

**遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請について
(国立がんセンター)**

(遺伝子治療臨床研究実施計画の申請)

- 諮問及び付議.....P1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書及び概要書.....P3
- 同意説明文書.....P31
- 厚生科学審議会科学技術部会がん遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿...P83

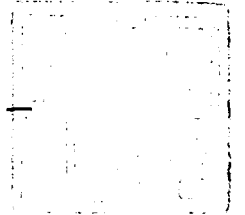
(遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請)

- 諮問及び付議.....P84
- 第一種使用規程承認申請書.....P86
- 生物多様性影響評価書.....P89
- 厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業委員会
遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会委員名簿
.....P112

厚生労働省発科第 0616003 号
平成 20 年 6 月 16 日

厚生科学審議会会長
久道 茂 殿

厚生労働大臣 舩添 要一



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

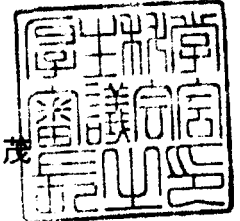
記

平成 20 年 6 月 9 日に国立がんセンター総長から提出された「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法」計画

厚科審第8号
平成20年6月16日

科学技術部会部会長
垣添 忠生 殿

厚生科学審議会会長
久道 茂



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成20年6月16日付け厚生労働省発科第0616003号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第3条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

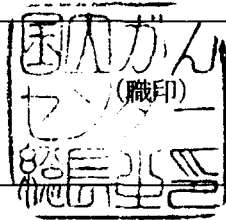
別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 20 年 6 月 9 日

厚生労働大臣 殿

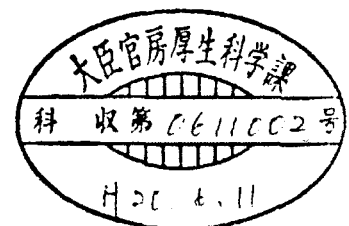
実 施 設	所在地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目 1 番 1 号
	名称	国立がんセンター (電話番号) 03-3542-2511 (FAX 番号) 03-3545-3567
	代表者 役職名・氏名	国立がんセンター 総長 廣橋 説雄



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 “Add-back” 療法	国立がんセンター中央病院 薬物療法部・幹細胞移植療法室 医長 平家 勇司



遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成 20 年 6 月 9 日 (申請年月日)

研 究 の 名 称	ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球“Add-back”療法
研 究 実 施 期 間	年 月 日(承認日)から3年間

総括責任者	所属部局の所在地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目1番1号	
	所属機関・部局・職	国立がんセンター中央病院・薬物療法部・幹細胞移植療法室・医長	
	氏 名	平家 勇司	(印)
実施の場所	所 在 地	(郵便番号) 104-0045 東京都中央区築地五丁目1番1号	
	名 称	国立がんセンター中央病院	
	連 絡 先	(電話番号) 03-3542-2511	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所 属 機 関 ・ 部 局 ・ 職	役 割
	吉田輝彦	国立がんセンター研究所 ・腫瘍ゲノム解析・情報研究部・部長	遺伝子導入細胞製剤 の製造管理責任者
	青木一教	国立がんセンター研究所 ・がん宿主免疫研究室・室長	遺伝子導入細胞製剤 の品質管理責任者
	高上洋一	国立がんセンター中央病院 ・薬物療法部・薬物療法部長	臨床効果の評価
	飛内賢正	国立がんセンター中央病院 ・第一領域外来部・第一領域外来部長	臨床効果の評価
	森慎一郎	国立がんセンター中央病院 ・臨床検査部・細菌検査室医長	投与患者の診療
金 成元	国立がんセンター中央病院	投与患者の診療	

対象疾患及び
その選定理由

1. 対象疾患

ヒト白血球抗原(HLA)適合又は1抗原不一致(血清型)の適切なドナーのいない、早期に移植治療を必要とする高リスク造血器悪性腫瘍患者。

2. 対象疾患に対する現時点での知見

【造血器悪性腫瘍に対する造血幹細胞移植の現状】

HLA 適合血縁者間での造血幹細胞移植は確立された治療手段であるが、約60%の患者はHLA 適合ドナーが存在しない。この場合、骨髄バンクを介して、非血縁者ドナーを探すこととなるが、ドナーが存在しない可能性及びコーディネートに時間を要するという問題がある。

【本邦における成人に対する臍帯血移植の現状】

本邦では、1994年に最初の同胞間臍帯血移植、1997年に非血縁者間臍帯血移植が行われて以来、緊急的移植にも迅速に対応可能であること、ドナーの負担がないこと、HLA 2座不一致まで移植可能であること等の利点があり、増加の一途を辿っている。2002年以降は成人における移植件数が小児のそれを上回るようになった。

【当施設における臍帯血移植の経験】

国立がんセンター中央病院では複数の臨床研究において症例登録を行い臍帯血移植を実施、着実に経験を蓄積している。

【日米欧から報告された成人に対する臍帯血移植の成績】

今までに報告された日米欧の多施設あるいは単施設からの成人に対する臍帯血移植の成績から、以下が明らかにされた。

- ・ 成人に対する骨髄破壊的前処置を用いた臍帯血移植においても、造血の再構築が得られること。
- ・ 発症する急性・慢性GVHDは許容できるものであること。
- ・ ハイリスク患者を対象とした場合でも10~20数%の長期生存が得られること。
- ・ 患者の年齢、移植されたCD34陽性細胞数が成績に相関すること。
- ・ 移植後100日以内の早期死亡例では感染症や前処置関連毒性が多いこと。

また、日本国内では、学会を中心に継続して成績の集積が行われている。

【日米欧から報告された成人における非血縁者骨髄移植と非血縁者臍帯血移植の成績の比較】

2004年末に欧米及び本邦から成人に対する非血縁臍帯血移植と非血縁者骨髄移植の治療成績が報告された。

欧米からの2つの報告の結果は、いずれも、HLA一致ドナーが見つからない場合には臍帯血は許容できる幹細胞ソースであると結論されており、類似していた。

本邦からの報告(単一施設による)では、血縁者ドナーが存在しない場合には、臍帯血が第一の幹細胞ソースであると結論されていた。臍帯血移植の成績としては、極めて優れていると評価されており、欧米からの報告とは異なっている。

【成人に対する臍帯血移植の課題】

現時点では、成人に対する臍帯血移植は、造血幹細胞移植の中の一つの選択肢として捉えられているが、体重あたりの移植細胞数が少ない場合には、生着不全の頻度が高い、生着までに時間を要する、移植後の重症感染症による治療関連死が多いといった点が指摘されている。

【ミスマッチ移植の現状と課題】

ミスマッチ移植は100%に近い確率でドナーを見つけることが可能である。しかし、移植片が非自己を認識する作用が強いため、そのままでは生着しにくく、拒絶のリスク及び重篤な急性GVHD発症のリスクが問題となる。G-CSFにより動員した末梢血幹細胞(peripheral blood stem cell; PBSC)からT細胞を除去した大量の造血幹細胞を急性白血病患者に移植することで、造血幹細胞を高率に生着させ、かつ重篤なGVHDを回避する手法も確立されているが、非血液疾患死亡率及び白血病再発率は依然として高く、この

観点でのより有効な治療法の開発が必須となっている。

【本邦におけるミスマッチ移植の現状と課題】

近年行われた調査によると、HLA 2 座以上の不一致を伴う移植においては、通常のGVHD 予防のみを行った場合には生存率が大きく低下した。HLA 2 座以上の不一致血縁者間移植を成功させるために、体外での T 細胞除去又は CD34 陽性細胞純化を行うミスマッチ移植、母子間免疫寛容の仮説に基づいたミスマッチ移植、強力なGVHD 予防法を用いたミスマッチ移植、及びアテムツズマブを用いた in vivo での T 細胞除去によるミスマッチ移植などの応用・研究が進んでいる。

【T 細胞除去ミスマッチ移植における課題に対する対策】

ドナー由来の T 細胞は造血幹細胞の生着及び宿主免疫再構築を促進しており、移植患者から日和見感染を予防し、GVM 効果による再発防止に寄与している。したがって、T 細胞除去ミスマッチ移植では、移植後早期に免疫系を再構築する手立てが必須である。

イタリアのモルメド社は、自殺遺伝子である HSV-TK 遺伝子をレトロウイルスベクターにより導入したドナー T リンパ球を調製し、これを T 細胞除去ミスマッチ移植後に Add-back することで、早期に免疫系を再構築する臨床試験を実施している。HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球には重篤な GVHD 発症時に GCV 製剤投与により当該細胞を抹消して沈静化する安全装置としての機能が付与されており、大量に Add-back することにより早期の免疫系再構築、感染症を含む治療関連死の発生率低下、及び GVM 効果による疾患再発阻止が期待できる。

【モルメド社の臨床試験概要】

現在、「ハプロタイプ一致ドナー由来 T 細胞除去造血幹細胞移植後の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 療法」による第 I / II 相臨床試験 (TK007) を欧州 4 施設において実施している。第 47 回米国血液学会において発表された本試験の途中経過では、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の Add-back が、早期免疫系再構築を促進し、移植後の感染死を含む治療関連死を予防し、全体としての生存率を上げることが確認された。

【タカラバイオ株式会社の治験概要(予定)】

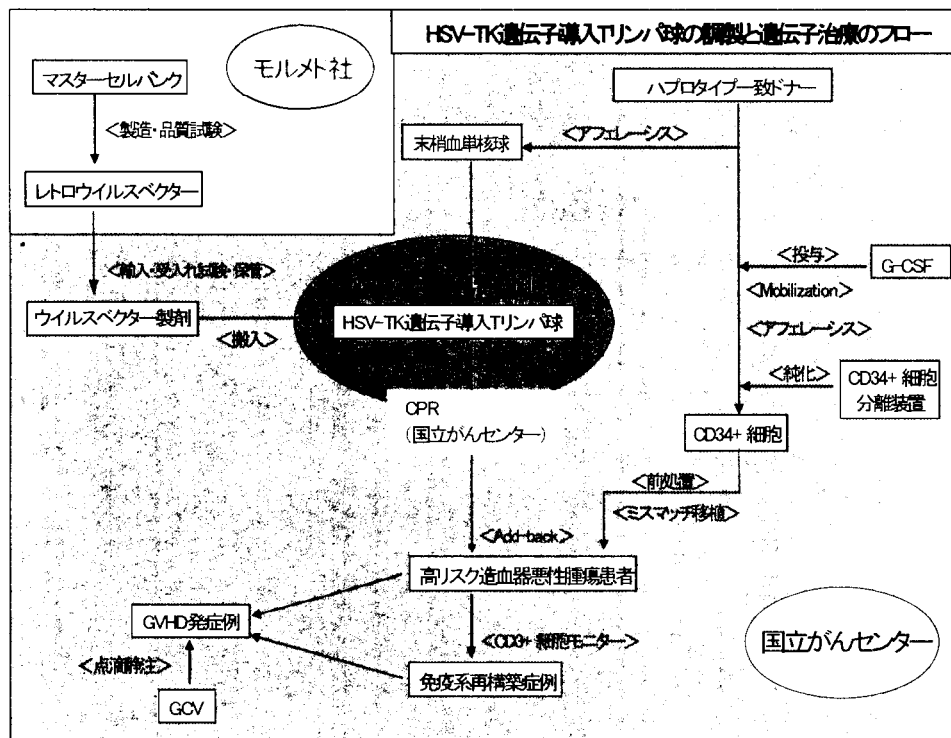
モルメド社から輸入した本臨床研究と同一のレトロウイルスベクターを用いた治験が、タカラバイオ(株)により計画されている。この治験では、同種造血幹細胞移植後に再発をきたした造血器悪性腫瘍患者を対象として、遺伝子導入 T リンパ球がドナーリンパ球輸注療法において投与される。タカラバイオ(株)は第 I 相試験を国立がんセンター中央病院で平成 20 年度に開始する予定である。

3. 本遺伝子治療臨床研究の概要

【本遺伝子治療臨床研究の全体フロー】

以上の状況を踏まえ、モルメド社が実施した臨床試験と同様のプロトコールによる遺伝子治療臨床研究を実施計画することとした。

本遺伝子治療臨床研究を実施するにあたっては、病院内に設置された無菌細胞調整施設(CPR)にて、モルメド社から輸入したレトロウイルスベクターを用いてHSV-TK 遺伝子導入細胞を GMP 基準に準拠して調製し、品質試験を行う。



【患者仮登録時選択基準の概要】

- 1) 予後不良の高リスク造血器悪性腫瘍患者(詳細は別途規定)
- 2) HLA 適合又は HLA 1 座不一致の適切なドナーがない
- 3) 末梢血幹細胞提供可能な HLA 2~3 座不一致の血縁ドナーがいる
- 4) 年齢が 20 歳以上 60 歳以下
- 5) ECOG の Performance Status が 0 又は 1
- 6) 主要臓器の機能が保たれている(詳細は別途規定)
- 7) ドナー及び患者の両者から文書での同意が得られている

【HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球の調製】

使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、モルメド社で GMP 基準に則って作製され、品質規格に適合したものを輸入して受け入れる。なお、当該レトロウイルスベクターは、モルメド社が欧州で実施中の臨床試験(TK007)及び本邦における筑波大学付属病院での遺伝子治療臨床研究で使用されているものと同一である。

T細胞除去ミスマッチ移植ドナーと同一のドナーに由来するPBMCをアフェレーシスにより採取する。IL-2 存在下で抗 CD3 抗体によりPBMCを刺激して活性化し、SFCMM-3により HSV-TK 遺伝子及び細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体(Δ LNGFR)遺伝子を ex vivo 遠心法により導入する。その後、抗 LNGFR 抗体と二次抗体結合磁気ビーズ及び細胞分離装置による純化、並びに IL-2 存在下での拡大培養を経て遺伝子導入 Tリンパ球を調製し、品質試験に合格した後に用いる。一部の品質試験項目については、Add-back 後に試験を実施することとし、万一不合格となった項目があればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。つまり、化学療法や移植幹細胞ソースの再検索といった臨床現場において現時点で HLA 適合又は HLA 1 座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者に行われている中で、患者の状態に応じ

総括責任者(又は治療にあたる分担研究者)が最も適切と考える治療法を行う。

【T細胞除去ミスマッチ移植】

ドナーからの末梢血幹細胞は、G-CSF 製剤投与により動員し、アフエーシスにより採取する。その後、CD34 陽性細胞を分取し、 4×10^6 個/kg を最少量として患者に移植する。

前処置は、モルメド社の臨床試験(TK007)と同様の内容で実施する計画である。アシクロビル(ACV)製剤及びGCV製剤は、後にAdd-backするHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球の自殺機能を惹起することから、本臨床研究で感染予防・治療には使用しないこととする。サイトメガロウイルス(CMV)感染が問題となった場合には、ホスカルネットナトリウム製剤を使用する予定である。

【HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back 及びフォローアップ】

T細胞除去ミスマッチ移植後、免疫系再構築の開始が確認されない場合には、造血幹細胞の生着が見込まれる移植後42日目の時点で、HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 1×10^6 個/kgをAdd-backする。その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後72日目及び102日目の時点で、それぞれ 1×10^7 個/kgのHSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球をAdd-backする。最終のAdd-back実施の6ヵ月後に本臨床研究のフォローアップを終了する。Grade II～IVのGVHDの発症が認められた場合には、通常のCMV感染症治療に用いられる用法・用量に従ってGCV製剤を投与する。この場合、患者の状態によっては、それまでのAdd-backの回数が1回または2回の場合、医師の判断により、GCV製剤投与後に1回のみHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球(1×10^6 個/kg)のAdd-backを許すものとする。

4. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

①ミスマッチ移植

ミスマッチ移植の課題の解決策を他の治療手段との比較をしながら段階的に示す。

【ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植】

ミスマッチ移植におけるT細胞除去は重篤なGVHD予防に最も有効な手段であるが、移植後の免疫抑制状態が感染症を引き起こすリスクを高めており、また再発などの問題も指摘されているため、早期の免疫系再構築、及びGVM効果が課題となる。

【T細胞除去ミスマッチ移植 vs T細胞除去ミスマッチ移植+Tリンパ球 Add-back】

T細胞除去ミスマッチ移植後の早期免疫系再構築においては、移植時と同じドナーに由来するTリンパ球のAdd-backは、理論的に有効な手段と考えられる。しかし、少量のTリンパ球のAdd-backでも致死的なGVHDを発症した例があり、改善が必須である。

【Tリンパ球 Add-back vs HSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球 Add-back】

本遺伝子治療では、T細胞除去ミスマッチ移植後の早期に免疫系を再構築するために、同一ドナー由来のHSV-TK 遺伝子導入 Tリンパ球をAdd-backする計画である。これはAdd-backしたTリンパ球が直接要因となる致死的なGVHD発症に対する対策として、安全装置としての自殺機能を当該Tリンパ球に付与するという考えに基づき、理論的には移植した造血幹細胞由来の免疫系には影響を与えずにGVHDを選択的に沈静化することが期待される。

②臍帯血移植

臍帯血移植については、近年、その評価は定まりつつあるが、成人に適用する場合の細胞数不足及び移植後療法としてのドナーリンパ球輸注などの細胞療法が不可能であることなどが問題点として挙げられている。臍帯血移植の利点である「ドナーの負担がない」という点では、本遺伝子治療は通常の移植以上にドナーの負担が大きいことから、臍帯血移植の方が優れているが、代表的な問題点である移植細胞数の不足、造血回復の遅延、生着不全の頻度の高さについては、本遺伝子治療により解決策を見出せる可能性がある。

	<p>ドナーの負担という点では、本遺伝子治療の個々の症例への適応については、慎重かつしゅうぶんな検討が必要である。しかしながら、本遺伝子治療は、一連の治療法の課題に対する解決策を模索した上で計画されたものであり、これまでの海外での臨床実績からも安全性及び有効性が見込まれるものとして妥当な手法と考え選択した。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>1. 人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ΔLNGFR 遺伝子と HSV-TK 遺伝子である。</p> <p>①人に導入する遺伝子の構造 ・細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子(ΔLNGFR 遺伝子) 使用するΔLNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子の細胞内領域をコードする塩基対を除去したもので、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、ΔLNGFR をコードする 956 塩基対の遺伝子である。 ・単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子(HSV-TK 遺伝子) 使用する HSV-TK 遺伝子は、CL101 株 DNA 由来の HSV-TK をコードする 1,131 塩基対及び翻訳開始コドン ATG の上流に位置する 14 塩基対の非翻訳領域からなる。</p> <p>②人に導入する遺伝子の性質 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 に含まれるΔLNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子は細胞内に侵入した後、逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA から 2 本鎖 DNA が合成され、核内に移行する。5'-LTR と 3'-LTR ではさまれた DNA はウイルスが持っているインテグラーゼによって細胞染色体に組み込まれ(プロウイルス)、細胞ゲノムの複製に伴って複製されて安定的に娘細胞へ受け継がれる。このために継続的な遺伝子発現が可能である。</p> <p>③導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 ・ΔLNGFR の生物活性 ΔLNGFR は、細胞内領域のほとんどが除去されているため、シグナルを細胞内に伝達することはない。in vitro 及び in vivo において、ΔLNGFR の機能活性は観察されない。ΔLNGFR は細胞膜でたん白発現するため細胞表面マーカーとして利用され、特異的抗体を用いて in vitro で発現細胞を迅速に分離することができ、ex vivo での発現細胞の検出や生存状態、増殖状態等のキャラクタリゼーションを行うことができる。 ・HSV-TK の生物活性 HSV-TK は、遺伝子導入された細胞において自殺遺伝子産物として機能する。自殺遺伝子が導入された細胞では、その遺伝子産物により非毒性のプロドラッグである GCV が毒性型ドラッグに変換され、細胞が傷害を受ける。</p> <p>2. 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質 本計画では使用しない。</p> <p>3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由 GVM 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T リンパ球であること、及び当該細胞が GVHD の原因となることが知られている。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は増殖中の細胞を標的としており、組換えヒトインターロイキン 2(IL-2)存在下、抗 CD3 抗体で刺激することにより活性化された T リンパ球に対しても高い遺伝子導入効率が得られることが証明されている。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いた遺伝子治療においては、ドナーリンパ球から得られる活性化 T リンパ球が標的細胞として使用される。</p> <p>4. 遺伝子導入方法の概略及び当該遺伝子導入法を選択した理由 ①遺伝子導入方法の概略 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を含むウイルス産生細胞の培養上清中にドナー末梢血リンパ球を加え、遠心することで行う。 ②当該遺伝子導入法を選択した理由</p>

当該遺伝子導入法としてレトロウイルスベクターを用いた遠心法を選択した理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニー Maus 白血病ウイルス (MoMLV) ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されていること、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。

③レトロウイルスベクターの選択根拠

レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行うことにより、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の基になる SFCMM-3 DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag, pol, env をコードする遺伝子の全てもしくは一部を欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12, ATCC CRL-9641) は、gag, pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて導入されているため、増殖性レトロウイルス (RCR) が出現する可能性は極めて低いと考えられており、すでに世界的に広く使用されている。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

①野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

MoMLV はマウス白血病ウイルス (MLV) を実験室で継代して高病原性株として単離された。MLV は AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであり、オンコウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好性ウイルスも知られているが、MoMLV は細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。ヒトへの感染の報告はない。

②ウイルスベクターの作製方法

・SFCMM-3 DNA ベクターの構築

pLXSN からネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除いて SV40 初期プロモーターの下流に Δ LNGFR 遺伝子を、パッケージングシグナルの下流に HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。

・パッケージング細胞株の構築

本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、Am12 である。本細胞株は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (ひとつは gag 遺伝子と pol 遺伝子で、もうひとつはマウスアンフォトロピックウイルス 4070A 由来の env 遺伝子) で別々にマウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 に導入したアンフォトロピックパッケージング細胞株である。また、gag 遺伝子と pol 遺伝子を含むプラスミド及び MoMLV の env 遺伝子を含むプラスミドによりこれらの遺伝子を NIH 3T3 に導入して作製されたエコトロピックパッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) をウイルス産生細胞の構築に用いた。

・ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 を含む培養上清を回収した。この上清を Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞を構築した。

SFCMM-3 産生細胞から、良好な生育性と T リンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、MCB を作製した。

・レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、バンキングされたウイルス産生細胞株の培養上

	<p>液中にウイルス粒子の状態が存在する。 製造は全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。</p> <p>③ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 はパッケージングシグナルとしてΨ^+を有し、gag、pol、env をコードする遺伝子は除かれている。</p> <p>④ウイルスベクターの生物学的特徴 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 はアンフォトロピックパッケージング細胞株 Am12 により産生されるので、マウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染する。また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
安全性についての評価	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>①遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造は、モルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。製剤は、ロットごとにウイルス安全性を含め品質試験を行う。</p> <p>②患者に投与する物質の純度及びその安全性 患者に投与する物質は、HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球及びその懸濁媒である RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液 (CP-1) である。細胞調製の際に用いられる培地、試薬等に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に生理食塩水でじゅうぶんに洗浄されるので、患者に影響を及ぼすことはないと考えられる。</p> <p>③増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の可能性</p> <p>・レトロウイルスベクターの安全性 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 のゲノムは gag、pol、env をコードする遺伝子の全部、若しくは一部を欠如しているため、パッケージング細胞内でしか増殖できない。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 上清の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性の製剤だけを臨床使用する。</p> <p>・パッケージング細胞の安全性 Am12 は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミドで別々に導入した第 3 世代のパッケージング細胞株であり、RCR を産生する可能性は、第 1 世代及び第 2 世代パッケージング細胞株と比較して極めて低い。従って、SFCMM-3 DNA ベクターと Am12 の組み合わせにより作製されたウイルス産生細胞株を使用してレトロウイルスベクター-SFCMM-3 を製造する過程で RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。 Am12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したという報告があり、Am12 を用いても RCR 出現の可能性を完全には否定できないことを示唆している。一方、Am12 を用いて多種類のウイルスの RCR チェックを試みたが検出されなかったという報告がある。</p> <p>・HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の安全性 HSV-TK 遺伝子導入ドナー T リンパ球の調製完了後、RT-PCR 法及び Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S+L-テスト (以下、増幅法) による RCR 試験を行う。RT-PCR 法による試験の結果、RCR 陰性であった細胞だけが患者に投与される。増幅法による試験は日数を要するために患者への投与後に結果が判明する場合も考えられるが、万一不合格となればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずる。</p> <p>④遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必要な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうるが、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。</p> <p>⑤体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性</p>

本遺伝子治療臨床研究では、ドナーTリンパ球に ex vivo で HSV-TK 遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経たあと患者に投与するので、感染性を持ったレトロウイルスベクター-SFCMM-3 が患者に投与される可能性は低い。また、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は増殖能を欠いているので、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入されることはない。

⑥患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作にじゅうぶんな知識と経験を有する研究者のみが行い、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。遺伝子導入操作は P2 レベルの細胞調製施設において行い、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の環境中への拡散を防止する。レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

⑦染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合にはその細胞は死に至る可能性があるが、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の近傍に挿入され、これらの遺伝子の発現量が変化することにより当該細胞が無制限増殖する可能性がある。

⑧がん原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、がん原性の問題が出現するが、本遺伝子治療は、1) 対象が造血幹細胞移植を要する成人の白血病患者であること、2) 分化した成熟リンパ球への遺伝子導入であること、3) 導入遺伝子 (HSV-TK 及び Δ LNGFR) は安全装置及びマーカーであること、から安全性が高い臨床計画と考えられている。遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖性については linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) によってモニタリングすることにより、評価する予定である。

2. 遺伝子産物の安全性

①HSV-TK 遺伝子の異常発現

HSV-TK は、GCV との組み合わせにより選択的自殺作用 (HSV-TK/GCV 自殺システム) を示す。一方、GCV 非存在下、HSV-TK が触媒する反応は通常の細胞内で行われている代謝反応であり、過剰発現による体細胞への影響は小さいものと思われる。ただし、HSV-TK 遺伝子発現細胞が免疫原となり、患者体内で当該細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることが過去の遺伝子治療臨床研究で示唆されている。このことは、GVM 効果の長期継続に対する障害となっている。HSV-TK/GCV 自殺システムを利用した遺伝子治療臨床試験において、本自殺システムに関連する有害事象は報告されていない。

② Δ LNGFR 遺伝子の異常発現

Δ LNGFR は細胞内領域を欠損させており、細胞外領域及び細胞膜貫通領域を有するタンパク質であり、 Δ LNGFR 遺伝子を導入した Tリンパ球は NGF に対する反応を示さないことが報告されている。

3. 細胞の安全性

①遺伝子導入細胞の調製方法

ドナーリンパ球を抗 CD3 抗体で刺激した後、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 に懸濁し、遠心法により遺伝子導入を行う。抗 LNGFR 抗体及び磁気ビーズを用いて遺伝子導入細胞を選択し、拡大培養を行う。培養終了後の細胞を洗浄し、RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液 (CP-1) に懸濁して一旦凍結し、輸注時に解凍後、そのまま患者に投与する。

	<p>②培養細胞の純度 全ての操作は国立がんセンター中央病院内に設置したP2レベルの無菌細胞調整施設内にて行われる。培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、異なるドナー細胞への遺伝子導入を同時には行わない。また、細胞の取扱いはクラスⅡの安全キャビネット内で行い、感染性微生物の混入を防ぐ。</p> <p>③細胞の遺伝子型、表現型の安全性 抗LNGFR抗体及び磁気ビーズを用いた遺伝子導入細胞の選択により、ΔLNGFR陽性率が90%以上のTリンパ球が得られることが知られている。過去の実績から、レトロウイルスベクター-SFCMM-3により遺伝子導入したTリンパ球は非導入細胞と同様に、Tリンパ球としての機能を保持していることが確認されている。</p> <p>④被験者に投与する細胞の安全性 投与する細胞はレトロウイルスベクター-SFCMM-3により遺伝子導入したドナーTリンパ球である。現在、白血病に対するドナーリンパ球輸注は広く行われており、ドナーTリンパ球の投与がGVHD以外に患者に重大な影響を及ぼすことはない。遺伝子導入細胞の品質は、品質試験によって担保される。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>以下の理由により、本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本臨床研究で使用されるレトロウイルスベクター-SFCMM-3はイタリアのモルメド社によりGMPに従って製造され、本邦では筑波大学附属病院における臨床研究に使用された実績がある。またモルメド社は、これを用いて調製したHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球に対して、造血幹細胞移植における付加的治療として、2003年に欧州におけるオーファン医薬品の指定を受けており、現在、同ベクターを用いて本臨床研究と同様の治験を欧州4施設において実施している。2005年12月に開催された米国血液学会における発表では、途中経過として、その良好な経緯が報告された。 このことから、ハプロタイプ一致ドナー由来T細胞除去造血幹細胞移植後のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球“Add-back”療法は、非常に有望であり、T細胞除去ミスマッチ移植を安全かつ有効に行える可能性が示唆されている。 2. 国立がんセンター中央病院は我が国の悪性腫瘍治療の基幹病院である。本臨床研究対象疾患の診療では、設立以来の豊富な経験を有し、経験豊富なスタッフを擁している。また、本臨床研究対象疾患に合致する患者が多く受診している。 3. 総括責任者である平家勇司は、国立がんセンター研究所並びに中央病院において、細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究を行ってきた。1997～1998年にかけて、米国アラバマ大学遺伝子治療センターにおいて、アデノウイルスベクター開発に携わると共に遺伝子治療臨床研究の研修を行った。前勤務地である国立病院四国がんセンター（現独立行政法人国立病院機構四国がんセンター）では、治験を含む複数の臨床研究に携わった。現在、国立がんセンター中央病院・薬物療法部遺伝子免疫療法室において細胞療法並びに遺伝子治療の開発研究及び固形腫瘍に対する骨髄非破壊的前処置による同種造血幹細胞移植療法の臨床開発に従事している。分担研究者である、吉田輝彦並びに青木一教はベクター開発を含む遺伝子治療開発研究を行っている。高上洋一、飛内賢正、森慎一郎、金成元、福田隆浩、田野崎隆二は、造血幹細胞移植の専門家で、多くの治験並びに医師主導の臨床試験の実績がある。

実 施 計 画

1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

①本臨床研究の実施に際し国立がんセンター中央病院内に設置される委員会・事務局

本遺伝子治療臨床研究実施計画が了承された後に、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会及び遺伝子治療臨床研究実施事務局を国立がんセンター中央病院内に設置する。

遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会及び遺伝子治療臨床研究実施事務局は遺伝子治療臨床研究審査委員会からは独立しており、それぞれ次に示す役割を担う。

遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会は、被験者選定の適格性確認の妥当性の判定、臨床研究の安全性の客観的な判定、臨床効果の客観的な判定、プロトコールの変更の妥当性確認、5例終了時点での臨床研究の目的が評価できたかについての判定等を行う。

遺伝子治療臨床研究実施事務局は、遺伝子治療臨床研究効果安全性評価委員会との連絡等事務局業務、症例登録業務等の本遺伝子治療臨床研究を適切に実施するための支援業務を行う。

②本臨床研究の実施手順

被験者・ドナー選定、登録～遺伝子導入Tリンパ球調製・移植細胞の分離・移植前処置

適応が予測される被験者及びそのドナーに対し、文書によるインフォームドコンセントを行い、文書による同意が得られた場合、適格性を確認する。適格性が確認できた被験者及びそのドナーについて、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への仮登録及び登録をそれぞれ依頼する。ドナーより、血漿、末梢血単核球(PBMC)画分及び末梢血幹細胞(PBSC)の採取を行い、一連の細胞調製を行う。遺伝子導入Tリンパ球は、品質を確認した後に Add-back に用いる。PBSC については、専用の細胞分離装置を用いて CD34 陽性細胞の分離を行い、この分離細胞を移植細胞とする。

遺伝子導入Tリンパ球の調製及び移植細胞の採取後、被験者の適格性を確認し、遺伝子治療臨床研究実施事務局に本臨床研究への本登録を依頼する。被験者が本登録となったことを確認した後、Fludarabine 製剤、Thiotepa 製剤、Thymoglobulin 製剤、及び放射線全身照射(TBI)による骨髄破壊的前処置を移植前処置として施行し、移植前処置の安全性及び原疾患の状態を確認する。

造血幹細胞移植

移植前処置後、CD34 陽性細胞の分離細胞 4.0×10^6 個/kg 以上を移植細胞として造血幹細胞移植を行う。

造血幹細胞移植後～遺伝子導入Tリンパ球 Add-back

移植直後の転帰の確認及び自発的な免疫系再構築の開始の確認を目的に造血幹細胞移植 30 日後から 40 日後の間に被験者の検査・観察を行う。遺伝子導入Tリンパ球 Add-back は以下に従い、免疫再構築の確認が得られるまで最大3回、それぞれ定められた日から7日以内に行うものとする。

初回の遺伝子導入Tリンパ球 Add-back 以降、GVHD が発症した場合には「GVHD 発症時の対応」の項の記載に従い、治療を行う。

初回の Add-back: 自発的な免疫系再構築の開始が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には造血幹細胞移植日を 0 日として 42 日目に 1×10^6 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

2 回目の Add-back: 初回の Add-back 以降、免疫系再構築が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には初回の Add-back から 30 日後に 1×10^7 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

3 回目の Add-back: 2 回目の Add-back 以降、免疫系再構築が確認されない場合、かつ GVHD を発症しないあるいは Grade II 以上の治療を必要とする GVHD を発症しない場合には 2 回目の Add-back から 30 日後に 1×10^7 個/kg の遺伝子導入Tリンパ球を Add-back する。

遺伝子導入Tリンパ球 Add-back 後のフォローアップ

安全性の判定に関する検査・観察、免疫系再構築の判定に関する検査・観察、GCV 製剤投与による GVHD 沈静化能の判定に関する検査・観察等を行う。

遺伝子導入Tリンパ球の Add-back に伴い、重篤な GVHD が発症した場合には、GCV 製剤を投与する。その場合、GCV 製剤投与による GVHD の沈静化能に関する検査・観察