

2. 遺伝子治療臨床研究 実施計画書（変更後）

目次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称	- 6
2. 研究者の氏名、所属部局、役職、役割	
2-1. 総括責任者氏名およびその担当する役割	- 7
2-1. 副総括責任者氏名およびその担当する役割	- 7
2-3. 総括責任者以外の研究者氏名およびその担当する役割	- 7
2-4. 研究協力者	- 8
3. 実施施設の名称およびその所在地	- 9
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	- 10
5. 同種造血幹細胞移植後の再発白血病を対象疾患に選んだ理論的根拠	
5-1. 臨床的背景	- 12
5-2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要	- 13
5-3. 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由	- 14
6. 遺伝子および遺伝子導入方法	
6-1. ヒトに導入する遺伝子の構造と性質	- 17
6-1-1. ヒトに導入する遺伝子の構造	
6-1-1-1. ヒト低親和性神経成長因子受容体	- 17
6-1-1-2. ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ	- 20
6-1-2. 導入する遺伝子の性質ならびに導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性	- 22
6-2. 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由	- 22
6-3. 遺伝子導入方法の概略および当導入法を選択した理由	- 23
6-4. ウイルスペクターを用いた遺伝子導入	
6-4-1. 野生型ウイルスの生物学的特徴およびヒトに対する影響	- 23
6-4-2. ウイルスペクターの作製方法	- 24
6-4-3. ウイルスペクターDNA の構造	- 27
6-4-4. ウイルスペクターの生物学的特徴	- 27
7. これまでの研究成果	
7-1. 培養細胞等を用いた研究の成果	- 28
7-1-1. 末梢血リンパ球への遺伝子導入率	- 28
7-1-2. 抗 LNGFR 抗体による遺伝子導入細胞の分離度	- 29
7-1-3. GCV 投与による遺伝子導入細胞の細胞死の程度	- 29
7-1-4. Bystander 効果の影響	- 29

7-1-5. 培養細胞を用いた追加実験	- 30
7-2. 実験動物を用いた研究の成果	- 30
7-3. これまでの遺伝子治療臨床研究の成果	- 31
7-4. 関連する研究の成果	- 33
7-4-1. イタリアの症例	- 33
7-4-2. アメリカの症例	- 33
7-4-3. フランスの症例	- 34
7-5. 当該遺伝子治療関連症例の臨床結果のまとめ	- 36
8. 安全性についての評価	
8-1. 遺伝子導入方法の安全性	
8-1-1. 遺伝子導入に用いられるウイルスベクターの純度	- 37
8-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性	- 46
8-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性	- 46
8-1-4. 遺伝子導入に用いられるウイルスベクターの細胞傷害性	- 46
8-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	- 46
8-1-6. 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性	- 47
8-1-7. 染色体へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	- 47
8-1-8. 癌原性の問題	- 47
8-2. 遺伝子産物の安全性	- 48
8-2-1. HSV-TK	- 48
8-2-2. ΔLNGFR	- 49
8-3. 細胞の安全性	
8-3-1. 培養細胞の純度	- 49
8-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性	- 50
8-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性	- 50
9. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠	- 51
10. 遺伝子治療臨床研究の計画	
10-1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	- 52
10-2. 被験者の選択基準および除外基準	- 52
10-2-1. 遺伝子治療実行委員会	- 53
10-2-2. 再発の定義	- 53
10-2-3. 被験者の選択基準	- 53
10-2-4. 被験者の除外基準	- 54
10-3. 被験者の同意の取得方法	- 54
10-3-1. 小児患者に対する同意の取得と患者・家族に対する 支援体制の構築	- 55
10-4. 実施期間および目標症例数	- 55
10-5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	

10-5-1. 対照群の設定方法	- 55
10-5-2. 遺伝子導入方法	
10-5-2-1. ドナーからの末梢血単核球の採取	- 56
10-5-2-2. ドナーリンパ球への遺伝子導入	- 56
10-5-2-3. 遺伝子導入細胞の選択	- 56
10-5-2-4. 遺伝子導入ドナーリンパ球の輸注	- 58
10-5-2-5. 急性 GVHD 発症時の対応	- 58
10-5-2-6. サイトメガロウイルス感染発症時の対応	- 58
10-5-2-7. 細菌、真菌感染症	- 58
10-5-3. 他の抗白血病療法との併用	- 59
10-5-4. 臨床検査項目および観察項目	- 59
10-5-5. 予想される副作用ならびにその対処方法	
10-5-5-1. ドナー末梢血リンパ球採取に伴うドナーへの危険性	- 60
10-5-5-2. ドナー末梢血リンパ球投与に伴う患者への危険性	- 60
10-5-5-3. RCR の危険性	- 60
10-5-6. 遺伝子治療臨床研究評価方法、評価基準および中止基準	
10-5-6-1. 遺伝子導入の評価方法	
10-5-6-1-1. 患者への遺伝子導入リンパ球投与前	- 61
10-5-6-1-2. 患者への遺伝子導入リンパ球投与後	- 61
10-5-6-1-3. 造血器悪性腫瘍の評価方法	- 62
10-5-6-1-4. GCV 投与にともなう GVHD 消退の評価	- 62
10-5-6-1-5. 副作用の評価方法	- 62
10-5-6-2. 脱落および中止基準	- 62
10-5-7. 症例記録に関する記録用紙等の様式	- 63
11. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況	- 64
12. 当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況	- 65
13. 研究者の略歴、研究業績	- 66
14. 参考文献	- 76

- 別添 1: 同意取得の際に用いられる説明および同意書(患者用)
- 別添 2: 同意取得の際に用いられる説明および同意書(ドナー用)
- 別添 3: 培養細胞を用いた追加実験の結果
- 別添 4: Bordignon 博士と Bonini 医師の同意書
- 別添 5: 略号一覧
- 別添 6: SFCMM-3 ベクターの全 cDNA 配列
- 別添 7: Performance Status
- 別添 8: 急性 GVHD の Grade
- 別添 9: DLT 治療効果の判定基準
- 別添 10: 薬物有害反応判定基準
- 別添 11: 遺伝子治療を行う施設の見取り図
- 別添 12: Verzeletti S. et al. Herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer for controlled graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia: clinical follow-up and improved new vectors. Hum Gene Ther 9: 2243-2251, 1998.
- 別添 13: Markowitz D. et al. Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line. Virology 167: 400-406, 1988.
- 別添 14: Bonini C. et al. HSV-TK gene transfer into donor lymphocytes for control of allogeneic graft-versus-leukemia. Science 276: 1719-1724, 1997.
- 別添 15: Tiberghien P. et al. Administration of herpes simplex-thymidine kinase-expressing donor T cells with a T-cell-depleted allogeneic marrow graft. Blood 97: 63-72, 2001.
- 別添 16: SRL社の増殖性レトロウイルス(RCR)検出法の信頼性

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究

2. 研究者の氏名、所属部局、役職、役割

2-1. 総括責任者氏名およびその担当する役割

長澤 俊郎

筑波大学・臨床医学系血液内科・教授

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、実施計画書の作製および実施施設長への提出、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・予期せぬ事態等の施設長および審査委員会への説明・報告

2-2. 副総括責任者氏名およびその担当する役割

小野寺 雅史

筑波大学・臨床医学系血液内科・講師

ウイルスベクター全般に関する情報の収集、ならびに安全管理・遺伝子導入条件の設定および遺伝子導入細胞の動態解析

2-3. 総括責任者以外の研究者氏名およびその担当する役割

※は新研究者

氏名	所属部局	役職	役割分担
小島 寛	筑波大学・臨床医学系	助教授	患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定 (内科)
松井 陽	筑波大学・臨床医学系	教授	患者の選定、患者への説明および同意の取得、治療効果の判定 (小児科)
長谷川 雄一	筑波大学・臨床医学系	講師	内科的診療 (内科)
須磨崎 亮	筑波大学・臨床医学系	助教授	内科的診療 (小児科)
福島 敬	筑波大学・臨床医学系	講師	内科的診療 (小児科)
清水 崇史	筑波大学・臨床医学系	講師	内科的診療 (小児科)
大塚 藤男	筑波大学・臨床医学系	教授	移植片対宿主病の診断
野口 雅之	筑波大学・基礎医学系	教授	移植片対宿主病の診断
松井 良樹	筑波大学・臨床医学系	助教授	末梢血単核球分離・細胞保存
大津 真	筑波大学・臨床医学系	講師	ウイルスベクターの安全管理・PCRを用いた遺伝子導入細胞のクロナリテイの解析
金子 新	筑波大学・臨床医学系	講師	遺伝子導入細胞の動態解析
中内 啓光	東京大学医科学研究所	教授	免疫学的検査の管理と指導
坂巻 壽	都立駒込病院血液内科	部長	適応患者の選定 (内科)
大橋 一輝	都立駒込病院血液内科	医員	適応患者の選定 (内科)
土田 昌宏	茨城県立こども病院小児科	部長	適応患者の選定 (小児科)
小池 和俊	茨城県立こども病院小児科	医員	適応患者の選定 (小児科)
加藤 俊一	東海大学総合医学研究所	教授	適応患者の選定 (小児科)

2-4. 研究協力者

本臨床研究を立案するにあたり、過去に同様の遺伝子治療を行ったイタリア H.S. Raffaele 研究所のディレクター Bordignon 博士、および Bonini 医師より治療結果の多大なる情報を得た。また、本臨床研究を実行するにあたり、治療用ウイルスベクターの供与、および遺伝子治療全体に対する助言をお願いする予定である（同意書を別添 4 に示す）。

3. 実施施設の名称およびその所在地

名称：筑波大学附属病院

所在地：つくば市天久保2丁目1-1

TEL: 0298-53-3900 FAX: 0298-53-3904

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

これは同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子導入リンパ球を用いたドナーリンパ球輸注療法 (donor lymphocyte transfusion : DLT) の安全性、およびその有効性を確認する臨床第 I、II 相試験のプロトコールである。現在、同種骨髄あるいは末梢血造血幹細胞移植後に白血病を再発した患者に対し、移植片対白血病反応 (Graft versus Leukemia reaction : GVL 反応) を期待した DLT が広く行われ、一部の白血病に対し著しい治療効果をあげている。しかし一方で、時に併発する重篤な移植片対宿主病 (Graft versus Host disease : GVHD) の問題から、DLT の適応範囲が厳しく制限され、造血幹細胞移植後に再発した白血病の治療法の選択に苦慮しているのが実状である。

本研究の原理は DLT の際に使用されるドナー末梢血リンパ球にレトロウイルスベクターを用いて HSV-TK 遺伝子を導入し、これら遺伝子導入ドナーリンパ球を患者に投与することで GVL 効果を期待し、さらには不幸にして重度の GVHD 出現の際にはガンシクロビル (GCV) を投与することでドナー T 細胞を死滅させ GVHD の沈静化を図るものである。

当該遺伝子治療においては、治療として DLT が考慮される同種造血幹細胞移植後の再発白血病 (慢性骨髄性白血病 chronic myelogenous leukemia : CML、急性骨髄性白血病 acute myelogenous leukemia : AML、急性リンパ性白血病 acute lymphoblastic leukemia : ALL)、ならびに骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome : MDS) が対象疾患となる。

本研究の主目的は、HSV-TK 遺伝子導入ドナーリンパ球の安全性、GVL 効果、および GCV 投与による GVHD の沈静化を検討することであり、各々の目的の達成は以下の点により評価される。

1. 安全性

遺伝子導入操作の安全性:

エンドトキシン、無菌性、細胞状態より判定される。

遺伝子導入細胞の安全性:

RCR の存在、遺伝子導入細胞の増殖能により判定される。

2. GVL 効果

「DLT 治療効果の判定基準 (別添 9)」に基づき、各々の疾患に対する HSV-TK 遺伝子導入ドナー T 細胞の治療効果を判定する。統計学的検討が可能ならだけ症例数が集積できれば、現行の治療成績との比較・検討を行う。

3. GCV 投与による GVHD の沈静化

GVHD 発症時に GCV の投与を行った症例に対し、その GVHD 沈静化の程度を「急性 GVHD の Grade (別添 8)」を参考に判定する (例 皮膚 III→0)。また、同時に抗 LNGFR 抗体を用いた FACS 解析ならびに HSV-TK 遺伝子に対

する polymerase chain reaction (PCR) 法にて遺伝子導入細胞の推移を測定する。CMV 発症の際に GCV を投与した症例に関しては、上記 FACS、PCR にて遺伝子導入細胞の推移を検討し、GCV 投与による遺伝子導入細胞の排除率を測定する。

また副目的として、PCR 法などを用いた長期にわたる治療対象患者体内でのドナーリンパ球の動態解析やヒトにとって異種タンパクである HSV-TK の発現が宿主の免疫に及ぼす影響も検討する。