

別紙様式第1

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 23年 7月 6日

厚生労働大臣 殿

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



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。


記

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 の 課 題 名	総 括 責 任 者 の 所 属 ・ 職 ・ 氏 名
MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注 による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究	消化器センター・副部長 上 田 修 吾


遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成23年 7月 6日 (申請年月日)

研究の名称	MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	平成 21 年 7 月 17 日 (三重大学医学部附属病院の実施計画の承認日) から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (郵便番号 530-8480)	
	所属機関・部局・職	田附興風会医学研究所 北野病院 消化器センター 外科・副部長	
	氏名	上田 修吾 	
実施の場所	所在地	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (郵便番号 530-8480)	
	名称	財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院	
	連絡先	大阪市北区扇町2丁目4番20号 (電話番号 06-6312-8831)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	尾崎 信弘	田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 消化器センター長	試験登録患者の診療
	珠玖 洋	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 教授	多施設共同臨床研究 代表者、臨床研究薬 品質管理者
	影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 准教授	レトロウイルスベク ター製剤の品質管理 責任者、遺伝子導入 細胞製剤の品質管理 責任者
	池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 准教授	レトロウイルスベク ター製剤の製造管理 責任者、遺伝子導入 細胞製剤の製造管理 責任者 遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価

	今井 奈緒子	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座 助教	遺伝子導入細胞製剤 の体内動態及び免疫 反応の評価
外部 協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター センター長	ウイルスベクターに 関する基礎的助言及 び遺伝子導入 T リン パ球調製技術の提供 と助言、遺伝子導入 細胞製剤の体内動態 検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技 術提供

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	<p>本臨床研究は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文科科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正）」の必要条件を満たしていると認める。</p> <p>本臨床研究で遺伝子導入する細胞はレトロウイルスベクターによる癌化リスクは低く、対象疾患の利益・不利益を総括すると遺伝子治療臨床研究の実施に問題は少ない。また本臨床研究実施計画に先立ち施行された実験動物に遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性試験の結果、遺伝子導入細胞投与群に毒性所見は観察されなかった。また、遺伝子導入細胞は三重大学内細胞調製施設において GMP 基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。本臨床研究を担当する研究者は、遺伝子ベクター調製、癌免疫療法・細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
	北野病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 田附興風会医学研究所 北野病院 副院長 心臓センター長	野原 隆司 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>本臨床研究は、標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A2402 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体（T cell receptor : TCR）α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球（TCR 遺伝子導入リンパ球）輸注について、その安全性、体内動態及び臨床効果を以下のエンドポイントにより評価することを目的とする。</p> <p>① 主要エンドポイント</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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）〕

	<p>② 副次エンドポイント</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤 ・ 腫瘍特異的免疫反応 ・ 腫瘍縮小効果 <p>尚、本臨床研究は三重大学大学院医学系研究科の珠玖洋を多施設共同臨床研究代表者として、三重大学医学部附属病院、大阪大学医学部附属病院、及び田附興風会医学研究所北野病院が参加する多施設共同臨床研究として実施する予定である。</p>
<p>対象疾患及びその選定理由</p>	<p>1. 対象疾患に関する現時点での知見</p> <p>食道癌は 60 歳代男性に多くみられる疾患であり、本邦での年間罹患数 (2003 年、年齢調整) は男性 13,658 人、女性 2,742 人、死亡数 (2007 年、年齢調整) は男性 9,900 人、女性 1,769 人である。食道癌は縦隔等へ浸潤傾向が強く、また、早期からリンパ節転移をきたす治療困難例が多いため、予後不良癌とされている。食道癌の治療法はその進行度により、内視鏡的粘膜切除、手術、放射線療法及び化学療法から選択される。近年、食道癌の治療成績は手術や補助療法の進歩により改善が得られているが、全国食道癌登録調査報告書によれば、全体の 5 年生存率 (TNM 病期分類) は、0 期: 70.2%、I 期: 64.5%、II a 期: 51.5%、II b 期: 34.0%、III 期: 19.8%、IV a 期: 13.7%、IV b 期: 5.5%と未だ予後不良である。現在、病期進行食道癌に対する治療法として、シスプラチン (CDDP:白金系抗腫瘍剤) /5-フルオロウラシル (5-FU:葉酸代謝拮抗剤) による化学療法と放射線療法の併用療法 (化学放射線療法) が標準的治療法として選択されているが、無効例も少なくない。また、CDDP/5-FU の他、ドセタキセルやパクリタキセル (本邦では食道癌の適応未承認) 等のタキソイド系薬剤の併用が検討されている。食道癌では、初回治療が適正に行われたにもかかわらず再発を認めることが多く、再発食道癌に対する治療法は、現在のところ一定のコンセンサスが得られていない。治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質 (QOL) の改善を目的とし、再発食道癌の 50%生存期間は約 6 ヶ月とされている。</p> <p>2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要</p> <p>本臨床研究では、治療抵抗性の食道癌患者から採取した末梢血リンパ球に、MAGE-A4 特異的 TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入し、その自己リンパ球を経静脈的に投与する。遺伝子導入リンパ球を投与後、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドを投与し、患者体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の増殖を図る。本臨床研究は、ヒト白血球抗原 (HLA)-A2402 拘束性 MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には腫瘍縮小効果を期待するものである。MAGE-A4 は食道癌、頭頸部癌及び非小細胞肺癌等に多く発現する腫瘍抗原であり、正常組織においては HLA を発現しない精巣のみに発現する。そして、TCR 遺伝子導入リンパ球による細胞傷害活性は、遺伝子導入された細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 表面上の MAGE-A4 特異的 TCR が、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体を特異的に認識することにより発揮される。本臨床研究における評価項目は、遺伝子治療の安全性、TCR 遺伝子導入リンパ球の体内動態及び臨床効果である。</p> <p>3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由</p> <p>治療抵抗性食道癌に対する根治療法は現時点では存在せず、栄養管理や QOL 向上のための緩和医療を行っているのが現状である。食道癌に対する抗癌剤以外の治療として、分子標的治療の開発が期待されているが、臨床研究結果の報告はない。このような現状において、食道癌に発現する腫瘍抗原を標的とした新規治療の開発が期待される。腫瘍抗原を標的とした免疫療法の 1 つとして、抗腫瘍活性を有する自己 T リンパ球を投与する細胞療法が積極的に研究されており、複数の臨床試験において有効例が報告されている。中でも、米国国立衛生研究所 (NIH) の Rosenberg らのグループは、転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、体外で増殖させた腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を患者に再移入する養子免疫療法を実施し、RESIST ガイドラインによる判定として 51%の腫瘍縮小効果を報告している。これら養子免疫療法における従来の細胞調製法と比較して、本遺伝子治療では、HLA-A2402</p>

	<p>陽性患者の T リンパ球に MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子を導入することによって、腫瘍細胞に対する傷害活性を付与するものであり、必要量の MAGE-A4 抗原特異的 T リンパ球を調製することが可能である。なお、上記の Rosenberg らのグループは、腫瘍抗原 MART-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を投与した臨床試験において、悪性黒色腫患者 17 名中 2 名について転移腫瘍巣の明らかな退縮を観察しており、この戦略が有望な新規癌治療法となる可能性を示唆している。更に、同グループは、より親和性の高い TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>1. 人に導入する遺伝子の構造と性質 本臨床研究において発現する遺伝子は TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子である。</p> <p>1.1. 人に導入する遺伝子の構造 本臨床研究に用いる TCR α 鎖遺伝子は 272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。TCR β 鎖遺伝子は 313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードしており、この遺伝子にコードされる蛋白は、116 アミノ酸からなる V7-9 領域、3 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域、179 アミノ酸からなる C2 領域という構造からなっている。これらの遺伝子は、HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28 から単離された。</p> <p>1.2. 人に導入する遺伝子の性質 本臨床研究において導入する遺伝子は、TCR α 鎖と β 鎖をコードする cDNA である。ヒトにおいて TCR α 鎖は 14 番染色体上に、β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロナタイプが存在する。TCR 遺伝子は免疫グロブリン (Ig) と同様に多数の亜型からなる V、D、J の可変領域と少数の C の定常領域からなる。その中で α 鎖の可変領域は V-J で β 鎖の可変領域は V-D-J で形成される。TCR 遺伝子は T 細胞の分化に伴い、これらの領域の遺伝子再構成という特徴的な過程を経て機能的遺伝子を形成する。まず D-J の遺伝子再構成が起こり、続いて V-DJ の再構成が生じる。再構成に伴い V-D 及び D-J 間にランダムな塩基配列 (N 領域) が組み込まれ TCR の多様性はさらに増加する。本臨床研究にはこの再構成を経た後の TCR 遺伝子の cDNA を導入する。われわれの使用する TCR α 鎖は Vα8-1、Jα10、C であり、TCR β 鎖は Vβ7-9、Jβ2-5、C2 の配列である。</p> <p>レトロウイルスベクター MS-bPa により遺伝子導入された細胞において、TCR α 鎖遺伝子はマウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーター (PPGK) によって転写される。マウス PPGK はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターであり、レトロウイルスベクター MS-bPa により導入される PPGK は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。</p> <p>TCR β 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される。レトロウイルスベクター MS-bPa ゲノム RNA の 5'-LTR は R 領域と U5 領域、3'-LTR は U3 領域と R 領域からなり、U5 領域と両端の R 領域は Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来、U3 領域は murine leukemia virus (MLV) の変異株である murine stem cell virus (MSCV) 由来である。細胞に遺伝子導入されてプロウイルスになると、両末端の LTR はいずれも U3-R-U5 領域の構造をとる。LTR 中では、MSCV 由来の U3 領域が強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は胚性幹細胞、胎児がん細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。</p> <p>1.3. 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性 TCR α 鎖及び β 鎖は S-S 結合でヘテロダイマーとして機能的な TCR 分子を構成し、主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞の活性化、アナジの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。TCR 鎖は Ig スーパーファミリー分子に属し、</p>

2つのIgドメインからなる細胞外領域、20アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2つのIgドメインのうち、N末端側が可変領域、C末端側が定常領域に相当する。細胞外領域に存在する相補性決定領域(CDR)1、CDR2領域はMHCとの結合に貢献し、CDR3領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。

TCRの発現とシグナル伝達にはTCRと複合体を形成する4種類のCD3鎖(γ 、 δ 、 ϵ 及び ζ 鎖)が重要であり、これらとTCRとが複合体を形成している。抗原認識の際にTCR/CD3複合体とCD4・CD8が会合してCD3の活性化モチーフITAMのチロシンがリン酸化されることによりTCRのシグナルが開始される。以上のシグナルにより、T細胞の抗原特異的な上記生理活性が発現される。

2. 本計画で使用するその他の組換えDNAの構造と性質
本計画では使用しない。

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

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

4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

4.1. 遺伝子導入方法の概略

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

4.2. 当該導入法を選択した理由

レトロウイルスベクターは感染した後に逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、導入遺伝子を長期にわたり発現しうる。また、レトロウイルスベクターによる末梢血Tリンパ球への遺伝子導入効率が高いことが知られている。さらに、多くのMoMLVベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されており、過去のT細胞遺伝子治療において重篤な副作用は報告されていない。以上の理由により、自己PBLへのTCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入する方法として、レトロウイルスベクターを選択した。

4.3. レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターやウイルスを利用しないNaked DNAベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。一方、レトロウイルスにより遺伝子導入する場合、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。レトロウイルスベクターMS-bPaを選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もとになる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。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

5.1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

レトロウイルスベクターMS-bPa のもとになる野生型ウイルスは MoMLV であり、以下のようなウイルス学的特徴を持つ。形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス及びスプーマレトロウイルスの 2 つの亜科に分類される。MoMLV はオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血球ウイルスの一種である。マウス白血球ウイルスは AKR や C58 系マウスの自然発症白血球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、急性白血球、白血球、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経向性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血球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球を誘発する。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血球所見を示し、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球に対しては抗 AKR MLV 血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLV に対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

5.2. ウイルスベクターの作製方法

①MS-bPa DNA ベクターの構築

レトロウイルスベクターMS-bPa 産生細胞株の構築に使用したプラスミドである MS-bPa DNA ベクターは、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。MoMLV プロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を含み、ウイルス蛋白をコードする配列を全く含まないレトロウイルスベクターである MT ベクターのプロウイルス配列を含むプラスミドが MT DNA ベクターであり、MT DNA ベクターの 3'-LTR を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものが MS DNA ベクターである。MS DNA ベクターのマルチプルクロニングサイトに、TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス PPGK 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込むことにより MS-bPa DNA ベクターを構築した。

②パッケージング細胞株の構築

本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、PG13 で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (1 つは gag と pol、もう 1 つは env 遺伝子) で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このアプローチは RCR 出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

③ウイルス産生細胞株の構築

gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エコトロピック env 遺伝子発現プラスミドである pE-eco 及びウイルスプラスミドベクターMS-bPa を 293T 細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞である PG13 に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクターMS-bPa が一過性に産生される。この培養上清を PG13 細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから、高力価なアンフォトロピックウイルスを産生するクローン MS-bPa #20 を得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。

④レトロウイルスベクターMS-bPa の製造

本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa は、バンキングされたウイルス産生細胞株 [MCB 又はワーキングセルバンク (WCB)] の培養上清を回収

	<p>することにより製造する。製造は全て管理された製造エリアにてGMP遵守下で行われる。</p> <p>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。</p> <p>5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴 パッケージング細胞株PG13は、GaLVのエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはマウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCRが出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクターMS-bPaを安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCBの作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPaの製造はGMP管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生国産のものを使用する。</p> <p>①MCBの作製法 ウイルス産生細胞MS-bPa #20の初代細胞ストックより作製されたPrimary Seed Bankが拡大培養され、ウイルス産生細胞MCBがGMP遵守下で作製された。MCBの作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製されたMCBに関しては、以下の品質試験が行われた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA染色法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（細胞）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 5. RCR 試験（上清）（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ） 6. XC プラークアッセイ 7. マウス抗体産生試験（MAP 試験） 8. 無菌試験（日本薬局方） 9. ウシウイルス試験 10. ヒトウイルス試験 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験 13. 導入遺伝子配列解析 14. 細胞生存率試験（トリパンブルー） 15. 産生ウイルスの力価試験 16. 導入遺伝子の機能確認 <p>②レトロウイルスベクターMS-bPaの製造方法 MCBの細胞を拡大培養した後、培地を交換し翌日に培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。回収した培養上清液を0.22 μmのミリポアフィルターで濾過滅菌した後、ウイルスベクターとして凍結保存バックに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。以下の品質試験を行う。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. マイコプラズマ否定試験（培養法） 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験（293細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）

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

1.2. 患者に投与する物質の純度及びその安全性

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

1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性

①レトロウイルスベクターの安全性

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

②パッケージング細胞の安全性

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

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

1.4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがあるが、このような細胞の割合は少ないと考えられる。なお、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療において細胞傷害性は報告されていない。

1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

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

1.6. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。遺伝子導入操作は P2 レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラス II 安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクターMS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。レトロウイルスベクターMS-bPa は増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合には細胞は死に至る可能性がある。ただし、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、がん遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの LTR が有するエンハンサー-プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、がん抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

1.8. がん原性の有無

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

2. 遺伝子産物の安全性

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

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

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

3. 細胞の安全性

3.1. 遺伝子導入細胞の調製方法

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

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

3.2. 培養細胞の純度

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

3.3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

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

3.4. 被験者に投与する細胞の安全性

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

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

	<p>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</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p>以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <p>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。</p> <p>②品質・安全性 本臨床研究は、腫瘍抗原MAGE-A4を認識するCTLクローン由来のTCR遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用のTCR遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。 本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来のTリンパ球であり、Tリンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによるがん化のリスクは極めて低く、対象疾患とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。 免疫不全マウスにTCR遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球と比較して、遺伝子導入に起因する毒性所見は観察されなかった。 レトロウイルスベクターによる遺伝子導入と同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識するTCR遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIHのRosenbergらのグループで既に実績がある。</p> <p>③期待される有効性 三重大学にて調製されたMAGE-A4 TCR遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4陽性・HLA-A2402陽性の腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことがin vitroにおいて確認されている。また、免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR遺伝子導入ヒトリンパ球投与に特異的な腫瘍径増大抑制効果が認められた。 NIHのRosenbergらは、転移性悪性黒色腫患者17例に腫瘍抗原MART-1のTCR遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2例(12%)にPR(部分奏功)を認めており、更に、同グループは、より親和性の高いTCR遺伝子を導入したTリンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者36名中9名について腫瘍退縮を観察している。 従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。</p> <p>④当施設・研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者(上田修吾、尾崎信弘)は対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験(手術 約40例、化学療法 約30例)及び臨床研究(CHPがんワクチン臨床試験、抗癌剤感受性に関する研究:文部科学省科学研究費)に対する知識を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。</p> <p>⑤臨床研究薬の調製 被験者へ投与されるTCR遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。</p> <p>⑥安全・効果評価・適応判定中央部会 本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。</p>

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

12) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた患者

除外基準（一次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

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

選択基準（二次登録）：

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

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

除外基準（二次登録）：

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

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

	<ul style="list-style-type: none"> ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症 ・自己免疫疾患 ・出血傾向〔プロトロンビン時間 (PT) <50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) >60 sec、フィブリノゲン (Fbg) <100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) >20 μg/mL] ・血栓形成傾向 <ol style="list-style-type: none"> 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者 4) 制御困難な脳内転移を有する患者 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者 6) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者(例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者) 7) 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する患者 8) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性患者。又は挙子希望の男性患者(ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない) 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた患者。 <p>3. 被験者の同意の取得方法</p> <p>本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、北野病院内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を説明の前又は説明するときに渡し、内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する(文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計 2 回行う)。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、総括責任者又は分担研究者以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。</p> <p>4. 実施期間及び目標症例数</p> <p>実施期間は共同実施機関である三重大学医学部附属病院が厚生労働大臣から本臨床研究実施の承認を得た時点(2009年7月17日)から3年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後 63 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり、遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発がんや RCR の有無について追跡調査を実施する。</p> <p>目標症例数は以下のとおり全施設の症例を合わせて 9 例とするが、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を最大 6 例まで増加し、安全性の評価を強化する。</p> <p><u>1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量</u></p> <table border="1" data-bbox="539 1563 922 1664"> <tr> <td>コホート 1</td> <td>2×10⁸個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 2</td> <td>1×10⁹個</td> <td>3 例</td> </tr> <tr> <td>コホート 3</td> <td>5×10⁹個</td> <td>3 例</td> </tr> </table> <p>5. 臨床検査項目及び観察項目</p> <p>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。</p>	コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例	コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例	コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例
コホート 1	2×10 ⁸ 個	3 例								
コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例								
コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例								
備 考										

(別紙) 検査・観察スケジュール

臨床研究期間 日数	スクリーニング 期間		治療期間										追跡 調査 期間 day63 ±3
	同意 取得日	771b-771c 実施日	day0 *	day1	day2	day3	day7	day14 ±3	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3	day35 ±3	
入院		○	○										
同意取得	○		○										
一次登録	○												
二次登録			○										
被験者背景	○												
アフエーシス		○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○										
MAGE-A4 ペプチド 投与								○		○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
動脈血酸素分圧・動 脈血酸素飽和度	○		○										
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○												
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○		○		○	○
血液凝固能検査	○		○ ²									○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
尿検査	○		○ ²	○			○	○		○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}									○ ⁴	○ ⁴
胸部 X 線検査	○		○ ²									○	○ ⁵
12 誘導心電図	○		○ ²									○	○ ⁵
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
PET-CT			○ ³									○	○ ⁵
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³									○	○ ⁵
腫瘍組織生検			○ ³									○	○ ⁵
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁶			○ ⁷	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ ²					○		○		○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ ³									○	○ ⁵
RCR ⁶				○ ⁸								○	○
LAM-PCR ⁶												○	○
採血量 (mL)	15	-	110	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70
有害事象													

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

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