

V.1.2 当該遺伝子治療臨床研究の概要

当該遺伝子治療臨床研究は、以下の選択基準に合致した患者を対象とし、前出図1に示した全体計画フロー（プロトコール概要）に基づいて行われる。

＜患者仮登録時選択基準の概要＞

- 1) 予後不良の高リスク造血器悪性腫瘍患者（詳細は別途規定）
- 2) HLA 適合又は HLA 1 座不一致の適切なドナーがいない
- 3) 末梢血幹細胞提供可能な HLA 2～3 座不一致の血縁ドナーがいる
- 4) 年齢が 20 歳以上 60 歳以下
- 5) ECOG の Performance Status が 0 又は 1
- 6) 主要臓器の機能が保たれている（詳細は別途規定）
- 7) ドナー及び患者の両者から文書での同意が得られている

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の調製】

遺伝子導入に使用するレトロウイルスベクターSFCMM-3 は、モルメド社で GMP 基準に則って作製され、品質規格に適合したものを輸入して受け入れ、国立がんセンター中央病院内の CPR に搬入する。なお、当該レトロウイルスベクターは、モルメド社が実施中の治験（TK007）及び本邦における筑波大学付属病院での遺伝子治療臨床研究で使用されているものと同じベクター^{*7}である。

国立がんセンター中央病院内において、T 細胞除去ミスマッチ移植ドナーと同一のドナーに由来する PBMC をアフエレーシスにより採取する。IL-2 存在下で抗 CD3 抗体により PBMC を刺激して活性化し、当該レトロウイルスベクターにより HSV-TK 遺伝子及び ΔLNGFR 遺伝子を ex vivo 遠心法により導入する。その後、抗 LNGFR 抗体と二次抗体結合磁気ビーズ及び細胞分離装置による純化、IL-2 存在下での拡大培養を経て HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 液を調製する。当該 Add-back 液の品質試験項目は次頁のとおりであり、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の＜品質試験項目-1＞に合格したことを確認した後に用いる。また、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の＜品質試験項目-2＞は Add-back 後に試験を開始するが、試験に日数を要するために結果の判明が Add-back 後になる場合がある。万一、Add-back 後に不合格であることが判明した項目があればその時点で臨床研究を中止して適切な措置を講ずることとする。つまり、化学療法や移植幹細胞ソースの再検索といった臨床現場において現時点で HLA 適合又は HLA 一座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者に行われている治療法の中で、患者の状態に応じ総括責任者（又は治療にあたる分担研究者）が最も適切と考える治療法を行う。なお、ドナーアフエレーシスに際しては、担当医師からドナーへのじゅうぶんなインフォームドコンセントを行い、文書による同意を取得する。

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-1>

- ・ 細胞生存率
- ・ エンドトキシン試験（日本薬局方）
- ・ ΔLNGFR 発現試験
- ・ 増殖性レトロウイルス（replication competent retrovirus: RCR）^{*8} 試験（RT-PCR 法）
- ・ マイコプラズマ否定試験（PCR 法）

<HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の品質試験項目-2>

- ・ 無菌試験（日本薬局方）
- ・ RCR 試験（増幅法）
- ・ マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
- ・ GCV 感受性試験
- ・ IL-2 依存的増殖試験

【T 細胞除去ミスマッチ移植】

ハプロタイプ一致ドナーからの末梢血幹細胞は、G-CSF 製剤投与により動員し、10 L 規模で2～3回アフエレーシスをすることにより採取する。その後、CD34 陽性細胞分離装置（ミルテニーバイオテク社製 ClinimACS 又は同等のもの）を用いて CD34 陽性細胞を分取し、 4×10^6 個/kg を最少量として患者に移植する。その際、CD3 陽性細胞の混入量についても確認する。

T 細胞除去ミスマッチ移植時の前処置は、モルメド社の治験（TK007）と同様の内容で実施する計画である（図9）。また、移植後のGVHD 予防に対する処置は行わないものとし、感染時には速やかに抗ウイルス剤や抗菌剤を処方することとする。なお、アシクロビル（aciclovir: ACV）製剤及びGCV 製剤は、後に Add-back する HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球の自殺機能を惹起することから、本臨床研究で感染予防・治療には使用しないこととする。もし、CMV 感染が問題となった場合には、ホスカルネットナトリウム製剤を使用する予定である。

Conditioning regimen

- TBI : Total Body Irradiation 7.5 Gy
- TT : Thiotepa 13mg/kg
- Flu: Fludarabine 40mg/m²
- ATG: Anti-Thymocyte Globuline(Fresenius®) 5 mg/kg

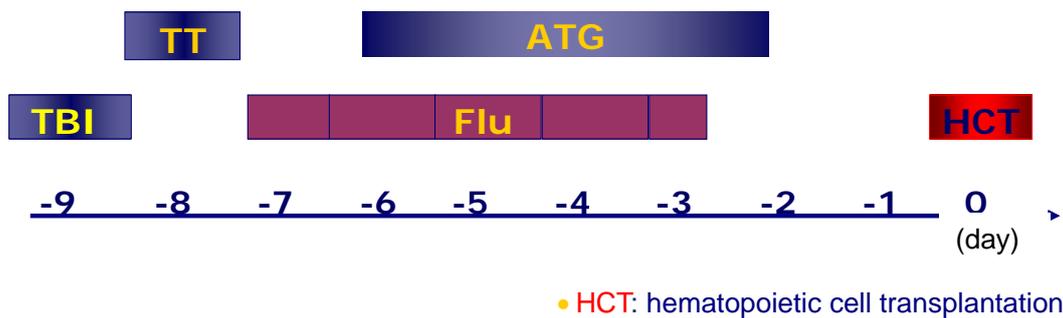


図9 T細胞除去ミスマッチ移植における前処置

【HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 及びフォローアップ】

自発的な免疫系再構築の開始が確認されない場合には、T細胞除去ミスマッチ移植後の造血幹細胞の生着が見込まれる移植後42日目に、上記により調製したHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球 1×10^6 個/kgを追加輸注(Add-back)する。その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後72日目の時点で、 1×10^7 個/kgのHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球を再度Add-backする。更に、その後、免疫系再構築が認められず、かつGrade II以上の治療を必要とするGVHDを発症しない場合は、移植後102日目の時点で 1×10^7 個/kgをAdd-backする。最終のAdd-back実施の6ヵ月後に本臨床研究のフォローアップを終了する。Grade II~IVのGVHDの発症が認められた場合には、通常のCMV感染症治療に用いられる用法・用量に従ってGCV製剤を投与し、末梢血中のHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球をモニターすると共にGVHD症状の沈静化能を評価する。この場合、患者の状態によっては、それまでのAdd-backの回数が1回または2回の場合、医師の判断により、GCV製剤投与後に1回のみHSV-TK遺伝子導入Tリンパ球(1×10^6 個/kg)のAdd-backを許すものとする。

フォローアップ期間における臨床モニタリング実施項目は、表12に示すとおりである。

表 12 臨床モニタリング実施項目

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、尿定性検査、有害事象
遺伝子治療安全性	RCR、LAM (linear amplification-mediated)-PCR (polymerase chain reaction)
移植生着	骨髄像、キメリズム
免疫系再構築	リンパ球免疫表現型 (CD3+、CD4+、CD8+等)
血中動態	フローサイトメトリー解析、PCR
GVHD 発症に対する GCV 製剤による鎮静効果	GVHD 症状、血中動態、免疫組織染色
副次的エンドポイント	再発までの時間、死亡に至るまでの時間、感染症の種類・発症件数・発症時期

V.1.3 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

本遺伝子治療の対象患者は、HLA 適合又は HLA 1 座不一致の血縁ドナーが見当たらない高リスク造血器悪性腫瘍患者である。この患者においては、移植治療は必須かつ急務であり、ミスマッチ移植および臍帯血移植が候補として考えられる。

① ミスマッチ移植

以下に、ミスマッチ移植の課題の解決策を段階的に、他の治療手段との比較を示しながら示す。

【ミスマッチ移植 vs T 細胞除去ミスマッチ移植】

ミスマッチ移植における T 細胞除去の利点は、上述のとおり [V.1.1 「対象疾患に関する現時点での知見」【ハプロタイプ一致ドナー由来造血幹細胞移植（ミスマッチ移植）の現状と課題】の項参照]、重篤な GVHD 予防に最も有効な手段であり、近年の細胞分離装置の進歩により混入する CD3 陽性細胞の少ない高純度の CD34 陽性細胞が得られるようになったため、移植後の重篤な GVHD 発症をほぼ完全に回避できるまでになっている。ただし、その反面、移植後の免疫抑制状態が感染症を引き起こすリスクを高めており、また再発などの問題も指摘されているため、早期の免疫系再構築、及び GVM 効果が課題となる。

【T 細胞除去ミスマッチ移植 vs T 細胞除去ミスマッチ移植+T リンパ球 Add-back】

前項に記載のとおり、T 細胞除去ミスマッチ移植においては、移植後の早期免疫系再構築が、重篤な感染症等による移植関連死を防御する上で最大の課題であり、T 細胞除去ミスマッチ移植時と同じドナーに由来する T リンパ球の Add-back は、理論的に有効な手段と考えられる。しかし、Aversa F らの報告(22)にあるとおり、少量の T リンパ球の Add-back でも致死的な GVHD を発症した例があり、この点での改善が必須である。

【T リンパ球 Add-back vs HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back】

本遺伝子治療では、T 細胞除去ミスマッチ移植後の早期に免疫系を再構築するために、同一ドナー由来の HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を Add-back する計画である。これは、前項に示したとおり、Add-back した T リンパ球が直接要因となる致死性 GVHD 発症に対する対策として、安全装置である自殺機能を当該 T リンパ球に付与するという考えに基づく。GVHD 発症に対する治療手段としては、シクロスポリン製剤又はタクロリムス製剤といった免疫抑制剤や副腎皮質ステロイド製剤の併用が考えられるが、移植後の Grade II 以上の急性 GVHD に対して標準的なステロイド治療を含む種々の治療法を行っても、部分反応 (PR) 以上の効果が認められる確率は 50%に達していない(38, 39)。また、いずれも非特異的に免疫系を抑制することから、急速に易感染性を高め、重度の感染症頻度が

顕著に増加するリスクを伴う。一方、本遺伝子治療では、GCV 製剤投与により HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球のみを選択的に抹消でき、理論的には移植した造血幹細胞由来の免疫系には影響を与えずに GVHD を選択的に沈静化できる可能性が期待される。実際、HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球を移入した後に GCV 製剤が投与された臨床試験例では、ほぼ全例で自殺機能が確認され、GVHD 沈静化に至っている。また、遺伝子治療に関連する有害事象報告は皆無である(40-42)。

② 臍帯血移植

臍帯血移植については、上述したとおり(「V.1.1 対象疾患に関する現時点での知見」【造血器悪性腫瘍患者に対する造血幹細胞移植の現状】の項参照)、近年、その件数が増大し、その評価は定まりつつある。事実、国立がんセンター中央病院においても、2006 年度に適応があると判断された患者計 8 例の臍帯血移植を施行している、しかし一方では、成人に適用する場合の細胞数不足及び移植後療法としてのドナーリンパ球輸注などの細胞療法が不可能であることなどが問題点として挙げられている。細胞数不足に対しては複数臍帯血移植や臍帯血体外増幅といった試みもなされているが、未だ研究段階であり最終的な評価は定まっていない。臍帯血移植と HSV-TK 遺伝子導入 T リンパ球 Add-back 療法である本遺伝子治療の比較を表 13 に示す。

表 13 臍帯血移植と本遺伝子治療の比較

視点	臍帯血移植	本遺伝子治療
<ul style="list-style-type: none"> ●HLA 一致度 ●GVHD によるリスク ●移植までの時間 ●ドナーの負担 	<ul style="list-style-type: none"> ●1-2 座の HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、重症例は少ない。 ●ドナープールに適合するものがあれば、検索開始から最短 7～10 日間で施行することが可能。 ●なし。 	<ul style="list-style-type: none"> ●3 座までの HLA 抗原の不一致。 ●発症した場合でも、自殺機能で制御可能。 ●血縁ドナーが原則であるため、遺伝子導入 T リンパ球の調製期間も含め、最短 2～3 週間で施行することが可能。 ●他の移植*と同等の負担に加え、遺伝子導入 T リンパ球調製のための末梢血単核球及び血漿の採取が行われる。遺伝子導入 T リンパ球調製後に、細胞が規格を満たさないことが判明した場合、本遺伝子治療が行えない可能性がある。
<ul style="list-style-type: none"> ●移植スケジュールの調整 ●ドナーからの感染症 ●GVM 効果 ●拒絶・生着不全 	<ul style="list-style-type: none"> ●患者の都合のみで調整可能。 ●リスクは低い。 ●期待できる。 ●報告によっては 15%前後の症例で見られ、移植する細胞数の不足に関連して不全の頻度が高まる。生着しても時間のかかる場合が多い。 ●複数臍帯血移植の検討が開始されている。 	<ul style="list-style-type: none"> ●ドナー、患者の双方の都合を調整する必要がある。 ●他の移植*と同等であるが、事前に確認することで回避可能。 ●期待できる。 ●他の移植*と同等。
<ul style="list-style-type: none"> ●治療関連毒性 ●再発時の対応 ●遺伝性疾患伝播 	<ul style="list-style-type: none"> ●生着不全・造血回復の遅延に伴う、治療関連毒性が多い。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注ができない。 ●可能性は否定できない。 	<ul style="list-style-type: none"> ●移植後、免疫系再構築までの期間は感染症のリスクが高まる。 ●同一ドナーからのリンパ球輸注が可能。 ●可能性は否定できないが、血縁ドナーが原則ゆえに排除しやすい。

*：臍帯血移植を除く

- 参考資料：・高橋 聡. 成人に対する臍帯血移植の現況. 医学のあゆみ, 218(4):271-275, 2006.
- ・甲斐俊朗. 成人への臍帯血移植. 今日の移植, 19(3):250-255, 2006.
 - ・高橋 聡、浅野茂隆. 臍帯血移植. 癌と化学療法, 31(3):307-313, 2004.
 - ・加藤俊一. 臍帯血移植, 第 68 回日本血液学会・第 48 回日本臨床血液学会合同総会教育講演 5, 2006.

臍帯血移植の利点である「ドナーの負担がない」という点では、本遺伝子治療は通常の移植以上にドナーへの負担を強いるものであり、臍帯血移植のほうが優れている。しかしながら、臍帯血移植の代表的な問題点である移植細胞数の不足、造血回復の遅延、生着不全の頻度の高さについては、本遺伝子治療では解決策を見出せる可能性がある。その他にも、特に高リスク造血器悪性腫瘍患者を対象とする場合には、GVM 効果を有することやドナーリンパ球輸注が可能であることは重要であると考えられる。臍帯血移植と比較すると本遺伝子治療では GVM 効果の発現が早期に期待できると考えられ、かつ状況に応じてドナーリンパ球輸注が実施可能であり、これらの点においても本遺伝子治療は有効な治療となりうる。

以上から、臍帯血移植と本遺伝子治療を比較した場合、本遺伝子治療は悪性度の高い疾患において、臍帯血移植を凌駕する可能性のある治療法になりうると考えられる。

ドナーの負担という点では、本遺伝子治療の個々の症例への適応については、治療効果や得られる利益等について慎重かつじゅうぶんな検討が必要である。しかしながら、本遺伝子治療は、一連の治療法の課題に対する解決策を模索した上で計画されたものであり、これまでの臨床実績からも安全性及び有効性が見込まれるものとして妥当な手法と考え選択した。

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 Δ LNGFR 遺伝子と HSV-TK 遺伝子である。導入されるが発現しないベクターDNA等の構造と性質は、VI. 5「ウイルスベクター^{*9}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 細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体遺伝子 (Δ LNGFR 遺伝子)

Δ LNGFR 遺伝子は、細胞内領域欠損ヒト低親和性神経成長因子受容体 (truncated low-affinity nerve growth factor receptor: Δ LNGFR) をコードする遺伝子である(43-45)。ヒト低親和性神経成長因子受容体 (human low affinity nerve growth factor receptor: LNGFR) 遺伝子は、1986年 Johnsonらによってヒトメラノーマ細胞株 A875 から単離され(43)、427 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1, 281 塩基対と終止コドン TAG より成り立っている。N 末端から、28 アミノ酸からなるシグナルペプチド、細胞外ドメインとして 6 個のシステイン残基を保存位置とする 40 アミノ酸からなるポリペプチドの 4 回繰り返し配列、セリン/スレオニンリッチ領域、1 回膜貫通領域、及び 155 アミノ酸を有する細胞内領域という構造からなっている。今回使用する Δ LNGFR 遺伝子は、LNGFR 遺伝子の cDNA から細胞内領域をコードする塩基対を除去したもので、翻訳開始コドン ATG の上流に 113 塩基対の非翻訳領域を有し、細胞外ドメイン及び細胞膜貫通領域の 280 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 956 塩基対の遺伝子である。図 10 に Δ LNGFR 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。下線部分が細胞内領域の変更部位である。

LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA	
Δ LNGFR	GCCGCGGCCAGCTCCGGCGGGCAGGGGGGGCGCTGGAGCGCAGCGCA	
LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG	
Δ LNGFR	GCGCAGCCCCATCAGTCCGCAAAGCGGACCGAGCTGGAAGTCGAGCG	
LNGFR	CTGCCGCGGGAGGCGGGCG	M G A G A T G R 8 AA
Δ LNGFR	CTGCCGCGGGAGGCGGGCG	ATG GGG GCA GGT GCC ACC GGC CGC 137 b
		M G A G A T G R 8 AA
LNGFR	A M D G P R L L L L L L L G V	23 AA
Δ LNGFR	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG	182 b
	GCC ATG GAC GGG CCG CGC CTG CTG CTG TTG CTG CTT CTG GGG GTG	182 b
	A M D G P R L L L L L L L G V	23 AA
LNGFR	S L G G A K E A C P T G L Y T	38 AA
Δ LNGFR	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA	227 b
	TCC CTT GGA GGT GCC AAG GAG GCA TGC CCC ACA GGC CTG TAC ACA	227 b
	S L G G A K E A C P T G L Y T	38 AA
LNGFR	H S G E C C K A C N L G E G V	53 AA
Δ LNGFR	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG	272 b
	CAC AGC GGT GAG TGC TGC AAA GCC TGC AAC CTG GGC GAG GGT GTG	272 b
	H S G E C C K A C N L G E G V	53 AA
LNGFR	A Q P C G A N Q T V C E P C L	68 AA
Δ LNGFR	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG	317 b
	GCC CAG CCT TGT GGA GCC AAC CAG ACC GTG TGT GAG CCC TGC CTG	317 b
	A Q P C G A N Q T V C E P C L	68 AA
LNGFR	D S V T F S D V V S A T E P C	83 AA
Δ LNGFR	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC	362 b
	GAC AGC GTG ACG TTC TCC GAC GTG GTG AGC GCG ACC GAG CCG TGC	362 b
	D S V T F S D V V S A T E P C	83 AA
LNGFR	K P C T E C V G L Q S M S A P	98 AA
Δ LNGFR	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG	407 b
	AAG CCG TGC ACC GAG TGC GTG GGG CTC CAG AGC ATG TCG GCG CCG	407 b
	K P C T E C V G L Q S M S A P	98 AA
LNGFR	C V E A D D A V C R C A Y G Y	113 AA
Δ LNGFR	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC	452 b
	TGC GTG GAG GCC GAC GAC GCC GTG TGC CGC TGC GCC TAC GGC TAC	452 b
	C V E A D D A V C R C A Y G Y	113 AA
LNGFR	Y Q D E T T G R C E A C R V C	128 AA
Δ LNGFR	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC	497 b
	TAC CAG GAT GAG ACG ACT GGG CGC TGC GAG GCG TGC CGC GTG TGC	497 b
	Y Q D E T T G R C E A C R V C	128 AA
LNGFR	E A G S G L V F S C Q D K Q N	143 AA
Δ LNGFR	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC	542 b
	GAG GCG GGC TCG GGC CTC GTG TTC TCC TGC CAG GAC AAG CAG AAC	542 b
	E A G S G L V F S C Q D K Q N	143 AA

		T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA
	LNGFR	ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b
Δ	LNGFR	ACC	GTG	TGC	GAG	GAG	TGC	CCC	GAC	GGC	ACG	TAT	TCC	GAC	GAG	GCC	587 b
		T	V	C	E	E	C	P	D	G	T	Y	S	D	E	A	158 AA
		N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA
	LNGFR	AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b
Δ	LNGFR	AAC	CAC	GTG	GAC	CCG	TGC	CTG	CCC	TGC	ACC	GTG	TGC	GAG	GAC	ACC	632 b
		N	H	V	D	P	C	L	P	C	T	V	C	E	D	T	173 AA
		E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA
	LNGFR	GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b
Δ	LNGFR	GAG	CGC	CAG	CTC	CGC	GAG	TGC	ACA	CGC	TGG	GCC	GAC	GCC	GAG	TGC	677 b
		E	R	Q	L	R	E	C	T	R	W	A	D	A	E	C	188 AA
		E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA
	LNGFR	GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b
Δ	LNGFR	GAG	GAG	ATC	CCT	GGC	CGT	TGG	ATT	ACA	CGG	TCC	ACA	CCC	CCA	GAG	722 b
		E	E	I	P	G	R	W	I	T	R	S	T	P	P	E	203 AA
		G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA
	LNGFR	GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b
Δ	LNGFR	GGC	TCG	GAC	AGC	ACA	GCC	CCC	AGC	ACC	CAG	GAG	CCT	GAG	GCA	CCT	767 b
		G	S	D	S	T	A	P	S	T	Q	E	P	E	A	P	218 AA
		P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA
	LNGFR	CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b
Δ	LNGFR	CCA	GAA	CAA	GAC	CTC	ATA	GCC	AGC	ACG	GTG	GCA	GGT	GTG	GTG	ACC	812 b
		P	E	Q	D	L	I	A	S	T	V	A	G	V	V	T	233 AA
		T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA
	LNGFR	ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b
Δ	LNGFR	ACA	GTG	ATG	GGC	AGC	TCC	CAG	CCC	GTG	GTG	ACC	CGA	GGC	ACC	ACC	857 b
		T	V	M	G	S	S	Q	P	V	V	T	R	G	T	T	248 AA
		D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA
	LNGFR	GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b
Δ	LNGFR	GAC	AAC	CTC	ATC	CCT	GTC	TAT	TGC	TCC	ATC	CTG	GCT	GCT	GTG	GTT	902 b
		D	N	L	I	P	V	Y	C	S	I	L	A	A	V	V	263 AA
		細胞外領域 ← → 1回膜貫通領域 ← → 細胞内領域 Pvu II (CAGCTG)															
		V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	S	C	278 AA
	LNGFR	GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGC	TGC	947 b
Δ	LNGFR	GTG	GGC	CTT	GTG	GCC	TAC	ATA	GCC	TTC	AAG	AGG	TGG	AAC	AGG	GGG	947 b
		V	G	L	V	A	Y	I	A	F	K	R	W	N	<u>R</u>	<u>G</u>	278 AA
		K	Q	N	K	Q	G	A	N	S	R	P	V	N	Q	T	293 AA
	LNGFR	AAG	CAG	AAC	AAG	CAA	GGA	GCC	AAC	AGC	CGG	CCA	GTG	AAC	CAG	ACG	992 b
Δ	LNGFR	<u>ATC</u>	<u>CTC</u>	<u>TAG</u>													956 b
		<u>I</u>	<u>L</u>	<u>*</u>													280 AA
		P	P	P	E	G	E	K	L	H	S	D	S	G	I	S	308 AA
	LNGFR	CCC	CCA	CCA	GAG	GGA	GAA	AAA	CTC	CAC	AGC	GAC	AGT	GGC	ATC	TCC	1037 b
		V	D	S	Q	S	L	H	D	Q	Q	P	H	T	Q	T	323 AA
	LNGFR	GTG	GAC	AGC	CAG	AGC	CTG	CAT	GAC	CAG	CAG	CCC	CAC	ACG	CAG	ACA	1082 b

LNGFR	A	S	G	Q	A	L	K	G	D	G	G	L	Y	S	S	338 AA
	GCC	TCG	GGC	CAG	GCC	CTC	AAG	GGT	GAC	GGA	GGC	CTC	TAC	AGC	AGC	1127 b
LNGFR	L	P	P	A	K	R	E	E	V	E	K	L	L	N	G	353 AA
	CTG	CCC	CCA	GCC	AAG	CGG	GAG	GAG	GTG	GAG	AAG	CTT	CTC	AAC	GGC	1172 b
LNGFR	S	A	G	D	T	W	R	H	L	A	G	E	L	G	Y	368 AA
	TCT	GCG	GGG	GAC	ACC	TGG	CGG	CAC	CTG	GCG	GGC	GAG	CTG	GGC	TAC	1217 b
LNGFR	Q	P	E	H	I	D	S	F	T	H	E	A	C	P	V	383 AA
	CAG	CCC	GAG	CAC	ATA	GAC	TCC	TTT	ACC	CAT	GAG	GCC	TGC	CCC	GTT	1262 b
LNGFR	R	A	L	L	A	S	W	A	T	Q	D	S	A	T	L	398 AA
	CGC	GCC	CTG	CTT	GCA	AGC	TGG	GCC	ACC	CAG	GAC	AGC	GCC	ACA	CTG	1307 b
LNGFR	D	A	L	L	A	A	L	R	R	I	Q	R	A	D	L	413 AA
	GAC	GCC	CTC	CTG	GCC	GCC	CTG	CGC	CGC	ATC	CAG	CGA	GCC	GAC	CTC	1352 b
LNGFR	V	E	S	L	C	S	E	S	T	A	T	S	P	V	*	427 AA
	GTG	GAG	AGT	CTG	TGC	AGT	GAG	TCC	ACT	GCC	ACA	TCC	CCG	GTG	TGA	1397 b

図 10 LNGFR 遺伝子と ΔLNGFR 遺伝子の塩基配列比較

下線部分は細胞内領域の変更部位

VI. 1. 1. 2 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-TK 遺伝子)

HSV-TK 遺伝子は、単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジンキナーゼ (herpes simplex virus 1-thymidine kinase: HSV-TK) をコードする遺伝子であり、1981 年、Wagner MJ らによりヒト単純ヘルペス 1 型の CL101 株由来の遺伝子配列が明らかにされた(46)。単一エクソンからなり、翻訳開始コドン ATG の上流に 107 塩基対の非翻訳領域を有し、376 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 1,128 塩基対と TAG を終止コドンとする 1,131 塩基対で構成されている。今回使用する HSV-TK 遺伝子は、CL101 株の DNA を BamH I と EcoR I で処理した後平滑末端化して LXS の Hpa I サイトにクローニングされた 1,128 塩基対を含む 1,131 塩基対の遺伝子であり、翻訳開始コドン ATG の上流に 14 塩基対の非翻訳領域を有する。図 11 に HSV-TK 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

GATCCGCCGCCACC	ATG	GCT	TCG	TAC	CCC	TGC	CAT	CAA	CAC	GCG	TCT	47
	M	A	S	Y	P	C	H	Q	H	A	S	
GCG TTC GAC CAG GCT GCG CGT TCT CGC GGC CAT AGC AAC CGA CGT	92											
A F D Q A A R S R G H S N R R												
ACG GCG TTG CGC CCT CGC CGG CAG CAA GAA GCC ACG GAA GTC CGC	137											
T A L R P R R Q Q E A T E V R												
CTG GAG CAG AAA ATG CCC ACG CTA CTG CGG GTT TAT ATA GAC GGT	182											
L E Q K M P T L L R V Y I D G												
CCT CAC GGG ATG GGG AAA ACC ACC ACC ACG CAA CTG CTG GTG GCC	227											
P H G M G K T T T T Q L L V A												
CTG GGT TCG CGC GAC GAT ATC GTC TAC GTA CCC GAG CCG ATG ACT	272											
L G S R D D I V Y V P E P M T												
TAC TGG CAG GTG CTG GGG GCT TCC GAG ACA ATC GCG AAC ATC TAC	317											
Y W Q V L G A S E T I A N I Y												
ACC ACA CAA CAC CGC CTC GAC CAG GGT GAG ATA TCG GCC GGG GAC	362											
T T Q H R L D Q G E I S A G D												
GCG GCG GTG GTA ATG ACA AGC GCC CAG ATA ACA ATG GGC ATG CCT	407											
A A V V M T S A Q I T M G M P												
TAT GCC GTG ACC GAC GCC GTT CTG GCT CCT CAT GTC GGG GGG GAG	452											
Y A V T D A V L A P H V G G E												
GCT GGG AGT TCA CAT GCC CGG CCC CCG GCC CTC ACC CTC ATC TTC	497											
A G S S H A P P P A L T L I F												
GAC CGC CAT CCC ATC GCC GCC CTC CTG TGC TAC CCG GCC GCG CGA	542											
D R H P I A A L L C Y P A A R												
TAC CTT ATG GGC AGC ATG ACC CCC CAG GCC GTG CTG GCG TTC GTG	587											
Y L M G S M T P Q A V L A F V												
GCC CTC ATC CCG CCG ACC TTG CCC GGC ACA AAC ATC GTG TTG GGG	632											
A L I P P T L P G T N I V L G												
GCC CTT CCG GAG GAC AGA CAC ATC GAC CGC CTG GCC AAA CGC CAG	677											
A L P E D R H I D R L A K R Q												
CGC CCC GGC GAG CGG CTT GAC CTG GCT ATG CTG GCC GCG ATT CGC	722											
R P G E R L D L A M L A A I R												
CGC GTT TAC GGG CTG CTT GCC AAT ACG GTG CGG TAT CTG CAG GGC	767											
R V Y G L L A N T V R Y L Q G												
GGC GGG TCG TGG TGG GAG GAT TGG GGA CAG CTT TCG GGG ACG GCC	812											
G G S W W E D W G Q L S G T A												
GTG CCG CCC CAG GGT GCC GAG CCC CAG AGC AAC GCG GGC CCA CGA	857											
V P P Q G A E P Q S N A G P R												
CCC CAT ATC GGG GAC ACG TTA TTT ACC CTG TTT CGG GCC CCC GAG	902											
P H I G D T L F T L F R A P E												
TTG CTG GCC CCC AAC GGC GAC CTG TAT AAC GTG TTT GCC TGG GCC	947											
L L A P N G D L Y N V F A W A												
TTG GAC GTC TTG GCC AAA CGC CTC CGT CCC ATG CAC GTC TTT ATC	992											
L D V L A K R L R P M H V F I												
CTG GAT TAC GAC CAA TCG CCC GCC GGC TGC CGG GAC GCC CTG CTG	1037											
L D Y D Q S P A G C R D A L L												
CAA CTT ACC TCC GGG ATG GTC CAG ACC CAC GTC ACC ACC CCA GGC	1082											
Q L T S G M V Q T H V T T P G												
TCC ATA CCG ACG ATC TGC GAC CTG GCG CGC ACG TTT GCC CGG GAG	1127											
S I P T I C D L A R T F A R E												
ATG GGG GAG GCT AAC TGA 1145												
M G E A N *												

図 11 HSV-TK 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

LNGFR は主に神経系細胞に発現する膜貫通型の神経成長因子 (nerve growth factor: NGF) に対する受容体で、神経細胞以外では筋肉、精巣で発現しているが、ほとんどの造血系細胞には発現していない(47)。現在、tropomyosin-related kinase (Trk) と結合することで高親和性の神経成長因子受容体を形成すると報告されており、LNGFR 単独では NGF の刺激を細胞内に伝播することはない(48)。

HSV-TK はウイルス特有のチミジンキナーゼで、ヒト細胞が有するチミジンキナーゼとは異なった基質特異性を有し、グアノシンの類似物質である ACV や GCV をリン酸化することが可能である(49, 50)。ACV や GCV は生物活性が低いプロドラッグ (prodrug) と呼ばれ、HSV-TK を発現していない細胞に対しては何ら毒性を示さないが、ウイルス感染等により HSV-TK が発現している細胞では ACV や GCV がリン酸化され、最終的に細胞を死に至らしめる。このように HSV-TK は ACV や GCV との組み合わせにより生物活性を示す特異な酵素である。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、標的細胞上の受容体にウイルス粒子の外皮表面に存在するエンベロープが結合することにより、ウイルスと細胞の膜融合が起こり、ウイルスゲノム RNA 及び逆転写酵素等のウイルスの感染に必要な酵素が細胞内へ侵入する。細胞内に入った後、逆転写酵素によってウイルスゲノム RNA から 2 本鎖 DNA が合成され、核内に移行する。5' -LTR と 3' -LTR ではさまれた DNA はウイルスが持っているインテグラーゼによって細胞染色体に組み込まれ (プロウイルス)、細胞ゲノムの複製に伴って複製されて安定的に娘細胞へ受け継がれる。このために継続的な遺伝子発現が可能である。

細胞染色体に組み込まれた Δ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 遺伝子は、SFCMM-3 内部のプロモーターである SV40 初期プロモーター及びウイルス末端反復配列 (long terminal repeat: LTR) プロモーターによってそれぞれ発現し、その発現はいずれも持続的である。

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

VI. 1.3.1 Δ LNGFR の生物活性

Δ LNGFR は、細胞内領域のほとんど (LNGFR の第 277 アミノ酸から最終第 427 アミノ酸まで) が除去されているため、シグナルを細胞内に伝達することはない。in vitro 及び in vivo において、 Δ LNGFR の機能活性は観察されず(45)、また Bonini C らの報告(51)により、本研究で用いるレトロウイルスベクター-SFCMM-3 と同じ Δ LNGFR 遺伝子を別のレトロウイルスベクター-SFCMM-2 により活性化ヒト T リンパ球に導入し、NGF 濃度依存的な、i) 細胞増殖、ii) CD25 発現、及び iii) 腫瘍壊死因子 (TNF) - α 産生による細胞傷害活性を経時的に調査した結果、遺伝子導入ヒトリンパ球は、遺伝子非導入ヒトリンパ球と同様に、NGF に対する反応を示さないことが確認された。なお、 Δ LNGFR 遺伝子が導入される T リンパ球は、通常、LNGFR を殆ど発現していないことが確認されている(45)。

Δ LNGFR は細胞膜でたん白発現するため細胞表面マーカーとして利用され、特異的抗体を用いて in vitro で発現細胞を迅速に分離することができ、ex vivo での発現細胞の検出や

生存状態、増殖状態等のキャラクタリゼーションを行うことができる。

VI. 1. 3. 2 HSV-TK の生物活性

HSV-TK は 376 アミノ酸からなるたん白質であり、本剤により遺伝子導入した細胞において自殺遺伝子産物として機能する。自殺遺伝子が導入された細胞では、その遺伝子産物により非毒性のプロドラッグが毒性型ドラッグに変換され、細胞が傷害を受ける。HSV-TK はガンシクロビル (GCV) をリン酸化することにより GCV 一リン酸を生成し、GCV 一リン酸は細胞由来のキナーゼにより GCV 三リン酸に変換される。GCV 三リン酸は dGTP に代わって合成中の DNA に取り込まれることにより DNA 合成を阻害し、細胞は死に至る (52)。ほ乳類のチミジンキナーゼで GCV はリン酸化されないが、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞では GCV 三リン酸が生成するので、HSV-TK 遺伝子導入細胞は *in vitro* 及び *in vivo* で選択的に死滅させることができる (53, 54)。

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

移植片対悪性腫瘍 (graft-versus-malignancy: GVM) 効果を担う免疫担当細胞がドナー由来の T リンパ球であることが多くの実験から支持されている一方、当該細胞が GVHD の原因となることが知られている。T リンパ球は組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) の存在下で培養可能であり、抗 CD3 抗体の刺激により活性化され、活発な増殖を開始する。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入は増殖中の細胞を標的としており、活性化された T リンパ球に対しても高い遺伝子導入効率が得られることが過去の臨床研究により証明されている (55, 56)。したがって、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を用いた遺伝子治療においては、ドナーリンパ球を rhIL-2 存在下、抗 CD3 抗体で刺激することにより得られる活性化 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

ドナー末梢血リンパ球への Δ LNGFR 及び HSV-TK 遺伝子の導入は、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 を含むウイルス産生細胞の培養上清中にドナー末梢血リンパ球を加え、遠心することで行う。遺伝子導入工程を含む遺伝子導入細胞の調製方法の詳細を VII. 3. 1 「遺伝子導入細胞の調製方法」に記載する。

VI. 4. 2 当該導入法を選択した理由

ドナー末梢血 T リンパ球への Δ LNGFR 遺伝子及び HSV-TK 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理由は、レトロウイルスベクターは感染後細胞染色体に組み込まれて細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、長期にわたり導入遺伝子を安定して発現することができること、多くのモロニーマウス白血病ウイルス (Moloney murine leukemia virus: 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いること (55-59)、及び末梢血 T リンパ球がレトロウイルスベクターにより効率よく遺伝子導入されることである。また安全性に関して、CD34 陽性細胞を標的とした X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) の遺伝子治療では白血病発症の報告がされているが、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 (55-58, 60)。

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 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、Naked DNA が細胞染色体に組み込まれる確率は $1.5 / 1 \times 10^4$ (61) 又は $1 / 1 \times 10^4$ (62) 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 (63)。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、導入遺伝子はすべて細胞染色体に組み込まれている。例えば、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 (64)、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-SFCMM-3 を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、基になる SFCMM-3 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もしくは一部を欠如しており、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^{*10} 株 GP+envAm12 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。本パッケージング細胞株は、gag、pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターを用いて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 (65)。

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-SFCMM-3 のもと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 (66, 67)。

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。オンコウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、がんであり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経好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 SFCMM-3 DNA ベクターの構築

本臨床研究で用いられる SFCMM-3 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。すなわち、ベースとなるレトロウイルスベクターは pLXSN(68) で、その遺伝子概略を図 12 に示す。

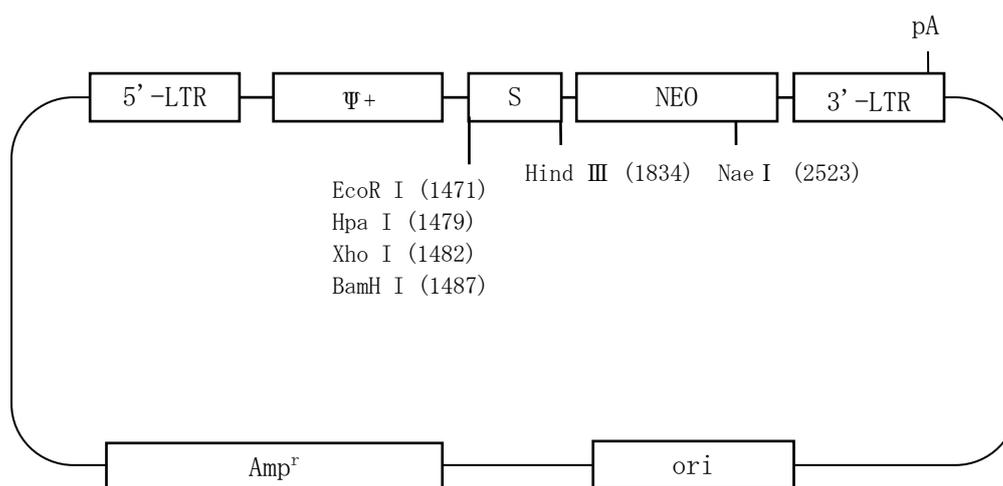


図 12 pLXSN の遺伝子構造の概略

LTR: Long Terminal Repeat、Ψ+: パッケージングシグナル、S: SV40 初期プロモーター、NEO: ネオマイシン耐性遺伝子、pA: poly A 付加シグナル

このベクターから制限酵素 Hind III と Nae I を用いてネオマイシン耐性遺伝子 (NEO) の配列を取り除き、SV40 初期プロモーターの下流に Δ LNGFR 遺伝子を組み込み、さらに制限酵素 Hpa I で切断して HSV-TK 遺伝子を組み込んだものが SFCMM-3 DNA ベクターである。その遺伝子概略を図 13 に示す。SFCMM-3 DNA ベクターにおいて、LXSN 由来の配列部分は、5' -LTR 及び、パッケージングシグナル、SV40 初期プロモーター、3' -LTR、poly A 付加シグナルである。SFCMM-3 DNA ベクター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 ベクターのみ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。

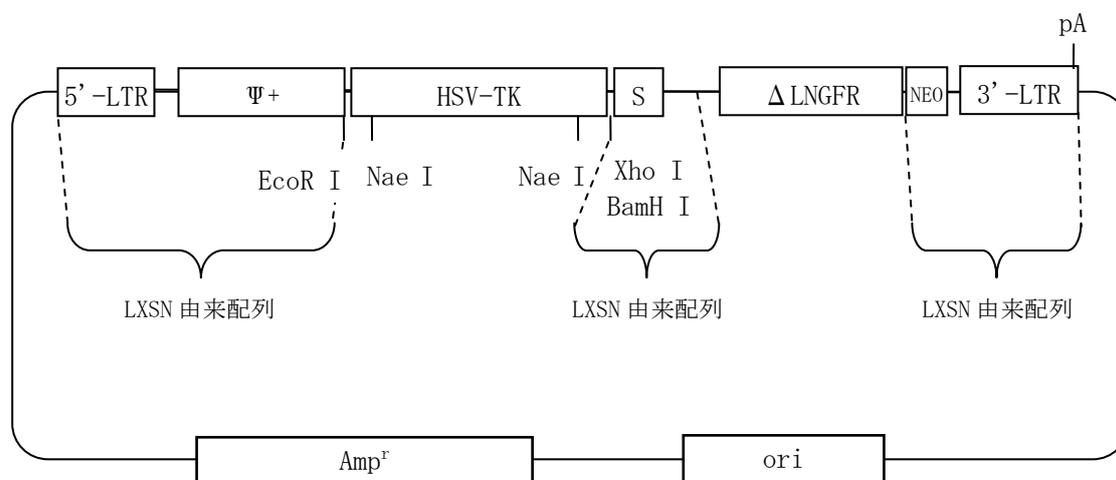


図 13 SFCMM-3 DNA ベクターの遺伝子構造の概略

配列名	塩基数	由来
5' -LTR : 5' -Long Terminal Repeat	(1 - 594)	MoMSV
Ψ+ : パッケージングシグナル	(664 - 1473)	MoMSV、 MoMLV
HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型一チミジンキナーゼ遺伝子	(1498 - 2628)	HSV
S : SV40 初期プロモーター	(2636 - 2992)	SV40
Δ LNGFR : 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子	(3113 - 3955)	ヒト
NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部	(3960 - 4123)	大腸菌
3' -LTR : 3' -Long Terminal Repeat	(4183 - 4776)	MoMLV
pA : poly A 付加シグナル	(4678)	MoMLV

VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築

SFCMM-3 DNA ベクターは、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、このベクターDNA のみでは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、GP+envAm12 (ATCC CRL-9641) (65) 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 (ひとつは gag と pol で、もうひとつは 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。

以下にパッケージング細胞株 GP+envAm12 (Am12) 及び GP+E-86 (69) 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と 3' -LTR を持たないプラスミド pgag-polgpt を、マウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 にエレクトロポレーション法にてトランスフェクションし、薬剤 (Hypoxanthine、Xanthine、Mycophenolic acid) で遺伝子導入細胞を選択した。
- 2) 選択した細胞株に、マウスアンフォトロピックウイルス*114070A 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 penvAm、及び Hygromycin 耐性遺伝子を持つプラスミド pRSVhyg を共にトランスフェクションし、Hygromycin B で env 遺伝子導入細胞を選択する。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 を産生しないアンフォトロピック (ヒトを含む多くの哺乳類に感染性を有する) パッケージング細胞株 Am12 を樹立した。
- 3) 前述の pgag-polgpt と、MoMLV の env を発現するプラスミド pEnv を NIH 3T3 細胞に導入することにより、エコトロピック (マウス細胞にのみ感染性を有する) パッケージング細胞株 GP+E-86 (ATCC CRL-9642) を構築した。

VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築

パッケージング細胞 GP+E-86 に SFCMM-3 DNA ベクターをトランスフェクションし、48 時間後の培養上清を回収した。この培養上清には、効率よく Am12 に感染するレトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 が含まれる。回収した上清をアンフォトロピックパッケージング細胞株 Am12 に感染させることにより、安定なレトロウイルスベクター-SFCMM-3 産生細胞が構築され、ヒトを含む多くの哺乳類細胞に感染可能なアンフォトロピックレトロウイルスベクターが産生される。

レトロウイルスベクターエコトロピック SFCMM-3 感染 Am12 細胞から、良好な生育性と T リンパ球への高い遺伝子導入効率を示すクローンを得た。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-SFCMM-3 の製造

本遺伝子治療臨床研究において使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 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）〕を培養し、その上清中にウイルス粒子の状態が存在する。

製造は全てモルメド社の管理された製造エリアにて 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-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略を図 14 に、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 DNA の全塩基配列を図 15 に示す。HSV-TK は 5' -LTR により、 Δ LNGFR は内在性プロモーターである SV40 初期プロモーターにより転写が誘導される。SFCMM-3 はパッケージングシグナルとして Ψ^+ を有し、gag、pol、env をコードする遺伝子は除かれている。



図 14 レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子構造の概略

5' : 5' -LTR、 Ψ^+ : パッケージングシグナル、S : SV40 初期プロモーター、HSV-TK : 単純ヘルペスウイルス 1 型-チミジinkinナーゼ遺伝子、 Δ LNGFR : 細胞内領域欠損 LNGFR 遺伝子、NEO : ネオマイシン耐性遺伝子の一部、3' : 3' -LTR

LTR	
AATGAAAGAC CCCACCTGTA GGTTTGGCAA GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC	60
ATGGA AAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA AGGTCAGGAA CAGATGGAAC	120
AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGGCC	180
AAGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC AACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG	240
CCCCGGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGTCC CCAGATGCGG TCCAGCCCTC AGCAGTTTCT	300
AGAGAACCAT CAGATGTTC CAGGGTGCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT	360
TGAACTAACC AATCAGTTCG CTTCTCGCTT CTGTTCGCGC GCTTCTGCTC CCCGAGCTCA	420
ATAAAAGAGC CCACAACCCC TCACTCGGGG CGCCAGTCTT CCGATAGACT GCGTCGCCCG	480
GGTACCCGTA TTCCAATAA AGCCTCTGC TGTTCATC CGAATCGTGG TCTCGCTGTT	540
CCTTGGGAGG GTCTCCTCTG AGTGATTGAC TACCCACGAC GGGGGTCTT CATTGGGGG	600
LTR	
CTCGTCCGGG ATTTGGAGAC CCCTGCCAG GGACCACCGA CCCACCACCG GGAGGTAAGC	660
Ψ+	
TGCCAGCAA CTTATCTGTG TCTGTCCGAT TGTCTAGTGT CTATGTTGA TGTTATGCGC	720
CTGCGTCTGT ACTAGTTAGC TAACTAGCTC TGTATCTGGC GGACCCGTGG TGGAAGTAC	780
GAGTCTGAA CACCCGGCCG CAACCCTGGG AGACGTCCA GGGACTTTGG GGGCCGTTTT	840
TGTGGCCCGA CCTGAGGAAG GGAGTCGATG TGGAATCCGA CCCGTCAGG ATATGTGGTT	900
CTGGTAGGAG ACGAGAACCT AAAACAGTTC CCGCTCCGT CTGAATTTT GCTTTCGGTT	960
TGGAACCGAA GCCGCGCTC TTGTCTGCTG CAGCGCTGCA GCATCGTTCT GTGTTGCTC	1020
TGCTGACTG TGTTTCTGTA TTTGTCTGAA AATTAGGGCC AGACTGTTAC CACTCCCTTA	1080

AGTTTGACCT TAGGTCACCTG GAAAGATGTC GAGCGGATCG CTCACAACCA GTCGGTAGAT	1140
GTCAGAAGA GACGTTGGGT TACCTTCTGC TCTGCAGAAT GGCCAACCTT TAACGTCGGA	1200
TGGCCGCGAG ACGGCACCTT TAACCGAGAC CTCATCACCC AGGTTAAGAT CAAGGTCTTT	1260
TCACCTGGCC CGCATGGACA CCCAGACCAG GTCCCCTACA TCGTGACCTG GGAAGCCTTG	1320
GCTTTTGACC CCCCTCCCTG GGTCAAGCCC TTTGTACACC CTAAGCCTCC GCCTCCTCTT	1380
CCTCCATCCG CCCCGTCTCT CCCCTTGAA CCTCCTCGTT CGACCCCGCC TCGATCCTCC	1440
CTTATCCAG CCCTCACTCC TTCTCTAGGC GCGGAATTC GTTGATCCGC CGCCACCATG	1500
GCTTCGTACC CCTGCCATCA ACACGGTCT GCGTTCGACC AGGCTGCGCG TTCTCGGGC	1560
CATAGCAACC GACGTACGGC GTTGCGCCCT CGCCGGCAGC AAGAAGCCAC GGAAGTCCGC	1620
CTGGAGCAGA AAATGCCAC GCTACTGCGG GTTATATAG ACGGTCCTCA CGGGATGGGG	1680
AAAACCACCA CCACGCAACT GCTGGTGCC CTGGGTTTCG GCGACGATAT CGTCTACGTA	1740
CCCAGCCGA TGACTIONTCTG GCAGGTGCTG GGGGCTTCCG AGACAATCGC GAACATCTAC	1800
ACCACACAAC ACCGCTCGA CCAGGTGAG ATATCGGCCG GGGACGCGGC GGTGGTAATG	1860
ACAAGCGCCC AGATAACAAT GGGCATGCCT TATGCCGTGA CCGACGCCGT TCTGGCTCCT	1920
CATGTCGGGG GGGAGGCTGG GAGTTCACAT GCCCGCCCC CGGCCCTCAC CCTCATCTTC	1980
GACCGCCATC CCATCGCCGC CTCCTGTGC TACCCGGCCG CGGATACTT TATGGGCAGC	2040
ATGACCCCC AGGCCGTGCT GCGTTCGTG GCCCTCATCC CGCCGACCTT GCCCGGCACA	2100
AACATCGTGT TGGGGGCCCT TCCGGAGGAC AGACACATCG ACCGCCTGGC CAAACGCCAG	2160

$\Psi +$

HSV-TK

CGCCCCGGCG AGCGGCTTGA CCTGGCTATG CTGGCCGCGA TTCGCCGCGT TTACGGGCTG	2220
CTTGCCAATA CGGTGCGGTA TCTGCAGGGC GGCGGGTCGT GGTGGGAGGA TTGGGGACAG	2280
CTTTCGGGGA CGGCCGTGCC GCCCCAGGGT GCCGAGCCCC AGAGCAACGC GGGCCCACGA	2340
CCCCATATCG GGGACACGTT ATTTACCCTG TTTCGGGCCC CCGAGTTGCT GGCCCCAAC	2400
GGCGACCTGT ATAACGTGTT TGCCTGGGCC TTGGACGTCT TGGCCAAACG CCTCCGTCCC	2460
ATGCACGTCT TTATCCTGGA TTACGACCAA TCGCCGCGG GCTGCCGGA CGCCCTGCTG	2520
CAACTTACCT CCGGGATGGT CCAGACCCAC GTCACCACCC CAGGCTCCAT ACCGACGATC	2580
TGCGACCTGG CGCGCACGTT TGCCCGGGAG ATGGGGGAGG CTAAGTGA ATTAACTCGA	2640
HSV-TK	
<u>GGATCCGGCT GTGGAATGTG TGTCAGTTAG GGTGTGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG</u>	2700
<u>GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG</u>	2760
<u>GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC</u>	2820
<u>CGCCCCTAAC TCCGCCATC CCGCCCCTAA CTCGCCCAG TTCCGCCAT TCTCCGCC</u>	2880
<u>ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCGGCC TCTGAGCTAT</u>	2940
<u>TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTGTGGAG GCCTAGGCTT TGCAAAAAG CTAATTCGGG</u>	3000
CCGCGGCCAG CTCCGGCGGG CAGGGGGGGC GCTGGAGCGC AGCGCAGCGC AGCCCCATCA	3060
GTCCGCAAAG CGGACCGAGC TGGAAGTCGA GCGCTGCCG GGGAGGCGGG CGATGGGGGC	3120
Δ LNGFR	
AGGTGCCACC GGCCGCGCCA TGGACGGGCC GCGCTGCTG CTGTTGCTGC TTCTGGGGGT	3180
GTCCCTTGA GGTGCCAAGG AGGCATGCC CACAGGCTG TACACACACA GCGGTGAGTG	3240

CTGCAAAGCC TGCAACCTGG GCGAGGGTGT GGCCAGCCT TGTGGAGCCA ACCAGACCGT	3300
GTGTGAGCCC TGCCTGGACA GCGTGACGTT CTCCGACGTG GTGAGCGCGA CCGAGCCGTG	3360
CAAGCCGTGC ACCGAGTGCG TGGGGCTCCA GAGCATGTCT GCGCCGTGCG TGGAGGCCGA	3420
CGACGCCGTG TGCCGCTGCG CCTACGGCTA CTACCAGGAT GAGACGACTG GGGCTGCGA	3480
GGCGTGCCGC GTGTGCGAGG CGGGCTCGGG CCTCGTGTTT TCCTGCCAGG ACAAGCAGAA	3540
CACCGTGTGC GAGGAGTGCC CCGACGGCAC GTATTCCGAC GAGGCCAACC ACGTGGACCC	3600
GTGCCTGCCC TGCACCGTGT GCGAGGACAC CGAGCGCCAG CTCCGCGAGT GCACACGCTG	3660
GGCCGACGCC GAGTGCAGG AGATCCCTGG CCGTTGATT ACACGGTCCA CACCCCAGA	3720
GGGCTCGGAC AGCACAGCCC CCAGCACCCA GGAGCCTGAG GCACCTCCAG AACAAGACCT	3780
CATAGCCAGC ACGGTGGCAG GTGTGGTGAC CACAGTGATG GGCAGCTCCC AGCCCGTGGT	3840
GACCCGAGGC ACCACCGACA ACCTCATCCC TGTCTATTGC TCCATCCTGG CTGCTGTGGT	3900
TGTGGGCCTT GTGGCTACA TAGCCTCAA GAGGTGGAAC AGGGGGATCC TCTAGAGTCG	3960
Δ LNGFR	
GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA	4020
GCTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTCCT CGTGCTTAC GGTATCGCCG CTCCCATTG	4080
GCAGGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTGA CGAGTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC	4140
GATAAAATAA AAGATTTTAT TTAGTCTCCA GAAAAGGGG GGAATGAAAG ACCCCACCTG	4200
LTR	
TAGTTTGGC AAGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGAAG GCATGGAAAA ATACATAACT	4260
GAGAATAGAG AAGTTCAGAT CAAGTCAGG AACAGATGGA ACAGCTGAAT ATGGGCCAAA	4320

CAGGATATCT GTGGTAAGCA GTTCCTGCCC CGGCTCAGGG CCAAGAACAG ATGGAACAGC	4380
TGAATATGGG CCAAACAGGA TATCTGTGGT AAGCAGTTCC TGCCCCGGCT CAGGGCCAAG	4440
AACAGATGGT CCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT	4500
TCCAGGGTGC CCAAGGACC TGAAATGACC CTGTGCCTTA TTTGAACTAA CCAATCAGTT	4560
CGCTTCTCGC TTCTGTTCGC GCGCTTCTGC TCCCCGAGCT CAATAAAAGA GCCACAACC	4620
CCTCACTCGG GGCGCCAGTC TTCCGATAGA CTGCGTCGCC CGGGTACCCG TATTCCCAAT	4680
AAAGCCTCTT GCTGTTTGCA TCCGAATCGT GGTCTCGCTG TTCCTTGGGA GGGTCTCCTC	4740
TGAGTGATTG ACTACCCACG ACGGGGGTCT TTCATT	4776

LTR

図15 SFCMM-3 DNAの全塩基配列

LXSN と相同な配列を下線で示す。

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 GP+envAm12 は、アンフォトロピック系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。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) と抗 CD3 抗体 (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SFCMM-3 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と言える。

VII. 安全性についての評価

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

ウイルス産生細胞には、セルバンクシステムを使用する。セルバンク作製に使用した培地及び試薬は、組成と品質の確認されたものを使用してしている。また、マスターセルバンク（MCB）は品質試験を行うことにより、バクテリア、真菌、マイコプラズマ及びウイルスの混入がないこと、並びにエコトロピックとアンフォトロピックの RCR が無いことを確認している（MCB 及びワーキングセルバンク（WCB）の品質試験の詳細を参考資料 1 に、MCB、WCB の品質試験項目と保存中の監視計画を参考資料 2 に記載する）。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の製造フローを図 16 に示す。

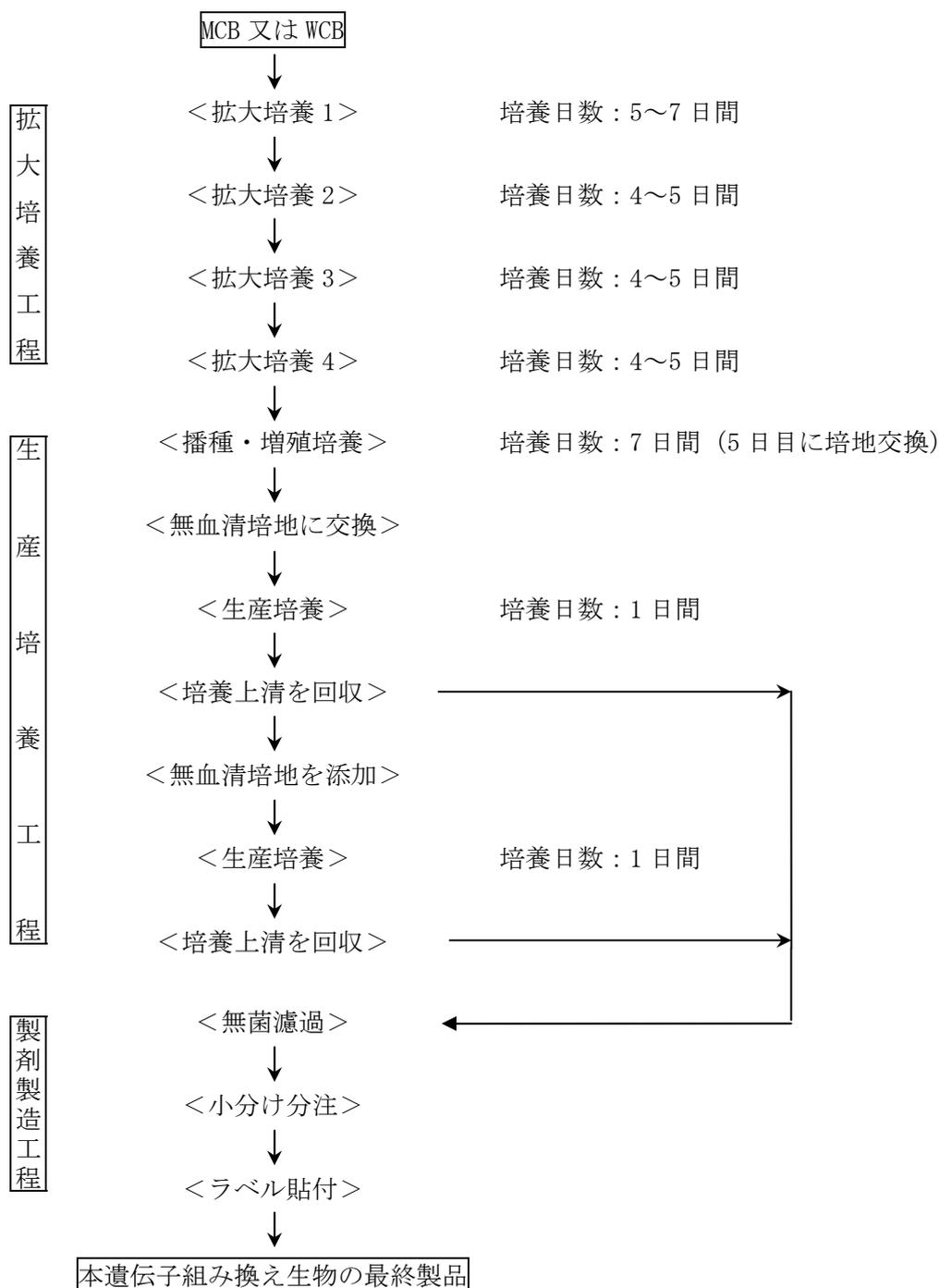


図 16 レトロウイルスベクターSFCMM-3 の製造フロー

レトロウイルスベクターSFCMM-3は、MCB 又は WCB から培養を開始し拡大培養した後、生産培養工程の培養上清に回収される。拡大培養工程及び生産培養工程の播種・増殖培養には10%ウシ胎児血清含有培地を用い、生産培養には無血清培地を用いる。レトロウイルスベクターSFCMM-3の製造に使用する培地及び試薬並びにその規格を参考資料3に記載する。回

収した培養上清は、保管、また精製することなく引き続き製剤製造工程に用いる。製剤は、この培養上清を無菌ろ過した後、規定液量に小分け・ラベル貼付して製造する。製造は、全てモルメド社の管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。製剤は、ロットごとにウイルス安全性を含め品質試験を行う。

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の品質は以下の試験を行うことにより確認する（レトロウイルスベクターの品質試験の詳細を参考資料 4 に記載する）。

1. 無菌試験（欧州薬局方）
2. マイコプラズマ否定試験（欧州薬局方）
3. in vitro ウイルス試験
4. in vivo ウイルス試験
5. RCR 試験
6. エンドトキシン試験（欧州薬局方）
7. 感染効率試験
8. 組み込まれたベクター遺伝子の完全性試験
9. GCV 感受性試験
10. HSV-TK スプライス型否定試験

HSV-TK スプライス型否定試験は、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞において、227 塩基短くなっているスプライス型の HSV-TK 遺伝子を持つものがあり、GCV に対する感受性に影響を与えると報告されていることによる(70)。スプライシングに作用する酵素の基質となりうる潜在的なスプライスサイトが HSV-TK 遺伝子中に予測されており、レトロウイルスベクター-SFCMM-3 により遺伝子導入したヒトリンパ球のゲノム DNA について、このサイトが正常であるものの割合を規格設定している。

本邦での臨床研究に使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 は、上記の品質を有し、感染性因子に対する危険性の低い生物由来成分をはじめとする培地、試薬等を用いていること、及び、モルメド社にて確立した製造方法により製造を行う予定であることから、その品質は、安全性の高いものと考えられる。

VII. 1.2 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与する物質は、HSV-TK 遺伝子導入ドナーT リンパ球及びその懸濁媒である RPMI 1640 及びヒト血清アルブミン含細胞凍害保護液（CP-1）である。ウシ血清は患者にとっての異種たん白質を含有しており抗原性の問題が生じる可能性があるため使用せず、ドナー血漿を培地添加剤として用いる。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-SFCMM-3 懸濁液の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に生理食塩水でじゅうぶんに洗浄されるので、患者に影響を及ぼすことはない

と考えられる。さらに懸濁媒である RPMI 1640 及び CP-1 については、本臨床研究と同様、細胞を凍結保存する目的で造血幹細胞移植等の臨床現場で広く使用されている。これらは医薬品としての承認は得ていないものの、CP-1 は移植用細胞の凍結用に使用され、また RPMI については、公式骨髄バンクレポート中に使用した浮遊液の一つとして記載されている。現時点ではこれらに由来する重篤な有害事象の報告は確認されておらず、本臨床研究における使用に関する安全性についても問題はないと考えられる。

細胞調製終了後、以下の試験を行うことにより品質を担保する。

1. 細胞生存率（トリパンブルー）
2. エンドトキシン試験（日本薬局方）
3. Δ LNGFR 発現試験
4. RCR 試験（RT-PCR 法）
5. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
6. 無菌試験（日本薬局方）
7. 細胞及び上清の RCR 試験（Mus dunni 細胞との共培養後の PG-4 S+L-テスト）
8. マイコプラズマ否定試験（日本薬局方、培養法）
9. GCV 感受性試験
10. IL-2 依存的増殖試験

Ⅶ. 1. 3 増殖性レトロウイルス（RCR）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

本研究で使用するレトロウイルスベクター-SFCMM-3 のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全部、若しくは一部を欠如している。また、用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 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-SFCMM-3 上清の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性の製剤だけを臨床使用する。また、治療開始後には患者末梢血中の RCR を RT-PCR 法により、最終 add-back 後、1 ヶ月後の 14 日目及び 28 日目、3 ヶ月後の 14 日目、6 ヶ月後の 28 日目並びにそれ以後の患者生存期間中は 1 年ごとに測定する。

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たん白質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生産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（ウイルスたん白質をコードする gag、pol、env 遺伝子を含む）をあらかじめ NIH 3T3 細胞に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