

遺伝子治療臨床研究実施計画について (三重大学医学部附属病院)

- 三重大学医学部附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について（がん遺伝子治療臨床研究作業委員会） P1
- がん遺伝子治療臨床研究作業委員会委員名簿 P7
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書及び概要書（改訂後） P8
- 遺伝子治療臨床研究実施計画書（改訂後） P30

平成 21 年 5 月 15 日

**三重大学医学部附属病院から申請のあった
遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について**

がん遺伝子治療臨床研究
作業委員会
委員長 笹月 健彦

三重大学医学部附属病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. **MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究**
申請者：三重大学医学部附属病院 病院長 内田 淳正
申請日：平成 20 年 6 月 9 日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

- (1) 研究課題名: MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究
- (2) 申請年月日: 平成 20 年 6 月 9 日
- (3) 実施施設: 三重大学医学部附属病院
代表者: 三重大学医学部附属病院 病院長 内田 淳正
- (4) 総括責任者: 三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座・教員 珠玖 洋
- (5) 対象疾患: 食道癌
導入遺伝子: MAGE-A4 抗原特異的 T 細胞受容体(TCR) α 鎖及び β 鎖遺伝子ベクターの種類: 非増殖性レトロウイルスベクター
用法・用量: 腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した自己リンパ球を経静脈的に投与し、投与後 14 日目及び 28 日目に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド 300 μ g (不完全フロイントアジュバントとの懸濁液) を皮下投与する。TCR 遺伝子導入リンパ球の投与量は各コホート 2×10^8 個、 1×10^9 個及び 5×10^9 個。
研究実施期間: 厚生労働大臣より了承された日から 3 年間
目標症例数: 9 例 (各コホート 3 例。有害事象が発現した場合には、各コホート最大 6 例まで増加し、最大 18 例。)

(6) 研究の概略:

本研究は、標準的な治療法 (化学療法、放射線療法等) による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、腫瘍抗原 MAGE-A4 をヒト白血球抗原 (HLA)-A2402 存在下で特異的に認識する TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入リンパ球) 輸注の安全性を主要エンドポイントとする。副次エンドポイントは、TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤、腫瘍特異的免疫反応、及び腫瘍縮小効果。

(7) その他 (外国での状況等):

治療抵抗性の食道癌に対する分子標的治療の臨床研究結果の報告は知られていない。米国の国立衛生研究所 (NIH) の Rosenberg らのグループは、転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、MAGE-A4 とは異なる腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球を体外で増殖させ、患者に再移入する免疫療法を実施しており、調製された TCR 遺伝子導入リンパ球の品質に起因する有害事象の報告はない。

2. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議概要

1) 第1回審議

① 開催日時：平成20年7月15日(火) 10:00~12:30

② 議事概要：

平成20年6月9日付けで三重大学医学部附属病院より申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：食道癌）について第1回目の審議を行った。

まず、研究実施計画について同病院の総括責任者らから説明を受けた後、説明及び提出資料を基に、委員間で実施計画の妥当性等について審議を行った。

各委員の意見については、事務局で整理の上、本作業委員会の意見として申請者に検討を依頼することとし、その結果を基に再度審議することとした。

（本作業委員会の意見）

1. 対象疾患について、再発しても他の治療法が有効な場合もあることから、今後の治療困難例を対象とすることを明確にすること。同意説明文書には、他の治療法が有効な場合もあることを明確に記載し、また、遺伝子導入細胞の調製に時間がかかるため、同意取得後一定期間は治療が行なわれない状態になるということもわかりやすく記載すること。
2. 腫瘍抗原 MAGE-A4 について、患者の選択基準4)に「PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認されている患者」とあるが、MAGE-A4 の発現を確認するためのプロトコルを明確にするとともに、PCR で陽性とする定量的な判断基準（例えば、腫瘍細胞の何パーセントがどの位この抗原を発現しているのか、転写産物の量は抗原蛋白量を正確に反映しているのか、バイオブシーによる複数のサンプルの結果がヘテロの場合どのように判断するのか等の判断基準）を示すこと。また、PCR 法以外で MAGE-A4 の発現を確認する方法があれば、その方法を併用することも検討すること。なお、遺伝子治療実施中の MAGE-A4 の発現をフォローすること。
3. 今回用いる TCR を何故選択したのか説明できるエビデンスがあれば示すこと。
4. 同意説明文書に、Rosenberg らの臨床試験では2名の患者で、輸注された TCR 遺伝子導入細胞が、輸注後1年を超えても末梢血単核球中の40%前後であった旨記載(7頁)しているが、癌腫毎の免疫療法の効果について追記を検討すること。また、根拠データの詳細を示した上で、例えば患者背景等、さらに説明すべき情報はないか再検討すること。さらに、40%という値は高い値であり、クローン増殖の可能性が懸念されるため、Rosenberg らによってクローナリティに関する検査が行なわれていないかどうか、可能な範囲で情報収集すること。
5. 計画書及び概要書の研究の目的には、TCR が腫瘍抗原 MAGE-A4 を「HLA-A2402 存在下で」特異的に認識することを明記すること。

6. マスターセルバンクの品質試験について、以下の点を明らかにすること。

(1) 組み込まれたベクター遺伝子のコピー数試験

参考資料にはゲノム DNA を BamHI で消化後、TCR β 配列をプローブとしてサザン解析を行い、特異バンド数から算定したと記載されているが、事前質問に対する回答では TCR α 配列をプローブとしてバンドの数と太さから算定したとあり、説明が矛盾しているため、正確な試験法を説明すること。また、レトロウイルスの組込み数が 22 コピーというのは異常に多い数であり、本当であれば細胞の安定性への影響が懸念されるため、コピー数を決めた実際のデータを提出すること。

(2) ベクターの細胞内での完全性

組み込まれたベクターの構造を調べる方法として、PCR 産物の塩基配列決定では不十分であり、全体像がわからないため、適切な制限酵素（できるだけ全長が含まれるように両 LTR 内のみ切断部位がある酵素）を使ったサザン解析を行い、そのデータを提出すること。

7. 同意説明文書について、以下の点を検討すること。

(1) 実施計画書の IX2.1.2 あるいは IX2.2.2 の除外基準として、「妊娠中、授乳中、…妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者」が挙げられてはいるが、臨床研究中（終了後も一定期間）は確実に避妊をする必要がないか検討し、必要に応じて、その旨を同意説明文書中に記載すること。

(2) HLA-A2402 が陽性である必要性が分かりにくいので、例えば、図 1 あるいは図 2 のどの分子が HLA-A2402、MAGE-A4、TCR 等に該当するか、図示する等して説明すること。

(3) 「5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について」において、「私たちの研究と同じく TCR 遺伝子を患者さま自身の細胞に導入して戻す臨床研究」とあるが、癌抗原の種類が違うこと以外に HLA のタイプやペプチドの投与をしていないといった違いがあることも説明すること。

(4) 6. 臨床研究の方法 第 II 段階について

①各コホートの症例数が 3 人（あるいは 6 人）と書かれているが、どのような場合に 6 人になるのか、分かりにくいので、実施計画書の p.56 IX.1.2 2) に記載されている同じコホートに 3 人が登録される条件について、わかりやすく説明すること。

②「なお、各段階で非常に重い有害事象・・・」の文章の意味が分かりにくいので、実施計画書の p.56 IX.1.2 3) の内容も踏まえ、記載を改めること。

(5) 6. 臨床研究の方法第 III 段階について、「あなたの体内で TCR 遺伝子導入細胞をさらに増殖させるため」とあるが、「増殖」は正確な表現ではなく、「活性化（あるいは増殖）」と記載する等、記載を改めること。

8. 参考資料として提出されているペプチドの毒性試験は、単回投与であり、アジュバントも用いられていないようであるが、ヒトでアジュバントを用いて繰り返し投与するときの安全性を説明することが可能か見解を示すこと。

2) 第2回審議

① 開催日時： 平成 21 年 1 月 23 日(金) 10:00~12:00

② 議事概要：

前回の審議における本作業委員会の意見に対し、三重大学医学部附属病院から回答書及び追加資料が提出されたことを受けて、第2回目の審議を行った。

まず、回答書及び追加資料について同病院の総括責任者らより説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性等について審議を行った。

その結果、本実施計画に関しては、委員の意見について、事務局で整理し、申請者に検討を依頼し、その回答を確認することが必要とされた。

(なお、申請者からの回答及び実施計画書等の整備については、各委員の確認を経て、平成 21 年 5 月 15 日に委員長了承。)

(各委員からの主な指摘の内容)

1. Rosenberg らの臨床試験において TCR 遺伝子導入細胞が輸注後 1 年を超えても末梢血単核球中の 40%前後で維持された例に関して、細胞のクローナリティー解析及び染色体検査に関して情報を収集すること。また、自己免疫反応等の発症の有無も含め、正常組織を傷害するような可能性についても併せて情報を収集すること。
2. 申請書の「がん原性の有無」及び同意説明文書の「レトロウイルスベクターを用いることによる危険性」の項に、X-SCID での白血病の発症例だけではなく、慢性肉芽腫症(CGD)での骨髄異形成症候群(MDS)の発症例や、ADA 欠損症での成功例などの最新の情報も追記すること。その上で、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、標的細胞、ベクターの種類により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対するレトロウイルスベクターによる遺伝子導入ではこれまで白血病化の報告がないことも追記すること。
3. 同意説明文書 p.6「MAGE-A4 について」の項目に以下の内容の追記を検討すること。「MAGE-A4 は食道癌の他に、頭頸部癌や肺癌等の多くの癌で発現が確認されていますが、個々のケースでは、MAGE-A4 が適切に癌細胞に現れていることを調べる必要があります。しかし、現在、これを直接調べる方法がないため MAGE-A4 の発現に関係する RNA の量で推定しています。」
4. 以下のフォローアップ観察項目の追加及び委員会への報告について検討すること。
 - ・遺伝子導入 T リンパ球の血中動態について、臨床研究終了後もフォローアップを実施すること。
 - ・遺伝子導入 T リンパ球が遺伝子導入効率から予想される数値以上に増加していると判断された場合、あるいは遺伝子導入 T リンパ球の漸増傾向が観察された場合はクローナリティーの解析及び染色体検査などを実施し癌化のステップが進んでいないかどうか検討すること。
 - ・「適切に MAGE-A4 を発現する細胞の検出」に関して新しい知見が出た場合には、

当委員会に報告すること。

3. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議を踏まえた第1回審議時からの実施計画及び被験者への同意説明文書の主な変更内容

(実施計画)

- ・ TCR が腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識するのは、HLA-A2402 存在下であることが明記された。
- ・ 選択基準について、今後の治療困難例を対象とすることが明確され、臨床検査の項目として「動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上」が追加された。
- ・ 遺伝子治療中の腫瘍組織の MAGE-A4 発現をフォローすることが規定され、また、MAGE-A4 発現陽性とする定量的な判断基準が追記された。

(同意説明文書)

- ・ 食道癌に対する化学療法や放射線療法に関する情報等が追記された。
- ・ 臨床試験に参加する場合、TCR 遺伝子導入細胞の品質を確認し、投与可能となるまで 14 日～40 日程度かかり、その間は無治療で経過を見ることが明記された。
- ・ 研究参加期間中と終了後 5 年間は避妊するよう明記された。
- ・ 各コホートで有害事象が発生した場合にはさらに 3 人に投与されること、及び合計 2 人以上に重い副作用が発現した場合には次の段階に進まないことが明記された。
- ・ 米国国立衛生研究所における臨床研究と本研究との相違点等について明記された。

4. がん遺伝子治療臨床研究作業委員会の検討結果

三重大学医学部附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：食道癌）に関して、がん遺伝子治療臨床研究作業委員会は、主として科学的観点から以上のおり論点整理を進めて、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。その上で、本作業委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

次回以降の科学技術部会に報告する。

**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**

氏 名	所 属
浅野 茂隆	早稲田大学理工学術院特任教授
荒戸 照世	独立行政法人医薬品医療機器総合機構生物系審査部審査役
上田 龍三	名古屋市立大学大学院医学研究科臨床分子内科学教授
小澤 敬也	自治医科大学医学部教授
金子 周一	金沢大学医学部長
金田 安史	大阪大学大学院医学系研究科教授
○笹月 健彦	国立国際医療センター一名誉総長
島田 隆	日本医科大学医学部教授
濱田 洋文	札幌医科大学教授
早川 堯夫	独立行政法人医薬品医療機器総合機構顧問
吉倉 廣	厚生労働省医薬食品局食品安全部企画情報課参与
(食道がん)	
安藤 暢敏	東京歯科大学市川総合病院病院長

○委員長 (五十音順 敬省略)

(平成 21 年 3 月 29 日現在)

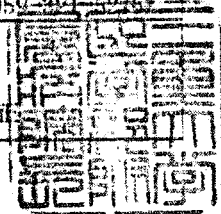
別紙様式第1

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

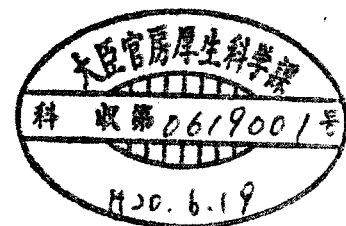
実 施 設	所在地	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (郵便番号 514-8507)
	名称	国立大学法人三重大学医学部附属病院 (電話番号 059-232-1111) (FAX番号 059-231-5976)
	代表者 役職名・氏名	国立大学法人三重大学医学部附属病院 病院長・内田 淳



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
MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究	国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座・ 教員・珠玖 洋



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	MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	平成 年 月 日 (承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (郵便番号 514-8507)	
	所属機関・部局・職	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座・教員	
	氏名	珠玖 洋 (印)	
実施の場所	所在地	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (郵便番号 514-8507)	
	名称	三重大学医学部附属病院	
	連絡先	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (電話番号 059-232-1111)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科・遺伝子・免疫細胞治療学講座・准教授	レトロウイルスベクター製剤の品質管理責任者、遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者、試験登録患者の診療
	日浅 厚則	三重大学大学院医学系研究科・遺伝子・免疫細胞治療学講座・助教	レトロウイルスベクター製剤の製造管理責任者、遺伝子導入細胞製剤の製造管理責任者
	池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科・がんワクチン講座・准教授	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び免疫反応の評価
	西川 博嘉	三重大学大学院医学系研究科・がんワクチン講座・講師	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び免疫反応の評価

	片山 直之	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座 造血病態内科学・教授 三重大学医学部附属病院・血液内科、腫瘍・免疫内科 ・科長	試験登録患者の診療
	中瀬 一則	三重大学医学部附属病院・がんセンター・センター長、 准教授	試験登録患者の診療
	榎屋 正浩	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座・ 造血病態内科学・准教授	試験登録患者の診療
	水野 聡朗	三重大学大学院医学系研究科・病態制御医学講座・ 腫瘍・免疫内科学・助教	試験登録患者の診療
	北野 滋久	三重大学医学部附属病院・腫瘍・免疫内科・医員	試験登録患者の診療、 遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び 免疫反応の評価
	大石 晃嗣	三重大学医学部附属病院・輸血部・部長、講師	アフェレーシスの 管理
	田中 匡介	三重大学医学部附属病院・光学医療診療部・助教	試験登録患者の診療
	白石 泰三	三重大学大学院医学系研究科・病態解明医学講座 腫瘍病態解明学・教授	病理組織学的診断
	佐藤 永一	東京医科大学・病理学講座・助教	病理組織学的診断
	大谷 明夫	独立行政法人国立病院機構 水戸医療センター・ 研究検査科・臨床研究部長	病理組織学的診断
外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社・ 細胞・遺伝子治療センター・センター長	ウイルスベクターに 関する基礎的助言及 び遺伝子導入 T リン パ球調製技術の提供 と助言

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	<p>本臨床研究は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文科科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正）」の必要条件を満たしている」と認める。</p> <p>本臨床研究で遺伝子導入する細胞はレトロウイルスベクターによる癌化リスクは低く、対象疾患の利益・不利益を総括すると遺伝子治療臨床研究の実施に問題は少ない。また本臨床研究実施計画に先立ち施行された実験動物に遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性試験の結果、遺伝子導入細胞投与群に毒性所見は観察されなかった。また遺伝子導入細胞は本学内細胞調製施設においてGMP基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。本臨床研究を担当する研究者は、遺伝子ベクター調製、細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。</p>
--------------------------------	---

	審査委員会の長の職名	氏名
	三重大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 三重大学大学院医学系研究科 病態解明医学講座 臨床検査医学分野 教授	登 勉 

研究の区分	<u>遺伝子治療臨床研究</u> 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>本臨床研究は、標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A2402 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及びβ 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入リンパ球) 輸注について、その安全性、体内動態及び臨床効果を以下のエンドポイントにより評価することを目的とする。</p> <p>①主要エンドポイント ・本遺伝子治療の安全性 [有害事象、臨床検査、増殖性レトロウイルス (RCR)、linear amplification mediated-PCR (LAM-PCR)]</p> <p>②副次エンドポイント ・TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤 ・腫瘍特異的免疫反応 ・腫瘍縮小効果</p>
対象疾患及びその選定理由	<p>1. 対象疾患に関する現時点での知見 食道癌は 60 歳代男性に多くみられる疾患であり、本邦での年間罹患数 (1999 年、年齢調整) は男性 12,402 人、女性 2,428 人、死亡数 (2003 年、年齢調整) は男性 9,397 人、女性 1,651 人である。食道癌は縦隔等へ浸潤傾向が強く、また、早期からリンパ節転移をきたす治療困難例が多いため、予後不良癌とされている。食道癌の治療法はその進行度により、内視鏡的粘膜切除、手術、放射線療法及び化学療法から選択される。近年、食道癌の治療成績は手術や補助療法の進歩により改善が得られているが、全国食道癌登録調査報告書によれば、全体の 5 年生存率 (TNM 病期分類) は、0 期 : 70.2%、I 期 : 64.5%、IIa 期 : 51.5%、IIb 期 : 34.0%、III 期 : 19.8%、IVa 期 : 13.7%、IVb 期 : 5.5%と未だ予後不良である。現在、病期進行食道癌に対する治療法として、シスプラチン (CDDP:白金系抗腫瘍剤) /5-フルオロウラシル (5-FU : 葉酸代謝拮抗剤) による化学療法と放射線療法の併用療法 (化学放射線療法) が標準的治療法として選択されているが、無効例も少なくない。また、CDDP/5-FU の他、ドセタキセルやパクリタキセル (本邦では食道癌の適応未承認) 等のタキソイド系薬剤の併用が検討されている。食道癌では、初回治療が適正に行われたにもかかわらず再発を認めることが多く、再発食道癌に対する治療法は、現在のところ一定のコンセンサスが得られていない。治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質 (QOL) の改善を目的とし、再発食道癌の 50%生存期間は約 6ヶ月とされている。</p> <p>2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要 本臨床研究では、治療抵抗性の食道癌患者から採取した末梢血リンパ球に、MAGE-A4 特異的 TCRα 鎖及びβ 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、その自己リンパ球を経静脈的に投与する。遺伝子導入リンパ球を投与後、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド (9 アミノ酸 : NYKRCFPVI) を投与し、患者体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の増殖を図る。本臨床研究は、ヒト白血球抗原 (HLA)-A2402 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には腫瘍縮小効果を期待するものである。 MAGE-A4 は食道癌の多くに発現する腫瘍抗原であり、癌組織と精巢においてのみ発現される。また、HLA-A2402 は日本人の約 60%が有する主要組織適合抗原である。</p>

TCR 遺伝子導入リンパ球による細胞傷害活性は、遺伝子導入された細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 表面上の MAGE-A4 特異的 TCR が、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体を特異的に認識することにより発揮される。なお、精巣細胞は HLA 分子を発現しないため MAGE-A4 抗原を認識する T リンパ球による傷害を受けない。

本臨床研究における評価項目は、遺伝子治療の安全性、TCR 遺伝子導入リンパ球の体内動態及び臨床効果である。

3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

治療抵抗性食道癌に対する根治療法は現時点では存在せず、栄養管理や QOL 向上のための緩和医療を行っているのが現状である。食道癌に対する抗癌剤以外の治療として、分子標的治療の開発が期待されているが、臨床研究結果の報告はない。このような現状において、食道癌に発現する腫瘍抗原を標的とした新規治療の開発が期待される。腫瘍抗原を標的とした免疫療法の 1 つとして、抗腫瘍活性を有する自己 T リンパ球を投与する細胞療法が積極的に研究されており、複数の臨床試験において有効例が報告されている。中でも、米国国立衛生研究所 (NIH) の Rosenberg らのグループは、転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、体外で増殖させた腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を患者に再移入する養子免疫療法を実施し、RECIST ガイドラインによる判定として 51% の腫瘍縮小効果を報告している。これら養子免疫療法における従来の細胞調製法と比較して、本遺伝子治療では、HLA-A2402 陽性患者の T リンパ球に MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子を導入することによって、腫瘍細胞に対する傷害活性を付与するものであり、必要量の MAGE-A4 抗原特異的 T リンパ球を調製することが可能である。実際に、当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが *in vitro* において確認されている。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な腫瘍径増大の抑制効果が認められた。なお、上記の Rosenberg らのグループは、腫瘍抗原 MART-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を投与した臨床試験において、悪性黒色腫患者 17 名中 2 名について転移腫瘍巢の明らかな退縮を観察しており、この戦略が有望な新規癌治療法となる可能性を示唆している。

4. MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由

近年の T 細胞の養子免疫療法における研究により、可能な限り短期の培養において必要な移入量を達成し、担癌宿主への移入後に *in vivo* において抗原刺激を加え活性化することにより効果的な抗腫瘍効果が得られると考えられている。これまでに、抗原ペプチドと不完全フロイントアジュバントのエマルジョンを含む、様々な形態のワクチンの投与を腫瘍抗原特異的 T 細胞の輸注療法に組み合わせることにより、輸注療法の抗腫瘍効果を増大させることが動物実験により報告されている。また、臨床試験においても同様にワクチン投与を腫瘍抗原特異的 T 細胞療法と組み合わせることでメラノーマ患者の治療が試みられている。このような知見に基づき、本臨床研究においては試験細胞の *in vitro* 培養を短期間とし、試験細胞の患者への移入後 2 週目と 4 週目に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを投与することを計画した。本治療スケジュールにより、まず患者体内における MAGE-A4 反応性 T 細胞の頻度を飛躍的に増大させ、その後に抗原ペプチドを投与することにより輸注した MAGE-A4 反応性 T 細胞を患者体内で活性化すると共にさらなる増殖を引き起こし、より高い免疫応答と臨床効果を期待するものである。

ペプチドの投与量については、マウスを用いた研究において、腫瘍抗原ペプチド特異的な免疫応答を誘導するために、約 100 μg のペプチドを不完全フロイントアジュバントとエマルジョン化して用いると有効であることが示されてきた。腫瘍抗原由来ペプチドを用いた初期のペプチドワクチン療法の臨床試験では当初 100 μg から 10 mg の投与量の範囲で用いられたが、その最大投与量においても毒性は認められなかった。加えて、ワクチン投与患者の末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を用いた *in vitro* の解析において、ワクチン投与による抗原特異的な T 細胞免疫応答の誘導と投与ペプチド量との間には特定の相関を認

	<p>めるに至っていない。これらの結果に基づき、以後の第1相臨床試験の多くでは、100 μg から1mg 程度の固定した投与量が設定されており、これまでに重篤な副作用は報告されていない。このような経緯と、従来の化学療法剤と腫瘍ワクチンとの根本的な性質の違いから、腫瘍抗原ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験においては用量試験の意義は限られていると考えられている。これらの知見に基づき、本臨床研究においては安全に投与可能であり、かつ免疫反応を誘導することが期待される投与量として300 μg を設定した。</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 TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子である。</p> <p>1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いる TCR α 鎖遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。TCR β 鎖遺伝子は 313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、116 アミノ酸からなる V7-9 領域、3 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域、179 アミノ酸からなる C2 領域という構造からなっている。これらの遺伝子は、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₂₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。</p> <p>1.2. 人に導入する遺伝子の性質 本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa が細胞に感染すると、MS-bPa のゲノムは逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、プロウイルスとなる。 本臨床研究において導入する遺伝子は、TCR α 鎖と β 鎖をコードする cDNA である。ヒトにおいて TCR α 鎖は 14 番染色体上に、β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロノタイプが存在する。TCR 遺伝子は免疫グロブリン (Ig) と同様に多数の亜型からなる V、D、J の可変領域と少数の C の定常領域からなる。その中で α 鎖の可変領域は V-J で β 鎖の可変領域は V-D-J で形成される。TCR 遺伝子は T 細胞の分化に伴い、これらの領域の遺伝子再構成という特徴的な過程を経て機能的遺伝子を形成する。まず D-J の遺伝子再構成が起こり、続いて V-DJ の再構成が生じる。再構成に伴い V-D 及び D-J 間にランダムな塩基配列 (N 領域) が組み込まれ TCR の多様性はさらに増加する。本臨床研究にはこの再構成を経た後の TCR 遺伝子の cDNA を導入する。われわれの使用する TCR α 鎖は Vα8-1、Jα10、C であり、TCR β 鎖は Vβ7-9、Jβ2-5、C2 の配列である。 レトロウイルスベクターMS-bPa により遺伝子導入された細胞において、TCR α 鎖遺伝子はマウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーター (P_{PGK}) によって転写される。マウス P_{PGK} はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターであり、レトロウイルスベクターMS-bPa により導入される P_{PGK} は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。 TCR β 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される。レトロウイルスベクターMS-bPa ゲノム RNA の 5'-LTR は R 領域と U5 領域、3'-LTR は U3 領域と R 領域からなり、U5 領域と両端の R 領域は Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来、U3 領域は murine leukemia virus (MLV) の変異株である murine stem cell virus (MSCV) 由来である。細胞に遺伝子導入されてプロウイルスになると、両末端の LTR はいずれも U3-R-U5 領域の構造をとる。LTR 中では、MSCV 由来の U3 領域が強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は胚性幹細胞、胎児癌細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。</p> <p>1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCR α 鎖及び β 鎖は S-S 結合でヘテロダイマーとして機能的な TCR 分子を構成し、主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞の活性化、アナジーの</p>

誘導、分化、生存と細胞死等を司る。TCR 鎖は Ig スーパーファミリー分子に属し、2つの Ig ドメインからなる細胞外領域、20 アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つの Ig ドメインのうち、N 末端側が可変領域、C 末端側が定常領域に相当する。細胞外領域に存在する相補性決定領域 (CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に貢献し、CDR3 領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。

本遺伝子治療において導入する MAGE-A4 特異的 TCR は、TCR α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な MAGE-A4 特異的 TCR 分子を構成している。この MAGE-A4 特異的 TCR 分子は、標的細胞あるいは抗原提示細胞上の MHC-class I 分子である HLA-A2402 分子と MAGE-A4 分子由来の抗原ペプチドである MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体によって形作られる構造を特異的に認識し、結合する。T 細胞表面上に存在する CD8 分子は、HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体が MAGE-A4 特異的 TCR 分子と結合する際の結合の安定化に必要であり、CD8 分子の非存在下では本 MAGE-A4 特異的 TCR 分子は機能しない。

導入された MAGE-A4 特異的 TCR による HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体の認識が起こると、複合体を形成した CD3 分子群を通して遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞の分裂・増殖、IFN- γ をはじめとしたサイトカインの産生、及びグランザイム B、パーフォリン等の細胞傷害性分子の放出が起こり、標的細胞の破壊を導く。

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。

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

本臨床研究における標的細胞は、治療抵抗性食道癌患者 (HLA-A2402 陽性、腫瘍組織に MAGE-A4 発現) 末梢血由来の T リンパ球である。その生物学的特徴として、①CTL は癌細胞を認識して破壊する能力を有する、②自己の T リンパ球を輸注した場合は、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病 (GVHD) 等の副作用がないことが挙げられる。T リンパ球を標的として MAGE-A4 特異的 TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入することで、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己 T リンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には腫瘍縮小効果が期待される。レトロウイルスベクターは増殖中の細胞に高効率で遺伝子導入することから、本臨床研究では、抗 CD3 抗体であるオルソクロン OKT3 (OKT3) による活性化と T リンパ球増殖因子であるインターロイキン 2 (IL-2) の存在下で増殖する T リンパ球が標的細胞として使用される。

4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

4.1. 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球 (PBL) に TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するにあたっては、組換えフィブロネクチンフラグメント (レトネクチン CH-296; タカラバイオ(株)) をコートした培養バッグ中にて、T リンパ球にレトロウイルスベクター MS-bPa を感染させる。

4.2. 当該導入法を選択した理由

レトロウイルスベクターは感染した後に逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、導入遺伝子を長期にわたり発現しうる。また、レトロウイルスベクターによる末梢血 T リンパ球への遺伝子導入効率が高いことが知られている。さらに、多くの 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おり、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。以上の理由により、自己 PBL への TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入する方法として、レトロウイルスベクターを選択した。

4.3. レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターやウイルスを利用しない Naked DNA ベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。一方、レトロウイルスにより遺伝子導入する場合、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 MS-bPa を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もとなる MS-bPa 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 PG13 は、すでに世界的に広く使用されているパッケージング細胞株であり、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である (CRL-10686)。本パッケージング細胞株において、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片とが染色体上の異なった位置に導入されているため、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

5.1. 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 MS-bPa のもとなる野生型ウイルスは MoMLV であり、以下のようなウイルス学的特徴を持つ。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。レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス及びスプーマレトロウイルスの 2 つの亜科に分類される。MoMLV はオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血病ウイルスの一種である。マウス白血病ウイルスは AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであるが、MoMLV は実験室内での継代により病原性の高いウイルス株として単離されたものである。

オルソレトロ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、癌であり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経向性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血病ウイルスはウイルスと細胞の間での遺伝子の組換えにより形成されるが、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。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血病所見を示し、脾臓への浸潤が顕著に認められる。AKR マウスの自然発症白血病に対しては抗 AKR MLV 血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLV に対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

5.2. ウイルスベクターの作製方法

① ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa の構築

レトロウイルスベクター MS-bPa 産生細胞株の構築に使用したウイルスプラスミドベクター pMS-bPa は、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。MoMLV プロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を含み、ウイルス蛋白をコードする配列を全く含まないレトロウイルスベクターである MT ベクターのプロウイルス配列を含むプラスミドがウイルスプラスミドベクター pMT であり、pMT の 3'-LTR を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものがウイルスプラスミドベクター pMS である。pMT のマルチプルクロニングサイトに、TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{PKK} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込んだ後、これら発現ユニットを pMS に載せ換えることにより pMS-bPa を構築した。

② 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、PG13 で、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 (1 つは gag と pol、もう 1 つは env 遺伝子) で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このアプローチは RCR 出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

③ ウイルス産生細胞株の構築

gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エコトロピック env 遺伝子発現プラスミドである pE-eco 及びウイルスプラスミドベクター pMS-bPa を 293T 細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞である