

- General safety test
- Endotoxin test: Limulus amoebocyte lysate assay
- Amplification in *Mus dunni* cells and S+L⁻ focus assays
- Sterility, Final product (Filter)

End-of-production cell (Producer cell) testing

- Co-cultivation with *Mus dunni* cells and S+L⁻ focus assays

(b) 増殖性レトロウイルスの出現の可能性

前述のように、我々の基礎実験において、現在 RCR の検出に有効とされている 3 つの方法全てにおいて、RCR は検出されていない。実際臨床に用いる HaMDR レトロウイルスは MA 社において S+L⁻法による RCR の否定試験に合格した後、日本に空輸される。MDR1 レトロウイルスを導入された CD34 抗原陽性細胞は一度凍結され、患者に戻す前にその一部の細胞を用いて RCR の否定試験を行って安全性を確認する。レトロウイルスを用いた遺伝子治療において、現在までにレトロウイルス導入細胞が個体に戻された後に RCR を発生したという報告はない。よって本臨床研究において増殖性レトロウイルスが患者の体内に出現する可能性はほとんどないと思われる。

(c) 遺伝子導入に用いるレトロウイルスの細胞傷害性

一般にレトロウイルス遺伝子は標的細胞の染色体にランダムに組み込まれる。したがってレトロウイルスがその細胞の生存に必須な部位に組み込まれた場合には、その細胞が死に至ることもある。しかしながらその可能性はわずかであり、レトロウイルスを導入された細胞のほとんどは正常に機能すると考えられている。

(d) 標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究においては、癌患者の骨髓細胞あるいは末梢血細胞由来の CD34 抗原陽性細胞を標的として、*ex vivo* の遺伝子導入を行う。この時、骨髓中、血中に転移癌細胞が存在すると、その癌細胞に対しても HaMDR レトロウイルスが導入されて患者に戻され、結果的に MDR1 遺伝子陽性の再発癌が出現してくることが危惧される。この危険を除くために、骨髓中に癌転移のみられる患者は対象より除外する。また、遺伝子導入の対象細胞である CD34 抗原陽性細胞を精製する過程で、CD34 抗原を発現していない転移乳癌細胞を効率よく除去することが可能であると思われる。しかしながら、転移乳癌細胞が CD34 抗原陽性細胞画分に混入する可能性が全くないとはいえないため、MDR1 遺伝子導入細胞を患者に戻す前に、MDR1 遺伝子導入細胞のなかに乳癌細胞関連抗原を発現する細胞が存在しないことをイムノサイトケミストリーで確認する。

(e) 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

HaMDR レトロウイルスはクラス 1,000 (NASA ユニット) の清浄度を持つ癌化学療法センター別館 2 階のクリーンルームにおいて患者の細胞に導入される。このクリーンルームは本臨床研究のためにのみ使用される部屋であり、レトロウイルス導入に携わる研究者以外は入室できない。したがって、その他の人がレトロウイルスに接触する可能性はない。また、遺伝子導入をした細胞を凍結保存前に遠心洗浄する過程で培養上清中に残存する HaMDR レトロウイルスは除かれる。したがって遺伝子導入細胞が凍結された後は、最初に遺伝子導入に用いた HaMDR レトロウイルスが患者以外の人に導入される可能性はきわめて低い。また、新たにレトロウイルスが患者の体内で生産されることは、RCR が出現した場合を除いてはありえない。また、仮に患者の体内に増殖性レトロウイルスが出現し、HaMDR レトロウイルスが産生された場合でも、レトロウイルスは空気感染せず、レトロウイルスが接触した皮膚に傷があるような場合以外は他の人に感染することはない。よって患者以外の人にレトロウイルスが導入される可能性はほとんどないといつてよい。

(f) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

本研究においては標的細胞の染色体に MDR1 遺伝子が組み込まれることが必要であり、染色体に組み込まれることによる問題が発生する。レトロウイルスはランダムに標的細胞のゲノム DNA に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を破壊する可能性もあるが、たいていの場合そうした細胞は死滅すると考えられる。レトロウイルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって、将来腫瘍が発生することも考えられる。2002 年にフランスで実際にレトロウイルスの組み込みにより白血病を発症したという症例が 2 例報告された。

X-SCID (X 染色体性重症複合免疫不全症) は、共通 γ 鎖 (γ c) 遺伝子の異常によって起こる先天性の疾患である。X-SCID の患者では、共通 γ 鎖の異常のためにインターロイキン-2 (IL-2) ; IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 の各受容体が全て機能不全になり、その結果として免疫担当細胞である T リンパ球、NK (ナチュラルキラー) 細胞の欠失と B リンパ球の機能不全をおこす。すなわち、免疫を担うリンパ球がほとんど機能しない、という疾患である。この病気に対してはこれまでは骨髄移植以外に有効な治療法はなく、骨髄移植を施行しない患者は乳幼児期に死亡する。フランスのネッカー小児病院の Fischer 博士らは、レトロウイルスベクター MFG/ γ c を用いて X-SCID 患者の自家骨髄由来 CD34 陽性細胞へ正常な γ c 遺伝子を導入して患者へ移植する遺伝子治療を 1999 年 3 月より開始した。これまでに 11 例の患者に遺伝子治療を行ったところ、9 例で免疫不全症が完全に修復され、致死的な感染症への罹患がなくなったと報告された。この結果は 2000 年 4 月の Science 誌に掲載され、遺伝子治療の最大の成功例として世界中の注目を集めた。

この遺伝子治療を受けた患者のうち 2 例が T 細胞白血病を発症した。1 例目の患者は 1999 年 10 月に生後 1 カ月で遺伝子治療を受け、その後は普通の生活を送っていた。移植 2 年半後より T 細胞増殖症が発見され、数ヶ月後に T 細胞白血病となった。この患者には化学療法が施行された。患者で増殖した T 細胞では、11 番染色体の LMO-2 遺伝子にレトロウイルスが 1 コピー挿入され、LMO-2 が高発現していた。LMO-2 高発現マウスの 15% が T 細胞腫をおこすことから、LMO-2 は癌遺伝子と考えられている。また、白血病期では t(6;13) の染色体転座も認められた。2 例目の患者は生後 3 ヶ月で遺伝子治療を受け、移植 3 年後に T 細胞白血病となった。この患者の細胞でも、LMO-2 遺伝子の近傍にレトロウイルスが 1 コピー挿入され、LMO-2 が高発現していた。この 2 例目の患者では、1 例目の患者でみられたような水痘感染、家系内に癌患者がいるという遺伝的背景などはない。よって、レトロウイルスの挿入による LMO-2 遺伝子の活性化が白血病の直接的な原因と考えられる。この 2 症例は、(1) 非常に幼少期に遺伝子治療を受けた、(2) 大量の遺伝子導入細胞が移植された、などの共通点を持つが、これらと白血病発症との因果関係は明らかにされていない。

本研究でも、レトロウイルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって、将来腫瘍が発生することが考えられるため、この点については対象患者によく説明した上でインフォームドコンセントを取る。

(g) 癌原性の有無

Amphotropic な env 蛋白を持つ組み換え MoMLV は免疫抑制剤を前投与されたサルにリンパ腫を引き起こすことが示されているため、RCR の出現については慎重に検討されなければいけない。しかしながら、RCR が検出されないレトロウイルスの導入によって、in vivo での RCR の発生は報告されていない。また、健康なサルに MoMLV を投与した場合には、これまでにリンパ腫を含む腫瘍の発生は認められていない。

レトロウイルスはランダムに標的細胞のゲノム DNA に挿入されるため、細胞機能に重要な遺伝子を破壊する可能性もあるが、たいていの場合そうした細胞は死滅すると考えられる。レトロウイルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって、将来腫瘍が発生することも考えられる。2002 年に実際にレトロウイルスの組み込みにより白血病を発症したとい

う症例がフランスで報告された（上記）。本研究でも、レトロウイルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって、将来腫瘍が発生することが考えられるため、この点については対象患者によく説明した上でインフォームドコンセントを取る。

(2) 遺伝子産物の安全性

本研究において導入される遺伝子の産物は、本来正常のヒトの細胞に発現している P-糖蛋白と同じものである。遺伝子導入の直接の標的細胞である CD34 抗原陽性細胞はもともと少量の P-糖蛋白を発現しているため、その発現量の増大が問題となるとは考えられない。実際、MDR1 遺伝子を導入された CD34 抗原陽性細胞から赤芽球、単球、顆粒球などへの分化と増殖が起こることが *in vitro* の実験で確かめられている。また、MDR1 遺伝子の発現が他の細胞に傷害となることは考えられない。

MDR1 遺伝子が骨髓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 β -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、骨髓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)。

MDR1 レトロウイルスを導入したマウス骨髓細胞を同系マウスに移植した実験においては、一部のマウスに遺伝子導入細胞の生体内での異常増殖がおこったことが報告されている。

これまでに M.D.Anderson 癌センターで 20 症例、NCI で 10 症例、コロンビア大で 5 症例に対し、MDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。このうち、NCI の 10 症例全て、およびコロンビア大の 2 症例で、患者末梢血に MDR1 遺伝子導入細胞が確認された。これらの症例で 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。また、東大医科研では 3 匹のマーモセットに MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行い、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。

とりわけ、NCI の 1 症例では末梢の有核細胞中の MDR1 遺伝子導入顆粒球の割合が 1% より高い状態が 3 ヶ月以上継続し、最大 9% であった。この患者では治療終了まで末梢血に MDR1 遺伝子陽性細胞が検出された。しかし、この患者を含め全ての患者 (35 名) で白血球の異常増殖が起きなかったということで、MDR1 遺伝子導入細胞がヒトで異常増殖をおこす可能性は少ないと考える。

(3) 細胞の安全性

(a) 培養細胞の純度

遺伝子導入される細胞は患者の末梢血単核細胞より純化された CD34 抗原陽性細胞である。この細胞のなかに CD34 抗原陰性の末梢血単核細胞が混在していても問題はない。遺伝子導入される細胞中に癌細胞の混入があると問題であるが、この点についてはあらかじめ検査を行う。

(b) 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

前述のようにレトロウイルスは標的細胞の染色体にランダムに組み込まれるので、その結果として遺伝子が導入された細胞集団の遺伝子型、表現型に影響を与えることはない。

(4) 患者に投与する物質の純度及び安全性

本遺伝子治療臨床研究において患者に投与する物質で、通常の自己造血幹細胞移植併用大量化学療法と異なるものは、MDR1 遺伝子が導入された CD34 抗原陽性細胞である。遺伝子導入に

使用するレトロウイルス HaMDR については、別記のごとく FDA の基準に従って安全性に関する項目全ての検査を行い、その安全性が確認されたものを使用する。培養に用いるウシ胎児血清 (FBS, Hyclone 社製, Defined Fetal Bovine Serum, Catalog#:SH30070) は MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) が臨床用レトロウイルスを作成するときに使用するロットを用いる。この FBS については、その生産者である Hyclone 社において別記のごとく細菌、マイコプラズマ、真菌、エンドトキシン、ウイルスなどの安全性検査が済んでおり、さらに MA 社において遺伝子治療臨床研究のための安全性検査を行う (現在使用予定のロットについては参考資料 D-2)。CD34 抗原陽性細胞の培養に使用するサイトカイン類は遺伝子組み換えによって生産されたものである。臨床研究には GMP 条件下で生産されたものを用いる (詳細は参考資料 D)。これら FBS、サイトカインを含む ex vivo での遺伝子導入に使用される培養液や試薬については、細胞を患者に戻す前に十分に洗浄されるため、患者に実際に投与される量はきわめて少なく、その直接作用による問題はないと考えられる。また、細胞の培養と遺伝子導入はクラス 1,000 (NASA ユニット) のクリーンルームで行われるため、細菌、マイコプラズマ、真菌などが混入する可能性はきわめて低いと考えられる。しかしながらその可能性は完全には否定できないので、細菌、マイコプラズマ、真菌、エンドトキシンなどの検査を行って安全性を確認した後、患者に MDR1 遺伝子導入細胞を輸注する。また、組み換えレトロウイルスを用いることから、RCR が出現する可能性があるが、これについては、遺伝子導入細胞を患者に戻す前に env 遺伝子を検出する PCR により、RCR が存在しないことを確認する。また、これとは別に、遺伝子導入細胞および遺伝子導入時の培養上清に対して S+L 試験を行い、遺伝子導入の過程において RCR が出現しなかったことを確認する。ただし、S+L 試験は数週間の時間を要するため、患者への遺伝子導入細胞の移植は、S+L 試験の結果がでていないことを必要条件としない。

10 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

当化学療法科では、1987 年 4 月より自己造血幹細胞移植併用大量化学療法が開始され、先進的な治療方法としてその治療管理ユニットは確立されている。本遺伝子治療の臨床管理的基盤は充実整備されている。

このうち、再発進行乳癌症例に対しても、これまでに、自己造血幹細胞移植併用大量化学療法を 40 症例以上施行している。従来の自己造血幹細胞移植併用大量化学療法に登録可能な症例の多くは本研究に登録可能であると考えられるため、対象患者の理解が得られれば、期間内に目標症例数を達成することは可能であると考えられる。

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)。MCB の細胞に対して、MA 社および MAGENTA 社 (現 BioReliance 社) において安全性試験が行われ、その結果 3P26 細胞は米国 FDA の定める全ての安全性基準を満たしていることが確認された。最初の臨床ロットの HaMDR レトロウイルス液は 1998 年に作成され、米国 FDA の定める全ての安全性基準を満たしていることが確認された。今後、新たに臨床ロットの HaMDR レトロウイルス液を作成する場合は、ロットごとに同じ安全性検査を行う。

また我々は MDR1 遺伝子治療の基礎的研究を精力的に進めており、この分野で国際的にも高い評価を受けている。また、ヒトの CD34 抗原陽性細胞への MDR1 遺伝子導入のための設備および技術は整備されている。

既に米国では 1995 年より 3 施設にて同様の遺伝子治療が開始されている。NCI およびコロンビア大の臨床研究については、その結果の詳細な報告がなされている (Cowan et al, 1999,

Moscow et al, 1999, Hesdorffer et al, 1998)。これまでに M.D.Anderson 癌センターで 20 症例、NCI で 10 症例、コロンビア大で 5 症例に対し、MDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。このうち、NCI の 10 症例全て、およびコロンビア大の 2 症例で、患者末梢血に MDR1 遺伝子導入細胞が確認された。とりわけ、NCI の 1 症例では末梢の有核細胞中の MDR1 遺伝子導入顆粒球の割合が 1%より高い状態が 3 ヶ月以上継続し、最大 9%であった。この患者では治療終了まで末梢血に MDR1 遺伝子陽性細胞が検出された。しかし、この患者を含め全ての患者 (35 名) で 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。

本研究で用いる HaMDR レトロウイルスの遺伝子のうち、レトロウイルス骨格の構造はコロンビア大で臨床研究に使われた HaMDR1/A と同じである。コロンビア大の HaMDR1/A レトロウイルスでは colchicine 耐性 KB 癌細胞より単離された変異型 MDR1 遺伝子が用いられたが、本研究の HaMDR レトロウイルスでは本来ヒトに発現しているものと同じ MDR1 遺伝子を用いる。また、NCI の臨床研究では野生型の MDR1 遺伝子を発現するレトロウイルスが用いられた。これまでの報告では NCI およびコロンビア大の臨床研究でそれぞれの MDR1 レトロウイルスに起因する副作用は報告されていない。HaMDR レトロウイルスの構成タンパクは PA317 細胞の産生するものであり、これは NCI での MDR1 遺伝子治療の臨床研究や北海道大学の ADA 欠損症に対する遺伝子治療などを含む多くの臨床研究で使われている。以上より、本研究で用いる HaMDR レトロウイルスはそれ自体として臨床研究で使われたことはないものの、これまでの施設での経験より、予測できない副作用を引き起こす可能性は極めて低いと思われる。

11 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本遺伝子治療臨床研究は、財団法人癌研究会附属病院化学療法科における再発あるいは進行乳癌症例に対する通常量の導入化学療法および自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法に引き続いて行われる。患者末梢血 CD34 陽性細胞への MDR1 遺伝子導入、MDR1 遺伝子導入細胞の移植及びその後の継続化学療法は通常の自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法のプロトコールに含まれない部分であり、この部分が遺伝子治療臨床研究である。

通常量の寛解導入化学療法 (4 から 6 コース) により CR あるいは PR がえられ、自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法のインフォームド・コンセントが得られて、自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法を施行する予定の再発あるいは進行乳癌症例の症例のうち、遺伝子治療のインフォームド・コンセントが得られた症例を本遺伝子治療研究の対象症例とする。自己末梢血幹細胞移植に用いる患者の末梢血単核細胞の採取は連日 3 日間を 1 コースから 3 コース施行する。遺伝子治療を施行する症例については、各コース 2 日分 (全採取細胞の 2/3 相当量) の末梢血単核細胞は、通常の自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法の手順に従い、そのまま凍結保存する。別に患者の骨髄血より骨髄単核細胞を採取し、これをバックアップとして凍結保存する。

本遺伝子治療には、遺伝子治療を施行する症例の、各コースの 1 日分の末梢血単核細胞を使用する。MDR1 遺伝子導入のために、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 2 日間培養する。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、MDR1 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する。遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞の一部を用いて遺伝子導入と発現の検討、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。

患者には、次いで、財団法人癌研究会附属病院化学療法科のプロトコールに基づいて自己造血幹細胞移植併用大量化学療法が施行される。患者に未処理の 2/3 相当量の末梢血単核細胞が戻される際に、凍結保存しておいた MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を同時に移植する。その後患者の臨床症状、臨床所見および諸検査成績等の推移を経過観察し、骨髄再構築が達成され

て末梢血所見が正常化しかつ対象症例の一般状態が完全に回復した後、本遺伝子治療プロトコールの手順に従い docetaxel の投与を施行する。docetaxel の投与量は通常投与量 (60mg/m²) の50%量より開始し、75%量、100%量と順次増量する。docetaxel による治療が不適応あるいは無効であった患者に対しては、paclitaxel あるいは anthracycline 系抗癌剤による治療を考慮する。これらの抗癌剤投与後の末梢血液所見、骨髄所見等を中心に本プロトコールの安全性及び有効性を経時的に検討する。

12 遺伝子治療の対象症例

本研究の対象となる乳癌症例は自己造血幹細胞移植併用大量化学療法を施行する患者である。患者は以下の条件を満たすものとする。

(1) 対象症例の選択基準

(A) 自己造血幹細胞移植併用大量化学療法の対象症例の選択基準

- (a) 自己造血幹細胞移植併用大量化学療法を受けることについて文書にて同意が得られている症例
- (b) 乳癌であることが組織診または細胞診にて確認されている症例
- (c) 臨床病期 IV の再発あるいは進行乳癌症例で、先行する化学療法により CR あるいは PR が得られた症例
- (d) 重篤な合併症がない症例
- (e) 重篤な活動性を有する疾患を有さない症例。
- (f) 年齢：20 歳以上 60 歳以下の症例
- (g) performance status (PS) : 0 - 1 (ECOG criteria) の症例
- (h) 3 ヶ月以上の生存が期待される症例
- (i) 本研究に耐え得るだけの十分な生理機能 (肝、腎、骨髄等) を有する症例で下記の各パラメータの条件を満たすこと
 - ・好中球数 : 1,500/μl 以上
 - ・血色素量 : 9.0g/dl 以上
 - ・血小板数 : 100,000/μl 以上
 - ・クレアチニン・クリアランス : 60 ml/min 以上 (24 時間法)
 - ・血清総ビリルビン : 1.0 mg/dl 以下
 - ・血清 GOT、GPT : 100U /l 以下
 - ・イジェクションフラクション(EF) : 60% 以上
 - ・心電図 : 正常範囲
 - ・骨髄穿刺と生検 : 組織学的に腫瘍細胞を認めない
 - ・HIV、HBV、HCV : 陰性

(A') 自己造血幹細胞移植併用大量化学療法の対象症例の除外基準

下記条件の症例は本研究の対象としない。

- (a) 重篤な薬剤過敏症の既往歴のある症例
- (b) 脳転移を有する症例
- (c) 骨シンチにおいて骨転移所見を有する症例
- (d) 活動性を有する感染症を有する症例
- (e) 骨盤に対する放射線療法の既往を有する症例。