

ドとは異なるが、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、抗原ペプチド産生ウイルス、又は抗原ペプチドパルス樹状細胞といった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、輸注された T 細胞の増殖、サイトカイン産生、及び腫瘍への浸潤を誘導し、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(14, 16-20)。また、これらの動物実験の結果を踏まえて、臨床試験においても同様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、抗原ペプチド産生ウイルス、又は抗原ペプチドパルス樹状細胞を腫瘍抗原特異的 T 細胞療法と組み合わせてメラノーマ患者の治療が試みられている(12, 21)。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。

V. 5.2 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与量の設定根拠

実験動物、特に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 μ g 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(22, 23)。1990 年代よりヒト腫瘍においても腫瘍関連抗原が同定され始め、これらの腫瘍抗原由来の抗原ペプチドを用いた腫瘍に対するワクチン療法の臨床研究が国内外において精力的に行われてきた(24-28)。その過程において、MART-1/Melan A や gp100 等の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 μ g 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めるに至っていない(29-33)。これらの結果に基づき、以後の第 I 相臨床試験の多くでは、100 μ g から 1 mg 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(29, 34)。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(29)。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 μ g を設定した。

VI. 遺伝子の種類及びその導入方法

VI. 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。ベクターDNA等の構造と性質は、「VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入」の項で述べられている。

VI. 1. 1 人に導入する遺伝子の構造

VI. 1. 1. 1 T細胞受容体 (TCR) α 鎖遺伝子

TCR α 鎖遺伝子は、TCR α 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR α 8-1 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28(35) から単離され、272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 816 塩基対と終止コドン TGA より成り立っている。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。図 1 に TCR α 8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

1	ATG CTC CTG TTG CTC ATA CCA GTG CTG GGG ATG ATT TTT GCC CTG	45	
1	M L L L L I P V L G M I F A L	15	
46	AGA GAT GCC AGA GCC CAG TCT GTG AGC CAG CAT AAC CAC CAC GTA	90	
16	R D A R A Q S V S Q H N H H V	30	
91	ATT CTC TCT GAA GCA GCC TCA CTG GAG TTG GGA TGC AAC TAT TCC	135	
31	I L S E A A S L E L G C N Y S	45	
136	TAT GGT GGA ACT GTT AAT CTC TTC TGG TAT GTC CAG TAC CCT GGT	180	
46	Y G G T V N L F W Y V Q Y P G	60	V8-1 領域
181	CAA CAC CTT CAG CTT CTC CTC AAG TAC TTT TCA GGG GAT CCA CTG	225	
61	Q H L Q L L L K Y F S G D P L	75	
226	GTT AAA GGC ATC AAG GGC TTT GAG GCT GAA TTT ATA AAG AGT AAA	270	
76	V K G I K G F E A E F I K S K	90	
271	TTC TCC TTT AAT CTG AGG AAA CCC TCT GTG CAG TGG AGT GAC ACA	315	
91	F S F N L R K P S V Q W S D T	105	
316	GCT GAG TAC TTC TGT GCC GGG AGG GGA GGA GGA AAC AAA CTC ACC	360	
106	A E Y F C A G R G G G N K L T	120	J10 領域
361	TTT GGG ACA GGC ACT CAG CTA AAA GTG GAA CTC AAT ATC CAG AAC	405	
121	F G T G T Q L K V E L N I Q N	135	
406	CCT GAC CCT GCC GTG TAC CAG CTG AGA GAC TCT AAA TCC AGT GAC	450	
136	P D P A V Y Q L R D S K S S D	150	
451	AAG TCT GTC TGC CTA TTC ACC GAT TTT GAT TCT CAA ACA AAT GTG	495	
151	K S V C L F T D F D S Q T N V	165	
496	TCA CAA AGT AAG GAT TCT GAT GTG TAT ATC ACA GAC AAA ACT GTG	540	
166	S Q S K D S D V Y I T D K T V	180	
541	CTA GAC ATG AGG TCT ATG GAC TTC AAG AGC AAC AGT GCT GTG GCC	585	
181	L D M R S M D F K S N S A V A	195	C 領域
586	TGG AGC AAC AAA TCT GAC TTT GCA TGT GCA AAC GCC TTC AAC AAC	630	
196	W S N K S D F A C A N A F N N	210	
631	AGC ATT ATT CCA GAA GAC ACC TTC TTC CCC AGC CCA GAA AGT TCC	675	
211	S I I P E D T F F P S P E S S	225	
676	TGT GAT GTC AAG CTG GTC GAG AAA AGC TTT GAA ACA GAT ACG AAC	720	
226	C D V K L V E K S F E T D T N	240	
721	CTA AAC TTT CAA AAC CTG TCA GTG ATT GGG TTC CGA ATC CTC CTC	765	
241	L N F Q N L S V I G F R I L L	255	
766	CTG AAA GTG GCC GGG TTT AAT CTG CTC ATG ACG CTG CGG CTG TGG	810	
256	L K V A G F N L L M T L R L W	270	
811	TCC AGC TGA	819	
271	S S *		

図1 TCR α 8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI. 1. 1. 2 T細胞受容体 (TCR) β 鎖遺伝子

TCR β 鎖遺伝子は、TCR β 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR β 7-9 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド特異的な CTL クローン #2-28(35)から単離され、313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 939 塩基対と終止コドン TAG より成り立っている。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。図 2 に TCR β 7-9 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

1	ATG GGC ACC AGC CTC CTC TGC TGG ATG GCC CTG TGT CTC CTG GGG	45	
1	M G T S L L C W M A L C L L G	15	
46	GCA GAT CAC GCA GAT ACT GGA GTC TCC CAG AAC CCC AGA CAC AAG	90	
16	A D H A D T G V S Q N P R H K	30	
91	ATC ACA AAG AGG GGA CAG AAT GTA ACT TTC AGG TGT GAT CCA ATT	135	
31	I T K R G Q N V T F R C D P I	45	
136	TCT GAA CAC AAC CGC CTT TAT TGG TAC CGA CAG ACC CTG GGG CAG	180	V7-9 領域
46	S E H N R L Y W Y R Q T L G Q	60	
181	GGC CCA GAG TTT CTG ACT TAC TTC CAG AAT GAA GCT CAA CTA GAA	225	
61	G P E F L T Y F Q N E A Q L E	75	
226	AAA TCA AGG CTG CTC AGT GAT CGG TTC TCT GCA GAG AGG CCT AAG	270	
76	K S R L L S D R F S A E R P K	90	
271	GGA TCT TTC TCC ACC TTG GAG ATC CAG CGC ACA GAG CAG GGG GAC	315	N 領域
91	G S F S T L E I Q R T E Q G D	105	
316	TCG GCC ATG TAT CTC TGT GCC AGC AGC TTA GCC CAG GGA GCG GGA	360	J2-5 領域
106	S A M Y L C A S S L A Q G A G	120	
361	GAG ACC CAG TAC TTC GGG CCA GGC ACG CGG CTC CTG GTG CTC GAG	405	
121	E T Q Y F G P G T R L L V L E	135	
406	GAC CTG AAA AAC GTG TTC CCA CCC GAG GTC GCT GTG TTT GAG CCA	450	
136	D L K N V F P P E V A V F E P	150	
451	TCA GAA GCA GAG ATC TCC CAC ACC CAA AAG GCC ACA CTG GTA TGC	495	
151	S E A E I S H T Q K A T L V C	165	
496	CTG GCC ACA GGC TTC TAC CCC GAC CAC GTG GAG CTG AGC TGG TGG	540	
166	L A T G F Y P D H V E L S W W	180	
541	GTG AAT GGG AAG GAG GTG CAC AGT GGG GTC AGC ACA GAC CCG CAG	585	C2 領域
181	V N G K E V H S G V S T D P Q	195	
586	CCC CTC AAG GAG CAG CCC GCC CTC AAT GAC TCC AGA TAC TGC CTG	630	
196	P L K E Q P A L N D S R Y C L	210	
631	AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCG GCC ACC TTC TGG CAG AAC CCC CGC	675	
211	S S R L R V S A T F W Q N P R	225	
676	AAC CAC TTC CGC TGT CAA GTC CAG TTC TAC GGG CTC TCG GAG AAT	720	
226	N H F R C Q V Q F Y G L S E N	240	
721	GAC GAG TGG ACC CAG GAT AGG GCC AAA CCC GTC ACC CAG ATC GTC	765	
241	D E W T Q D R A K P V T Q I V	255	
766	AGC GCC GAG GCC TGG GGT AGA GCA GAC TGT GGC TTC ACC TCC GAG	810	
256	S A E A W G R A D C G F T S E	270	
811	TCT TAC CAG CAA GGG GTC CTG TCT GCC ACC ATC CTC TAT GAG ATC	855	
271	S Y Q Q G V L S A T I L Y E I	285	
856	TTG CTA GGG AAG GCC ACC TTG TAT GCC GTG CTG GTC AGT GCC CTC	900	
286	L L G K A T L Y A V L V S A L	300	
901	GTG CTG ATG GCC ATG GTC AAG AGA AAG GAT TCC AGA GGC TAG	942	
301	V L M A M V K R K D S R G *		

図2 TCRβ 7-9遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI. 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 (図 7 参照) 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。プロウイルスは図 3 に示すウイルスプラスミドベクターpMS-bPa と同様の構造を有するが、後述するように、5'-LTR 及び 3'-LTR の由来が異なる。

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。TCR は T 細胞に特異的に発現する抗原認識レセプターであり、免疫系における T 細胞の抗原特異性を決定している。機能的 TCR 分子は抗原認識を行う TCR α β 鎖又は γ δ 鎖のヘテロダイマーからなり、細胞内への直接シグナル伝達を担う CD3 分子群と会合し、TCR-CD3 複合体を形成している。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 (variable)、D (diversity)、J (joining) の可変領域と少数の C (constant) 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 V α 8-1、J α 10、C であり、TCR β 鎖は V β 7-9、J β 2-5、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 (図 7 参照)。PGK は解糖系の酵素であり、ほとんどの組織において構成的に発現している。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 (図 7 参照)。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 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 PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV) 由来であり、PCMV は murine leukemia virus (MLV) を実験室で継代することにより得られた変異株である。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。

VI. 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 遺伝子からの生成物は T 細胞における抗原認識レセプター分子である。TCR α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な TCR 分子を構成している。TCR 分子は主要組織適合抗原 (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、アナジューの誘導、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 (IgSF) 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。 α 鎖が 45-60 kDa、 β 鎖が 40-50 kDa で α 鎖と β 鎖は S-S 結合でヘテロ 2 量体を形成し、2つの Ig ドメインをもってペプチド+MHC との接合面を構成している。

細胞外領域に存在する相補性決定領域 (complementarity determining region : 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。つまり、比較的一定のアミノ酸配列による蛋白構造を持つ CDR1、CDR2 領域を介して MHC を認識し、フレキシブルな CDR3 領域が構造変化をとりながらペプチドと結合し、安定化する。また、TCR は MHC の溝に対して、MHC class I 分子とは斜めに、MHC class II 分子とは直角に結合する。

TCR の発現とシグナル伝達には TCR と複合体を形成する 4 種類の CD3 鎖が重要である。細胞外領域に Ig ドメインを 1 つ持ち細胞内領域に活性化モチーフの ITAM を 1 つ持つ CD3 γ 、 δ 、 ϵ 鎖がそれぞれ γ - ϵ 、 δ - ϵ の 2 量体を作り、また、9 アミノ酸の短い細胞外領域と細胞内領域に 4 個の ITAM を持つ ζ 鎖は S-S 結合でホモ 2 量体となり、これら全部を含めて TCR と複合体を 1 単位として形成している。

本遺伝子治療において導入する MAGE-A4 特異的 TCR は、 α 鎖が 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、及び 141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなり (図 1 参照)、 β 鎖は 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、及び 179 アミノ酸からなる C2 領域という構造からなっている (図 2 参照)。これら 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。

本遺伝子治療において T 細胞に導入された本 MAGE-A4 特異的 TCR 分子は、導入された T 細胞が本来持っている CD3 分子鎖群と複合体を形成し、標的細胞あるいは抗原提示細胞上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体を認識するが、認識に際しては CD8 分

子による安定化が必要である為に、CD8 陽性 T 細胞に導入された場合のみに機能的である。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。

VI. 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。

VI. 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（graft-versus-host disease : 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、OKT3 による活性化と T リンパ球増殖因子である 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。

VI. 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

VI. 4. 1 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球（peripheral blood lymphocyte : 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（レトロネクチン 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。

VI. 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（36-40）、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(13, 36-39)。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。

VI. 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。例えば、電気穿孔法により Naked DNA が細胞染色体に組み込まれる確率は $1.5/1 \times 10^4$ (41) 又は $1/1 \times 10^4$ (42) 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は $1/1 \times 10^{3\sim 6}$ 程度であると報告されている (43)。すなわち、細胞染色体に組み込まれ、長期にわたって導入遺伝子が安定して発現する効率は、これらベクターでは非常に低いものである。

一方、レトロウイルスにより遺伝子導入された細胞において、導入遺伝子は全て細胞染色体に組み込まれている。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が 50%以上であるとの報告もあり、他の方法に比べると格段に高く (44)、レトロウイルスベクターを用いた場合、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 (45)。

VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

VI. 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 (46, 47)。

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 (orthoretrovirus) 及びスプーマレトロウイルス (spumaretrovirus) 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。

VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法

VI. 5. 2. 1 ウイルスプラスミドベクターpMS-bPaの構築

本臨床研究で用いられるレトロウイルスベクターMS-bPaは、レトロウイルスベクターMS-bPa産生細胞から産生される。この産生細胞は、レトロウイルスベクターMS-bPaのプロウイルス配列をパッケージング細胞PG-13の染色体に挿入することにより作製された。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。以下に構築手順を述べる。

MS-bPaのベースとなるウイルスプラスミドベクターはpMSで、pMS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_{PGK}及びTCR α 鎖cDNAのコード域を組み込んだものがpMS-bPaであり、大腸菌プラスミドベクターに由来する部分を省略した遺伝子概略を図3に示す。

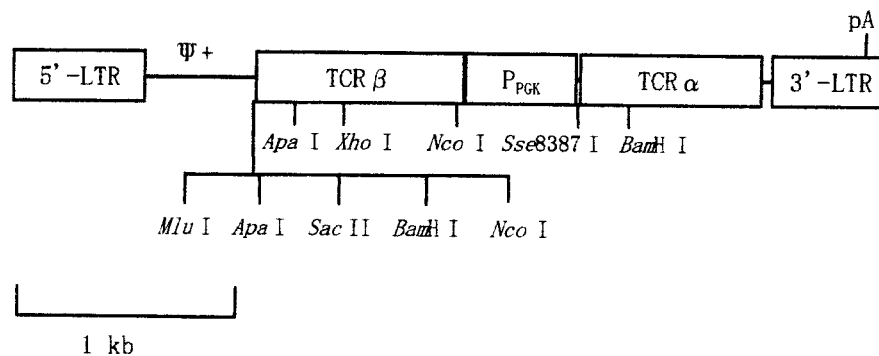


図3 pMS-bPaの遺伝子概略

TCR β : TCR β 鎖遺伝子のコード域、TCR α : TCR α 鎖遺伝子のコード域、pA: polyA付加シグナル
 Ψ +: パッケージングシグナル、5'-LTRはMoMLV由来、3'-LTRはMSCV由来である。
 大腸菌プラスミドベクターに由来する部分は省略した。

ウイルスプラスミドベクターpMS は、ウイルスプラスミドベクターpMT の 3'-LTR (long terminal repeat; 末端反復配列) を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものである (48)。ウイルスプラスミドベクターpMT は 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ウイルスプラスミドベクターである (49, 50)。pMS の 遺伝子の 大腸菌プラスミドベクターに由来する部分を省略した 遺伝子概略を 図 4 に、pMS の 構築手順を 図 5 に示す。

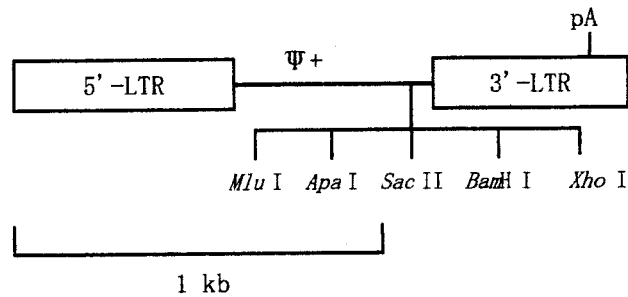


図 4 pMS の 遺伝子概略

$\Psi+$: パッケージングシグナル、pA: polyA 付加シグナル
 5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来である。
 大腸菌プラスミドベクターに由来する部分は省略した。

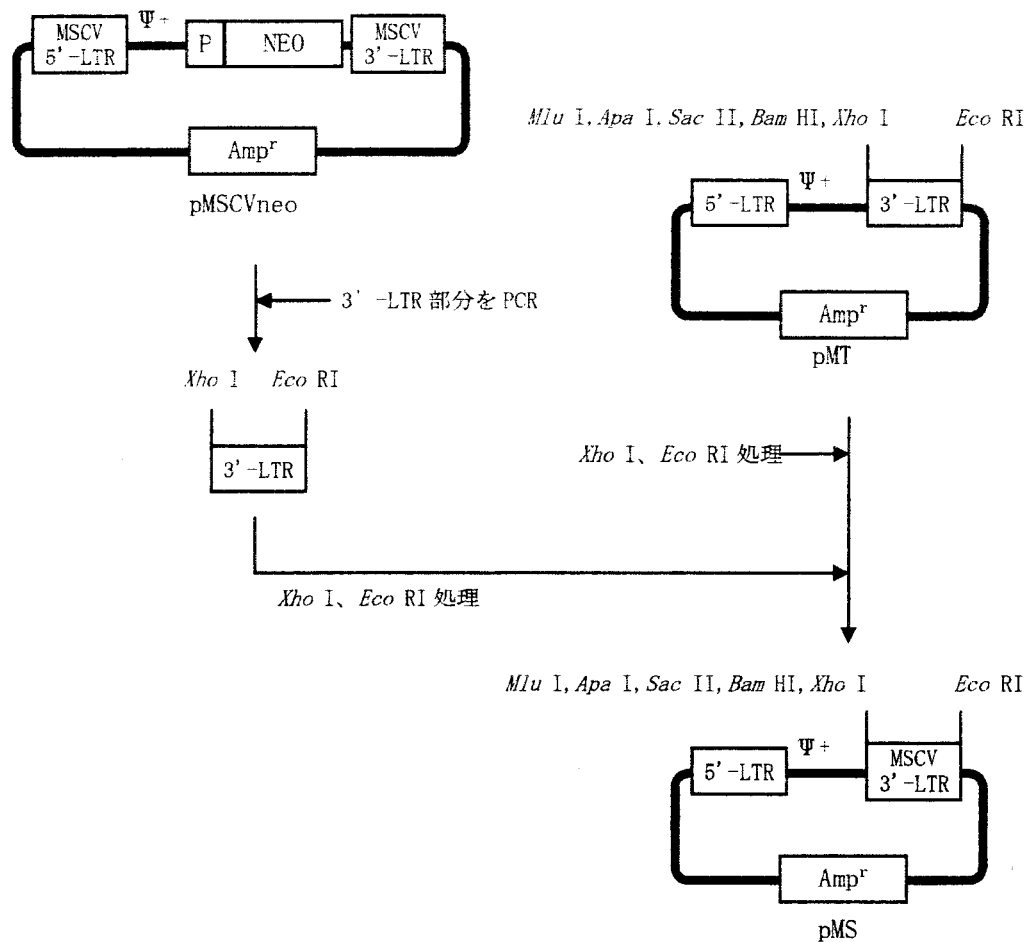


図5 pMSの構築手順

pMSCVneo(Clontech, Mountain View, CA)を鋳型に、制限酵素 Xho I の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Eco RI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、3' -LTR 部位を増幅して Xho I と Eco RI で切断、pMT ベクターの Xho I - Eco RI サイトにクローニングし、pMS を作製した。

次に pMS-bPa の構築手順を図 6 (29 頁～31 頁) に示す。

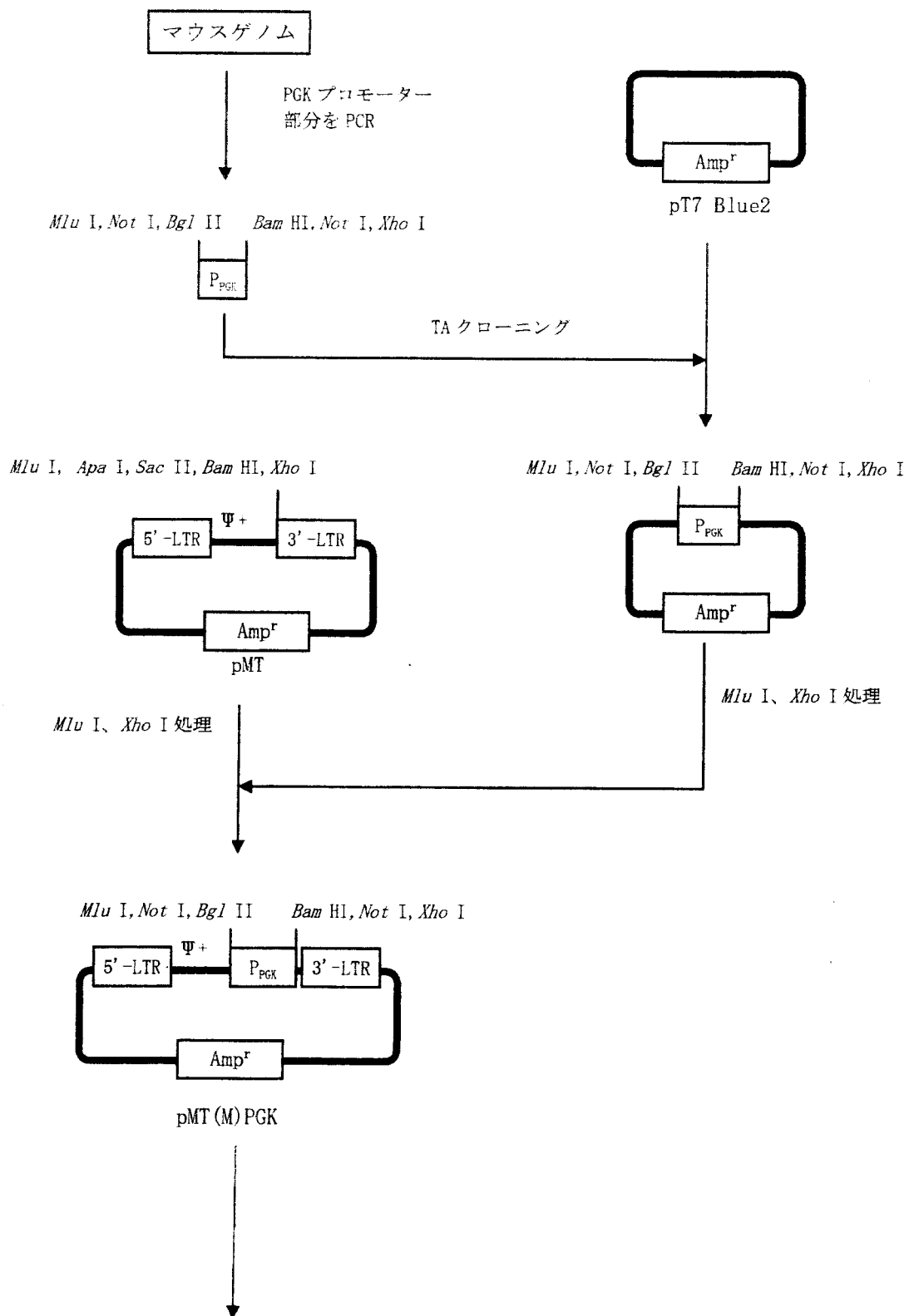
マウスゲノム DNA を鋳型に、制限酵素 Mlu I, Not I 及び Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I, Not I 及び Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い P_{PGK} 配列を増幅し、pT7 Blue2 ベクターに TA クローニングした。次に、このプラスミドから制限酵素 Mlu I と Xho I で P_{PGK} 部位を切り出し、pMT ベクターの Mlu I - Xho I サイトにクローニングし、pMT(M)PGK を作製した。

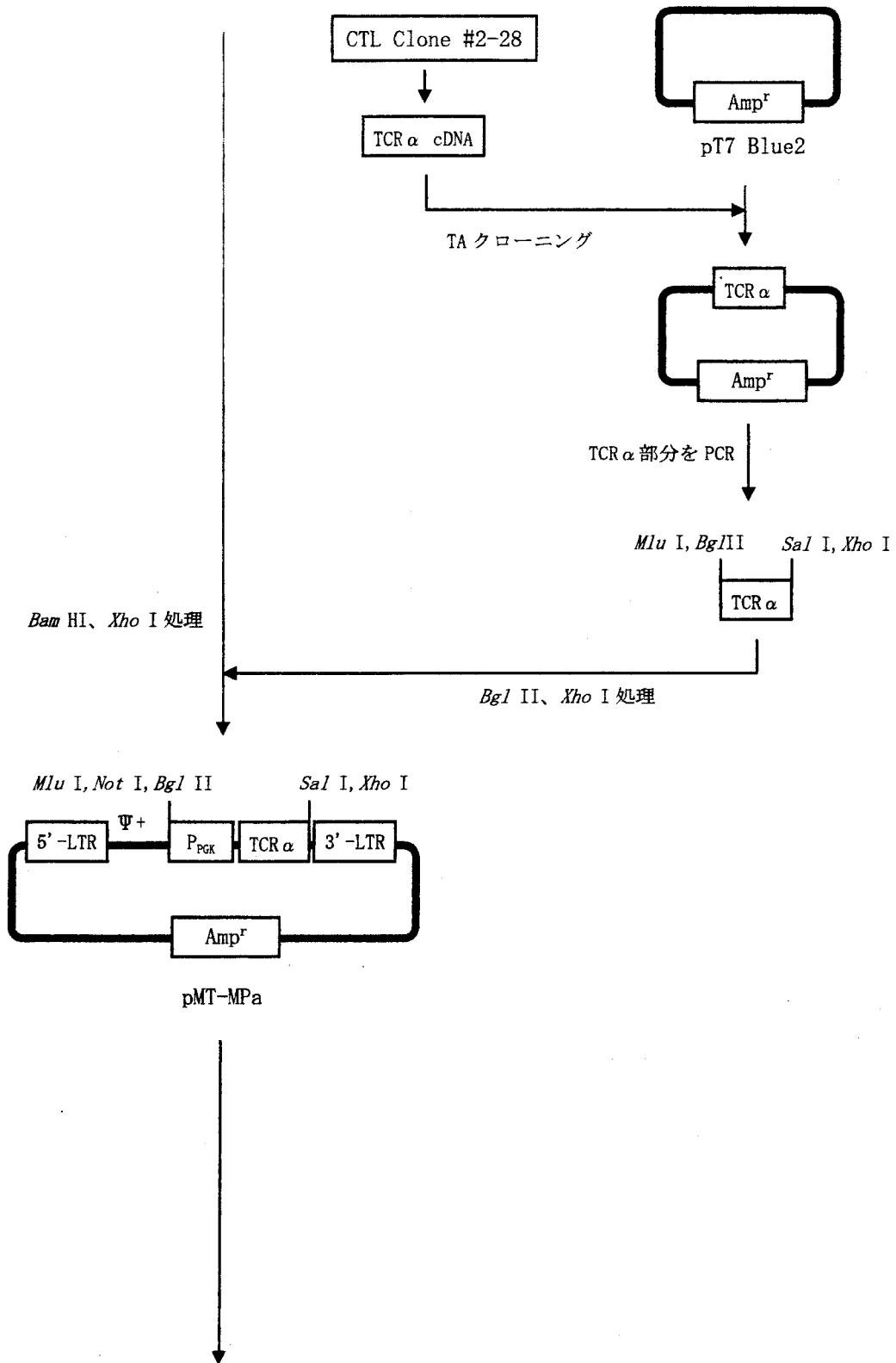
MAGE-A4 CTL Clone #2-28 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA 及び TCR β cDNA のコード域を増幅しそれぞれ pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

TCR α のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Mlu I と Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I と Sal I の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、Bgl II と Xho I で切断、pMT(M)PGK の Bam HI - Xho I サイトにクローニングし、pMT-MPa を作製した。

同様に、TCR β のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Mlu I と Sal I の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、制限酵素 Mlu I と Bam HI で切断して pMT-MPa の Mlu I - Bgl II サイトにクローニングし、pMT-bPa を作製した。

最後に pMT-bPa を Sal I で切断して「TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{PGK} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域」を切り出し、pMS の Xho I サイトにクローニング、pMS-bPa を得た。





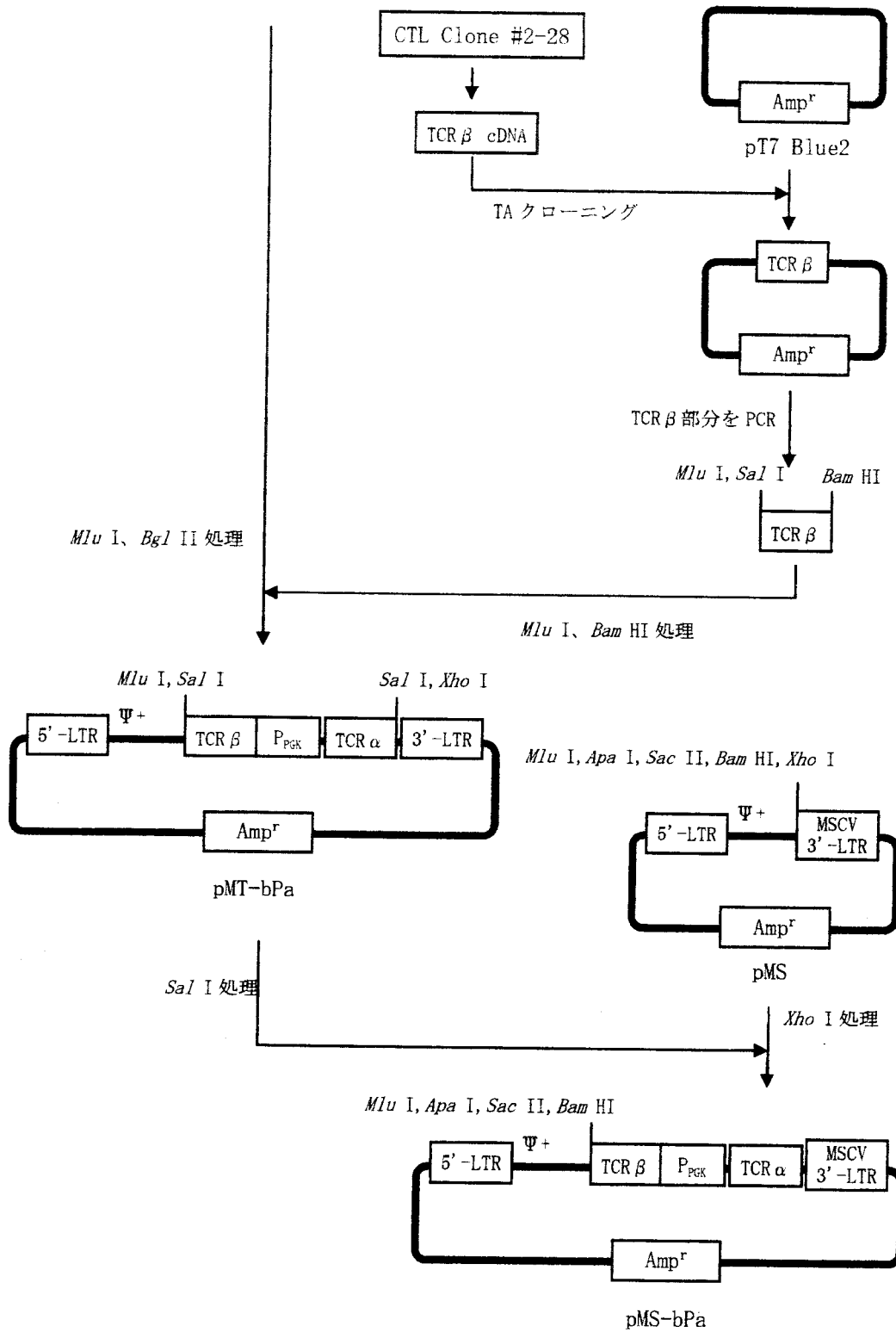


図 6 pMS-bPa の構築手順

VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築

ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa は、ウイルス粒子形成に必須な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、この DNA を通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。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 (ATCC CRL-10686) (45)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。

以下に、文献(45, 51)をもとにパッケージング細胞株PG13の構築手順を示す。

- 1) MoMLV の gag 遺伝子、pol 遺伝子及び選択マーカーの gpt 遺伝子配列を持ち、かつ Ψ パッケージングシグナル及び3'-LTRを欠失しており、truncated 5'-LTRプロモーターを持つプラスミド pLGPS、及び単純ヘルペスウイルス1型-チミジンキナーゼ遺伝子がクローニングされた pBR322 プラスミドを、マウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 TKに共にトランスフェクションし、HAT 培地 (Hypoxanthine、Amethopterin、Thymidine) で遺伝子導入細胞を選択した。
- 2) 選択した細胞株に、Gibbon ape leukemia virus (GaLV) 由来の env 遺伝子を持ち、かつ Ψ パッケージングシグナルと3'-LTRを持たないプラスミド pMOV-GaLV Seato env 及び変異型 Dihydrofolate reductase 遺伝子を持つプラスミド pFR400 を共にトランスフェクションし、Methotrexate で env 遺伝子導入細胞を選択した。使用した全てのプラスミドは、 Ψ パッケージングシグナルと3'-LTRを持たないため、この方法により、ウイルス由来の gag、pol、env は発現するがRCRを産生しないパッケージング細胞株PG13を樹立した。

VI. 5. 2. 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 PG13 に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクターMS-bPa が一過性に産生される。この培養上清を PG13 細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから産生されるレトロウイルスベクターMS-bPa の力価をリアルタイム RT-PCR により測定し、高力価なアンフォトロピックウイルスを産生するクローン MS-bPa #20 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、これを培養して MCB を作製した。