

## 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

培養細胞を用いた実験において検討した項目は以下の4点である。

1. 末梢血リンパ球への遺伝子導入効率
2. 抗 LNGFR 抗体による遺伝子導入細胞の分離度
3. GCV 投与による遺伝子導入細胞の細胞死の程度
4. Bystander 効果の影響

#### 7-1-1. 末梢血リンパ球への遺伝子導入率

##### 実験方法

健常者よりアフエーシスにて白血球分画を採取し、Ficoll-Hypaque による比重遠心法にて末梢血単核球を分取した。分取された末梢血単核球はリン酸緩衝液 (phosphate buffered saline: PBS) にて洗浄され、100U/mL rhIL-2、10ng/mL OKT3 の存在下 10% FCS/RPMI1640 にて 72 時間培養された。培養条件は  $1 \times 10^6$ /mL の細胞濃度で、37°C、5%CO<sub>2</sub> のインキュベーターが用いられ、72 時間後、細胞培養液は 100U/mL rhIL-2 および 5 $\mu$ g/mL 硫酸プロタミンが添加されたウイルスベクター産生細胞の培養上清に置換された。同様の操作を 2 日間にわたり行い、遺伝子導入後さらに 48 時間細胞を培養し、遺伝子導入効率を解析した。

遺伝子導入効率は HSV-TK 遺伝子に対する PCR 法、および抗 LNGFR 抗体を用いた FACS 解析により決定された。HSV-TK および actin 遺伝子に対する PCR primer は以下の通りである。

HSV-TK sense 5' GCT CCA TAC CGA CGA TCT GC 3'  
Antisense 5' GGA CTT TCC ACA CCC TAA CTC AA 3'

actin sense 5' CAT TGT GAT GGA CTC CGG AGA CGG 3'  
antisense 5' CAT CTC CTG CTC GAA GTC TAG AGC 3'

また、FACS 解析のための抗体反応は、ウイルスベクター導入細胞を 2% ヒト血清アルブミン (HSA) 含有の PBS にて洗浄後、ヒト LNGFR に対するマウス・モノクローナル抗体 (20.4, American Type Culture Collection) に 4°C、氷温で 30 分間反応させ、ラット抗マウス IgG1 抗体に 45 分間反応させた後、FITC 標識ヒツジ抗ラット IgG 抗体と反応させ、解析した。

## 結果

PCRの結果は10-20%の導入効率であった。  
FACS解析では23%が $\Delta$ LNGFR発現細胞であった。

### 7-1-2. 抗LNGFR抗体による遺伝子導入細胞の分離度

#### 実験方法

前実験方法で示したように、ヒトLNGFRに対するマウス・モノクローナル抗体に反応させた後、磁気ビーズ(ビーズ結合ヤギ抗マウスIgG抗体:Dynabeads M-450 goat anti-mouse IgG、ダイナール)で $\Delta$ LNGFR発現細胞のみを回収し、さらに抗体を細胞表面からはずすために培養液にて24時間培養した。24時間後(分離48時間後)再びヒト抗LNGFRに対するマウス・モノクローナル抗体にて染色した後、FACS解析を行った。

#### 結果

FACS解析では90 - 95%が $\Delta$ LNGFR発現細胞であった。また、細胞表面マーカーでは、CD8<sup>+</sup>: 53 - 78.9%、CD4<sup>+</sup>: 17.4 - 43.9%、CD56<sup>+</sup>: < 2%、CD19<sup>+</sup>: < 1%であった。PCRの結果は85 - 90%の細胞中にHSV-TK遺伝子が確認された。

### 7-1-3. GCV投与による遺伝子導入細胞の細胞死の程度

#### 実験方法

実験7-1-2で回収された細胞( $\Delta$ LNGFR発現細胞)を、5日間GCVの存在下で培養した(培養液に100 U/mL rhIL-2を含む)。対照実験としてウイルスベクター非導入細胞が用いられ、120時間後にトリパンブルー染色にて細胞死の割合が決定された。

#### 結果

使用されたGCVの濃度は生体内で至適濃度と考えられる5 - 10  $\mu$ g/mLである。この条件下で120時間培養したウイルスベクター非導入細胞は、8-12%程度が死細胞となった。これに対し、GCV非存在下で9-13%程度と非導入細胞とほぼ同程度の細胞死しか示さなかったウイルスベクター導入細胞は、5-10  $\mu$ g/mLのGCV存在下で75-90%が死滅した。

### 7-1-4. Bystander効果の影響

#### 実験方法

HSV-TKはGCV存在下である種の細胞にBystander効果(HSV-TKを有していない細胞も周囲にHSV-TK遺伝子を有する細胞が存在すれば、GCV

投与により細胞死に至ること)を示すことが知られている。HSV-TK 導入末梢血 T 細胞の Bystander 効果が検討された。ウイルスベクター導入細胞と非導入細胞とを 0 から 100%の割合で混合し、5 $\mu$ g/mL の GCV 存在下で培養した。120 時間後にトリパブルー染色にて細胞死の割合が決定された。

## 結果

ウイルス感染細胞による bystander 効果は認められなかった。

以上の培養細胞等を用いた研究の結果から、遺伝子導入効率は 10 - 20%と低率であったが、抗 LNGFR 抗体によるウイルスベクター導入細胞分離方法で 90%を超える $\Delta$ LNGFR 発現細胞が得られることが示唆された。また、その大部分が GCV に反応し、細胞死に至ることから、レトロウイルスベクターによりもたらされた HSV-TK はベクター導入細胞でも機能的であることが示された。また、ウイルスベクター導入細胞における bystander 効果が認められないことから、GCV の効果は選択的にウイルスベクター導入細胞のみに作用し、他の非導入細胞に何ら影響がないことが示された。

### 7-1-5. 培養細胞を用いた追加実験

当該遺伝子治療臨床研究に向け、培養液、培養時の至適自家血清濃度、遺伝子導入に対する各種サイトカン、遠心法、ファイブプロネクチンの影響、small scale ( $10^7$  以下の細胞数)での遺伝子導入、 $\Delta$ LNGFR 発現細胞の分離度、GCV による感受性検査、ならびに bag を用いた large scale ( $3 \times 10^7$  以上の細胞数)での遺伝子導入実験を行った(添付資料 3 参照)。

### 7-2. 実験動物を用いた研究の成果

HSV-TK 発現 T 細胞 (TK<sup>+</sup>) の in vivo における GCV の感受性を確認するために、Drobyski らは CD3 promoter/enhancer の下流に HSV-TK 遺伝子を組み込んだコンストラクトを用いて、HSV-TK 遺伝子の発現を T 細胞のみに限局したトランスジェニックマウス (C57BL/6 background) を作製した (57)。850cGy の放射線照射した AKR/J (H-2<sup>k</sup>) マウスに T 細胞除去した C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) マウス骨髓血と上記トランスジェニックマウスより得た  $5 \times 10^5$  個の TK<sup>+</sup> を同時に移植し、移植後 4 - 8 日目に GCV を投与した。この結果、GCV を投与された群では、投与されなかった群と比較して、骨髓におけるドナー細胞の生着と著明な GVHD の沈静化が認められた。このことから in vivo においても、HSV-TK 遺伝子の GCV に対する感受性が保持されていることが示された。また、同様の実験が Tiberghien らのグループによっても示されている (58)。

### 7-3. これまでの遺伝子治療臨床研究の成果

現在まで欧米(イタリア、フランス、イギリス、ドイツ、オランダ、アメリカ)を中心に当該遺伝子治療が計画され、イタリア、フランス、アメリカにおいては実際に行われ、一部の結果が学会等で報告されている。本臨床研究はイタリア H.S. Raffaele 研究所の Claudio Bordignon 博士らが行った遺伝子治療とベクターを含めほぼ同一のプロトコールで行われるため、以下にイタリアでの遺伝子治療臨床研究の結果を示す(30)。また、イタリアで新たに行われた haplo-identical の造血幹細胞移植の結果、ならびにアメリカ、フランスでの臨床結果は次の「関連する研究の成果」の項で示す。

現在、33名の患者が遺伝子治療に参加しており、実際に遺伝子治療を受けた患者は23名で、解析可能(治療後3ヵ月以上生存可能であった症例)であった患者は以下の16名であった。

診断	症例数	解析数	完全寛解	部分寛解
CML/CMML	5	5	2	2
AML	8	3	1	1
ALL	1	1	0	0
NHL	5	4	2	1
HD	2	1	0	0
MMY	2	2	1	1
合計	23	16	6	5

(CML/CMML: 慢性骨髄性白血病/慢性骨髄単核球性白血病、AML: 急性骨髄性白血病、ALL: 急性リンパ性白血病、NHL: 非ホジキンリンパ腫、HL: 非ホジキンリンパ腫、MMY: ミエローマ)

15症例中完全寛解は6症例(CML/CMML 2名、AML 1名、NHL 2名、多発性骨髄腫 1名)、部分寛解は5症例であった。また、非ホジキンリンパ腫とCMLのうち各々1症例が骨髄移植後に発症したEBV-LPDであり、いずれの症例もDLTによりリンパ腫は完治した。

投与量は各々の症例により若干異なるが、白血病再発の治療としては $4.4 \times 10^7$  /kg、EBV-LPD治療としては $1 \times 10^6$  /kgのHSV-TK遺伝子導入ドナーT細胞が投与された。完全寛解の症例ではDLT後、12ヶ月を超えて遺伝子導入細胞が検出された。

GCV を投与した症例

患者	ベクター	GVHD/CMV	LNGFR の比率		臨床結果
			投与前	投与後	
1	SFCMM-2	急性(皮膚 II/III)	13.4	$< 1 \times 10^{-4}$	CR
2		急性(肝 II/III)	2.0	$< 1 \times 10^{-4}$	CR
3		慢性	11.9	2.8	PR → CR
4	SFCMM-3	CMV	1.1	$< 1 \times 10^{-4}$	-
5		CMV	$1 \times 10^{-4}$	$< 1 \times 10^{-4}$	-
6		急性(皮膚 II)	2	$< 1 \times 10^{-4}$	CR

解析可能であった15症例中3症例に grade II 以上の GVHD が発症し、1 症例は慢性 GVHD を発症した。また、経過観察中にサイトメガロウイルス感染症 (CMV) を発症した症例は 2 例で、合計上記 6 症例に対して GCV が投与された。ベクターによる内訳としては、3 症例が旧タイプのウイルスベクターの SFCMM-2 で、3 症例は本臨床研究で使用予定の SFCMM-3 を用いた症例であった(構造等の違いは「8-2-1. HSV-TK」項で述べられる)。これら 6 症例に対し 10 mg/kg/day の GCV が 1 週間にわたり投与され、その結果、SFCMM-2 を用いた 3 症例中 2 症例で、SFCMM-3 を用いた全症例で GVHD の完全な沈静化が認められた。また、SFCMM-2 を用いた 1 症例においては部分的な沈静化が認められた。この症例は GCV の投与により、肺、肝病変は完全に沈静化した。皮膚病変が残存したため、サイクロスポリンとステロイドが投与され、皮膚病変は沈静化した。完全な沈静化を示した症例では、投与前に末梢血中で 2-13% 程度存在していた HSV-TK 発現 T リンパ球が、GCV 投与により PCR の測定感度以下 ( $< 10^{-4}$ ) まで減少した。一方、完全な沈静化に至らなかった SFCMM-2 の 1 症例では、遺伝子導入細胞数は投与前の 11.9% から投与後の 2.8% 程度の減少にとどまった。遺伝子治療関連の副作用は認められなかった。

遺伝子導入細胞に対する CTL は 23 例中 8 例に検出され、2 例は neomycin に対して (SFCMM-2)、6 例は HSV-TK (SFCMM-3) に対して観察された。LNGFR に対する CLT は観察されなかった。これら CTL は全てドナー由来の T 細胞であった。

## 7-4. 関連する研究の成果

ここでは、現在までに行われた当該遺伝子治療臨床研究に関連する臨床研究の結果を示す。いずれの症例とも TK-DLT における GCV 投与による GVHD 沈静効果を示している。

### 7-4-1. イタリアの症例

イタリア H.S. Raffaele 研究所の Claudio Bordignon らは「7-3. これまでの遺伝子治療臨床研究の成果」で示した結果を基に、さらに治療対象を広げて遺伝子治療を行った(33)。現在、HLA が一致したドナーの見つからない患者に対し、時に一方の allele のみが一致した haplo-identical な造血幹細胞移植(haplo-SCT)が行われる(この場合、大多数は患者の両親がドナーとなる)。しかし、haplo-SCT では GVHD が必発し、また GVHD の予防のために T 細胞除去ドナー血を用いた場合には白血病の再発率が極めて高くなる。このため Bordignon らは T 細胞を除いて haplo-SCT を行った 5 症例に対して、移植後 42 日目に SFCMM-3 ベクターを導入したドナー T 細胞を  $5 \times 10^4$  -  $1 \times 10^8$  /kg 個患者に移植する add-back 法を行った。また、HLA が一致したドナーから T 細胞を除去した骨髓細胞を用いて移植を行い、移植後に再発した 2 症例に対しても SFCMM-3 ベクターを用いた DLT を行った(投与量は  $10^7$  /kg オーダー)。7 症例中 5 症例で輸注後 3 ヶ月を越えて完全寛解が維持され、ドナー T 細胞が検出できなかった症例のうち 1 症例で白血病が再発した。DLT 後に重篤な GVHD の発症は見られなかったが、7 症例中 4 症例でサイトメガロウイルスの感染が確認され、GCV を投与せざるを得なかった。この結果、全症例で HSV-TK 遺伝子導入細胞の消失をみた。この後、3 症例に対し 2 回目の DLT を行ったところ全症例で T 細胞の生着を認め、このうち GCV 投与によりドナー T 細胞が消失した後に白血病が再発した 1 症例では  $1 \times 10^7$  /kg の TK-DLT により病状が安定化した。一方、GCV 投与後に通常の DLT を行った 1 症例においては GVHD が発症し、死亡した。

### 7-4-2. アメリカの症例

アメリカ、Iowa Methodist Medical Center の Seregina らは、5 名の骨髓移植後の再発造血系悪性腫瘍患者(CML、AML、ホジキン7病、非ホジキンリンパ腫、皮膚 T 細胞リンパ腫 CTCL)に対し、レトロウイルスベクター LTKOSN (pLXSN に HSV-TK 遺伝子を組み込みこんだベクター)を用いて TK-DLT を行った(31)。投与した細胞数は、HLA 一致血縁者がドナーである場合は  $0.1$  -  $2.5 \times 10^8$  個、HLA ミスマッチ血縁者、あるいは非血縁者がドナーの場合は  $0.01$  -  $2.5 \times 10^8$  個であった。解析可能な症例は CML、AML、CTCL の 3 症例で、いずれの症例においても副作用は認めなかった。TK-DLT により 2 症例(AML、CTCL)で CR、AML の 1 症

例では過去の化学療法において得られた寛解期間を越えて長期間の寛解が得られた。GVHD 発症に関しては 1 症例で発症し、最初にステロイドなどの従来の治療法が採られたが、GVHD の沈静化が認められず、5 日間にわたって GCV が投与され、HSV-TK 遺伝子導入細胞の消失と GVHD の沈静化が認められた。

### 7-4-3. フランスの症例

フランスの Tiberghien らのグループはイタリアと同様 add-back 法における HSV-TK 遺伝子治療の臨床効果を検討した(32)。対象患者は HLA が一致したドナーより T 細胞を除去した骨髓細胞を用いて移植を行った 12 症例(次頁)で、レトロウイルスベクター-G1TkSvNa を導入したドナー T 細胞  $2 \times 10^5$ /kg(患者 1-5)、 $6 \times 10^5$ /kg(患者 6-10)、 $20 \times 10^5$ /kg(患者 11、12)個を造血幹細胞と共に患者に移植した。輸注後、特に重篤な副作用を認めず、12 症例中 11 症例で移植後 2 ヶ月以上にわたり遺伝子導入ドナー T 細胞の検出が可能であった。さらに、患者 1、5 では EBV-LPD に対し、患者 7 では再発 ALL に対して 2 度目の TK-DLT を行った。経過中に GCV の投与を受けたのは 6 症例で、内訳は grade II 以上の急性 GVHD、あるいは慢性 GVHD をきたした 5 症例(患者 1、3、6、9、11)と grade I の急性 GVHD と CMV 感染症により GCV の投与を受けた 1 症例(患者 12)である。ただし、患者 11 に関しては、通常の DLT 後に発症した GVHD に対し GCV を投与している。解析可能な 4 症例において GCV 投与により以下に示すように著明な遺伝子導入細胞の減少を認めた。また、GVHD の臨床症状に関しては、4 症例(患者 1、3、6、9)中 3 症例で GCV 単独により、また 1 症例ではステロイドとの併用療法にて完全寛解した。皮膚症状は 24-48 時間内に、また肝障害は 2 週間以内に完治した。

患者	末梢血中の遺伝子導入 T 細胞の割合 (%)		減少率 (%)
	GCV 投与前	GCV 投与後(測定日)	
1	0.54	0.01(D47)	98.1
9	0.1	0.015(D146)	85
11	1.28	0.083(D246)	93.5
12	14.86	0.82(D56)	94.5

フランスの遺伝子治療の内訳

1. high grade B 細胞性リンパ腫
 

GVHD	D31 grade II	GCVにて鎮静化
転帰	脳トキソプラズマ症にて day 91 に死亡	
2. Ph1 ALL
 

GVHD	なし	
転帰	ALLの再発にて day 129 に死亡	
3. high grade B 細胞性リンパ腫
 

GVHD	D15 grade III	GCVにて鎮静化
転帰	難治性リンパ腫にて day 106 に死亡	
4. MDS
 

GVHD	なし	
転帰	脳内出血にて day 38 に死亡	
5. high grade B 細胞性リンパ腫
 

GVHD	なし	
転帰	EBV-LPD、肺 aspergillosis で day72 に死亡	
6. CML
 

GVHD	D20 grade II	GCV+ステロイドにて鎮静化
転帰	CRにて34ヵ月間生存	
7. Ph1 ALL
 

GVHD	なし	
転帰	CRにて34ヵ月間生存	
8. CML
 

GVHD	なし	
転帰	CRにて29ヵ月間生存	
9. CML
 

GVHD	D135 慢性 GVHD	GCVにて鎮静化
転帰	CRにて31ヵ月間生存	
10. CML
 

GVHD	なし	
転帰	EBVリンパ腫にて day159 に死亡	
11. high grade B 細胞性リンパ腫
 

GVHD	なし(その後リンパ腫の再発に対する通常の DLT を 行い、D238 に急性 GVHD が発症した)	
転帰	急性 GVHD にて day252 に死亡	
12. Waldenström 病
 

GVHD	D40 grade I + CMV 感染	GCVにて鎮静化
転帰	敗血症にて day300 に死亡	
	[Tiberghien P. et al: 2001 <sup>32)</sup> より改変、引用]	

### 7-5.当該遺伝子治療関連症例の臨床結果のまとめ

前述のように、現在造血系腫瘍に対する TK-DLT はイタリア、アメリカ、フランスにおいて行われ、その臨床結果が学会等にて報告されている。使用されたレトロウイルスベクター（イタリア: SFCMM-2、-3、アメリカ: LTKOSN、フランス: G1TkSvNa）ならびに遺伝子導入方法は各施設で異なるものの、下表のように解析可能であった症例 37 例中、遺伝子治療関連の重篤な副作用を認めた症例は皆無であった。また、GVHD、あるいは CMV 感染症に対し GCV を投与した症例は 16 症例で、その内 15 症例において GCV 投与により完全にウイルスベクター導入ドナー T 細胞は消失した。ドナー T 細胞を完全に排除できなかった症例は、SFCMM-2 を用いた 1 例のみだった（この症例も通常の治療により GVHD は沈静化した）。

国名	イタリア	イタリア	アメリカ	フランス	総計
方法	DLT	Add-back	DLT	Add-back	
患者数	15	7	3	12	37
副作用	なし	なし	なし	なし	
TK-DLT 関連 GVHD 発症例	4	0	1	4	9
GCV による GVHD の沈静化 <sup>1)</sup>	CR: 3 PR: 1	0	CR: 1	CR: 4	CR: 8 PR: 1
CMV 感染症	2	4	0	1	7
GCV 投与によるドナー細胞消失	2	4	0	1	7
GCV 投与症例	6	4	1	5	16
GCV 投与によるドナー細胞消失	5 (1 症例は減少)	4	1	5	15 (1 症例は減少)

<sup>1)</sup> CR: complete response (完全沈静化)、PR: partial response (部分的沈静化)