

ヒト MDR1 遺伝子の産物である P-糖蛋白は 1280 個のアミノ酸と細胞外に突き出た糖鎖よりなる分子量 17 万-18 万の膜糖蛋白質である。P-糖蛋白は分子内に細胞膜を 6 回貫通する膜結合領域 2 つと ATP 結合部位 2 つを持つ。P-糖蛋白は、ATP の水解エネルギーを利用して種々の抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働くと推定されている (Gottesman et al, 1995)。

MDR1 遺伝子の抗癌剤感受性細胞への導入実験により、P-糖蛋白の発現した細胞は、adriamycin, vincristine, vinblastine, paclitaxel など種々の抗癌剤に耐性を示すことが明らかとなっている (Ueda et al, 1987b; Guild et al, 1988; Lincke et al, 1990; Choi et al, 1991)。

MDR1 遺伝子は、副腎皮質、肝、腎、小腸、大腸など、物質の透過に関与する組織に発現している。また、CD34 抗原陽性細胞や、脳、精巣の血管内皮細胞において MDR1 遺伝子が発現していることから、MDR1 遺伝子が、個体の生存、種の維持に重要な組織、細胞を種々の毒物から保護するために働いていることが示唆される (Chaudhary et al, 1991)。しかしながら、分化段階の進んだ血球前駆細胞や成熟した末梢白血球においては MDR1 遺伝子の発現は低く、このことが、MDR1 遺伝子の基質となりうる種々の抗癌剤が強い骨髄毒性を示す理由の一つであると思われる。

## (2) 自己末梢血幹細胞の生物学的特徴並びに当該細胞を標的とした理由

現在、自己造血幹細胞移植に用いる癌患者の血液細胞としては、自家骨髄単核細胞と自己末梢血単核細胞の 2 種類が使われている。しかしながら、これまでの臨床研究より、末梢血単核細胞を移植した方が骨髄単核細胞を移植した場合より白血球数および血小板数の回復に要する日数が有意に短いことが明らかとなっている。また、進行乳癌においては骨転移を伴うものが多いことから、自家骨髄単核細胞には、乳癌細胞が混入している可能性が危惧される。以上の理由により、財団法人癌研究会附属病院化学療法科の乳癌に対する自己造血幹細胞移植併用大量化学療法のプロトコールでは、患者より自己末梢血単核細胞と自家骨髄単核細胞の両方を採取、凍結保存し、大量化学療法施行後はまず自己末梢血単核細胞を患者に戻し、患者の骨髄機能の再構築が不十分と判断される場合にのみ、バックアップとして保存されていた自家骨髄単核細胞を患者に戻すこととしている。本研究は財団法人癌研究会附属病院化学療法科の乳癌に対する自己造血幹細胞移植併用大量化学療法のプロトコールに準じた形で行われるので、自己末梢血単核細胞が MDR1 遺伝子導入の標的細胞となる。

乳癌患者より採取した自己末梢血単核細胞に MDR1 遺伝子を導入する時に用いられる HaMDR レトロウイルス液 (HaMDR レトロウイルス産生細胞 3P26 の培養上清は、 $10^7$  cfu/ml の力価を持つ HaMDR レトロウイルスが含まれる。一方、乳癌患者より採取した自己末梢血細胞は、採取 1 回あたり  $4-6 \times 10^{10}$  個にのぼる。この細胞に MDR1 遺伝子導入を行う場合、仮に、 $6 \times 10^{10}$  個の細胞を用いて、細胞とレトロウイルスの比を 1:1 にすると仮定すると、 $6 \times 10^{10}$  個のレトロウイルスが必要となり、これはレトロウイルス液にして 6 リットルに相当する。すると、レトロウイルスを 4 倍希釈で用いる現在のプロトコールでは、24 リットルの培養液が必要になる。したがって、患者の末梢血単核細胞より、これから増殖分化していく未分化な血球細胞を濃縮することは、この臨床研究の成功に必須である。また、レトロウイルス DNA の標的細胞への組み込みには細胞の増殖を必要とすることから、末梢血単核細胞の大部分を占める分化したリンパ球、好中球、マクロファージなどには効率の良い遺伝子導入はなされない。よって、これらの細胞は MDR1 遺伝子導入の標的細胞より除外するのが適当であると考えられる。以上の理由により、本研究では乳癌患者の自己末梢血単核細胞より造血幹細胞、造血前駆細胞のマーカーである CD34 抗原が陽性である細胞を分離精製して、これに対して MDR1 遺伝子導入を行う。

造血幹細胞とは自己再生能および分化増殖能を有する細胞と定義される。即ち、造血幹細胞は赤血球、白血球、血小板など形態も機能も異なる種々の成熟血液細胞をつくり出す能力を有している。したがって、遺伝子導入された細胞の永続的な維持のためには、自己再生能を持つ造血幹細胞への遺伝子導入が必須と考えられる。また、造血前駆細胞は造血幹細胞より分化段階が進んでどのような血液細胞に分化していくかが決まった細胞であり、大量化学療法施行後の速やかな

骨髓機能の回復のためには、多くの造血前駆細胞が患者に戻されることが必要である。

造血幹細胞、造血前駆細胞は、その細胞表面に細胞接着分子でもある CD34 抗原を発現している。既に CD34 抗原陽性細胞のみに純化した骨髓細胞、末梢血細胞を用いた造血幹細胞移植の臨床研究は世界中で行われており、CD34 抗原陽性細胞のみの移植によって患者の骨髓機能が正常に回復することが示されている。CD34 抗原陽性細胞はヒトの正常骨髓単核細胞の 1-3%、末梢血単核細胞の 0.01% を占める。また、G-CSF などのサイトカインの投与によって骨髓中の CD34 抗原陽性細胞が末梢血中に動員され、その結果末梢血単核細胞に占める CD34 抗原陽性細胞の割合が 1% 程度にまで高められることが示されている。

CD34 抗原陽性細胞の多くは、stem cell factor の受容体をコードする受容体型チロシンキナーゼである c-kit を発現しており、また thrombopoietin の受容体である c-mpl の発現も認められる。

以上のごとく CD34 抗原陽性細胞の中に含まれると推定される造血幹細胞は全ての末梢血液細胞に分化増殖可能であるとともに自己複製能を有する。このような細胞を標的として遺伝子導入が図られるならば、導入遺伝子の機能が末梢血液細胞に賦与されるばかりでなく、造血幹細胞のゲノム中にも保持される為、導入遺伝子機能の発現は永続性を有することになり、ここに極めて有用な生体機能システムを構築し得ることになる。よって本療法の標的細胞は CD34 抗原陽性細胞となる。

### (3) レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入

#### (a) 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

本研究で用いる HaMDR レトロウイルスベクターは HaMSV 由来のものである。この野生型ウイルスは齧歯類の動物に肉腫を作るウイルスであり、ras 癌遺伝子を持っている。しかし組み換えウイルスではこの部分の配列は除かれている。HaMDR レトロウイルスが組み込まれたレトロウイルス産生細胞である 3P26 細胞には、親株の PA317 細胞と同じ Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来の PAM3 遺伝子が組み込まれている。この PAM3 遺伝子は MoMLV の 5'-LTR の一部と gag、pol、env の全長を持つ。したがって HaMDR 組み換えレトロウイルスは MoMLV の gag、pol、env のウイルス蛋白を持つことになるため、細胞へのウイルスの導入過程においては MoMLV としての性質を持つ。PA317 細胞の env 蛋白は amphotropic virus 由来のものであり、この amphotropic virus 由来の env 蛋白をもつ組み換えレトロウイルスである HaMDR は、マウスのみならずヒトを含む多くの動物細胞に遺伝子を導入する性質を持つ。

レトロウイルスが標的細胞の細胞膜表面のレセプターに結合すると、ウイルス粒子の内容物が細胞内に放出される。ウイルスの遺伝子 RNA はウイルス由来の逆転写酵素により DNA に変換され、このウイルス DNA が、ウイルスの遺伝子の両端にある LTR を介して細胞染色体上に組み込まれる。挿入されたレトロウイルス DNA より RNA が転写され、蛋白が合成される。gag、pol、env 遺伝子をもつ野生型レトロウイルスが細胞に導入された場合は、パッケージングシグナルと両端の LTR をもつレトロウイルス RNA と、レトロウイルス粒子の構成蛋白である gag、pol、env の各蛋白より、ウイルスの再構成が起きる。再構成されたウイルスは細胞外に放出され、同じ生活環を繰り返す。一般に、この過程で細胞が死滅することはない。しかしながら、gag、pol、env 遺伝子を欠く組み換えレトロウイルスが細胞に導入された場合は、レトロウイルスに組み込まれた遺伝子が発現して蛋白が合成されるが、レトロウイルスの構成蛋白である gag、pol、env の各遺伝子由来の蛋白は合成されないため、新たなレトロウイルスが産生されることはない。

#### (b) レトロウイルスベクター-HaMDR の構造と生物学的特徴

本研究では、CD34 抗原陽性細胞に MDR1 遺伝子を導入する方法としてレトロウイルスを用

いる。本研究においては、遺伝子導入された CD34 抗原陽性細胞は患者の体内で分化増殖していくので、その過程で導入遺伝子が保持されるためには、導入遺伝子が宿主染色体の中に組み込まれて、宿主染色体の複製に伴って導入遺伝子が一緒に複製されることが必要である。遺伝子を細胞に導入する方法としては、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルス、リポソームなどが考えられるが、レトロウイルス以外の方法では導入遺伝子の細胞 DNA への組み込みの頻度が低く、本研究に用いることは不適當である。

これに対して、レトロウイルスは、遺伝子導入効率が高いこと、導入遺伝子が標的細胞のゲノム DNA に組み込まれて安定に維持され、導入された遺伝子が長期間にわたって発現されることなどから、本研究の目的にもっとも適していると思われる。また、レトロウイルスはこれまでに米国を中心に行われた遺伝子治療の臨床研究の過半数、及びわが国で行われた北海道大学のアデノシンデアミナーゼ欠損症の遺伝子治療、および東京大学で行われた腎癌患者に対する GM-CSF 遺伝子治療に用いられ、最もよく研究の進んだ遺伝子導入法である。

レトロウイルスベクター HaMDR は、HaMSV の 5'-LTR、レトロウイルスパッケージングシグナル $\psi$ 、ヒト MDR1 遺伝子 cDNA、HaMSV の 3'-LTR から構成されている。レトロウイルスを導入された細胞では、レトロウイルス内の唯一のプロモーターである 5'-LTR 内のプロモーターよりヒト MDR1 遺伝子 cDNA の全長をコードする mRNA が転写され、この mRNA よりヒト P-糖蛋白が翻訳される。このレトロウイルスからは免疫学的にヒト P-糖蛋白と異なる蛋白は作られない。

米国コロンビア大学において、HaMDR と同じレトロウイルス骨格に 185 位のグリシンがバリンに変異した MDR1 cDNA を組み込んだ HaMDR1/A レトロウイルスを用いた臨床研究が行われた (Hesdorfer et al, 1999)。その結果、HaMDR1/A レトロウイルスベクターによる MDR1 遺伝子導入細胞の移植後、2 名の患者でそれぞれ移植 10 週後と 3 週後に MDR1 遺伝子導入細胞が検出されたが、MDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖その他の MDR1 遺伝子導入に起因するとみられる副作用は観察されなかった。遺伝子導入細胞を移植した後に患者に増殖性レトロウイルス (RCR) は検出されず、その他の有害反応も起きなかった。Ha レトロウイルスベクターは今まで多く臨床研究に使われてきたモロニー白血病ウイルス由来のレトロウイルスベクターと同様に、安全性の高いベクターと考えられる。

#### (c) レトロウイルスの作成方法

HaMDR レトロウイルスはその遺伝子上に HaMSV 由来の 5'-LTR、3'-LTR およびウイルス遺伝子がウイルス粒子に入り込むためのパッケージングシグナル $\psi$ を有しているが、レトロウイルス粒子の構成蛋白質をコードする遺伝子 gag, pol, env は有していない。プラスミド pHaMDR は、HaMDR のレトロウイルス cDNA およびベクターの pBR322 プラスミドより構成されている。我々は HaMDR レトロウイルスを作成するためにレトロウイルスパッケージング細胞 PA317 を用いる。PA317 は、チミンキナーゼを欠損したマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に gag, pol, env を発現する PAM3 遺伝子をトランスフェクトして作られた (Miller and Buttimore, 1986)。PAM3 遺伝子はマウスの MoMLV 由来の gag, pol, env の各蛋白質をコードする遺伝子を持っているが、元の MoMLV の 5'-LTR を一部欠失し、また、パッケージングシグナル $\psi$  および 3'-LTR は有していない。したがって、PAM3 遺伝子の gag, pol, env 遺伝子をコードする mRNA がレトロウイルスに組み込まれることはない。

pHaMDR プラスミドを PA317 細胞に導入すると、PA317 細胞に発現している gag, pol, env 蛋白質と HaMDR レトロウイルス mRNA が会合し、HaMDR レトロウイルス粒子となって細胞外に放出される。PA317 細胞に発現している env 蛋白質は amphotropic なレトロウイルス由来であり、ヒトを含む多くの動物細胞に遺伝子を導入することが可能である。

HaMDR レトロウイルス産生細胞上清には gag, pol, env 遺伝子をコードするレトロウイルス DNA, RNA は存在しないので、HaMDR レトロウイルスが標的細胞に導入された後は、gag, pol, env 蛋白質の発現はおこらず、したがって標的細胞において HaMDR レトロウイルスが再

び生産されることはない。

本臨床研究に用いられる HaMDR レトロウイルスは PA317 細胞に pHaMDR プラスミドを導入して作成された 3P26 細胞より産生される。3P26 細胞の master cell bank (MCB) は米国 Maryland 州の MA BioServices 社 (MA 社) およびその子会社である MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) において米国食品医薬局 (FDA) の基準に従って作成され、種々の安全性試験に合格した後、(現 BioReliance 社) に凍結保存されている (PA317/HaMDR, Part #5.40088, Lot #2037-0010)。HaMDR レトロウイルス培養上清 (HaMDR/3P26) は、MAGENTA 社において作成され、増殖性レトロウイルス (RCR) 否定試験、無菌試験、エンドトキシン試験などを行ったのち、凍結されて日本に空輸される。

#### (4) 遺伝子導入方法の概略

患者の末梢血単核細胞より CD34 抗原陽性細胞を分離し、サイトカイン存在下培養する。この細胞に HaMDR レトロウイルス産生細胞の培養上清を加えて 2 日間培養し、遺伝子導入を行う。遺伝子導入した CD34 抗原陽性細胞は洗浄後、液体窒素タンクに凍結保存される。この遺伝子導入細胞の一部を用いて遺伝子発現の検討、増殖性レトロウイルスの検索、無菌試験、エンドトキシン試験などを行う。患者に大量化学療法を施行した後、凍結されていた遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を未処理の末梢血単核細胞とともに患者に戻す。

## 7 MDR1 レトロウイルスに関する研究

### (1) レトロウイルスを用いた MDR1 遺伝子の細胞への導入

最初の MDR1 遺伝子のレトロウイルスによる導入は米国 NCI の Pastan らにより報告された (Pastan et al, 1988)。彼らの用いた HaMDR1/A レトロウイルスは HaMSV 由来のもので、我々を含め、MDR1 レトロウイルスとしてその後広く使われている。この HaMDR は、ヒト、マウスの骨髓細胞に導入した場合、遺伝子治療によく使われる MoMLV 由来のレトロウイルスより P-糖蛋白を高発現させ、その結果として HaMDR 導入細胞の方が MoMLV 由来の MDR1 レトロウイルス導入細胞よりも抗癌剤に高い耐性を示す。また、通常の MoMLV 由来の MDR1 レトロウイルスも多くの研究室で使用され、その有効性が示されている (Guild et al, 1988; Choi et al, 1991)。

最初に単離された MDR1 cDNA は colchicine 耐性細胞由来のもので、185 位のグリシンがバリンに変異していることが後の研究で明らかになった。この変異型の MDR1 遺伝子は colchicine には高い耐性を与えるが、抗癌剤として臨床に用いられる taxane 類抗癌剤 (docetaxel あるいは paclitaxel)、anthracycline 系抗癌剤 (adriamycin など) に対する耐性度は野性型 MDR1 遺伝子を導入した方が高くなる (Choi et al, 1988, Kioka et al, 1989, Safa et al, 1990)。したがって、本臨床研究では、野性型 MDR1 遺伝子を組み込んだ HaMDR レトロウイルスを用いることとした。

### (2) マウス造血幹細胞への MDR1 レトロウイルスの導入と、MDR1 遺伝子のマウス個体における発現

HaMDR1/A レトロウイルスの導入によって、マウスの骨髓細胞を *in vitro* で抗癌剤耐性にできることが示された (McLachlin et al, 1990)。次いで、MDR1 遺伝子の導入によりマウスの骨髓細胞を *in vivo* で抗癌剤耐性にするという研究が、米国 NIH の Sorrentino らとコロンビア大の Podda らにより独立に報告された。両者とも、バリン変異型 MDR1 cDNA を組み込んだ HaMDR1/A レトロウイルス産生細胞をマウス骨髓細胞と共培養し、遺伝子導入された骨髓細胞を放射線照射したマウスに移入した後、マウスに paclitaxel を投与した。Sorrentino らは、paclitaxel 投与により、末梢の白血球に組み込まれた MDR1 レトロウイルス DNA のコピー数

が有意に増大することを示した(Sorrentino et al, 1992)。Podda らは、末梢血中の MDR1 陽性細胞が移植後 240 日でも検出可能であったと報告した(Podda et al, 1992)。また、米国 M. D. Anderson 癌センターの Hanania らは、MDR1 遺伝子導入マウス骨髄細胞をマウスに継代して paclitaxel 治療することにより、6 代のマウスで半年以上にわたってマウス骨髄細胞の抗癌剤耐性が維持できることを示した (Hanania et al, 1994)。こうした実験より、マウスの骨髄細胞に MDR1 レトロウイルスを導入してマウス個体に移植することにより、マウス骨髄細胞が *in vivo* の抗癌剤耐性を示すこと、すなわち抗癌剤の骨髄抑制の軽減が可能であることが示された。

### (3) MDR1 遺伝子による癌の遺伝子治療

これまでの基礎研究の成果をふまえて、大量化学療法を受けた癌患者への自己造血幹細胞移植時に MDR1 遺伝子を CD34 抗原陽性細胞へ導入して、その後の化学療法の骨髄抑制を回避しようという遺伝子治療の試みが提唱された (Gottesman et al, 1991, 1994a, 1994b)。

現在、MDR1 遺伝子治療は、乳癌、卵巣癌、悪性リンパ腫などの治療として行われている自己造血幹細胞移植併用大量化学療法と組み合わせた形で考えられている。現在の治療法は、癌患者より骨髄細胞、末梢血幹細胞をあらかじめ採取、凍結しておいてから癌患者に大量のアルキル化剤などの抗癌剤を投与して癌細胞のせん滅を図り、その後保存しておいた自己の骨髄細胞、末梢血幹細胞を再移入して破壊された骨髄機能を回復させるというものである。しかしながら、大量化学療法では患者の体内の癌細胞を全て殺すには至らないことがあり、癌の再発が問題となっている。自己造血幹細胞移植併用大量化学療法自体が癌患者に多大の身体的負担を与えるため、これまでは、大量化学療法で殺しきれなかった癌細胞に対する再度の化学療法は困難であった。MDR1 遺伝子の造血幹細胞への導入によって、自己造血幹細胞移植後の taxane 類抗癌剤による化学療法を可能とし、癌細胞の完全せん滅による癌の治癒を目指す、というのが MDR1 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療の戦略である。この場合、使用する抗癌剤として taxane 類抗癌剤が最適である理由は、MDR1 遺伝子の導入によって細胞が taxane 類抗癌剤に高い耐性を示すことと、taxane 類抗癌剤の投与量を制限する主たる副作用は骨髄抑制であり、骨髄細胞に対する毒性が緩和できれば投与量の増大が図りうるということの 2 点による。しかしながら、この時点での化学療法は微小残存病変に対する治療であり、taxane 類抗癌剤の投与量の増大によらなくても、通常投与量の繰り返し投与でも治療効果が得られると期待される。また、taxane 類抗癌剤等が有効性を示す癌、ということで、乳癌、卵巣癌が MDR1 遺伝子治療の最もふさわしい対象となる。

自己造血幹細胞移植においては、 $6 \times 10^{10}$  個程度の単核細胞が患者に戻される。遺伝子導入にあたっては、単核細胞中に 0.1% から 1% 程度含まれる CD34 抗原陽性細胞を精製し、これに HaMDR1 レトロウイルスを導入する。本臨床研究に使用する HaMDR1 レトロウイルスの力価は  $10^7$  cfu/ml 程度であるため、この全部の単核細胞に HaMDR1 レトロウイルスを導入するには数リットルのレトロウイルス液が必要となり、これは現実的には困難である。そのため、単核細胞中に 0.1% から 1% 程度含まれる CD34 抗原陽性細胞を精製し、これに HaMDR1 レトロウイルスを導入する。1 回の遺伝子導入では、 $2-10 \times 10^7$  個程度の CD34 抗原陽性細胞に対し 20 - 100 ml 程度のレトロウイルス液を用いて遺伝子導入を行う。

レトロウイルスは増殖期にある細胞に遺伝子を導入するので、通常静止期にある CD34 抗原陽性細胞を増殖期に移行させるために stem cell factor (SCF)、interleukin-6 (IL-6)、flk-2/flt-3 ligand (FL ligand)、soluble IL-6 receptor、thrombopoietin (TPO)、の 5 種のサイトカイン存在下 CD34 抗原陽性細胞を 2 日間培養し、引き続いて同じ培養条件下で MDR1 遺伝子の導入を行う。

MDR1 遺伝子が骨髄細胞に過剰発現したときに起こりうる副次的反応については MDR1 トランスジェニックマウスを用いて検討が加えられた。MDR1 遺伝子をニワトリの  $\beta$ -アクチンプロモーターにつないでマウス ES 細胞に導入して作成された MDR1 トランスジェニックマウスの一系においては、骨髄及び末梢白血球に特異的な P-糖蛋白の過剰発現が観察された (Galski et al,

1989)。このマウスの白血球は daunorubicin などの抗癌剤に対して耐性を示したが、マウスの生育、免疫能、生殖などには何の異常も見られなかった(Mickisch et al, 1991a, 1991b)。CD34 抗原陽性細胞を含む未分化な造血幹細胞、造血前駆細胞ではもともと MDR1 遺伝子が発現していることが知られている。現在までの知見では外来性の MDR1 遺伝子が造血幹細胞を含む血液細胞に発現してもその血液細胞の機能には影響を与えないと考えられている(Chaudhary et al, 1991)。

これまで述べてきた基礎研究に基づいて、米国の 3 つの研究機関より MDR1 レトロウイルスを用いた癌の遺伝子治療のプロトコールが独立に提出され、1995 年春より米国において臨床研究が始まった(O'Shaughnessy et al, 1994; Hesdorffer et al, 1994; Deisseroth et al, 1994; Deisseroth et al, 1996)。また、新たに米国 Indiana 大、英国などにおいても、同様の MDR1 遺伝子治療臨床研究が実施されている。これまでに MDR1 遺伝子導入のために患者が移植不全に陥ったという報告はない。また、レトロウイルス由来の MDR1 遺伝子が血液細胞に過剰発現したことに起因すると思われる副作用は報告されていない。外国での臨床研究の結果の詳細については、第 15 項に記した。

## 8 これまでの研究成果

### (1) レトロウイルス産生細胞クローンの作成

pHaMDR プラスミドを PA317 細胞にトランスフェクトし、vincristine 35 ng/ml 存在下で MDR1 遺伝子を発現して抗癌剤耐性となった細胞を選択した。この pHaMDR 導入 PA317 細胞を 96well マイクロタイタープレートにまき、限界希釈法にてクローニングを行った。

こうして得られた 200 個余りの pHaMDR 導入 PA317 細胞クローンについて、その培養上清に含まれる HaMDR レトロウイルスの力価を調べた。まず、10cm のディッシュに NIH3T3 細胞を  $3 \times 10^4$  細胞まき、翌日、pHaMDR 導入 PA317 細胞クローンの培養上清を 1-2 ml 加えた。2 日後、vincristine 25 ng/ml を加え、更に 7-10 日間培養して、vincristine 耐性となった NIH3T3 細胞のコロニーを数え、この結果からウイルス力価を計算した。こうして得られた HaMDR レトロウイルス産生 PA317 細胞クローンより、もっとも力価の高かったクローン 3P26 を以下の実験に使用した。

### (2) レトロウイルスの力価の検定

NIH3T3 細胞に対する HaMDR レトロウイルスの力価を調べる目的で、6 穴プレートに K562 細胞をまき、種々の濃度の HaMDR レトロウイルス液を加えた。レトロウイルス導入 3 日後に、ヒト P-糖蛋白に特異的な単クローン抗体 MRK16 のビオチン化 F(ab')<sub>2</sub> フラグメントとストレプトアビジン結合 R-ファイコエリスリンを用いて細胞を免疫染色し、FACS (Fluorescence-activated cell sorter) でヒト P-糖蛋白を発現している細胞を検出した(Okochi et al, 1995)。その結果、本臨床研究に用いる MDR1 レトロウイルスの力価はおおよそ  $10^7$  cfu/ml であった。

### (3) HaMDR レトロウイルス導入による抗癌剤耐性の獲得

HaMDR を導入された細胞がどのような抗癌剤にどの程度耐性を示すかを調べる目的で、MDR1 遺伝子を発現していないヒト卵巣癌細胞 A2780 に HaMDR レトロウイルスを導入し、2 つの vincristine 耐性クローンを樹立した。この 2 つの HaMDR 導入クローンの種々の抗癌剤に対する耐性を調べた。その結果、1 コピーの HaMDR レトロウイルスの導入されたクローンは paclitaxel に数百倍から数千倍の耐性を示した。MDR1 遺伝子の導入によってもっとも耐性となる抗癌剤は paclitaxel で、その次が vinca alkaloid であった(杉本, 1995)。

### (4) 遺伝子導入の確認

ヒト KB3-1 細胞に HaMDR を導入して得られた vincristine 耐性細胞に外来 MDR1 遺伝子が組み込まれて発現している事をサザンブロット法およびノーザンブロット法で確認した。親株 KB3-1 細胞および HaMDR を導入した KB/MDR 細胞より DNA を抽出し、SacII、XhoI の両制限酵素で切断後アガロースゲル電気泳動で分離し、ニトロセルロースフィルターに転写し、<sup>32</sup>P で標識したヒト MDR1 cDNA をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った。その結果、KB/MDR 特異的に 4.2kb のヒト MDR1 cDNA 由来のバンドが検出された。KB3-1 細胞および KB/MDR 細胞より RNA を抽出し、上記と同様にノーザンハイブリダイゼーションを行ったところ、KB/MDR 特異的に約 9kb の HaMDR mRNA が検出された。

#### (5) ヒト CD34 抗原陽性細胞への HaMDR レトロウイルスの導入実験

MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) にて MCB 樹立後、MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) より送られてきた MCB 由来の 3P26 細胞の培養上清 (HaMDR/3P26) を用いてヒト CD34 抗原陽性細胞への MDR1 遺伝子導入を行った。ヒト CD34 抗原陽性細胞への HaMDR レトロウイルスの導入効率の検定には、FACS 及びメチルセルロース中でのコロニーフォーメーションアッセイを用いた。

10<sup>5</sup> 個の CD34 抗原陽性細胞に対し、1ml の HaMDR レトロウイルスを用いて 2 日間遺伝子導入を行い、更に 4 日間培養後、細胞表面の P-糖蛋白の発現を MRK16 抗体を用いた FACS で調べたところ、約 50% の細胞が P-糖蛋白陽性であった。

この、HaMDR レトロウイルス導入 CD34 抗原陽性細胞の一部を、vincristine を加えたメチルセルロースプレートにまき、vincristine 耐性コロニーの出現を 12 日後に判定した。HaMDR を導入された CD34 抗原陽性細胞は、レトロウイルスを導入されない CD34 抗原陽性細胞と比較して、4-8 ng/ml の vincristine 存在下でコロニー形成率が vincristine 非存在下の 40-50% 程度多かった。

以上の結果は、CD34 抗原陽性細胞の 40-50% に MDR1 遺伝子導入がなされたという事を示している。

#### (6) 実験動物を用いた研究

MDR1 遺伝子を発現するレトロウイルスをマウスの骨髓細胞に導入後、致死量の放射線を照射した別のマウスに移植して、末梢血細胞におけるヒト P-糖蛋白の発現を FACS を用いて経時的に調べた。MDR1 遺伝子導入骨髓細胞の移植後 1 カ月のマウスの末梢血で、30% の細胞にヒト P-糖蛋白の発現が確認された。このマウスに paclitaxel を投与することにより、ヒト P-糖蛋白陽性細胞の割合は増大した。paclitaxel の投与を行わないで経過観察すると、ヒト P-糖蛋白陽性細胞の割合は減少したが、paclitaxel の再投与により、ヒト P-糖蛋白陽性細胞の割合は再度増大した。このマウスは、MDR1 遺伝子導入骨髓細胞の移植後 11 カ月を経過しても、約 20-30% の末梢血細胞にヒト P-糖蛋白を発現しているが、特に異常は見られない。また、このマウスの末梢血中に RCR は検出されなかった。

東大医科研と癌研の共同研究で、3 匹のマーモセットに MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行った。そのうちの 1 匹では 412 日間にわたって末梢血に MDR1 遺伝子導入細胞が検出されたが、この研究でも、MDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖など、MDR1 遺伝子導入に起因すると考えられる副作用は起きなかった。これらの結果は、末梢白血球に MDR1 遺伝子を発現させることによる重大な副作用はおきないということを示している (Hibino et al, 1999)。

#### (7) 増殖性レトロウイルス (RCR) の検出

##### (a) HaMDR レトロウイルスを導入した細胞よりの MDR レトロウイルスの産生

HaMDR レトロウイルスを導入されて vincristine 耐性となった NIH3T3 細胞プール (10<sup>5</sup> 個以上のコロニーよりなる) の培養上清 10ml を 5×10<sup>4</sup> 個の NIH3T3 細胞にかけ、vincristine 25

ng/ml で選択したが、耐性コロニーは得られなかった。

(b) 逆転写酵素活性の測定

HaMDR レトロウイルスを導入して vincristine 耐性となった NIH3T3 細胞およびヒト正常繊維芽細胞の培養上清の超遠心ペレットの逆転写酵素 (RT) 活性を、ポリ rA を鋳型とした <sup>3</sup>H-チミジンの取り込みで調べた。陽性コントロールの HaMDR 産生細胞培養上清は高い RT 活性を示したが、HaMDR 導入細胞では RT 活性は検出されなかった。

(c) S<sup>+</sup>L<sup>-</sup>試験

MCB の HaMDR レトロウイルス産生細胞と *Mus dunni* 細胞を共培養し、その培養上清を PG-4 細胞にかけ、プラークの出現の有無を調べたが、野生型レトロウイルス感染によるプラークは検出されなかった。

HaMDR レトロウイルスで遺伝子導入された CD34 抗原陽性細胞と *Mus dunni* 細胞を共培養し、その培養上清を PG-4 細胞にかけ、プラークの出現の有無を調べたが、野生型レトロウイルス感染によるプラークは検出されなかった。

## 9 安全性についての評価

### (1) 遺伝子導入方法の安全性

#### (a) 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの安全性

本臨床研究に用いられる HaMDR レトロウイルスは PA317 細胞に pHaMDR プラスミドを導入して作成された 3P26 細胞より産生される。3P26 細胞の master cell bank (MCB) は米国 Maryland 州の MA 社および MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) において米国 FDA の基準に従って作成され、MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) に保存されている (PA317/HaMDR, Part #5.40088, Lot #2037-0010, 参考資料 E 参照)。MCB の細胞に対して、MA 社および MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) において以下の安全性試験が行われ、その結果 3P26 細胞は全ての安全性基準を満たしていることが確認された (参考資料 E 参照, Ostrove, 1994)。

- ・ Sterility test
- ・ Isoenzyme analysis
- ・ Mycoplasma
- ・ Extended XC plaque
- ・ Producer cell testing: Co-cultivation with *Mus dunni* cells and S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> focus assays
- ・ Supernatant testing: Amplification in *Mus dunni* cells and S<sup>+</sup>L<sup>-</sup> focus assays
- ・ Mouse antibody production
- ・ In vitro assay for adventitious viral contaminants
- ・ In vivo assay for adventitious viral contaminants

HaMDR レトロウイルス培養上清は、MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) によって作成され、以下の安全性試験を行ったのち、凍結されて日本に空輸された (参考資料 F 参照)。

#### Supernatant testing

- ・ In vitro assay for the presence of viral contaminants
- ・ Sterility test; Bacteriostatic and fungistatic activity:
- ・ GMP sterility, Bulk product
- ・ Test for the presence of Mycoplasma