR陽性率が90%以上のTリンパ球が得られることが知られている。また、過去の症例においても、レトロウイルスベクターSFCMM-3により遺伝子導入したTリンパ球は非導入細胞と同様に、Tリンパ球としての機能を保持しており、このことから遺伝子導入による末梢血T細胞の表現型の大きな変化はないものと考えられる。

なお本研究では、投与細胞の性質を同定するため、培養各段階において各種細胞表面マーカーに対する抗体を用いて投与細胞の特徴を解析する予定である。

Ⅶ. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性

投与する細胞はレトロウイルスベクター-SFCMM-3 により遺伝子導入したドナー由来の末梢血 T 細胞である。現在、白血病に対する治療としてドナー由来の末梢血リンパ球を患者に投与するドナーリンパ球輸注は広く行われており、ドナーT 細胞の投与は、GVHD 以外に患者に重大な影響を及ぼすことはない。

遺伝子導入細胞は、冷凍保存前の細胞を試験検体として採取し、参考資料 10 に示す試験によって品質が担保される。品質試験は国立がんセンター中央病院、または外部委託機関にて実施する。細胞生存率（トリパンブルー）と Δ LNGFR 発現試験については遺伝子導入細胞調製当日に、国立がんセンター中央病院において実施する。その他の試験については、採取した試験検体を凍結して外部委託機関に送付し、試験を実施する。

1. 細胞生存率（トリパンブルー）
2. エンドトキシン試験（日本薬局方）
3. Δ LNGFR 発現試験
4. RCR 試験（RT-PCR 法）
5. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
6. 無菌試験（日本薬局方）
7. RCR 試験（増幅法）
8. マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
9. GCV 感受性試験
10. IL-2 依存的増殖試験

なお、品質試験項目のうち、細胞生存率（トリパンブルー）、エンドトキシン試験（日本薬局方）、 Δ LNGFR 発現試験、RCR 試験（RT-PCR 法）及びマイコプラズマ否定試験（PCR 法）についていずれも適合の場合に、遺伝子導入細胞について仮合格として被験者に適切な時期に Add-back される。試験結果を得るまでに日数を要する試験項目である無菌試験（日本薬局方）、RCR 試験（増幅法）、マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法及び指標細胞を用いた DNA 染色法）、GCV 感受性試験及び IL-2 依存的増殖試験については、Add-back をする時点では結果が得られていない場合も考えられるが、万一不合格となった項目があれば、その時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。

遺伝子導入した細胞は閉鎖系で凍結保存専用バッグに充填・密封し、ディープフリーザー（ -80°C ）にて凍結保存するため、保存の間に外部からの細菌やエンドトキシン等の混入はなく安全が担保される。また、唯一冷凍保存による劣化の可能性がある細胞生存率につ

いて、細胞調製 10 日目に専用バッグに充填する際に品質試験用としてバイアルに充填する最終産物を、投与の前日以前に 37℃温浴にて急速に解凍し細胞生存率の確認（70%以上の生存率）を行い、Add-back が行われる。