

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

同種造血幹細胞移植は CML、AML、ALL、ならびに MDS などの造血器悪性腫瘍の根治療法として広く導入され、これらの疾患の治療成績を飛躍的に向上させた(1、2)。造血幹細胞移植によって白血病が治癒に向かう過程において、移植前処置としての抗癌剤の大量投与、全身放射線照射のみならず、ドナーリンパ球による白血病細胞排除(GVL 効果)が重要である。しかし、一方でドナーリンパ球は GVHD と呼ばれる免疫反応も引き起こす。GVHD とは、移植されたドナーリンパ球が宿主を攻撃する同種造血幹細胞移植に特有の免疫反応であり、移植後 GVHD の制御は移植の成功の鍵を握ると言っても過言ではない。GVHD と GVL は表裏一体の関係にあり、ともにドナーTリンパ球が司る免疫反応であると考えられている。従って GVHD を起こすことなく GVL を誘導することが、骨髄移植の治療成績向上には重要である。実際の臨床の場合において GVL 効果のみを直接的に観察することは困難であるが、以下の事象は GVL 効果の重要性を示唆するものである。

1. 同種造血幹細胞移植後、免疫抑制剤の中止により GVHD が発症すると、白血病が寛解に至ることがある(3)。
2. 同種造血幹細胞移植に比べて同系造血幹細胞移植では移植後再発率が高い(4)。
3. GVHD の発症例は非発症例に比し、白血病の再発率が低い(5)。
4. T細胞除去造血幹細胞移植では、GVHD の頻度が減少するものの、移植後における白血病の再発率が高い(6)。

近年、移植成績の向上に伴い、移植後の造血器悪性腫瘍再発が臨床上の重要な問題として注目されるようになった(2)。従来、移植後の再発性造血器悪性腫瘍に対して、化学療法、再移植などの治療法が選択されてきたが、その治療成績は必ずしも満足のものではなかった。移植後再発に対して化学療法を選択した場合、AML の 32~45%、ALL の 42~55%で再寛解導入が可能であるが(7、8)、長期生存者は 5%にすぎないことが報告されている(9、10)。一方、再移植を行った症例のうち 20%前後が長期生存したことが報告されているが、治療関連死亡率が 40%と高率である(11)。1990 年に Kolb らは、CML 移植後再発症例に対して、DLT が著効することを報告した(12)。この治療法はドナーリンパ球を輸注することによって GVL 効果を誘導し、再寛解を導入することを意図したものである。Kolb らの最初の報告は CML 移植後再発3例について検討したものであったが、対象疾患および症例数を拡大して行われたその後の追試では、CML の 72%、AML の 29%、MDS の 25%が DLT によって完全寛解に至ったと報告されてい

る(13)。同様の臨床試験は多くの施設で行われ(14、15)、特に CML の移植後再発例に関しては、DLT が標準的治療法として認められるまでになった(16)。これに比べ AML、ALL、MDS 等の疾患では治療成績が悪いことも確認されたが、これら疾患においても大量のドナーリンパ球を輸注すること、または PCR 法などの高感度の検査法により再発を早期に診断し、十分量の細胞を用いた DLT を施行することで(17、18)、治療成績が改善する可能性も否定できない。

DLT の主たる副作用として GVHD と骨髄抑制がある。GVL 効果と GVHD は表裏一体の免疫反応であり、DLT 療法の副作用としての GVHD を完全に回避することは困難である。前述の Kolb らの追試によれば、DLT 療法を受けた 135 人の患者のうち 41 人(34%)に重症(grade II 以上)の急性 GVHD が発症した(13)。このため、最近では GVL 効果を残したままで GVHD を抑えるための様々な試みが行われている(19-22)。特に注目されるのは、DLT に用いるリンパ球数を徐々に増加させ、繰り返し投与する escalating dose regimen (EDR)法である。Dazzi らの non-randomized trial によれば、EDR によって治療効果に影響を与えることなく、重症の急性 GVHD の頻度を、45%から 10%に減少させることが可能であった(23)。しかしながら今日、DLT 療法にともなう GVHD を完全に制御することは困難であり、このために投与可能なドナーリンパ球数が制限されている。先にも述べたとおり、AML、ALL、MDS などの疾患では、輸注するドナーリンパ球数を増加させれば治療成績が改善する可能性もあり、GVHD が回避されればさらに有効な治療法が開発されるとも考えられる。

一方、DLT 後の骨髄抑制は、前述の Kolb らの臨床試験において 34%の症例に合併したと報告されている(13)。再発後 DLT を行う時期にドナー細胞がどれだけ骨髄に残存しているかが、骨髄抑制の合併を予測する重要なファクターであることから、再発を早期に診断し DLT を行うことが重要である(25、26)。

5-2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要

いわゆる“自殺遺伝子”を発現した細胞は、非発現細胞に対して全く毒性を示さないある種の薬剤に対して強い感受性を示し、この薬剤の存在下で死に至る。代表的な自殺遺伝子としては HSV-TK が挙げられ、HSV-TK を発現した細胞は GCV に対し強い感受性を示し、実際 *in vivo* においても HSV-TK 発現細胞が GCV 投与によって生体内から排除されることが確認されている(26-29)。この HSV-TK 遺伝子の自殺システムを DLT 療法に組み入れたのが、今回の遺伝子治療臨床研究である。すなわち、再発白血病の治療としての DLT の際に、予めアフレーシスにより得られたドナー末梢血 T 細胞にレトロウイルスベクターを用いて HSV-TK 遺伝子を組み込み、これら HSV-TK 発現 T 細胞を患者に投与することで GVL 効果を期待し、仮に重篤な GVHD が発症した際には GCV を投与することでドナー T 細胞を死滅させ、GVHD の沈静化を図ることを目的としている。

本遺伝子治療臨床研究の治療効果、ならびに安全性の評価に関しては、HSV-TK 発現 T 細胞の患者に対する安全性や GVL 効果、GCV に対するドナー細胞の反応性、ならびに産生される HSV-TK 蛋白質に対する治療対象患者の免

疫反応などが評価の対象となる。

現在のところイタリアのグループは同様の遺伝子治療臨床研究を再発白血病患者に対して行い、重症のGVHDの際にGCVを投与することで、GVHDの沈静化が確認できたと報告している(詳細は7.3の「これまでの遺伝子治療臨床研究の成果」で示される)。さらにこの結果を受け、現在、イタリア、フランス、イギリス、ドイツ、オランダなどのヨーロッパ諸国、またアメリカにおいても再発白血病患者に対するHSV-TK遺伝子を用いた同様な遺伝子治療が計画、実行されている(30-33)。

5-3. 他の治療法との比較および当該遺伝子治療を選択した理由

同種造血幹細胞移植後のGVHDは時に重症化し、患者を致死的状态へと陥れることがある。その予防策として現在ではあらかじめ抗T細胞抗体等によるドナー細胞からのT細胞の除去や、移植後にサイクロスポリンなどの免疫抑制剤の患者への投与が行われているが、ドナー細胞からのT細胞の除去は移植細胞の患者骨髄への生着率を低下させ、白血病の再発率を高めることとなる(6)。一方、免疫抑制剤はドナー細胞の患者骨髄への生着に影響を与えず、GVL効果も認めることからGVHDの予防療法として使用されることが多いが(34)、GVHDの抑制効果は完全なものでなく、特に非血縁者やHLA部分一致の血縁者からの移植の際には、免疫抑制剤を使用してもGVHDが重篤化することがある(35)。さらには免疫抑制剤の使用が患者の免疫力を低下させ、重篤なサイトメガロウイルスやEBウイルス感染が起こり、時には致死的なリンパ腫(EBウイルス関連リンパ増殖性疾患:EBV-LPD)を惹起することもある(36)。このように現在のところ同種造血幹細胞移植の高い骨髄生着率や強いGVL効果を認めつつも、移植後のGVHDを完全に抑制できないための様々な問題が生じており、GVHDに対する新たな治療法の確立が望まれている。以上のことから同種造血幹細胞移植後の重篤なGVHDに対するHSV-TK/GCVの効果と安全性が臨床研究で検討されることは必須事項と思われる。さらに本研究でHSV-TK遺伝子を用いたDLT(TK-DLT)の有効性と安全性が確認されれば、今後は本遺伝子治療の広範囲な適応を目指し、移植の際にHSV-TK遺伝子を組み込んだドナーT細胞を造血幹細胞と一緒に投与する移植法(add-back法)(30、33)やミニトランスプラントとの併用による固形腫瘍の治療など、その応用範囲は拡大していくものと予想される。

当院および都立駒込病院におけるDLTの臨床成績は以下の通りである。

現在まで、筑波大学附属病院および都立駒込病院において合計8症例のDLTが試行された。8症例の内訳はCML2症例、Ph1陽性ALL1症例、その他のALL2症例、MDSからAMLへの進展例2症例、MDSから慢性骨髄単球性白血病(CMML)への進展例1症例であった。再発の状態はCMLの2症例、およびPh1陽性ALLではcytogenetic relapseであり、それ以外の症例は寛解期であった1症例を除いて全症例がhematological relapseであった。CD3の発現が解

析されなかった1症例を除いて、体重あたり $5.5-26.0 \times 10^7$ ($5.5-26.0 \times 10^7/\text{kg}$)のCD3陽性T細胞が患者に輸注された。筑波大学附属病院の2症例(#1, 2)は $5.0 \times 10^7/\text{kg}$ のCD3陽性T細胞から、治療効果およびGVHDの発症を観察しながら細胞数を増量し、4-8週ごとに輸注が繰り返された。都立駒込病院における6症例では、輸注が短期間に集中的に行われた。GVHDは8症例中4症例で認められ、いずれも重症であったが、投与した細胞数との明確な相関関係は認められなかった。DLTの治療成績は1症例でCRになったものの、他の症例ではほとんど治療効果が認められなかった。筑波大学附属病院のCML(#2)症例は現在も治療継続中である。以上より、DLTにおいて高い頻度でGVHDが発症することが確認され、またCD3陽性T細胞の投与数によりGVHDの発症は予測できないことが明らかになった。

当院および駒込病院における DLT の臨床成績

症例	施設	年齢/ 性別	診断 ¹⁾	再発 ²⁾	投与した CD3 陽性 細胞数 (投与回数)	効果 ³⁾	副作用 ⁴⁾	急性 GVHD ⁵⁾	転帰	死因
1	筑波	39 / 男	CML	Cy	7.0×10^7 (3)	NR	(-)	(-)	再移植で CR	
2	筑波	53 / 男	CML	Cy	14.5×10^7 (3)	NR	(-)	(-)	再発・生存	
3	駒込	35 / 男	Ph1ALL	Cy	5.5×10^7 (1)	CR	(-)	IV	CR・生存	
4	駒込	27 / 男	ALL	He	21.3×10^7 (3)	NR	(-)	III	DLT 5 月後死亡	原病
5	駒込	29 / 男	ALL	HeCR	20.5×10^7 (3)	NA	PT-LPD	IV	DLT 2 月後死亡	GVHD
6	駒込	23 / 男	MDS/AML	He	17.6×10^7 (3)	NR	(-)	(-)	再移植で CR	
7	駒込	49 / 男	MDS (CMML)	He	17.6×10^7 (3)*	NR	cytopenia	III	DLT 3 月後死亡	真菌感染
8	駒込	20 / 男	MDS (AML)	He	26.0×10^7 (4)	NR	(-)	(-)	CR・生存	

1) CML: 慢性骨髄性白血病、ALL: 急性リンパ性白血病、MDS: 骨髄異形成症候群、CMML: 慢性骨髄単球性白血病、AML: 急性骨髄性白血病

2) Cy: 細胞遺伝学的再発 (cytogenetic relapse)、He: 血液学的再発 (hematological relapse) HeCR: 血液学的再発後の寛解

3) NR: 効果なし、CR: 完全寛解、NA: 解析不可

4) PT-LPD: 移植後リンパ増殖性疾患、cytopenia: 血球減少症

5) 別添 5 参照

*: 症例 7 では投与したドナーリンパ球総数を表わす。

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

本臨床研究において発現する遺伝子はヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子とHSV-TK 遺伝子である。導入されるが発現しないベクターDNAなどの構造と性質は、6-4 の「ウイルスベクターを用いた遺伝子導入」の項で述べられる。

6-1-1. 人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

ヒト低親和性神経成長因子受容体 (human low affinity nerve growth factor receptor: LNGFR) は、1986 年 Johnson らによってヒトメラノーマ細胞株 A875 より単離された 1 回膜貫通型受容体分子で、427 アミノ酸をコードする 1281 塩基対と終止コドン TAG より成り立っている (37)。5' 末端に 28 アミノ酸のシグナルペプチドを有し、細胞膜外ドメインとして 6 個のシステイン残基を有する 40 個のアミノ酸が 4 回繰り返され、それに続きセリン/スレオニンリッチ領域、細胞膜貫通領域、および 155 個のアミノ酸を有する細胞内領域から成っている。今回使用する LNGFR は、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、細胞膜貫通領域、および細胞内領域の最も N 末端のアミノ酸より 9 番目の 841-843 番塩基対を終止コドンに変更することで、細胞外および細胞膜貫通領域の 280 アミノ酸をコードする 956 塩基対の遺伝子である (delta LNGFR: ΔLNGFR) (38, 39)。下記に ΔLNGFR の塩基配列とアミノ酸配列、および細胞内領域の変更部位を示す。SFCMM-3 ベクターの全 DNA 塩基配列上 (別添 6)、3157-4112 に相当する塩基対が ΔLNGFR の領域である。

ΔLNGFR 遺伝子の塩基配列

GGCCGCGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCCCTGGAGCGCAGCGCAGCCGAGCCCCAT 60
 ─────────────────────────────────── 5' UTR ───────────────────────────────────
 CAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCGCTGCCCGGGGAGGGCGGGCGATGGGG 120
 ─────────────────────────────────── 5' UTR ───────────────────────────────────
 MetGly
 GCAGGTGCCACCGCGCGCCATGGACGGGGCCGGCCTGCTGCTGTGTGCTGCTTCGGGG 180
 AlaGlyAlaThrGlyArgAlaMetAspGlyProArgLeuLeuLeuLeuLeuLeuLeuGly
 GTGTCCCTTGGAGGTGCCAAGGAGGCATGCCCCACAGGCCTGTACACACACAGCGGTGAG 240
 ValSerLeuGlyGlyAlaLysGluAlaCysProThrGlyLeuTyrThrHisSerGlyGlu
 TGCTGCAAAGCCCTGCAACCTGGGGGAGGGTGTGGCCACGCCCTGTGTGGAGCCAACCAGACC 300
 CysCysLysAlaCysAsnLeuGlyGluGlyValAlaGlnProCysGlyAlaAsnGlnThr
 GTGTGTGAGCCCTGCCCTGGACAGCGTGACGTTCTCCGACGTGGTGAGCCGGACCCGAGCCG 360
 ValCysGluProCysLeuAspSerValThrPheSerAspValValSerAlaThrGluPro
 TGCAAGCCGTGCACCGAGTGGCGTGGGGCTCCAGAGCATGTCCGGCCCGTGGGTGGAGGCC 420
 CysLysProCysThrGluCysValGlyLeuGlnSerMetSerAlaProCysValGluAla
 GACGACGCCGTGTGCCGCTCCGCCTACGGCTACTACCAGGATGAGACCGACTGGCCGCTGC 480
 AspAspAlaValCysArgCysAlaTyrGlyTyrTyrGlnAspGluThrThrGlyArgCys
 GAGGCGTGCCCGGTGTCCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCCTCCGAGGACAAGCAG 540
 GluAlaCysArgValCysGluAlaGlySerGlyLeuValPheSerCysGlnAspLysGln
 AACACCGTGTGCGAGGAGTGGCCCGCAGGCACGTATTCGACGAGGCCAACCCACGTGCAC 600
 AsnThrValCysGluGluCysProAspGlyThrTyrSerAspGluAlaAsnHisValAsp
 CCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCCGCGCAGCTCCGGGAGTGCACACGC 660
 ProCysLeuProCysThrValCysGluAspThrGluArgGlnLeuArgGluCysThrArg
 TGGGCCGACGCGGAGTCCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGATTACAGGTCCACACCCCCA 720
 TrpAlaAspAlaGluCysGluGluIleProGlyArgTrpIleThrArgSerThrProPro
 GAGGCTCGGACAGCACAGCCCCAGCACCCAGGAGCCTGAGGCACCTCCAGAACAGAC 780
 GluGlySerAspSerThrAlaProSerThrGlnGluProGluAlaProProGluGlnAsp
 CTCATAGCCAGCACGGTGGCAGGTGTGGTGACCACAGTGATGGCCAGCTCCAGCCCCGTG 840
 LeuIleAlaSerThrValAlaGlyValValThrThrValMetGlySerSerGlnProVal
 GTGACCCGAGGCACCACCGACAACCTCATCCCTGTCTATTCCTCCATCCTGGCTGCTGTG 900
 ─────────────────────────────────── TM ───────────────────────────────────
 ValThrArgGlyThrThrAspAsnLeuIleProValTyrCysSerIleLeuAlaAlaVal
 GTGTGGCCCTGTGGCCTACATAGCCTTCAAGAGGTGGAACAGGGGGATCCTCTAG 957
 ─────────────────── TM ─────────────────── ICD ───────────────────
 ValValGlyLeuValAlaTyrIleAlaPheLysArgTrpAsnArgGlyIleLeuTer

細胞内領域の変更部位

膜貫通領域

細胞内領域

LNGFR

GCC TTC
Ala Phe

AAG AGG TGG AAC AGC TGC AAG CAG AAC
Lys Arg Trp Asn Arg Cys Lys Gln Asn

ΔLNGFR

GCC TTC
Ala Phe

AAG AGG TGG AAC AGG GGG ATC CTC TAG
Lys Arg Trp Asn Arg Gly Ily Leu ***

6-1-1-2. ヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ

HSV-TK 遺伝子は 1980 年、Mcknight によりクローニングされたヒト単純ヘルペスウイルス 1 型 (strain CL101) のチミジンキナーゼ (ATP: thymidine 5' phosphotransferase, EC 2.7.1.21) である (40)。転写領域は単一エクソンよりなる約 1300 塩基対であり、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 アミノ酸をコードする 1128 塩基対と TGA を終止コドンとする 1131 塩基対に構成されている。今回使用する HSV-TK は、翻訳開始コドン ATG の上流に 14 塩基対の非翻訳領域を有し、376 アミノ酸をコードする 1128 塩基対を含む 1131 塩基対の遺伝子である。ベクターの全 DNA 塩基配列上 (別添 6)、1667-2794 に相当する塩基対が HSV-TK 遺伝子の領域である。

HSV-TK 遺伝子の塩基配列

ATGGCTTCGTACCCCTGCCATCAACACGGCTCTCGGTTCGACCAGGCTGGCGGTCTCCCGGCCATAGCAACCGACGTACGCCGTTGCCG 90
 MetAlaSerTyrProCysHisGlnHisAlaSerAlaPheAspGlnAlaAlaArgSerArgGlyHisSerAsnArgArgThrAlaLeuArg

 CCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAGTCCGCCTGGAGCAGAAATGCCACGGCTACTGCGGGTTTATATAGACGGTCTCTCACGGGATG 180
 ProArgArgGlnGlnGluAlaThrGluValArgLeuGluGlnLysMetProThrLeuLeuArgValTyrIleAspGlyProHisGlyMet

 GGGAAAACCACCACCACCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTCGGCGGACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCAGGTG 270
 GlyLysThrThrThrThrGlnLeuLeuValAlaLeuGlySerArgAspAspIleValTyrValProGluProMetThrTyrTrpGlnVal

 CTGGGGCTTCGAGACAATCCGGAACATCTACACCACACAACACCCCTCGACCAGGCTGAGATATCGGCCGGGACCGCCCGGTGGTA 360
 LeuGlyAlaSerGluThrIleAlaAsnIleTyrThrThrGlnHisArgLeuAspGlnGlyGluIleSerAlaGlyAspAlaAlaValVal

 ATGACAAGCGCCAGATAACAATGGCCATGCCTTATGCCGTGACCGACCGCGTCTCGGCTCCTCATGTCCGGGGGGAGCCTGGGAGTTCA 450
 MetThrSerAlaGlnIleThrMetGlyMetProTyrAlaValThrAspAlaValLeuAlaProHisValGlyGlyGluAlaGlySerSer

 CATGCCCGCCCGCCCGCCCTCACCCCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCCGCCCTCCTGTGCTACCCGGCCCGCGGATACCTTA 540
 HisAlaProProProAlaLeuThrLeuIlePheAspArgHisProIleAlaAlaLeuLeuCysTyrProAlaAlaArgTyrLeuMetGly

 AGCATGACCCCGCCAGGCGGTGCTGGCGTTCGTGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGCACAAACATGTTGGGGCCCGCCCTCCGGAG 630
 SerMetThrProGlnAlaValLeuAlaPheValAlaLeuIleProProThrLeuProGlyThrAsnIleValLeuGlyAlaLeuProGlu

 GACAGACACATCGACCCCTGGCCAAACGCCAGCGCCCGCCGCGAGCGGCTTGACCTGGCTATGCTGCGCCGGATTGCGCGGTTTACGGG 720
 AspArgHisIleAspArgLeuAlaLysArgGlnArgProGlyGluArgLeuAspLeuAlaMetLeuAlaAlaIleArgArgValTyrGly

 CTGCTTGCCAAATACGGTCCGGTATCTCCAGGGCCCGCGGTGCTGGTGGGAGGATTGGGGACAGCTTTCGGGAAGGCCCGTCCCGCCCGCAG 810
 LeuLeuAlaAsnThrValArgTyrLeuGlnGlyGlyGlySerTrpTrpGluAspTrpGlyGlnLeuSerGlyThrAlaValProProGln

 GGTGCCGACCCCGCAGCAACCGCCCGCCACGACCCCATATCCGGGACACGTTATTTACCCCTGTTTCGGGCCCGCCGAGTTGCTGGCCCCC 900
 GlyAlaGluProGlnSerAsnAlaGlyProArgProHisIleGlyAspThrLeuPheThrLeuPheArgAlaProGluLeuLeuAlaPro

 AACGGGACCTGTATAACGTGTTTCCTGGGCTTGGAGCTCTTGCCCAAACCGCCCTCCGTCATGCACGTCTTTATCCTGGATTACGAC 990
 AsnGlyAspLeuTyrAsnValPheAlaTrpAlaLeuAspValLeuAlaLysArgLeuArgProMetHisValPheIleLeuAspTyrAsp

 CAATGCCCGCCCGGCTCCCGGACCGCCCTGCTGCAACTTACCTCCGGATGGTCCAGACCCACGTCACCACCCCGAGGCTCCATACCGAGC 1080
 GlnSerProAlaGlyCysArgAspAlaLeuLeuGlnLeuThrSerGlyMetValGlnThrHisValThrThrProGlySerIleProThr

 ATCTGGACCTGCGCCGACGTTTGGCCGGGAGATGGGGAGGCTAACTGA 1131
 IleCysAspLeuAlaArgThrPheAlaArgGluMetGlyGluAlaAsnTer

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

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(41)。現在、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(42)。しかし、本臨床研究における LNGFR の使用目的は、ウイルスベクター導入細胞をマーキングすることで、これら導入細胞を非導入細胞から分離し、かつ DLT 後の患者体内での細胞動態解析を可能にすることにある。したがって、抗体による不必要な細胞内刺激を完全に抑制するため、LNGFR の細胞内領域を欠失させた細胞外及び細胞膜領域のみを有する Δ LNGFR を使用する。

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、グアノシンの類似物質であるアシクロビル (ACV) や GCV をリン酸化することが可能である(43, 44)。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 が細胞内でリン酸化され(一リン酸化物)、さらには内在性の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ていく。この最終産物である三リン酸化物が DNA ポリメラーゼ阻害や DNA の伸長障害を引き起こすことで細胞に強い傷害を与え、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。ただ、HSV-TK はウイルス由来のタンパク質であるためヒトに対し抗原性を有する。

いずれの遺伝子もレトロウイルスベクターにより宿主の染色体 DNA に組み込まれ、HSV-TK はウイルス LTR により、また Δ LNGFR は SV40 early promoter (SV) により発現され、その発現は持続的である。

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

本臨床研究の標的細胞はドナー由来の末梢血 T 細胞である。これは GVL 効果のメカニズムが未だ解明されていないものの、GVL 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T 細胞であることが多くの実験から支持されているためである。最近これら T 細胞が GVHD の原因となる T 細胞と異なることが示唆されているが、現実的には両者を区別することは不可能であるため、本研究においてはリコンビナント・ヒト・インターロイキン 2 (rhIL-2) と抗 CD3 抗体 (OKT3) にて刺激した末梢血リンパ球 (T 細胞) 全体が標的細胞として使用される。

末梢血リンパ球は上記のサイトカインの存在下で長期間培養可能であ

り、レトロウイルスの感染効率も極めて高いことが過去の臨床治験より証明されている(45、46)。

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

ドナー末梢血リンパ球への Δ LNFR および HSV-TK 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクターを含むウイルス産生細胞の培養上清中でドナー末梢血リンパ球を培養することで行う。遺伝子導入法の詳細は 10-5-2 の「遺伝子導入方法」の項で示される。

末梢血 T 細胞への遺伝子導入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が細胞感染後、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することや、他のベクターと比較してレトロウイルスベクターが末梢血 T 細胞において高い遺伝子導入効率を示すことが現在までのアデノシン・デアミナーゼ欠損症に対する遺伝子治療臨床研究において示されていることによる(45、46)。また、安全性に関しては過去の 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(45-49)。

6-4. ウイルスベ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人に対する影響

使用するウイルスベクターはモロニーマウス白血病ウイルス(Moloney Murine Leukemia Virus: MoMLV)由来のレトロウイルスベクターである。この MoMLV は sarcoma 37 細胞より分離され、同種指向性のレトロウイルスで、マウスの年齢及び系統に関わらず感染する。また、発癌遺伝子を持たないが、このウイルスに長期間感染したマウスからリンパ性白血病を発症することが報告されている。人に感染することはない(50)。

MoMLV のゲノムは 5'LTR-パッケージ(Ψ)シグナル-gag-pol-env-3'LTR より構成されている。ウイルス LTR にはエンハンサー/プロモーター活性があり、ウイルスゲノムは 5'LTR により転写、翻訳される。gag はウイルスのコア構造タンパク質をコードする遺伝子で、pol は逆転写酵素ならびにインテグラーゼをコードする遺伝子、env はウイルスの外被タンパク質をコードする遺伝子である。 Ψ シグナルはウイルスゲノム RNA がコア構造タンパク質や pol 遺伝子産物により構成される正二十面体の複合体に取り込まれるのに必須な配列であり、ゲノム RNA が複合体に取り込まれることでウイルス粒子が形成され、細胞膜表面より出芽する。この際、宿主細胞膜の一部を自らの外皮として持ち込む。

レトロウイルスの生活環は、ウイルス粒子の外皮表面に存在する外皮タンパク質(Env)が標的細胞の細胞膜表面に存在する Env に対する受容体に結合することにより始まる。ウイルス粒子の受容体を介した細胞膜表面への結合後、ウイルスはエンドサイトーシスにより細胞質内へと取り込まれる。その後、自らの逆転

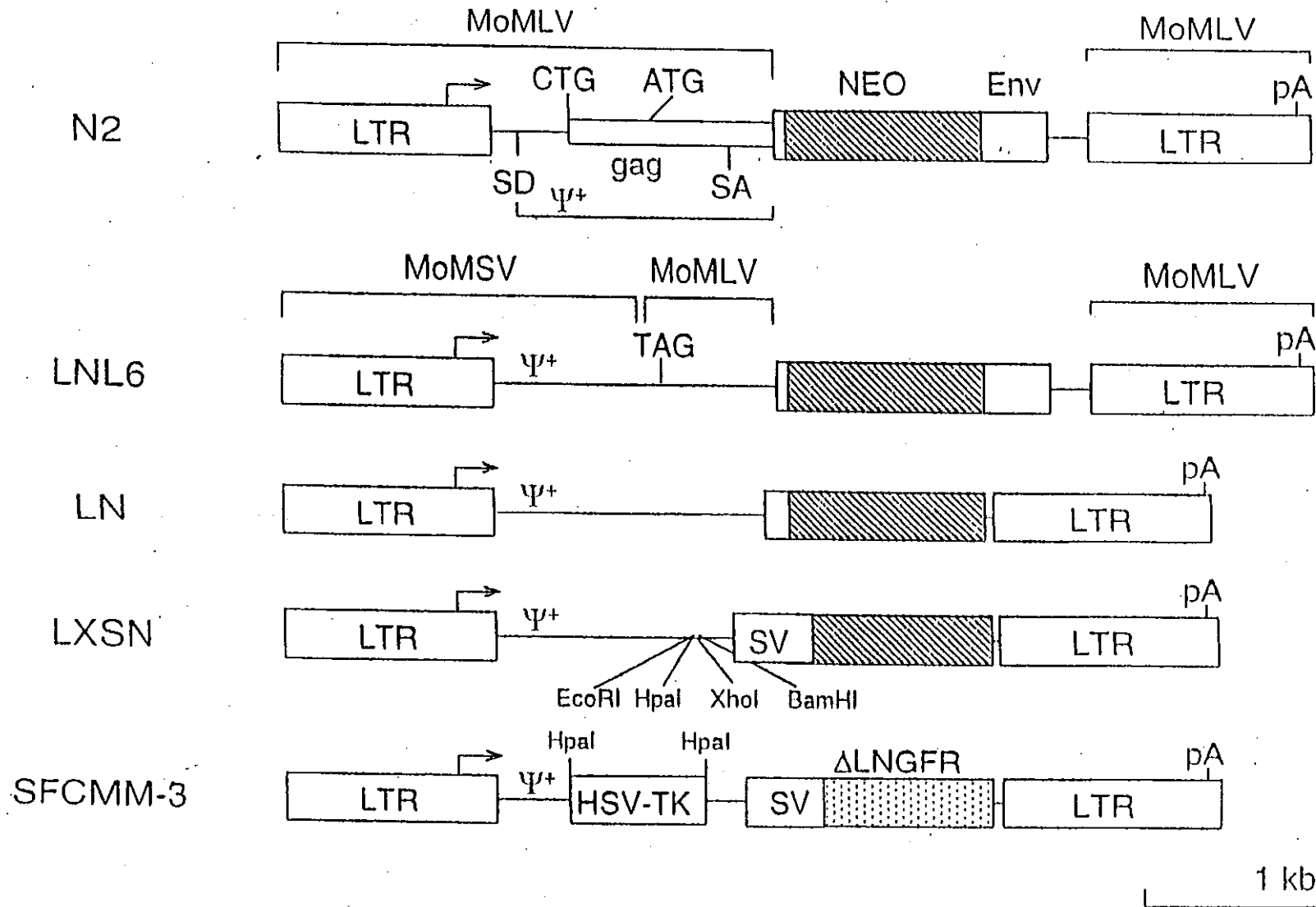
写酵素によってウイルスゲノムRNAを2本鎖DNAへと変換する。この2本鎖DNAが核へと移行し、ウイルスが持っているインテグラーゼによって宿主の染色体DNAへと組み込まれる。この状態のウイルスゲノムをプロウイルスと呼ぶ。染色体に組み込まれたプロウイルスはあたかも宿主の遺伝子のように振るまい、宿主の転写、翻訳機構を用いてウイルスゲノム(RNA)を転写する。ウイルスゲノムの一部はgag、pol、envを翻訳するメッセンジャーRNAとして働き、ウイルスの構成タンパク質を産生する。このようにして新たに産生されたウイルス粒子は細胞外へと出芽し、周囲の細胞に感染していく。

本臨床研究において標的細胞はヒト末梢血 T 細胞であり、MoMLV は同種指向性ウイルス(マウス細胞のみ感染性を有するウイルス)であるため、Env をヒト細胞にも感染性を有するアンフォトロピックウイルス由来の Env に変更しなければならない。

6-4-2. ウイルスベクターの作製方法

レトロウイルスベクターDNA は野生型ウイルスゲノムの LTR、プライマー結合部位、 Ψ シグナル、およびポリプリン領域を保存し、ウイルス粒子構造タンパク質遺伝子(gag、pol、env)を排除して作成されているため、ウイルスベクターDNAのみではウイルスベクター粒子とはなり得ない。ウイルスベクター粒子の産生のためには後に述べられるパッケージング細胞が必要となるが、さらに安全性を高めるため、種々の工夫がレトロウイルスベクターDNA 自体になされてきた。本臨床研究で用いられるウイルスベクターDNA SFCMM-3 の作製過程を以下に示す。1987年、Armentanoらはgag領域にも Ψ シグナルがあることを示し、gag領域のパッケージングシグナルを含むパッケージングシグナル(拡張パッケージングシグナル: Ψ')を有するレトロウイルスベクターN2を作成して、ベクターのウイルス力価を飛躍的に向上させた(51)。次に、Millerらのグループにより replication competent retrovirus (RCR)の産生を抑えるために、gagの開始コドン(ATG)を終止コドン(TAG)に変更して、ウイルス由来の蛋白質の発現を抑え、5'LTRを含む5'側の非翻訳領域をMoMLVのもの(N2はMoMLV由来)からMoloney murine sarcoma virus (MoMSV)のものに変更したLNL6が作成された(52)。さらに、RCRの発生の原因となるホモローガス・リコンビネーションを抑えるためにLNL6に残存するEnv遺伝子の配列を全て取り除き、またネオマイシン耐性遺伝子(NEO)から3'側の非翻訳領域を除くことでLNが作成され(53)、最終的にはLNのNEOの上流にSVと multicloning site を組み込むことで、2種類の遺伝子を一つのベクターから発現させるLXSNが作成された(53)。このLXSNにおいては、導入遺伝子はLTRにより、NEO遺伝子はSVにより転写、翻訳される。SFCMM-3はLXSNのHpaI siteにHSV-TK遺伝子を組み込み、NEOを Δ LNGFRに変更したものである(54)。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3の作製過程



前述のようにSFCMM-3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のみではウイルスベクター粒子を産生することはない。ウイルスベクター粒子の産生にはパッケージング細胞株が必要となる。本遺伝子治療臨床研究で使用されるパッケージング細胞株はマウス線維芽細胞株 NIH3T3 由来の細胞で、ヒト細胞に感染性を有するウイルスベクター粒子を産生するアンホトロピックパッケージング細胞株 GP+envAm12(Am12)である。Am12の樹立法を下記に示す(55)。

野生型 MoMLV のゲノム DNA よりΨシグナルを排除したプラスミド(3PO)より5'LTRを含む gag-pol 配列を切り出し、SV40 プロモーターで大腸菌 gpt 遺伝子の発現が誘導されるプラスミド pSV2gpt ベクターに組み込む(pgag-polgpt)。この pgag-polgpt をエレクトロポレーション法にて NIH3T3 に導入し、薬剤(hypoxanthine, xanthine, mycophenolic acid)で遺伝子導入細胞を選択する。これらの薬剤により選択された細胞にマウスアンホトロピックウイルス 4070A 由来の env 遺伝子を発現するプラスミド(penvAm)を pRSVhyg と共に transfection し、Hygromycin B で選択することで env 遺伝子発現細胞を選択する。このようにして、ウイルス由来の gag、pol、env を効率よく発現し、野生型ウイルスを産生しない(使用した全ての発現プラスミドはΨシグナルを有しないため)細胞株を Am12 として樹立した。

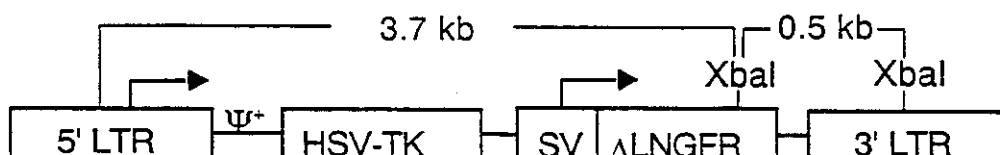
ウイルスベクター産生株はレトロウイルスベクターDNA SFCMM-3をリン酸カルシウム法にて同種指向性パッケージング細胞株であるGP+E86にトランスフェクションし、48時間後その上清を回収、8μg/mLのポリプレンの存在下でAm12にトランスダクションし、マウス抗ヒトLNGFRに対する抗体にて細胞を選択した。

GP+E86は上記のpgag-polgptとMoMLVのenvを発現するプラスミド(pEnv)をNIH3T3に導入することで樹立された(56)。

6-4-3. ウイルスベクターDNAの構造

SFCMM-3の概略を下図に、また全塩基配列を別添6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SV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をコードする各遺伝子は除かれている。

SFCMM-3



LTR: long terminal repeat、SV: SV40 early promoter
矢印は転写開始点を示す。

6-4-4. ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 Am12 はアンホトロピック系のパッケージング細胞株で、感染宿主は広範であり、マウス、ラット、サル、ヒト等の細胞に感染する。ただレトロウイルスの場合、静止期の細胞には感染せず、遺伝子導入に際しては種々のサイトカインで標的細胞に刺激を与え、細胞を細胞周期に誘導しなければならない。本臨床研究では末梢血 T 細胞を rhIL-2 と OKT3 で刺激する。レトロウイルスベクターにより導入された遺伝子は一般的に安定で、細胞分裂ごとに娘細胞へと伝えられていくが、導入された遺伝子発現に関しては in vivo において、種々の shut off 機構により減弱していくことが知られている。本臨床研究で使用されるウイルスベクターは増殖能を欠いているので、RCR が存在しない限り、感染した末梢血 T 細胞から周囲の細胞へ感染することはない。