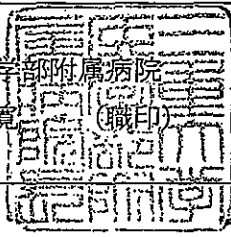


正 本

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 24 年 7 月 23 日

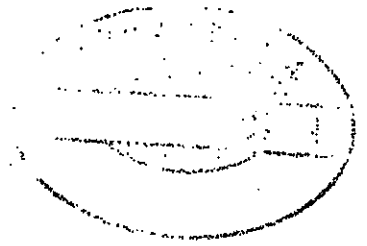
厚生労働大臣 殿

実 施 設	所 在 地	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (郵便番号 514-8507)
	名 称	国立大学法人三重大学医学部附属病院 (電話番号 059-232-1111) (FAX番号 059-321-5645)
	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
MS3-WT1-siTCRベクターを用いたWT1抗原特異的TCR遺伝子導入Tリンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究	国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座・ 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24年7月23日 (申請年月日)

研究の名称	MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群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	遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者 被験者の診療
	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	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 被験者の診療
	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 被験者の診療
	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 被験者の診療
	齋藤 佳菜子	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教	被験者の診療
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	レトロウイルスベクター製剤の製造・品質管理責任者、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）」の必要な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、対象疾患の利益が不利益を上回ることが十分予測されるものであった。</p> <p>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。</p> <p>更に、遺伝子導入細胞は本学内細胞調製施設においてGMP基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。多施設との細胞搬送システムが確立され多施設共同研究（愛媛大学、藤田保健衛生大学、名古屋大学）の体制が整備されている。本臨床研究を担当する研究者は、遺伝子ベクター調製、細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。</p> <p>以上より、本臨床研究の実施は適当と認める。</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
	<p>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</p>	<p>登 勉 </p>

研究の区分	<p style="text-align: center;">遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究</p>
研究の目的	<p>本臨床研究は、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者を対象として、WT1 抗原を HLA-A*24:02 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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) 輸注の安全性、体内動態及び臨床効果を以下の項目について評価することを目的とする。</p> <p>1) 主要評価項目</p> <p>a) 本遺伝子治療の安全性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・有害事象発現の有無 ・臨床検査値異常変動の有無 ・増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の有無 ・TCR 遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティの検討 <p>2) 副次評価項目</p> <p>a) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態</p> <p>b) 血液学的効果 (PCR 等を用いた分子生物学的完全寛解の確認を含む)</p> <p>c) 免疫機能解析</p> <p>また、TCR 遺伝子治療を実用化し、多くの患者へ投与するためには、細胞調製施設を有していない医療機関においても遺伝子導入細胞を投与することが必要となる。そのため、本臨床研究ではあらかじめ構築した搬送体制を利用し、三重大学医学部内に設置された細胞調製施設より本臨床研究に参画している医療機関へ TCR 遺伝子導入 T リンパ球を搬送し、被験者に投与することで医療機関の間で安全性や血中動態等の結果に差が無いことを確認することも目的としている。</p>

<p>対象疾患及びその選 定理由</p>	<p>1. 対象疾患及び被験者 薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者のうち、HLA-A*24:02 陽性、腫瘍細胞に WT1 抗原が発現している被験者。</p> <p>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、WT1 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後、培養増殖させ、その自己リンパ球を2回経静脈的に投与する。2回目の TCR 遺伝子導入 Tリンパ球を輸注後、被験者体内での TCR 遺伝子導入 Tリンパ球の活性化（あるいは増殖）を図る目的で、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを皮下投与し、安全性及び有効性を確認する。</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 治療抵抗性となった急性骨髄性白血病に対して、白血病細胞の増殖の病勢を抑える程度の化学療法が実施されるものの予後は数か月未満である。MDS は急性転化しなければ保存的治療で年単位の予後が見込めるが、輸血合併症、反復感染症をきたす場合、多くの予後は1年未満となる。 急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群に対する化学療法以外の治療として、分子標的治療薬が開発されているが、それら薬剤においても寛解導入がなされない症例は、依然として絶対予後不良であり、免疫的機序による白血病抗原などを標的とする新規治療法の開発が期待されている。 以上より、本臨床研究で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。</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 TCRα 鎖及びβ 鎖遺伝子である。また、内在性の TCRα 鎖及びβ 鎖遺伝子に干渉する siRNA 発現配列も導入される。</p> <p>1.1 人に導入する遺伝子の構造 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 V20、J33、C であり、TCRβ 鎖は V5-1、N、J2-1、C2 の配列である。 また本臨床研究では内在性のヒト TCR の発現を抑制する為にショートヘアピン型 DNA (shDNA) 配列を導入する。これは、ヒト 13 番染色体上に存在するマイクロ RNA has-mir-17、has-mir-18、has-mir-19、has-mir-20 のクラスター配列中の4種類のマイクロ RNA 配列を、ヒト TCRα の C 領域に相同な2種類の shDNA とヒト TCRβ の C 領域に相同な2種類の shDNA 並びにこれらに相補的な配列により置換したものである。</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。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。 レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、</p>

TCR β 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 MS3-WT1-siTCR により導入される PPGK は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。

TCR α 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 MS3-WT1-siTCR 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 MoMLV 由来、U3 領域は MSCV 由来である。MSCV LTR は PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV) 由来であり、PCMV は murine leukemia virus (MLV) を実験室で継代することにより得られた変異株である。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、MSCV 由来 (すなわち 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。また、TCR α 鎖遺伝子の上流に位置するヒト EFl α の 5' 非翻訳領域は、スプライシング能の高いイントロンのスプライシングアクセプター周辺の配列を含んでおり、その下流に位置する遺伝子の意図しないスプライシングを防ぐことにより遺伝子発現転写能を高めている。

レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、ヒト TCR α の C 領域配列/ヒト TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列は TCR α 鎖 mRNA の下流に連結された形で LTR プロモーターによって転写される。これらの siRNA 配列は、レトロウイルスベクターが導入された T 細胞の内在性 TCR の発現を特異的に抑制する効果がある。T 細胞の内在性 TCR の存在は、内在性 TCR と導入 TCR による CD3 分子の競合と内在性 TCR と導入 TCR の間でのミスペアリングにより本来目的とする腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させると共に、予測不可能な特異性を有する TCR が出現する可能性も示唆している。従ってレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR に含まれる siRNA 配列は導入 TCR の発現効率を上昇し、TCR ミスペアリングの危険性を低下させる。なお、導入する WT1 特異的 TCR 遺伝子にはコドン修飾がなされ、siRNA の影響を受けない。

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 鎖のヘテロダイマーによって機能的な TCR 分子を構成する。TCR 分子は主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞の活性化、アナジューの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。

TCR 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 (CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に寄与し、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 鎖が重要である。細胞外領域に Ig ドメインを 1 つ持ち細胞内領域に活性化モチーフの ITAM を 1 つ持つ CD3 γ 、 δ 、 ϵ 鎖がそれぞれ γ - ϵ 、 δ - ϵ の 2 量体を作り、また、9 アミノ酸の短い細胞外領域と細胞内領域に 4 個の ITAM を持つ ζ 鎖は S-S 結合でホモ 2 量体となり、これら全部を含めて TCR と複合体を 1 単位として形成している。

WT1 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 WT1 分子由来の抗原ペプチドである WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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。

本遺伝子治療において T 細胞に導入された WT1 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 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの複合体を認識する。導入された WT1

特異的 TCR による HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、TCR 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が起こり、TCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞では更にグランザイム 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遺伝子を導入する標的細胞は、造血幹細胞移植適応がない急性骨髄性白血病もしくは骨髄異形成症候群患者 (HLA-A*24:02 陽性、腫瘍細胞に WT1 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、①様々な抗原を特異的な受容体で認識する。②抗原の認識に続き活性化され、増殖すると共に各種サイトカインの産生や抗原を発現する標的細胞を特異的に傷害する能力をもつ。③活性化された後に一部はメモリー T リンパ球となり、長期に生存し抗原に再遭遇した場合、急速に強く反応し得る。なお、自己 T リンパ球を輸注した場合、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病 (GVHD) 等の副作用がない長所がある。WT1 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 T リンパ球へ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 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己 T リンパ球を作製可能である。本遺伝子導入 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が期待される。

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) へ TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するために、レトロネクテン 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 MS3-WT1-siTCR 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、プロウイルスとなり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は末梢血 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レトロウイルスベクターの使用に起因する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 に 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、レトロウイルスベクター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、効率的に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 MS3-WT1-siTCR を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もともなる MS3-WT1-siTCR 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、MS3-WT1-siTCR 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、既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、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MS3-WT1-siTCR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原因ウイルスであるが、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、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。なお、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pMS3-WT1-siTCRの構築

ウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR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。

pMS3-WT1-siTCRのベースとなるウイルスプラスミドベクターはpMSで、pMSのマルチクローニングサイトにヒトEF1 α の5'非翻訳領域、HLA-A*24:02拘束性WT1特異的TCR α 鎖遺伝子のC領域をコード最適化したcDNAのコード域、TCR α のC領域配列及びTCR β のC領域配列に対するsiRNA発現配列、マウスPPGK、並びにHLA-A*24:02拘束性WT1特異的TCR β 鎖遺伝子のC領域をコード最適化したcDNAのコード域を組み込んだものがpMS3-WT1-siTCR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(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pMS3-WT1-siTCRの構築手順を示す。

pDON-5ベクターを制限酵素Mlu IとNot Iで切断して、ヒトEF1 α の5'非翻訳領域を切り出し、pMSベクターのMlu I-Not Iサイトにクローニングし、pMS3を得た。

HLA-A*24:02拘束性WT1 CTL Clone TAK-1よりtotal RNAを抽出、RT-PCRによりTCR α cDNAのコード域を増幅し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Apa Iが付加された5'用プライマーと制限酵素Sfa NIの認識配列が付加された3'用プライマーを用いてTCR α cDNAのV-J領域のPCRを行い制限酵素Sfa NIで切断した。この時、制限酵素Sfa NIで切断するとBgl IIの切断配列が生じるように3'用プライマーをデザインした。また、コドン最適化したTCR α 鎖遺伝子C領域を合成して、制限酵素Sal Iが付加さ

れた5'用プライマーと制限酵素Bgl II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Sal Iで切断した。両断片をライゲーションし、C領域がコドン最適化されたTCR α 断片を得た。

TCR α 遺伝子のC領域とTCR β 遺伝子のC領域に特異的なsiRNA発現配列をそれぞれ2種類ずつ含むsiRNAクラスター (siRNAs) を合成した。また、C領域がコドン最適化されたTCR α 断片をBgl IIで切断した。これら両断片をpMS3のApa I-Not IサイトにクローニングしてpMS3-WT1-A-siを得た。

A*24:02拘束性WT1 CTL Clone TAK-1よりtotal RNAを抽出、RT-PCRによりTCR β cDNAのコード域を増幅しpT7Blue2ベクターにTAクローニングした。

TCR β のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素Bam HIが付加された5'用プライマーと制限酵素Sfa NIの認識配列が付加された3'用プライマーを用いてTCR β cDNAのV-J-D領域のPCRを行い制限酵素Sfa NIで切断した。この時、制限酵素Sfa NIで切断するとBgl IIの切断配列が生じるように3'用プライマーをデザインした。また、コドンを最適化したTCR β 遺伝子C2領域を合成して、制限酵素Bgl IIが付加された5'用プライマーと制限酵素Xho 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、制限酵素Bgl IIで切断した。両断片をライゲーションし、C2領域がコドン最適化されたTCR β 断片を得た。

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PPGK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Not IとBam HIでPPGK部位を切り出した。

最後に、C2領域がコドン最適化されたTCR β 断片を制限酵素Bam HIとXho Iで切断し、PPGK部位をNot IとBam HIで切断し、両断片をpMS3-WT1-A-siのNot I-Xho Iサイトにクローニング、pMS3-WT1-siTCRを得た。得られたpMS3-WT1-siTCR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pMS3-WT1-siTCR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。従って、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 (一方はgagとpol、もう一方は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、この方法は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pMS3-WT1-siTCRを293T細胞へ共にトランスフェクションした。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MS3-WT1-siTCR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MS3-WT1-siTCR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#S45を得た。これをマスター/ワーキングセルバンク (M/WCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養してM/WCBを作製した。

5.2.4 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR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MS3-WT1-siTCR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 (GMP) 遵守下で行われる。

	<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MS3-WT1-siTCR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ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染する。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OKT3及びレトロネクチンCH-296で活性化し、増殖させる。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MS3-WT1-siTCR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。従って、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MS3-WT1-siTCR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。M/WCBの作製・保存及びレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR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>1.1.1 M/WCBの作製法 GMP製造施設の管理区域にて3バイアルのPrimary Seed Bank(クローンWT1-siTCR preMBC S45)より拡大培養され、最終的に181バイアルのウイルス産生細胞M/WCBがGMP遵守下で作製された。M/WCB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M/WCB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. <i>in vivo</i> ウイルス試験 3. <i>in vitro</i> 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 (HIV-1、HIV-2、HTLV-1/2、HAV、HBV、HCV、hCMV、HHV-6、HHV-7、HHV-8、EBV、SV40、Human Parvovirus B19) 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. ベクター遺伝子の組み込み数試験(サザンプロット) 13. ベクター遺伝子の完全性試験(サザンプロット) 14. 導入遺伝子配列解析 15. 細胞生存率試験 16. ウイルスベクター産生能確認 (産生ウイルスRNAコピー数: real-time PCR法)

17. 産生ウイルスベクター機能確認試験①：TCR 発現性試験
(SupT1 細胞感染/FCM)

18. 産生ウイルスベクター機能確認試験②：野生型 TCR 発現抑制確認
(J45.01 細胞感染/real-time PCR 法)

1.1.2 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造方法

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造は、1 パイアルの M/WCB を用いて行う。凍結保存している M/WCB の細胞を解冻後、培養を開始し、拡大培養及び細胞継代を行い、5 個の大量静置培養用容器にて培養する。大量静置培養用容器において培養細胞が接着面全体に広がった後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清液は、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MS3-WT1-siTCR 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 (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. ウイルス RNA コピー数 (real-time PCR 法)
 9. TCR 発現性試験 (SupT1 細胞感染/FCM)
 10. 野生型 TCR 発現抑制確認 (J45.01 細胞感染/real-time PCR 法)
- End of Production Cells (EPC)
11. マイコプラズマ否定試験 (培養法)
 12. マイコプラズマ否定試験 (DNA 染色法)
 13. RCR 試験 (293 細胞で増幅、PG-4 S+L-アッセイ)

1.2 被験者に投与する物質の純度及びその安全性

被験者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した被験者由来 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 年以上の末梢血幹細胞採取・保存・解冻投与の臨床経験例において、CP-1 と RPMI1640 による凍結保存法が用いられて、人に投与されている。また、内外の骨髄移植の臨床経験では、ヘパリン剤希釈液として RPMI1640 を採取骨髄に添加後に投与する方法が広く行われてきたが、何れの使用においても CP-1 又は RPMI1640 に起因する重篤な有害事象の報告はみられない。

また、遺伝子導入細胞の投与後に、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドが不完全フロイントアジュバントとの懸濁液として皮下投与される。このペプチドの純度は逆相 HPLC による解析により 91.8% であり、エンドトキシン試験や無菌試験などにより品質が確認されている。不完全フロイントアジュバントは医薬品として承認されているものではないが、本臨床研究に用いる MONTANIDE® ISA-51 VG は、SEPPIC 社 (75, quai d' Orsay 75321 Paris cedex 07 FRANCE) が人への投与を目的として GMP 製造し、販売しているものである。SEPPIC 社の資料によると、MONTANIDE® ISA-51 は、AIDS や癌患者に対して、既に 5,000 人以上に投与され、延べ約 50,000 回以上の投与の実績がある。その副作用として、一過性の局所反応が報告されている。また、インフルエンザ様症状が現れることも報告されているが、一過性であり、発現頻度も低いことから MONTANIDE® ISA-51VG は安全に人へ投与することが可能と考えられている。

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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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のみを臨床使用する。また、遺伝子導入 T リンパ球投与後には被験者末梢血中の 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pMS3-WT1-siTCR 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。更に、レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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。従って、ウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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。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 を欠失しているため、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。

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、被験者 T リンパ球を ex vivo (生体外) で遺伝子導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に被験者に投与する。使用したレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR はこの過程でほぼ完全に除去される。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。そのため、例えばレトロウイルスベクター粒子が被験者体内に侵入しても、被験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MS3-WT1-siTCR は増殖能を欠いているため、遺伝子導入した被験者 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない、RCR が出現しない限り体内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-MS3-WT1-siTCR 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-MS3-WT1-siTCR は増殖能欠損型なので、被験者を介して被験者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が被験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。細胞が生存や増殖するため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、被験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

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。従って、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。今回は内在性 TCR に対する siRNA 発現配列が遺伝子導入されるので、内在性 TCR の関与した反応性の低下が予想される。また一般に、siRNA の配列によってはインターフェロン経路遺伝子の発現上昇などのオフターゲット効果が見られることが知られているが、本臨床研究に用いる siRNA 構造を持つ 2 種類のレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 及び MS-MA24-siTCR を用いて遺伝子導入した細胞に特異的に発現上昇または発現減少する遺伝子はなかった。したがって、オフターゲット作用のリスクは低いと考えられる。

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。また、今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成を低減すると考えられる。
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。また、この場合も今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、本メカニズムが出現するリスクも低減すると考えられる。
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被験者の 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 T 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と共にメラノサイト分化抗原である 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。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 (72000 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。このことから、TCR 遺伝子を導入した T 細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないが、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。本臨床試験では化学療法による前処置や IL-2 投与は行わず、 2×10^8 個と少量の輸注細胞数から慎重に開始する。また、難治性の白血病、骨髄異形成症候群の患者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。

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MS3-WT1-siTCR を用いた遺伝子導入 T リンパ球の調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：被験者のコホートに応じて培養開始細胞数を決定し、被験者全血より分離した新鮮または凍結末梢血単核球 (PBMC) を遺伝子導入細胞の調製に使用する。

被験者から全血の採取 (最大採血量 100 mL) は、各医療機関において実施する。

採取した被験者の全血を三重大学内の細胞調製施設へ輸送し、外観試験を実施した後に細胞調製施設内に持ち込み、自己血漿を分離した後に、Ficoll-Paque を用いた被験者 PBMC の分離と 1% HSA 含生理食塩水及び GT-T Retro III 培地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。

リンパ球の刺激には抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグを使用する。すなわち、抗 CD3 抗体 (5 μ g/mL) CH-296 (25 μ g/mL) となるように ACD-A 液に希釈した溶液 25 mL をリンパ球刺激用バッグに添加し、CO₂ インキュベーター中で 5~10 時間静置して準備する。培養用培地 (基本培地 GT-T Retro III, 600 IU/mL rhIL-2, 0.6% 非働化被験者血漿, 0.2% HSA, 60 mg/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。) に被験者リンパ球を 2×10^5 個/mL となるように懸濁し、抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグに加えて、37°C、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 10-1 及び 10-2 に示す。

第4日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数から 0.4×10^6 個/mL 以下になるように培養用培地で希釈し、レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグあたり 30 mL の細胞懸濁液を加える。1,000 \times g、32 \pm 3°C で 10 分間遠心した後に CO₂ インキュベーター中で第5日まで培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ (1 回目、2 回目遺伝子導入工程用) は以下のように用意する。レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを 15 mL の ACD-A 液で 2 回洗浄した後に、原液又は HSA/ACD-A/生理食塩水で希釈した MS3-WT1-siTCR を添加 (30 mL/バッグ) する。2,000 \times g、32 \pm 3°C、2 時間遠心した後に、MS3-WT1-siTCR を除き HSA/生理食塩水で洗浄した後に同液を保存液として添加し使用時まで薬用保冷庫にて保存する。

第5日：第4日から培養した活性化 T リンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、1,000 \times g、32 \pm 3°C で 10 分間遠心する。遠心後、第6日まで 5% CO₂ インキュベーター中で培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ (3 回目遺伝子導入工程用) を第4日目と同じ方法で作成し、使用時まで薬用保冷庫にて保存する。

第6日：第5日から培養した活性化 T リンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、1,000 \times g、32 \pm 3°C で 10 分間遠心する。遠心後、4 時間 + 10 分以内、5% CO₂ インキュベーター中で培養した後、細胞を回収し、新しい培養用培地にて容量が計 2,400 mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、37°C、5% CO₂ インキュベーター中にて培養を開始する。

第7日：第5日から培養しているガス透過性培養用バッグに、等量の培養用培地 (自己血漿 0~0.6% 含) を加えて、37°C、5% CO₂ インキュベーター中にて培養をする。

第10-14日：細胞処理装置を用いて細胞の洗浄と濃縮を HSA 含 RPMI1640 で行い、被験者投与に必要な遺伝子導入細胞数に応じて、 $1.6 \sim 6.7 \times 10^7$ 細胞/mL

となるように HSA 含 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 TCR 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 -80°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) の条件下にて使用時まで凍結保存する。

投与前：被験者へ投与する各医療機関に、凍結状態で TCR 遺伝子導入 T リンパ球を輸送する。

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

3.2 培養細胞の純度

遺伝子導入に用いる細胞は、OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化し増殖させた被験者自己由来の T 細胞である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の遺伝子導入細胞の比率は 31.1%程度であり、T リンパ球が 99.7%以上を占めていた。被験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、被験者末梢血より得られた細胞であり問題ないと考えられる。また、T リンパ球以外の細胞に遺伝子が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

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、siRNA 発現配列、並びにレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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 T 細胞であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は非常に低いと考えられるが完全には否定できないため、LAM-PCR によるモニタリングを行う。

OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化することによって 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、これを被験者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。

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 リンパ球群において移入 T リンパ球が被験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

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 MS3-WT1-siTCR 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。また、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。投与前に品質試験が不合格であることが判明した場合には、再度細胞調製のための採血が可能か検討したうえで、当該被験者における臨床研究の継続・中止の判定を行うこととする。

	<ol style="list-style-type: none"> 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 6. 細胞数試験 7. 遺伝子導入効率及び導入遺伝子機能確認試験 (細胞内 IFN-γ 産生試験) <p>被験者への投与の際には、凍結保存専用バッグ中に凍結保存している細胞懸濁液を投与直前に 37℃温浴にて急速解凍し、静脈内投与する (生理食塩水にて投与液量を調整することも可能とする)。</p> <p>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・解凍後の細胞生存率については、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、投与日以前に解凍し細胞生存率を測定する。</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した。</p> <p>①開発意義</p> <p>急性骨髄性白血病は標準的化学療法により 70-80%の完全寛解率が得られているにもかかわらず、長期生存率は 30-40%である。そのため化学療法による治療効果は、まだ十分なものとは言えない。近年、新たな薬剤であるゲムツズマブオゾガマイシンが登場したものの、効果は限定的である。治療の一つとして同種造血幹細胞移植があるが、高齢者や適切なドナーが得られないなど同種造血幹細胞移植を行えない症例も多い。</p> <p>また、骨髄異形成症候群は、同種造血幹細胞移植が有効であるが、適切なドナーが得られないことや、高齢者においては同種造血幹細胞移植による治療関連毒性に耐えられないなどの問題も多い。また、抗癌剤による治療効果も低く、新たな治療戦略の必要性が指摘されている。</p> <p>これらのことから、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者に対する有効な治療手段の開発が強く望まれており、本遺伝子治療臨床研究の開発意義は高く、医療現場における需要は存在すると考える。</p> <p>②品質・安全性</p> <p>本臨床研究は、腫瘍抗原 WT1 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被験者に投与する。この製造過程は十分に確立され、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。</p> <p>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 (治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病、治療不応性の骨髄異形成症候群) 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と考えられる。</p> <p>免疫不全マウスに本 TCR 遺伝子導入ヒト T リンパ球を投与した安全性試験において、比較対照とした非遺伝子導入ヒト T リンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒト T 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)。</p> <p>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。</p>

	<p>本臨床研究において標的とする WT1 抗原は白血病細胞において強発現することが知られている。一方、正常細胞における WT1 発現は腎臓の糸球体上皮細胞、胸膜や腹膜の中皮細胞等の限られた細胞にみられる。これまでに WT1 を標的としたペプチドワクチンの臨床試験が国内外において精力的に実施されているが、正常細胞の傷害に起因すると考えられる重篤な副作用はこれまでのところ知られていない。対象疾患（治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病または、治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群）とのリスク・ベネフィットを総括すると、低用量のリンパ球輸注より慎重に実施することにより本臨床研究の実施は可能であると考えられる。</p> <p>③本臨床研究の期待される有効性 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR を用いて調製された WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、WT1 陽性・HLA-A*24:02 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して抗原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 WT1 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 T リンパ球投与群で腫瘍の抑制効果が認められた。</p> <p>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 を認めており、更に、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子（DMF5）、又はマウス由来の gp100 特異的 TCR 遺伝子（gp100(154)）を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 例中 9 例について腫瘍退縮を観察している。</p> <p>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と考えられる。</p> <p>④当施設における研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者（影山、池田、宮原、今井、齋藤）は対象疾患である造血器腫瘍に対する十分な臨床経験（急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群の治療 120 例）及び臨床研究（JALSG 多施設共同研究、CHP がんワクチン：文部科学省がんトランスレーショナル事業）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>また、三重大学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調製される。三重大学内にて細胞調製に携わる者は、遺伝子導入、細胞培養、品質管理について事前に十分な教育訓練を受けた経験者により構成される。これらのことから、三重大学には TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製に必要な設備・技術が十分備わっていると判断する。</p> <p>更に、本臨床研究は三重大学を中心とした複数の医療機関（愛媛大学、藤田保健衛生大学、名古屋大学）と共同で実施することから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一した評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 本臨床研究の実施手順 患者へ臨床研究の内容を説明し、十分な理解を得たうえで文書にて同意を取得する。その後、一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、一次登録を行う。</p> <p>採取した末梢血を三重大学の細胞調製施設へ搬送する。細胞調製施設にて自己 PBL に WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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、凍結保存する。</p> <p>TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製終了後、品質の確認を行う。その際に、コホート毎に規定された細胞数に満たない場合や品質試験により被験者への投与が不適</p>

格と判断された場合には、担当医師と臨床研究薬品質管理者間で協議し、被験者の状態を考慮したうえで被験者からの了承が得られれば、再び採血・細胞調製を行うことを可能とする。

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。

三重大学の細胞調製施設より搬送された TCR 遺伝子導入 T リンパ球を経静脈的に投与する。原則として二次登録後、速やかに TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与することとしているが、安全性及び有効性を適正に評価するため、被験者の状態に応じて、初回投与開始日及び 2 回目投与日を変更することも可能とする。ただし、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の有効期限内に 2 回目の投与を終えることとする。

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 28 日後 (±7 日) に 2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与する。2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 2 日後及び 16 日後の計 2 回、改変型 WT1²³⁵⁻²⁴³ ペプチド 300 μg を皮下へ投与する。初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 58 日後 (±7 日) に臨床研究終了時検査を実施し、本臨床研究を終了とする。なお、2 回目のペプチド投与は外来にて行うことも可能とする。

被験者の生存期間中 (FDA のガイドラインに従い、最短 15 年間) は 1 年に 1 回の頻度で被験者の安全性確保を目的に所定の検査を実施する。

本臨床研究では、安全性 (有害事象、臨床検査、RCR 発生の有無、クローナリチーの検討)、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態、腫瘍特異的免疫反応及び血液学的効果を評価する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球数の設定

本臨床研究におけるコホートは 3 群 (2×10^8 cells、 1×10^9 cells、 5×10^9 cells) とし、各コホートの症例数は 3 例とする。各コホートにおいて 2 回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与し、その後 2 回ペプチド (各 300 μg) の投与を行う。

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)

1) 以下のいずれかの疾患と診断された被験者

- a) 再発期または初回寛解導入不能な急性骨髄性白血病 (非定型白血病と骨髄異形成症候群よりの移行例を含む) で造血幹細胞移植適応がない被験者
- b) 治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群で造血幹細胞移植適応がない被験者

2) HLA-A*24:02 陽性の被験者

3) PCR 法にて腫瘍細胞に WT1 の発現が確認されている被験者

4) ECOG Performance Status 0~2 の被験者

5) 一次登録時の年齢が 20 歳以上の被験者

6) 遺伝子を導入する T リンパ球採取時に前治療 (化学療法等) 終了から十分な回復が見込める被験者

7) 主要臓器 (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被験者

・総ビリルビン (T-Bil)	施設基準値の上限 3 倍未満
・AST (GOT)、ALT (GPT)	施設基準値の上限 5 倍未満
・血清クレアチニン (Cr)	施設基準値の上限 3 倍未満
・左室駆出率	55%以上
・動脈血酸素飽和度	94%以上

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被験者

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被験者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞、心不全
 - ・制御困難な糖尿病又は高血圧症
 - ・制御困難な感染症
 - ・間質性肺炎又は肺線維症
 - ・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被験者
- 3) HBV、HCV、HIV、HTLV-1 に感染している被験者
- 4) 同意取得後、4ヶ月以上の生命予後が見込めない被験者
- 5) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する被験者
- 6) 安全性評価が困難となるような脳脊髄病変（脳内転移を含む）を有する被験者
- 7) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾン換算にて0.5mg/kg/day以上）を使用している被験者
- 8) 本臨床研究の参加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被験者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。又は挙子希望の被験者。（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）に参加している被験者
- 11) 同種造血幹細胞移植を施行した被験者
- 12) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

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。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製が終了し、最小輸注量 (1.6×10^8 cells) 以上の投与が可能かつ、使用期限内に投与が完了する見込みのある被験者
- 2) ECOG Performance Status 0~2 の被験者
- 3) 主要臓器（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被験者

・総ビリルビン (T-Bil)	施設基準値の上限 3 倍未満
・AST (GOT)、ALT (GPT)	施設基準値の上限 5 倍未満
・血清クレアチニン (Cr)	施設基準値の上限 3 倍未満
・左室駆出率	55%以上
・動脈血酸素飽和度	94%以上

- 4) 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被験者

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) TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後に3ヶ月以上の生存が見込めない被験者
- 2) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾン換算にて0.5mg/kg/day以上）を使用している被験者
- 3) 本臨床研究の参加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被験者
- 4) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。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)
- 5) TCR 遺伝子導入 T リンパ球が自己細胞反応性を持つ被験者※
- 6) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

3. 被験者の同意の取得方法

総括責任者又は分担研究者は、医療機関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・説明文書を被験者に説明前又は説明時に提供し、同意・説明文書に記載されている内容を口頭で詳しく説明する。その後、被験者より自由意思による文書同意を取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計二回行う）。なお、同意取得前に、被験者本人に質問する機会と本臨床研究参加を判断するための時間を十分に与え、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、担当医師以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。

4. 実施期間及び目標症例数

実施期間は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 58 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 回の頻度で被験者の生存状況や TCR 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。

本臨床研究における目標症例数は合計で 9 例とする。ただし、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には、安全性確認のため症例数の追加を行う。なお、実施計画書に規定された細胞数及びペプチドが投与されなかった場合は症例数として数えないこととする。

各コホートにおける症例数と TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量

	症例数	TCR 遺伝子導入 T リンパ球 初回・2 回目輸注量	改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 初回・2 回目投与量
コホート 1	3 症例	各 2×10^8 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g
コホート 2	3 症例	各 1×10^9 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g
コホート 3	3 症例	各 5×10^9 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g

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. 安全・効果評価・適応判定中央部会

有効性や安全性の評価基準を統一する目的で、本臨床研究では、各医療機関に共通の安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。

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

	<p>7. 個人情報の保護の徹底</p> <p>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。</p>
備 考	

(別紙) 検査・観察スケジュール

	一次登録時	採血前※1	初回投与 day0		day					2回目投与 day28		day							中止 終了時 day58	研究終了 後の追跡 調査 ※3	
			前	後	1	2	3	7	14	前	後	29	30	31	35	44	45	51			
同意取得	●		●																		
被験者登録	●		●																		
被験者背景	●																				
TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与				●						●											
WT1 ペプチド投与												●			●						
問診、PS、SpO ₂ 、バイタルサイン	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	
感染症検査	●																				
血液検査	●	●	●		●			●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	
PCR 法による WT1 測定	●		●							●									●		
胸部 X 線検査	●		●							●									●		
血液像検査 (末梢血)	●		●							●									●		
骨髄検査 (実施可能例)			●							●									●		
心臓超音波検査	●		●							●									●		
12 誘導心電図	●		●							●									●		
血中動態測定			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
免疫機能解析			●							●					●				●		
RCR の測定					●														●	●	
LAM-PCR			●																●	●	
長期保存用検体の採血			●							●									●		
採血量 (mL) (免疫機能解析を除く)	17	11	42	60	31	15	15	26	26	37	60	26	26	26	26	26	26	26	26	47	36
免疫機能解析用採血量 (mL) ※2			20 ~ 50							20 ~ 50						20 ~ 50			20 ~ 50		
有害事象																					

※1 一次登録と同日に TCR 遺伝子を導入する T リンパ球を採取する場合は、一次登録時の検査にて代用を可能とする。

※2 被験者の Hb 値を考慮したうえで採血量 (20mL、30mL、40mL、50mL) を決定する。

※3 1年に1回の頻度で FDA ガイドラインに従い最短15年間にわたり検査を実施する。

