

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

平成 25 年 3 月 5 日
大臣官房厚生科学課

三重大学医学部附属病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画については、遺伝子治療臨床研究に関する指針（以下、「指針」という。）第五章第一の三の規定に基づき、複数の有識者に意見を伺った結果、新規性はなく、指針第五章第一の三のいずれの項目にも該当しないものと判断された。

上記の意見を踏まえ、当該実施計画に係る厚生労働大臣の意見としては実施して差し支えないものと判断したので、別紙のとおり報告する。

記

1. 免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究
申請者：三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛
申請日：平成 25 年 1 月 25 日

1: 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名: 免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

(2) 申請年月日: 平成 25 年 1 月 25 日

(3) 実施施設: 三重大学医学部附属病院

代表者: 三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛

(4) 総括責任者: 三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座
大学教員 珠玖 洋

(5) 対象疾患: 食道癌

導入遺伝子: MAGE-A4 抗原特異的 T 細胞受容体(TCR) α 鎖及び β 鎖遺伝子
ベクターの種類: レトロウイルスベクター

用法・用量: 腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した自己リンパ球を経静脈的に投与する。また、投与 5 日前より 3 日間、1 日 1 回シクロホスファミドによる前処置を行う。TCR 遺伝子導入リンパ球の投与量は 1×10^9 個及び 5×10^9 個とし、 5×10^9 個についてはシクロホスファミドの投与量が異なる 3 コホートが存在する。

研究実施期間: 厚生労働大臣より了承された日から 2 年間

目標症例数: 12 例 (各コホート 3 例)

(6) 研究の概略:

本研究は、標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、シクロホスファミド投与による免疫抑制性前処置を行い、腫瘍抗原 MAGE-A4 をヒト白血球抗原(HLA)-A*24:02 存在下で特異的に認識する TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球) を輸注し、その安全性を評価することを主要評価項目とする。また、副次評価項目として、TCR 遺伝子導入 T 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、並びに腫瘍縮小効果を評価する。

(7) その他:

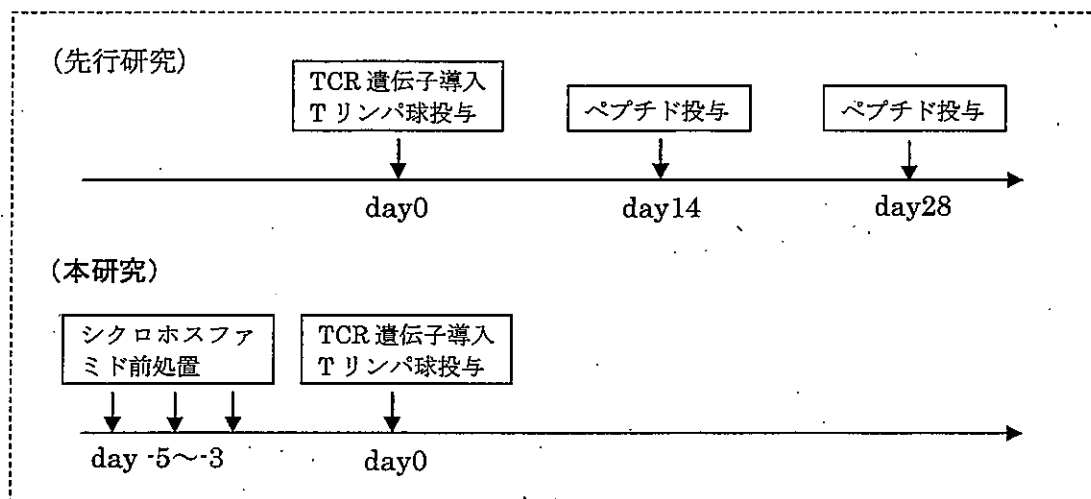
本研究は、現在三重大学医学部附属病院において実施されている遺伝子治療臨床研究「MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究」(平成 21 年 7 月 17 日厚生労働大臣承認。平成 25 年 1 月 11 日時点で 9 症例に実施済み。以下「先行研究」という。)を発展させた研究と

位置づけられている。

対象疾患、使用するベクター、患者リンパ球への遺伝子導入方法はすべて先行研究と同一である。また、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与量も、先行研究の中用量群及び高用量群と同一であり、先行研究が終了し安全性が確認された後に本研究を開始するとされている。

一方、先行研究と異なり、本研究では、治療効果の増強を目的として、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与前に化学療法剤シクロホスファミドによる前処置を行う。なお、先行研究で実施している TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後の MAGE-A4 ペプチドの投与は行わない。

【参考】投与スケジュールの比較



2. 有識者の意見

1) 意見を伺った有識者

荒戸 照世	北海道大学大学院医学研究科 教授
大橋 十也	東京慈恵会医科大学DNA医学研究所 教授
小野寺 雅史	国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
斎藤 泉	東京大学医科学研究所遺伝子解析施設 教授
島田 隆	日本医科大学医学部 教授
谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
那須 保友	岡山大学病院新医療研究開発センター 教授
水口 裕之	大阪大学大学院薬学研究科分子生物学分野 教授
山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 研究員

2) 有識者の意見

いずれの有識者からも、本臨床研究実施計画については、新規性はなく、指針第五章第一の三のいずれの項目にも該当しないものと判断された。

【有識者からの主な意見】

- 本研究における遺伝子導入の方法、遺伝子導入細胞の用法・用量等は、すでに実施されている先行研究と同じであり、特段新しいものではない。
- シクロホスファミドによる前処置は、homeostatic proliferation と呼ばれる現象を利用して、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与による治療効果の増強を期待して行われるものである。当該手法は、古くから国内外の多くのリンパ球輸注療法において行われているものであり、それに用いる薬剤としてシクロホスファミドは最もよく使用されている。前処置に伴う有害事象として、骨髄抑制による感染症等、あるいは、上記の効果増強により免疫状態が活性化されることによる遅延型アナフィラキシー等が考えられ、一定の注意は必要であるものの、新規性はないものと考えられる。
- なお、新規性の判断には影響しないと考えられるが、先行研究で実施されている、MAGE-A4 ペプチドの投与を行わない点については、その理由や、先行研究における途中経過の状況を説明すること。

→ その後、申請者からは、先行研究においては動物実験等から期待されたペプチド投与による増強効果は明らかでないこと、ただし、この点についてはデータが限られていることから今後の検証が必要であり、本研究との比較によりペプチド投与の意義を示唆するデータが得られる可能性も期待されること、等が説明された。

当該説明に対し、有識者からは、新規性の判断は変わらないものと判断された。

3. 厚生労働大臣の意見

上記2の有識者の意見を踏まえ、本臨床研究実施計画については、新規性はなく、指針第五章第一の三のいずれの項目にも該当しないことから、厚生労働大臣の意見としては実施して差し支えないものと判断し、平成25年2月26日付で申請者に通知した。

【参照】遺伝子治療臨床研究に関する指針

第五章 厚生労働大臣の意見等

第一 厚生労働大臣の意見

三 厚生労働大臣は、二に基づき意見を求められた場合において、複数の有識者の意見を踏まえ、当該遺伝子治療臨床研究が次に掲げる事項のいずれかに該当すると判断するときは、当該遺伝子治療臨床研究の医療上の有用性及び倫理性について厚生科学審議会の意見を聴くものとする。

1 疾病の治療のための遺伝子が組み込まれたDNA又はこれを含むウイルスその他の粒子であつて、当該遺伝子を細胞内に導入する際に用いられる新規のもの又は新規の遺伝子投与方法を用いていること。

2 新規の疾病を対象としていること。

3 新規の遺伝子治療方法を用いていること（1又は2に該当するものを除く。）。

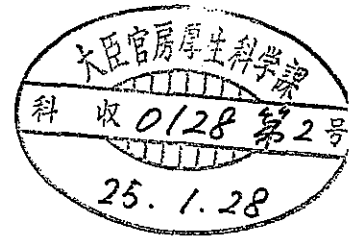
4 その他個別の審査を必要とするような事項を含んでいること。

四 厚生労働大臣は、三の規定による厚生科学審議会からの意見の聴取が必要ないと判断する場合には、意見を求められた日から三十日以内に、当該遺伝子治療臨床研究の実施に関し意見を述べるものとする。

正 本

別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書



平成 25 年 1 月 25 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (郵便番号 514-8507)
	名称	国立大学法人三重大学医学部附属病院 (電話番号 059-232-1111) (FAX 番号 059-321-5276)
	代表者 役職名・氏名	国立大学法人三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛

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
免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 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	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 大学教員 珠玖 洋

(

(

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成 25 年 1 月 25 日

(申請年月日)

研究の名称	免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 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	承認日から 2 年間

総括責任者	所属部局 の所在地	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (郵便番号 514-8507)	
	所属機関・ 部局・職	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座・大学教員	
	氏 名	珠玖 洋 	
実施の場所	所 在 地	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (郵便番号 514-8507)	
	名 称	三重大学医学部附属病院	
	連 絡 先	三重県津市江戸橋二丁目 174 番地 (電話番号 059-231-5187) 遺伝子・免疫細胞治療学講座	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 准教授	レトロウイルスベクター製剤の品質管理責任者、遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者、試験登録患者の診療
	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、試験登録患者の診療
	宮原 慶裕	三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン講座 講師	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び免疫反応の評価、試験登録患者の診療
	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、試験登録患者の診療
	石原 幹也	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 医員	試験登録患者の診療
	片山 直之	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 教授 三重大学医学部附属病院 血液内科、腫瘍内科 科長	試験登録患者の診療

	中瀬 一則	三重大学医学部附属病院 がんセンター 准教授 センター長	試験登録患者の診療
	榎屋 正浩	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 准教授	試験登録患者の診療
	杵本 由香	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 助教	試験登録患者の診療
	藤枝 敦史	三重大学医学部附属病院 血液内科 助教	試験登録患者の診療
	門間 文彦	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 助教	試験登録患者の診療
	水野 聡朗	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 講師	試験登録患者の診療
	齋藤 佳菜子	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教	試験登録患者の診療
	大石 晃嗣	三重大学医学部附属病院 輸血部 講師 部長	アフェレーシスの管理
	濱田 康彦	三重大学医学部附属病院 光学医療診療部 助教	試験登録患者の診療
	白石 泰三	三重大学大学院医学系研究科 基礎医学系講座 腫瘍病理学 教授	病理組織学的診断
	佐藤 永一	東京医科大学 人体病理学講座 講師	病理組織学的診断
外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	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	審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書を審査した結果、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日文部科学省・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）」の求める必要な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が低く、対象疾患での利益が不利益を上回ることが十分予測されるものであった。また本臨床研究実施計画以前に実施されている「MAGE-A4抗原特異的TCR 遺伝子導入T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」では、遺伝子治療に関係のある重篤な有害事象は、現在までのところ観察
------------------------	--

	されていない。また、遺伝子導入細胞は本学内の細胞調製施設においてGMP基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。本臨床研究を担当する研究者は遺伝子ベクター調製、細胞治療等の経験者であり、計画施行に適切な構成である。 以上より、本臨床研究の実施は適当と認める。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	三重大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会・委員長 三重大学大学院医学系研究科・臨床医学系講座・検査医学分野・教授	登 勉 

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、シクロホスファミド投与による免疫抑制性前処置を行い、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A*24:02 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 T リンパ球）を輸注し、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) 主要評価項目 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) 副次評価項目 a) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤 b) 腫瘍特異的免疫反応 c) 腫瘍縮小効果	
対象疾患及びその選定理由	1. 対象疾患及び被験者 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のうち、HLA-A*24:02 陽性かつ腫瘍組織に MAGE-A4 の発現が確認されている患者。 2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要 被験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を導入する。その後、遺伝子導入リンパ球の投与前にシクロホスファミド投与による免疫抑制性前処置を行い、輸注リンパ球の体内での増殖と抗腫瘍効果の増強を図る。なお、本臨床研究は、HLA-A*24:02 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 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を期待するものである。 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。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、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。
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 TCRα 鎖遺伝子は、TCRα 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCRα 8-1 である。本遺伝子は HLA-A*24:02 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、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。 TCRβ 鎖遺伝子は、TCRβ 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCRβ 7-9 である。本遺伝子は HLA-A*24:02 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド特異的な CTL クローン #2-28 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。 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。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 TCRα 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 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 (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 TCRα 鎖は Vα 8-1、Jα 10、C であり、TCRβ 鎖は Vβ 7-9、Jβ 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、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 (P_{PGK}) によって転写される。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。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 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。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 領域の構造をとり、PCMV 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。なお、PCMV の U3 領域は、MoMLV と比較して一部分が欠失、点変異しており、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。

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、アナジ一の誘導、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、 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。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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体の認識が起こると、複合体を形成した CD3 分子群を通して遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞の分裂・増殖、IFN- γ をはじめとしたサイトカインの産生、及びグランザイム B、パーフォリン等の細胞傷害性分子の放出が起こり、標的細胞の破壊を導く。

2. 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では使用しない。

3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

本臨床研究における標的細胞は、治療抵抗性食道癌患者（HLA-A*24:02 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-A*24:02 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。

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：peripheral blood lymphocyte，以下同じ）へ TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するために、レトロネクチン CH-296 をコートした培養バッグ中にて、T リンパ球をレトロウイルスベクター MS-bPa に感染させる。

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低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。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 $1.5/1 \times 10^4$ 又は $1/1 \times 10^4$ 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は $1/1 \times 10^3 \sim 5$ 程度であると報告されている。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、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。

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 (orthoretrovirus) 及びスプーレトロウイルス (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。

5.2 ウイルスベクターの作製方法

5.2.1 ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa の構築

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 である。

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。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。

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

	TCRα 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。得られた pMS-bPa の全塩基配列解析を実施し、予期せぬ変異等が含まれていないことを確認した。 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) 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。 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。 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が存在する。 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。 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。
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 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。

1.1.1 MCB の作製法

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、PG-4 S+L-アッセイ）
5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅、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

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な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。

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。

Virus supernatant

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（細胞及び上清）（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 被験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。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。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。

1.3 増殖性ウイルス出現の可能性

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、一過性にエコ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。

1.3.2 パッケージング細胞の安全性

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。

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・増殖に必要な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうる。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。

1.5 体内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 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い、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 被験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、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。

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。

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。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。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。

なお、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 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。

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 と同様の蛋白である。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 件の臨床試験において、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 による有害事象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 を併用したものであり、血液学的又はそれ以外の有害事象 (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 を単独で使用した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少ないと考えられる。

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である細胞の大半は TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たに WT1 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。

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 TCR 2

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。その後、メラノサイト分化抗原 MART-1 及び gp100 に対する高親和性 TCR 遺伝子を用いた転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、これらの抗原を発現する正常組織（皮膚、眼、内耳）に対する傷害性が報告されたがいずれも生命に危機をもたらすものでなくコントロール可能であった。また、CEA を標的抗原とする大腸癌を対象にした臨床試験において腫瘍縮小の効果がみられる一方で、一時的ではあるが重篤な有害事象として正常な大腸粘膜への傷害性が報告されている。しかし、癌精巣抗原である NY-ESO-1 を標的にした転移性滑膜細胞肉腫、転移性悪性黒色腫患者への遺伝子導入自己リンパ球輸注臨床試験では、腫瘍縮小効果などの臨床効果がみられ、安全性についてはリンパ球輸注に併用した前処置あるいは IL-2 投与による副作用以外、遺伝子導入リンパ球輸注に関係する有害事象の発生はなかったと報告されている。

以上のことから、TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注における副作用は、腫瘍組織に発現する標的抗原に対する特異性に大きく関与すると考えられる。本臨床試験では、腫瘍組織への発現の特異性が高い癌精巣抗原 MAGE-A4 を標的とするものであり、オンターゲット効果としての副作用の発生は少ないと予測される。

3. 細胞の安全性

3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

細胞培養にかかわる以下の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、他の被験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（ 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。

患者からのリンパ球と血漿の採取は、三重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細胞調製施設内に持ち込み、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-T-Retro III、600 IU/mL rhIL-2、1% 非働化患者血漿、60 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン及び 2.5 μ 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℃、5% CO₂ 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 μg/mL) を添加して薬用保冷庫にて保存する。

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 × g、32℃、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 × g、32 ± 3℃ 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 × g、32 ± 3℃ で 10 分間遠心する。遺伝子導入操作後、4 時間、5% CO₂ 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℃、5% CO₂ 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 $0.5(\pm 0.05) \times 10^6$ 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、 $1.6 \sim 10 \times 10^7$ 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。

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。

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。

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、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。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。

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。

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。 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。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。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。 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 TCRα 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。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. 導入遺伝子機能確認試験 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。
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した。 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本臨床研究の品質・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 T 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。 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 T 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。 なお、本臨床研究にて行われるシクロホスファミドの前処置は、リンパ腫、白血病の治療、あるいは末梢血造血幹細胞の採取に用いられている用量の範囲内のものであり、十分に安全性を確保した実施に問題はない。 ③本臨床研究の期待される有効性 当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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 <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 MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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。 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 T 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、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) 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おり、また、癌精巣抗原 NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、滑膜細胞肉腫患者 6 名中 4 名 (67%)、及び悪性黒色腫患者 11 名中 5 名 (45%) に臨床反応 (PR+CR) を認めたことを報告している。 したがって、本臨床研究においても抗腫瘍効果が見込まれると考えられる。 ④当施設における研究者の能力 当施設内に設置された細胞調製施設は GMP 準拠で運営・管理される体制にあり、TCR 遺伝子導入 T リンパ球は同基準に準拠して調製される。 本臨床研究の研究者は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフエーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び当施設における T 細胞輸注療法臨床試験、遺伝子治療臨床試験、造血幹細胞移植を含む血液疾患治療の経験者、悪性腫瘍の化学療法の経験者により構成される。
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。 アフエーシスにて採取した自己 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 T リンパ球を <i>ex vivo</i> 培養し、一旦凍結保存する。 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製を終了し、安全性を確認した時点で、二次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への二次登録を行う。 二次登録完了後、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 5 日前より 3 日間、1 日 1 回シクロホスファミドによる前処置を行う。なお、必要に応じてシクロホスファミドによる副作用予防・軽減目的のため抗菌薬、制吐剤の投与など各種支持療法を実施する。

前処置開始から5日後に、TCR 遺伝子導入 T リンパ球 (単回投与) を経静脈的に投与する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後 28 日目に、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 T 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し、有害事象等が継続していない様であれば本臨床研究を終了とする。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球数の設定

投与する TCR 遺伝子導入 T リンパ球数は 1 回投与量 1×10^9 個、 5×10^9 個とする。 1×10^9 個のコホートにおいて安全性が確認された後に、 5×10^9 個へと増加させる。なお、投与量 5×10^9 個については 3 群存在し、前処置薬であるシクロホスファミドの投与量が異なっている。

2. 被験者の選択基準及び除外基準

2.1 一次登録

患者より文書同意取得後、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たうえで、一次登録を行う。

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-A*24:02 陽性の患者
- 4) PCR 法又は免疫組織染色法にて腫瘍組織に 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) 終了から十分な回復が見込める患者
- 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	3,000/mm ³
・ヘモグロビン	≥ 8.0 g/dL
・血小板数	≥ 100,000/mm ³
・総ビリルビン (T-Bil)	≤ 1.5×施設基準値上限
・AST (GOT)、ALT (GPT)	≤ 3.0×施設基準値上限
・クレアチニン (Cr)	≤ 1.5×施設基準値上限
・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度	94%以上
・左室駆出率 (LVEF)	≥ 50%
・推定糸球体濾過量 (eGFR) ≥ 50 mL/分/1.73m ² 、または クレアチニンクリアランス (CCr) ≥ 50 mL/min	

- 11) 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

*: MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、定量的 RT-PCR 法の場合、GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とし、免疫組織染色法の場合、腫瘍組織切片中の細胞で染色が認められることとする。

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被験者は除外する。

- 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）
- ・血栓形成を有する患者

- 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) シクロホスファミド投与により重篤な副作用が予想される患者
- 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

2.2 二次登録

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前に再度文書にて同意を取得する。その後、二次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、二次登録を行う。

2.2.1 選択基準（二次登録）

以下の全ての基準を満たす被験者を対象とする。

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製が完了した患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要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 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・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） $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
 - ・AST（GOT）、ALT（GPT） $\leq 3.0 \times$ 施設基準値上限
 - ・クレアチニン（Cr） $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
 - ・左室駆出率（LVEF） $\geq 50\%$
 - ・推定糸球体濾過量（eGFR） $\geq 50 \text{ mL/分/1.73m}^2$ 、またはクレアチニンクリアランス（CCr） $\geq 50\text{mL/min}$
- 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

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被験者は除外する。

- 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）

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)

・血栓形成を有する患者

- 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) シクロホスファミド投与により重篤な副作用が予想される患者
- 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、三重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立ち会い、説明補助を行うことも可能とし、適切な環境下での同意を取得することとする。

4. 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から2年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後 28 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 12 例とするが、因果関係が否定できない重篤な有害事象が発現した場合には、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。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸注量とシクロホスファミドの投与量

	症例数	輸注量	シクロホスファミド 投与量
コホート 1	3 症例	1×10^9 cells	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 2	3 症例	5×10^9 cells	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 3	3 症例	5×10^9 cells	500 mg/m ² /day × 3 日
コホート 4	3 症例	5×10^9 cells	600 mg/m ² /day × 3 日

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。これらの項目で、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与以降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）又は疾患のことを有害事象とする。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を調査する。有害事象のグレードは、2009 年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events

	v4.02 (CTCAE v4.02) 有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2009 年 12 月 28 日」に従い、判定を行う。 6. 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会 安全・効果評価・適応判定部会は、本臨床研究の安全性及び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遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。 7. 個人情報の保護の徹底 三重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（情報公開・個人情報担当）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。三重大学医学部附属病院においては、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、三重大学医学部附属病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程（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。保護管理者である三重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で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。
備 考	本臨床研究は「MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 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」の登録が終了後に、実施する。

(別紙) 検査・観察スケジュール

	同意 取得日	アフェレンス 実施日	二次 登録時 day -12～-5	day		T リンパ 球投与日 (day0)		day						終了・ 中止時 day28	追跡 調査 ※5
				-4	-3	投与前 ※2	投与後	.1	2	3	7	14	21		
同意取得	●		●												
被験者登録	●														
被験者背景	●														
アフェレンス		●													
前処置			●	●	●										
シクロスポリム® 投与															
TCR 遺伝子導入						●									
T リンパ 球投与															
問診、PS、SpO ₂ 、 バイタルサイン	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●		
感染症検査	●														
血液・尿検査	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●		
胸部 X 線検査	●		●											●	
12 誘導心電図	●		●											●	
頸部・胸部・腹部・ 骨盤 CT	●※1		●											●	
PET-CT			●											●	
上部消化管 内視鏡検査	●※1		●											●	
腫瘍組織生検			●											●	
血中動態測定			●			●	●※3	●	●	●	●	●	●	●	
免疫機能解析			●									●		●	
TCR 遺伝子導入 T リンパ 球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			●											●	
血中サイトカイン測定			●			●	●※3	●	●	●	●	●	●	●	
LAM-PCR			●											●	
RCR の測定			●					●						●	
長期保存用 検体の採血			●			●								●	
採血量 (ml)	13	10	50			40	80	35	30	30	30	30	30	50	
免疫機能解析用 採血量 (ml) ※4			20 ～ 50									20 ～ 50		20 ～ 50	
有害事象※5															

※1：同意取得日から12週間以内の成績の利用を可とする。

※2: TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前日に各検査を実施することを可とする。

※3: TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後に行う。

※4：被験者の Hb 値を考慮したうえで採血量を決定する。

※5：1年に1度の頻度でFDAガイドラインに従い、最短15年にわたり検査を実施する。

※6：前処置開始以降に発現したものを有害事象として取り扱う

遺伝子治療臨床研究実施計画書

課題名「免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的
TCR 遺伝子導入 T 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」

三重大学医学部附属病院

第 1 版：平成 24 年 10 月 1 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
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 前処置を併用する理由	17
V.5.1 前処置を併用する根拠	17
V.5.2 前処置の設定根拠	18
VI. 遺伝子の種類及びその導入方法	20
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	20
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造	20
VI.1.1.1 T細胞受容体 (TCR) α 鎖遺伝子	20
VI.1.1.2 T細胞受容体 (TCR) β 鎖遺伝子	22
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	24
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	24
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	26
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	26
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	26
VI.4.1 遺伝子導入方法の概略	26
VI.4.2 当該導入法を選択した理由	26
VI.4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠	27
VI.5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	27
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	27
VI.5.2 ウイルスベクターの作製方法	28
VI.5.2.1 ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa の構築	28

VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築	35
VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築	35
VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造	36
VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造	36
VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴	36
VII. 安全性についての評価（ウイルスベクター、遺伝子産物、細胞及び前処置）	37
VII. 1 遺伝子導入方法の安全性	37
VII. 1. 1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	37
VII. 1. 1. 1 MCB の作製法	37
VII. 1. 1. 2 レトロウイルスベクターMs-bPa の製造方法	38
VII. 1. 2 患者に投与する物質の純度及びその安全性	40
VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性	40
VII. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性	40
VII. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性	40
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	44
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	44
VII. 1. 6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	45
VII. 1. 7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	45
VII. 1. 8 癌原性の有無	45
VII. 2 遺伝子産物の安全性	47
VII. 3 細胞の安全性	48
VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法	48
VII. 3. 2 培養細胞の純度	51
VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性	52
VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性	53
VII. 4 同じレトロウイルスベクターを使用した国内の臨床研究における安全性	54
VII. 5 前処置の安全性	54
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	55
IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	57
IX. 1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	57
IX. 1. 1 本臨床研究の実施に際し三重大学医学部附属病院内に設置される委員会	57
IX. 1. 1. 1 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会	57
IX. 1. 1. 2 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会	57
IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順	58
IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準	60

IX. 2. 1 一次登録	60
IX. 2. 1. 1 選択基準（一次登録）	60
IX. 2. 1. 2 除外基準（一次登録）	61
IX. 2. 2 二次登録	61
IX. 2. 2. 1 選択基準（二次登録）	62
IX. 2. 2. 2 除外基準（二次登録）	62
IX. 3 被験者の同意の取得方法	63
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 T リンパ球の調製	65
IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与	65
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 支持療法	65
IX. 5. 3. 3 併用禁止療法及び併用禁止薬	66
IX. 5. 4 臨床検査項目及び観察項目	66
IX. 5. 5 予測される副作用及びその対処方法	75
IX. 5. 5. 1 アフェレーシスに伴う副作用	75
IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注に伴う副作用	76
IX. 5. 5. 3 前処置による副作用	76
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	77
IX. 5. 6. 1 主要評価項目	77
IX. 5. 6. 2 副次的評価項目	78
IX. 5. 6. 3 中止基準	80
IX. 5. 7 有害事象が発現した場合の措置	81
IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合	81
IX. 5. 7. 2 重篤な有害事象が発現した場合	81
IX. 5. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式	81
IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法	82
IX. 5. 10 個人情報の保護の徹底	82
IX. 5. 10. 1 個人情報保護に関する責務	82

IX. 5. 10. 2 個人情報の取得と利用に関する制限	82
IX. 5. 10. 3 個人情報保護に関する安全管理措置	84
IX. 5. 10. 4 第三者提供の制限	84
IX. 5. 10. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等	85
X. その他必要な事項	86
X. 1 遵守する法令/省令等	86
X. 2 引用文献	87
X. 3 検査・観察スケジュール	94
X. 4 TNM 病期分類 (TNM Classification of Malignant Tumours)	95
X. 5 Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG))	96
X. 6 RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)	97
X. 7 同意・説明文書	99

<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: 遺伝子導入細胞調製に使用する培地等の資料
- 参考資料 10: 遺伝子導入細胞試験成績書
- 参考資料 11: 遺伝子導入調製細胞構成

参考資料 12 : FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1

参考資料 13 : 遺伝子導入リンパ球の品質試験

参考資料 14 : MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール

参考資料 15 : 三重大学で実施中の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子治療臨床研究の情報

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T 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臨床研究において果たす役割

II.1 総括責任者の氏名

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 大学教員

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
影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	准教授	レトロウイルスベクター製剤の 品質管理責任者、遺伝子導入細胞 製剤の品質管理責任者、試験 登録患者の診療
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、試験登録 患者の診療
宮原 慶裕	三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン講座	講師	遺伝子導入細胞製剤の体内動態 及び免疫反応の評価、試験登録 患者の診療
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、試験登録 患者の診療
石原 幹也	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科	医員	試験登録患者の診療
片山 直之	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 三重大学医学部附属病院 血液内科、腫瘍内科	教授 科長	試験登録患者の診療
中瀬 一則	三重大学医学部附属病院 がんセンター	准教授 センター 長	試験登録患者の診療

榊屋 正浩	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学	准教授	試験登録患者の診療
杵本 由香	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学	助教	試験登録患者の診療
藤枝 敦史	三重大学医学部附属病院 血液内科	助教	試験登録患者の診療
門間 文彦	三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学	助教	試験登録患者の診療
水野 聡朗	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科	講師 副科長	試験登録患者の診療
齋藤 佳菜子	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科	助教	試験登録患者の診療
大石 晃嗣	三重大学医学部附属病院 輸血部	部長 講師	アフェレーシスの管理
濱田 康彦	三重大学医学部附属病院 光学医療診療部	助教	試験登録患者の診療
白石 泰三	三重大学大学院医学系研究科 基礎医学系講座 腫瘍病理学	教授	病理組織学的診断
佐藤 永一	東京医科大学 人体病理学講座	講師	病理組織学的診断

外部協力者

峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター	センター 長	ウイルスベクターに関する基礎 的助言及び遺伝子導入 T リンパ 球調製技術の提供と助言、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

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

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、シクロホスファミド投与による免疫抑制性前処置を行い、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A*24:02 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 T リンパ球) を輸注し、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 T 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(2006年)は男性15,818人、女性2,905人、死亡数(2010年)は男性9,992人、女性1,875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)-A*24:02陽性、腫瘍組織中にMAGE-A4抗原が発現〕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。その後、遺伝子導入リンパ球の投与前にシクロホ

スファミド投与による免疫抑制性前処置を行い、輸注リンパ球の体内での増殖と抗腫瘍効果の増強を図る。なお、本臨床研究は、HLA-A*24:02 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入 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を期待するものである。

MAGE-A 抗原は食道癌の 39~71%(5, 6) (三重大学自検食道癌例では 68%) に発現する腫瘍抗原であり、HLA-A*24:02 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 T 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-A*24:02 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。

様々な免疫抑制剤や放射線などによるリンパ球減少性の前処置が T 細胞輸注療法の効果を向上させ得ることが長年にわたり示されてきた(7-9)。三重大学自検例の動物実験において、シクロホスファミドの前処置により腫瘍特異的リンパ球輸注療法の抗腫瘍効果が顕著に増強することを確認した(添付資料Ⅲ.2.3)。したがって、本臨床試験ではシクロホスファミドを投与し、患者の既存リンパ球の一部を一過性に減少させることで、輸注する TCR 遺伝子導入 T リンパ球の患者体内における増殖と抗腫瘍活性を増強する可能性を検討する。また、シクロホスファミドの至適投与量については用量漸増法を用いて決定する。

なお、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 T 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(10, 11)、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(12-14)。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(13)。

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(12-15)。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-A*24:02 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 T リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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Ⅲ.1.3)。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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 T 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Ⅲ.2.1)。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(16)。更に、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子、又はマウス由来の gp100 特異的 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おり(17)、また、癌精巣抗原 NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、滑膜細胞肉腫患者 6 名中 4 名 (67%)、及び悪性黒色腫患者 11 名中 5 名 (45%) に臨床反応 (PR+CR) を認めたことを報告している(18)。

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 前処置を併用する理由

V.5.1 前処置を併用する根拠

動物実験において、シクロホスファミド等の化学療法剤により宿主の免疫担当細胞を減少させる前処置を行うことが、腫瘍に対するリンパ球輸注療法の効果を顕著に改善することが長年にわたり報告されてきた(7, 8)。この効果の機序については、いまだ完全には解明されていないが、近年複数の要因が貢献していることが報告されている(9)。これらの要因の一つとして、制御性 T 細胞を始めとした免疫抑制性細胞の除去による効果が考えられている(19)。抗腫瘍免疫における制御性 T 細胞が果たす抑制性の効果は広く注目されており、悪性黒色腫、肺癌、卵巣癌などでは腫瘍に浸潤する制御性 T 細胞が抗腫瘍性の T 細胞応答を抑制し、患者生存と負に相関することが示されている(20-23)。制御性 T 細胞はその細胞性の抑制機序と同時に IL-2 利用の阻害をすることにより輸注細胞の機能と増殖を抑制していると考えられる(24)。さらに、骨髄由来抑制性細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC)、Natural Killer 細胞 (NK cells)、Natural killer T 細胞 (NKT cells) もまた抗腫瘍免疫を負に制御することが示されており(25-27)、これらの細胞の除去も輸注療法の効果改善に貢献していることが考えられる。二つ目の機序として、IL-7、IL-15 を始めとしたホメオスタシス (恒常性) の維持に重要と考えられているサイトカインを輸注細胞と宿主リンパ球との間で競合することが、前処置による宿主リンパ球減少によって消失する効果が示されている(28)。これは一般にホメオスタティック拡大と呼ばれる現象であり、IL-7、IL-15 等のホメオスタティックサイトカインが輸注細胞にとって十分に利用可能となることにより、メモリー形質を持つ CD8 陽性 T 細胞が優先的に増殖、維持されると考えられる(29)。更に、化学療法剤や Total body irradiation により、腫瘍、あるいは腸内細菌叢から放出される HMGB1 や LPS といった Toll-like receptor (TLR) のリガンドが抗原提示細胞の機能を向上させ、輸注された T 細胞を効率良く活性化することも考えられている(30, 31)。これらの知見は多くの場合、腫瘍反応性 T 細胞レセプター (TCR) のトランスジェニックマウス由来の T 細胞を輸注する系における検討から得られてきた。しかしその後、レトロウイルスによる TCR 遺伝子導入 T 細胞を用いた輸注療法のマウスモデルにおいても、同様に、免疫抑制剤によるリンパ球減少性の前処置を行うことが効果的な抗腫瘍効果の発現に大きく貢献することが示されている(32)。

我々は、BALB/c マウス由来線維肉腫 CMS5 の腫瘍拒絶抗原である変異型 MAP キナーゼを認識する TCR を発現するトランスジェニックマウスを作製し、本トランスジェニックマウス由来の CD8 陽性 T 細胞を輸注することにより CMS5 担癌マウスを治療する、腫瘍特異的 T 細胞輸注療法の動物実験系を開発した(33, 34)。本動物実験系において、シクロホスファミド単剤(2.5 mg)の前投与を行うと、腫瘍特異的リンパ球輸注療法の抗腫瘍効果を著明に増強し、腫瘍特異的リンパ球輸注単独では明らかな抗腫瘍効果を認められない条件においても前投与の併用により腫瘍の退縮を導くことが示された。またシクロホスファミドの前投与により、輸注リンパ球がマウス体内において強く分裂し、サイトカイン分泌や細胞傷害性

顆粒の放出などのファンクション性を向上させることが示された (添付資料Ⅲ. 2. 3)。

悪性黒色腫の患者を対象とした腫瘍反応性の T 細胞クローンや T 細胞ラインを輸注する初期の臨床試験では、輸注細胞の体内維持と臨床効果の両面において十分な効果が認められなかった (35, 36)。しかしながら、近年のプロトコールでは比較的短期培養の腫瘍反応性 T 細胞を用いると共に、前処置としてリンパ球減少性の全身的な化学療法剤の投与 (シクロホスファミド 60 mg/kg 2 日間とフルダラビン 25 mg/m² 5 日間) を行うことにより、進行期の悪性黒色腫を対象とした臨床試験で輸注細胞が患者の体内に効率良く生存することが可能となり、登録患者の 50% 近くに RECIST 基準により CR 又は PR の臨床効果を認めることが米国国立がん研究所のグループにより報告されている (12, 13)。これらの中には、巨大な腫瘍や多発性の肝転移が輸注療法後に消失した症例も報告されている (37)。その後、同グループが実施している転移性悪性黒色腫患者に対する MART-1 抗原特異的あるいは gp100 特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸注療法や、転移性滑膜肉腫及び悪性黒色腫患者に対する NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸注療法の臨床試験においてもシクロホスファミド (60 mg/kg、2 日間) とフルダラビン (25 mg/m²、5 日間) の前処置が行われている (12-14)。このように、リンパ球減少性前処置の輸注療法の効果に対する有効性は臨床的にも認められるところであるが、同時にこれらの前処置は時に日和見感染などの誘引となる血液学的毒性を中心とした副作用を来し得ることが報告されている (13, 38)。したがって、前処置に用いる薬剤については血液などへ副作用がより少ない選択が望まれる。

V. 5. 2 前処置の設定根拠

様々な免疫抑制剤や放射線などによるリンパ球減少性の前処置が T 細胞輸注療法の効果を向上させ得ることが動物実験により示されてきた (7-9)。これらの知見をヒトのがん治療に還元する試みとしては、米国国立がん研究所のグループがシクロホスファミド 60 mg/kg × 2 日間とフルダラビン 25 mg/m² × 5 日間を投与するプロトコールを用いた臨床試験を実施した例が報告されており、臨床的な有効性を示した症例も経験されている (12, 13, 16, 17, 18)。同時にこれらの臨床試験では骨髄抑制による日和見感染などの副作用も報告されている (13, 38)。

我々は、マウスの腫瘍特異的 T 細胞輸注療法モデルを用いて、シクロホスファミドの単独投与による前処置がマウス体内における輸注 T 細胞の増殖と機能を向上させ、抗腫瘍効果を著明に増強することを確認した (添付資料Ⅲ. 2. 3)。その結果をふまえ、シクロホスファミド単独投与により輸注リンパ球の体内動態に変化を与え、抗腫瘍効果を向上する可能性を検討する臨床試験を計画した。シクロホスファミドの投与量は、様々な悪性腫瘍の治療に用いられる投与量が 1 コースの治療 (1-5 日間) あたり 400-1,800 mg/m² であることが多く、末梢血幹細胞採取における幹細胞動員時の化学療法でも 2 g/m²/day 程度であることを考慮し (39, 40)、400 mg/m² × 3 日間 (総投与量 1,200 mg/m²) をコホート 1 及びコホート 2 において投与し、コホート 3 では 500 mg/m² × 3 日間 (総投与量 1,500 mg/m²)、コホ

ート4では $600 \text{ mg/m}^2 \times 3 \text{ 日間}$ (総投与量 $1,800 \text{ mg/m}^2$) と用量増加し、安全性とともに輸注細胞の動態と臨床効果を評価する計画とした。

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-A*24:02 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 (41) から単離され、272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 816 塩基対と終止コドン TGA より成り立っている。この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。図 1 に TCR α 8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

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

図1 TCR α 8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI.1.1.2 T細胞受容体 (TCR) β 鎖遺伝子

TCR β 鎖遺伝子は、TCR β 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR β 7-9 である。本遺伝子は HLA-A*24:02 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド特異的な CTL クローン #2-28(41) 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	V7-9 領域
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	N 領域
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	J2-5 領域
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	C2 領域
586	CCC CTC AAG GAG CAG CCC GCC CTC AAT GAC TCC AGA TAC TGC CTG	630	
196	P L K E Q P A L N D S R Y C L	210	
631	AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCG GCC ACC TTC TGG CAG AAC CCC CGC	675	
211	S S R L R V S A T F W Q N P R	225	
676	AAC CAC TTC CGC TGT CAA GTC CAG TTC TAC GGG CTC TCG GAG AAT	720	
226	N H F R C Q V Q F Y G L S E N	240	
721	GAC GAG TGG ACC CAG GAT AGG GCC AAA CCC GTC ACC CAG ATC GTC	765	
241	D E W T Q D R A K P V T Q I V	255	
766	AGC GCC GAG GCC TGG GGT AGA GCA GAC TGT GGC TTC ACC TCC GAG	810	
256	S A E A W G R A D C G F T S E	270	
811	TCT TAC CAG CAA GGG GTC CTG TCT GCC ACC ATC CTC TAT GAG ATC	855	
271	S Y Q Q G V L S A T I L Y E I	285	
856	TTG CTA GGG AAG GCC ACC TTG TAT GCC GTG CTG GTC AGT GCC CTC	900	
286	L L G K A T L Y A V L V S A L	300	
901	GTG CTG ATG GCC ATG GTC AAG AGA AAG GAT TCC AGA GGC TAG	942	
301	V L M A M V K R K D S R G *		

図2 TCRβ 7-9遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI. 1.2 人に導入する遺伝子の性質

本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa が細胞に感染すると、MS-bPa のゲノム (図 7 参照) は逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、プロウイルスとなる。プロウイルスは図 3 に示すウイルスプラスミドベクターpMS-bPa と同様の構造を有するが、後述するように、5' -LTR 及び 3' -LTR の由来が異なる。

本臨床研究において導入する遺伝子は、TCR α 鎖と β 鎖をコードする cDNA である。TCR は T 細胞に特異的に発現する抗原認識レセプターであり、免疫系における T 細胞の抗原特異性を決定している。機能的 TCR 分子は抗原認識を行う TCR α β 鎖又は γ δ 鎖のヘテロダイマーからなり、細胞内への直接シグナル伝達を担う CD3 分子群と会合し、TCR-CD3 複合体を形成している。ヒトにおいて TCR α 鎖は 14 番染色体上に、 β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロ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 (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 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。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 領域の構造をとり、PCMV 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。なお、PCMV の U3 領域は、MoMLV と比較して一部分が欠失、点変異しており、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、アナジーの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。

TCR 鎖は Ig スーパーファミリー (IgSF) 分子に属し、2つの Ig ドメインからなる細胞外領域、20 アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つの Ig ドメインのうち、N 末端側が可変領域、C 末端側が定常領域に相当する。 α 鎖が 45-60 kDa、 β 鎖が 40-50 kDa で α 鎖と β 鎖は S-S 結合でヘテロ 2 量体を形成し、2つの Ig ドメインをもってペプチド+MHC との接合面を構成している。

細胞外領域に存在する相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に貢献し、CDR3 領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。つまり、比較的一定のアミノ酸配列による蛋白構造を持つ CDR1、CDR2 領域を介して MHC を認識し、フレキシブルな CDR3 領域が構造変化をとりながらペプチドと結合し、安定化する。また、TCR は MHC の溝に対して、MHC class I 分子とは斜めに、MHC class II 分子とは直角に結合する。

TCR の発現とシグナル伝達には TCR と複合体を形成する 4 種類の CD3 鎖が重要である。細胞外領域に Ig ドメインを 1 つ持ち細胞内領域に活性化モチーフの ITAM を 1 つ持つ CD3 γ 、 δ 、 ϵ 鎖がそれぞれ $\gamma-\epsilon$ 、 $\delta-\epsilon$ 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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 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-A*24:02 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（42-46）、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（16, 42-45）。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 $1.5/1 \times 10^4$ (47) 又は $1/1 \times 10^4$ (48) 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は $1/1 \times 10^3 \sim 5$ 程度であると報告されている (49)。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 (50)、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、もともになる 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 (51)。

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 のもともに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 (52, 53)。

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。

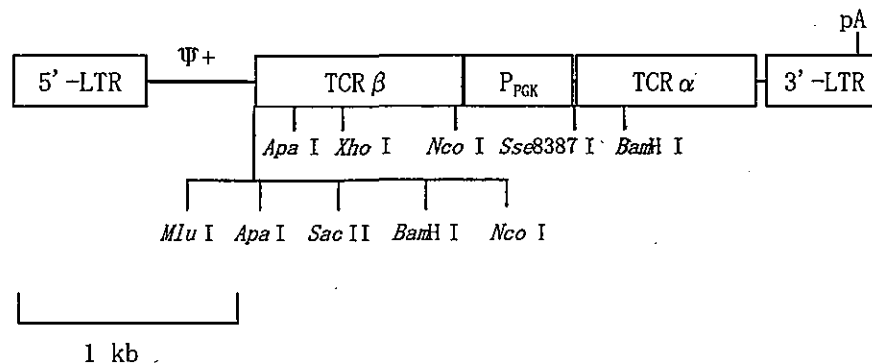


図 3 pMS-bPa の遺伝子概略

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 (54)。

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(55, 56)。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。

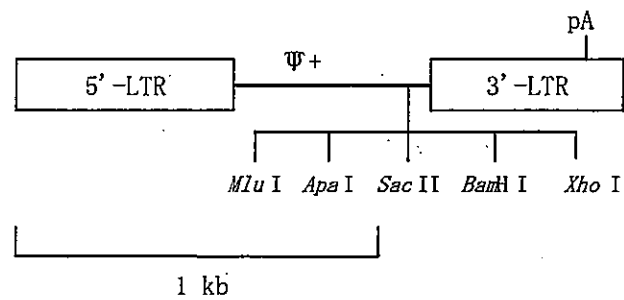


図4 pMSの遺伝子概略

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。

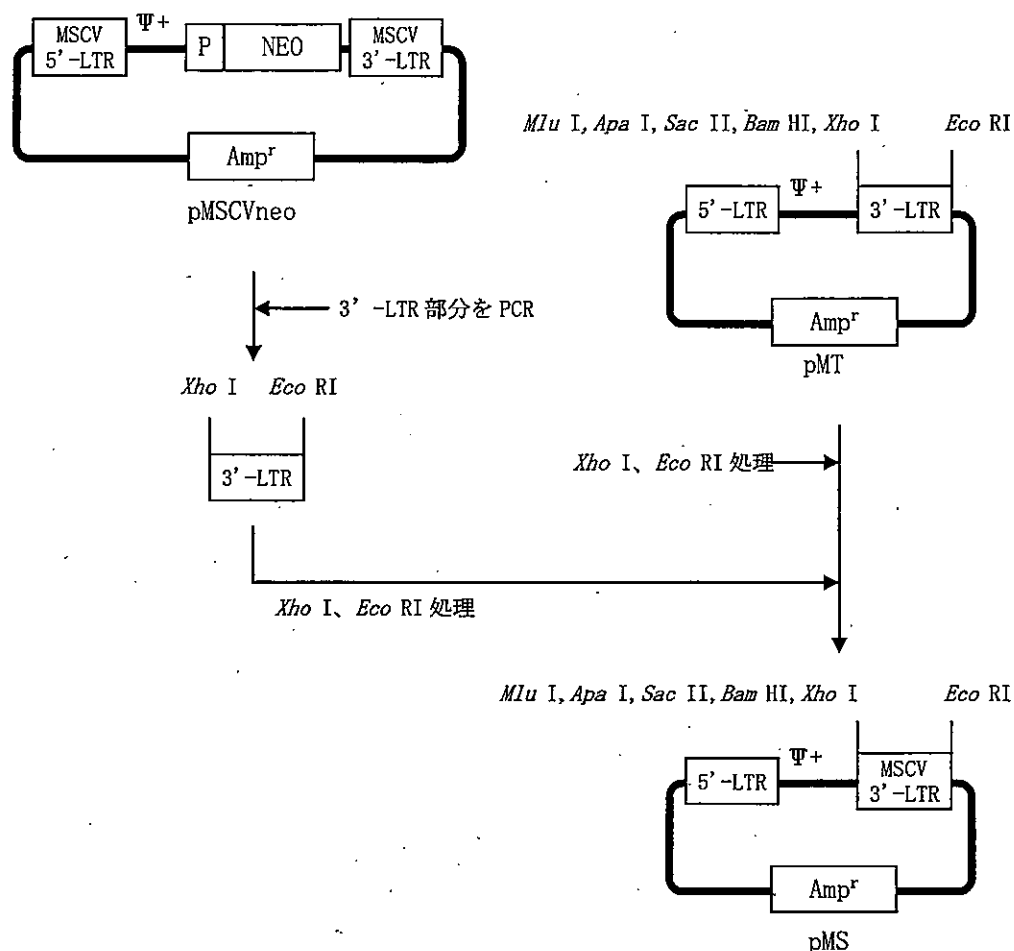


図5 pMSの構築手順

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 に示す。

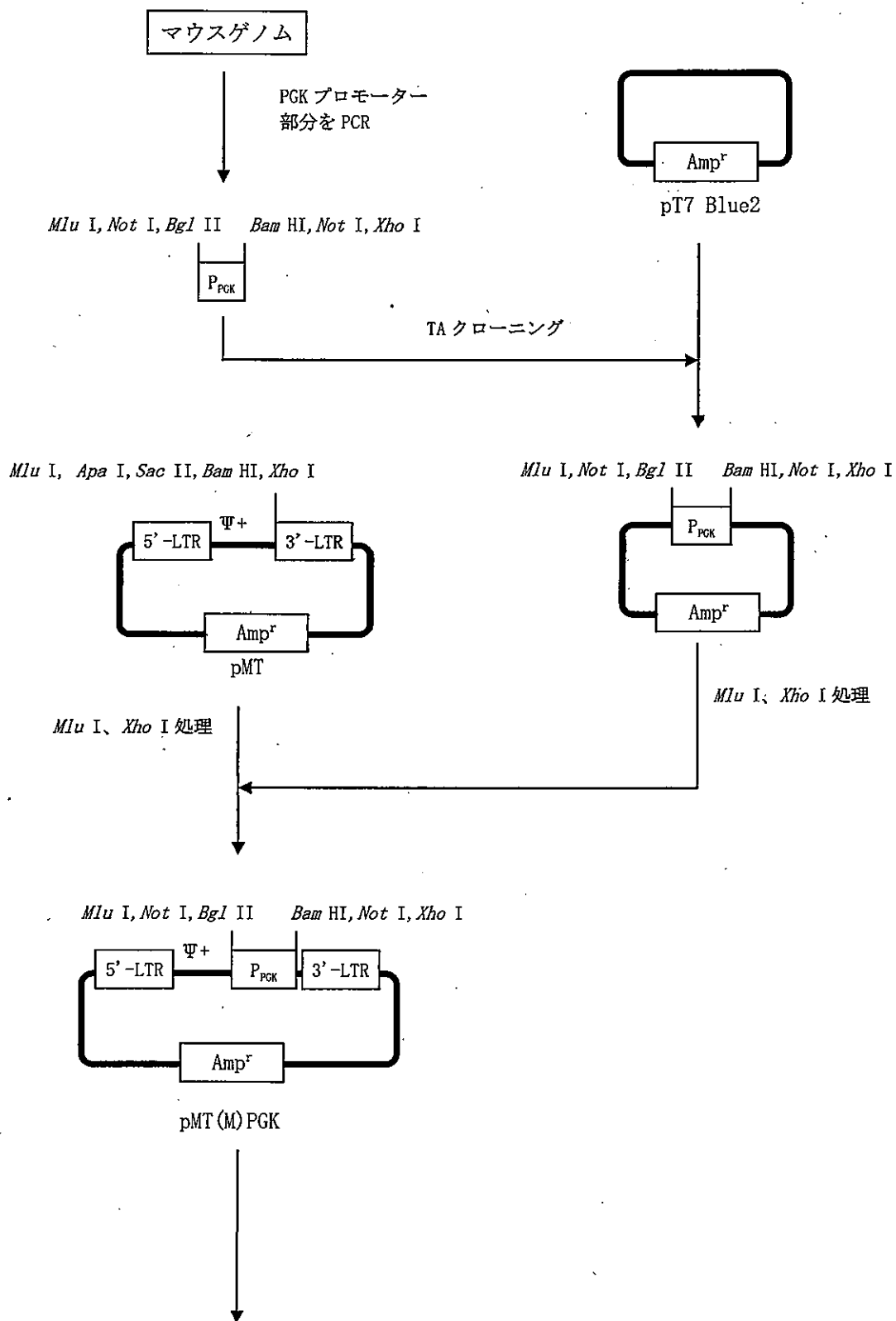
マウスゲノム DNA を鋳型に、制限酵素 Mlu I, Not I 及び Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I, Not I 及び Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い P_{PGK} 配列を増幅し、pT7 Blue2 ベクターに TA クローニングした。次に、このプラスミドから制限酵素 Mlu I と Xho I で P_{PGK} 部位を切り出し、pMT ベクターの Mlu I - Xho I サイトにクローニングし、pMT(M)PGK を作製した。

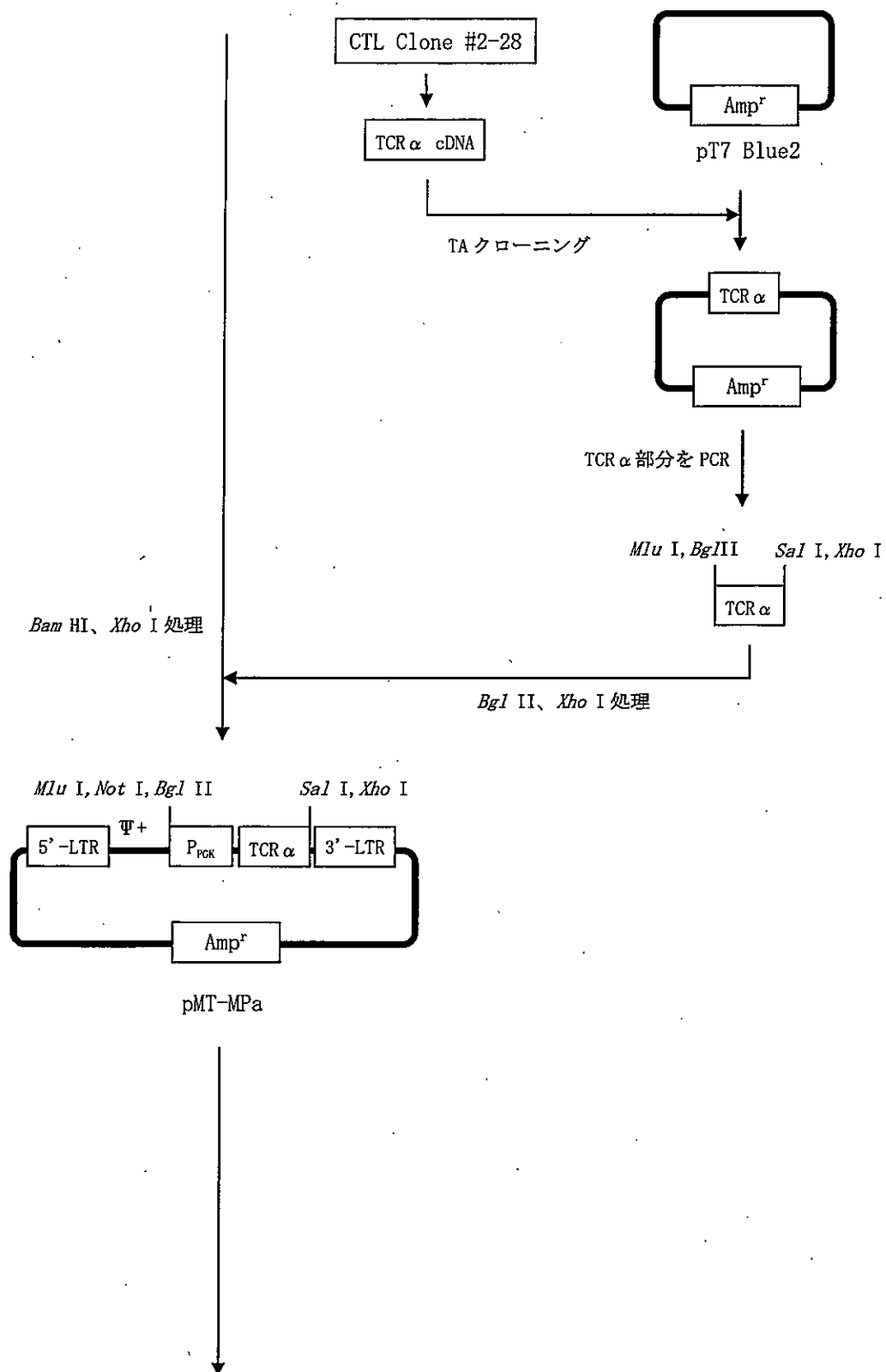
MAGE-A4 CTL Clone #2-28 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA 及び TCR β cDNA のコード域を増幅しそれぞれ pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

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。得られた pMS-bPa の全塩基配列解析を実施し、予期せぬ変異等が含まれていないことを確認した。





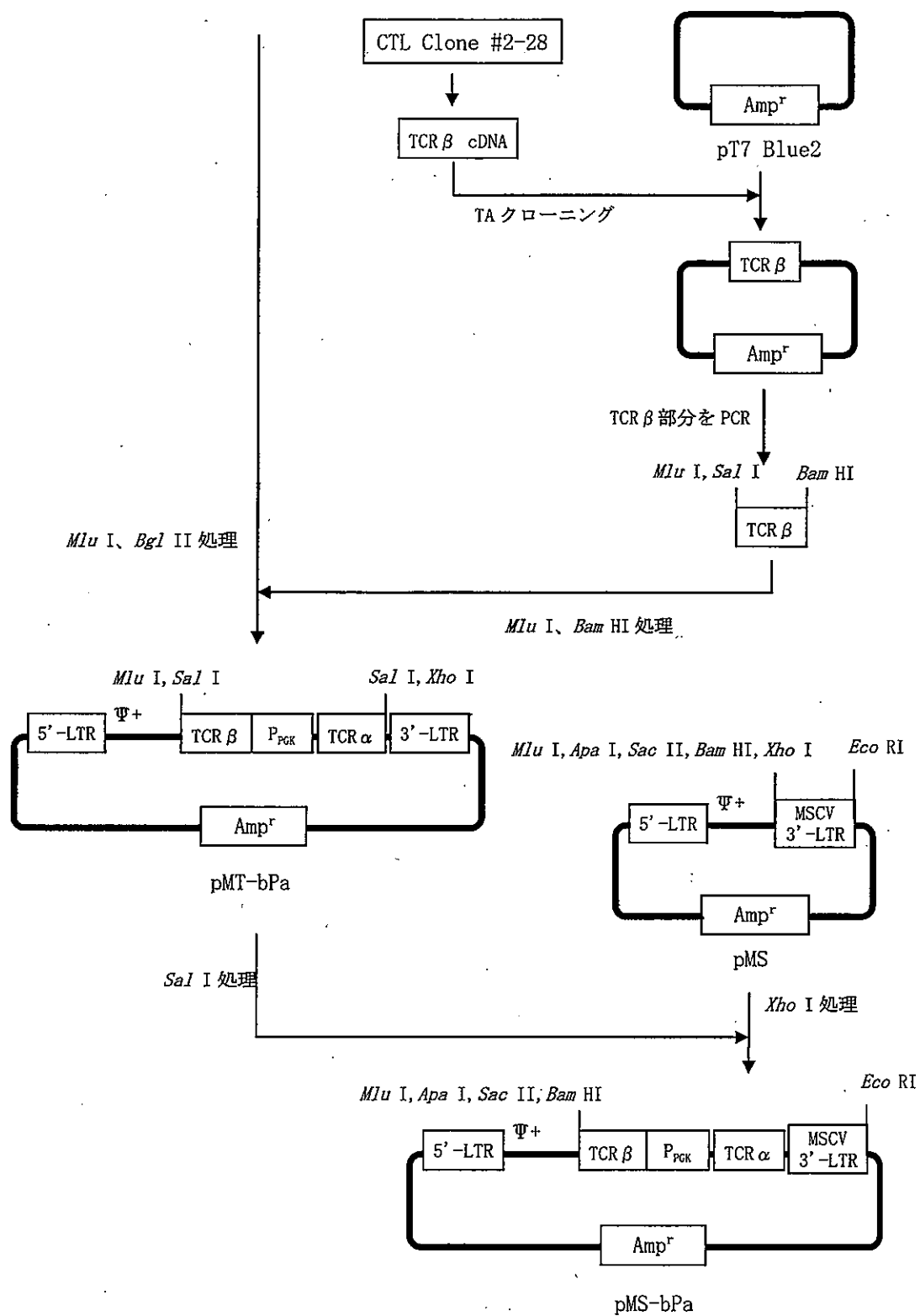


図 6 pMS-bPa の構築手順

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要な遺伝子である 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) (51) 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(51, 57)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。

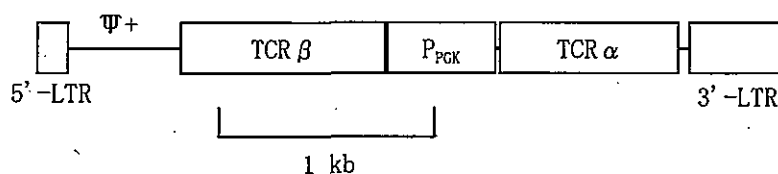


図 7 MS-bPa ベクターのゲノム構造概略

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、細胞及び前処置）

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。

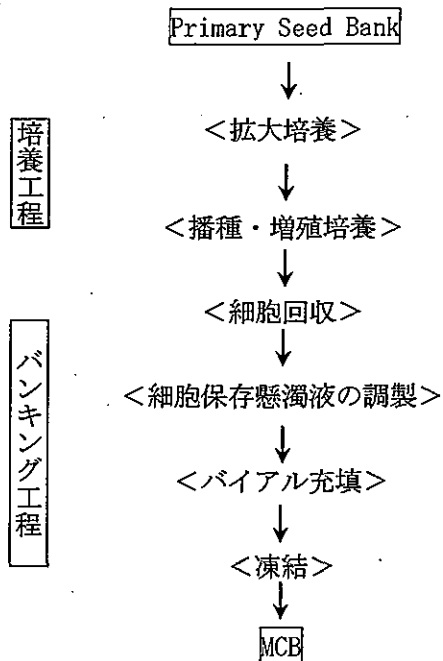


図 8 MCB の作製フロー

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 (トリパンプルー)
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パイアルの 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、本遺伝子治療臨床研究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。

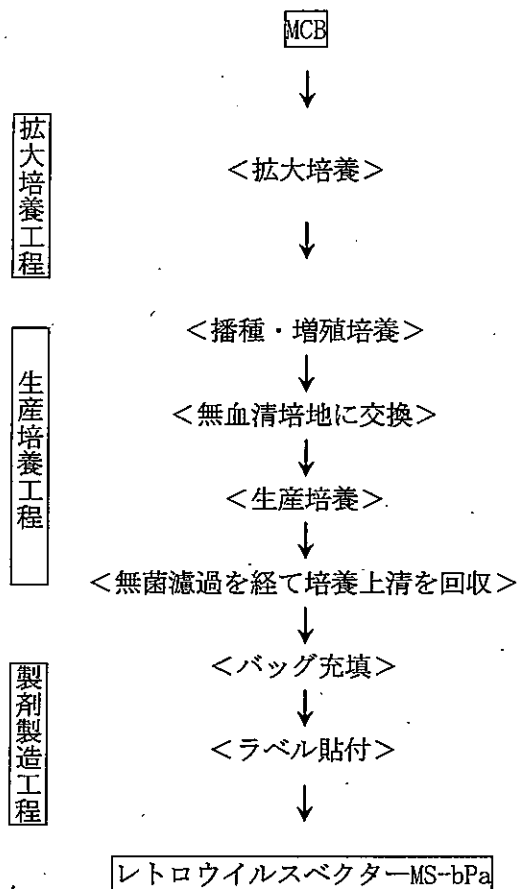


図9 レトロウイルスベクターMS-bPaの製造フロー

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。

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、一過性にエコ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 (58)。図 10 にその概念図を示す。

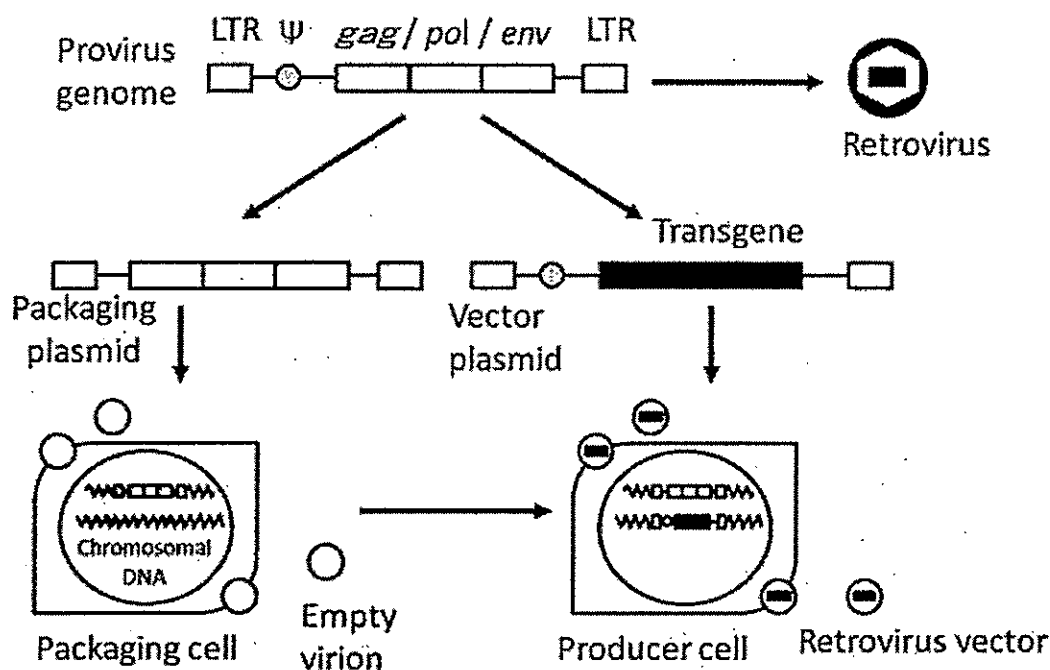


図 10 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 58 より転載)

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 (58)。

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 ヲ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。

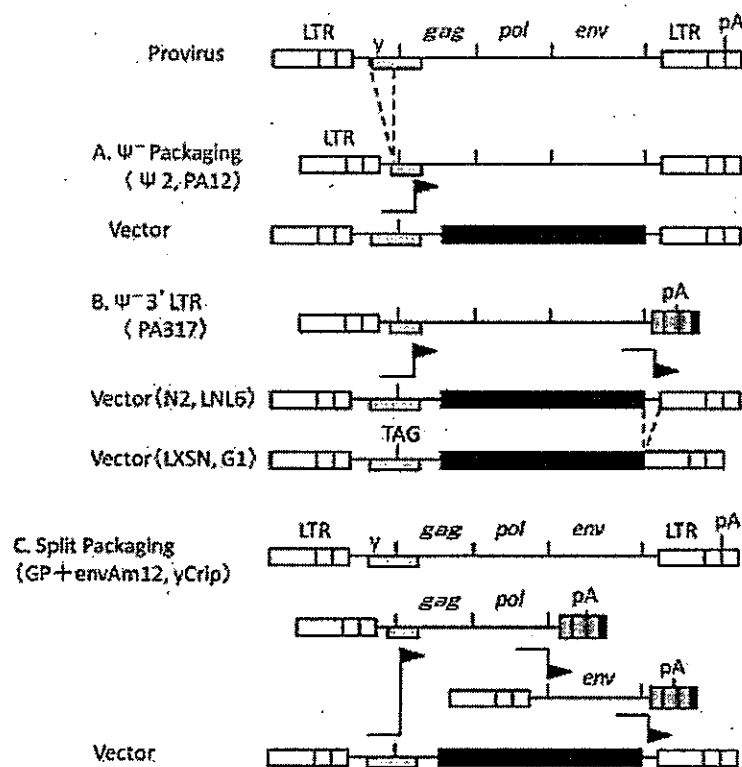


図 11 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 58 より転載)

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。

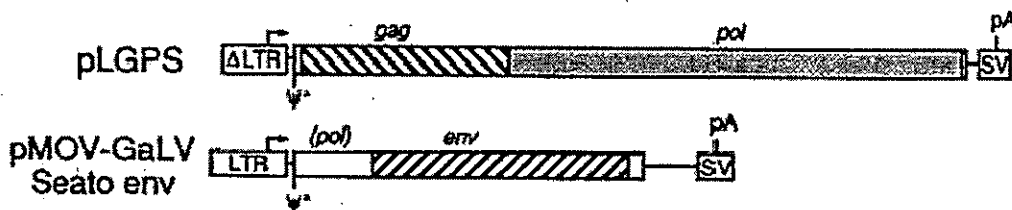


図 12 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造
(引用文献 51 より転載)

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 (59) 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 (59)。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 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(60)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 (61-63)。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 (64)。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 (65, 66)。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) での遺伝子治療においては、15 例中 3 例の骨髓異形成症候群 (MDS) の発症が報告されており (67, 68)、ウィスコット・アルドリッチ症候群 (WAS) での遺伝子治療においても 18 例中 4 例の白血病の発症が報告されている (69, 70)。

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 (71)。最近の報告によると、イタリアでは 18 症例中 15 例、イギリスでは 8 症例中 4 例、アメリカでは 14 症例中 10 例で酵素補充療法の必要がなくなり、白血病発症の報告はないとされている (69)。また、白血病の発症が報告された X-SCID を対象とした臨床試験においても約半数の症例で免疫グロブリン補充療法の必要がなくなり、白血病を発症した 5 例のうち 4 例においても、現在まで部分的な免疫回復を維持して長期間寛解の状態を保っていると報告されている。さらに、CGD 及び WAS を対象とした臨床試験においても、それぞれ臨床効果が認められたことが報告されている (69)。これらの報告から CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした場合には、癌化のリスクは否定できないが、一方で顕著な臨床効果も認められており、特に ADA 欠損症を対象とした遺伝子治療においてはレトロウイルスベクターを用いた場合でもリスク・ベネフィットで判断して有効な治療法として承認され得るとの期待が高まっている。

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 (16, 42-45)。

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 (72)。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 (73)。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(74)。

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 細胞クローンをを用いた 2 件の臨床試験(75, 76)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 を単独で使った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(77)。

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 TCR 2 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(16)。その後、メラノサイト分化抗原 MART-1 及び gp100 に対する高親和性 TCR 遺伝子を用いた転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、これらの抗原を発現する正常組織（皮膚、眼、内耳）に対する傷害性が報告されたがいずれも生命に危機をもたらすものでなくコントロール可能であった(17)。また、CEA を標的抗原とする大腸癌を対象にした臨床試験において腫瘍縮小の効果がみられる一方で、一時的ではあるが重篤な有害事象として正常な大腸粘膜への傷害性が報告されている(78)。しかし、癌精巣抗原である NY-ESO-1 を標的にした転移性滑膜細胞肉腫、転移性悪性黒色腫患者への遺伝子導入自己リンパ球輸注臨床試験では、腫瘍縮小効果などの臨床効果がみられ、安全性についてはリンパ球輸注に併用した前処置あるいは IL-2 投与による副作用以外、遺伝子導入リンパ球輸注に関係する有害事象の発生はなかったと報告されている(79)。

以上のことから、TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注における副作用は、腫瘍組織に発現する標的抗原に対する特異性に大きく関与すると考えられる。本臨床試験では、腫瘍組織への発現の特異性が高い癌精巣抗原 MAGE-A4 を標的とするものであり、オンターゲット効果としての副作用の発生は少ないと予測される。

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

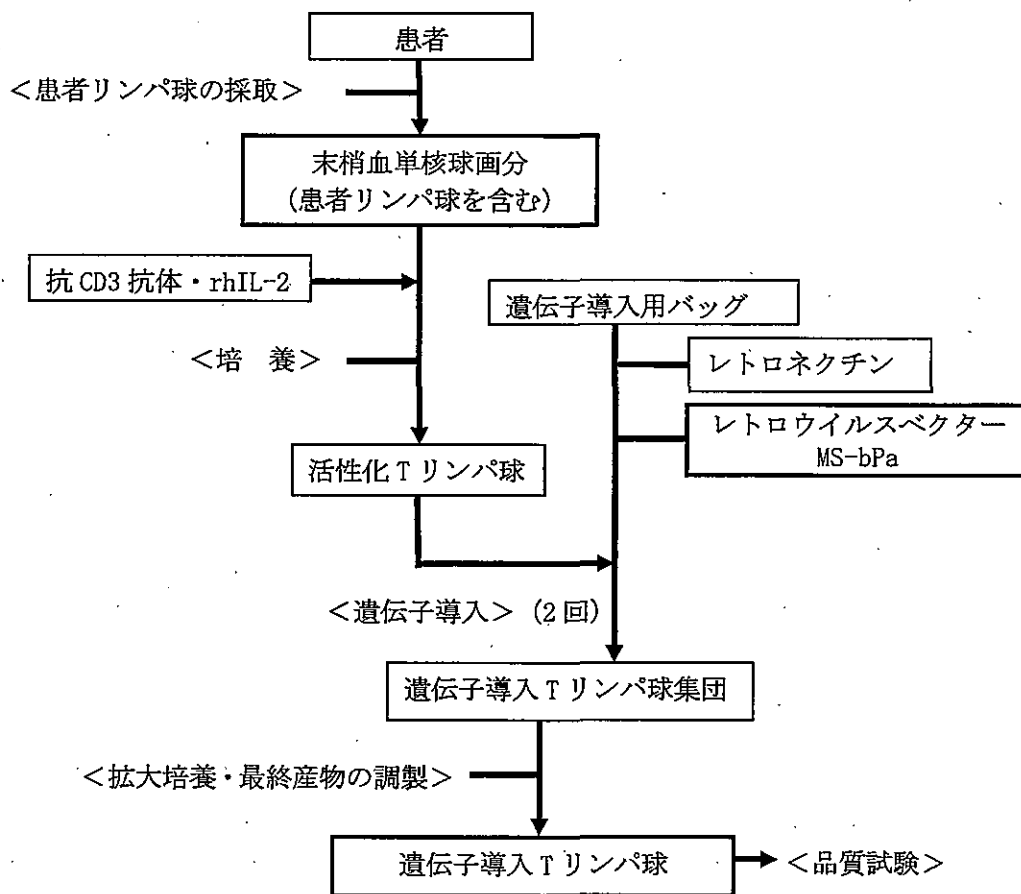


図 13 遺伝子導入細胞調製工程の概略

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（ 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）	1×10^9 個	5×10^9 個

患者からのリンパ球と血漿の採取は、三重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細胞調製施設内に持ち込み、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-T-Retro III、600 IU/mL rhIL-2、1% 非働化患者血漿、60 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン及び 2.5 μ 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℃、5% CO₂ 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 μ g/mL）を添加して薬用保冷庫にて保存する。

基本培地 GT-T-Retro III 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 9-1 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×g、32℃、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×g、32±3℃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×g、32±3℃で 10 分間遠心する。遺伝子導入操作後、4 時間、5% CO₂ 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℃、5% CO₂ 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（±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9-3及び9-4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。

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。健康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10「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11「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、健康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11「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 12「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 T 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(80)。

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(14, 16, 17, 18, 81, 82)。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(16)。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 13「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 10「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 同じレトロウイルスベクターを使用した国内の臨床研究における安全性

本臨床研究にて使用されるレトロウイルスベクター (MS-bPa) と同じものを使用した三重大学の遺伝子治療臨床研究では、12 例の遺伝子導入細胞調製及び 7 例の被験者に対する遺伝子導入細胞投与が行われたが、これまでに RCR は検出は確認されていない (2012 年 10 月 1 日現在、参考資料 15)。また、遺伝子導入細胞及び遺伝子導入細胞調製時に使用した RPMI1640 や CP-1 等の原材料に起因すると考えられる有害事象は認められていない。

VII.5 前処置の安全性

本臨床研究にて用いられるシクロホスファミドの投与量は、既にリンパ腫、白血病を含む多くの悪性腫瘍の治療、あるいは末梢血造血幹細胞の採取に用いられている用量の範囲内のものである (39, 40)。また、本臨床研究の研究者は、造血幹細胞移植を含む血液疾患治療の経験者、悪性腫瘍に対する化学療法の経験者により構成される。したがって、十分に安全性が確保されており、実施に問題はないと考える。

シクロホスファミドの前処置に関連した重篤な副作用として、主なものとして心毒性、生殖機能障害、出血性膀胱炎、骨髄抑制による免疫機能低下、二次性発癌が挙げられる。これらの副作用については化学療法に対する経験が豊富な担当医が注意深く患者の病状を観察し、必要に応じて適切な処置を講じる。骨髄抑制による免疫機能低下に対する支持療法として、レボフロキサシンなどの抗菌薬をシクロホスファミド投与開始日より十分な好中球数の増加 (例 好中球数 $\geq 1,000/\text{mm}^3$) が確認されるまで経口投与する (83, 84)。また、必要に応じて他の抗菌薬、G-CSF、抗ウイルス薬、抗真菌薬の追加投与を行う。また、シクロホスファミドの投与前に、制吐剤として 5-HT₃ 受容体拮抗薬 (グラニセトロンなど) を経口あるいは静脈内投与する。

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

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本臨床研究の品質・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 T 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、III. 2. 2 安全性）。

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 T 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、IV. 1 TCR 遺伝子導入リンパ球を用いた *in vitro* の研究）。

なお、本臨床研究にて行われるシクロホスファミドの前処置は、リンパ腫、白血病の治療、あるいは末梢血造血幹細胞の採取に用いられている用量の範囲内のものであり、十分に安全性を確保した実施に問題はない。

③本臨床研究の期待される有効性

当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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、III. 1 培養細胞を用いた研究の成果）。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A*24:02 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、III. 2 実験動物を用いた研究の成果）。

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 T 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(16) (添付資料、IV. 4. 2 MART-1 特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注の臨床試験)、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) 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おり(17)、また、癌精巣抗原 NY-ESO-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、滑膜細胞肉腫患者 6 名中 4 名 (67%)、及び悪性黒色腫患者 11 名中 5 名 (45%) に臨床反応 (PR+CR) を認めたことを報告している(18)。(添付資料、IV. 4. 3 MART-1 又は gp100 特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注の臨床試験)。

したがって、本臨床研究においても抗腫瘍効果が見込まれると考えられる。

④当施設・研究者の能力

当施設内に設置された細胞調製施設は GMP 準拠で運営・管理される体制にあり、TCR 遺伝子導入 T リンパ球は同基準に準拠して調製される。

本臨床研究の研究者は、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、品質管理及び当施設における T 細胞輸注療法臨床試験、遺伝子治療臨床試験、造血幹細胞移植を含む血液疾患治療の経験者、悪性腫瘍の化学療法の経験者により構成される。

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 本臨床研究の実施に際し三重大学医学部附属病院内に設置される委員会

遺伝子治療臨床研究審査委員会に安全・効果評価・適応判定部会及び遺伝子製剤検証部会を設置する。

上記の委員会・部会の運営に関しては、別途作成の業務手順書に従うものとする。

IX. 1.1.1 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会

安全・効果評価・適応判定部会は、本臨床研究の安全性及び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

一次登録後に各患者が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、本臨床研究の対象患者として適当かどうかを判定する。

2) 用量増加における評価

各コホートの全被験者における臨床研究終了・中止時（day28）までのデータをもとにコホートごと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、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

重篤な有害事象が発現した場合、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。

4) 臨床研究の総合判定

全被験者における臨床研究が終了した後、全被験者の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。

IX. 1.1.2 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。

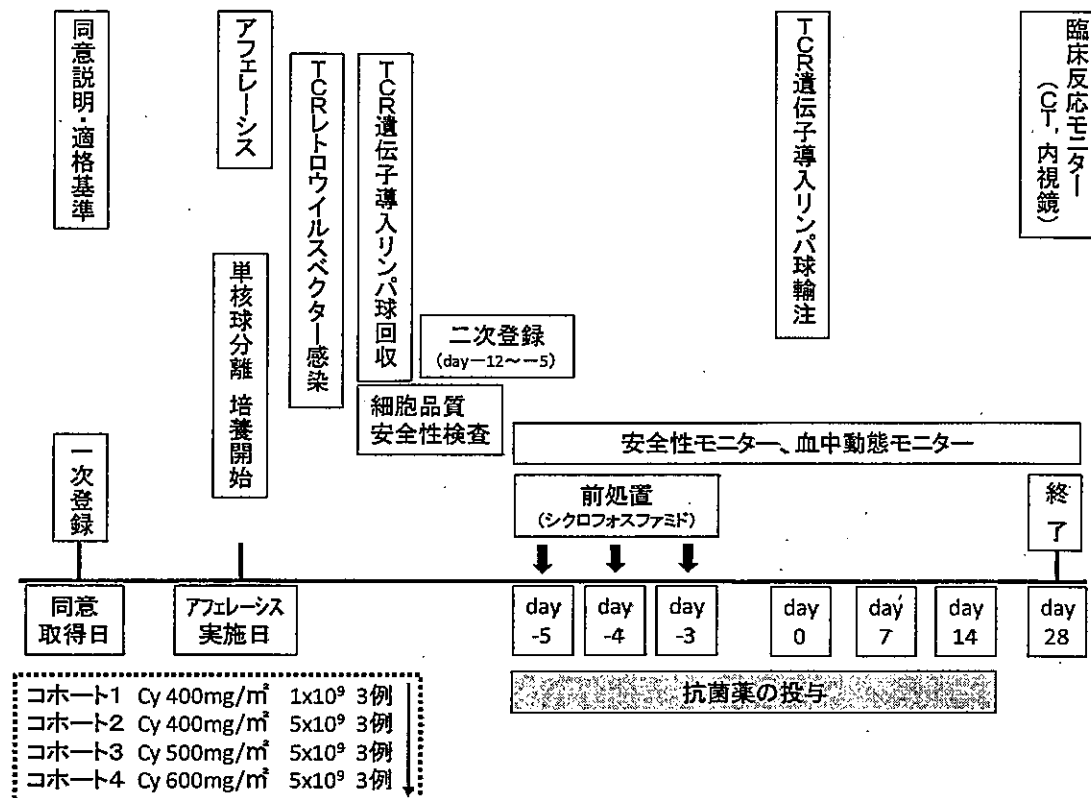


図 15 TCR 遺伝子導入 T リンパ球調製及び輸注計画

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。

アフェレーシスにて採取した自己 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 T リンパ球を ex vivo 培養し、一旦凍結保存する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製を終了し、安全性を確認した時点で、二次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への二次登録を行う。

二次登録完了後、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 5 日前より 3 日間、1 日 1 回シクロホスファミドによる前処置を行う。なお、必要に応じてシクロホスファミドによる副作用予防・軽減目的のため抗菌薬、制吐剤の投与など各種支持療法を実施する。

前処置開始から 5 日後に、TCR 遺伝子導入 T リンパ球 (単回投与) を経静脈的に投与する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後 28 日目に、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 T 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し、有害事象等が継続していない様であれば本臨床

研究を終了とする。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球数の設定

投与する TCR 遺伝子導入 T リンパ球数は 1 回投与量 1×10^9 個、 5×10^9 個とする。 1×10^9 個のコホートにおいて安全性が確認された後に、 5×10^9 個へと増加させる。なお、投与量 5×10^9 個については 3 群存在し、前処置薬であるシクロホスファミドの投与量が異なっている。

メラノサイト分化抗原 MART-1 及び gp100 に対する高親和性 TCR 遺伝子を用いた転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、これらの抗原を発現する正常組織（皮膚、眼、内耳）に対する傷害性が報告されたがいずれも生命に危機をもたらすものでなくコントロール可能であった(17)。この Johnson らの報告例では輸注を受けた患者は、輸注前に体内のリンパ球を減少させる化学療法を前処置として施され、細胞輸注後は高用量 IL-2 ($72,000 \text{ U/kg}$) を投与された。これらの処置は輸注細胞を強力に刺激する目的で行われている。また輸注細胞は $1.5 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^{11}$ 個と大量であった。また、海外で行われた臨床試験では輸注細胞に起因すると考えられる有害事象が報告されているが、本臨床研究にて投与される TCR 遺伝子導入 T リンパ球と腫瘍特異性が異なっていることから、自己免疫疾患などが発生する可能性は低いと考えられる。さらに、輸注する細胞数や補助的処置の方法によりコントロール可能であると考えられる。また、 1×10^9 個と比較的少量の輸注細胞数から慎重に開始する。なお、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の上限が 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。以上のことから、難治性の食道癌を対象とすることにより本臨床試験の対象患者にとってのリスク／ベネフィット比で考慮した場合に実施可能であることを確認して行われる。

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（ただし、血液毒性及び発熱性好中球減少症は除く）」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（血液毒性及び発熱性好中球減少症は除く）」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（血液毒性及び発熱性好中球減少症は除く）」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（血液毒性及び発熱性好中球減少症は除く）」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（血液毒性及び発熱性好中球減少症は除く）」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-A*24:02 陽性の患者
- 4) PCR法又は免疫組織染色法にて腫瘍組織に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）終了から十分な回復が見込める患者
- 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 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
- ・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) $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
- ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 3.0 \times$ 施設基準値上限
- ・クレアチニン (Cr) $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
- ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- ・左室駆出率 (LVEF) $\geq 50\%$
- ・推定糸球体濾過量 (eGFR) $\geq 50 \text{ mL/分/1.73m}^2$ 、またはクレアチニニックリアランス (CCr) $\geq 50 \text{ mL/min}$

11) 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 14 「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 法の場合、GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とし、免疫組織染色法の場合、腫瘍組織切片中の細胞で染色が認められることとする。

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）
 - ・血栓形成を有する患者
- 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) シクロホスファミド投与により重篤な副作用が予想される患者
- 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

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 T 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) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製が完了した患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要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 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
- ・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) $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
- ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 3.0 \times$ 施設基準値上限
- ・クレアチニン (Cr) $\leq 1.5 \times$ 施設基準値上限
- ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- ・左室駆出率 (LVEF) $\geq 50\%$
- ・推定糸球体濾過量 (eGFR) $\geq 50 \text{ mL/分/1.73m}^2$ 、または
クレアチニンクリアランス (CCr) $\geq 50\text{mL/min}$

- 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) $> 20 \mu\text{g/mL}$)
 - ・血栓形成を有する患者
- 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) シクロホスファミド投与により重篤な副作用が予想される患者
- 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、三重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、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立ち会い、説明補助を行うことも可能とし、適切な環境下での同意を取得することとする。

IX.4 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から2年間とする。症例毎の実施期間はTCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後28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(85)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12例とするが、因果関係が否定できない重篤な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。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸注量とシクロホスファミドの投与量

	症例数	輸注量	シクロホスファミド 投与量
コホート 1	3 症例	1×10^9 cells	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 2	3 症例	5×10^9 cells	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 3	3 症例	5×10^9 cells	500 mg/m ² /day × 3 日
コホート 4	3 症例	5×10^9 cells	600 mg/m ² /day × 3 日

また、TCR 遺伝子導入 T 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。

- ・各コホートで定められた輸注量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 T リンパ球を投与する。
- ・投与した TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量が規定量の 80% 以上であった場合には、該当するコホートの症例数として数えるが、それ未満の場合は該当するコホートの症例数としない。
- ・規定の TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量に満たない被験者より得られた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。

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

三重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 37.5 °C 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 T リンパ球の調製

採取された PBMC 画分を用いて、「VII. 3. 1 遺伝子導入リンパ球の調製方法」に従い、細胞調製を行う。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 T リンパ球としての品質を確認したうえで投与に用いる。

IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入 T 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 T 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 °C 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う。TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後、外来でのフォローアップが問題となるような有害事象や感染症に罹患しやすい状態（目安として白血球数が 1,000/mm³未満）ではなく、退院後も被験者と安全性確保のための連絡体制が取れるのであれば、退院も可能とする。

有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入 T 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

シクロホスファミドは生理食塩水 250 mL に溶かし、day -5 から day -3 までの 3 日間、1 日 1 回、60 分以上かけて静脈内投与する。各コホートにおけるシクロホスファミドの投与量は以下の通りである。

	シクロホスファミド投与量
コホート 1	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 2	400 mg/m ² /day × 3 日
コホート 3	500 mg/m ² /day × 3 日
コホート 4	600 mg/m ² /day × 3 日

IX. 5. 3. 2 支持療法

シクロホスファミドによる悪心・嘔吐の予防目的で、グラニセトロンなどの 5-HT₃ 受容体拮抗薬を経口あるいは静脈内投与する。制吐目的でのステロイド剤投与は禁止する。

5-HT₃ 受容体拮抗薬を用いても嘔気強い場合には、必要に応じてドンペリドンやメトクロプラミド、プロクロルペラジン、ハロペリドールの追加投与を行う。本臨床研究以前の

治療により悪心・嘔吐の可能性が高いことが想定される患者に対しては、ロラゼパムやアルプラゾムの投与も許可する。

また、シクロホスファミドの骨髄抑制による免疫機能低下に備えレボフロキサシンなどの抗菌薬をシクロホスファミド投与開始日より十分な好中球数の回復（例 好中球数 $\geq 1,000/\text{mm}^3$ ）が確認されるまで投与する。

本臨床研究では、原則として G-CSF 製剤の予防的投与は行わないが、抗菌薬に対する過敏症の既往があり予防的な抗菌薬使用が困難な患者などにおいては、G-CSF 製剤の予防的投与を許可する。また、高齢者、肺炎、臓器障害などの危険因子を有する患者において発熱性好中球減少が発症した場合には G-CSF 製剤の治療的投与を許可する。

HBs 抗原陰性 HBc 抗体陽性者では、HBV ウイルスの再活性化の危険性を考慮して、肝機能や HBV ウイルス DNA 量をモニタリングする。HBV ウイルスの再活性化が確認された場合には、抗 HBV 薬を追加投与する。

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 T 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。また、検体採取直後に検査・測定が困難な場合には後日、複数の検体をまとめて検査・測定することを可能とする。

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 又は免疫染色）、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、HBc 抗体、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、心臓超音波検査、頸部・胸部・腹部・骨盤 CT※

8) 上部消化管内視鏡検査※

※：同意取得日から 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

・尿検査：尿定性、尿沈査

・腫瘍マーカー検査※ (SCC、CEA、CA19-9)

※：一次登録時の検査にて高値であった症例については実施する

day -12 ~ -5 (二次登録時)

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：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※²⁾ (SCC、CEA、CA19-9。)

・リンパ球サブセット TB 分画、CD4/CD8

・免疫グロブリン IgG、IgA、IgM

5) 画像診断

・胸部 X 線検査、12 誘導心電図、心臓超音波検査、
頸部・胸部・腹部・骨盤 CT※¹⁾、PET-CT※¹⁾

6) 上部消化管内視鏡検査※¹⁾、腫瘍組織生検※¹⁾

7) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

・リアルタイム PCR、テトラマー解析

8) 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

9) サイトカイン解析

・血中サイトカイン測定

- 10) TCR 遺伝子導入 T 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
 - 11) LAM-PCR
 - 12) 長期保存用検体の採血
 - 13) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）^{※3)}
 - ・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)：二次登録日より 14 日以内に行った検査結果の利用を可とする
 ※2)：一次登録時の検査にて高値であった症例については実施する
 ※3)：有害事象発現有無の確認は前処置開始以降に行う

day -1～0 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注前検査)

- 1) 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
- 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。)
 - ・リンパ球サブセット TB 分画、CD4/CD8
- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) サイトカイン解析
 - ・血中サイトカイン測定
- 6) 長期保存用検体の採血
- 7) 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

※：一次登録時の検査にて高値であった症例については実施する

day0 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後)

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (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
- 2) サイトカイン解析
 - ・血中サイトカイン測定 (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)
- 3) 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 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 T リンパ球血中動態 (投与 24 時間 (±4 時間) 後)
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) サイトカイン解析
 - ・血中サイトカイン測定
- 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
- 7) 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) 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
 - ・ 尿検査：尿定性、尿沈査
- 5) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (投与 48 時間(±4 時間)後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 6) サイトカイン解析
 - ・ 血中サイトカイン測定
- 7) 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) 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
 - ・ 尿検査^{※1)}：尿定性、尿沈査
- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (投与 72 時間(±4 時間)後)
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) サイトカイン解析
 - ・ 血中サイトカイン測定

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 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
- ・リンパ球サブセット TB分画、CD4/CD8

4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

5) サイトカイン解析

- ・血中サイトカイン測定

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 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
- ・リンパ球サブセット TB分画、CD4/CD8
- ・免疫グロブリン IgG、IgA、IgM

4) TCR 遺伝子導入 T 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) サイトカイン解析

- ・血中サイトカイン測定

7) 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 21±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

- ・リンパ球サブセット TB分画、CD4/CD8

4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

5) サイトカイン解析

- ・血中サイトカイン測定

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 28±3 (終了・中止時検査)

- 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。)
 - ・ リンパ球サブセット TB 分画、CD4/CD8
 - ・ 免疫グロブリン IgG、IgA、IgM
- 4) 画像診断
 - ・ 胸部 X 線検査、12 誘導心電図、心臓超音波検査、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 T リンパ球血中動態
 - ・ リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 7) サイトカイン解析
 - ・ 血中サイトカイン測定
- 8) 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
- 9) TCR 遺伝子導入 T 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
- 10) RCR
- 11) LAM-PCR
- 12) 長期保存用検体の採血
- 13) 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 T リンパ球血中動態※1)

※1)：生存期間（FDA のガイドライン(85)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) 血管ルート確保に関すること

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 T 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 T 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 前処置による副作用

シクロホスファミド投与による副作用のうち比較的頻度の高いものとして白血球減少、悪

心・嘔吐、脱毛、下痢・口内炎等が知られている。一方で発生頻度は少ないが重篤な副作用としてショック、アナフィラキシー様症状、骨髄抑制、出血性膀胱炎・排尿障害、イレウス・胃腸出血、間質性肺炎・肺線維症、心筋障害・心不全・心タンポナーデ、心膜炎等が知られている(86)。しかし、今回前処置にて使用する投与量は既に承認されている投与量以下であり、化学療法や造血幹細胞移植に対する経験が豊富な医師が安全性に十分配慮し、有害事象が発生した場合には適切な処置を速やかに行うことが可能であることから、本臨床研究における前処置の実施に問題は無いと考える。

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

本臨床研究における有害事象とは、前処置開始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（関連あり、関連があるかもしれない、おそらく関連なし、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、2009年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAE v4.0) 有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2010年9月11日」に従い、判定を行う(表3)。また、CTCAE v4.0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 v4.0 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、臨床検査値を確認し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大きな変動が見られ、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 T 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 T 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-A*24:02/ 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 T 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 RNeasy (Qiagen 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 14「MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール」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 T 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

Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC を更に、CD8 陽性細胞と CD8 非陽性細胞に分離する。CD8 非陽性細胞を刺激用細胞として調製し、CD8 陽性細胞と作製した刺激用細胞を IL-2 等の存在下で培養する。その後、ELISPOT アッセイにて確認する。

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 から調製した CD8 陽性 T 細胞に、PE 標識化 HLA-A*24:02/ MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ テトラマーを反応させ、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には、上記テトラマー解析の際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、MAGE-A4 反応性 T リンパ球の反応特性の解析を行う。

・腫瘍縮小効果

「RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)」(87)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、必要に応じて三重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、本臨床研究全体の中止について安全・効果評価・適応判定部会と協議のうえ決定する。また、必要な検査・観察を行うとともに三重大学医学部附属病院長に中止した旨を報告する。

- 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、有害事象に対する治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

重篤な有害事象が発生した場合、総括責任者又は分担研究者は、「IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合」の対応を行う。

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究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知った時点から 24 時間以内に医療機関の長に口頭もしくは電話（必要に応じて E-mail）等の手段を用いて報告を行う。また、医療機関の長へ「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」の原本を提出する。さらに、重篤な有害事象の発現を知った時点から 7 日以内に「重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）」をもって、医療機関の長及び安全・効果評価・適応判定部会へ報告を行う。報告を受けた医療機関の長は、被験者が死亡した場合、及び因果関係の否定できない重篤な有害事象が生じた場合は、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もっ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 と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。

なお、症例報告書の作成対象となる被験者は、二次登録にて適格と判断された症例とする。従って、二次登録前に中止となった被験者や、二次登録時に不適格と判断された被験

者については症例報告書の作成は不要とする。

IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は三重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

三重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、国立大学法人三重大学個人情報保護規程（平成 17 年 4 月 1 日施行）に必要な事項を定めている。

三重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（情報公開・個人情報担当）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。

三重大学医学部附属病院においては、三重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、三重大学医学部附属病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程（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。保護管理者である三重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・教育機関としての三重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

三重大学医学部附属病院は診療・教育機関として、患者本位の医療、地域と世界の医療への貢献、臨床研究と人材育成の推進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三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程、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、三重大学医学部附属病院を受診する患者には、三重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) 三重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
 - ・医療の質の向上、医療安全確保のための基礎資料
- (2) 三重大学医学部附属病院及び三重大学での利用
- ・医学系教育
 - ・臨床データが必要な臨床研究
 - ・外部監査機関への情報提供（本利用に当たっては、氏名、生年月日、住所等を可能な限り匿名化する）
- (3) 学外での教育研究の利用
- ・学会、研究会、学会誌等での報告は、氏名、生年月日、住所等を原則として匿名化する
- (4) 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する連携
 - ・他の医療機関等からの医療サービス等に関する照会への回答
 - ・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・教育機関としての三重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

三重大学医学部附属病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程及び三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、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性管理措置を実施し、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、手続きの詳細を三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、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、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理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、三重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】

三重大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

診療に関すること：医療サービス課 診療案内係（TEL：059-231-5072）

教育・研究に関すること：総務課企画第1係（TEL：059-231-5261）

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 14 年文部科学省・厚生労働省告示第一号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)
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 日全部改正)
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 2011 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
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. Cheever MA, Greenberg PD, Fefer A. Specificity of adoptive chemoimmunotherapy of established syngeneic tumors. *J Immunol* 125:711-714, 1980.
8. North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med* 155: 1063-1074, 1982.
9. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response, *Nat Rev Immunol* 12:269-281, 2012.
10. 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.
11. Laskin JJ, Sandler AB. Epidermal growth factor receptor: a promising target in solid tumours. *Cancer Treat Rev* 30:1-17, 2004.
12. 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.
13. 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.
14. 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.

15. 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.
16. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314:126-129, 2006.
17. 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.
18. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Clin Oncol* 29:917-924, 2011.
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* 174:2591-2601, 2005.
20. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4+ CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* 61:4766-4772, 2001.
21. Viguier M, Lemaître F, Verola O, et al. Foxp3 expressing CD4+ CD25high regulatory T cells are overpresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-1453, 2004.
22. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-949, 2004.
23. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intratumoral CD8+ tumour-infiltrating lymphocytes and high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc. Natl Acad Sci USA* 102:18538-18543, 2005.
24. Kastenmüller W, Gasteiger G, Subramanian N, et al. Regulatory T cells selectively control CD8+ T cell effector pool size via IL-2 restriction. *J Immunol* 187:3186-3197, 2011.
25. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V, et al. Coordinated regulation of myeloid cells by tumors. *Nature Rev Immunol* 12:253-268, 2012.
26. Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, et al. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 11:1059-1065, 2005.
27. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes.

- Annu Rev immunol 23:877-900, 2005.
28. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptive transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202:907-912, 2005.
 29. Tan JT, Ernst B, Kieper WC, et al. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8+ cells but are not required for memory phenotype CD4+ cells. *J Exp Med* 195:1523-1532, 2002.
 30. Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest* 117:2197-2204, 2007.
 31. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13:1050-1059, 2007.
 32. de Witte MA, Jorritsma A, Kaiser A, et al. Requirements for effective antitumor response of TCR transduced T cells. *J Immunol* 181:5128-5136, 2008.
 33. Hanson HL, Donermeyer DL, Ikeda H, et al. Eradication of established tumors by CD8+ T cell adoptive immunotherapy. *Immunity* 13:265-276, 2000.
 34. Imai N, Ikeda H, Tawara I, et al. Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 39:241-253, 2009.
 35. Topalian SL, Solomon D, Avis FP, et al. Immunotherapy of patients with advanced cancer using tumor-infiltrating lymphocytes and recombinant interleukin-2: a pilot study. *J Clin Oncol* 6:839-853, 1988.
 36. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319:1676-1680, 1988.
 37. Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6:383-393, 2006.
 38. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26:5233-5239, 2008.
 39. Cyclophosphamide: Drug information, UpTo Date, www.uptodate.com
 40. EEBM 造血幹細胞移植診療マニュアル、神田善伸 日本医学館
 41. 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.
42. 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.
 43. 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.
 44. 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.
 45. 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.
 46. 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.
 47. 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.
 48. 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.
 49. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, et al. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. J Virol 73:6141-6146, 1999.
 50. Hanazono Y, Brown KE, Dunbar CE. Primary T Lymphocytes as Targets for Gene Therapy. J Hematother Stem Cell Res 9:611-622, 2000.
 51. 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.
 52. 渡辺 格、福見秀雄 編集. ウイルスの研究 181, 1984.
 53. Weiss R, et al. RNA TUMOR VIRUSES, 901-911, 1982.
 54. 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.
 55. Yu SS, Kim J-M, Kim S. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. Gene Ther 7:797-804, 2000.
 56. 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 Ther* 11:94-99, 2004.
57. 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.
 58. 早川堯夫 監修、バイオ医薬品の開発と品質・安全性確保. 第2部、第2章、第2節 レトロウイルスベクター, 578-598, 2007.
 59. Chong H, Vile RG. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function' third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Ther* 3:624-629, 1996.
 60. 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.
 61. 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.
 62. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
 63. 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.
 64. Recommendations of the Gene Therapy Advisory Committee/Committee on Safety of Medicines Working Party on Retroviruses. *Hum Gene Ther* 16:1237-1239, 2005.
 65. Thrasher A and Gaspar B. Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID. (http://www.asgct.org/upload/X-SCID_statement_AT.pdf) December 18, 2007.
 66. 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.
 67. 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.
 68. Fischer A and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 371:2044-2047, 2008.
 69. Rivat C, Santilli G, Gaspar HB, et al. Gene Therapy for primary

- immunodeficiencies(PIDs). *Hum Gene Ther* 23:668-675, 2012.
70. Avedillo Diez I, Zychlinski D, Coci EG, et al. Development of novel efficient SIN vectors with improved safety feature for Wiskott-Aldrich Syndrome stem cell based gene therapy. *Mol Pharm* 8:1525-1537, 2011.
 71. 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.
 72. Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting June 10, 2004 (Revised in February 2005).
 73. 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.
 74. 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.
 75. 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.
 76. 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.
 77. Schumacher TN. T-cell-receptor gene therapy. *Nat Rev Immunol* 2:512-519, 2002.
 78. Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, et al. T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 19:620-626, 2011.
 79. Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, et al. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *J Clin Oncol* 29:917-924, 2011.
 80. 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.
 81. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat Rev Cancer* 3:666-675, 2003.
 82. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus⁺ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200:1623-1633, 2004.
 83. Bucaneve G, Micozzi A, Menichetti F, et al. Levofloxacin to prevent bacterial infection in patients with cancer and neutropenia. *N Engl J Med* 353:977-987, 2005.

84. Cullen M, Steven N, Billingham L, et al. Antibacterial prophylaxis after chemotherapy for solid tumors and lymphomas. N Engl J Med 353:988-998, 2005.
85. Guidance for Industry Gene therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events. November 2006.
86. 注射用エンドキサン 添付文書
87. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline.(version 1.1). Eur J Cancer 45:228-247, 2009.

X.3 検査・観察スケジュール

	同意 取得日	アフェーシス 実施日	二次 登録時 day -12～-5	day		T リンパ球投与日 (day0)		day						終了・ 中止時 day28	追跡 調査 ※5
				-4	-3	投与前 ※2	投与後	1	2	3	7	14	21		
同意取得	●		●												
被験者登録	●														
被験者背景	●														
アフェーシス		●													
前処置 シクロスファイト® 投与			●	●	●										
TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与						●									
問診、PS、SpO ₂ 、 バイタルサイン	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●	
感染症検査	●														
血液・尿検査	●	●	●			●		●	●	●	●	●	●	●	
胸部 X 線検査	●		●												●
12 誘導心電図	●		●												●
頸部・胸部・腹部・ 骨盤 CT	● ※1		●												●
PET-CT			●												●
上部消化管 内視鏡検査	● ※1		●												●
腫瘍組織生検			●												●
血中動態測定			●			●	● ※3	●	●	●	●	●	●	●	●
免疫機能解析			●									●			●
TCR 遺伝子導入 T リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			●												●
血中サリカイン測定			●			●	● ※3	●	●	●	●	●	●	●	●
LAM-PCR			●												●
RCR の測定			●					●							●
長期保存用 検体の採血			●			●									●
採血量 (ml)	13	10	50			40	80	35	30	30	30	30	30	50	30
免疫機能解析用 採血量 (ml) ※4			20 ～ 50									20 ～ 50		20 ～ 50	
有害事象 ※5				←──											

※1：同意取得日から12週間以内の成績の利用を可とする。

※2: TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前日に各検査を実施することを可とする。

※3: TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後、1 時間後、3 時間後、6 時間後、12 時間後に行う。

※4: 被験者の Hb 値を考慮したうえで採血量を決定する。

※5：1年に1度の頻度でFDAガイドラインに従い、最短15年にわたり検査を実施する。

※6：前処置開始以降に発現したものを有害事象として取り扱う

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 A 期	T1	N0	M0
I B 期	T2	N0	M0
II A 期	T3	N0	M0
II B 期	T1、T2	N1	M0
III A 期	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
	T1、T2	N2	M0
III B 期	T3	N2	M0
III C 期	T4a	N0	M0
	T4b	N1	M0
	Any T	N3	M0
IV 期	Any T	Any N	M1

[UICC International Union Against Cancer —第7版(2009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/高度異形成
- T1 粘膜固有層、粘膜筋板、または粘膜下層に浸潤する腫瘍
 - T1a 粘膜固有層または粘膜筋板に浸潤する腫瘍
 - T1b 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
 - T4a 胸膜、心膜、横隔膜に進達する腫瘍
 - T4b 大動脈、椎体、気管など他の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 1-2 個の所属リンパ節に転移あり
- N2 3-6 個の所属リンパ節に転移あり
- N3 7 個以上の所属リンパ節に転移あり

M: 遠隔転移

- M0 遠隔転移なし
- M1 遠隔転移あり

所属リンパ節

所属リンパ節は、原発部位にかかわらず、腹腔動脈リンパ節や頸部食道傍リンパ節を含む食道のリンパ流領域にあるリンパ節であるが、鎖骨上リンパ節は含まない。

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、時に少し介助が要することもある。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

1) 測定可能病変

腫瘍病変では少なくとも1方向で正確な測定が可能であり(測定断面における最大径(長径)を記録する)、かつ以下のいずれかのサイズ以上のもの。

- ・ CTで10mm (CTのスライス厚は5mm以下)
- ・ 測径器による測定で10mm (測径器により正確に測定できない病変は測定不能として記録する)
- ・ 胸部X線写真で20mm

また、リンパ節病変では病的な腫大と判断され、かつ測定可能なリンパ節はCTで評価した短軸の径(短径)が15mm以上(CTのスライス厚は5mm以上を推奨)。ベースラインおよび経過中は短径のみを測定して評価する。

2) 測定不能病変

測定不能病変とは小病変(長径が10mm未満の腫瘍病変または短径が10mm以上15mm未満であるリンパ節病変)、および真の測定不能病変を含む、測定可能病変以外のすべての病変。

評価の方法

標的病変や非標的病変として報告される各病変を記録するにあたっては、ベースラインおよび観察期間を通じて、同一の評価法かつ同一の技術を用いる。追跡する病変が、画像評価はできないが臨床評価はできるという場合を除き、原則として画像診断に基づく評価を行うこととする。

標的病変及び非標的病変の選択

ベースライン評価において2個以上の測定可能病変を認める場合、合計が5個(各臓器につき最大2病変)までの病変を標的病変として選択し、これらについてベースライン評価での測定値を記録する(すなわち、浸潤臓器が1臓器の場合は最大で2病変、2臓器の場合は最大で4病変を記録する)。

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。なお、リンパ節病変については短径で10mm未満に縮小。
- ・ 部分奏効(PR): ベースライン径和と比較して標的病変の径和が30%以上減少。
- ・ 進行(PD): 経過中の最小の径和と比較して標的病変の長径和が20%以上増加、かつ径和が絶対値でも5mm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。

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

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

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かつ腫瘍マーカー値が基準値上限以下。すべてのリンパ節は病的腫大とみなされないサイズ (短径が 10mm 未満) である。
- ・非 CR/非 PD : 1 つ以上の非標的病変の残存かつ/または腫瘍マーカー値が基準値上限を超える。
- ・進行 (PD) : 非標的病変の増大により臨床研究を中止するに値するような場合。

新病変出現の有無

ベースライン評価では撮影されなかった臓器や部位において、経過の検査で病変が同定された場合、それは新病変とみなされ増悪と判定される。また、ベースライン評価時に撮影されなかった部位について、臨床研究中の画像診断にて転移等が確認された場合は PD の証拠とみなされる。更に、腫瘍サイズが小さい又は画像が不鮮明などの理由で新病変が明確ではない場合に、後日の検査等により新病変であることが確定された場合には最初の撮影の日付を持って増悪と判定する。

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	Non-CR/non-PD	なし	PR
CR	評価なし	なし	PR
PR	Non-PD or 評価の欠損あり	なし	PR
SD	Non-PD or 評価の欠損あり	なし	SD
評価の欠損あり	Non-PD	なし	NE
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)、NE=Not Evaluable (評価不能)

臨床研究ご参加についての説明文書

免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的
TCR 遺伝子導入 T 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遺伝子治療臨床研究審査委員会において、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います。

(遺伝子治療臨床研究審査委員会 承認日： 年 月 日)

第 1 版 作成年月日：2012 年 10 月 1 日

目次

1. 臨床研究とは	3
2. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて	4
3. 本臨床研究の方法と目的	4
4. 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間	5
5. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び 他の組織との関わり	5
6. あなたの費用負担について	5
7. 健康被害の補償について	5
8. 新たな情報のお知らせについて	6
9. あなたに守っていただきたいこと	6
10. 検体提供のお願い	7
11. 個人情報の保護について	8
12. 個人情報の第三者への提供制限について	8
13. 知的財産権の帰属について	9
14. 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について	9
15. あなたの病気について	9
16. 他の治療法について	11
17. 本臨床研究に参加できる方、参加できない方	11
18. 本臨床研究の概要（スケジュール）について	13
19. 本臨床研究の中止について	18
20. 期待される効果と原理について	18
21. ^{ディージーン} TCR 遺伝子治療臨床研究の国内外での状況について	20
22. 予想される危険性および副作用	21
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について	28
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制	28

1. 臨床研究とは

これまでに多くの病気の原因が解明され、たくさんの「お薬」や「治療法」が開発されました。どの「お薬」や「治療法」も、患者さまに安心して使っていただくためには、効果（有効性）や安全性を確認する必要があります。そのためには、最初に目的とする効果を有する候補物質を探索し、動物を使って有効性や安全性を調べる実験が行われます。動物で有効性と安全性が確認されたうえで、最終的に患者さまに使用していただき、有効性と安全性を検討する必要があります。

新たな「お薬」や「治療法」を患者さまに使用していただき、安全性や有効性を評価することを臨床研究といいます（臨床試験ともいいます）。一般的に臨床試験には、第Ⅰ相試験、第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験があります。それぞれの試験の目的は以下のとおりです。臨床試験は、一般的に第Ⅰ相試験から始め第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験と段階を踏みながら慎重に進んでいきます。このように臨床研究および臨床試験には、研究的な一面があることを十分ご理解ください。

	目的
第Ⅰ相試験	一般的なお薬では、少数の健康な男性もしくは患者さまに使用していただき、安全性と適切な投与量を確認します。 抗癌剤等の副作用が強いと考えられるお薬の場合には、対象となる少数の患者さまに使用していただき、安全性と適切な投与量を確認することがあります。
第Ⅱ相試験	一般的なお薬では、少数で比較的軽症な患者さまに使用していただき、有効性と安全性を確認します。 抗癌剤等の副作用が強いと考えられるお薬の場合には、軽症な患者さまだけではなく、重症な患者さまも対象として、有効性と安全性を確認することがあります。
第Ⅲ相試験	第Ⅱ相試験よりも多数もしくは重症な患者さまに使用していただき、有効性と安全性を確認します。

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、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会（臨床研究を実施する者から独立した委員会）と国の審議会の審査を受け、承認されたものです。

本臨床研究は必ず、患者さまの同意をいただいたうえで行うことが義務付けられています。

なお、本臨床研究は、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）とタカラバイオ株式会社との共同研究に基づいて、三重大学医学部附属病院で実施します。

2. 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、あなたの意思で決めてください。たとえ臨床研究への参加を断られても、あなたが不利益を受けることは一切ありません。お断りになられた場合には、その時点において最も良いと考えられる治療を行います。

また、この臨床研究へ参加することを同意された後でも、あなたの意思でいつでも参加を取りやめることができます。中止を希望される場合には、担当医師に申し出てください。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、^{ティーツーアール}TCR^{ティーツー} 遺伝子導入^{ティーツー} Tリンパ球の輸注を受けた後は、あなたの体内から^{ティーツーアール}TCR^{ティーツー} 遺伝子導入^{ティーツー} Tリンパ球を取り除くことはできません。また、^{ティーツーアール}TCR^{ティーツー} 遺伝子導入^{ティーツー} T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、あなたの安全を確認するために必要な検査等を実施することにご協力ください。

3. 本臨床研究の方法と目的

本臨床研究は、所定の条件を満たした食道癌の患者さまに対する治療効果を期待して、MAGE-A 4^{メー ジ エイフォー}を認識する^{ティーツーアール}TCR^{ティーツー} 遺伝子を導入した^{ティーツー} Tリンパ球を投与し、好ましくない影響が起こっていないか（安全性）、食道癌がどの程度良くなったか（有効性）を確認することを目的として行われます。なお、^{ティーツーアール}TCR^{ティーツー} 遺伝子を導入した^{ティーツー} Tリンパ球を投与する前に、十分な効果を発揮させるため、抗がん剤として一般的に使用されているシクロホスファミドを1日1回、3日間投与します。

4. 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間

本臨床研究は、標準的な治療法では十分な効果が期待できない食道癌の患者さまもしくは、再発した患者さまを対象に行われます。なお、参加していただく患者さまは、12名を予定しています。

この臨床研究の実施期間は 20__年__月__日～20__年__月__日迄を予定しています。あなたが本臨床研究に参加いただく期間（同意取得から終了時の検査を終えるまで）は、約 60 日間（入院約 2～4 週間、外来通院約 4～6 週間）を予定しています（^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}T リンパ球の調製や投与の準備にかかる時間、副作用の有無により変化します）。

5. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

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。

6. 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^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入にかかる費用や^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}T リンパ球を投与する前の処置として必要なお薬、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、この臨床研究と関係のない病気（例えば、高血圧や糖尿病など）に対する治療費は、通常の診療と同様に患者さまの加入している健康保険が適用され、その治療にかかる費用は患者さまの負担となります。

また、臨床研究終了後、年 1 回程度の安全性確認のための来院時の検査費用等に関しても上記が適用されます。

7. 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、適切な治療を行います。本臨床研究と健康被害の間に合理的な可能性があり、少なくとも因果関係が否定できないと判断された、健康被害に関する治療については、あなたの負担はありません。なお、本臨床研究との関連が認められない健康被害については、

あなたの加入している健康保険を利用し治療していただき、費用についてはあなたにお支払いしていただきたいと考えております。また、本臨床研究に参加することにより期待される効果が得られなかった場合についても、補償の対象とはなりませんのでご了承ください。

健康被害と臨床研究の関連性についての判定は本臨床研究にて、あなたを担当している医師が行い、その判定結果について、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会が承認します。判定結果について異議がある場合には、あなたからの請求により、私たちとは利害関係を有さない「安全・効果評価・適応判定部会」にて再度判定し、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会が承認します。また、当院に過失がない限り、補償金が支払われないことをご了承ください。

8. 新たな情報のお知らせについて

本臨床研究参加中に新しい情報（例えば本臨床研究と同様の臨床試験が国内及び海外で行われた場合の結果等）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。そのため、本臨床研究を継続して参加されるかどうかについて影響を与えと考えられる情報を入手した場合は、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。

9. あなたに守っていただきたいこと

- ① 病院内の他科や別の病院にて治療を受けている場合や、本臨床研究の途中で病院内の他科や別の病院にて治療を受ける場合は、必ずその旨をお知らせください。あなたの安全のため、病院内の他科や別の病院の先生へ遺伝子治療の臨床研究に参加している旨の情報を提供したり、通院先でどのような治療を行っているか情報を提供していただく場合があります。しかし、いずれの場合にも、あなたに御了承をいただいたうえで行います。
- ② お薬の種類によっては副作用が起こりやすくなったり、本臨床研究に影響を及ぼす可能性がありますので、新たにお薬の服用を開始される場合には、担当医師へお伝えください。
- ③ 担当医師の指示に従い、定められた来院日には必ず来院してください。その際には診察や定められた検査を行います。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。

- ④ 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、我慢せず担当医師や臨床研究コーディネーター等に相談したり、当院（通院困難な場合には近隣の医療機関）を受診してください。
- ⑤ 本臨床研究での^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球による生殖器や胎児への影響に関する十分な検討がなされておりません。そのため、本臨床研究参加から終了後5年間は避妊することをお願いします。

10. 保存サンプル及び検体提供に関するお願い

あなたから採取した血液等の検体について、この臨床研究で予定された検査に使用された後は、一定期間保存したいと考えております。この検体（保存サンプル）は、将来予期せぬ副作用などが発生した際に原因を確認するために必要な検査に使用されます。保存期間は10年間を予定しています。保存サンプルは匿名化され、保存サンプルから個人が特定されることはありません。また、保存期間を超えた保存サンプルは自動的に破棄されますが、副作用が発生し検査をさらに追加する必要がある場合には保存期間を延長する場合があります。

また、本臨床研究のために、あなたからいただいた細胞や組織、それらから作製した^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球は、遺伝子治療の研究を行ううえで非常に貴重なものです。もし、投与や検査の後に使用されなかった検体がある場合には、三重大大学の細胞調製施設にて保管し、三重大大学や三重大大学と連携している研究機関へ提供し本臨床研究の更なる発展や、新たな診断法や治療法の開発のために使用させていただきたいと考えております。また、万が一あなたに何らかの副作用が発生し、担当医師が必要と判断した際には、原因を解明するために長期保存している検体とあわせて使用したいと考えております。いただいた検体等を使用する際には、あなたに新たな肉体的負担や金銭的負担を求めることはございませんし、あなたからいただいた検体に関する情報は、あなたの個人情報と同様に適切かつ厳重に管理されます。

もし、このお願いを断られたとしても、臨床研究に参加することは可能ですし、何ら不利益を被ることはありません。

また、同意をいただいた後でも、同意を撤回したい場合には、その旨を担当医師に申し出ていただければ、検体の保存を中止し破棄するなど、適切な対応をとります。

11. 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、「国立大学法人三重大学個人情報保護規程」（平成 22 年 4 月 1 日施行）および「三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程」（平成 17 年 4 月 1 日施行）に従い、適切に管理、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、あなたの安全を守るために使用します。さらに、本臨床研究に参加される全ての患者さまの安全を守るため、本臨床研究に参加している医療機関へ、あなたの臨床研究に関する情報を提供します。情報提供にあたっては、本臨床研究に関与しない第三者に情報漏洩しないよう十分に注意したうえで行います。また、あなたの安全を守るために、本臨床研究に参加している全ての患者さまの臨床研究に関する情報を収集します。

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、本臨床研究の結果を検討する時や、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。

12. 個人情報の第三者への提供の制限について

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や、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るあなたの診療記録を閲覧することがありますので予めご了承ください。なお、その際には、あなたの個人情報は本臨床研究に関与しない第三者へ漏洩しないよう細心の注意を払い取り扱われます。

本臨床研究では、タカラバイオ株式会社が外部協力者としてレトロウイルスベクターの製造や^{ディーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子導入^{ディー}T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、^{アールシーアール}RCR検査及び^{ラム}LAM-^{ピーシーアール}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^{ディーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子導入^{ディー}T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、タカラバイオ株式会社の担当者が閲覧する可能性があります。ただし、閲覧した情報が

ら個人が特定できないよう被験者識別コードを用いて個人情報を匿名化します（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）。

13. 知的財産権の帰属について

この臨床研究の結果により、特許権などの知的財産権が生じる可能性があります。その権利はあなたではなく、当院や共同研究機関などに帰属します。

14. 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について

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。

【個人情報に関する相談窓口】

三重大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

- ・診療に関すること：医療サービス課 診療案内係（TEL：059-231-5072）
- ・教育・研究に関すること：総務課 企画第1係（TEL：059-231-5261）

15. あなたの病気について

癌にはその進行の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つの要素によって癌の進行の度をあらわすことができます。以下にその分類を示します。

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、化学療法、放射線療法等の標準的な治療の実施が困難となったⅢ期、Ⅳ期の食道癌
- ☐ 手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、その後の治療が困難となった食道癌であることが判明しました。

表 1 食道癌の病期分類（^{ティーンエージ}TNM分類一部改変）

病期分類			
Ⅰ期	Tis	NO	MO
ⅠA期	T1		
ⅠB期	T2		
ⅡA期	T3		
ⅡB期	T1、T2	N1	
ⅢA期	T4a	NO	
	T3	N1	
	T1、T2	N2	
ⅢB期	T3	N2	
ⅢC期	T4a	NO	
	T4b	N1	
	Any T	N3	
Ⅳ期	Any T	Any N	M1

T：腫瘍の状況

- Tis 上皮内癌/高度異形成
- T1 粘膜固有層、粘膜筋板、また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
 - T4a 胸膜、心膜、横隔膜に進運する腫瘍
 - T4b 大動脈、椎体、気管など他の周囲組織に浸潤する腫瘍

N：リンパ節への転移

- NO 所属リンパ節転移なし
- N1 1-2 個の所属リンパ節に転移あり
- N2 3-6 個の所属リンパ節に転移あり
- N3 7 個以上の所属リンパ節に転移あり

M：遠隔転移

- MO 遠隔転移なし
- M1 遠隔転移あり

食道癌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^{キューオーエル}（「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。）

16. 他の治療法について

あなたの食道癌に対して、これまでに手術、あるいは化学療法や放射線療法を行いました。根治には至っておりません。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今後の治療方法が異なってきます。そのため、患者さまによって個々の状態が異なることから、現時点ではどの治療法を用いることが最も患者さまにとって有益であるか、結論は出ておりません。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^{キューオーエル}向上のための緩和医療）を受けることもできます。

17. 本臨床研究に参加できる方、参加できない方

本臨床研究に参加できる方は以下の全ての条件を満たす患者さまです。

- ① 根治切除不可能で、化学療法、放射線療法等の標準的な治療が困難となった臨床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、治療が困難となった食道癌の方
- ② HLA^{エイチエルエイ} -A*24:02（白血球の型）陽性の方
- ③ 癌組織にMAGE-A^{メー ジ} 4^{エイフォー}の発現が確認されている方
- ④ 肉体労働は制限を受けるが、軽い家事や事務作業は可能な方。
（パフォーマンス^{パフォーマンス} ステータス^{ステータス} 0～1 に該当する方）
- ⑤ 本臨床研究に参加時点の年齢が20歳以上75歳以下の方
- ⑥ 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から十分な回復が見込まれる方
- ⑦ 主要な臓器（骨髄、心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査に

大きな異常値がない方

⑧ 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

⑨ TCR^{ティンダー} 遺伝子導入 T^{ティン} リンパ球の調製が完了した方（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、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
- ・間質性肺炎^{かんしつせい}又は肺線維症^{はいせんいしょう}
- ・活動性の自己免疫疾患

② 重篤な過敏症の既往歴を有する方

③ B型肝炎ウイルス^{ビー}、C型肝炎ウイルス^{シー}、HIV^{エイチアイブイ}（ヒト免疫不全ウイルス）、HTLV-1^{エイチティーエルブイ}（ヒトTリンパ好性ウイルス^{ティン}）のいずれかに感染している方

④ 一次登録時：同意取得後、4 カ月以上の生命予後が見込めない方

二次登録時：TCR^{ティンダー} 遺伝子導入 T^{ティン} リンパ球投与後 3 カ月以上の生存が見込めない方

⑤ 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

⑥ 制御困難な脳内転移を有する方

⑦ 免疫抑制剤又は一定量以上の副腎皮質ステロイド剤を使用している方

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 投与するTCR^{ティンダー} 遺伝子導入 T^{ティン} リンパ球による副作用が予測される方

⑫ その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた方

18. 本臨床研究の概要（スケジュール）について

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、以下に示した方法に従って本臨床研究を実施します。

第Ⅰ段階：^{ティー}Tリンパ球への^{ティーシーアール}TCR遺伝子の導入

- 1) 腫瘍細胞に癌抗原（本臨床研究で標的としている癌抗原を「MAGE-A^{メー ジ エイフォー}4」といいます）が発現し、白血球の型が「HLA-A*24:02^{エイチエルエー エー}」である患者さまの末梢血（「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）中から採取装置を使ってTリンパ球を採取します。これをアフエレーシス（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。

^{エイチエルエー}HLA（human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原）について

^{エイチエルエー}HLAとは白血球の型のことで、細胞の表面に存在し自分の体と外部から侵入した細菌等の異物を区別して認識する重要な抗原（免疫反応を引き起こさせる物質）です。主要な^{エイチエルエー}HLAの型として、^{エー}A抗原、^{ビー}B抗原、^{ティーアール}DR抗原があります。さらに^{エー}A抗原、^{ビー}B抗原、^{ティーアール}DR抗原は細分化されます。日本人のおよそ60%が^{エイチエルエー エー}HLA-A*24:02を有しています。

- 2) 採取したリンパ球は三重大学内の細胞処理センターへ運ばれ、血液に異物が混入しないよう、細心の注意を払い、MAGE-A^{メー ジ エイフォー}4を認識するアンテナ（これを「^{ティー}T細胞受容体：^{ティーシーアール}TCR」といいます）を^{ティー}Tリンパ球に作るために、人工的に作製した遺伝子を^{ティー}Tリンパ球に導入します。遺伝子を^{ティー}Tリンパ球に導入するために、レトロウイルスベクターと呼ばれる運び屋を利用します。

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、細胞へ人為的にDNA^{ディーエヌエイ}（遺伝情報を担う物質）を入れる際に用いるウイルス等を指します。レトロウイルスは遺伝子を導入するベクターとして最も早く応用が進んだウイルスです。

レトロウイルスを用いて遺伝子を細胞に導入することで、導入した遺伝子が標的細胞の染色体（DNA^{ディー・エヌ・エイ}が小さく折りたたまれたもの）に組み込まれるため、細胞が二つに増える時に導入した遺伝子は複製され、どちらの細胞にも確実に伝達されます。そのため、長期間にわたり導入した遺伝子を安定して発現させることが可能となります。

- 3) 患者さまに投与する細胞の調製が完了後一部を抜き取り、調製した細胞に異物が含まれていないか等、品質の確認を行います。確認結果が得られるまで、患者さまに投与するものは冷凍庫にて保存します。そのため、投与可能になるまで、約 3 週間程度かかることをご了承ください。二回目の同意をいただいた日より 4 週間以内に食道癌に対する治療等を行うと遺伝子治療による効果や安全性を確認できなくなるため、原則として無治療で経過を観察させていただきます。ただし、患者さまの状態によっては担当医師の判断により何らかの治療が行われる場合があります。さらに、シクロホスファミド投与の前に患者さまの身体の状態が定められた基準を満たすことを確認します。細胞調製の結果、予定していた細胞量が得られなかったり、品質に問題があったりするなど、定められた基準を満たしていないことが判明した場合には、患者様の身体の状態等を考慮したうえで、再度リンパ球の採取を行うことにご了承いただければ、再び細胞調製を行うことも可能です。

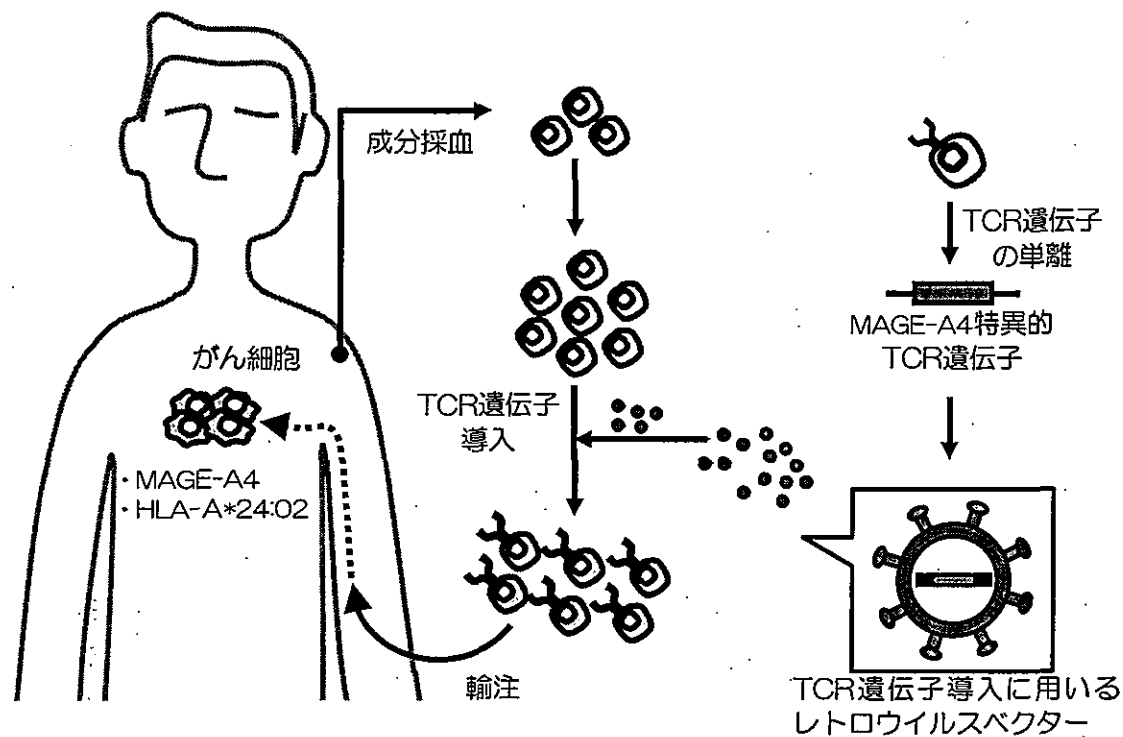


図1 遺伝子治療臨床研究の概要

また、細胞の調製が完了し投与するための品質を満たしていたとしても、患者さまの身体の状態が悪く投与の基準を満たさない場合は、投与ができなくなることをあらかじめご了承ください。

第Ⅱ段階：^{ディージェーアール}TCR^{ディ}遺伝子導入^{ディ}Tリンパ球の投与

4) 投与する^{ディージェーアール}TCR^{ディ}遺伝子導入^{ディ}Tリンパ球の効果を高める目的で、シクロホスファミドと呼ばれる抗がん剤を^{ディージェーアール}TCR^{ディ}遺伝子導入^{ディ}Tリンパ球投与の5日前から1日1回、3日間投与します。その後、^{ディージェーアール}TCR^{ディ}遺伝子導入^{ディ}Tリンパ球を投与しますが、シクロホスファミドの影響により白血球の数が減少し、感染症にかかりやすい状態となることが予想されます。そのため、^{ディージェーアール}TCR^{ディ}遺伝子導入^{ディ}Tリンパ球投与から最低14日間は、安全性を確認するために入院していただき各種検査を受けていただくことになります（患者さまの状態によっては、予定よりも長く入院していただくこともあります）。特に、今回使用するレトロウイルスベクターは患者さまの体内で増殖

しないように作られていますが、変異により増殖能力を持つレトロウイルスが患者さまの血液中に出現する可能性は否定できません。国の指針等により増殖能力を有するレトロウイルスが出現していないことを確認できるまで、外部環境中にレトロウイルスが放出される可能性を最小限にすることが規定されていますので、^{チー}TCR^{シー} 遺伝子導入 T リンパ球投与後、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の措置にご協力していただく必要があります。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入 T リンパ球とシクロホスファミドの適切な投与量を確認するため、それぞれの組み合わせにより 4 つのグループを設定しております。具体的な投与量については以下の表にてご確認ください。患者さまの安全のため、低用量であるグループ 1 から順に患者さまの登録が行われ、グループ 1 の投与量が安全であると判断されれば、グループ 2、グループ 3、グループ 4 へと段階を経て行われます。

	遺伝子導入 T リンパ球投与量	シクロホスファミド投与量
グループ 1	1×10 ⁹ 個 (10 億個)	400mg/m ² /日 × 3 日
グループ 2	5×10 ⁹ 個 (50 億個)	400mg/m ² /日 × 3 日
グループ 3	5×10 ⁹ 個 (50 億個)	500mg/m ² /日 × 3 日
グループ 4	5×10 ⁹ 個 (50 億個)	600mg/m ² /日 × 3 日

もし、副作用が発生した場合には、適切な処置を行います。また、各グループ 3 人のうち 1 人でも重い副作用（重篤な有害事象といいます）が、発生した場合には、適切な治療を行うとともに、さらに詳しく安全性を確認するため、重い副作用が発生した患者さまと同じ細胞数で新たに 3 人の患者さまに対して投与が行われます。もし、同じグループで 2 人以上に重い副作用が発生した場合には、その細胞数では重い副作用が起こりやすいものと判断し臨床研究は中断されます。

あなたは グループ に振り分けられ、本臨床研究にご協力いただくこととなります。

※ただし、採取した細胞数が少なかったり、採取した細胞の増殖が当初の予定よりも悪かった場合には、投与する細胞数が少なくなる場合があります。

また、患者さまの身体の状態等を考慮したうえで、再度リンパ球の採取を行うことにご了承いただければ、再び細胞調製を行うことも可能です。

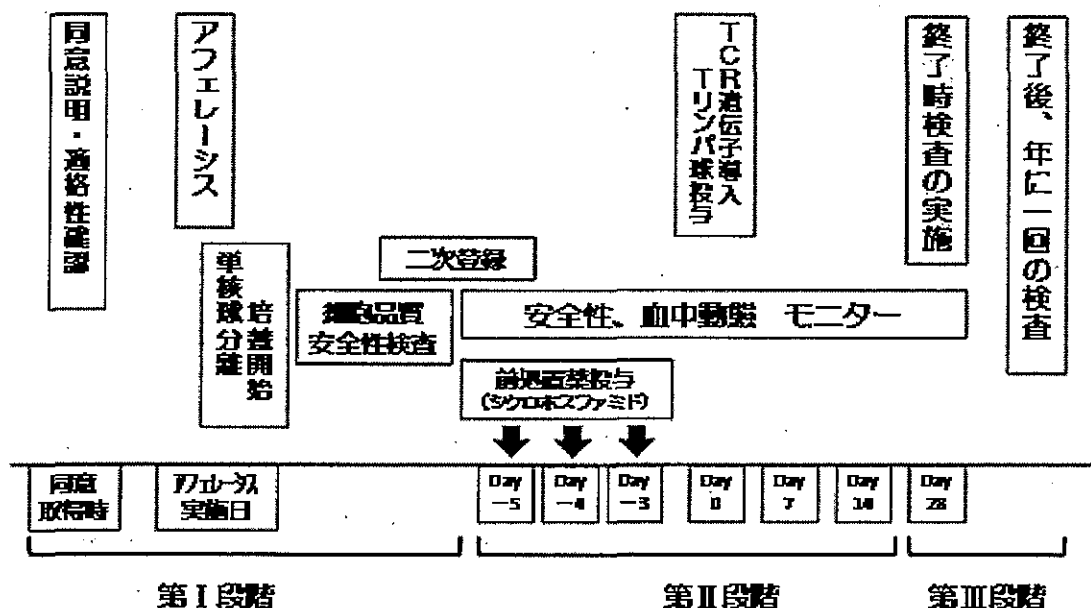


図3 遺伝子治療臨床研究のステップ

第Ⅲ段階：臨床研究終了後

5) 本臨床研究は、^{ディーシーアール}TCR 遺伝子導入 ^{ディー}Tリンパ球投与から 28 日後に終了を予定しています。また、遺伝子治療は長期にわたる安全性が確立しておりませんので、最短でも 15 年間は年に 1 回程度は安全性の確認を目的として、投与した^{ディーシーアール}TCR 遺伝子導入 ^{ディー}Tリンパ球の生存確認、および新たな癌の発生の有無や増殖能を持つレトロウイルスの有無について調べるため、来院していただくことにご協力ください。

なお、本臨床研究の検査の一部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行われますが、検査に用いた検体から患者さま個人を特定できないよう、特に注意を払い検体の輸送及び検査が行われます。

表2 遺伝子治療臨床研究の検査・観察のスケジュール

※追跡調査については、1年に1回の頻度で最短15年間にわたり検査を行います。

	同意 取得日	アムニ 実施日	二次 登録時 day -12 ~ -5	day		Tリガ球 投与日 (day0)	day						終了・ 中止時 day28	追跡 調査 ※
				-4	-3		1	2	3	7	14	21		
同意取得	●		●			●								
アムニ		●												
前処置 シメタマシド投与			●	●	●									
TCR遺伝子導入 Tリガ球投与						●								
問診	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	
感染症検査	●													
血液・尿検査	●	●	●			●	●	●	●	●	●	●	●	
画像検査	●		●										●	
腫瘍組織生検			●										●	
長期保存用 検体の採血			●			●							●	
血中動態測定及び 免疫機能解析等			●			●	●	●	●	●	●	●	●	●
採血量 (ml)	13	10	50			125	35	30	30	30	30	30	50	30
免疫機能解析用 採血量 (ml)			20 ~ 50								20 ~ 50		20 ~ 50	
有害事象														

19. 本臨床研究の中止について

あなたに本臨床研究継続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。中止時には、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により中止した場合には、速やかに適切な処置を行います。また、有害事象については安全性が確認されるまで追跡調査が行われることをご了承ください。ただし、^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入 ^{ディー}Tリンパ球を投与した後は、中止後もあなたの安全を確保するため、1年に1回の頻度で来院していただき、安全性に関する検査を実施することにご了承ください。

- 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) 有害事象により本臨床研究の継続が困難な場合
- 3) 対象疾患の悪化により本臨床研究の継続が困難な場合
- 4) 担当医師が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

20. 期待される効果と原理について

近年、癌細胞の表面に正常な細胞とは異なる“目印”が存在することが解明されました（この目印を「癌抗原」といいます）。また、この癌抗原を認識して、癌細胞を攻撃・破壊する細胞（この細胞を「細胞傷害性^{ティ-}リンパ球」といいます）が体内に存在することも証明されました。

本臨床研究は、患者さま自身の血液からリンパ球を採取し、細胞傷害性^{ティ-}細胞にMAGE-A^{メー ジ エイフォー} 4 とよばれる癌抗原を認識するために必要な「アンテナ（これを「^{ティ-}細胞受容体：TCR^{ティ-シーアール}」）と（いいます）」であるTCR^{ティ-シーアール} 遺伝子を導入します。その後、点滴により患者さまの体内にTCR^{ティ-シーアール} 遺伝子導入^{ティ-}リンパ球を戻すことにより、食道癌に対する治療効果が期待されます。なお、TCR^{ティ-シーアール} 遺伝子導入^{ティ-}リンパ球を戻す前に、TCR^{ティ-シーアール} 遺伝子導入^{ティ-}リンパ球の効果を高める目的でシクロホスファミドとよばれる抗がん剤を投与します。

^{ティ-}リンパ球について

血液は、血漿という液体成分と血球という細胞成分から構成されており、血球には赤血球、白血球、血小板の3種類の細胞が含まれています。白血球にはさまざまな種類があり、その中の一つであるリンパ球は、白血球の約25%を占めています。さらに、リンパ球は免疫系にかかわる^{ビー}Bリンパ球、^{ティ-}リンパ球等から構成されています。

TCR^{ティ-シーアール}について

^{ティ-}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（免疫反応に関連する物質）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。^{ティ-}リンパ球の表面に出ている、抗原を認識するためのアンテナを^{ティ-}細胞受容体（TCR^{ティ-シーアール}）といいます。

MAGE-A^{メー ジ エイフォー} 4について

MAGE-A^{メー ジ エイフォー} 4とは癌細胞に多く存在している蛋白であり、正常組織では精巣以外の細胞では、ほとんど存在していません。ただし、癌細胞によってはMAGE-A^{メー ジ エイフォー} 4が存在しない場合もありますので、検査にて存在の有無を確認する必要があります。

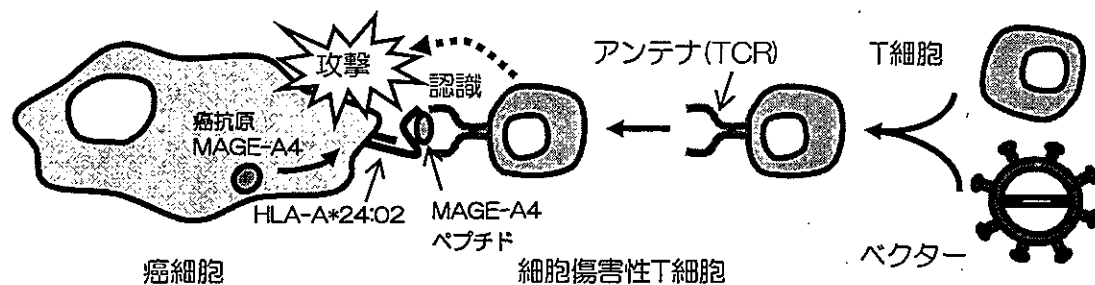


図2 細胞傷害性T細胞による癌抗原の認識

21. ^{ディージェアール}TCR 遺伝子治療臨床研究の国内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、進行性の転移性悪性黒色腫（メラノーマと呼ばれる皮膚癌の一種です）の17例に対して臨床試験が行われ、2006年にその結果が報告されました。悪性黒色腫に特有な「MART-1」と呼ばれる癌抗原を認識する^{ディージェアール}TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて^{ディージェアール}Tリンパ球に遺伝子導入後、被験者へ投与したものです。この臨床試験において、^{ディージェアール}TCR 遺伝子導入^{ディージェアール}Tリンパ球を投与したことによる大きな副作用は認められませんでした。また、2例では、投与後1年を超えても^{ディージェアール}TCR 遺伝子導入^{ディージェアール}Tリンパ球が血液中に非常に高い水準で維持され、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 抗原や gp100 抗原との反応性をより強くした^{ディージェアール}TCR 遺伝子を用いた臨床試験では、目および耳に一時的な副作用が発生したと2009年に報告されています。また、CEAを標的抗原とする大腸癌を対象にした臨床試験では腫瘍縮小効果が認められましたが、一時的な重篤な有害事象として正常な大腸粘膜への傷害性が報告されています。さらに、癌精巢抗原である NY-ESO-1 を標的にした転移性滑膜細胞肉腫、転移性悪性黒色腫患者への遺伝子導入自己リンパ球輸注臨床試験では、腫瘍縮小効果などの臨床効果が確認されており、安全性についてはリンパ球輸注の際に併用した前処置薬あるいは^{インターロイキン}IL-2 投与による副作用以外、遺伝子導入リンパ球輸注に関する有害事象の発生はなかったと報告されています。

ただし、体外にて^{ディージェアール}TCR 遺伝子を被験者本人の細胞に導入してから患者さまの体内へ戻す臨床試験は、悪性黒色腫、滑膜肉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、これまでに行われてきた臨床試験と今回の試験は条件（標的となるがん抗原、導入された^{ディージェアール}TCR 遺伝子、^{ディージェアール}TCR に対して抗原ペプチドを提

示するHLA^{エイチエルエー}分子の種類、投与されたペプチドの種類など）が異なるために、安全性や効果の程度が異なる可能性があります。

また、三重大学では今回使用するレトロウイルスベクターと同じものを用いてTCR^{ティーシーアール}遺伝子を導入した細胞が複数の患者さまに投与されましたが、これまでに、TCR^{ティーシーアール}遺伝子を導入した細胞の影響と考えられる副作用は認められておりません。

22. 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件以上実施されています。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遺伝子が、T^{ティー}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言えません。そのため、あらかじめ定められた遺伝子治療についての規則やガイドラインに従い、レトロ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。ただし、現在の科学技術では、レトロウイルスベクターを用いることにより発生する副作用および危険性を完全に排除することはできませんので、考えられる副作用および危険性について、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。今回の遺伝子治療に使用するレトロウイルスベクターは、一度細胞に感染すると他の細胞に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レトロウイルスベクター自身が増殖を始め、身体に悪影響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TCR^{ティーシーアール}遺伝子導入T^{ティー}リンパ球のみが投与されます。また、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ため、定期的に検査を行います。

第2点目は、「挿入変異」といわれる、導入する遺伝子が細胞の染色体に組み込まれる際に起こる可能性のある問題です。染色体には、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導入する遺伝子を染色体のいずれかの場所に組み込みます。ただし、組み込む場所をあらかじめ指定することができません。そのため、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、遺伝子導入し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、癌細胞となる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起きて、正常な細胞が癌化へと進む可能性もあります。一般的には、1つの遺伝子に対して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さらに詳しく説明します。

X^{エックス}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、細菌やウイルスにより重症の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11例に対して、遺伝子治療の臨床研究が行われました。この遺伝子治療では11例中9例で治療が成功し、当初は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、その後2例が白血病を発症（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。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、細胞が腫瘍性に増殖した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遺伝子の性質が、細胞の増殖を調節する遺伝子であったため、白血病発症の危険性をさらに高くしたと考えられています。この報告により、同様の遺伝子治療臨床研究を行っていたアメリカでは一時中断し、専門家等による公聴会で議論され、この症例に関する内容を臨床研究に参加している方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、上記の臨床研究で3例目の白血病発症（治療後33ヶ月後）の報告とともに、白血病発症1例目の方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。その後、4例目の白血病発症の報告がされました。なお、別のグループもX^{エックス}連鎖重症複合性免疫不全症に対して、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例で白血病を発症したことが報告されました。

また、慢性肉芽腫症（好中球が正しく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、遺伝子治療が行われました。この遺伝子治療では、15例中3例で、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。また、ウィスコット・アルドリッチ症候群（血小板減少と湿疹を伴う免疫不全症）に対す

る遺伝子治療でも 18 例中 4 例の白血病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導入する遺伝子治療では、10 例中 8 例で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、 $X^{エックス}$ 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に参加することにより得られる利益と不利益を最新の知見に基づき定期的に評価することを条件に継続が認められています。

今回の臨床研究では、遺伝子を導入する細胞は $T^{ハイ}$ 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。造血幹細胞は赤血球や白血球、血小板に分化することが可能な細胞であるため、癌化がおこりやすい細胞ですが、 $T^{ハイ}$ リンパ球は他の細胞へ分化する能力を失った細胞であるため、造血幹細胞に比べ癌化しにくい細胞と考えられています。このことから、導入した遺伝子が染色体に組み込まれることによる挿入変異の可能性は $T^{ハイ}$ リンパ球と造血幹細胞の間で同程度ではあるものの、今回の治療法で細胞が癌化する危険性は、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。過去に日本や海外で実施された、 $T^{ハイ}$ 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、イタリアでは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した $T^{ハイ}$ リンパ球を投与した

46 例を対象に、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な増殖は認められなかったと報告しています。

以上より、今回の遺伝子治療に起因する細胞の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、抗癌剤の投与等の最善と考えられる治療を行います。

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

・ルート確保に関すること

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、感染気胸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

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、失禁がみられることもあります。このような副作用が出現した場合は、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。

②前処置治療に伴う副作用

- ・ 悪心・嘔吐、食欲不振等

遺伝子導入 T リンパ球投与の前にあなたへ投与されるシクロホスファミドは乳癌や悪性リンパ腫の治療に使用される抗がん剤です。シクロホスファミドは投与することにより白血球（リンパ球）が減少することが知られております。そのため、このお薬で患者さんの体内におけるリンパ球の一時的な減少を起こして、遺伝子導入リンパ球が体内で増えやすい状態にすることを目的としております。一方で、シクロホスファミドには他にも副作用が発生しやすいことが知られており、投与当日から 5 日間ほど悪心・嘔吐、食欲不振が起きる可能性があります。そのため、少しでも症状を悪心・嘔吐の症状を緩和するため制吐剤（吐き気止め）を工夫して投与しますが、ある程度は起きることが予想されます。

- ・ 粘膜障害、下痢

シクロホスファミド投与後 7～10 日後に、口や腸の粘膜が傷害を受ける場合があります。口の中の粘膜が傷害を受けると口内炎が発生し、腸の粘膜が傷害を受けると下痢等の症状が発生します。それらの症状が発生した場合には、適切な治療を行います。

- ・ 白血球減少

リンパ球の減少に伴って血液中の白血球数も減少します。白血球は細菌などの異物に対する防御機能を有していることから、白血球の減少により感染症にかかりやすい状態となります。そのため、感染予防目的で抗菌剤の内服及び手洗い、うがいをこまめにさせていただきます。しかし、これらの感染症予防対策をしていても感染症にかかる可能性もあります。その際は、抗生物質の点滴投与、白血球数を増加させる G-CSF 剤投与等、症状に応じた治療を行います。

- ・ 脱毛

シクロホスファミド投与から 2～3 週間後より脱毛が起こる可能性があります。脱毛の程度には個人差がありますが、ほとんどは一時的なもので、投与が終了してから 2～3 カ月後に生え始めます。

- ・ 出血性膀胱炎

患者さんに投与されたシクロホスファミドは肝臓で分解され、腎臓に運ばれ尿として排泄されますが、分解された成分が膀胱粘膜を荒らすことがあります。ひどい場合は出血を伴うこともあります。時間がかかりますが、徐々に治っていきます。一方で、十分な水分補給により尿量を増やすことで膀胱への傷害は予防できることが知られています。

- ・ 心臓毒性

シクロホスファミドによって、まれに心臓の筋肉内に出血することが知られています。投与後、十分に注意して観察していきます。

③^{ティーシーアール}TCR^{ディー} 遺伝子導入^{ディー} T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

調製した^{ティーシーアール}TCR^{ディー} 遺伝子導入^{ディー} Tリンパ球は、投与するまで凍結保存されます。投与の際には解凍しますが、解凍の際に崩壊した細胞の一部からサイトカイン（細胞から分泌される蛋白）等が放出され発熱、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、症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。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

一般的な輸血でまれに見られる重篤な副作用として「輸血関連急性肺障害（症状として、寒気、発熱、呼吸困難、喀痰を伴わない咳、低血圧、低酸素血症などがあげられます。）」が知られています。輸血関連急性肺障害の発症の原因は不明ですが、抗白血球抗体（抗HLA^{エイチエルエイ}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。本臨床研究では患者さまご本人から採血した血液を輸血しますので、「輸血関連急性肺障害」に類似の病態が発症する可能性は低いと考えられますが、^{ティーシーアール}TCR^{ディー} 遺伝子導入^{ディー} T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の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-A 4^{メー ジ エイフォー}は、正常細胞において発現量が少なく、投与した^{ティーシーアール}TCR^{ティー}遺伝子導入^{メー ジ エイフォー}Tリンパ球による正常組織への細胞傷害の可能性は低いと考えられていますが、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。症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。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。

・その他の事象

^{ティーシーアール}TCR^{ティー}遺伝子導入^{メー ジ エイフォー}Tリンパ球は理論的にMAGE-A 4^{メー ジ エイフォー}を有する細胞のみを攻撃と考えられています。しかし、予想しない効果により、^{ティーシーアール}TCR^{ティー}遺伝子導入^{メー ジ エイフォー}Tリンパ球がMAGE-A 4^{メー ジ エイフォー}を有していない正常な細胞にも攻撃し、体に悪い影響を及ぼす可能性は否定できません。もし、その場合には症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。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。

3) 本臨床研究にて使用する原材料の危険性

本臨床研究では、レトロウイルスベクター製造時や患者さまご本人から採取した^{ティー}Tリンパ球を培養する際に、ウシ血清や他の方から献血等の方法により提供されたヒト血清アルブミン等の生物由来成分を使用しています。そのため、安全性を確保する目的で加熱処理やウイルス検査等が行われた原材料を使用していますが、感染症にかかる可能性を完全には排除できません。万が一、それらによると考えられる副作用が発生又は海外より報告があった場合には、速やかに患者さまご本人へお伝えするとともに、適切な治療を行います。

4) 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は否定できません。その場合も、適切な処置を行います。

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。

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

TEL：059-231-5187

休日・夜間の緊急連絡先 TEL：059-231-5187 又は 059-231-5103

(三重大学医学部附属病院 11 階病棟)

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：

免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

2) 実施施設：

三重大学医学部附属病院

3) 総括責任者：

珠玖 洋^{しゆく ひろし}：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
大学教員

4) 分担研究者：

影山 慎一^{かげやま しんいち}：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^{いけだ ひろあき}：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

宮原 慶裕^{みやはら よしひろ}：三重大学 大学院医学系研究科 がんワクチン講座
講師

今井 奈緒子^{いまい なおこ}：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

石原 幹也^{いしはら みきや}：三重大学医学部附属病院 腫瘍内科
医員

かたやま 片山	なおゆき 直之	：三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 教授、 三重大学医学部附属病院 血液内科、腫瘍内科 科長
なかせ 中瀬	かずのり 一則	：三重大学医学部附属病院 がんセンター 准教授、センター長
ますや 桧屋	まさひろ 正浩	：三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 准教授
すぎもと 根本	ゆか 由香	：三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 助教
ふじえだ 藤枝	あつし 敦史	：三重大学医学部附属病院 血液内科 助教
もんま 門間	ふみひこ 文彦	：三重大学大学院医学系研究科 臨床医学系講座 血液・腫瘍内科学 助教
みずの 水野	としろう 聡朗	：三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 講師、副科長
さいとう 齋藤	かなこ 佳菜子	：三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教
おおいし 大石	こうし 晃嗣	：三重大学医学部附属病院 輸血部 講師、部長
はまだ 濱田	やすひこ 康彦	：三重大学医学部附属病院 光学医療診療部 助教
しろいし 白石	だいぞう 泰三	：三重大学大学院医学系研究科 基礎医学系講座 腫瘍病理学 教授
さとう 佐藤	えいいち 永一	：東京医科大学 人体病理学講座 講師

臨床研究参加同意書

三重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：免疫抑制性前処置後の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）の以下の事項について、文書と口頭にて説明を受け、十分理解しましたので、本臨床研究へ参加することに以下の通り意思を表示します。

了解した事項は□内にしを付けて示します。

- | | |
|--|--|
| ☐ 臨床研究とは | ☐ 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について |
| ☐ 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて | ☐ あなたの病気について |
| ☐ 本臨床研究の方法と目的 | ☐ 他の治療法について |
| ☐ 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間 | ☐ 本臨床研究に参加できる方、参加できない方 |
| ☐ 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり | ☐ 本臨床研究の概要(スケジュール)について |
| ☐ あなたの費用負担について | ☐ 本臨床研究の中止について |
| ☐ 健康被害の補償について | ☐ 期待される効果と原理について |
| ☐ 新たな情報のお知らせについて | ☐ TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について |
| ☐ あなたに守っていただきたいこと | ☐ 予想される危険性および副作用 |
| ☐ 検体提供のお願い | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 個人情報の保護について | ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 |
| ☐ 個人情報の第三者への提供の制限について | |
| ☐ 知的財産権の帰属について | |

どちらかにし又は○で囲む。

私は本臨床研究の参加に

- ☐ 同意します ☐ 同意しません

ティーシーアール

TCR 遺伝子導入Tリンパ球および検体の提供に

- ☐ 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

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： _____

同意撤回書

三重大学医学部附属病院 病院長 殿

私は、「免疫抑制性前処置後の MAGE-A4 抗原特異的
TCR 遺伝子導入 T 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」への
参加に関して同意撤回いたします。

同意撤回日：平成 年 月 日

患者さま

ご署名： _____

同意撤回確認日：平成 年 月 日

総括責任者（又は分担研究者）所属・氏名： _____