

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成25年 7月 3日

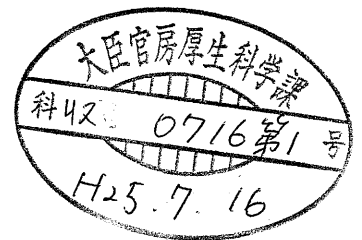
厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	〒329-0498 栃木県下野市薬師寺3311-1
	名称	自治医科大学附属病院 (電話番号) 0285-44-2111 (FAX 番号) 0285-40-8303
	代表者 役職名・氏名	自治医科大学附属病院長 安田 是和 (職印)

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
CD19 特異的キメラ抗原受容体発現Tリンパ球を用いた難治性B細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究	自治医科大学 内科学講座血液学部門 分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 免疫遺伝子細胞治療学 (タカラバイオ) 講座 教授 小澤 敬也 (印)





## 遺伝子治療臨床研究実施計画概要書


平成 25 年 7 月 3 日

(申請年月日)

研究の名称	CD19 特異的キメラ抗原受容体発現 T リンパ球を用いた難治性 B 細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	承認日から 3 年間

総括責任者	所属部局の所在地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	所属機関・部局・職	自治医科大学 内科学講座血液学部門 分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部 免疫遺伝子細胞治療学(タカラバイオ)講座 教授	
	氏名	小澤 敬也	
実施の場所	所在地	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (郵便番号 329-0498)	
	名称	自治医科大学附属病院	
	連絡先	栃木県下野市薬師寺 3311-1 (電話番号 0285-44-2111)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	大嶺 謙	自治医科大学 内科学講座血液学部門 免疫遺伝子細胞治療学(タカラバイオ)講座 講師	臨床分野からの研究計画の推進及び試験登録患者の診療
	塚原 智典	自治医科大学 内科学講座血液学部門 免疫遺伝子細胞治療学(タカラバイオ)講座 助教	CAR 遺伝子導入 T リンパ球製剤の製造管理責任者
	内堀 亮介	自治医科大学 遺伝子治療研究部 免疫遺伝子細胞治療学(タカラバイオ)講座 助教	基礎分野からの研究計画の推進
	室井 一男	自治医科大学 輸血・細胞移植部 教授	細胞プロセッシング室の管理責任者及び試験登録患者の診療
	岡塚 貴世志	自治医科大学 内科学講座血液学部門 助教	CAR 遺伝子導入 T リンパ球製剤の品質管理責任者、遺伝子治療プロトコールの作成及び試験登録患者の診療
	永井 正	自治医科大学 内科学講座血液学部門 准教授	試験登録患者の診療
	森 政樹	自治医科大学 内科学講座血液学部門 講師	試験登録患者の診療
	鈴木 隆浩	自治医科大学 内科学講座血液学部門 講師	試験登録患者の診療

	藤原 慎一郎 翁 家国 多々良 礼音 上原 英輔 久米 晃啓 水上 浩明 卜部 匡司 福嶋 敬宜 吉尾 卓 山崎 晶司	自治医科大学 内科学講座血液学部門 講師 自治医科大学 内科学講座血液学部門 講師 自治医科大学 内科学講座血液学部門 助教 自治医科大学 内科学講座血液学部門 助教 自治医科大学 遺伝子治療研究部 准教授 自治医科大学 遺伝子治療研究部 准教授 自治医科大学 遺伝子治療研究部 講師 自治医科大学 病理診断部 教授 自治医科大学附属病院臨床試験センター センター長 自治医科大学附属病院臨床試験センター 副センター長	試験登録患者の診療 CAR 遺伝子導入 T リンパ球製剤の 品質管理副責任者、遺伝子治療プ ロトコールの作成及び試験登録患 者の診療 遺伝子治療プロトコールの作成及 び試験登録患者の診療 遺伝子治療プロトコールの作成及 び試験登録患者の診療 ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球調製に関する助言 ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球調製に関する助言 ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球調製に関する助言 病理組織学的診断 試験実施の支援 試験実施の支援
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	レトロウイルスベクター製剤の製 造・品質管理者、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 T リンパ球製剤の体内動 態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に 関する技術提供
	Renier J Brentjens	メモリアル・スローン・ケタリング癌センター Associate Member	マスターセルバンクの提供、遺伝 子治療プロトコールの作成の助言
	Isabelle Riviere	メモリアル・スローン・ケタリング癌センター Gene Transfer & Somatic Cell Engineering Facility Director	マスターセルバンクの提供、遺伝 子治療プロトコールの作成の助言
	Michel Sadelain	メモリアル・スローン・ケタリング癌センター Center for Cell Engineering Founding Director	マスターセルバンクの提供、遺伝 子治療プロトコールの作成の助言
	西川 博嘉	大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 特任准教授	基礎分野からの研究計画の推進

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「CD19特異的キメラ抗原受容体発現Tリンパ球を用いた難治性B細胞性悪性リンパ腫に対する遺伝子治療臨床研究」を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実施計画は、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1号、平成16年文部科学省・厚生労働省告示第2号により全部改正、平成20年文部科学省・厚生労働省告示第2号により一部改正以下「国の指針」という。）の必要条件を全て満たしていると認められたため、所轄官庁に遺伝子治療臨床研究実施計画を申請することを決定した。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	自治医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員長 自治医科大学地域医療センター センター長	梶井英治 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
	<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B細胞性非ホジキンリンパ腫（B-NHL）を対象とした養子免疫遺伝子療法の第I/II相臨床研究である。具体的には、CD19抗原を特異的に認識するキメラ抗原受容体（CAR: chimeric antigen receptor）の遺伝子を導入した自己Tリンパ球（以下、CAR遺伝子導入Tリンパ球）を輸注し、その安全性を検証することを目的とする。併せて、臨床効果とCAR遺伝子導入Tリンパ球の体内動態を評価する。</p> <p>① 主要評価項目</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 本遺伝子治療の安全性 <ul style="list-style-type: none"> <li>(1) CAR 遺伝子導入 T リンパ球の検定</li> <li>(2) 有害事象 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 一般臨床検査 <ul style="list-style-type: none"> <li>● 正常 B リンパ球（減少の有無）</li> <li>● 血清免疫グロブリン濃度</li> </ul> </li> <li>● 増殖性レトロウイルス（RCR）</li> <li>● 挿入変異によるクローナルな細胞増殖及びがん化の監視 <ul style="list-style-type: none"> <li>● FACS 及び定量的 PCR による体内 CAR 遺伝子導入 T リンパ球の解析</li> <li>● linear amplification mediated-PCR (LAM-PCR)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> <p>② 主な副次的評価項目</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 腫瘍縮小効果</li> <li>● CAR 遺伝子導入 T リンパ球のサブセット解析</li> <li>● human anti-mouse antibody (HAMA) テスト</li> </ul>	
対象疾患及びその選定理由	<p>対象疾患：CD19 抗原陽性の難治性 B-NHL</p> <p>対象疾患に関する現時点での知見：</p> <p>初発 B-NHL に対しては、CHOP 療法に抗 CD20 抗体（リツキシマブ）を加えた R-CHOP 療法が現在スタンダードとなっている。しかし、R-CHOP 療法に不応あるいは再発するリンパ腫も多い。再発・難治性の中悪性度 B-NHL に対しては、サルベージ（救援）療法や自家造血幹細胞移植併用大量化学療法が行われるが、十分な治療成績は得られていない。低悪性度 B-NHL やマントル細胞リンパ腫などに関しては、治癒が期待できる標準的治療法は確立されていない。その他、同種造血幹細胞移植も治療選択肢の一つであるが、やはり対象症例は限定され、治療成績も必ずしも良好でない。</p> <p>現在、リツキシマブ以外の新規抗体医薬を始めとする分子標的治療薬の開発が行われているが、その限界もあり、全く新しい観点からの治療法として遺伝子治療法の開発が期待される。</p>	

<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p><b>人に導入する遺伝子の構造と遺伝子導入方法：</b></p> <p>本臨床研究において用いる遺伝子は、ヒト CD8<math>\alpha</math> リーダーペプチド、ヒト CD19 抗原特異的マウス単鎖抗体 (scFv)、ヒト CD28 の一部、及びヒト CD3<math>\zeta</math> 細胞内シグナル伝達領域のキメラ抗原受容体 (CAR) をコードしている。</p> <p>患者の末梢血リンパ球 (peripheral blood lymphocyte : PBL) に CAR 遺伝子を導入するにあたっては、遺伝子導入効率の高いレトロウイルスベクター法を用いる。今回用いるレトロウイルスベクターの SFG-1928z のもとになる野生型ウイルスは MoMLV である。パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープタンパク質を持つ。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遺伝子導入できる。遺伝子導入の際は、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) をコートした培養バッグ中にて、刺激した T リンパ球浮遊液とレトロウイルスベクターの SFG-1928z を混合培養する。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p><b>1. 遺伝子導入方法の安全性</b></p> <p><b>1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度</b></p> <p>ワーキングセルバンク (WCB) は、米国 Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) より入手したマスターセルバンク (MCB) を出発原材料として、タカラバイオの管理された製造エリアにて GMP 遵守下で製造する。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用する。</p> <p><b>1.2. 被験者に投与する物質の純度及びその安全性</b></p> <p>被験者に投与されるのは CAR 遺伝子を導入した自己 T リンパ球である。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 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。</p> <p><b>1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性</b></p> <p>①レトロウイルスベクターの安全性</p> <p>本臨床研究で使用する SFG-1928z 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おり、RCR の出現する可能性は極めて低いと考えられる。確認のために RCR 試験を行い、RCR 陰性の SFG-1928z を臨床研究に使用する。</p> <p>②パッケージング細胞株の安全性</p> <p>SFG-1928z 作製の用パッケージング細胞 PG13 は、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片を異なるプラスミドでトランスフェクションして作製された第 3 世代パッケージング細胞株で、予期せぬ遺伝子組換えにより RCR が出現する可能性は極めて低い。</p> <p><b>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</b></p> <p>SFG-1928z 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。</p> <p><b>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</b></p> <p>本臨床研究では、被験者の T リンパ球に <i>ex vivo</i> (生体外) で CAR 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投与する。SFG-1928z 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であるため、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。さらに、マウス細胞由来のパッケージング細胞株を用いて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。したがって、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と考えられる。</p> <p><b>1.6. 被験者以外の人に遺伝子が導入される可能性</b></p> <p>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。遺伝子導入操作は P2 レベルの臨床用細胞プロセッシング室において、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は臨床用細胞プロセッシング室内に設置されたクラス II 安全キャビネット内で行う。レトロウイルスベクターを含む廃液の全てはオートクレーブ後に廃棄される。このような対策により、SFG-1928z の環境</p>

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。SFG-1928z 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極めて低い。

### 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。特に、癌遺伝子の近傍に挿入され、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てその遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞ががん化する可能性がある。

### 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) の遺伝子治療において、白血病発症が報告されている。造血幹細胞を含む CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした場合には、がん化のリスクは否定できないが、本臨床研究の場合のように、末梢リンパ球を標的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入では、これまで白血病発症の報告はない。

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性増殖を LAM-PCR によってモニタリングし、遺伝子導入細胞のがん化の有無を評価する予定である。

## 2. 遺伝子産物の安全性

本研究で用いる CAR 遺伝子の産物は、細胞表面抗原 CD19 を特異的に認識する抗体の Fab 領域に由来する単鎖抗体 (scFv)、T リンパ球活性化の副刺激因子である CD28 ドメイン、及び TCR のシグナル伝達領域である CD3 $\zeta$  のキメラタンパク質である。CD19 は正常 B リンパ球にも発現していることから、CAR 遺伝子導入 T リンパ球を投与することにより、正常 B リンパ球が減少する可能性がある。必要に応じ、免疫グロブリン製剤の予防投与を行うことで安全性を確保することができる。また、CAR 遺伝子導入 T リンパ球の投与細胞数の少量からの漸増、2 回の分割投与により、腫瘍崩壊症候群が起こらないように配慮する。

## 3. 細胞の安全性

### 3.1. 遺伝子導入細胞の調製方法

細胞分離・細胞培養・遺伝子導入の全ての操作は自治医科大学附属病院内に設置された清浄度クラス 10,000 かつ封じ込め対応 (P2 レベル) の臨床用細胞プロセッシング室内で行われる。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、外来微生物の混入などを防止する。

### 3.2. 培養細胞の純度

健常人末梢血リンパ球を用いた遺伝子導入では、遺伝子導入 T リンパ球の比率は 15%程度である。患者に投与される細胞中には、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存在したものであり問題ないと考えられる。

細胞培養の際に使用する抗 CD3 抗体、レトロネクチン CH-296、rhIL-2 等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。

### 3.3. 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

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ほとんどないと考えられるが、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。

*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、輸注 T リンパ球の安全性に関する大きな問題は報告されていない。さらに、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* 培養を行った T リンパ球が、被験者体内で長期間観察されたことが報告されている。本臨床研究でも、T リンパ球の培養は同程度の短期間にとどめている。

### 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、SFG-1928z により CD19-CAR 遺伝子を導入した被験者由来の T リンパ球である。細胞調製に用いられる培地成分、SFG-1928z、種々の試薬に関しては、遺伝子導入 T リンパ球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、最終培養液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。

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 (セルカウンター)
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

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

本臨床研究は、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、CD19 抗原を認識し T リンパ球活性化能を持つ CAR の遺伝子をレトロウイルスベクターにより被験者の T リンパ球に導入した後、増幅する。この製造工程は十分に確立され、また、調製された輸注用の CAR 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標的細胞は、造血幹細胞ではなく、成人末梢血 T リンパ球である。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、対象疾患におけるリスク・ベネフィットを考慮すると、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。同一のレトロウイルスベクターによる遺伝子導入で調製された CAR 遺伝子導入 T リンパ球のヒトへの投与は、米国 MSKCC で既に実績がある。本臨床研究は CAR 遺伝子導入 T リンパ球の品質の管理方法および予測される副作用とその対処法に関する十分な情報の下に遂行される。これまで報告されている CD19-CAR 遺伝子を用いた臨床研究における主な有害事象はインフュージョン反応、高サイトカイン血症、腫瘍崩壊症候群、正常 B リンパ球の減少である。

本臨床研究では、以上の事例を踏まえ CAR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量を慎重に漸増し、最大耐用量を決定する。また、初日に 1/3 量を投与し、問題なければ翌日に 2/3 量を投与するデザインにより安全性を図る。正常 B リンパ球の減少に伴う血清免疫グロブリン値の低下に対しては、適宜、免疫グロブリン製剤を投与し、感染症を予防する。

#### 3. 本臨床研究の期待される有効性

CAR 遺伝子導入 T リンパ球は、CD19 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、マウスに腫瘍細胞株を注射したモデル実験において、CAR 遺伝子導入ヒト T リンパ球投与により特異的な腫瘍増大抑制効果が認められた。

米国 MSKCC では、化学療法抵抗性の慢性リンパ性白血病 4 例にシクロホスファミドで前処置を行い、CAR 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、評価可能な 4 例中 3 例に治療効果を認めた。3 例のうち 1 例で 3 ヶ月目に明らかなリンパ節腫脹の退縮が観察され、リンパ節腫脹と血球減少が急速に進行している別の 2 例は治療後にそれぞれ 8 週間と 4 ヶ月間にわたり進行なく、病態が安定した。彼らは再発 ALL 患者 5 名に対しても 19-28zCAR 導入 T リンパ球による治療を行い、全例(うち 4 例は治療前に微小残存病変を認めた)で分子生物学的寛解が得られたと報告している。本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる。

#### 4. 当施設・研究者の能力

本臨床研究の研究者は、患者リンパ球採取、遺伝子ベクター調製、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び当施設における臨床試験の経験者により構成される。自治医科大学附属病院は、悪性リンパ腫に対する長年の豊富な診療経験と優れた診断技術を有し、豊富な経験をもつスタッフを擁している。

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



さらに臨床研究の対象となる患者も北関東を中心に集まっており、系統立てた診療体制とデータ管理体制が整っている。院内に設置された臨床用細胞プロセッシング室は治験薬の製造管理、品質管理等に関する基準（治験薬 GMP）（薬食発第 0709002 号 平成 20 年 7 月 9 日）に基づき運営・管理される体制にあり、CAR 遺伝子導入 T リンパ球は同基準に準拠して調製される。カルタヘナ関連法、個人情報保護法を含め、本臨床研究実施に必要な学内・院内システムは全て整っている。

実施計画

1. 本臨床研究の実施に際し自治医科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・適応判定部会を設置する。

## 2. 本臨床研究の実施手順

### 2.1 プロトコール治療の流れ

#### (1) CAR 遺伝子導入 T リンパ球の調製

一次登録時の選択基準・除外基準に適合する難治性 B-NHL 患者を選定し、本臨床研究への一次登録を行う。被験者末梢血単核球に SFG-1928z を用いて遺伝子導入を行い、10 日間拡大培養して凍結保存する。CAR 遺伝子導入 T リンパ球の調製と一次品質試験を終了した後、二次登録時の選択基準・除外基準に適合する被験者を選定し、本臨床研究への二次登録を行う。

#### (2) 前処置薬の投与

Day -2 にシクロホスファミド ( $1.5 \text{ g/m}^2$ : ただし、年齢及び被験者の状態等によって減量を可とする)、または Day -3 および -2 にベンダムスチン ( $120 \text{ mg/m}^2$ : ただし、年齢及び被験者の状態等によって減量を可とする) を投与する。

#### (3) CAR 遺伝子導入 T リンパ球の輸注

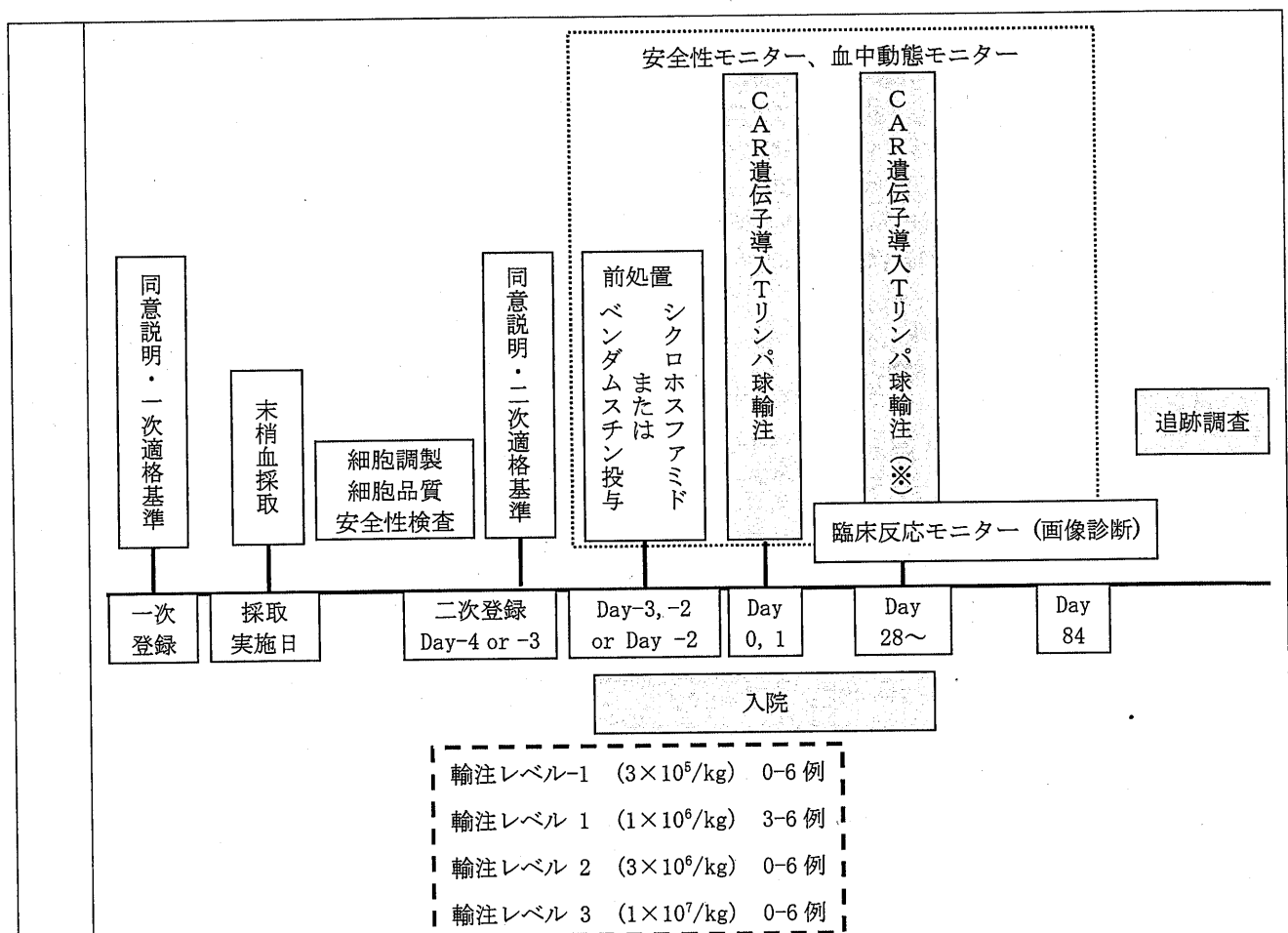
CAR 遺伝子導入 T リンパ球は、Day 0 及び Day 1 に経静脈的に分割投与する (Day 0: 1/3 量、Day 1: 2/3 量)。また、細胞調製において十分な CAR 遺伝子導入 T リンパ球が得られている場合、Day 28 以降に 1 回目投与後の患者の病態変化をみて、2 回目投与の要否の判断を行う。2 回目投与が必要と判断した場合は、適切な時期に投与することができる。

### 2.2 用量漸増計画

各輸注レベルで投与する CAR 遺伝子導入 T リンパ球数及び被験者数を下の表に示す。なお、本臨床研究における CAR 遺伝子導入 T リンパ球の投与細胞数は CAR 陽性細胞数とし、各輸注レベルで定めている CAR 遺伝子導入 T リンパ球数の 50% 以上が得られた場合、その輸注レベルの DLT 解析対象として投与するものとする。ただし、得られた CAR 遺伝子導入 T リンパ球数が 50% 未満の場合も、DLT 解析対象外ではあるが、最小輸注量 (輸注レベル -1) が得られている場合は、投与を行うものとする。

輸注レベル	CAR 遺伝子導入 T リンパ球数	被験者数
-1	$3 \times 10^5/\text{kg}$	0-6
1 (開始レベル)	$1 \times 10^6/\text{kg}$	3-6
2	$3 \times 10^6/\text{kg}$	0-6
3	$1 \times 10^7/\text{kg}$	0-6

- 輸注レベル 1 より開始する。
- 薬物有害事象以外の理由で DLT 観察期間中に臨床研究中止となった患者は、DLT 解析対象外とする。また DLT の解析対象外となった被験者を認めた場合は、該当するレベルに追加登録を行う。
- 各輸注レベル 3 例まで実施し、DLT 出現被験者数に応じて、必要な場合にはさらに 3 例を追加する。各輸注レベルの実施被験者数は 3 例もしくは 6 例となるが、登録一時中止のアナウンスが行われる前に複数の未登録被験者から試験参加への同意取得が得られていた場合、3 例もしくは 6 例を超えて臨床研究を実施することを許容する。



※十分な CAR 遺伝子導入 T リンパ球が得られている場合、Day 28 以降に 1 回目投与後の患者の病態変化をみて、2 回目投与が必要と判断した場合は、適切な時期に投与することができる。

図 本臨床研究の実施手順/遺伝子導入 T リンパ球調製及び輸注計画

### 2.3 用量制限毒性(dose limiting toxicity:DLT)の定義

DLT は以下の通りとする。

- 治療前に白血球数が  $1,000/\mu\text{L}$  以上だった患者において、CAR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後 28 日の時点で、本治療との因果関係を否定できない Grade 4 以上の白血球減少 ( $\text{WBC} < 1,000/\mu\text{L}$ ) が認められた場合。但し、原疾患に因る減少の場合は除く。
- 治療前に血小板数が  $50,000/\mu\text{L}$  以上だった患者において、CAR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後 28 日の時点で、本治療との因果関係を否定できない Grade 3 以上の血小板減少 ( $\text{Plt} < 50,000/\mu\text{L}$ ) が認められた場合。但し、原疾患に因る減少の場合は除く。
- 本治療との因果関係を否定できない上記以外の Grade 4 以上の血液毒性。
- 本治療との因果関係を否定できない Grade 3 以上の非血液毒性(但し、対処可能な悪心、嘔吐、食欲不振、疲労、下痢、便秘、電解質異常及び過敏反応は除く)が、14 日間以上続いたとき。

### 2.4 最大耐用量(MTD)の推定及び推奨用量 (RD) の定義

MTD は、DLT が起こった患者が 33%未満である用量のうち、最大の用量とする。なお、RD は MTD と同用量とする。

用量移行は 3+3 デザインに従う。最初に輸注レベル 1 に 3 例を登録する。用量移行する場合は、次の輸注レベルに別の 3 例を登録する。輸注レベル移行の可否は、下記の基準に従う。

- ① 各輸注レベルの 3 例に DLT が認められなかった場合は、次の段階の輸注レベルへ移行する。
- ② 各輸注レベルの 3 例中 1 名に DLT が認められた場合は、同レベルに新たに 3 例の被験者を追加登録し、6 例で検討する。DLT 発現が 6 例中 1 例であった場合は、次の段階の輸注レベルへ移行する。
- ③ 輸注レベル 1 の 3 例中 2 例以上、または 6 例中 2 例以上に DLT が認められた場合は、輸注レベル-1 へ移行する。

- ④ 各輸注レベルの2例以上にDLTが認められた場合は、増量検討は行わない。この輸注レベルはMTDを超えていると考え、一つ前の輸注レベルでMTDを検討する。
- ⑤ MTDを決定する輸注レベルのDLT評価対象が3例であった場合は、この輸注レベルへ新たに3例の被験者を追加登録し、6例でDLT評価を行う。6例中DLTが認められないか、1例のみに認められた場合、この輸注レベルをMTDとする。6例中2例以上にDLTが認められた場合は、一つ前の輸注レベルに戻り同様にMTDを検討する。
- ⑥ 上記③に従った後、輸注レベル-1の3例にDLTが認められないか、3例中1例にDLTが認められた場合は、輸注レベル-1に新たに3例の被験者を追加登録し、6例でDLT評価を行う。
- ⑦ 上記③に従った後、輸注レベル-1の2例以上にDLTが認められた場合は、輸注レベル-1はMTDを超えているとする。

### 3. 被験者の選択基準及び除外基準

#### 3.1 一次登録

患者より文書にて同意を取得する。一次登録時の適格基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しない患者を登録適格例とする。

##### 3.1.1 適格基準（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. 再発・難治性の CD19 陽性 B-NHL 患者
2. 評価可能病変が CT 画像で確認でき、かつ FDG-PET 検査で陽性として検出できること
3. 本臨床研究登録時に 20 歳以上、かつ 70 歳以下であること
4. ECOG の全身状態の指標 (PS) が 0 から 2 であること
5. 主要臓器予備能が以下の基準を満たすこと
  - ① 好中球数  $\geq 1,500 / \text{mm}^3$  (リンパ腫の骨髄浸潤による好中球減少はこの限りではない)
  - ② 血小板数  $\geq 10 \times 10^4 / \text{mm}^3$   
(リンパ腫の骨髄浸潤による血小板減少はこの限りではない)
  - ③ 総ビリルビン  $\leq 2.0 \text{ mg/mL}$
  - ④ AST (GOT)、ALT (GPT)  $\leq 150 \text{ IU/dL}$   
(リンパ腫の肝浸潤による肝障害はこの限りではない)
  - ⑤ ALP 正常上限値の 1.5 倍以下
  - ⑥ 血清クレアチニン  $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
  - ⑦  $\text{SpO}_2 \geq 92 \%$  (酸素吸入なしの状態)
6. 同意取得後、3ヶ月以上の生存が見込めること
7. 試験参加について患者本人から文書で同意が得られていること

##### 3.1.2 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. 活動性の重複癌を併発している患者
2. リンパ腫の明らかな中枢神経浸潤を伴う患者
3. 同種造血幹細胞移植後の患者
4. 24 週間以内に CAR 遺伝子導入 T リンパ球を投与する臨床試験に既に参加している患者
5. ステロイドまたは免疫抑制剤の全身投与を行っている患者。
6. 重度の心疾患を併発する患者
7. 重度の脳血管疾患の既往を有する、或はそれによる麻痺など後遺症を残す患者
8. 活動性、或は重篤な感染症を併発している患者
9. HIV 抗体陽性患者
10. HB-s 抗原陽性、或は HB-c 抗体陽性かつ HBV-DNA が陽性である患者
11. 活動性の HCV 感染患者
12. 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
13. 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性または妊娠を希望している女性患者。又は育児希望のある男性患者 (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)
14. その他、担当医師によって本臨床試験への参加が適当でないと判断される患者

#### 3.2 二次登録

二次登録時の適格基準の全てを満たし、かつ除外基準のいずれにも該当しないことを確認し二次登録を行う。

### 3.2.1 適格基準 (二次登録)

一次登録適格基準の全て、および次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 CAR 遺伝子導入 T リンパ球の一次品質試験に合格し、最小輸注量 (輸注レベル -1) が得られた患者
2. 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意志による同意が文書にて得られた患者

### 3.2.2 除外基準 (二次登録)

一次登録除外基準のいずれかの項目に抵触する患者は除外する。

## 4. 被験者の同意取得方法

登録に先立って、担当医師は医療機関及び厚生労働省の承認が得られた説明文書を患者本人に渡し、以下の内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する (文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計2 回行う。また、二次登録時には施設コーディネーター等が説明補助を行うものとする。

## 5. 目標登録数・登録期間・追跡期間

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3 年間とする。症例毎の実施期間はCAR遺伝子導入Tリンパ球輸注後84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がんやRCR の有無について追跡調査を実施する。

目標症例数は6例から最大18例である。

## 6. 臨床検査項目及び観察項目

評価項目は、遺伝子治療の安全性、CAR 遺伝子導入 T リンパ球の体内動態及び臨床効果である。フォローアップ期間における臨床モニタリング項目は下記の表に示す通りである。

評価事項	モニタリング実施項目
治療全体の安全性	血液学的検査、血液生化学検査、免疫学的検査、感染症検査、有害事象
遺伝子治療安全性	フローサイトメトリー解析、RCR 検査、LAM-PCR
血中動態	フローサイトメトリー解析、PCR
抗腫瘍効果判定	PET-CT、全生存率、無増悪生存期間
CAR 遺伝子導入 T リンパ球免疫原性	human anti-mouse antibody (HAMA) テスト

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。

## 7. 予測される副作用及びその対処方法

### 7.1 採血に伴う副作用

- 1) 迷走神経反射：重篤な場合は採取を中止し、必要な処置を行う。

### 7.2 CAR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用

- 1) インフュージョン反応：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。重篤な場合は投与を中止する。
- 2) 輸注後低ガンマグロブリン血症と易感染性：免疫グロブリン製剤を予防投与する。
- 3) 腫瘍崩壊症候群：自治医科大学血液科のマニュアルに基づき、治療を行う。
- 4) シクロホスファミド及びベンダムスチンの毒性：G-CSF投与や赤血球輸血・血小板輸血を行う。
- 5) 自己免疫疾患の発生：ステロイド等を用いた免疫抑制療法を行うことがある。
- 6) レトロウイルスベクターを用いる危険性：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。Tリンパ球のクローン性増殖が認められた場合には、当該クローンの遺伝子挿入部位の同定を行うとともに、化学療法等による最善の治療を行う。

## 8. 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

### 8.1 主要評価項目

1. 被験者リンパ球から作製したCAR遺伝子導入Tリンパ球の検定：CAR遺伝子導入Tリンパ球における遺伝子導入効率、Tリンパ球生存率、無菌性、機能の評価する。
2. 本臨床試験に関連した有害事象の評価：有害事象のGradeは、2003 年に米国National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.0 (CTCAEv4.0)

- May 28, 2009 (v4.03-Jun 14, 2010、JCOG/JSCO版：日本語表記MedDRA/J v13.1対応 - 2010年9月11日) に従い、判定を行う。

3. 被験者血清中の免疫グロブリン濃度を測定する。
4. レトロウイルスベクターの安全性を確認するためにRCR検査を行う。
5. 被験者末梢血におけるCAR遺伝子導入Tリンパ球の動態を、FACS及び定量的PCR法を用いて検討すし、挿入変異によるクローナルな細胞増殖及び発がんの監視を行う。

#### 8.2 副次的評価項目

1. CAR遺伝子導入Tリンパ球の抗腫瘍効果
  - ・ 抗腫瘍効果を画像検査で判定する。
  - ・ 治療前、腫瘍細胞が末梢血または骨髄中で検出可能だった場合には、細胞表面マーカー、染色体分析、FISH法、RT-PCR法を用いて微小残存病変 (MRD) の有無を判定する。
  - ・ 全生存率 (OS) と無増悪生存期間 (PFS) を判定する。
2. CAR遺伝子導入Tリンパ球のサブセット解析
3. human anti-mouse antibody (HAMA) テスト  
治療後に、腫瘍組織またはリンパ節、骨髄の生検可能な病変を有し、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。

#### 8.3 各被験者における臨床研究中止基準

以下のいずれかの場合、臨床研究を中止する。なお、中止例については、出来るだけ早い時期に可能な限り中止時の検査をすべて行うとともに、中止日、中止理由を調査する。

- 1) 治療開始後に原病の増悪が認められた場合
- 2) 有害事象によりプロトコール治療が継続できない場合
- 3) 有害事象との関連が否定できない理由により、患者がプロトコール治療の中止を申し出た場合
- 4) 有害事象との関連が否定できる理由により、患者がプロトコール治療の中止を申し出た場合
- 5) プロトコール治療中の死亡
- 6) その他、登録後治療開始前の増悪 (急速な増悪によりプロトコール治療が開始できなかった)、プロトコール違反が判明、登録後の病理診断変更などにより不適格性が判明して治療を変更した場合など

#### 9. 記録の保存及び成績の公表の方法

##### 9.1 記録の保存

本臨床研究に関する記録の保存期間は、本臨床研究の特殊性に鑑み、15年間とする。

##### 9.2 個人情報の保護の徹底

患者のプライバシー保護と秘密の保全に関しては、「自治医科大学附属病院の患者等の個人情報保護に関する取扱要領」ならびに「自治医科大学附属病院の患者等の個人情報保護に関する規定」に沿って適切な取扱いを行う。

##### 9.3 成績の公表の方法

1. 遺伝子治療臨床研究に関する指針に基づき、自治医科大学附属病院長は、遺伝子治療臨床研究に関する情報の適切かつ正確な公開に努めるものとする。
2. 本研究の結果は、本研究に用いた技術の厚生労働省への製造 (輸入) 販売承認申請における参考資料として使用する。また、本臨床研究から得られたデータを学会などで発表、論文として医学雑誌などに発表する場合がある。なお、承認後、結果の一部を添付文書及びインタビューフォームに記載することがあるが、それ以外の目的には使用しない。また、前記の資料に公表する場合にあっても被験者のプライバシーは確保される。

備考

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)
3. 「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)

(別紙) 検査・観察スケジュール

日数	スクリーニング期間		前治療期間			輸注日		観察期間																	84 または 中止時 <sup>4</sup>					
	一次 登録時	末梢血 採取時	2次 登録時	前処 置時	-1	0	1	2~5	6	7	8	9	10	11	12	14	17	20	22	25	28	35	42	49		56	63	70	77	
来院許容範囲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±1	±1	±1	±1	±1	±1	±3	±3	±3	±3	±3	±3	±3	±3	
入院※				○																										
同意取得	○		○																											
一次登録	○																													
二次登録			○																											
被験者背景	○																													
末梢血採取		○																												
CAR 遺伝子導入 T リンパ球投与						○	○																							(○) 該当する場合
問診・バイタルサイン	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Performance status	○			○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○																													
血液検査	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
腫瘍マーカー検査	○																													
胸部 X 線検査	○		○																											○
12 誘導心電図	○		○ <sup>1</sup>																											○
CT 検査	○		○																											○
PET-CT・脳 MRI	○ <sup>1</sup>		○ <sup>1</sup>																											○
心臓超音波検査	○ <sup>1</sup>		○ <sup>1</sup>																											○
呼吸機能検査	○ <sup>1</sup>		○ <sup>1</sup>																											○
上部消化管内視鏡検査	○																													
血漿サイトカイン			○	○	○		○ <sup>2</sup>								○						○									○
CAR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態							○ <sup>2</sup>								○						○									○
T リンパ球サブセ ット解析				○				○ <sup>3</sup>							○						○									○
制御性 T 細胞解析			○																		○									○
骨髄検査	○																				○									○
LAM-PCR																					○									○
RCR 検査・HAMA テスト								○ <sup>3</sup>													○									○
有害事象				○																										
予定末梢血採取量(mL)	12	8	46	28	18	48*	48*	18	8	8	-	8	-	8	-	18	-	-	-	28	28	-	-	-	21	-	-	28	28	

※ 個室管理に該当する期間は、その規定に従う。  
 \* Day 0 および Day 1 はそれぞれ採血を 4 回施行する。採血量は各 18 mL, 10 mL, 10 mL, 10mL.

1. 同意取得時はスクリーニング期間開始前 12 週間以内、2 次登録時は 4 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 1 回目 CAR 遺伝子導入 T リンパ球輸注前及び輸注後 : 1、3、8 hr、2 回目 CAR 遺伝子導入 T リンパ球輸注前及び輸注後 : 1、3、8、24、48、72、96 hr
3. Day 2 のみ実施
4. 中止時は出来るだけ早い時期に可能な限りすべての中止時の検査を行う。