



別紙様式第1

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成23年 7 月 5 日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所 在 地	大阪府吹田市山田丘2番15号 (郵便番号: 565-0871)
	名 称	国立大学法人 大阪大学医学部附属病院 (電話番号: 06-6879-6551) (FAX番号: 06-6879-6649)
	代 表 者	国立大学法人 大阪大学医学部附属病院
	役職名・氏名	病院長 福澤 正洋



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	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 教授 土岐 祐一郎

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成 23 年 7 月 5 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 21 年 7 月 17 日 (三重大学医学部附属病院の実施計画の承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局 の所在地	大阪府吹田市山田丘 2 番 15 号 (郵便番号 565-0871)	
	所属機関・ 部局・職	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 教授	
	氏 名	土岐 祐一郎 	
実施の場所	所 在 地	大阪府吹田市山田丘 2 番 15 号 (郵便番号 565-0871)	
	名 称	大阪大学医学部附属病院	
	連 絡 先	大阪府吹田市山田丘 2 番 15 号 (電話番号 06-6879-5111)	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	和田 尚	大阪大学医学部附属病院 消化器外科 臨床登録医	試験登録患者の診療
	山崎 誠	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 助教	試験登録患者の診療
	宮田 博志	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 助教	試験登録患者の診療
	富山 佳昭	大阪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
	珠玖 洋	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 教授	多施設共同臨床研究 代表者、臨床研究薬 品質管理者
	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

外部協力者	池田 裕明	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製造管理責任者、遺伝子導入細胞製剤の製造管理責任者 遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び免疫反応の評価
	今井 奈緒子	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	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び免疫反応の評価
	佐藤 永一	東京医科大学 人体病理学講座 助教	病理組織学的診断
	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、遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及びLAM-PCR に関する技術提供

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	以下の理由により本臨床研究実施を適当と判断した。 ① 臨床ニーズ：再発食道癌の患者の生命予後が乏しく他に有効な治療法がないこと。 ② 品質・安全性：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のリスクが極めて低い。対象疾患（治療抵抗性食道癌）とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。 ③ 期待される有効性：共同実施施設である三重大学にて調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球が、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、動物モデル実験においても、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ている。海外でも同様の試験にて他の癌における有効性が臨床的に認められている。したがって、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。 ④ 当施設・研究者の能力：当施設の総括責任者及び研究者（宮田、山崎、和田、富山）はリンパ球アフェレーシス、細胞品質管理、腫瘍抗原由来蛋白を用いた癌ワクチン臨床試験の実施と末梢血を用いた免疫学的解析の経験者であ
------------------------	---

	り、さらに対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験（食道癌治療 150 例以上）を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。 ⑤ 臨床研究薬の調製：被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、当該試薬等臨床試験経験者である三重大学大学院医学系研究科の監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。 ⑥ 安全・効果評価・適応判定中央部会：本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置している。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	大阪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 大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学 教授	金田 安史 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	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（T cell receptor：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。 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（replication competent retrovirus：RCR）、linear amplification mediated-PCR（LAM-PCR）〕 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 尚、本臨床研究は三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。	
対象疾患及びその選定理由	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（2003 年、年齢調整）は男性 13,658 人、女性 2,742 人、死亡数（2007 年、年齢調整）は男性 9,900 人、女性 1,769 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) 等のタキソイド系製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。 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 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、頭頸部癌及び非小細胞肺癌等に多く発現する腫瘍抗原であり、正常組織においては HLA を発現しない精巣のみに発現する。そして、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。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、RESIST 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。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巣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。更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。
遺伝子の種類及びその導入方法	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。 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。

1. 2. 人に導入する遺伝子の性質

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、多様なクロータイプが存在する。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 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 (PPGK) によって転写される。マウス PPGK 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 PPGK 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、胎児がん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。

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。

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 (γ 、 δ 、 ϵ 及び ζ 鎖) が重要であり、これらと TCR とが複合体を形成している。抗原認識の際に TCR/CD3 複合体と CD4・CD8 が会合して CD3 の活性化モチーフ ITAM のチロシンがリン酸化されることにより TCR のシグナルが開始される。以上のシグナルにより、T 細胞の抗原特異的な上記生理活性が発現される。

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、腫瘍組織中に 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ーン 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、がんであり、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 ①MS-bPa DNA ベクターの構築 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プラスミドである MS-bPa DNA ベクターは、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 MT DNA ベクターであり、MT DNA ベクターの 3'-LTR を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものが MS DNA ベクターである。MS DNA ベクターのマルチプルクローニングサイトに、TCRβ 鎖 cDNA のコード域、マウス PPGK 及び TCRα 鎖 cDNA のコード域を組み込むことにより MS-bPa DNA ベクターを構築した。 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 ベクターを 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、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。 ④レトロウイルスベクターMS-bPa の製造 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 は、バンキングされたウイルス産生細胞株 (MCB 又はワーキングセルバンク (WCB)) の培養上清を回収することにより製造する。製造は全て管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。 5. 3. ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS-bPa はパッケージングシグナルとしてΨ + を有し、gag、pol、env をコードする配列を持たない。 5. 4. ウイルスベクターの生物学的特徴 パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPa 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。
安全性についての	1. 遺伝子導入方法の安全性 1. 1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

評価	レトロウイルスベクターMS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生病産のものを使用する。 ①MCB の作製法 ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより作製された Primary Seed Bank が拡大培養され、ウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA 染色法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（細胞）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 6. XC プラークアッセイ 7. マウス抗体産生試験（MAP 試験） 8. 無菌試験（日本薬局方） 9. ウシウイルス試験 10. ヒトウイルス試験 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験 13. 導入遺伝子配列解析 14. 細胞生存率試験（トリパンブルー） 15. 産生ウイルスの力価試験 16. 導入遺伝子の機能確認 ②レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法 MCB の細胞を拡大培養した後、培地を交換し翌日に培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。回収した培養上清液を 0.22 µm のミリポアフィルターで濾過滅菌した後、ウイルスベクターとして凍結保存バックに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。以下の品質試験を行う。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 5. 無菌試験（日本薬局方） 6. エンドトキシン試験（日本薬局方） 7. 導入遺伝子配列解析 8. 産生ウイルスの力価試験 9. 導入遺伝子の機能確認 1. 2. 患者に投与する物質の純度及びその安全性 患者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS-bPa により TCRα 鎖及びβ 鎖遺伝子を導入した患者由来 T リンパ球である。 1. 3. 増殖性ウイルス出現の可能性 ③レトロウイルスベクターの安全性 本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターMS-bPa のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子を完全に欠如している。また、パッケージング細胞株として PG13 を用いるので、RCR の出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクターMS-bPa の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰
----	---

性のレトロウイルスベクターを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中の RCR を測定する。

②パッケージング細胞の安全性

レトロウイルスベクター MS-bPa を作製する際に使用されるパッケージング細胞 PG13 は、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極めて低い。すなわち、パッケージングに必要なウイルス遺伝子が pLGP5 及び pMOV-GaLV Seal env という 2 個の DNA 断片として別々に導入されていることに加え、どちらの DNA 断片も Ψ パッケージングシグナルと 3'-LTR を欠失しているため、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

PG13 と同じ第 3 世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが 1996 年に Chong らにより初めて報告された。RCR 出現の頻度を測定することは困難であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている。なお、PG13 を用いてレトロウイルスベクターを作製する過程で RCR が出現したという報告はない。

1. 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・増殖に必須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。

1. 5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、患者 T リンパ球に ex vivo (生体外) で TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用したレトロウイルスベクター MS-bPa はこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化されるため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。また、レトロウイルスベクター MS-bPa は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

1. 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、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業中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、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラス II 安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。レトロウイルスベクター MS-bPa 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導入が起こる可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

1. 7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。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細胞は死に至る可能性がある。ただし、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、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターのLTRが有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

1. 8. がん原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖によるがん化の問題が出現する。実際に、CD34陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたX連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)のフランスでの遺伝子治療において、合計4例の白血病発症が報告されている。本臨床研究における遺伝子導入標的細胞である成熟Tリンパ球のがん化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、ICHの遺伝子治療専門家グループから出されている。過去に実施されたT細胞を遺伝子導入の標的細胞とした遺伝子治療において、遺伝子導入細胞のがん化は報告されていない。また、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与した46例のフォローアップ(最長9年間)において、遺伝子導入Tリンパ球のクローン増殖が認められなかったとの報告がある。なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖をLAM-PCRによってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

2. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、標的細胞であるT細胞は内在性にTCR α 鎖及び β 鎖を発現している。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。Ex vivoで培養、増殖させたT細胞クローンを大量に投与する臨床試験において、重大な有害事象は併用した化学療法剤又はIL-2によるものだけであったとの報告がある。このことから、特定のTCR可変領域を持つT細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半は内在性にTCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たにMAGE-A4に対するTCR遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において2種類の配列の α 鎖及び β 鎖が発現する。このため、(1)予測不可能な抗原特異性を持つ混合TCR2量体の形成、(2)自己抗原特異的TCRを有する無応答T細胞の、導入されたTCRからの刺激による活性化及び(3)腫瘍抗原ペプチドとHLA分子との複合体が、自己抗原ペプチドと患者のHLAアレル(対立遺伝子)との複合体の立体構造に酷似していることによる、自己細胞の攻撃、のいずれかのメカニズムにより、理論的には自己免疫疾患を発症する可能性が指摘されている。

ただし、メラノーマ抗原に対するTCR遺伝子を用いた臨床試験において遺伝子導入細胞による毒性は認められていないことから、TCR遺伝子を導入したT細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

3. 細胞の安全性

3. 1. 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す遺伝子導入細胞の調製にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置されたP2レベルの細胞調製施設内で行う。また、細胞調製操作時には、品質が確認された試薬、培地類を使用し、清浄度クラス100、クラスII安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

遺伝子導入Tリンパ球調製工程の概略は以下に示すとおりである。すなわち、OKT3及び組換えヒトIL-2を含む培地で患者リンパ球の培養を開始し、レトロウイルスベクターMS-bPaを結合させたレトロネクチンCH-296コートバッグに上記活性化Tリンパ球懸濁液を添加して遠心することにより遺伝子導入を合計2回行い、拡大培

	養後に細胞を洗浄・濃縮・回収するというものである。こうして得られた細胞懸濁液に凍害保護液を添加し、凍結保存バッグに移した後、凍結保存する。 3. 2. 培養細胞の純度 遺伝子導入後の細胞中に遺伝子導入されていないTリンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題はないと考えられる。また、細胞培養の際に使用する原材料の残留は極めて微量であり、これらが生体に及ぼす影響は限りなく少ない。TCR 遺伝子導入リンパ球は、「3. 4. 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。 3. 3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性 リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクターMS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞のがん化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である。OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を ex vivo で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。Sauce らは、PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で ex vivo にて培養すると、リンパ球の表現型が変化するが、レトロウイルスベクターの感染による変化は特に認められないことを報告している。ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない。また、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6 日から 9 日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている。本計画においても同様に短期間培養した遺伝子導入 T リンパ球を使用する予定である。 3. 4. 被験者に投与する細胞の安全性 以下の試験を行うことにより遺伝子導入細胞の品質を担保する。安全性が確認されるまで凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。 1. マイコプラズマ否定試験 (PCR 法) 2. RCR 試験 (RT-PCR 法) 3. 無菌試験 (日本薬局方) 4. エンドトキシン試験 (日本薬局方) 5. 細胞生存率試験 (トリパンブルー) 6. 細胞数試験 7. 遺伝子導入効率試験 8. 導入遺伝子の機能試験
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	以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。 ①臨床ニーズ 再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。 ②品質・安全性 本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 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を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。 本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢

	血由来のTリンパ球であり、Tリンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによるがん化のリスクは極めて低く、対象疾患とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。 免疫不全マウスにTCR遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球と比較して、遺伝子導入に起因する毒性所見は観察されなかった。 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識するTCR遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIHのRosenbergらのグループで既に実績がある。 ③期待される有効性 三重大学にて調製された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に特異的な腫瘍増大抑制効果が認められた。 NIHのRosenbergらは、転移性悪性黒色腫患者17例に腫瘍抗原MART-1のTCR遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2例(12%)にPR(部分奏功)を認めており、更に、同グループは、より親和性の高いTCR遺伝子を導入したTリンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者36名中9名について腫瘍退縮を観察している。 従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。 ④当施設・研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者(宮田、山崎、和田、富田)はリンパ球アフェレーシス、細胞品質管理、腫瘍抗原由来蛋白を用いた癌ワクチン臨床試験の実施と末梢血を用いた免疫学的解析の経験者であり、さらに対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験(食道癌治療150例以上)を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。 ⑤臨床研究薬の調製 被験者へ投与されるTCR遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。 ⑥安全・効果評価・適応判定中央部会 本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。
実 施 計 画	1. 本臨床研究の実施手順 治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。 大阪大学医学部附属病院においてアフェレーシスにて自己PBLを採取し、三重大学細胞調製施設に搬送する。三重大学細胞調製施設で自己PBLにMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ペプチドを認識するTCRα鎖及びβ鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られたTCR遺伝子導入リンパ球をex vivo培養し、一旦凍結保存する。 三重大学細胞調製施設にて調製したTCR遺伝子導入リンパ球の品質が確認された後、大阪大学医学部附属病院にTCR遺伝子導入リンパ球が提供される。二次登録の前に再度文書にて同意を取得し、二次登録時の選択基準を満たし、除外基準に抵触しないことを確認したうえで本臨床研究への二次登録を行う。 TCR遺伝子導入リンパ球(単回投与)を経静脈的に投与する。 1日投与量300μgのMAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの

懸濁液を、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、皮下投与する。

追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性(有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR)、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を評価する。

TCR 遺伝子導入リンパ球投与後 63 日目に本臨床研究を終了とする。

TCR 遺伝子導入リンパ球数の設定

投与する TCR 遺伝子導入リンパ球数は 1 回投与量 2×10^8 個、 1×10^8 個、 5×10^7 個の各コホート別とする。各コホートは 3 例とし、1 回投与量を 1×10^8 個、 5×10^7 個へと増加させる。ただし、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を増加し、安全性の評価を強化する。

2. 被験者の選択基準及び除外基準

選択基準 (一次登録):

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者
- 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法(化学療法、放射線療法等)抵抗性の臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期(TNM 分類)の食道癌患者、又は術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者
- 3) HLA-A2402 陽性の患者
- 4) PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認されている患者
- 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要なとされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 6) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 7) 本臨床研究参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の患者
- 8) 細胞採取時に前治療(手術、化学療法、放射線療法)終了から 4 週間以上の経過が見込める患者
- 9) 同意取得後 4 ヶ月以上の生命予後が見込める患者
- 10) 主要臓器(骨髄、心、肺、肝、腎等)に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラス I 分子発現が確認されている患者
- 12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準 (一次登録):

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 [プロトロンビン時間 (PT) $< 50\%$ 、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) $> 60 \text{ sec}$ 、フィブリノゲン (Fbg) $< 100 \text{ mg/dL}$ 、フィブリン分解産物 (FDP) $> 20 \mu\text{g/mL}$]
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者

- 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-I 抗体のいずれかが陽性である患者
- 4) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 7) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 8) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)
- 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験 (臨床研究) に参加している患者
- 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者

選択基準 (二次登録) :

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量 (2×10^6 個) の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器 (骨髄、心、肺、肝、腎等) に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 5) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準 (二次登録) :

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 [プロトロンビン時間 (PT) $< 50\%$ 、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) $> 60 \text{ sec}$ 、フィブリノゲン (Fbg) $< 100 \text{ mg/dL}$ 、フィブリン分解産物 (FDP) $> 20 \mu\text{g/mL}$]
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 4) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 6) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性

	患者。又は精子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない） 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者 3. 被験者の同意の取得方法 本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、大阪大学医学部附属病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を説明の前又は説明するときに渡し、内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計2回行う）。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。 4. 実施期間及び目標症例数 実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点（2009年7月17日）から3年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後 63 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり、遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発がんや RCR の有無について追跡調査を実施する。 目標症例数は以下のとおり 9 例とするが、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を最大 6 例まで増加し、安全性の評価を強化する。 <u>1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量</u> <table><tr><td>コホート 1</td><td>2×10⁸ 個</td><td>3 例</td></tr><tr><td>コホート 2</td><td>1×10⁹ 個</td><td>3 例</td></tr><tr><td>コホート 3</td><td>5×10⁹ 個</td><td>3 例</td></tr></table> 5. 臨床検査項目及び観察項目 検査・観察スケジュール（別紙）に定められたとおりに検査・観察を実施する。	コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例	コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例	コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例
コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例								
コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例								
コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例								
備 考										

(別紙) 検査・観察スケジュール

臨床研究期間	スクリーニング 期間	治療期間											追跡 調査 期間
日数	同意 取得日	アフェレーシス 実施日	day0 *	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	day63 ±3
入院		○	○				→	○	→	○	→		
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフェレーシス		○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド 投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧・動 脈血酸素飽和度	○		○										
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○												
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○ ²									○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
尿検査	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}									○ ⁴	○ ⁴
胸部 X 線検査	○		○ ²									○	○ ⁵
12 誘導心電図	○		○ ²									○	○ ⁵
頭部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
PET-CT			○ ³									○	○ ⁵
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
腫瘍組織生検			○ ³									○	○ ⁵
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁵			○ ⁷	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ ²					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ ³									○	○ ⁵
RCR ⁵				○ ⁵								○	○
LAM-PCR ⁵												○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70
有害事象			←										→

* アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (± 2 時間) 後、及び 12 時間 (± 2 時間) 後。
8. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

遺伝子治療臨床研究実施計画書

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」

大阪大学医学部附属病院

第 1.2 版：平成 23 年 9 月 22 日作成

記号・略号一覧表

記号・略号	一般名等
ALT	alanine aminotransferase (GPT) (アラニンアミノトランスフェラーゼ)
APTT	activated partial thromboplastin time (活性化部分トロンボプラスチン時間)
AST	aspartate aminotransferase (GOT) (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
BUN	blood urea nitrogen (尿素窒素)
cDNA	complementary DNA (相補的 DNA)
CDR	complementarity determining region (相補性決定領域)
CEA	carcinoembryonic antigen (癌胎児性抗原)
Cr	creatinine (クレアチニン)
CRP	C reactive protein (C 反応性蛋白)
CT	computed tomography (コンピューター断層撮影)
CTL	cytotoxic T lymphocyte (細胞傷害性 T リンパ球)
D-bil	direct bilirubin (直接ビリルビン)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EGFR	epidermal growth factor receptor (上皮細胞成長因子受容体)
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
Fbg	fibrinogen (フィブリノゲン)
FDA	Food and Drug Administration (《米》食品医薬品局)
FDP	fibrin degradation products (フィブリン分解産物)
GaLV	Gibbon ape leukemia virus
GMP	Good Manufacturing Practice (医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準)
GVHD	graft-versus-host disease (移植片対宿主病)
HBV	hepatitis B virus (B 型肝炎ウイルス)
HCV	hepatitis C virus (C 型肝炎ウイルス)
HIV	human immunodeficiency virus (ヒト免疫不全ウイルス)
HLA	human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
HSA	human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
HTLV-1	human T-lymphotrophic virus type 1 (ヒト T 細胞向性ウイルス 1 型)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米 EU 医薬品規制調和国際会議)

IL-2	interleukin 2 (インターロイキン 2)
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LAM-PCR	linear amplification mediated-PCR
LTR	long terminal repeat (末端反復配列)
MAGE-A4	melanoma associated antigen-A4
MART-1	melanoma antigen recognized by T cells-1 (メラノーマ抗原-1)
MCB	master cell bank (マスターセルバンク)
MHC	major histocompatibility complex (主要組織適合抗原)
MLV	murine leukemia virus (マウス白血病ウイルス)
MoMLV	Moloney murine leukemia virus (モロニーマウス白血病ウイルス)
MSCV	murine stem cell virus (マウス幹細胞ウイルス)
NCI	National Cancer Institute (《米》国立癌研究所)
NIH	National Institutes of Health (《米》国立衛生研究所)
OKT3	Orthoclone OKT3 (オルソクローン OKT3: 抗 CD3 抗体)
PBL	peripheral blood lymphocyte (末梢血リンパ球)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PCMV	PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PET	positron emission tomography (陽電子放出断層撮影)
PGK	phosphoglycerate kinase (ホスホグリセリンキナーゼ)
PR	partial response (部分奏効)
PT	prothrombin time (プロトロンビン時間)
QOL	quality of life (クオリティ・オブ・ライフ: 生活の質)
RCR	replication competent retrovirus (増殖性レトロウイルス)
rhIL-2	recombinant human interleukin 2 (組換えヒトインターロイキン 2)
SCC	squamous cell carcinoma related antigen (扁平上皮癌関連抗原)
T-bil	total bilirubin (総ビリルビン)
TCR	T cell receptor (T 細胞受容体)
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte (腫瘍浸潤リンパ球)
TRALI	transfusion-related acute lung injury (輸血関連急性肺障害)
UA	ureic acid (尿酸)

目 次

	頁
I. 遺伝子治療臨床研究の名称	9
II. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	10
II.1 総括責任者の氏名	10
II.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割	10
III. 実施施設の名称及びその所在地	12
III.1 当該実施施設の名称及び所在地	12
III.2 細胞を調製する施設の名称及び所在地	12
III.3 当該実施施設以外に本臨床研究の実施を予定する施設の名称及びその所在地	12
IV. 遺伝子治療臨床研究の目的	13
V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	14
V.1 研究の区分	14
V.2 対象疾患に関する現時点での知見	14
V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要	14
V.4 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	15
V.5 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由	16
V.5.1 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与の根拠	16
V.5.2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与量の設定根拠	17
VI. 遺伝子の種類及びその導入方法	18
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	18
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造	18
VI.1.1.1 T細胞受容体 (TCR) α 鎖遺伝子	18
VI.1.1.2 T細胞受容体 (TCR) β 鎖遺伝子	20
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	22
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	23
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	24
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	24
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	24
VI.4.1 遺伝子導入方法の概略	24
VI.4.2 当該導入法を選択した理由	24
VI.4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠	25

VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	25
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	25
VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法	26
VI. 5. 2. 1 ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa の構築	26
VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築	33
VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築	33
VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造	34
VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造	34
VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴	34
VII. 安全性についての評価（ウイルスベクター、遺伝子産物、細胞及びペプチド）	35
VII. 1 遺伝子導入方法の安全性	35
VII. 1. 1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	35
VII. 1. 1. 1 MCB の作製法	35
VII. 1. 1. 2 レトロウイルスベクターMs-bPa の製造方法	36
VII. 1. 2 患者に投与する物質の純度及びその安全性	38
VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性	38
VII. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性	38
VII. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性	39
VII. 1. 4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	42
VII. 1. 5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	42
VII. 1. 6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	43
VII. 1. 7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	43
VII. 1. 8 癌原性の有無	43
VII. 2 遺伝子産物の安全性	44
VII. 3 細胞の安全性	45
VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法	45
VII. 3. 2 培養細胞の純度	48
VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性	49
VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性	50
VII. 4 ペプチドの安全性	51
VII. 4. 1 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの純度	51
VII. 4. 2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの安全性	51
VIII. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	52
IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	54

IX. 1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	54
IX. 1. 1 臨床研究実施体制	54
IX. 1. 1. 1 本臨床研究の実施に際し医療機関内に設置される委員会	54
IX. 1. 1. 2 安全・効果評価・適応判定中央部会	55
IX. 1. 1. 3 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会	56
IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順	57
IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準	58
IX. 2. 1 一次登録	58
IX. 2. 1. 1 選択基準（一次登録）	59
IX. 2. 1. 2 除外基準（一次登録）	59
IX. 2. 2 二次登録	60
IX. 2. 2. 1 選択基準（二次登録）	60
IX. 2. 2. 2 除外基準（二次登録）	61
IX. 3 被験者の同意の取得方法	61
IX. 4 実施期間及び目標症例数	63
IX. 5 遺伝子治療臨床研究の実施方法	64
IX. 5. 1 対照群の設定方法	64
IX. 5. 2 遺伝子導入方法	64
IX. 5. 2. 1 PBMC の採取	64
IX. 5. 2. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球の調製	64
IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入リンパ球の投与	64
IX. 5. 3 前処置及び併用療法の有無	65
IX. 5. 3. 1 前処置	65
IX. 5. 3. 2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与	65
IX. 5. 3. 3 併用禁止療法及び併用禁止薬	65
IX. 5. 4 臨床検査項目及び観察項目	65
IX. 5. 5 予測される副作用及びその対処方法	73
IX. 5. 5. 1 アフェレーシスに伴う副作用	73
IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用	74
IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用	74
IX. 5. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	75
IX. 5. 6. 1 主要評価項目	75
IX. 5. 6. 2 副次的評価項目	76
IX. 5. 6. 3 中止基準	78
IX. 5. 7 有害事象が発現した場合の措置	79

IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合	79
IX. 5. 7. 2 重篤な有害事象が発現した場合	79
IX. 5. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式	80
IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法	80
IX. 5. 10 個人情報の保護の徹底	80
IX. 5. 10. 1 個人情報保護に関する責務	80
IX. 5. 10. 2 個人情報の取得と利用に関する制限	81
IX. 5. 10. 3 個人情報保護に関する安全管理措置	82
IX. 5. 10. 4 第三者提供の制限	82
IX. 5. 10. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等	83
X. その他必要な事項	84
X. 1 遵守する法令/省令等	84
X. 2 引用文献	85
X. 3 検査・観察スケジュール	91
X. 4 TNM 病期分類 (TNM Classification of Malignant Tumours)	92
X. 5 Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG))	93
X. 6 RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)	94
X. 7 同意・説明文書	96

<実施計画書に添付すべき資料>

遺伝子治療臨床計画実施計画書添付資料

- I 研究者の略歴及び研究業績
- II 実施施設の施設設備の状況
- III 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果
- IV 遺伝子治療臨床研究に関する実施施設以外の内外の研究状況
- V その他必要な資料

<参考資料>

- 参考資料 1: レトロウイルスベクターMS-bPa の全塩基配列
- 参考資料 2: マスターセルバンクの作製方法
- 参考資料 3: マスターセルバンク試験成績書
- 参考資料 4: マスターセルバンクの品質試験
- 参考資料 5: レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法

- 参考資料 6： 製造施設（位置・構造設備）
- 参考資料 7： レトロウイルスベクター試験成績書
- 参考資料 8： レトロウイルスベクターMS-bPa の品質試験
- 参考資料 9： SEPPIC 社 MONTANIDE™ 資料
- 参考資料 10： 遺伝子導入細胞調製に使用する培地等の資料
- 参考資料 11： 遺伝子導入細胞試験成績書
- 参考資料 12： 遺伝子導入調製細胞構成
- 参考資料 13： FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1
- 参考資料 14： 遺伝子導入リンパ球の品質試験
- 参考資料 15： ペプチド製造工程・品質試験報告書
- 参考資料 16： ラット単回皮下投与急性毒性試験
- 参考資料 17： MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール
- 参考資料 18： 血液・遺伝子導入細胞の搬送手順書

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

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

Ⅱ. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療研究において果たす役割

Ⅱ.1 総括責任者の氏名

土岐 祐一郎

大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 教授

遺伝子治療臨床研究の総括

Ⅱ.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

氏名	所属	役職	役割分担
和田 尚	大阪大学医学部附属病院 消化器外科	臨床 登録医	試験登録患者の診療
山崎 誠	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科	助教	試験登録患者の診療
宮田 博志	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科	助教	試験登録患者の診療
富山 佳昭	大阪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
珠玖 洋	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	教授	多施設共同臨床研究代表者、 臨床研究薬品質管理者
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
池田 裕明	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 製造管理責任者、遺伝子導入細胞 製剤の製造管理責任者 遺伝子導入細胞製剤の体内動態 及び免疫反応の評価
今井 奈緒子	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	遺伝子導入細胞製剤の体内動態 及び免疫反応の評価
佐藤 永一	東京医科大学 人体病理学講座	助教	病理組織学的診断

外部協力者

氏名	所属	役職	役割分担
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、遺伝 子導入細胞製剤の体内動態検 査、RCR 検査及び LAM-PCR に関 する技術提供

Ⅲ. 実施施設の名称及びその所在地

Ⅲ.1 当該実施施設の名称及び所在地

名称：大阪大学医学部附属病院

所在地：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2番15号

TEL. 06-6879-5111 FAX. 06-6879-3259

Ⅲ.2 細胞を調製する施設の名称及び所在地

名称：三重大学医学部附属病院

所在地：三重県津市江戸橋二丁目174番地

TEL：059-232-1111 FAX：059-321-5276

Ⅲ.3 当該実施施設以外に本臨床研究の実施を予定する施設の名称及びその所在地

名称：三重大学医学部附属病院

所在地：三重県津市江戸橋二丁目174番地

TEL：059-232-1111 FAX：059-321-5276

名称：財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院

所在地：大阪市北区扇町2丁目4番20号

TEL：06-6312-8831 FAX：06-6312-8867

IV. 遺伝子治療臨床研究の目的

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 (T cell receptor : 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。

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 (replication competent retrovirus : RCR)、linear amplification mediated-PCR (LAM-PCR)〕

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

V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

V.1 研究の区分

遺伝子治療臨床研究

遺伝子標識臨床研究

V.2 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（2003年、年齢調整）は男性13,658人、女性2,742人、死亡数（2007年、年齢調整）は男性9,900人、女性1,769人である（文献1：以下(1)と略す）。

食道癌の発生因子として、喫煙、飲酒及び熱い飲食物の嗜好が密接に関係するといわれている。また、アルコール代謝酵素の遺伝子多型と強く関連し、アルコールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドの蓄積が原因である可能性が示唆されている(2)。

本邦の食道癌の特徴として、扁平上皮癌が全体の90%以上を占め、また、発生部位が胸部中部食道に多く、欧米の下部食道に多く発生する腺癌とは異なっている。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（X.4「TNM病期分類」参照）〕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(3)。

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）等のタキソイド系製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見解が得られていない。その治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質（quality of life：QOL）改善を目的とし(4)、再発食道癌の50%生存期間は約6ヶ月とされている。

V.3 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〔ヒト白血球抗原（human leukocyte antigen：HLA）-A2402陽性、腫瘍組織中にMAGE-A4が発現〕から採取した末梢血リンパ球に、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活性化 (あるいは増殖) を図る。本臨床研究は、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-A 抗原は食道癌の 39~71%(5, 6) に、MAGE-A4 抗原は 68% (三重大学自験食道癌例) に発現する腫瘍抗原であり、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。MAGE-A4 は癌・精巣抗原 (Cancer-Testis 抗原; CT 抗原) に分類される腫瘍抗原であり、癌組織と精巣においてのみ発現される。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 (cytotoxic T lymphocyte : 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。

V. 4 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。本邦に多い食道癌と同じ扁平上皮癌である頭頸部癌を適応として、上皮細胞成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 阻害剤である Cetuximab が、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) により承認されている。食道癌における EGFR の発現率が頭頸部癌に次いで非常に高いことから (7, 8)、食道癌に対する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 (9-11)。中でも、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health : NIH) の Rosenberg SA 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 (tumor infiltrating lymphocyte : 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 (11)。

このように、体外で増殖させた腫瘍抗原反応性 T リンパ球の再移入による抗腫瘍効果が報告されているが、投与細胞が体内での腫瘍細胞に対する傷害活性を発揮させるために、

これまで通常 $10^8 \sim 10^{11}$ 個の細胞が投与され、生体内での一定期間の維持が確認された (9-12)。このような細胞数を準備するために、これまでは、体外での抗原刺激、オルソクローン OKT3 (Orthoclone OKT3 : OKT3) 及びインターロイキン 2 (interleukin 2 : IL-2) 等を用いて T リンパ球を活性化し、2~3 週間培養して増殖させたものが用いられてきた。投与細胞としては、複数のクローンを含む腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte : TIL)、又は患者自己末梢血リンパ球あるいは TIL から樹立された腫瘍抗原反応性 T 細胞クローンが用いられてきた。しかし、これらの方法では患者自身の病態により細胞入手可能例がごく少数に限られ、また、十分量の細胞数を得られない症例もあり、実際の治療応用には多くの制限がある。

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 (添付資料、38 ページ)。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 (添付資料、45 ページ)。なお、上記の NIH Rosenberg SA 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巣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 (13)。更に、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子 (DMF5)、又はマウス由来の gp100 特異的 TCR 遺伝子 (gp100(154)) を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している (14)。

以上より、本研究で実施を計画している遺伝子治療は、患者自己末梢血リンパ球から腫瘍傷害性 T リンパ球を大量に調製する方法を基礎としており、将来他の癌種への応用により幅広い患者を対象とすることが期待される。本臨床研究では、大量調製された腫瘍傷害性 T リンパ球の安全性、体内動態及び臨床効果を評価することを計画している。

V.5 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由

V.5.1 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与の根拠

近年の T 細胞の養子免疫療法における研究により、移入 T 細胞を *in vitro* において刺激し長期培養することにより、T 細胞は活性化フェノタイプを持つと共に *in vitro* における抗腫瘍活性を増強させるが、同時に終末期活性化 T 細胞あるいは疲弊化 T 細胞となり、移入後の生体内においては長期維持されずに結果としてより減弱した抗腫瘍効果しか示さないことが明らかとなってきた (15)。したがって、むしろ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(15-21)。今回使用するペプチドとは異なるが、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ション、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(15, 17-21)。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ション、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, 22)。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ション化して用いると有効であることが示されてきた(23, 24)。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(25-29)。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(30-34)。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(30, 35)。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(30)。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(36) 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
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
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
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	*													

V8-1 領域

J10 領域

C 領域

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(36)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
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
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
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
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 TCR β 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 $\gamma-\epsilon$ 、 $\delta-\epsilon$ 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（37-41）、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, 37-40)。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 $1.5/1 \times 10^4$ (42) 又は $1/1 \times 10^4$ (43) 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 $1/1 \times 10^{3-5}$ 程度であると報告されている(44)。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(45)、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(46)。

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、以下のようないウイルス学的特徴を持つ(47, 48)。

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。

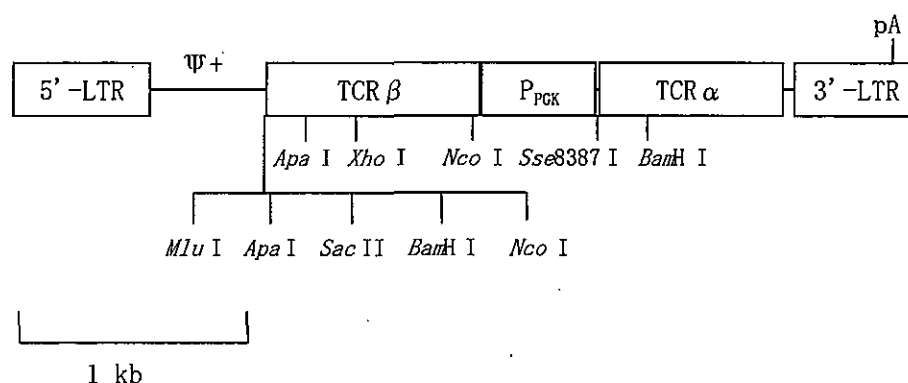


図 3 pMS-bPa の遺伝子概略

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(49)。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(50, 51)。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。

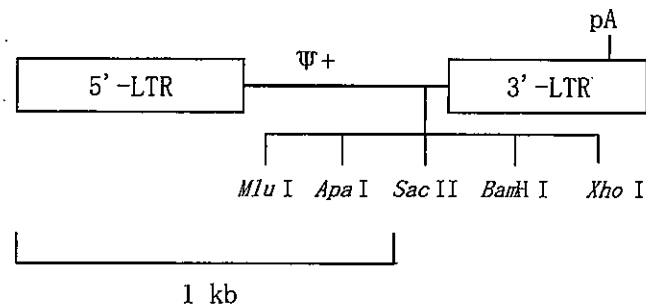


図 4 pMS の遺伝子概略

Ψ+: 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。

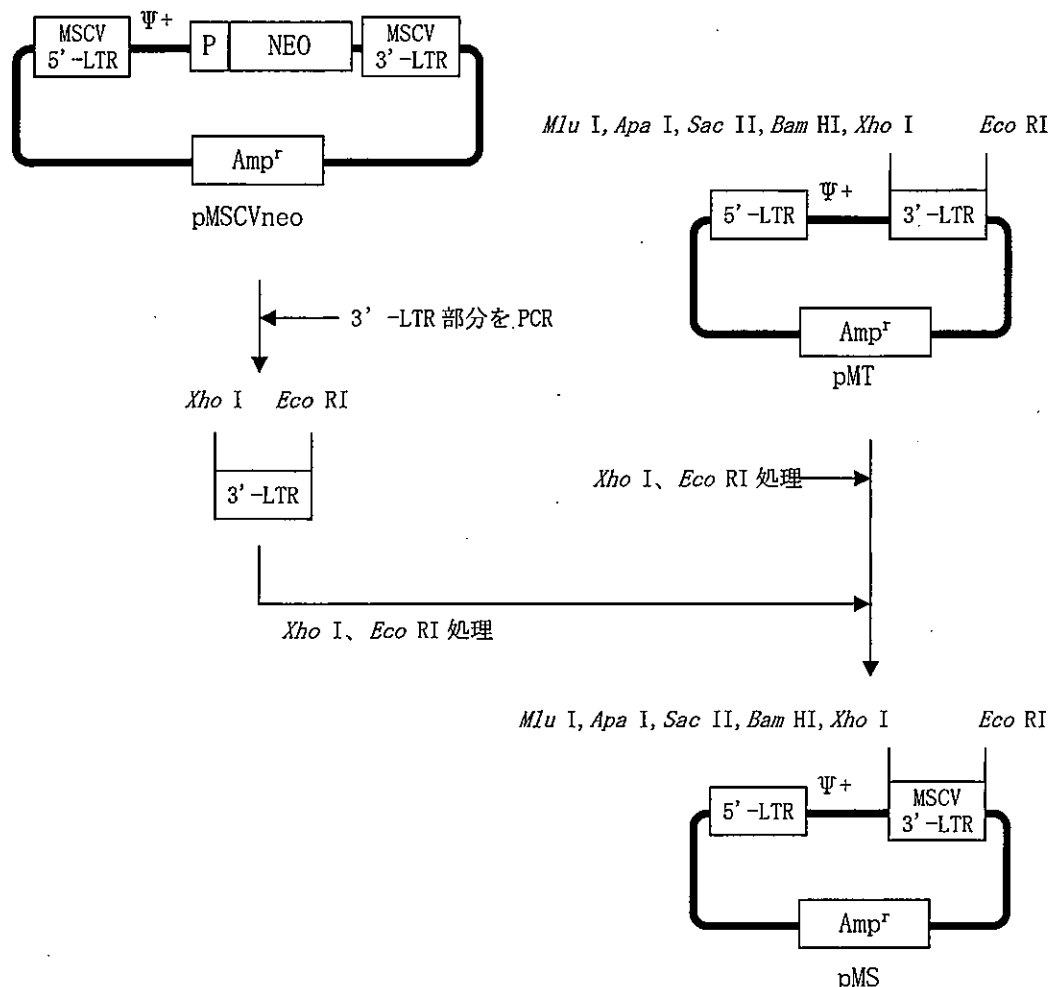


図5 pMS の構築手順

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。

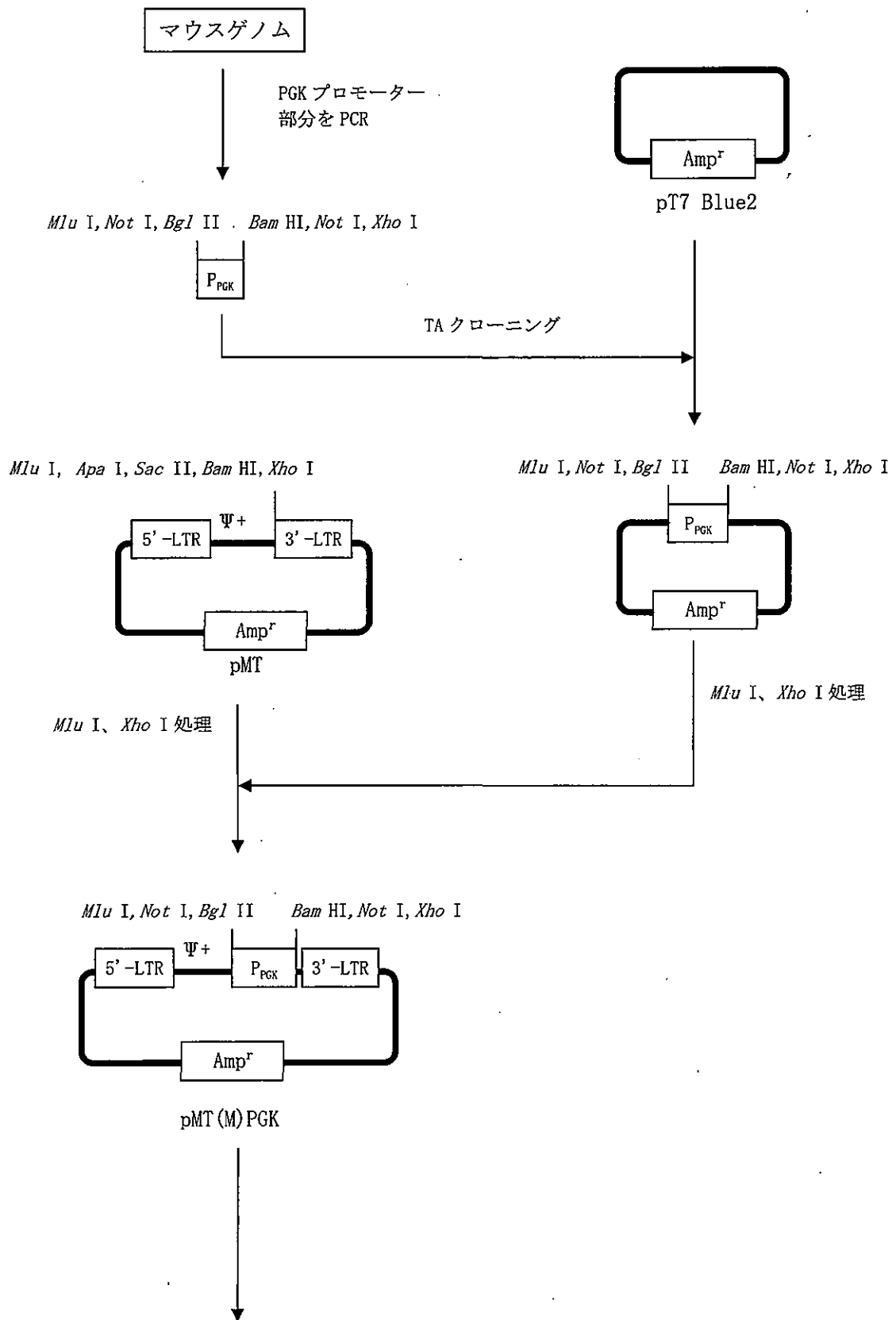
マウスゲノム DNA を鋳型に、制限酵素 Mlu I, Not I 及び Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I, Not I 及び Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い P_{PGK} 配列を増幅し、pT7 Blue2 ベクターに TA クローニングした。次に、このプラスミドから制限酵素 Mlu I と Xho I で P_{PGK} 部位を切り出し、pMT ベクターの Mlu I - Xho I サイトにクローニングし、pMT(M)PGK を作製した。

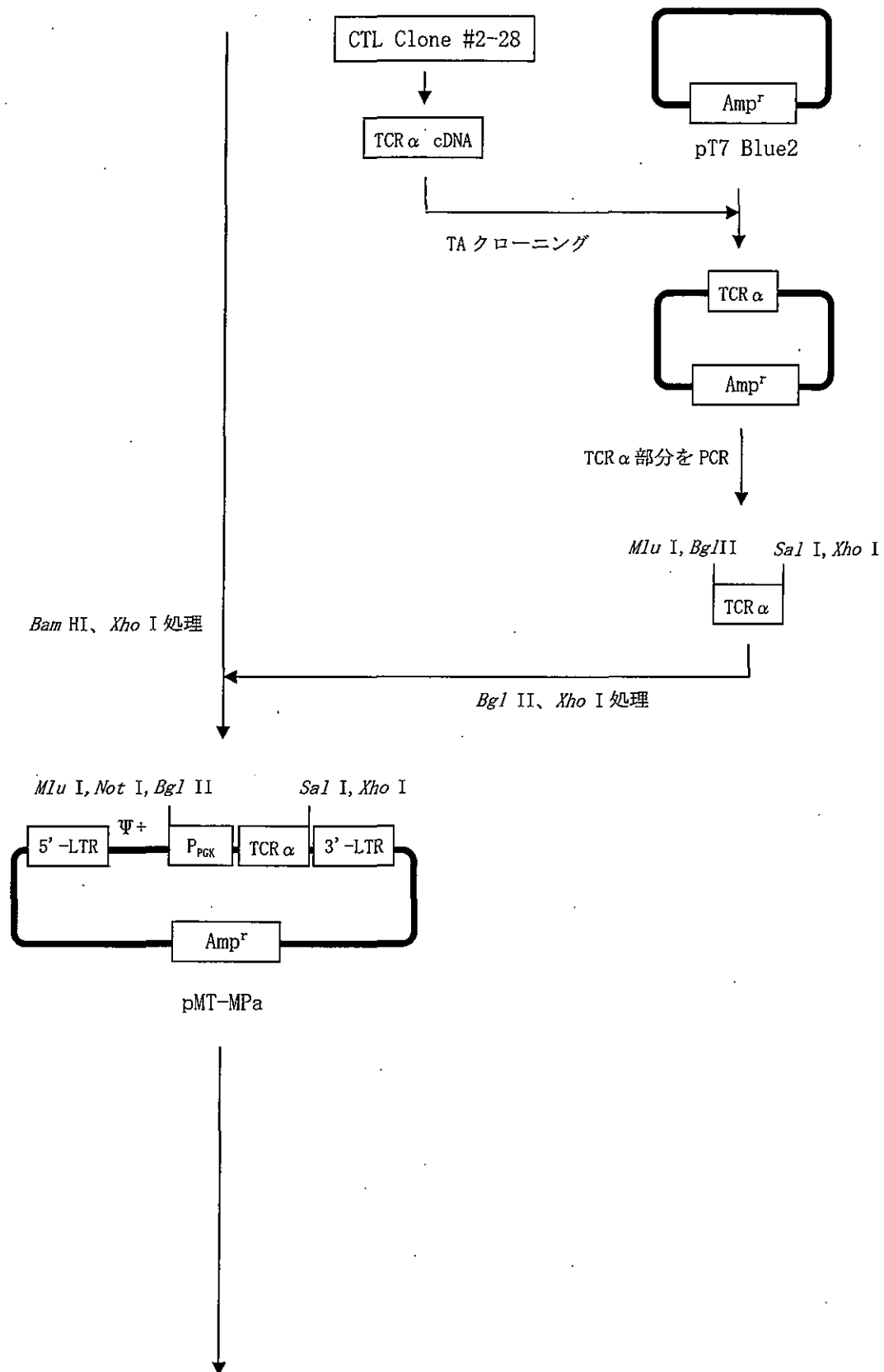
MAGE-A4 CTL Clone #2-28 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA 及び TCR β cDNA のコード域を増幅しそれぞれ pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

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。





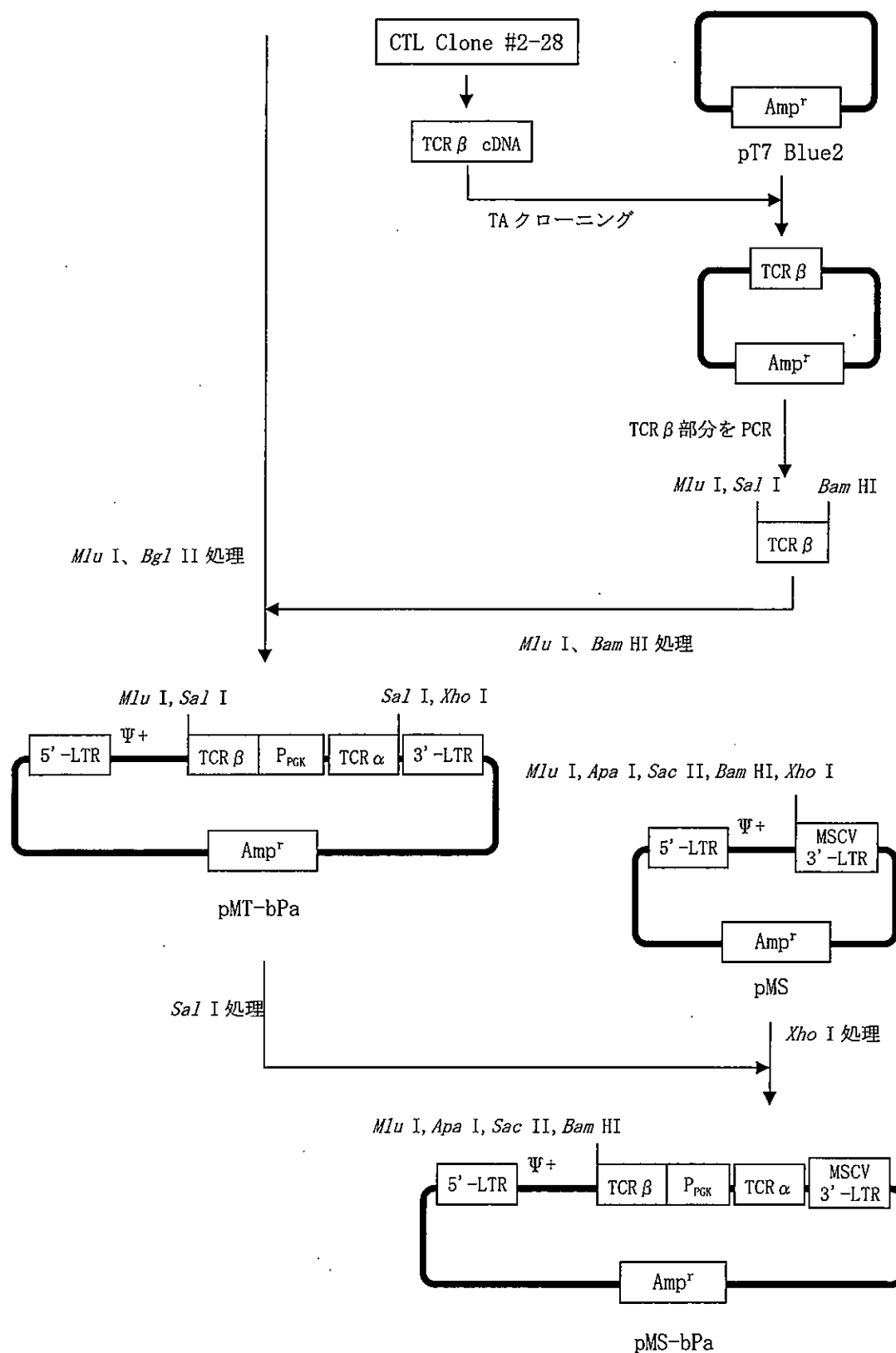


図 6 pMS-bPa の構築手順

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) (46)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 (46, 52) 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、Aminopterin、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。

VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造

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 は、ウイルス産生細胞株のMCBを培養し、その上清中にウイルス粒子の状態で存在する。

製造は全て管理された製造エリアにて医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準 (Good Manufacturing Practice : GMP) 遵守下で行われる。

VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造

レトロウイルスベクターMS-bPa のゲノム構造の概略を図 7 に示す。また、全塩基配列を参考資料 1 「レトロウイルスベクターMS-bPa の全塩基配列」に示す。レトロウイルスベクターMS-bPa はパッケージングシグナルとして Ψ^+ を有し、gag、pol、env をコードする配列を持たない。

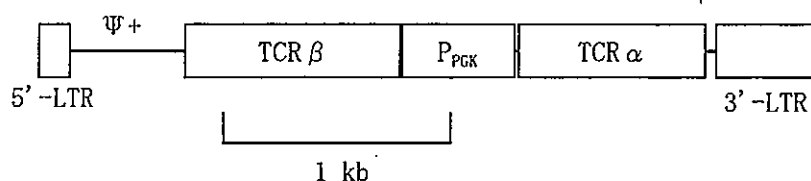


図 7 MS-bPa ベクターのゲノム構造概略

5'-LTR 及び 3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来、3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来である。

VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。レトロウイルスは増殖中の細胞にのみ感染するので、遺伝子導入に先立って標的細胞を組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) と OKT3 で刺激する。これにより高い遺伝子導入効率が期待できる。また、レトロウイルスベクターMS-bPa 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。

「VI. 4. 3 レトロウイルスベクターの選択根拠」の項で述べたように、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より効率よく遺伝子を導入し、細胞染色体に組み込むことが可能である。

VII. 安全性についての評価（ウイルスベクター、遺伝子産物、細胞及びペプチド）

VII.1 遺伝子導入方法の安全性

VII.1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

本臨床研究に用いるレトロウイルスベクターMS-bPa は、パッケージング細胞 PG13 を用いて樹立したウイルス産生細胞 MS-bPa #20 から産生される。レトロウイルスベクターMS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。

VII.1.1.1 MCB の作製法

MCB の作製フローを図 8 に示す。ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより、Primary Seed Bank が作製された。GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルの Primary Seed Bank が拡大培養され、最終的に 114 バイアルのウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 2「マスターセルバンクの作製方法」に記載する。

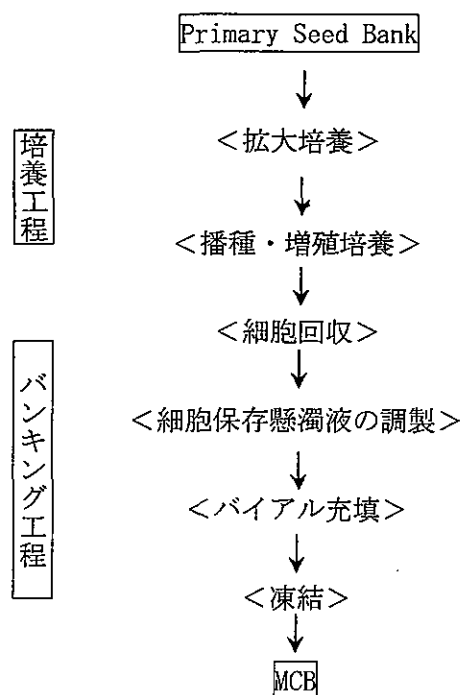


図 8 MCB の作製フロー

作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 3「マスターセルバンク試験成績書」参照）。なお、品質試験方法の概要は、参考資料 4「マスターセルバンクの品質試験」に示す。

1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA 染色法）
2. in vivo ウイルス試験
3. in vitro ウイルス試験
4. RCR 試験（細胞）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
6. XC プラークアッセイ
7. マウス抗体産生試験（MAP 試験）
8. 無菌試験（日本薬局方）
9. ウシウイルス試験
10. ヒトウイルス試験
11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験
13. 導入遺伝子配列解析
14. 細胞生存率試験（トリパンブルー）
15. 産生ウイルスの力価試験
16. 導入遺伝子の機能確認

VII. 1. 1. 2 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法

レトロウイルスベクターMS-bPa の製造フローを図 9 に示す。レトロウイルスベクターMS-bPa の製造は、4 バイアルの MCB を用いて行う。MCB の細胞を解凍後、培養を開始し、拡大培養により 5 個の大量静置培養用容器まで増殖させる。大量静置培養用容器において培養細胞が接着面いっぱいに広がった状態に達した後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。0.22 μm の濾過フィルターによる無菌濾過を経て培養上清液を回収した後、ウイルスベクターとして凍結保存バッグに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。

製造に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 5「レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法」に記載する。製造は、共同実施施設である三重大学医学部の研究者が製造管理責任者となり、全てタカラバイオ社の管理された製造エリア（参考資料 6「製造施設（位置・構造設備）」）にて GMP 遵守下で行われる。また、タカラバイオ社の製造施設から三重大学医学部内細胞調製施設へのウイルスベクターの輸送は、凍結・ドライアイス詰で、輸送中の温度変化をモニター・記録して行う。

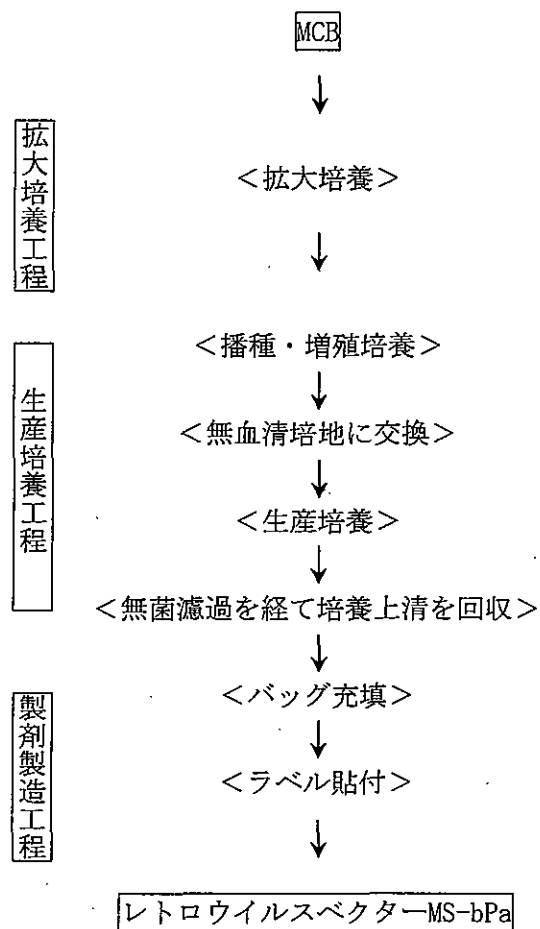


図9 レトロウイルスベクターMS-bPaの製造フロー

レトロウイルスベクターMS-bPa に関しては、以下の品質試験を行う（1 ロットの結果を参考資料7「レトロウイルスベクター試験成績書」に示す）。なお、品質試験方法の概略は、参考資料8「レトロウイルスベクターMS-bPaの品質試験」に示す。

1. マイコプラズマ否定試験（培養法）
2. in vivo ウイルス試験
3. in vitro ウイルス試験
4. RCR 試験（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
5. 無菌試験（日本薬局方）
6. エンドトキシン試験（日本薬局方）
7. 導入遺伝子配列解析
8. 産生ウイルスの力価試験
9. 導入遺伝子の機能確認

VII. 1.2 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS-bPaにより TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した患者由来Tリンパ球であるため、その安全性については「VII. 3.4 被験者に投与する細胞の安全性」に記載する。なお、この細胞は、RPMI1640培地とヒト血清アルブミン(HSA)含細胞凍害保護液(CP-1)とが1:1の割合で混合された溶液の懸濁液として投与される(「VII. 3.1 遺伝子導入細胞の調製方法」参照)。HSAは承認された医薬品製剤を使用する。RPMI1640及びCP-1は研究用試薬である。本邦では15年来の末梢血幹細胞採取・保存・解凍投与の臨床経験例において、CP-1とRPMI1640による凍結保存法が用いられて、人に投与されている。また、内外の骨髄移植の臨床経験では、ヘパリン剤希釈液としてRPMI1640を採取骨髄に添加後に投与する方法が広く行われてきたが、何れの使用においてもCP-1又はRPMI1640に起因する重篤な有害事象の報告はみられない。

また、遺伝子導入細胞の投与後に、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ペプチドが不完全フロイントアジュバントとの懸濁液として皮下投与される。このペプチドの純度は逆相HPLCによる解析により98.3%であり、エンドトキシン試験や無菌試験などにより品質が確認されている(「VII. 4 ペプチドの安全性」参照)。不完全フロイントアジュバントは医薬品として承認されているものではないが、本臨床研究に用いるMONTANIDE™ ISA 51は、SEPPIC社(75, quai d'Orsay 75321 Paris cedex 07 FRANCE)が人への投与を目的としてGMP製造し、販売しているものである。SEPPIC社の資料(参考資料9-1及び2)によると、これまでにAIDSや悪性腫瘍のワクチンの臨床試験において、4,000人以上の患者に約40,000回の投与がなされており、副作用は多くの場合投与部位の発赤等の一過性の局所反応のみであることが示されている。また、その他の副作用としては、一過性のインフルエンザ様の全身症状が時に観察されている。以上よりMONTANIDE™ ISA 51は安全に人へ投与されるものであると考えられている(参考資料9-1)。

VII. 1.3 増殖性ウイルス出現の可能性

VII. 1.3.1 レトロウイルスベクターの安全性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターMS-bPaのゲノムはMoMLV由来のgag、pol、envをコードする遺伝子を完全に欠如している。また、一過性にエトロピックウイルスベクターMS-bPaを産生させた293T細胞、及びパッケージング細胞株PG13において、gag、polをコードするDNA断片とenvをコードするDNA断片とが異なったプラスミド上あるいは染色体上の異なった位置に挿入されているので、RCRの出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクターMS-bPaの試験項目にRCR試験が含まれており、RCR陰性のレトロウイルスベクターだけを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中のRCRを測定する。

VII. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性

パッケージング細胞は一般に、ウイルス粒子を構成する蛋白の遺伝子を有さない増殖能欠損型レトロウイルスベクターを産生するために使用される。組換えレトロウイルスベクターを作製するために、パッケージングプラスミド（ウイルス蛋白をコードする gag、pol、env 遺伝子を含む）をあらかじめ組み込んだパッケージング細胞が作られている。この細胞に遺伝子治療用レトロウイルスベクターのゲノム配列を含む DNA を導入したプロデューサー細胞を樹立することにより、高力価のレトロウイルスベクターを大量に調製することが可能になった(53)。図 10 にその概念図を示す。

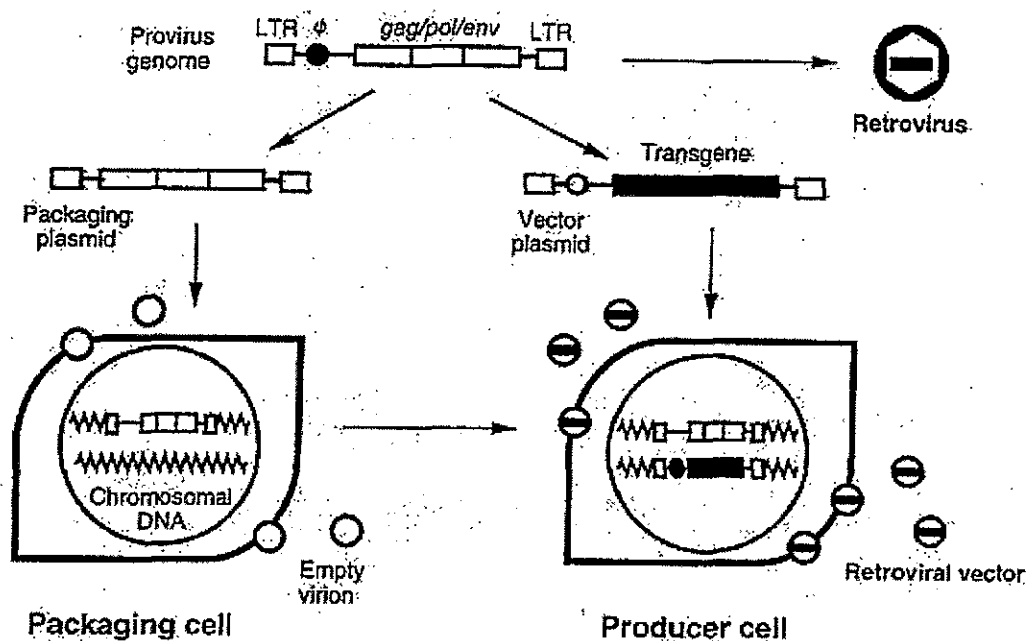


図 10 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 53 より転載)

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要な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、このプラスミドを通常の細胞に導入しただけではウイルス粒子を産生することはない。さらに、レトロウイルスベクター MS-bPa を作製する際に使用されるパッケージング細胞 PG13 は、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 個の DNA 断片として別々に導入した第 3 世代のパッケージング細胞株なので、予期せぬ遺伝子組換えにより増殖可能な野生型レトロウイルス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。したがって、ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa とパッケージング細胞株 PG13 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たレトロウイルスベクター MS-bPa を製造する過程において、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる。

表 1 に各世代のパッケージング細胞の特徴を、図 11 に各世代のパッケージング細胞と対応するレトロウイルスベクターの構造を記載する(53)。

表 1 各世代のパッケージング細胞の特徴

	パッケージングプラスミドの構造	RCR 出現の機構
第1世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の A)	パッケージングシグナルだけを除いたもの。効率よくベクターを作るために、ベクタープラスミド側に gag 遺伝子の一部を残しておく必要がある。	パッケージング配列とベクター配列に共通する gag 部分で相同組換えが起こると RCR が出現する。
第2世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の B)	パッケージングシグナルを除去し、さらに 3' -LTR を polyA 付加シグナルで置換したもの。	RCR が出現するためには、gag 部分と 3' -LTR 部分の 2 ヾ所で同時に相同組換えがおこる必要があり、その可能性は非常に低いと考えられている。
第3世代パッケージング細胞 (パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の C)	パッケージングシグナルを除去して 3' -LTR を polyA 付加シグナルで置換し、さらにウイルス蛋白のコーディング領域を gag-pol と env の 2 種類に分割して発現させるようにしたもの。	RCR が出現するためには、gag 部分と pol 部分と 3' -LTR 部分の 3 回の相同組換えが同時に起こる必要があり、その可能性は極めて低いと考えられている。

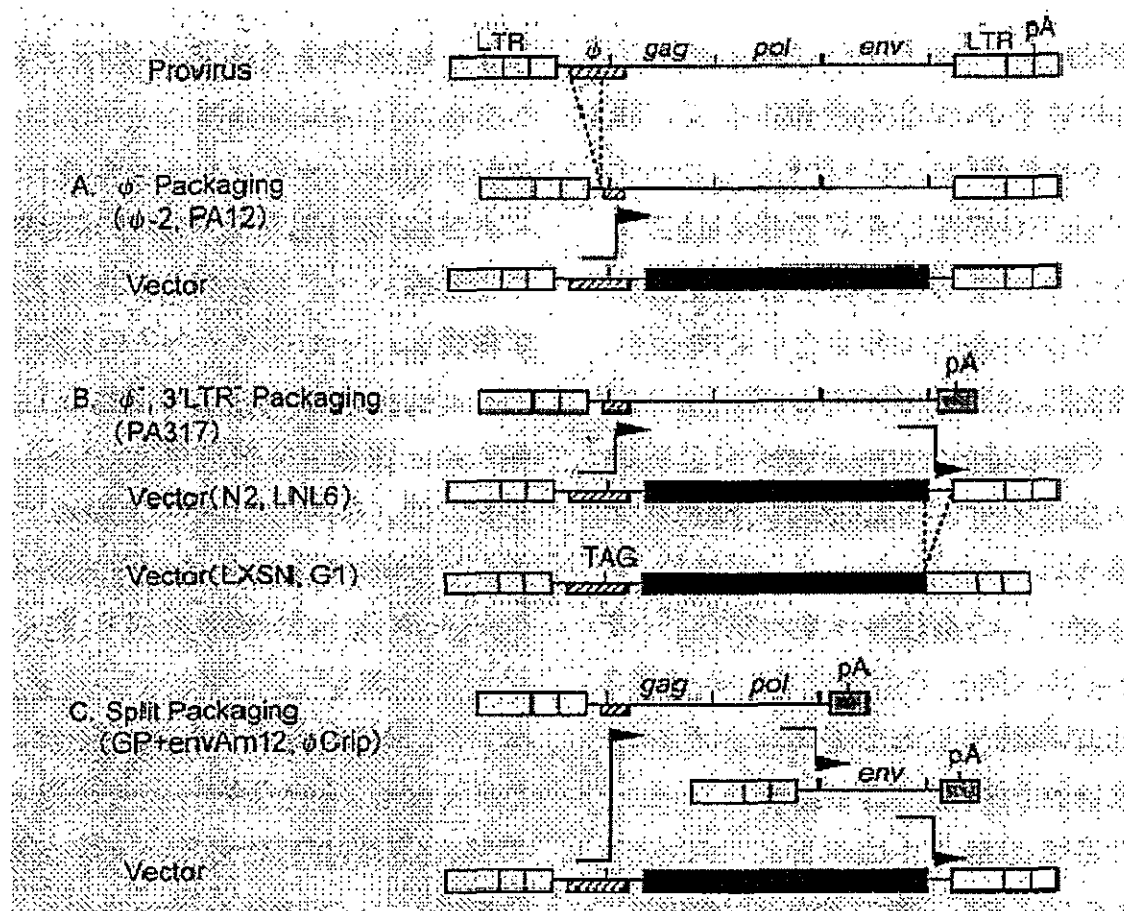


図 11 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 53 より転載)

続いて図 12 に、パッケージング細胞株 PG13 を作製するために用いた 2 種のプラスミド、pLGPS と pMOV-GaLV Seato env の構造を示す。

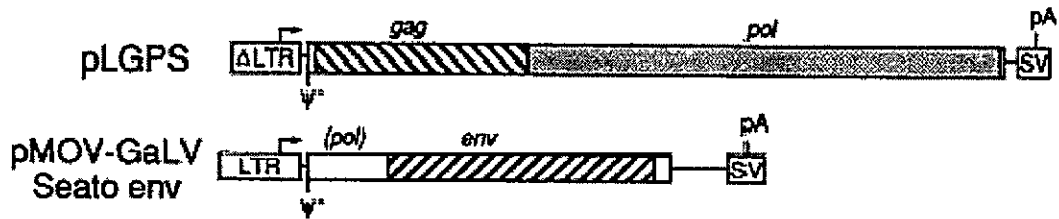


図 12 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造
(引用文献 46 より転載)

pLGPS と pMOV-GaLV Seato env は、どちらも Ψ パッケージングシグナルと 3'-LTR を欠失しているので、PG13 細胞が内在性のパッケージングシグナルと 3'-LTR を持つことはなく、gag-pol 遺伝子や env 遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

以上のことから、パッケージング細胞株 PG13 を用いて作製したレトロウイルスベクターが RCR を含む可能性は極めて低く安全であると考えられる。

PG13 と同じ第 3 世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが 1996 年に Chong ら (54) により初めて報告された。RCR 出現の頻度を測定することは困難であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている (54)。なお、PG13 を用いてレトロウイルスベクターを作製する過程で RCR が出現したという報告はない。

VII. 1. 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・増殖に必須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。しかしながら、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。

VII. 1. 5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、標的細胞としての患者 T リンパ球に ex vivo (生体外) で TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用した

レトロウイルスベクターMS-bPa はこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化される(55)ため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。

また、レトロウイルスベクターMS-bPa は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

VII. 1.6 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、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、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、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラスII安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクターMS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。

レトロウイルスベクターMS-bPa 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導入が起こる可能性は、大量のRCRが患者体内に存在しない限り非常に低い。

VII. 1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。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細胞は死に至る可能性がある。ただし、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、癌遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターのLTRが有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、癌抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

VII. 1.8 癌原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖による癌化の問題が出現する。実際に、CD34陽性細胞を遺伝子導入

の標的細胞とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のフランスでの遺伝子治療において、合計 4 例の白血病発症が報告されている (56-58)。この白血病発症については、①免疫系が成熟していない幼少の患者が対象であること、②遺伝子導入の標的細胞が分化・増殖能が旺盛な造血幹細胞であること、③導入された治療遺伝子 (IL-2 受容体 γc 鎖) が細胞増殖に直接関与する機能を有すること等、この遺伝子治療に特殊な事情が重なることにより遺伝子導入細胞の癌化が発生したことが示唆されている (59)。なお、同様に X-SCID に対し、レトロウイルスベクターにより IL-2 受容体 γc 鎖遺伝子を CD34 陽性細胞に導入するイギリスでの遺伝子治療においても、10 例中 1 例に白血病が発症したことが 2007 年 12 月に報告された (60, 61)。また、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした慢性肉芽腫症 (CGD) のドイツでの遺伝子治療において、2 例中 2 例の骨髓異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている (62, 63)。一方、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいて癌化が見られなかったと報告されている (64)。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、遺伝子導入の標的細胞、ベクターの種類等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はない (13, 37-40)。

本臨床研究では、遺伝子導入の標的細胞は分化を終えた成熟 T リンパ球であり、その癌化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、日米 EU 医薬品規制調和国際会議 (ICH) の遺伝子治療専門家グループから出されている (65)。実際に、過去に実施された T 細胞を遺伝子導入の標的細胞とした遺伝子治療において、遺伝子導入細胞の癌化は報告されていない (66)。また、イタリアのグループは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した T リンパ球を投与した 46 例のフォローアップ (最長 9 年間) において、遺伝子導入 T リンパ球のクローン増殖は認められなかったことを報告している (67)。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖を linear amplification-mediated PCR (LAM-PCR) によってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

VII. 2 遺伝子産物の安全性

本臨床研究において、遺伝子導入の標的細胞は、PBMC を OKT3 により刺激増殖させた T 細胞である。これら T 細胞の大半は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、もともと発現している TCR と同類の蛋白である。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。

メラノーマ抗原である gp100 に対する T 細胞クローンを用いた 2 件の臨床試験 (68, 69) において、ex vivo で培養、増殖させた約 10^{10} 個の細胞が投与された。1 件は T 細胞と IL-2

を併用するものであり、T細胞を単独投与した場合には治療に関連する重大な有害事象が発生せず、IL-2を併用した場合にはIL-2による毒性以外は認められなかった。一方、もう1件は化学療法の後、T細胞とIL-2を併用するものであり、血液学的又はそれ以外の毒性（血圧低下、吐き気など）が見られたが、これらは併用した化学療法剤又はIL-2を単独で使用的場合にも見られるものであった。このことから、特定のTCR可変領域を持つT細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半はTCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たにMAGE-A4に対するTCR遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において2種類の配列の α 鎖及び β 鎖が発現する。このため、下記のいずれかのメカニズムにより、理論的には自己免疫疾患を発症する可能性が指摘されている(70)。

1. 導入したTCR鎖と内在性のTCR鎖が予測不可能な抗原特異性を持つ混合TCR2量体を形成する。この場合、内在性TCRの配列によっては、自己抗原に対する混合TCRを形成する可能性が否定できないが、特定の自己抗原を認識する遺伝子導入T細胞の存在割合は非常に少ないので、正常細胞への影響は小さいと考えられる。
2. 自己抗原に特異的なTCRを有する無応答T細胞が、導入されたTCRからの刺激によって活性化され、自己の正常細胞を攻撃する。この場合、TCR α 鎖の対立遺伝子排除が完全ではないために、正常なT細胞の中にも2種類のTCRを発現しているものがあるが、これが自己免疫疾患に関与しているとの証拠はほとんどない。従って、このようなことを生じる可能性は小さいと考えられる。
3. 導入TCR分子が認識する腫瘍抗原ペプチドとHLA分子複合体の立体構造が、自己抗原ペプチドと患者のHLAアレル（対立遺伝子）との複合体の立体構造に酷似する場合、導入TCR分子が自己抗原と交差反応して正常細胞を認識することにより、遺伝子導入リンパ球が自己の細胞を攻撃する可能性がある。この可能性は、論理的には指摘されているが、頻度や危険性については今後の検討・確認が必要である。

メラノーマ抗原であるMART-1に対するTCR遺伝子を自己リンパ球に導入し、転移性悪性黒色腫患者に移入するという臨床試験において、遺伝子導入細胞による毒性は認められなかった(13)。このことから、TCR遺伝子を導入したT細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

VII.3 細胞の安全性

VII.3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す細胞培養にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置されたP2レベルの細胞調製施設内で行われる。また、細胞調製操作時には、品質が確認された試薬、培地類を使用し、クラスII安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

レトロウイルスベクターMS-bPa を用いた遺伝子導入 T リンパ球調製工程について、細胞培養における操作概要を表 2 に、操作手順の概略図を図 13 にそれぞれ示す。

表 2 細胞培養における操作概要

日	操作内容
第 0 日	リンパ球刺激工程
第 2 日	ウイルス結合バッグ調製工程
第 3 日	遺伝子導入工程 (1 回目)
第 4 日	遺伝子導入工程 (2 回目)
第 7～9 日	最終産物調製工程

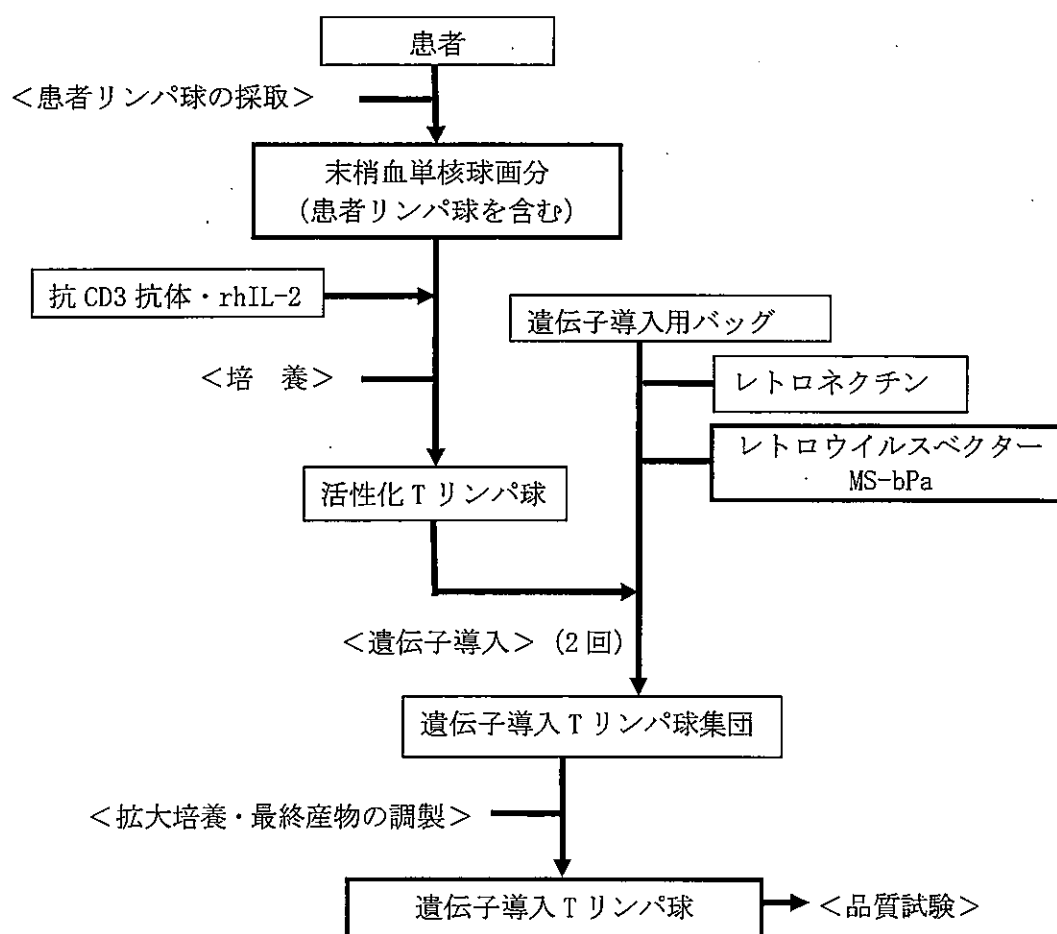


図 13 遺伝子導入細胞調製工程の概略

レトロウイルスベクターMS-bPaを用いた遺伝子導入Tリンパ球調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（ 2×10^8 個、 1×10^9 個、又は 5×10^9 個）から、培養ユニットを決定し、培養ユニットに応じた以下の個数を満たす患者リンパ球を採取し、遺伝子導入細胞の調製に使用する。

培養ユニット数	1	2～4
患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（個）	2×10^8 個又は 1×10^9 個	5×10^9 個

患者からのリンパ球と血漿の採取は、大阪大学医学部附属病院輸血部において、血液成分分離装置 COBE SPECTRA（GAMBRO BCT 社）を用いて実施する。

採取された患者リンパ球を三重大大学の細胞調製施設に搬送し、セルプロセッサを用いて患者リンパ球の濃縮と PBS/11.8% ACD-A 溶液による洗浄を行った後、生細胞数及び細胞生存率を測定する。抗 CD3 抗体（30 ng/mL）を添加した培養用培地〔基本培地 GT-T503、600 IU/mL rhIL-2、1%非働化患者血漿、0.2% HSA 及び $2.5 \mu\text{g/mL}$ アムホテリシン B 含有。〕に患者リンパ球を $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内にて培養を開始する。

遺伝子導入用バッグにレトロネクチン CH-296（ $20 \mu\text{g/mL}$ ）を添加して薬用保冷庫にて保存する。

基本培地 GT-T503 の組成及びレトロネクチン CH-296 の試験成績書を参考資料 10-1 及び 10-2 に示す。

第2日：レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを PBS で洗浄した後に、レトロウイルスベクターMS-bPa を添加（30 mL/バッグ）する。 $2,000 \times g$ 、 32°C 、2 時間遠心した後に、MS-bPa を除き 1.5% HSA/PBS で洗浄した後に、同液を保存液として添加し薬用保冷庫にて保存する。

第3日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数及び細胞生存率を測定し、遠心分離機にて $500 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$ で 20 分間遠心し、細胞を濃縮・回収する。レトロウイルスベクターMS-bPa 結合バッグの保存液を捨てる。ここに活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、 $1,000 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$ で 10 分間遠心する。遺伝子導入操作後、4 時間、5% CO_2 インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、新鮮な培養用培地にて $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内にて培養を開始する。

第4日：第3日と同様の遺伝子導入操作を行う。遺伝子導入操作後の細胞濃度は $0.5(\pm 0.05)$

×10⁶個/mLにて培養する。

第7～9日：セルプロセッサを用いて細胞の洗浄と濃縮をHSA含RPMI1640で行い、1.6～10×10⁷細胞/mLとなるようにRPMI1640に懸濁する。その後、HSA含CP-1と1:1の割合で混合する。HSA含CP-1と混合した遺伝子導入Tリンパ球は、投与に必要な細胞数に相当する液量を凍結保存専用バッグに充填した後に温度管理されたディープフリーザー（-80℃）にて凍結し使用時まで保存する。また、同懸濁液の一部を凍結保存後の細胞生存率試験用に凍結保存用バイアルに分注し同様に凍結保存する。

RPMI1640及びCP-1の組成を参考資料10-3及び10-4に示す。

投与前：凍結保存後の細胞生存率試験として、凍結保存バイアルをディープフリーザー（-80℃）より取り出し、37℃温浴にて急速に解凍した後、遺伝子導入Tリンパ球生存率を測定する。また、輸注用細胞と同時に搬送した凍結保存バイアルを用い実施施設にて凍結保存細胞の生存率を測定する。

投与日：凍結保存バッグにて保存された遺伝子導入Tリンパ球を投与直前に37℃温浴にて急速に解凍し、投与する。

VII. 3. 2 培養細胞の純度

遺伝子導入される細胞は、OKT3により活性化され増殖期にある患者自己由来のTリンパ球である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の遺伝子導入細胞の比率は20%程度であり（参考資料11「遺伝子導入細胞試験成績書」参照）、Tリンパ球が95%以上を占め、若干のBリンパ球が含まれていた（参考資料12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。患者に投与される細胞中にも、遺伝子導入されていないTリンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題ないと考えられる。また、仮にTリンパ球以外に遺伝子導入された場合には、発現したTCR分子は受容体としての機能を発揮しないと考えられることから、生体への影響が発生する可能性は低いと考えられる。

遺伝子導入により、導入遺伝子の本来の機能とは関係なく移入細胞の腫瘍化を誘導する確率が一定度に存在すると考えられる。ただし造血幹細胞以外の細胞に遺伝子導入された場合には、血液系細胞はいずれもその生理的寿命が限られていることから腫瘍が発生する確率は極めて低いと考えられる。なお、造血幹細胞の混入については、①培養開始時点の患者末梢血リンパ球中の造血幹細胞の比率は極めて低いこと（通常0.1%以下）、②Tリンパ球を活性化させる今回の培養条件ではレトロウイルス感染時に造血幹細胞が分裂増殖している可能性が極めて低いこと、③造血幹細胞の増殖に必要なサイトカイン等を含まない条件で増殖培養されることを総合すると、遺伝子導入された造血幹細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。実際に、健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝

子導入後の細胞中の CD34 陽性細胞の比率は 0.1%未満（検出限界以下）であった（参考資料 12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。一方、レトロウイルスベクターでの遺伝子導入により白血病発症が認められた、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたフランス及びイギリスの X-SCID 遺伝子治療では、抗 CD34 抗体を用いて純化した CD34 陽性細胞を用いて、FLT3 リガンド、IL-3 及び幹細胞因子等のサイトカインを加えた条件で培養されており（参考資料 13「FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1」参照）、今回の遺伝子導入細胞の培養条件とは大きく異なっている。ただし、万が一、造血幹細胞に遺伝子導入された場合には腫瘍発生のリスクを否定できないことから、投与後の遺伝子導入細胞のクローン増殖をモニタリングする予定である。

培養細胞間の相互汚染及び取違えを防ぐために、細胞調製施設内の同一の部屋で同時に複数バッチの細胞調製は行わない。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作は P2 レベルの細胞調製施設内で行う。細胞やレトロウイルスベクター等が作業エリア内の空気に直接暴露される操作は清浄度クラス 100、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とともにレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散を防止する。

また、細胞培養の際に使用する OKT3 の洗浄後の残留濃度は極めて微量であり、これらの刺激性物質が生体に及ぼす影響は限りなく少ない。

TCR 遺伝子導入リンパ球は、三重大学医学部内に設置した P2 レベルの細胞調製施設において調製され、以下「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

遺伝子導入細胞調製にあたっては、患者リンパ球を OKT3 により刺激した後にレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行うとともに、*ex vivo* での培養を行う。

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクター MS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である（「VII. 1. 8 癌原性の有無」参照）。

OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を *ex vivo* で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。

2002 年のフランスの Sauce らによる報告では、リンパ球を含む PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で *ex vivo* にて培養するとリンパ球表面の CD4/CD8 の比率は減少し、CD62L、CCR7、

CD45RA、CD27、CD28 の発現も徐々に低下する。代わりに、CD45RO、CD25、CD154、CD40、CD80、CD86、CD95、HLA-DR 等の発現は増大する。ただし、レトロウイルスベクターの感染によるリンパ球の表現型の変化は特に認められないことを報告している(71)。

ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg SA らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない(9, 13, 72, 73)。さらに、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6 日から 9 日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている(13)。本計画においても T リンパ球の培養期間はこれと同程度に抑えている。

VII. 3.4 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞は、レトロウイルスベクターMS-bPa により TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した被験者個人由来の T リンパ球である。細胞調製の際に用いられる培地の成分、レトロウイルスベクターMS-bPa の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を凍結保存する前に RPMI1640 で十分に洗浄される。そのため被験者に投与される量は極めて少なく、これらが直接影響を及ぼすことはないと考えられるが、細胞調製終了後、培養上清又は凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を検体として採取し、以下の試験を行うことにより品質を担保する（品質試験方法の概要を参考資料 14「遺伝子導入リンパ球の品質試験」に、健常人リンパ球での試験調製での結果を参考資料 11「遺伝子導入細胞試験成績書」に示す）。全ての品質試験結果が得られて安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
2. RCR 試験（RT-PCR 法）
3. 無菌試験（日本薬局方）
4. エンドトキシン試験（日本薬局方）
5. 細胞生存率試験（トリパンブルー）
6. 細胞数試験
7. 遺伝子導入効率試験
8. 導入遺伝子の機能試験

被験者への投与の際は、凍結保存専用バッグ中に凍結された細胞懸濁液を投与直前に 37℃ 温浴にて急速に解凍し、RPMI1640 培地と HSA 含 CP-1 とが 1:1 の割合で混合された細胞懸濁液として静脈内投与される（生理食塩水の追加により投与液量を調整する場合がある）。

なお、品質試験の検体を採取した後の工程としては、閉鎖系操作による凍結保存専用バッグへの充填、凍結、解凍、及び閉鎖系操作による輸注用バッグ又は注射器への移し替え

であり、不純物混入のリスクは極めて低いと考えられる。また、凍結・解凍による細胞生存率の低下については、凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を別途バイアルに凍結保存し、投与日以前に細胞生存率を測定することにより確認する。

VII. 4 ペプチドの安全性

VII. 4. 1 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの純度

本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは米国 NeoMPS 社において GMP 準拠で製造された。その製造工程の概略と品質試験の結果を参考資料 15「ペプチド製造工程・品質試験報告書」に示す。その純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であった。またエンドトキシンは 0.100 EU/mg 未満であり、無菌試験により無菌性が確認されている。

VII. 4. 2 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの安全性

腫瘍ワクチンの臨床試験はこれまでに国内外ですでに主要なものだけでも 1,300 名以上の対象者につき報告されている(74)。その中でも CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は最も多数行われており、米国の Rosenberg らのグループだけでも 2004 年の時点で総数 381 名の患者に腫瘍抗原ペプチドワクチンを投与している(74)。しかしながらこれら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、現在までに重篤な副作用の報告はない(30)。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫脹）、微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドはラットにおける単回皮下投与毒性試験を実施した（株式会社三菱化学安全科学研究所 熊本研究所、熊本県宇土市栗崎町 1285 番地）。ヒトへの投与量として予定している 300 μ g/body を投与した結果、一般状態の変化及びペプチド投与に関連する体重の変化は認められず、また病理学的検査においても異常は認められなかった。（参考資料 16「ラット単回皮下投与急性毒性試験」参照。MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは資料中「MAGE-A4-A24」に該当）。以上より MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの投与において重篤な副作用が出現する可能性は極めて小さいと考えられる。なお、有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

VII. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

①臨床ニーズ

再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。

②品質・安全性

本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 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を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。

本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによる癌化のリスクは極めて低く、対象疾患（治療抵抗性食道癌）とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。

免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な毒性所見は観察されなかった（添付資料、52 ページ）。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg SA らのグループで既に実績がある（添付資料、62～64 ページ）。

③期待される有効性

共同実施施設である三重大学にて調製された 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（添付資料、38 ページ）。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（添付資料、45 ページ）。

NIH の Rosenberg SA らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例（12%）に PR（partial response：部分奏効）を認めており（13）（添付資料、62 ページ）、さらに、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子（DMF5）、又はマウス由来の gp100 特異的 TCR 遺伝

子 (gp100(154)) を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している (14) (添付資料、64 ページ)。

したがって、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。

④当施設・研究者の能力

当施設の総括責任者及び研究者 (宮田、山崎、和田、富山) はリンパ球アフェレーシス、細胞品質管理、腫瘍抗原由来蛋白を用いた癌ワクチン臨床試験の実施と末梢血を用いた免疫学的解析の経験者であり、さらに対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験 (食道癌治療 150 例以上) を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。

⑤臨床研究薬の調製

被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。

⑥安全・効果評価・適応判定部会

本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会の委員から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定部会を設置する。なお、安全・効果評価・適応判定部会の詳細については第IX章及び別途作成する手順書に従う。

IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

IX.1.1 臨床研究実施体制

本臨床研究は、三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。安全性、有効性の評価を統一するため、全施設共通の安全・効果評価・適応判定部会を設置する。また、TCR 遺伝子導入リンパ球の調製は細胞調製施設を有する三重大学にて行う。(図 14 参照)

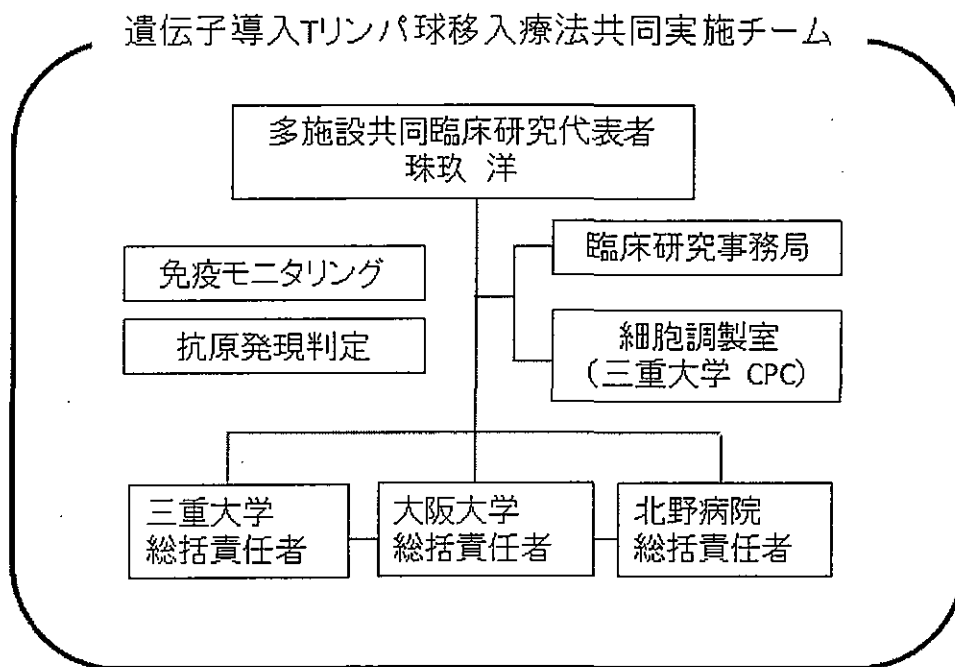


図. 14 本臨床研究における実施体制

IX.1.1.1 本臨床研究の実施に際し医療機関内に設置される委員会

本臨床研究実施の適否及びその他本臨床研究に関する調査審議を行うため、各医療機関に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置する。なお、遺伝子治療臨床研究審査委員会の運営に関しては、医療機関毎に作成した手順書に従うものとする。

IX.1.1.2 安全・効果評価・適応判定中央部会

有効性及安全性の評価基準を統一することを目的とし、本臨床研究では、各医療機関で共通の安全性・効果評価・適応判定を検証するため、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。なお、安全・効果評価・適応判定中央部会の委員については各医療機関から選出し、本臨床研究の安全性、効果並びに被験者の適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その適否及び留意事項、改善事項等について各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。

1) 適格性評価

被験者の本臨床研究への登録は、総括責任者から安全・効果評価・適応判定中央部会に被験者登録用紙を提出することで行われる。なお、本臨床研究に関する情報を共有することを目的として、安全・効果評価・適応判定中央部会への被験者登録用紙提出と同時に、本臨床研究参加医療機関の総括責任者に対して被験者情報の提供を行う。

安全・効果評価・適応判定中央部会は提出された被験者登録用紙をもとに、各被験者が全ての選択基準を満たし、除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、本臨床研究の対象被験者として適切かどうかを判定する。得られた判定結果については遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。

2) 用量増加における評価

コホート毎に規定された症例数を満了した場合、安全・効果評価・適応判定中央部会はコホート毎の各被験者から得られた、臨床研究終了・中止時検査までのデータをもとにコホート毎の安全性を判定する。安全性に問題がないと判定された場合、全ての医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告したうえで、次のコホートに移行する。

3) 重篤な有害事象発現時の対応

安全・効果評価・適応判定中央部会は、総括責任者より提出された重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）をもとに、本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。なお、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会からの判定結果をもとに臨床研究の継続に関する審査を行い、医療機関の長及び総括責任者へ審査結果を報告する。

4) 臨床研究の総合判定

臨床研究終了後、安全・効果評価・適応判定中央部会は全ての被験者から得られたデータをもとに本臨床研究の安全性並びに効果について総合的に判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会及び総括責任者へ報告する。

IX. 1. 1. 3 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会

遺伝子製剤検証部会は、本臨床研究に用いる遺伝子導入細胞製剤の検証及びその品質の評価を行い、その結果を各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出する。

IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順

本臨床研究の治療計画は以下の図 15 のとおりである。

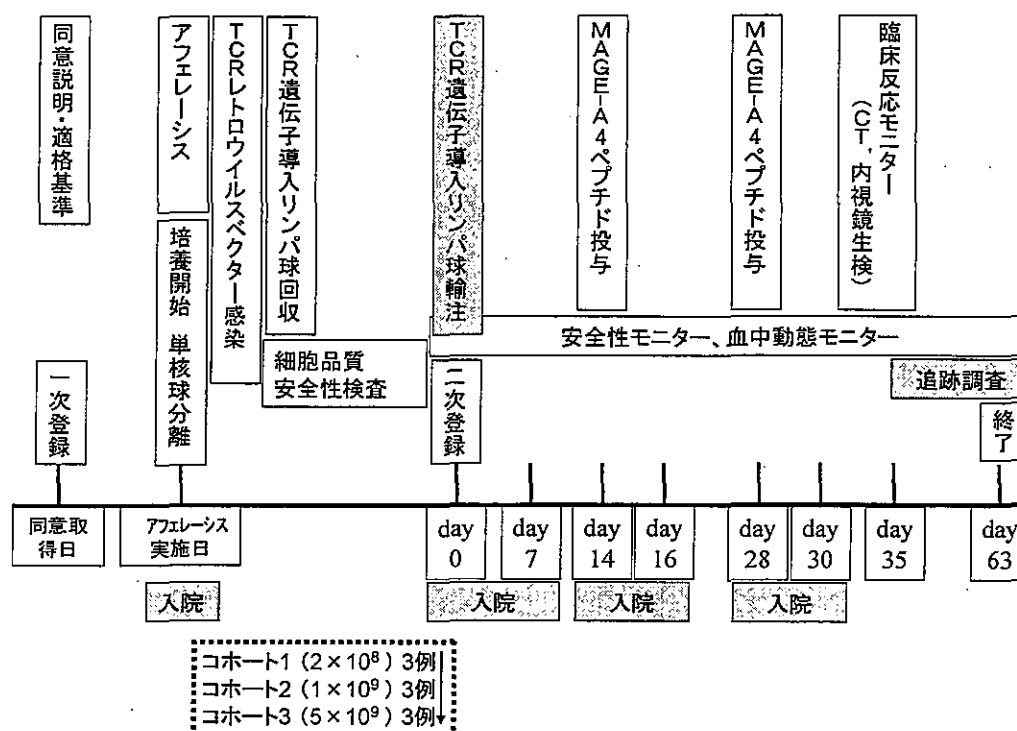


図 15 TCR 遺伝子導入リンパ球調製及び輸注計画

治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。

大阪大学医学部附属病院においてアフェレーシスにて自己 PBL を採取し、三重大学細胞調製施設に搬送する。三重大学細胞調製施設で自己 PBL に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを認識する TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られた TCR 遺伝子導入リンパ球を ex vivo 培養し、一旦凍結保存する。

三重大学細胞調製施設にて調製した TCR 遺伝子導入リンパ球の品質が確認された後、大阪大学医学部附属病院に TCR 遺伝子導入リンパ球が提供される。二次登録の前に再度文書にて同意を取得し、二次登録時の選択基準を満たし、除外基準に抵触しないことを確認したうえで本臨床研究への二次登録を行う。

TCR 遺伝子導入リンパ球（単回投与）を経静脈的に投与する。

1 日投与量 $300 \mu\text{g}$ の MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの懸濁液を、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、皮下投与する。

追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性（有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR）、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を評価する。

TCR 遺伝子導入リンパ球投与後 63 日目に本臨床研究を終了とする。

TCR 遺伝子導入リンパ球数の設定

投与する TCR 遺伝子導入リンパ球数は 1 回投与量 2×10^8 個、 1×10^9 個、 5×10^9 個の各コホート別とする。各コホートは 3 例とし、1 回投与量を 1×10^9 個、 5×10^9 個へと増加させる。

腫瘍浸潤リンパ球や T 細胞クローンを体外で増殖後に投与する自家培養リンパ球輸注が米国を中心に行われ、 $3 \times 10^9 \sim 4 \times 10^{11}$ 個のリンパ球が投与され細胞輸注に起因する重篤な有害事象の報告はない(9, 75)。また、TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する類似研究 (NIH、米国) では、17 例において 1×10^9 以上 ($1 \times 10^9 \sim 8.6 \times 10^{10}$; 中央値 7×10^9) のリンパ球が 1 回に静脈内投与され、投与リンパ球に起因する重篤な有害事象の報告はない (添付資料、62 ページ)。本計画では安全性を評価するために、その投与数より少ない 2×10^8 個のリンパ球数を初期投与数と設定した。また、臨床試験のプロトコールに従うと、体外にて遺伝子導入細胞調製時に培養増殖される細胞数が 1×10^{10} 程度と予想されるため、調製し投与可能な最大リンパ球数を 5×10^9 個と設定した。

投与量増加基準は、以下のとおりとする (有害事象のグレードについては「IX. 5. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準」参照)。

- 1) 3 例のうち 1 例も「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現しなかった場合、次のコホートに 3 例が登録される。
- 2) 3 例のうち 1 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、同じコホートに 3 例が登録される。
- 3) 3 例のうち 2 例又は 3 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加はそこで中止される。
- 4) 上記 2) に従った後、6 例のうち 1 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加は続けられる。
- 5) 上記 2) に従った後、6 例のうち 2 例以上に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加はそこで中止される。

IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準

IX. 2. 1 一次登録

患者より文書にて同意を取得する。一次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、登録を行う。

IX. 2. 1. 1 選択基準（一次登録）

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者
- 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM 分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者
- 3) HLA-A2402 陽性の患者
- 4) PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認* されている患者
- 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 6) ECOG Performance Status 0～1 の患者
- 7) 本臨床研究参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の患者
- 8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経過が見込める患者
- 9) 同意取得後 4 ヶ月以上の生命予後が見込める患者
- 10) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラス I 分子発現が確認されている患者
- 12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

*: 試験方法は参考資料 17 「MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール」参照。MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、定量的 RT-PCR 法により GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

IX. 2. 1. 2 除外基準（一次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症

- ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向（プロトロンビン時間（PT）＜50%、活性化トロンボプラスチン時間（APTT）＞60 sec、フィブリノゲン（Fbg）＜100 mg/dL、フィブリン分解産物（FDP）＞20 μ g/mL）
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
 - 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体のいずれかが陽性である患者
 - 4) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
 - 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
 - 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
 - 7) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者（例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者）
 - 8) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
 - 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は精子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
 - 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している患者
 - 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者

IX.2.2 二次登録

一次登録した患者における TCR 遺伝子導入リンパ球の調製が終了した後、再度患者より文書にて同意を取得する。二次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、登録を行う。

IX.2.2.1 選択基準（二次登録）

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量（ 2×10^8 個）の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要な測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0～1 の患者
- 4) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$

- ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 5) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

IX.2.2.2 除外基準 (二次登録)

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 (プロトロンビン時間 (PT) $< 50\%$ 、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) $> 60 \text{ sec}$ 、フィブリノゲン (Fbg) $< 100 \text{ mg/dL}$ 、フィブリン分解産物 (FDP) $> 20 \mu\text{g/mL}$)
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 4) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 6) $\text{MAGE-A4}_{143-151}$ ペプチド投与に適さない患者 (例えば $\text{MAGE-A4}_{143-151}$ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)
- 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者

IX.3 被験者の同意の取得方法

本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、大阪大学医学部附属病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書 (X.7) を説明の前又は説明するときに渡し、以下の内容を口頭で詳しく

説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計2回行う）。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。

1. はじめに
2. 臨床研究について
3. あなたの食道癌について
4. 遺伝子治療臨床研究の概要について
5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について
6. 臨床研究の方法
7. 参加できる方、参加できない方
8. 臨床研究のスケジュール
9. 期待される効果
10. 予想される危険性および副作用
11. 臨床研究への参加予定期間
12. 臨床研究への参加患者数
13. 他の治療法について
14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて
15. 健康被害の補償について
16. 新たな情報のお知らせについて
17. 遺伝子治療臨床研究の中止について
18. あなたに守っていただきたいこと
19. あなたの費用負担について
20. 個人情報の保護について
21. 個人情報の第三者への提供の制限について
22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

IX. 4 実施期間及び目標症例数

実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点（2009年7月17日）から3年間とする。症例毎の実施期間はTCR遺伝子導入リンパ球輸注後63日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間（FDAのガイドライン(76)に従い、最短15年間）にわたり、1年に1回の頻度で遺伝子導入Tリンパ球の血中動態及び二次発癌やRCRの有無について追跡調査を実施する。

目標症例数は以下のとおり、全施設の症例を合わせて9例とするが、有害事象が発現した場合には、「IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順」の投与量増加基準に従って、安全性の評価を強化する。

1回当たりのTCR遺伝子導入リンパ球輸注量

コホート1	2×10^8 個	3 例
コホート2	1×10^9 個	3 例
コホート3	5×10^9 個	3 例

また、TCR遺伝子導入リンパ球の増殖率は培養ごとに予測することができないため、症例の取り扱いを以下のとおりとする。

- ・コホート1で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ 2×10^8 個）を本臨床研究における最小輸注量とする。最小輸注量に満たない場合にはTCR遺伝子導入リンパ球を投与せず、本臨床研究における脱落例とする。
- ・コホート2で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ 1×10^9 個）が得られなかった場合にはその被験者に輸注可能な全てのTCR遺伝子導入リンパ球を投与する。投与したTCR遺伝子導入リンパ球輸注量が 0.8×10^9 個以上の場合、コホート2の症例数として数えるが、それ未満の場合は投与量増加の評価例としない。
- ・コホート3で定められたTCR遺伝子導入リンパ球輸注量（ 5×10^9 個）が得られなかった場合にはその被験者に輸注可能な全てのTCR遺伝子導入リンパ球を投与する。投与したTCR遺伝子導入リンパ球輸注量が 4×10^9 個以上の場合、コホート3の症例数として数えるが、それ未満の場合は投与量増加の評価例としない。
- ・コホート2及び3の投与量増加のための評価対象としない症例における臨床観察項目データは、当臨床研究の安全性評価解析対象とする。
- ・投与量増加の評価対象としない症例数は、コホート2、3において最大3例までとし、その症例をもって当該コホートへの登録を終了し、本臨床研究におけるTCR遺伝子導入リンパ球の臨床至適用量を決定する。

IX. 5 遺伝子治療臨床研究の実施方法

IX. 5. 1 対照群の設定方法

本臨床研究では対照群を設定しない。

IX. 5. 2 遺伝子導入方法

IX. 5. 2. 1 PBMC の採取

大阪大学医学部附属病院輸血部において採取機種 COBE SPECTRA (GAMBRO BCT 社) を用いて、被験者より PBMC、及び T リンパ球培養に必要な血漿を採取する。被験者からの PBMC 採取条件及び被験者のアフエレーシス実施条件は以下のとおりとする。なお、アフエレーシスは日本造血細胞移植学会のガイドラインに準じて、手技に習熟した医師が被験者の状態を十分に観察しながら実施する。

被験者からの PBMC 採取条件

- ・血液処理量：約 5,000 mL (最大で 150 mL/kg)
- ・処理速度：0.8～1.5 mL/kg/min
- ・処理時間：通常 90 分以内 (最大 120 分まで)

被験者のアフエレーシス実施条件

- ・採取当日の身体的、精神的状態が良好であること
- ・採取当日に 37.0℃を超える発熱を有しないこと
- ・採取当日の収縮期血圧が 90 mmHg 以下又は 180 mmHg 以上でないこと
- ・その他、アフエレーシス実施医師が不可能と判断した場合は実施を延期する。

IX. 5. 2. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球の調製

採取された PBMC 画分を別途手順書 (参考資料 18) に定められた条件で三重大学細胞調製施設へ搬送する。そして、三重大学細胞調製施設にて「VII. 3. 1 遺伝子導入リンパ球の調製方法」に従い、細胞調製が行われる。細胞調製後、「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に示した各種試験により、TCR 遺伝子導入リンパ球としての品質を確認したうえで別途手順書 (参考資料 18) に定められた条件で大阪大学医学部附属病院に搬送され、投与に用いられる。また、輸注用細胞と同時に搬送した凍結保存バイアルを用い実施施設にて凍結保存細胞の生存率を測定する。

IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入リンパ球の投与

各コホートにて設定された細胞数の TCR 遺伝子導入リンパ球 (単回投与) を静脈内投与する。凍結保存されたリンパ球浮遊液を含むバッグを 37℃恒温槽内で解凍、被験者静脈内へ投与し、投与直後より問診とバイタルサインを取りながら十分な観察を行い、有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用」に従い、適

切な処置を施す。

IX. 5. 3 前処置及び併用療法の有無

IX. 5. 3. 1 前処置

前処置は特に必要としない。

IX. 5. 3. 2 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与

1 回量 300 μ g の MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、不完全フロイントアジュバント (商品名: MONTANIDE™ ISA 51、SEPPIC 社) との懸濁液として皮下投与する。有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

IX. 5. 3. 3 併用禁止療法及び併用禁止薬

以下の療法及び薬剤については、遺伝子を導入するための T リンパ球を採取する日より前 4 週間以内及び、二次登録 4 週間前から臨床研究終了時までの間、使用・実施を禁止する。

併用禁止療法

- 1) 化学療法
- 2) 放射線療法
- 3) 手術

併用禁止薬

- 1) 抗癌剤
- 2) 副腎皮質ステロイド剤 (全身投与)
- 3) 免疫抑制剤 (全身投与)

IX. 5. 4 臨床検査項目及び観察項目

以下のとおり検査・観察を実施する。検査・観察スケジュールについては「X. 3 検査・観察スケジュール」に記載する。なお、TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態、免疫機能解析 (腫瘍特異的免疫反応)、遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、RCR および LAM-PCR については、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にて検査を行うものとし、当該検査のうち、PCR 法の工程はタカラバイオ (株) が担当する。

同意取得日 (スクリーニング期間)

- 1) 同意取得 (一次登録)
- 2) 被験者背景

- ・性別、生年月日（年齢）、診断名、身長、体重、既往歴、合併症、過敏症の有無、前治療、併用療法・併用薬、妊娠の有無、HLA 型、MAGE-A4 発現の有無（PCR）、他の臨床試験（臨床研究）への参加の有無

3) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数、動脈血酸素分圧または動脈血酸素飽和度

4) Performance status

5) 感染症検査

- ・HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体

6) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
- ・血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
- ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
- ・尿検査：尿定性、尿沈査
- ・腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9)

7) 画像診断

- ・胸部 X 線検査、12 誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT※

8) 上部消化管内視鏡検査※

※：スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。

アフエレーシス実施日（スクリーニング期間）

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数

2) Performance status

3) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値

day 0 (治療期間)

- 1) 同意取得 (二次登録)
- 2) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数、動脈血酸素分圧または動脈血酸素飽和度
- 3) Performance status
- 4) 臨床検査
 - ・ 血液学的検査^{※1)}: 白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・ 血液生化学的検査^{※1)}: AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・ 血液凝固能検査^{※1)}: プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
 - ・ 免疫血清^{※1)}: C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・ 尿検査^{※1)}: 尿定性、尿沈査
 - ・ 腫瘍マーカー検査^{※1)} (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)
- 5) 画像診断
 - ・ 胸部 X 線検査^{※1)}、12 誘導心電図^{※1)}、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT^{※2)}、PET-CT^{※2)}
- 6) 上部消化管内視鏡検査^{※2)}、腫瘍組織生検^{※2)}
- 7) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (投与前^{※1)}、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (±2 時間) 後及び 12 時間 (±2 時間) 後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 8) 免疫機能解析^{※1)}
 - ・ テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 9) TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度^{※2)}、MAGE-A4 抗原発現検査^{※2)}
 - ・ 浸潤リンパ球の検出
 - ・ PCR 法による MAGE-A4 発現
- 10) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
 - ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

※1): 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。

※2): 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。

day 1 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
 - ・ 血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・ 血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・ 免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・ 尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 24 時間(±4 時間)後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
 - ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係
- 6) RCR

day 2 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 48 時間(±4 時間)後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)
 - ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入リンパ球投与 72 時間(±4 時間)後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象 (臨床検査値の異常変動含む)

- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 7（治療期間）

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
 - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
 - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 14 $\pm$ 3（治療期間）

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
 - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 免疫機能解析
 - ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 6) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
 - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 16±3（治療期間）

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
 - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 28±3（治療期間）

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
 - ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、γ-GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・尿検査：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 免疫機能解析
 - ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 6) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
 - ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、

転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 30±3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
 - ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 35±3 (治療期間)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・ 血圧、体温、脈拍数
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査
 - ・ 血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
 - ・ 血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、 γ -GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
 - ・ 血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
 - ・ 免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
 - ・ 尿検査：尿定性、尿沈査
 - ・ 腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)
- 4) 画像診断
 - ・ 胸部 X 線検査、12 誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT、PET-CT
- 5) 上部消化管内視鏡検査、腫瘍組織生検
- 6) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 7) 免疫機能解析
 - ・ テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 8) TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度、MAGE-A4 抗原発現検査

- ・浸潤リンパ球の検出
- ・PCR 法による MAGE-A4 発現

9) RCR

10) LAM-PCR

11) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）

- ・内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

day 63±3（追跡調査期間）

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数

2) Performance status

3) 臨床検査

- ・血液学的検査：白血球数、白血球分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数
- ・血液生化学的検査：AST (GOT)、ALT (GPT)、ALP、LDH、ロイシンアミノペプチターゼ (LAP)、γ-GTP、総ビリルビン (T-Bil)、直接ビリルビン (D-Bil)、総蛋白 (TP)、アルブミン (Alb)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (Cr)、尿酸 (UA)、Na、K、Cl、Ca、血糖値
- ・血液凝固能検査：プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン (Fgb)、フィブリン分解産物 (FDP)
- ・免疫血清：C 反応性蛋白 (CRP)
- ・尿検査：尿定性、尿沈査
- ・腫瘍マーカー検査 (SCC、CEA、CA19-9。ただし、スクリーニング期間時高値例のみ)

4) 画像診断^{※1)}

- ・胸部 X 線検査、12 誘導心電図、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT、PET-CT

5) 上部消化管内視鏡検査^{※1)}、腫瘍組織生検^{※1)}

6) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

7) 免疫機能解析

- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色

8) TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織浸潤度^{※1)}、MAGE-A4 抗原発現検査^{※1)}

- ・浸潤リンパ球の検出
- ・PCR 法による MAGE-A4 発現

9) RCR

10) LAM-PCR

11) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）

- ・ 内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係

※1)：必要に応じて実施する。

研究終了後の追跡調査

- 1) RCR※1)
- 2) LAM-PCR※1)
- 3) TCR 遺伝子導入リンパ球血中動態※1)

※1)：生存期間（FDA のガイドライン(76)に従い、最短 15 年間）にわたり、1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施する。

IX. 5. 5 予測される副作用及びその対処方法

IX. 5. 5. 1 アフェレーシスに伴う副作用

1) 血管ルート確保に關すること

両側前肘部に十分な太さの血管がなく、鎖骨下静脈又は鼠径静脈に穿刺する場合、まれに出血、感染、気胸の合併の危険がある。穿刺皮膚部位を十分に消毒し、手技に習熟した医師が行う。また、常に救急カート等の設備を整え、出血、気胸の対処に備える。

2) 迷走神経反射

精神的緊張、不安、体調不良等の原因により血管迷走神経反射が起こり、約 10%のドナーでめまい、吐き気、嘔吐（グレード 1）が出現し、重篤な場合、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈（グレード 2）、さらに高度では痙攣、失禁（グレード 3）がみられることもある。対処法は、グレード 1 の副作用が出現した場合、採取を一時休止して頭位を下げ、生理食塩水の点滴を行い、経過観察する。症状が容易に改善した場合は、厳重な観察の下、採取速度を低下させて採取を再開する。再度、症状が出現した場合は採取を中止とする。グレード 2 以上の副作用が出現した場合は、直ちに採取を中止し、補液、昇圧剤、硫酸アトロピン投与等、必要な処置を行う。

3) クエン酸反応

抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがある。軽症では口唇、手指のしびれ感が出現する。また、進行により症状が悪化する他、手指の突っ張り感が出現する。対処法は、軽症の症状が出現した場合、採取速度を低下させて観察するが、それでも改善しない場合、グルコン酸カルシウムを緩徐に静注する。

4) 血小板減少

アフェレーシスの際に血小板も除去されるため、アフェレーシス後に血小板減少が高頻度（50%以上）にみられ、また、 $50,000/\text{mm}^3$ 未満の高度の減少も 5%前後みられており、注意を要する。対処法は、アフェレーシス終了後 1 週間位は必ず血小板をチェックし、採取

前値への回復を確認する。また、アフェレーシス開始から終了までアスピリン製剤は使用しない。

IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

1) 発熱、発疹、アレルギー類似反応等

TCR 遺伝子を導入し、一旦凍結後に解凍したリンパ球を投与した際に、解凍に伴い一部崩壊した細胞内のサイトカイン等による発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性がある。対処法は、経過観察、あるいは解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の適切な薬剤を投与する。また、グレード3 以上の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行う。

2) 肺障害

重篤な輸血副作用として輸血関連急性肺障害 (TRALI: Transfusion-Related Acute Lung Injury) が知られている。抗白血球抗体 (抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体) による抗原抗体反応が原因と推測されているが、詳細は不明である。本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、TRALI 類似病態発症の可能性は考えにくい。TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に留意すべきと考えられる。対処法として、発症時は副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行う。

3) 免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原であるMAGE-A4は、Cancer-Testis抗原 (癌精巣抗原) の一つであり、腫瘍特異性が極めて高い。精巣組織ではHLA分子の発現が欠失しているため、正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低い。自己免疫疾患様症状 (発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛等) には常に留意する必要がある。対処法は、グレード1では無処置で経過観察するが、グレード2以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

4) レトロウイルスベクターを用いる危険性

「VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性」に記載のとおり、本臨床研究においてはRCRが出現する可能性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。よって、本臨床研究では被験者体内におけるRCR出現をRT-PCR法によってモニタリングすることにより、評価を行う予定である。万が一、RCRが出現した場合には、抗ウイルス剤によるウイルス感染症治療等の最善の治療を行う。

「VII. 1. 8 癌原性の有無」に記載のとおり、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与することによる癌化の危険性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。よって、本臨床研究では遺伝子導入細胞の被験者体内におけるクローン増殖をLAM-PCRによってモニタリングすることにより、評価を行う予定である。万が一、異常増殖が認められた場合には、当該クローンの遺伝子導入位置の同定や染色体検査等を行うとともに化学療法等の最善の治療を行う。

IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用

MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは不完全フロイントアジュバント（商品名：MONTANIDE™ ISA 51、SEPPIC 社）とともに 2 回皮下投与される。CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は種々行われており、現在までに重篤な副作用の報告はない。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫脹）、微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究ではペプチド反応性 T 細胞の頻度を上昇させた状態においてペプチドを投与する。ペプチド反応性 T 細胞の活性化に伴う微熱、倦怠感等の症状、あるいは予測できない症状が出現する可能性は否定できないが、これまでの異なるペプチド等の抗原と T 細胞を用いた同様な臨床試験ではそのような機序によると考えられる副作用の出現は報告されていない。副作用発生時の対処法は、グレード 1 の場合、無処置にて経過観察とするが、グレード 2 以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

IX. 5. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準

IX. 5. 6. 1 主要評価項目

・安全性の評価

1) 有害事象

有害事象とは、遺伝子導入 T リンパ球投与以降に被験者に生じるあらゆる好ましくないあるいは意図しない症状、徴候（臨床検査値の異常も含む）又は病気のことであり、当該治療との因果関係の有無は問わない。

重篤な有害事象とは、以下のものをいう。

1. 死亡に至るもの
2. 死亡につながるおそれのあるもの
3. 治療のため入院又は入院期間の延長が必要なもの
4. 障害（永続的又は顕著な障害もしくは機能不全に陥るもの）
5. 障害につながるおそれのあるもの
6. 上記 1 から 5 に準じて重篤であるもの
7. 後世代における先天性の疾病又は異常をきたすもの

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究実施期間中に発現した有害事象について、その内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係（明らかに関連あり、多分関連あり、関連あるかもしれない、関連なし）を調査する。なお、本臨床研究との因果関係を否定できない有害事象については、原則として消失又は軽快するまで追跡調査を行う。

発現した有害事象のグレードは、2003 年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE v3.0)」有害事

象共通用語規準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2007 年 3 月 8 日」に従い、判定を行う (表 3)。
また、CTCAE v3.0 に記載のないもので、発現が予想される有害事象についても CTCAE v3.0 に準じて判定を行うものとする。

表 3 有害事象のグレード

Grade 1	軽度の有害事象
Grade 2	中等度の有害事象
Grade 3	高度の有害事象
Grade 4	生命を脅かす又は活動不能とする有害事象
Grade 5	有害事象による死亡

2) 臨床検査

総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の正常・異常について判定する (大阪大学医学部附属病院の基準範囲を逸脱した場合、「異常」と判定する)。

また、総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の異常変動の有無について判定する。異常変動「有」とは、正常値→異常値もしくは異常値→異常値の増強がみられた場合、その臨床的意義を考慮して判定する (これに該当しない場合においても、その変動の臨床的意義を考慮した結果、異常変動「有」と判断した場合も含まれる)。なお、異常変動の有無の判定について、正常値→異常値もしくは異常値の増強が見られ、かつ異常変動「無」と判断した場合には、その理由について、臨床経過を踏まえて考察を行う。

3) RCR

本臨床研究期間中の RCR の出現の有無を検討する。検体から total RNA を調製してランダムプライマーで逆転写反応を行い、GaLV のエンベロープ遺伝子領域に設定した検出用プライマーを用いて PCR を行う。PCR 生成物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行って特異的増幅バンドの有無を確認する。

4) LAM-PCR

TCR 遺伝子導入リンパ球のクローナリティーを検討する。検体から調製したゲノム DNA を鋳型として LAM-PCR 反応を行い、反応産物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色による泳動パターンによりクローナリティーを確認する。

IX.5.6.2 副次的評価項目

・ TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態

被験者から末梢血採取し、Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC について、以下の試験を行う。

1) TCR 遺伝子導入細胞の定量

分離した PBMC より QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN 社) や PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems 社) 等のキットを用いてゲノム DNA を調製する。調製したゲノム DNA をテンプレートとして、Cycleave 法を用いたベクター及び IFN- γ の定量的 PCR を行う。ベクターの定量的 PCR の結果をそれぞれ IFN- γ に対する定量的 PCR の結果で割ることによりノーマライズし、末梢血リンパ球における導入 TCR の定量化を行う。

2) テトラマー解析による TCR 発現細胞の血中頻度測定

分離した PBMC と PE 標識化 HLA-A2402/ MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ テトラマーとを 37°C、10 分～30 分間反応させ、その後、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

・ TCR 遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織への浸潤度

治療期間中、腫瘍組織又はリンパ節の生検の可能な病変を有し、侵襲的検査のリスクが少ないと判断される場合、生検を行う。

生検試料について、以下の試験を行う。

1) 腫瘍における抗原の発現の評価*

腫瘍塊の一部を採取後速やかに RNAlater (Ambion 社) を用いて保存する。保存した腫瘍塊を Trizol (Invitrogen 社) 中でホモジナイズし RNA を抽出する。抽出した RNA は RNeasy カラム (Qiagen 社) 等を用いて精製する。精製した RNA から逆転写酵素を用いて cDNA を作製する。作製した cDNA をテンプレートとして MAGE-A4 の発現を定量的 PCR にて定量する。MAGE-A4 の発現はハウスキーピング遺伝子 GAPDH 発現でノーマライズし、GAPDH 発現 10,000 コピー当たりの MAGE-A4 発現コピー数により評価する。MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

*:試験方法は参考資料 17 「MAGE-A4 抗原発現検査プロトコル」 参照。

2) 生検組織内へのリンパ球浸潤度の評価

腫瘍塊の一部をホルマリン固定し、パラフィン組織切片を作製する。作製したパラフィン組織切片と抗ヒト CD3 抗体及び抗ヒト CD8 抗体を用いて、生検組織内へのリンパ球の浸潤を評価する。

また、腫瘍塊の一部からゲノム DNA を調製し、TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態の解析における「TCR 遺伝子導入細胞の定量」で用いた手法と同様の手法により、生検組織内のリンパ球中の導入 TCR の定量化を行う。

・ 腫瘍特異的免疫反応

被験者から末梢血を採取し、Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC について、以下の試験を行う。

1) ELISPOT アッセイによる MAGE-A4 反応性 T リンパ球の定量

分離した PBMC を MACS ビーズ (Miltenyi 社) を用いて、CD8 陽性細胞と CD8 非陽性細胞に分離する。CD8 非陽性細胞を 40 Gray にて放射線照射し、MAGE-A4 ペプチドをパルスし刺激用細胞とする。CD8 陽性細胞と作製した刺激用細胞を IL-2 (20 IU/ml) と IL-7 (40 ng/ml) 存在下に 37°C で 7 日から 10 日間培養する。その後、被験者由来 PBMC に EB ウイルスを感染させて樹立した B 細胞株 (EBV 細胞株) 又は被験者由来 PBMC を Con-A を用いて刺激し樹立した活性化 T 細胞株 (T-APC) に MAGE-A4 ペプチドをパルスした細胞を標的細胞とし ELISPOT アッセイを行う。ELISPOT アッセイは抗 IFN- γ 抗体をコーティングした ELISPOT プレート (Millipore 社) に培養 CD8 陽性細胞と標的細胞を入れ、1 日間培養し、細胞を洗浄後 2 次抗体 (ビオチン化抗 IFN- γ 抗体) とアルカリホスファターゼ標識化ストレプトアビジンを反応後、基質を加え発色させ、CD8 陽性 T 細胞から産生された IFN- γ をスポットとして可視化し、MAGE-A4 特異的 T 細胞の存在を確認する。陰性コントロールとして、ペプチド非パルス標的細胞およびコントロールペプチド (HER2 由来 HLA-A2402 結合性ペプチド HER2₆₃₋₇₁:TYLPTNASL) パルス標的細胞を用いる。

2) テトラマーによる MAGE-A4 反応性 T リンパ球の定量

分離した PBMC をそのまま、又は上記 ELISPOT アッセイと同様に MAGE-A4 ペプチドにより 7 日から 10 日間刺激培養した CD8 陽性 T 細胞を用いて、PE 標識化 HLA-A2402/ MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ テトラマーと 37°C、10~30 分間反応させ、その後、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

3) 細胞内サイトカイン染色による MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性の解析

採取 PBMC 量が十分である場合は、上記テトラマー解析の際に細胞内サイトカイン染色を加えることにより MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性の解析を行う。PBMC をそのまま、又は刺激培養した CD8 陽性 T 細胞を、ELISPOT アッセイに使用する標的細胞と同様の手法により調製した標的細胞と GolgiStop (BD Bioscience 社) の存在下で数時間培養し、Cytofix/Cytoperm (BD Bioscience 社) を用いて固定・穿孔化後に、抗サイトカイン抗体を用いて細胞内サイトカイン染色を行い、サイトカインの産生特性を解析する。

・腫瘍縮小効果

「RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)」(77)にしたがって、腫瘍縮小効果を判定する (X.6)。

IX. 5. 6. 3 中止基準

・被験者ごとの中止基準

本臨床研究期間中に以下のような事例が発生した場合、総括責任者又は分担研究者は当該被験者における本臨床研究を中止する。また、必要な検査・観察を行うとともに、共同

実施医療機関の総括責任者、及び大阪大学医学部附属病院長に本臨床研究を中止した旨を連絡する。なお、有害事象の発現や対象疾患の悪化等、安全性に問題が生じ中止した場合、総括責任者又は分担研究者は速やかに適切な処置を行い、被験者の安全性が確認されるまで追跡調査を実施する。

- 1) 被験者が同意を撤回した場合
- 2) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 3) 本臨床研究継続困難な有害事象が発現した場合
- 4) 本臨床研究継続困難な対象疾患の悪化が生じた場合
- 5) その他、総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

・研究全体の中止

総括責任者又は分担研究者は以下の情報が得られ、臨床研究全体の続行が困難であると考えられる場合、安全・効果評価・適応判定中央部会に本臨床研究全体の中止について審査を依頼する。審査の結果、中止が決定した場合には、大阪大学医学部附属病院長及び共同実施医療機関の総括責任者に中止した旨を報告する。研究担当者は被験者に対し、可能な限り必要な検査・観察を行う。

- 1) 本臨床研究との因果関係を否定できない重篤な有害事象が発生した場合
- 2) 総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の継続が不適切であると判断する情報を入手した場合

IX. 5. 7 有害事象が発現した場合の措置

IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合

総括責任者又は分担研究者は、有害事象に対する医療が必要になったことを知った場合、被験者にその旨を伝える。また、総括責任者又は分担研究者は、有害事象の発現に際して適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

IX. 5. 7. 2 重篤な有害事象が発現した場合

総括責任者又は分担研究者は重篤な有害事象の発生を察知した場合は、「IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合」の対応を行う。また、総括責任者は、本臨床研究薬との因果関係の有無に係わらず、重篤な有害事象の発現を察知した時点から 72 時間以内に大阪大学医学部附属病院長及び本臨床研究を実施している全ての総括責任者へ「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」をもって報告を行う。なお、大阪大学医学部附属病院長への報告については分担研究者が行うことも可能とする。

総括責任者は、重篤な有害事象の発現を察知した時点から 7 日以内に大阪大学医学部附属

病院長、本臨床研究を実施している全ての総括責任者及び安全・効果評価・適応判定中央部会へ「重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）」をもって報告を行う。

なお、大阪大学医学部附属病院長は、被験者が死亡もしくは因果関係の否定できない重篤な有害事象（因果関係：「関連なし」以外）に関する報告を受けた場合には、速やかにその概況及び対処の方針を第一報として厚生労働省大臣官房厚生科学課に報告し、15 日以内を目安に文書をにて厚生労働大臣に報告する。

表 4 有害事象報告の必要性の有無について

	重篤な有害事象			非重篤な有害事象
	死亡 (因果関係問わず)	因果関係		
		否定 できない	なし	
厚生科学課及び大臣への報告	必要	必要	不要	不要
安全・効果評価・適応判定部会 医療機関の長への報告	必要	必要	必要	不要

IX. 5. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究専用の症例報告書を作成する。症例報告書に記載されたデータのうち、総括責任者又は分担研究者のコメント及び有害事象の重篤性、本臨床研究との因果関係等、判定に関する事項については症例報告書の記載をもって原データとする。

IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は大阪大学医学部附属病院長が指名した保管責任者が行う。保管責任者は適切な状態の下で、本臨床研究終了後少なくとも5年間保存するものとする。

成績の公表は、被験者の同意のもと、研究者全員の合意を得て行う。公表の際には、被験者のプライバシーに十分配慮し、個人情報 that 特定できないよう必要な措置を講じる。

IX. 5. 10 個人情報の保護の徹底

IX. 5. 10. 1 個人情報保護に関する責務

大阪大学における個人情報の取扱いに関しては、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律（平成 15 年 5 月 30 日法律第 59 号）その他関係法令に定めるものの他、国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程（平成 17 年 4 月 1 日施行）に必要な事項を定めている。

大阪大学における保有個人情報の管理に関する事務を総括するものとして理事（総務・企画・評価担当）を総括保護管理者に置き、総括保護管理者の下に保護管理者、保護担当者を置くことにより、個人情報保護管理の徹底を行っている。

大阪大学医学部附属病院においては、大阪大学医学部附属病院長が総括保護管理者から保護管理者として指名を受けており、大阪大学医学部附属病院長は国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程（平成17年4月1日施行）に従い、組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である大阪大学医学部附属病院長はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置を講ずることができる。

IX. 5. 10. 2 個人情報の取得と利用に関する制限

1) 診療・教育機関としての大阪大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱い

大阪大学医学部附属病院は診療・教育機関として、良質な医療を提供すると共に、医療人の育成と医療の発展に貢献するという社会的使命の実現に向けて、一般的な診療行為・教育に関する以下に挙げる目的に限り、患者の個人情報を使用する。この使用に関しては、個人情報の保護の法律に基づいた国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程、研究活動の実施に関する法令や倫理指針等を遵守したうえで取り扱われる。また、大阪大学医学部附属病院を受診する患者には、大阪大学医学部附属病院で使用する個人情報の目的についての理解と協力を求めている。

(1) 大阪大学医学部附属病院での利用

- ・患者に提供する医療サービス
- ・医療保険事務
- ・患者に関係する管理運営業務（入退院等の病棟管理、会計・経理、医療事故の報告、医療サービスの向上）
- ・医療サービスや業務の維持・改善のための基礎資料

(2) 大阪大学医学部附属病院及び大阪大学での利用

- ・医学系教育
- ・症例に基づく研究
- ・外部監査機関への情報提供（本利用に当たっては、可能な限り匿名化する）

(3) 他の事業者等への情報提供

- ・他の病院、診療所、助産所、薬局、訪問看護ステーション、介護サービス事業者等との医療サービス等に関しての連携
- ・他の医療機関等からの医療サービス等に関しての照会への回答
- ・患者の診療等にあたり外部の医師等の意見・助言を求める場合
- ・検体検査業務の委託その他の業務委託
- ・家族等への病状説明

- ・医療保険事務（保険事務の委託、審査支払機関へのレセプトの提出）
- ・審査支払機関又は保険者からの照会への回答
- ・関係法令等に基づく行政機関及び司法機関等への提出等
- ・関係法令に基づいて事業者等からの委託を受けて健康診断を行った場合における、事業者等へのその結果通知
- ・医師賠償責任保険等に係る医療に関する専門の団体、保険会社等への相談又は届出等

2) その他本臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取扱い

上記の診療・教育機関として的大阪大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱いに加え、本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取扱いについては、総括責任者はあらかじめ被験者の個人情報の利用目的を公表している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者に通知し、又は公表しなければならない。

本臨床研究で扱う被験者の診療録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡等、被験者の生命を守るために使用する。その他、特別な目的で使用する場合は、事前に被験者に説明し、了承を得てから使用する。

また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のため等を目的に本臨床研究成績等を公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者への同意・説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護及び使用目的について通知し、同意を得る計画とした。

被験者の同意取得は、自由意思によるものであり、本臨床研究に参加しない場合であっても被験者の不利益はない。このことは医学研究を行ううえで大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意・説明文書に記載し、被験者へ通知する。

総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲内において、個人情報を正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

IX. 5. 10. 3 個人情報保護に関する安全管理措置

大阪大学医学部附属病院長は国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程及び大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い、個人情報保護に関して、組織的、人的、物理的及び技術的に安全管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失又は棄損の防止に対する措置を講じている。一方で個人情報の漏洩等に係わる新しい犯罪手法等が急速な勢いで多様化していることを鑑み、本臨床研究では規程等の柔軟な運用をもって、個別に適切な対応を行う。

さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報が死者の人としての尊厳や遺族の感情及び遺伝情報が血縁者と共通していることに鑑み、生存する個人に関する情報と同様に死者に関する個人情報についても同様の措置を講じている。

IX.5.10.4 第三者提供の制限

総括責任者は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者の同意を得ずに個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、タカラバイオ（株）が外部協力者として「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、遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技術提供」に限定し、間接的に関与する。したがって、タカラバイオ（株）の担当者が研究協力のために一部データを閲覧する予定であるが、治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。なお、被験者識別コードから被験者を特定する情報については、総括責任者が厳重に管理するものとする。また、事前にその旨を被験者に通知し、文書にて同意を取得する（一部データとは、ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球の調製に限定されたものであり、本臨床研究のデータの客観的かつ公正な記録はその意向に影響を受けることはない）。その他第三者への個人情報の提供は予定していないが、第三者への個人情報の提供を行う場合には、適切な目的であることを確認し、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九に従い、その旨を被験者へ通知する。

IX.5.10.5 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知り得る状態にしなければならない。

- 1) 臨床研究実施機関の名称
- 2) 個人情報の利用目的
- 3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き
- 4) 苦情の申し出先

本臨床研究においては、1)、2)、4)について同意・説明文書に明記した。また、3)については、それらの手続きができることを同意・説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い、被験者に説明する。

総括責任者は被験者から当該被験者が識別される保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について、大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行う他、対応結果について被験者に通知しなければならない。

さらに、大阪大学医学部附属病院では個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応できる体制を整えている。

【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

大阪大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

個人情報に関する内容と開示請求について：総務課広報評価係（TEL：06-6879-5020）

診療記録開示の手続き：医療課医事係（TEL：06-6879-5206）

X. その他必要な事項

X.1 遵守する法令/省令等

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

1. 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第二号、平成 16 年 12 月 28 日、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)
2. 「臨床研究に関する倫理指針」
(厚生労働省告示第四百十五号、平成 20 年 7 月 31 日)
3. 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」
(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月 19 日)
4. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」
(薬発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)
5. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」
(医薬発第 329004 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成 14 年 3 月 29 日)
6. 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」
(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)

X.2 引用文献

1. がん研究振興財団. がんの統計 2009 年版
2. 横山 顕. 12-12 食道がん、頭頸部がんのリスクとアルコール代謝酵素の関連に関する研究 (厚生労働省がん研究助成金研究)
3. The Japan Society for Esophageal Disease. Comprehensive Registry of Esophageal Cancer in Japan (1998,1999) and long-term results of esophagectomy in Japan (1988-1997) 3rd Edition, 2002.
4. 日本食道疾患研究会. 食道癌治療ガイドライン 2007 年 4 月版
5. Haier J, Owzcareck M, Guller U, et al. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 26:2281-2287, 2006.
6. Akcakanat A, Kanda T, Tanabe T, et al. Heterogeneous expression of GAGE, NY-ESO-1, MAGE-A and SSX proteins in esophageal cancer: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 118:123-128, 2006.
7. Friess H, Fukuda A, Tang WH, et al. Concomitant analysis of the epidermal growth factor receptor family in esophageal cancer: overexpression of epidermal growth factor receptor mRNA but not of c-erbB-2 and c-erbB-3. *World J Surg* 23:1010-1018, 1999.
8. Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 30:1-17, 2004.
9. Yee C, Thompson JA, Byrd D, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:16168-16173, 2002.
10. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854, 2002.
11. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23:2346-2357, 2005.
12. Mackensen A, Meidenbauer N, Vogl S, et al. Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 24(31):5060-5069, 2006.
13. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129, 2006.

14. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114(3):535-546, 2009.
15. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 115(6):1616-1626, 2005.
16. Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5):383-393, 2006.
17. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 198(4):569-580, 2003.
18. Lou Y, Wang G, Lizée G, et al. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res* 64(18):6783-6790, 2004.
19. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591-2601, 2005.
20. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 202(7):907-912, 2005.
21. Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, et al. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J Clin Invest* 117(2):492-501, 2007.
22. Powell DJ Jr, Dudley ME, Hogan KA, et al. Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177(9):6527-6539, 2006.
23. Noguchi Y, Chen YT and Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(8):3171-3175, 1994.
24. Nava-Parada P, Forni G, Knutson KL, et al. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. *Cancer Res* 67(3):1326-1334, 2007.
25. Boon T and Old LJ. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9(5):681-683, 1997.
26. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, et al. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208, 2006.
27. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic

- evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4(3):321-327, 1998.
28. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835):380-384, 2001.
 29. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188:22-32, 2002.
 30. Simon RM, Steinberg SM, Hamilton M, et al. Clinical trial designs for the early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J Clin Oncol* 19(6):1848-1854, 2001.
 31. Weber JS, Hua FL, Spears L, et al. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother* 22(5):431-440, 1999.
 32. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, et al. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am.* 3(1):37-44, 1997.
 33. Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, et al. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* 56(20):4749-4757, 1996.
 34. Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, et al. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5(10):2756-2765, 1999.
 35. Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31):12837-12842, 2007.
 36. Miyahara Y, Naota H, Wang L, et al. Determination of cellularly processed HLA-A2402-restricted novel CTL epitopes derived from two cancer germ line genes, MAGE-A4 and SAGE. *Clin Cancer Res* 11(15):5581-5589, 2005.
 37. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480, 1995.
 38. Onodera M, Ariga T, Kawamura N, et al. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91:30-36, 1998.
 39. Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, et al. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med* 2:216-23, 1996.

40. Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2:551-555, 1996.
41. Dunbar C, Kohn D. Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 7:231-253, 1996.
42. Toneguzzo F, Hayday AC, Keating A. Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6:703-706, 1986.
43. Ohtani K, Nakamura M, Saito S, et al. Electroporation: application to human lymphoid cell lines for stable introduction of a transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I. *Nucleic Acids Res* 17:1589-1604, 1989.
44. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, et al. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* 73:6141-6146, 1999.
45. Hanazono Y, Brown KE, Dunbar CE. Primary T Lymphocytes as Targets for Gene Therapy. *J Hematother Stem Cell Res* 9:611-622, 2000.
46. Miller AD, Garcia JV, von Suhr, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65:2220-2224, 1991.
47. 渡辺 格、福見秀雄 編集. ウイルスの研究 181, 1984.
48. Weiss R, et al. RNA TUMOR VIRUSES, 901-911, 1982.
49. Kim S, Lee K, Kim MD, et al. Factors affecting the performance of different long terminal repeats in the retroviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4):1017-1022, 2006.
50. Yu SS, Kim J-M, Kim S. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000.
51. Lee J-T, Yu SS, Han E, et al. Engineering the splice acceptor for improved gene expression and viral titer in an MLV-based retroviral vector. *Gene Therapy* 11:94-99, 2004.
52. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6:2895-2902, 1986.
53. 早川堯夫、山崎修道、延原正弘 編集. バイオ医薬品の品質・安全性評価 第2部、第1章、第1節 レトロウイルスベクター, 351-363.
54. Chong H, Vile RG. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Therapy* 3:624-629, 1996.

55. Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, et al. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68:8001-8007, 1994.
56. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419, 2003.
57. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
58. Commentary from the Board of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) Fourth case of leukaemia in the first SCID-X1 gene therapy trial, and the diversity of gene therapy.
59. Recommendations of the Gene Therapy Advisory Committee/Committee on Safety of Medicines Working Party on Retroviruses. *Hum Gene Ther* 16:1237-1239, 2005.
60. Thrasher A and Gaspar B. Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID. (http://www.esgct.org/upload/X-SCID_statement_AT.pdf) December 18, 2007.
61. Board of the European Society of Gene and Cell Therapy, Executive Committee of the Clinigene Network of Excellence, Executive of the Consort Integrated Project. Case of Leukaemia Associated with X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Gene Therapy Trial in London. *Hum Gene Ther* 19(1):3-4, 2008.
62. Williams DA. An international conversation on Stem Cell Gene Therapy. 4th Stem Cell Conference on Stem Cell Gene Therapy, Thessaloniki, Greece, 13-17 September 2007. *Mol Ther* 15(12):2058-2059, 2007.
63. Fischer A and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 371:2044-2047, 2008.
64. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 360(5):447-458, 2009.
65. Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting June 10, 2004 (Revised in February 2005)
66. Baum C, Kustikova O, Modlich U, et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17:253-263, 2006.
67. Recchia A, Bonini C, Magnani Z, et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1457-1462, 2006.
68. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, et al. Adoptive transfer of cloned

- melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24:363-373, 2001.
69. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25:243-251, 2002.
 70. Schumacher TNM. T-cell-receptor gene therapy. *Nature Rev Immunol* 2:512-519, 2002.
 71. Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, et al. Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 11:929-40, 2002.
 72. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Rev Cancer* 3:666-675, 2003.
 73. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus⁺ Hodgikin' s disease. *J Exp Med* 200:1623-1633, 2004.
 74. Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9):909-915, 2004.
 75. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14639-14645, 2004.
 76. Guidance for Industry Gene therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events
 77. Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 92:205-216, 2000.

X.3 検査・観察スケジュール

表 5 検査・観察スケジュール

臨床研究期間 日数	スクリーニング 期間		治療期間											追跡 調査 期間
	同意 取得日	アフェレーシス 実施日	day0 *	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	day63 ±3	
入院		○	○					○		○				
同意取得	○		○											
一次登録	○													
二次登録			○											
被験者背景	○													
アフェレーシス		○												
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○											
MAGE-A4 ペプチド 投与								○		○				
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧/動 脈血酸素飽和度	○		○											
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○													
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○	○
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○	○
血液凝固能検査	○		○ ²									○	○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○		○		○	○	○
尿検査	○		○ ²	○			○	○		○		○	○	○
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}									○ ⁴	○ ⁴	○ ⁴
胸部 X 線検査	○		○ ²									○	○ ⁵	○ ⁵
12 誘導心電図	○		○ ²									○	○ ⁵	○ ⁵
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵	○ ⁵
PET-CT			○ ³									○	○ ⁵	○ ⁵
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵	○ ⁵
腫瘍組織生検			○ ³									○	○ ⁵	○ ⁵
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁶			○ ⁷	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ ²					○		○		○	○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ ³									○	○ ⁵	○ ⁵
RCR ⁶				○ ⁸								○	○	○
LAM-PCR ⁶												○	○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70	70
有害事象			←											→

*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (±2 時間) 後、及び 12 時間 (±2 時間) 後。
8. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

X.4 TNM 病期分類 (TNM Classification of Malignant Tumours)

表 6 TNM 病期分類

病期分類			
0 期	Tis	N0	M0
I 期	T1	N0	M0
IIA 期	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
IIB 期	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
III 期	T3	N1	M0
	T4	N に関係なく	M0
IV 期	T, N に関係なく		M1
IVA 期	T, N に関係なく		M1a
IVB 期	T, N に関係なく		M1b

[UICC International Union Against Cancer - 第 6 版 (2002 年) 抜粋]

T: 原発腫瘍

- TX 原発腫瘍の評価が不可能
- T0 原発腫瘍を認めない
- Tis 上皮内癌
- T1 粘膜固有筋層又は粘膜下層に浸潤する腫瘍
- T2 固有筋層に浸潤する腫瘍
- T3 外膜に浸潤する腫瘍
- T4 周囲組織に浸潤する腫瘍

N: 所属リンパ節

- NX 所属リンパ節転移の評価が不可能
- N0 所属リンパ節転移なし
- N1 所属リンパ節転移あり

M: 遠隔転移

- MX 遠隔転移の評価が不可能
- M0 遠隔転移なし
- M1 遠隔転移あり

- 胸部上部食道腫瘍: M1a 頸部リンパ節への転移
- M1b 他の遠隔転移
- 胸部中部食道腫瘍: M1a 該当なし
- M1b 所属リンパ節以外の転移又は他の遠隔転移
- 胸部下部食道腫瘍: M1a 腹腔動脈周囲リンパ節への転移
- M1b 他の遠隔転移

X.5 Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG))

表 7 Performance Status

Grade	Performance Status (PS)
0	無症状で社会活動ができ、制限を受けることなく、発病前と同等にふるまえる。
1	軽度の症状があり、肉体労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や坐業はできる。 例えば軽い家事、事務等。
2	歩行や身の廻りのことはできるが、時に少し介助が要ることもある。軽労働はできないが、日中の 50%以上は起居している。
3	身の廻りのある程度のことはできるが、しばしば介助が要り、日中の 50%以上は就床している。
4	身の廻りのこともできず、常に介助が要り、終日就床を必要としている。

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

この基準は全身状態の指標であり、局所症状で活動性が制限されている場合は、臨床的に判断する。〔出典先 : Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982〕

X.6 RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)

測定可能病変及び測定不能病変

測定可能病変とは、少なくとも一次元で正確に測定でき、最大径（以下、長径）が従来の検査法で ≥ 20 mmあるいはヘリカルCTで ≥ 10 mmの病変である。

測定不能病変とは、それ以外の全ての病変であり、小病変（長径が従来の検査法で < 20 mm又はヘリカルCTで < 10 mm）と真の測定不能病変を含む。

標的病変及び非標的病変の選択

登録時に認められた測定可能病変のうち、長径の大きい順に5つまでを選択して標的病変とする。選択した標的病変の部位、検査法、検査日、長径、全ての標的病変の長径の和（以下、長径和）を記録する。

標的病変として選択されなかった病変は、測定可能か否かを問わず全て非標的病変として部位、検査方法、検査日を記録する。

腫瘍縮小効果の判定

標的病変及び非標的病変の評価を登録時と同じ検査方法にて行い、標的病変の長径、非標的病変の消失又は増悪の有無を記録する。

標的病変の効果判定基準

- ・完全奏効（CR）：全ての標的病変の消失。
- ・部分奏効（PR）：治療開始前の長径和と比較して標的病変の長径和が30%以上減少。
- ・進行（PD）：治療開始以降の最小の長径和と比較して標的病変の長径和が20%以上増加。
- ・安定（SD）：PRに該当する腫瘍縮小やPDに該当する腫瘍増大を認めない。

$$\text{長径和の縮小割合} = \frac{\text{治療前の長径和} - \text{評価時の長径和}}{\text{治療前の長径和}} \times 100$$

$$\text{長径和の増大割合} = \frac{\text{評価時の長径和} - \text{最小の長径和}}{\text{最小の長径和}} \times 100$$

非標的病変の効果判定基準

- ・完全奏効（CR）：全ての非標的病変が消失。
- ・不完全奏効/安定（IR/SD）：1つ以上の非標的病変が消失しないか、腫瘍マーカーが院内基準値上限を超える（測定を行った場合）。
- ・進行（PD）：既存の非標的病変の明らかな増悪。

新病変出現の有無

「RECIST ガイドライン」における「新病変の出現」は「標的病変の効果」、「非標的病変の効果」いずれも「PD」となるとされているが、総合効果判定の規定と矛盾するため、「新病変の出現」は「標的病変の効果」と「非標的病変の効果」を左右しないこととし、「標的病変の効果」と「非標的病変の効果」とは別に評価する。

例えば、標的病変の長径和の増大割合 $< 20\%$ 、非標的病変の増大がない場合、それ以外に新病変が認められた場合、「標的病変=SD、非標的病変=IR/SD、新病変出現あり」として、「総合効果=PD」とする。

総合効果

総合効果は標的病変の効果と非標的病変の効果の組み合わせから、以下にしたがって判定する。

表 8 標的病変と非標的病変の腫瘍縮小効果の組み合わせによる総合効果

標的病変	非標的病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	IR/SD	なし	PR
PR	PD 以外	なし	PR
SD	PD 以外	なし	SD
PD	任意	任意	PD
任意	PD	任意	PD
任意	任意	あり	PD

CR=complete response (完全奏効)、IR/SD=incomplete response/stable disease (不完全奏効)、PR=partial response (部分奏効)、SD=stable disease (安定)、PD=progressive disease (進行)

臨床研究ご参加についての説明書

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

この臨床研究の内容は人権と安全性に最大限の配慮をして、当院に設置されている倫理委員会において、患者さまの人権が保護され、科学的・倫理的に妥当であることが確認されております。

(遺伝子治療臨床研究審査委員会 承認日：2011 年 月 日)

第 1.0 版 作成年月日：2011 年 1 月 14 日

1. はじめに	3
2. 臨床研究について	3
3. あなたの食道癌について	4
4. 遺伝子治療臨床研究の概要について	5
5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について	6
6. 臨床研究の方法	7
7. 参加できる方、参加できない方	9
8. 臨床研究のスケジュール	10
9. 期待される効果	13
10. 予想される危険性および副作用	13
11. 臨床研究への参加予定期間	17
12. 臨床研究への参加患者数	17
13. 他の治療法について	18
14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて	18
15. 健康被害の補償について	18
16. 新たな情報のお知らせについて	18
17. 遺伝子治療臨床研究の中止について	19
18. あなたに守っていただきたいこと	19
19. あなたの費用負担について	19
20. 個人情報の保護について	20
21. 個人情報の第三者への提供の制限について	20
22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の 窓口について	21
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について	21
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制	21

1. はじめに

近年、癌細胞の表面のみに発現する“目印”（この目印を「癌抗原」といいます）が存在することが科学的に解明され、また、この癌抗原を認識して、癌を攻撃・破壊することができる細胞（この細胞を「細胞傷害性 T 細胞」といいます）の存在も証明されました。

本臨床研究では、患者さま自身の細胞をいったん体の外に取り出し、そこに細胞傷害性 T 細胞が癌抗原を認識するために必要な「アンテナ」の遺伝子を導入した後、再びその細胞を患者さまに戻すことによって、治療効果を得る遺伝子治療を考えています。

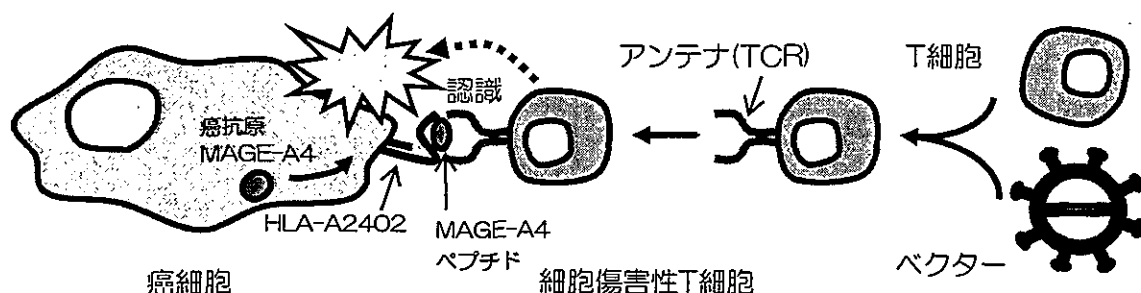


図 1 細胞傷害性 T 細胞による癌抗原の認識

2. 臨床研究について

これまでに多くの病気の原因が解明され、また、たくさんの「薬」や「治療法」が開発され、広く一般に使用されるようになりました。どの「薬」や「治療法」も、患者さまに使っていただけるようになるためには、はじめに試験管等を使った実験により、目的とする作用を持ったいくつかの「薬」や「治療法」を選び出し、次に動物を使ってそれがどれくらい効くか（効果）、また、安全かどうか（安全性）を調べる実験が行われます。そして、最終的に実際の患者さまに試みて、効果と安全性を検討する必要があります。

患者さまを対象にして、「薬」や「治療法」を評価するために行うものを臨床研究といいます。一般的に臨床研究には、安全性を調べる段階（第Ⅰ相試験）、効果（例えば、癌であればどの程度縮小するか）を調べる段階（第Ⅱ相試験）、現在一般的に使われている「薬」や「治療法」と比較する段階（第Ⅲ相試験）があり、段階を踏みながら進んでいきます。このように臨床研究には、研究的な一面があることを十分ご理解ください。

今回、患者さまに説明する臨床研究は、安全性を調べることを目的とした臨床研究（第Ⅰ相試験）に相当するものです。本臨床研究は、国が定めた指針に基づいて計画され、当院の倫理委員会（臨床研究を実施する者から独立した委員会）と国の審議会の厳しい審査を受け、承認されたものです。

3. あなたの食道癌について

癌にはその進行の程度をあらわす分類法があり、癌がどのくらいの大きさになっているか（深達度）、周辺のリンパ節にどれほど転移しているか（リンパ節転移）、遠く離れた臓器への転移があるか（他臓器の転移）、の3つの要素によって決められています。以下にその分類を示します。

表 1 食道癌の病期分類（TNM 分類一部改変）

病期分類			
I 期	T1（粘膜下層にとどまる腫瘍）	NO（リンパ節転移なし）	MO （遠隔転移なし）
II A 期	T2（固有筋層に浸潤する腫瘍） T3（外膜に浸潤する腫瘍）	NO（リンパ節転移なし）	
II B 期	T1（粘膜下層にとどまる腫瘍） T2（固有筋層に浸潤する腫瘍）	N1（リンパ節転移あり）	
III 期	T3（外膜に浸潤する腫瘍） T4（周囲組織に浸潤する腫瘍）	N1（リンパ節転移あり） N に関係なし	
IV 期	T, N に関係なし		M1 （遠隔転移あり）

食道癌に対する一般的な治療法として、内視鏡粘膜切除（内視鏡を用いて粘膜上の癌を切除する方法）、手術（身体から癌を切除する方法）、化学療法（抗癌剤による治療）および放射線療法（癌に放射線を照射する治療）の4つの治療法があります。

現在あなたは、

- ☐ 根治切除が不可能で、かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）に抵抗性となったⅢ期、Ⅳ期の食道癌
- ☐ 術後あるいは初回放射線化学療法（化学療法と放射線療法を組み合わせたもの）後に再発転移をきたし、その後の治療に抵抗性となった食道癌

であることが判明しました。

食道癌では、初回の治療がきちんと行われたにもかかわらず再発することが多いですが、化学療法や放射線療法が効果を示すことがあり、しばらくはこれらの治療をおこないます。しかし、効果がみられなくなった際に、その後の治療法について確立されたものがないのが実情で、病気による苦痛をとってQOL（「生活の質」といいます）の改善をはかる治療をするのが現状です。（本臨床研究以外の他の治療法については、後ほど説明します。）

4. 遺伝子治療臨床研究の概要について

私たちの計画している遺伝子治療は、以下のとおりです。この臨床研究は、三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学（タカラバイオ株式会社との産学連携講座）を含む複数の医療機関とタカラバイオ株式会社（本社：滋賀県大津市瀬田）との共同研究に基づいて、大阪大学医学部附属病院で実施します。

- 1) 食道癌に癌抗原（本臨床研究で標的としている癌抗原を「MAGE-A4」といいます）が発現し、白血球の型が「HLA-A2402」である患者さまから末梢血（「末梢血」とは血管の中を流れている血液のことをいいます）中のリンパ球を採取します。
- 2) 採取した末梢血中のリンパ球に、MAGE-A4 を認識するアンテナ（これを「T 細胞受容体：TCR」といいます）の遺伝子を、レトロウイルスベクターという運び屋を使って導入します。
- 3) TCR 遺伝子を導入したリンパ球を体外で培養して数を増やした後に、再び患者さま自身に投与します。
- 4) MAGE-A4 ペプチド（蛋白の小さいもので、9 個のアミノ酸からできたもの）を投与し、患者さまの体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の活性化（あるいは増殖）を図ります。
- 5) 癌細胞を認識するアンテナ（TCR）を発現した細胞が、患者さまの体内で活性化され、癌細胞に向かっていくことが期待されます。

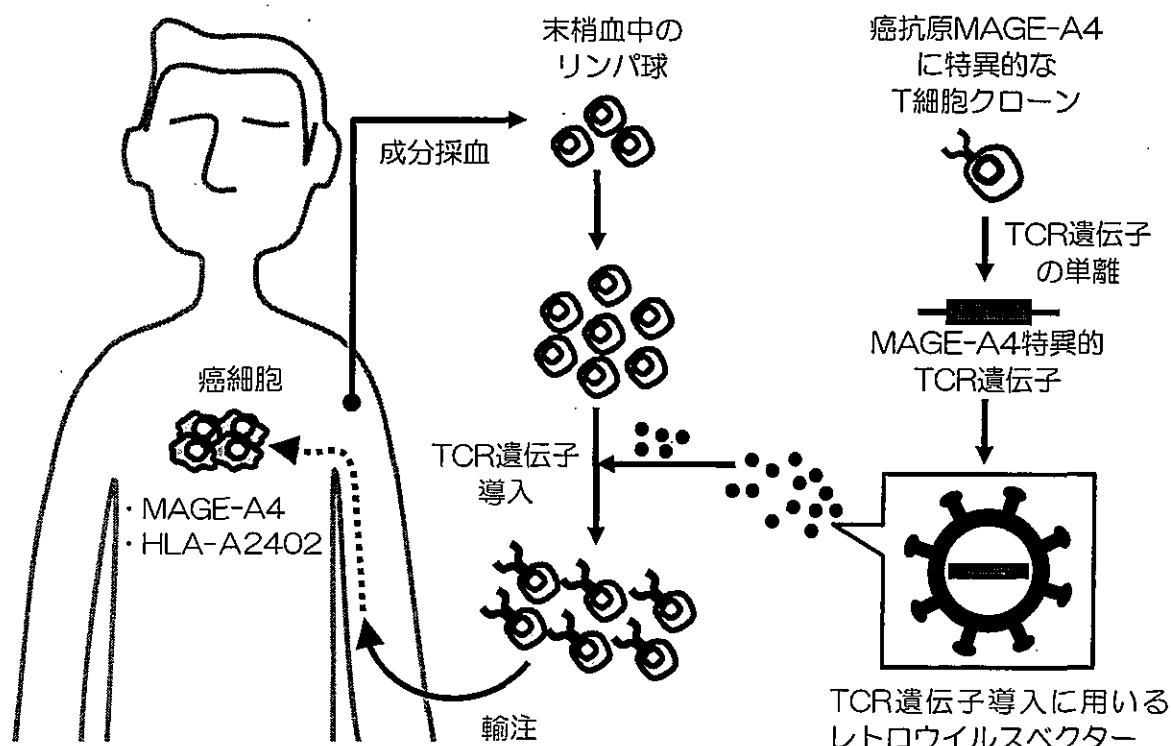


図2 遺伝子治療臨床研究の概要

リンパ球について

血液は、^{けっしょう}血漿という液体成分と血球という細胞成分からできていて、血球には赤血球、白血球、血小板の3種類の細胞があります。リンパ球は、白血球のうち約25%を占める細胞のことで、免疫系にかかわるB細胞（Bリンパ球）、T細胞（Tリンパ球）等から構成されています。

HLA（human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原）について

HLAとは白血球の型のことで、自己と非自己を区別して認識する重要な抗原であり、ヒトの6番染色体に存在します。ここには多数の遺伝子が存在しますが、HLAの検査では、A、B、DRの3種類の遺伝子座が検査されます。ヒトの細胞はA抗原、B抗原、DR抗原の遺伝子を各2個、計6個有しており、これらの抗原が細胞表面に発現しています。HLA-A2402の日本人における頻度はおよそ60%です。

T細胞受容体（TCR）について

T細胞（Tリンパ球）とは例えば癌細胞のような標的細胞を攻撃する役割と、抗体の産生を調節する役割を担う重要な細胞であり、免疫系の司令塔的な役割を担っています。T細胞の表面に出ている、抗原を認識するためのアンテナをT細胞受容体（TCR）といいます。

MAGE-A4について

MAGE-A4とは癌組織のみに過剰に発現する“目印”蛋白であり、正常組織では精巣以外ほとんど発現が認められません。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が適切に癌細胞に発現していることを調べる必要があります。しかし、現在、この蛋白の発現を直接調べる方法がないため、MAGE-A4蛋白のもととなるRNAの量で推定しています。

レトロウイルスベクターについて

ベクターとは『運び屋』という意味で、細胞や体に異種のDNAを入れる際に用いる、二本鎖の環状DNAや無毒化したウイルス等を指します。また、レトロウイルスとは遺伝子を導入するベクターとして最も応用が早く進んだウイルスであり、これを用いて遺伝子を導入することで、導入した遺伝子が標的細胞の染色体に組み込まれるため、細胞分裂後も確実に娘細胞に伝達され、長期間安定に遺伝子を発現させることが可能です。

5. TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について

アメリカの国立衛生研究所において、私たちの計画と同じくTCR遺伝子を患者さま自身の細胞に導入して戻す臨床試験が行われ、2006年にその報告がさ

れました。ただし、この臨床試験は、あなたと同じ食道癌ではなく、悪性黒色腫^{こくしよくしゅ}（メラノーマと呼ばれる皮膚癌の一種です）の患者さまを対象として行われたものです。

進行性の転移性悪性黒色腫の患者さま 17 名に対して、悪性黒色腫に特有な癌抗原（ここではこれを「MART-1」といいます）を認識する TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した患者さま自身のリンパ球を輸注したものです。この臨床試験において、17 名の患者さまのいずれにおいても、TCR 遺伝子導入細胞の輸注による毒性は認められませんでした。また、そのうち 2 名の患者さまでは、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^{まっしょうけつたんかくきゅう}（白血球の約 25% を占めるリンパ球と、約 5% を占める単球の総称）中の 40% 前後という非常に高い水準で維持され、この 2 名の患者さまでは癌の明らかな縮小が観察されました。なお、この臨床試験の後に行われた、MART-1 抗原との反応性がより強い TCR 遺伝子を使った臨床試験では、自己免疫反応と思われる目および耳の障害が発生したとの情報があります。

ただし、TCR 遺伝子を患者さま自身の細胞に導入して戻す臨床試験は、悪性黒色腫を対象とした上に述べる試験以外には報告がなく、悪性黒色腫以外の癌にどの程度効果があるかは未知数です。また、標的となるがん抗原、導入された TCR 遺伝子、TCR に対して抗原ペプチドを提示する HLA 分子の種類、投与されたペプチドの種類などが、アメリカの国立衛生研究所で行われた試験とあなたが受けようとしている今回の試験とは異なるために、安全性や効果の程度が異なる可能性があります。

また、今回の臨床研究で使う TCR 遺伝子については、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入した細胞が、これまで人に投与されたことはありません。

6. 臨床研究の方法

本臨床研究は以下のステップで行います。

第 I 段階：T 細胞への TCR 遺伝子の導入

1) T リンパ球の採取

あなたの全身状態に問題がないことを確認し、採取機械を使ってあなたの末梢血から T リンパ球を採取します。これをアフェレーシス（成分採血）といいます。

あなたの腕（あるいは太もも）の静脈血管から約 90 分かけて約 5,000 mL の血液を採取し、リンパ球の濃縮された成分、およびその T リンパ球を培養するために必要な血漿（～最大 400 mL）を採血します。残りの血液は採血した腕と反対の腕からあなたに戻します。

2) TCR 遺伝子導入細胞の調製

採取した T リンパ球と血漿は三重大学内の細胞処理センターに搬送され、前述

したレトロウイルスベクターを使ってTCR 遺伝子が導入されます。この施設では細胞の処理はすべて無菌操作で行います。遺伝子導入を含めて試験管内で7日間培養し、いったん凍結させて保存します。そして、TCR 遺伝子導入細胞の品質を確認後、三重大大学の細胞処理センターから大阪大学医学部附属病院に搬送されます。

この試験では TCR 遺伝子導入細胞の品質が確認されて、投与することが可能になるまで、40日程度かかります。その間は無治療で経過をみていただきます。さらに、投与前に選択基準を満たすかどうかを確認して投与することになります。基準を満たさない際は、投与することができなくなることをご了解いただきたいと思います。

第Ⅱ段階：TCR 遺伝子導入リンパ球の投与

TCR 遺伝子導入リンパ球を投与します。治療効果が最も期待でき、かつ、安全な TCR 遺伝子導入リンパ球の量は、現時点でははっきりしていません。投与する TCR 遺伝子導入リンパ球の量は、参加いただいた患者さまに対して、次の3段階を予定しています。最初の3人には 2×10^8 個（2億個）、次の3人には 1×10^9 個（10億個）、最後の3人には 5×10^9 個（50億個）の細胞を投与します。

なお、各段階で、もし日常生活に支障をきたしたり、また治療が必要なほどの重い副作用（高度な有害事象と言われます）が、3人のうち1人に発現した場合には、増量せずに同じ細胞数でさらに3人の患者さまに対して投与を続け、合計2人以上に重い副作用が発現した場合には、その細胞数は重い副作用がよく起こるものとして次の段階には進みません。

あなたには、（ $\times 10^$ 個）の細胞を投与します。その後十分な観察を行い、副作用が発現した場合には、適切な処置を行います。

第Ⅲ段階：MAGE-A4 ペプチドの投与

あなたの体内で TCR 遺伝子導入細胞をさらに活性化（あるいは増殖）させるため、MAGE-A4 ペプチド 1 回量 $300 \mu\text{g}$ を、TCR 遺伝子導入細胞投与後 14 日目および 28 日目の 2 日間の計 2 回、アジュバント（ペプチドの作用を修飾・増強するために加えられるものを「アジュバント」といいます）とともに投与します。

本臨床研究終了後、大阪大学医学部附属病院では患者さまの生存期間（アメリカ食品医薬品局（FDA）のガイドラインに従い、最短 15 年間）にわたり、二次発癌や増殖能を持つレトロウイルスの有無についてフォローアップを行う予定であることをご了解ください。これは遺伝子治療の長期にわたる安全性がまだ確立していないことから、臨床研究後に問題が生じることがないかを追跡するために行います。

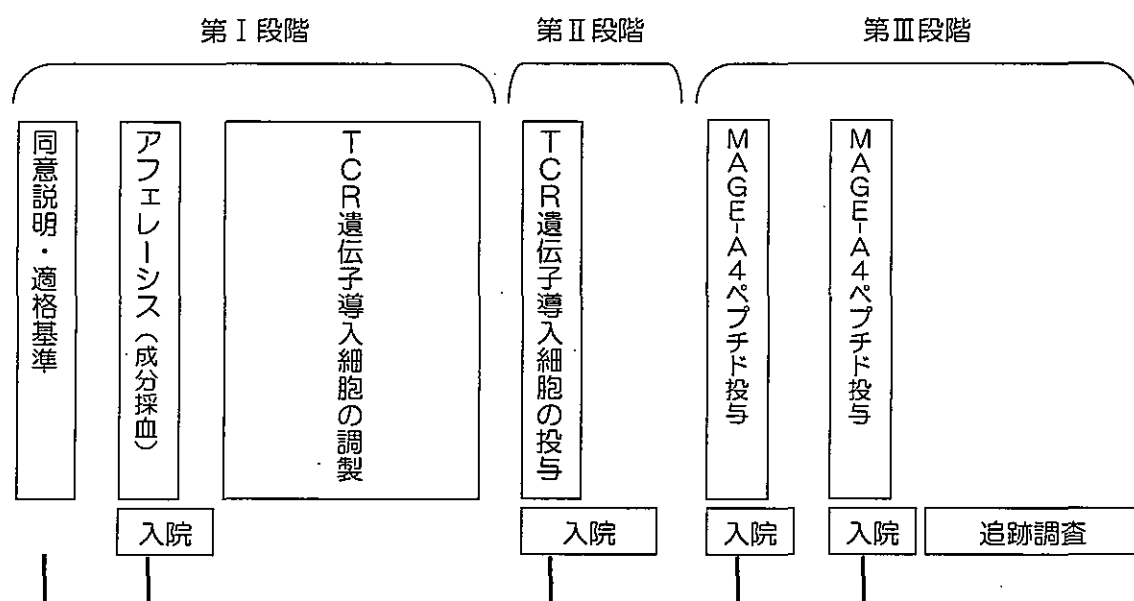


図3 遺伝子治療臨床研究のステップ

7. 参加できる方、参加できない方

本臨床研究に参加できるのは以下のすべての条件を満たす患者さまです。

- ① 組織診断によって食道癌であることが確認されている方
- ② 根治切除不可能で、かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった臨床Ⅲ期、Ⅳ期（表 1）の食道癌の方、又は、術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし、治療抵抗性となった食道癌の方
- ③ HLA-A2402（白血球の型）陽性の方
- ④ 癌組織に MAGE-A4 の発現が確認されている方
- ⑤ 画像診断に必要とされる、測定可能な癌病変を持っている方
- ⑥ Performance Status（全身一般状態）が 0～1 の方
- ⑦ 本臨床研究に参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の方
- ⑧ 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経過が見込まれる方
- ⑨ 同意取得後 4 ヶ月以上の生存が見込まれる方
- ⑩ 主要な臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす方
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$

- ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
- ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- ⑪ 癌組織にHLAクラスⅠ分子の発現が確認されている方
- ⑫ 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた方
- ⑬ 本臨床研究における最小輸注量 (2×10^8 個) のTCR 遺伝子導入リンパ球輸注量が得られた方 (二次登録時)

本臨床研究に参加できないのは以下のいずれかの条件に該当する患者さまです。

- ① 以下の重篤な合併症を有する方
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症^{かんしつせい はいせんいしょう}
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 (プロトロンビン時間 (PT) $< 50\%$ 、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 秒、フィブリノゲン (Fbg) $< 100 \text{ mg/dL}$ 、フィブリン分解産物 (FDP) $> 20 \text{ } \mu\text{g/mL}$)
 - ・血栓形成傾向
- ② 重篤な過敏症の既往歴を有する方
- ③ HCV 抗体、HBs 抗原、HTLV-1 抗体、HIV 抗体のいずれかが陽性である方
- ④ コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水^{しんのう}を有する方
- ⑤ 制御困難な脳内転移を有する方
- ⑥ 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の方
- ⑦ MAGE-A4 ペプチドの投与に適さない方
- ⑧ 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する方
- ⑨ 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性の方。又は挙子希望の男性の方 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合はこの限りではありません)
- ⑩ 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験 (臨床研究) に参加している方
- ⑪ その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた方

8. 臨床研究のスケジュール

あなたが先に説明した「参加できる条件」に当てはまる場合、次ページの「表 2」に示したスケジュールに従って本臨床研究を実施します。概要としては、はじめに、あなたから遺伝子を導入する細胞を採取するために数日間入院していただきます。その後、いったん退院いただき、あなたから採取した細胞は三重大学内にある細胞処理センターに搬送します。そして、TCR 遺伝子を導入する

一連の作業を行い、その細胞の安全性を確認します。細胞の安全性が確認された後投与することになりますが、TCR 遺伝子導入細胞を投与する日から投与後 7 日間、および 2 回の MAGE-A4 ペプチド投与後 2 日間（詳細は次項をご覧ください。）は、再度入院していただくことになります（患者さまの状態によっては長く入院することもあります）。この間に診察や画像診断、各種の検査を実施しますが、それ以外は外来通院での治療が可能です。本臨床研究は、TCR 遺伝子導入細胞投与の 63 日後に終了となります。それ以降も、8 ページに記載したように患者さまの生存期間にわたり、フォローアップとして 1 年に 1 回の頻度で、TCR 遺伝子導入細胞の血中動態、および二次発癌や増殖能を持つレトロウイルスの有無について注意深く経過を観察します。なお、臨床研究で実施する検査のうち TCR 遺伝子導入細胞の血中動態、TCR 遺伝子導入細胞の腫瘍組織浸潤度、RCR、LAM-PCR および免疫機能解析は三重大学で検査を行います。

今回使用するレトロウイルスベクターは増殖能力を欠損していますが、万が一増殖能力を持つレトロウイルスが患者さまの血液に出現する場合に備えて、遺伝子導入細胞投与後、最低 3 日間は個室に入院していただく必要があります。また、その個室入院期間中には個室外に出る自由が制限されること、検査等のために個室外に出る際にはマスク及びガウンの着用が義務付けられること、および排泄物が特別な消毒をされること等、増殖能力を持つレトロウイルスが環境中に放出される可能性を最小限にするための措置にご協力していただく必要があります。

表 2 遺伝子治療臨床研究の検査・観察のスケジュール

臨床研究期間 日数	スクリーニング 期間		治療期間											追跡 調査 期間
	同意 取得日	アフェレーシス 実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	day63 ±3	
入院		○	○					○		○				
同意取得	○		○											
一次登録	○													
二次登録			○											
被験者背景	○													
アフェレーシス		○												
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○											
MAGE-A4 ペプチド投与								○		○				
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧/動 脈血酸素飽和度	○		○											
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○													
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○	
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○	
血液凝固能検査	○		○ ²					○		○		○	○	
尿検査	○		○ ²	○			○	○		○		○	○	
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○		○		○	○	
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}									○ ⁴	○ ⁴	
胸部 X 線検査	○		○ ²									○	○ ⁵	
12 誘導心電図	○		○ ²									○	○ ⁵	
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵	
PET-CT			○ ³									○	○ ⁵	
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵	
腫瘍組織生検			○ ³									○	○ ⁵	
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁶			○ ⁷	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	
免疫機能解析 用採血			○ ²					○		○		○	○	
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検 査			○ ³									○	○ ⁵	
RCR ⁶				○ ⁸								○	○	
LAM-PCR ⁶												○	○	
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70	
有害事象														

*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1.スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。

2.治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。

3.治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。

4.スクリーニング期間の測定値が高値列のみ実施。

5.必要に応じて実施。

6.臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。

7.TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (±2 時間) 後、及び 12 時間 (±2 時間) 後。

8.遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。

※RCR 検査	遺伝子治療に用いるレトロウイルスベクターは増殖能力を欠損していますが、何らかの理由によって増殖を始めてしまう可能性が皆無ではありません。増殖能力を持つようになったレトロウイルスをRCRといい、その出現の有無を確認する検査です。
※LAM-PCR	レトロウイルスを用いた遺伝子治療において、あなたに投与された遺伝子導入細胞の中である特定の細胞だけがが増えていないかどうかを調べる検査です。また、特別に増えた細胞がある場合には、染色体のどの場所に治療用遺伝子が挿入されたかを確認します。
※有害事象	副作用等の好ましくないすべての事象のことで遺伝子治療との因果関係は問いません。

9. 期待される効果

臨床効果は、実際に患者さんに投与されたことがないため、はっきりとわかっていません。

「5. 海外での状況について」の項で説明しましたとおり、今回の抗原とは別の悪性黒色腫の癌抗原MART-1に対するTCR遺伝子導入リンパ球を用いた臨床試験は、アメリカで悪性黒色腫の患者さま 17 名に対して行われ、2 名の患者さまで明らかな癌の縮小が認められました。しかし、悪性黒色腫以外の癌である食道癌に対して、また別の癌抗原であるMAGE-A4を用いた今回の遺伝子治療により、どの程度の効果が得られるかについては、これまで人に投与されたことがないため、不明です。

私たちが実験小動物や試験管内で行った実験においては、MAGE-A4 を認識するTCR 遺伝子を導入したリンパ球が、MAGE-A4 陽性/HLA-A2402 陽性の癌細胞株を攻撃・破壊することが認められており、本臨床研究においても同様の効果が期待されています。但し、実験小動物や試験管内での実験結果は、リンパ球投与量や投与時期、腫瘍量など実験室における最適と思われる条件下で得られたものであり、必ずしも人での効果を反映するものではありません。

「2. 臨床研究について」の項で説明したとおり、臨床研究には研究的な一面があります。今回の試験は、安全性を主目的として調べる段階（第Ⅰ相試験）ですが、あなたに御参加いただくことで本研究の発展に非常に助けになり、将来同じ病気になった患者さんの治療に役立つ可能性があります。

10. 予想される危険性および副作用

1) レトロウイルスベクターを用いることによる危険性

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、現在までアメリカを中心とした全世界で 280 件以上が実施されており、多くの実績があります。しかし、何らかの原因により、治療を受けた患者さまの体内でこのウイルスベクターが増殖をはじめめる可能性や、遺伝子を導入した細胞が腫瘍性に増殖する可能性は皆無とはいえません。

そこで、この可能性を最小限にするために、遺伝子治療についての規則やガイドラインにしたがって、ウイルスベクターの安全性と品質の管理が行われています。また、この臨床研究で使われるのは人工的に改良した安全性の高いレトロウイルスベクターです。しかしながら、レトロウイルスベクターによって導入された治療用の遺伝子が、患者さまの T リンパ球の染色体に組み込まれたときに悪影響を及ぼす可能性は皆無とはいえません。そこで、レトロウイルス

ベクターを用いることによる副作用および危険性の可能性について、もう少し詳しく説明します。

第1点目は、レトロウイルスベクターの無秩序な増殖という問題です。今回の遺伝子治療で使われるレトロウイルスベクターは、一度細胞に感染すると二度は感染しないように、安全性を高める工夫が施されています。しかし、何らかの理由によってこのレトロウイルスベクター自身が増殖を始め、患者さまにウイルス性の疾患を引き起こす可能性は皆無とはいえません。この危険性を可能な限り取り除くために、あらかじめ定められた品質規格に合格した遺伝子導入Tリンパ球のみが投与され、投与後も体内で増殖性ウイルスが発生していないことを確認する検査が繰り返し行われる計画になっています。

第2点目は、「挿入変異」といわれる、治療用の遺伝子が細胞の染色体に組み込まれる際におこる可能性のある問題です。染色体には、蛋白の設計図に相当する多数の遺伝子が並んでいます。レトロウイルスベクターは治療用の遺伝子をこの染色体のいずれかの場所に組み込みます。ただし、この組み込まれる場所はあらかじめ予測することができないため、組み込まれる場所によっては、大切な遺伝子を壊したり、他の遺伝子に悪い影響を与えたりして、遺伝子導入された細胞を癌細胞に変えてしまう危険性があります。通常、染色体には、癌遺伝子や癌の発生を抑える働きをする遺伝子が含まれていますが、遺伝子導入によってこれらの遺伝子の働きに何らかの影響がおきて、癌化へと進む可能性もあります。一般的には、1つの遺伝子に影響が生じただけでは、癌化する可能性は極めて低いと考えられていますが、その危険性は完全には否定できません。

特に「挿入変異」による癌化の可能性については、極めて大切なことですので具体例についてさらに詳しく説明します。X連鎖重症複合性免疫不全症（遺伝的に身体の抵抗力が弱く、重症の細菌やウイルス感染症を起こしやすい病気）という先天性の病気の乳幼児に対して、レトロウイルスベクターを用いて、欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞^{そうけつかん}に導入する遺伝子治療の臨床研究がフランスで1999年3月から行われました。当初、この遺伝子治療では11例中9例で治療が成功し、遺伝子治療の最大の成功例として注目を集めました。しかしながら、その後2002年に2例の患者さまが白血病を発症（治療後30又は34ヶ月後）したという報告がなされ、解析の結果、遺伝子治療による「挿入変異」が白血病の原因と考えられました。具体的には、この白血病発症の原因として、特定の癌遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入され、その結果、この癌遺伝子が活性化されて、細胞が腫瘍性に増殖してしまったという可能性が考えられています。さらに、レトロウイルスベクターで導入した治療用遺伝子が、細胞の増殖をコントロールする遺伝子だったことが、白血病の発症リスクをさらに高くしたと考えられています。この報告の後に、アメリカでは、同様の先天性免疫不全症に対するレトロウイルスベクター遺伝子治療臨床研究を一時中断し、公聴会での議論がなされ、この症例に関する内容を患者さまやそのご家族に正しく伝えたいと再開することとなりました。しかし、2005年1月には上記フランスの臨床研究で3例目の白血病発

症（治療後 33 ヶ月後）の報告がなされるとともに、白血病発症第 1 例目の患者さまが白血病によって亡くなられたという報告がありました。また、2007 年 3 月には 4 例目の白血病発症の報告がなされました。現在フランスのグループは、より安全なベクターが開発されるまでこの遺伝子治療を中断しています。なお、この X 連鎖重症複合性免疫不全症に対して、イギリスのグループもフランスと同様の遺伝子治療臨床研究を行っていましたが、治療を受けた 10 例中 1 例で白血病が発症したことが 2007 年 12 月に報告されました。

また、慢性肉芽腫症（好中球などの食細胞が機能しないため重症な細菌・真菌性感染症を反復して発症する先天性免疫不全症）に対して、レトロウイルスベクターを用いて、欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞^{そうけつかん}に導入するドイツの遺伝子治療では、遺伝子導入細胞を投与された 2 例の患者さまで、特定の癌遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入された細胞が多く認められており、骨髓異形成症候群という前白血病状態の発症が報告されています。一方、アデノシンデアミナーゼ欠損症（アデノシンデアミナーゼという酵素が先天的に欠けているために血液中の正常に働くリンパ球が減少し、感染症が発症しやすくなる病気）に対して、レトロウイルスベクターを用いて欠けている遺伝子を血液のもとになる造血幹細胞^{そうけつかん}に導入するイタリアの遺伝子治療では、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、癌化は見られなかったと報告されています。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の可能性は、対象となる病気、遺伝子を挿入する細胞、ベクターの種類等によって大きく異なっています。ちなみに、本研究で行うような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癌化の報告はありません。

上記の先天性免疫不全症以外のレトロウイルスベクターを使用する遺伝子治療では、白血病の発症の頻度は比較的低いと考えられ、その危険性について患者さまに十分に説明したうえで実施してもよいとの決定が各実施国の所轄官庁からなされています。日本においても同様の状況で、実施が承認されている 4 件のレトロウイルスを使用する遺伝子治療臨床研究のうち、X 連鎖重症複合性免疫不全症に対する遺伝子治療については実施施設が開始を保留していますが、それ以外の 3 件の遺伝子治療臨床研究については、長期間にわたって被験者の追跡調査を行うとともに、それぞれの遺伝子治療臨床研究のリスク／ベネフィットに関する評価を最新の知見に基づき定期的に実施することを条件に継続されています。

今回の TCR 遺伝子導入リンパ球輸注療法では、遺伝子を導入する細胞は T リンパ球であり、先に述べた先天性免疫不全症に対する遺伝子治療のような造血幹細胞に遺伝子を導入するものではありません。造血幹細胞は未熟な細胞であり、骨髓等で再生する能力があるため、癌化がおこりやすい細胞ですが、T リンパ球は分化や再生能を失った細胞であるため、癌化しにくい細胞と考えられています。このことから、治療用遺伝子が染色体に組み込まれることによる挿入変異のリスクは T リンパ球と造血幹細胞の間で同程度ではあるものの、今回の治療法で癌化がおきる危険性は、先天性免疫不全症に対する遺伝子治療と

比較して低いものと考えています。実際に、過去に日本や海外で実施された、Tリンパ球にレトロウイルスベクターで遺伝子を導入する臨床研究において、遺伝子治療による癌化は1件も報告されていません。また、イタリアのグループは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与した患者さま46人について、最長9年間の追跡調査をした結果、遺伝子導入した細胞の異常増殖は認められなかったと報告しています。

以上より、今回の遺伝子治療臨床研究における、遺伝子治療に起因する癌化の危険性は極めて低いと考えられます。ただし、万が一、癌化が認められた場合には、化学療法等の最善の治療が行われることになります。

2) 本遺伝子治療による危険性

①成分採血（アフエレーシス）に伴う副作用

・ルート確保に關すること

両腕に十分な太さの血管がなく、鎖骨下静脈又は鼠径静脈に針を刺す場合、まれに出血、感染^{ききょう}、気胸^{ききょう}の合併の危険がありますが、消毒を十分に行い、ルート確保に習熟した医師が行います。また、常に救急カート等の設備を整え、出血、気胸の対処に備えます。

・迷走神経反射^{めいそうしんけい}

精神的な緊張、不安、体調不良等の原因により血管迷走神経反射が起こり、約10%の方でめまい、吐き気、嘔吐が出現し、重篤な場合には、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈、さらに高度では痙攣^{けいれん}、失禁、そして心停止に至る可能性もあります。血圧や脈拍をモニターしながら十分に観察し、このような副作用の兆候が出現した場合は、採取を一時休止もしくは中止し、薬剤投与等適切な処置を施します。

・クエン酸反応

成分献血は、血液が固まらないように抗凝固剤を加えながら採血していきます。抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがあります。軽い症状では、口唇、手指のしびれ感が出現し、進行により症状が悪化する他、手指の突っ張り感が出現します。軽い症状が出現した場合は、採取速度を低下させて観察しますが、それでも改善しない場合は薬剤を投与します。

・血小板減少

アフエレーシスの際に血小板も一部除去されるため、アフエレーシス後に血小板の減少が高頻度（50%以上）にみられ、また、 $50,000/\text{mm}^3$ 未満の高度の減少も5%前後みられます。そのため、アフエレーシス終了後1週間位は必ず血小板をチェックし、採取前値への回復を確認します。また、アフエレーシス開始から終了までアスピリン製剤（血小板の働きを抑え、血液を固まりにくくする作用があります）は使用しません。

②TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

- ・発熱、発疹、アレルギー類似反応等

TCR 遺伝子を導入し、一旦凍結後に解凍したリンパ球を投与した際に、解凍に伴って一部崩壊した細胞内のサイトカイン（細胞から分泌される蛋白のこと）等による発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性があります。その際には、経過観察、あるいは解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の適切な薬剤の投与にて対処します。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

- ・肺障害

重篤な輸血副作用として「輸血関連急性肺障害」が知られています。抗白血球抗体（抗HLA抗体、抗顆粒球抗体）による抗原・抗体反応が原因と推測されていますが、現在のところ詳細は不明です。本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、「輸血関連急性肺障害」に類似の病態が発症する可能性は考えにくいですが、TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に注意すべきと考えられます。発症時には、副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行います。

- ・免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原である MAGE-A4 は、「癌・精巢抗原」の一つであり、腫瘍特異性が極めて高いのが特徴です。精巣組織ではHLA分子の発現が欠失しているため、正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低いのですが、自己免疫疾患様症状（発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛等）には常に注意する必要があります。対処法として、軽度の副作用では無処置で経過観察しますが、中等度以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与します。

③ペプチド投与に伴う副作用

MAGE-A4 ペプチドはアジュバントとともに 2 回の皮下投与が予定されています。MAGE-A4 と同様な癌抗原のペプチドを用いた臨床研究は種々行われていますが、現在までに重篤な副作用の報告はありません。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫^{しゅちよう}脹）、微熱、倦怠感等が報告されています。軽度の副作用の場合、無処置にて経過観察しますが、中等度以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与します。また、予期せぬ副作用の発現に十分注意する必要があります。

3) その他予測できない副作用

上記以外にも予測できない副作用が発現する可能性があります。その場合にも必要に応じて、できる限り適切な処置を行います。

11. 臨床研究への参加予定期間

本臨床研究への参加予定期間は、最長で約 110 日間です（TCR 遺伝子導入リンパ球の準備にかかる時間や副作用の有無により変化します）。

12. 臨床研究への参加患者数

本臨床研究に参加していただく患者さまは、9 名（最大で 18 名）を予定しています。

13. 他の治療法について

あなたの食道癌に対する治療に関しては、既に手術、あるいは化学療法や放射線療法が行われておりますので、根治療法はありません。再発形式がリンパ行性、血行性、複合性のいずれであるか、初回治療におけるステージがどの程度であったか、初回治療は何か、などにより治療方法が異なってきますが、一定のコンセンサスが得られている治療法はありません。また、新しい治療法としては、分子標的治療の開発が期待されているところですが、まだ確立された治療法ではありません。

その他、最良支持療法という症状緩和を目指す治療（栄養管理や QOL 向上のための緩和医療）を受けることもできますので、十分に担当医師とご相談ください。

14. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて

この臨床研究に参加するかどうかは、あなたの自由意思でお決めください。たとえ臨床研究への参加をお断りになっても、あなたが不利益を受けることは一切ありません。その場合、あなたにとって最も良いと考えられる治療を行います。

また、この臨床研究に参加することに同意された後でも、中止を希望される場合には、どんな理由であっても担当医師に申し出てください。あなたの自由意思でいつでも参加を取りやめることができます。その場合でもあなたが不利益を受けることは一切ありません。ただし、TCR 遺伝子導入リンパ球の輸注を受けた後は、あなたの体内の TCR 遺伝子導入リンパ球を取り除くことはできません。あなたが TCR 遺伝子導入リンパ球輸注の後に本臨床研究への参加の中止を申し出られても、あなたの体内から TCR 遺伝子導入リンパ球がすべて消失したことが検査によって確認されるまでは検査等を実施します。

15. 健康被害の補償について

本臨床研究に関連する健康被害が生じた場合には、最も適切な治療を行います。健康被害がこの臨床研究と関係があるかどうかの判定は、本遺伝子治療臨床研究を行っている医療機関が共同で設置する「安全・効果評価・適応判定中

央部会」で検討します。なお、「安全・効果評価・適応判定中央部会」は私たちと利害関係はありません。この臨床研究との関連が否定できないと判断された副作用の検査や治療に対する医療費は当院が負担いたします。一方、この臨床研究との関連が認められない健康被害に関する医療費の支払いには、あなたの加入している健康保険が適用されます。また、当院に過失がない限り、補償金は支払われないことをご了承ください。

16. 新たな情報のお知らせについて

本臨床研究に参加中、新しい情報（例えば本臨床研究と同様の試験が海外で行われた場合の成績等）が得られることがあります。このような新しい情報を知ることによって、あなたが本臨床研究への参加をやめるという判断をされるかもしれません。よって、本臨床研究に関連する全ての情報はできるだけ速やかにお知らせし、本臨床研究に継続して参加されるかどうかについて、担当医師があらためてお尋ねします。

17. 遺伝子治療臨床研究の中止について

あなたに本臨床研究参加の意思があったとしても、以下の場合には本臨床研究を中止させていただきます。なお、必要な検査・観察を行うとともに、有害事象の発現や対象疾患の悪化など、安全性に問題が生じて中止した場合には、速やかに適切な処置を行い、安全性が確認されるまで追跡調査を行います。

- 1) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 2) 本臨床研究の継続が困難な有害事象が発現した場合
- 3) 本臨床研究の継続が困難な対象疾患の悪化が生じた場合
- 4) 担当医師が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

18. あなたに守っていただきたいこと

- ① 何らかの理由で担当医師以外の医師による治療を受けている場合や、本臨床研究の途中で新たに担当医師以外の医師による治療を受けた場合は、必ずその旨をお知らせください。本臨床研究参加中に服用することが好ましくない薬があった場合には、その薬をやめていただくか、本臨床研究への参加をやめていただくことがあります。
- ② 担当医師の指示に従い、定められた来院日は必ず守るようにしてください。その際には診察や定められた検査を受けていただきます。どうしても来院できない場合には、できるだけ早く担当医師にお知らせください。
- ③ 本臨床研究期間中、今までと比べて身体の調子がおかしいと感じたときは、必ず担当医師等に相談してください。
- ④ 本臨床研究での遺伝子導入リンパ球による生殖器や胎児への影響に関する検討がなされておりません。研究ご参加期間中と終了後 5 年間は避妊することをお願いします。

19. あなたの費用負担について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わり、本臨床研究にかかる費用、たとえばレトロウイルスベクターや TCR 遺伝子導入にかかわる費用、遺伝子治療臨床研究の安全性を確認するために必要な検査の費用、および入院中の個室使用料等は当院または共同実施機関で負担します。

ただし、今回の臨床研究の期間内であっても、この研究と関係のない病状に対する治療費には、通常の診療と同じようにあなたの加入している健康保険が適用され、その医療費にかかる一部負担金はあなたの負担となります。

なお、この臨床研究の経費の一部には、共同研究先であるタカラバイオ株式会社から提供された資金が使用されています。

20. 個人情報の保護について

あなたの診療録をはじめとする個人情報は、「独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律」（平成 15 年 5 月 30 日法律第 59 号）その他関係法令に定めるものの他、「国立大学法人大阪大学の保有する個人情報の管理に関する規程」（平成 17 年 4 月 1 日施行）および「大阪大学医学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程」（平成 17 年 4 月 1 日施行）にしたがって保護されます。

本臨床研究で扱うあなたの個人情報は、主として病状の経過観察、緊急事態発生のための連絡等、あなたの生命を守るために使用します。その他、特別な目的で使用する場合には、事前にあなたに説明し、ご了解を頂いてから使用します。また、本臨床研究の成果を検討する時や、医療向上等を目的に本臨床研究の成績を公表・公開する場合には、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開します。

21. 個人情報の第三者への提供の制限について

個人情報は適切に管理し、あらかじめあなたの同意を得ることなく第三者に提供することは絶対にありません。

国の審議会における審査の過程において、厚生労働省の担当官および審議会の委員が、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。あなたの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

当院の倫理委員会における審査の過程において、審査の客観性を保つために当院以外の外部委員が、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。また、本臨床研究の客観性を保証するために当院以外の外部の監査担当者があなたの診療記録を閲覧することがあります。このような方々は第三者に相当しますので、このような場合は当院との秘密保持契約のもとで行われますので、あなたの個人情報はすべて秘密として取り扱われます。

本臨床研究では、タカラバイオという会社が外部協力者としてレトロウイル

スベクターに関する基礎的助言や TCR 遺伝子導入リンパ球の調製技術の提供・助言と遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技術提供に限定し、間接的に関与しています。調製されたリンパ球をあなたに投与した場合の安全性や機能に関する記録は、通常の治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人が特定できないように個人情報を完全に匿名化してから、タカラバイオの担当者が閲覧する可能性があります（被験者識別コードから患者さまを特定する情報については、担当医師が厳重に管理します）。

22. 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について

本臨床研究で取り扱う個人情報について、あなたは開示、訂正、利用停止を求めることができます。個人情報に関する疑問等がある場合は、担当医師にお問い合わせください。お申し出に応じ、その手続きに関する詳細を説明します。

また、担当医師とは別に個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口もございますので、疑問等がございましたらお問い合わせください。

【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

大阪大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

・個人情報の内容と開示請求について：総務課広報評価係（TEL：06-6879-5020）

・診療録開示の手続き：医事課医事係（TEL：06-6879-5206）

23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について

緊急時、またこの臨床研究について何かご心配やご質問がありましたら、下記にご連絡ください。

大阪大学大学院医学系研究科 消化器外科

TEL：06-6879-3251

休日・夜間の緊急連絡先 TEL：06-6879-5111

24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

1) 研究の正式名称：

MAGE-A 4 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) 実施施設：

大阪大学医学部附属病院

3) 総括責任者：

土岐 祐一郎：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻
外科学講座 消化器外科 教授

4) 分担研究者：

- 和田 尚：大阪大学医学部附属病院 消化器外科 臨床登録医
山崎 誠：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座
消化器外科 助教
宮田 博志：大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座
消化器外科 助教
富山 佳昭：大阪大学医学部附属病院 輸血部 部長

珠玖 洋：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
教授
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
池田 裕明：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
今井 奈緒子：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
佐藤 永一：東京医科大学 人体病理学講座 助教

臨床研究参加同意書

大阪大学医学部附属病院 病院長 殿

私は、本臨床研究（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）について、文書と口頭にて説明を受け、以下の事項について十分了解しました。

了解した事項は□内にレを付けて示します。

- ☐ はじめに
- ☐ 臨床研究について
- ☐ あなたの食道癌について
- ☐ 遺伝子治療臨床研究の概要について
- ☐ TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について
- ☐ 臨床研究の方法
- ☐ 参加できる方、参加できない方
- ☐ 臨床研究のスケジュール
- ☐ 期待される効果
- ☐ 予想される危険性および副作用
- ☐ 臨床研究への参加予定期間
- ☐ 臨床研究への参加患者数
- ☐ 他の治療法について
- ☐ 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて
- ☐ 健康被害の補償について
- ☐ 新たな情報のお知らせについて
- ☐ 遺伝子治療臨床研究の中止について
- ☐ あなたに守っていただきたいこと
- ☐ あなたの費用負担について
- ☐ 個人情報の保護について
- ☐ 個人情報の第三者への提供の制限について
- ☐ 個人情報の開示、訂正、利用停止や問い合わせ・相談・苦情の窓口について
- ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について
- ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

どちらかにレ又は○で囲む。

☐ 同意します

☐ 同意しません

同意年月日：平成 年 月 日

患者さま

ご署名：_____

説明年月日：平成 年 月 日

同席者さま

ご署名：_____

説明年月日：平成 年 月 日

総括責任者（又は分担研究者）所属・氏名：_____

説明年月日：平成 年 月 日

その他説明補助者

所属・氏名：_____



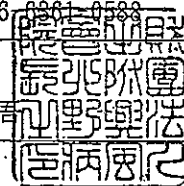
別紙様式第1

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 23年 7月 6日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所 在 地	(530-8480) 大阪市北区扇町2丁目4番20号
	名 称	財団法人田附興風会医学研究所北野病院 tel: 06-6312-1221 fax: 06-6361-0588
	代 表 者 役職名・氏名	病院長 藤井 信吾



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	消化器センター・副部長 上 田 修 吾

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成23年 7月 6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 21 年 7 月 17 日 (三重大学医学部附属病院の実施計画の承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (郵便番号 530-8480)	
	所属機関・部局・職	田附興風会医学研究所 北野病院 消化器センター 外科・副部長	
	氏 名	上田 修吾 (印)	
実施の場所	所 在 地	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (郵便番号 530-8480)	
	名 称	財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院	
	連 絡 先	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (電話番号 06-6312-8831)	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	尾崎 信弘	田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 消化器センター長	試験登録患者の診療
	珠玖 洋	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 教授	多施設共同臨床研究 代表者、臨床研究薬 品質管理者
	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
	池田 裕明	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 ター製剤の製造管理 責任者、遺伝子導入 細胞製剤の製造管理 責任者 遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価

	今井 奈緒子	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	遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価
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、遺伝子導入 細胞製剤の体内動態 検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技 術提供

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	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、平成20年12月1日一部改正））」の必要条件を満たしていると認める。 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、遺伝子導入細胞は三重大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、癌免疫療法・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。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	北野病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 心臓センター長	野原 隆司 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	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（T cell receptor：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。 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（replication competent retrovirus：RCR）、linear amplification mediated-PCR（LAM-PCR）〕	

	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 尚、本臨床研究は三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。
対象疾患及び その選定理由	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（2003 年、年齢調整）は男性 13,658 人、女性 2,742 人、死亡数（2007 年、年齢調整）は男性 9,900 人、女性 1,769 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。 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、頭頸部癌及び非小細胞肺癌等に多く発現する腫瘍抗原であり、正常組織においては HLA を発現しない精巣のみに発現する。そして、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。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、RESIST 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。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巣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。更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。
遺伝子の種類及びその導入方法	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 TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子である。 1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いる TCRα 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。TCRβ 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。 1.2. 人に導入する遺伝子の性質 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 TCRα 鎖は 14 番染色体上に、β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロータイプが存在する。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 TCRα 鎖は Vα8-1、Jα10、C であり、TCRβ 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、TCRα 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 (PPGK) によって転写される。マウス PPGK 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 PPGK は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。 TCRβ 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、胎児がん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。 1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCRα 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。

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(γ 、 δ 、 ϵ 及び ζ 鎖)が重要であり、これらとTCRとが複合体を形成している。抗原認識の際にTCR/CD3複合体とCD4・CD8が会合してCD3の活性化モチーフITAMのチロシンがリン酸化されることによりTCRのシグナルが開始される。以上のシグナルにより、T細胞の抗原特異的な上記生理活性が発現される。

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、腫瘍組織中に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。

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 のもとに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、がんであり、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 MS-bPa DNA ベクターの構築

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プラスミドである MS-bPa DNA ベクターは、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 MT DNA ベクターであり、MT DNA ベクターの 3'-LTR を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものが MS DNA ベクターである。MS DNA ベクター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 PPGK 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込むことにより MS-bPa DNA ベクターを構築した。

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 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、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。

④ レトロウイルスベクター MS-bPa の製造

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 は、バンキングされたウイルス産生細胞株 [MCB 又はワーキングセルバンク (WCB)] の培養上清を回収

	することにより製造する。製造は全て管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。 5.3. ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS-bPa はパッケージングシグナルとしてΨ+を有し、gag、pol、env をコードする配列を持たない。 5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴 パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPa 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。
安全性についての評価	1. 遺伝子導入方法の安全性 1.1. 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MS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。 ①MCB の作製法 ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより作製された Primary Seed Bank が拡大培養され、ウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA 染色法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（細胞）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 6. XC プラークアッセイ 7. マウス抗体産生試験（MAP 試験） 8. 無菌試験（日本薬局方） 9. ウシウイルス試験 10. ヒトウイルス試験 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験 13. 導入遺伝子配列解析 14. 細胞生存率試験（トリパンブルー） 15. 産生ウイルスの力価試験 16. 導入遺伝子の機能確認 ②レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法 MCB の細胞を拡大培養した後、培地を交換し翌日に培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。回収した培養上清液を 0.22 μm のミリポアフィルターで濾過滅菌した後、ウイルスベクターとして凍結保存バックに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。以下の品質試験を行う。 1. マイコプラズマ否定試験（培養法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）

5. 無菌試験（日本薬局方）
6. エンドトキシン試験（日本薬局方）
7. 導入遺伝子配列解析
8. 産生ウイルスの力価試験
9. 導入遺伝子の機能確認

1.2. 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS-bPaによりTCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した患者由来Tリンパ球である。

1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性

①レトロウイルスベクターの安全性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターMS-bPaのゲノムはMoMLV由来のgag、pol、envをコードする遺伝子を完全に欠如している。また、パッケージング細胞株としてPG13を用いるので、RCRの出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクターMS-bPaの試験項目にRCR試験が含まれており、RCR陰性のレトロウイルスベクターを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中のRCRを測定する。

②パッケージング細胞の安全性

レトロウイルスベクターMS-bPaを作製する際に使用されるパッケージング細胞PG13は、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極めて低い。すなわち、パッケージングに必要なウイルス遺伝子がpLGP5及びpMOV-GaLV Seato envという2個のDNA断片として別々に導入されていることに加え、どちらのDNA断片も Ψ パッケージングシグナルと3'-LTRを欠失しているため、gag-pol遺伝子やenv遺伝子がウイルス粒子内にパッケージングされて細胞外に出ることはない。

PG13と同じ第3世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株GP+envAml2を用いて産生したレトロウイルスベクター中にRCRを検出したことが1996年にChongらにより初めて報告された。RCR出現の頻度を測定することは困難であるが、過去4年間、GP+envAml2細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60以上のウイルスについてRCRチェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている。なお、PG13を用いてレトロウイルスベクターを作製する過程でRCRが出現したという報告はない。

1.4. 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・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがあるが、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。

1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、患者Tリンパ球にex vivo（生体外）でTCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用したレトロウイルスベクターMS-bPaはこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されと考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化されるため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することなく、RCRが出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

1.6. 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、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、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、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラス II 安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。レトロウイルスベクター MS-bPa 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導入が起こる可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。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細胞は死に至る可能性がある。ただし、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、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの LTR が有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

1.8. がん原性の有無

レトロウイルスベクターの染色体への組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には、上述のとおり異常増殖によるがん化の問題が出現する。実際に、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) のフランスでの遺伝子治療において、合計 4 例の白血病発症が報告されている。本臨床研究における遺伝子導入標的細胞である成熟 T リンパ球のがん化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、ICH の遺伝子治療専門家グループから出されている。過去に実施された T 細胞を遺伝子導入の標的細胞とした遺伝子治療において、遺伝子導入細胞のがん化は報告されていない。また、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した T リンパ球を投与した 46 例のフォローアップ（最長 9 年間）において、遺伝子導入 T リンパ球のクローン増殖が認められなかったとの報告がある。なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖を LAM-PCR によってモニタリングして、遺伝子導入細胞の異常増殖の有無を評価する。

2. 遺伝子産物の安全性

導入遺伝子の産物は、可変領域の配列に違いがあるものの、標的細胞である T 細胞は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。Ex vivo で培養、増殖させた T 細胞クローンを大量に投与する臨床試験において、重大な有害事象は併用した化学療法剤又は IL-2 によるものだけであったとの報告がある。このことから、特定の TCR 可変領域を持つ T 細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たに MAGE-A4 に対する TCR 遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において 2 種類の配列の α 鎖及び β 鎖が発現する。このため、(1) 予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成、(2) 自己抗原特異的 TCR を有する無応答 T 細胞の、導入された TCR からの刺激による活性化及び (3) 腫瘍抗原ペプチドと HLA 分子との複合体が、自己抗原ペプチドと患者の HLA アレル（対立遺伝子）との複合体の立体構造に酷似していることによる、自己細胞の攻撃、のいずれかのメカニズムにより、理論的には自己免疫疾患を発症する可能性が指摘されている。

ただし、メラノーマ抗原に対する TCR 遺伝子を用いた臨床試験において遺伝子導入細胞による毒性は認められていないことから、TCR 遺伝子を導入した T 細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

3. 細胞の安全性

3.1. 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す遺伝子導入細胞の調製にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置された P2 レベルの細胞調製施設内で行う。また、細胞調製操作時には、品質が確認された試薬、培地類を使用し、清浄度クラス 100、クラス II 安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

遺伝子導入 T リンパ球調製工程の概略は以下に示すとおりである。すなわち、OKT3 及び組換えヒト IL-2 を含む培地で患者リンパ球の培養を開始し、レトロウイルスベクター MS-bPa を結合させたレトロネクチン CH-296 コートバッグに上記活性化 T リンパ球懸濁液を添加して遠心することにより遺伝子導入を合計 2 回行い、拡大培養後に細胞を洗浄・濃縮・回収するというものである。こうして得られた細胞懸濁液に凍害保護液を添加し、凍結保存バッグに移した後、凍結保存する。

3.2. 培養細胞の純度

遺伝子導入後の細胞中に遺伝子導入されていない T リンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題はないと考えられる。また、細胞培養の際に使用する原材料の残留は極めて微量であり、これらが生体に及ぼす影響は限りなく少ない。TCR 遺伝子導入リンパ球は、「3.4. 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

3.3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクター MS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞のがん化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である。OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を ex vivo で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。Sauce らは、PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で ex vivo にて培養すると、リンパ球の表現型が変化するが、レトロウイルスベクターの感染による変化は特に認められないことを報告している。ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない。また、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6 日から 9 日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている。本計画においても同様に短期間培養した遺伝子導入 T リンパ球を使用する予定である。

3.4. 被験者に投与する細胞の安全性

以下の試験を行うことにより遺伝子導入細胞の品質を担保する。安全性が確認されるまで凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)
2. RCR 試験 (RT-PCR 法)
3. 無菌試験 (日本薬局方)
4. エンドトキシン試験 (日本薬局方)
5. 細胞生存率試験 (トリパンブルー)

	6. 細胞数試験 7. 遺伝子導入効率試験 8. 導入遺伝子の機能試験
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	以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。 ①臨床ニーズ 再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。 ②品質・安全性 本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 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を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。 本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによるがん化のリスクは極めて低く、対象疾患とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。 免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球と比較して、遺伝子導入に起因する毒性所見は観察されなかった。 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg らのグループで既に実績がある。 ③期待される有効性 三重大学にて調製された 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 <i>in vitro</i> において確認されている。また、免疫不全マウスに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に特異的な腫瘍径増大抑制効果が認められた。 NIH の Rosenberg らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例 (12%) に PR (部分奏功) を認めており、更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。 従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。 ④当施設・研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者（上田修吾、尾崎信弘）は対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験（手術 約 40 例、化学療法 約 30 例）及び臨床研究（CHP がんワクチン臨床試験、抗癌剤感受性に関する研究：文部科学省科学研究費）に対する知識を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。 ⑤臨床研究薬の調製 被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。 ⑥安全・効果評価・適応判定中央部会 本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。

	そのため、各医療機関から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。
実施計画	1. 本臨床研究の実施手順 治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。 北野病院においてアフレーシスにて自己 PBL を採取し、三重大大学細胞調製施設に搬送する。三重大大学細胞調製施設で自己 PBL に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを認識する TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られた TCR 遺伝子導入リンパ球を ex vivo 培養し、一旦凍結保存する。 三重大大学細胞調製施設にて調製した TCR 遺伝子導入リンパ球の品質が確認された後、北野病院に TCR 遺伝子導入リンパ球が提供される。二次登録の前に再度文書にて同意を取得し、二次登録時の選択基準を満たし、除外基準に抵触しないことを確認したうえで本臨床研究への二次登録を行う。 TCR 遺伝子導入リンパ球（単回投与）を経静脈的に投与する。 1 日投与量 300 μg の MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの懸濁液を、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日間の計 2 回、皮下投与する。 追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性（有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR）、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を評価する。 TCR 遺伝子導入リンパ球投与後 63 日目に本臨床研究を終了とする。 <u>TCR 遺伝子導入リンパ球数の設定</u> 投与する TCR 遺伝子導入リンパ球数は 1 回投与量 2×10^8 個、1×10^9 個、5×10^9 個の各コホート別とする。各コホートは 3 例とし、1 回投与量を 1×10^8 個、5×10^9 個へと増加させる。ただし、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を増加し、安全性の評価を強化する。 2. 被験者の選択基準及び除外基準 選択基準（一次登録）： 以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性の臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM 分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者 3) HLA-A2402 陽性の患者 4) PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認されている患者 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患者 6) ECOG Performance Status 0～1 の患者 7) 本臨床研究参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の患者 8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経過が見込める患者 9) 同意取得後 4 ヶ月以上の生命予後が見込める患者 10) 主要臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者 ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$ ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$ ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$ ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$ ・総ビリルビン（T-Bil）$\leq 2.0 \text{ mg/dL}$ ・AST（GOT）、ALT（GPT）$\leq 150 \text{ IU/dL}$ ・クレアチニン（Cr）$\leq 2.0 \text{ mg/dL}$ ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラスⅠ分子発現が確認されている患者

12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準（一次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・ 不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・ コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・ 活動性の感染症
 - ・ 胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・ 自己免疫疾患
 - ・ 出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) < 50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 sec、フィブリノゲン (Fbg) < 100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) > 20 μ g/mL〕
 - ・ 血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体のいずれかが陽性である患者
- 4) コントロール不能な胸水・腹水・心臓水を有する患者
- 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 7) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 8) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者 (ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)
- 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験 (臨床研究) に参加している患者
- 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者

選択基準（二次登録）：

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量 (2×10^8 個) の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要なとされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器 (骨髄、心、肺、肝、腎等) に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす患者
 - ・ 白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・ 好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・ 血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・ 総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・ AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・ クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・ 動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94% 以上
- 5) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準（二次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・ 不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・ コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・ 活動性の感染症

	・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症 ・自己免疫疾患 ・出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) <50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) >60 sec、フィブリノゲン (Fbg) <100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) >20 μg/mL〕 ・血栓形成傾向 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者 4) 制御困難な脳内転移を有する患者 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者 6) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者(例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者) 7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者 8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者(ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない) 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた患者 3. 被験者の同意の取得方法 本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、北野病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を説明の前又は説明するときに渡し、内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する(文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計 2 回行う)。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。 4. 実施期間及び目標症例数 実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点(2009 年 7 月 17 日)から 3 年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後 63 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり、遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発がんや RCR の有無について追跡調査を実施する。 目標症例数は以下のとおり全施設の症例を合わせて 9 例とするが、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を最大 6 例まで増加し、安全性の評価を強化する。 <u>1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量</u> <table border="1"> <tr> <td>コホート 1</td> <td>2×10⁸個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 2</td> <td>1×10⁹個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 3</td> <td>5×10⁹個</td> <td>3 例</td> </tr> </table> 5. 臨床検査項目及び観察項目 検査・観察スケジュール(別紙)に定められたとおりに検査・観察を実施する。	コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例	コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例	コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例
コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例								
コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例								
コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例								
備 考										

(別紙) 検査・観察スケジュール

臨床研究期間	スクリーニング期間		治療期間										追跡調査期間
	同意取得日	アフェレーシス実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	day63 ±3
入院		○	○				→	○	→	○	→		
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフェレーシス		○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド 投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧・動 脈血酸素飽和度	○		○										
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○												
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○ ²									○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
尿検査	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}									○ ⁴	○ ⁴
胸部 X 線検査	○		○ ²									○	○ ⁵
12 誘導心電図	○		○ ²									○	○ ⁵
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
PET-CT			○ ³									○	○ ⁵
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
腫瘍組織生検			○ ³									○	○ ⁵
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁶			○ ⁷	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ ²					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ ³									○	○ ⁵
RCR ⁸				○ ⁸								○	○
LAM-PCR ⁶												○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70
有害事象			←										→

*アフェレーシス実施日より約 40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. TCR 遺伝子導入リンパ球投与前 (治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする)、投与 1 時間後、3 時間後、6 時間 (± 2 時間) 後、及び 12 時間 (± 2 時間) 後。
8. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。