

特異的 TCR $\alpha$  鎖及び $\beta$  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-A4<sub>143-151</sub> ペプチド (9 アミノ酸 : NYKRCPVI) を投与し、患者体内での TCR 遺伝子導入リンパ球の活性化 (あるいは増殖) を図る。本臨床研究は、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-A 抗原は食道癌の 39~71% (5, 6) に、MAGE-A4 抗原は 68% (三重大学自験食道癌例) に発現する腫瘍抗原であり、また HLA-A2402 は日本人の約 60% が有する主要組織適合抗原である。MAGE-A4 は癌・精巣抗原 (Cancer-Testis 抗原; CT 抗原) に分類される腫瘍抗原であり、癌組織と精巣においてのみ発現される。TCR 遺伝子導入リンパ球による細胞傷害活性は、遺伝子導入された細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic T lymphocyte : CTL) 表面上の MAGE-A4 特異的 TCR が、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドの複合体を特異的に認識することにより発揮される。なお、精巣細胞は HLA 分子を発現しないため MAGE-A4 抗原を認識する T リンパ球による傷害を受けない。

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。

#### V. 4 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

治療抵抗性食道癌に対する根治療法は現時点では存在せず、栄養管理や QOL 向上のための緩和医療を行っているのが現状である。

食道癌に対する抗癌剤以外の治療として、分子標的治療の開発が期待されている。本邦に多い食道癌と同じ扁平上皮癌である頭頸部癌を適応として、上皮細胞成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor : EGFR) 阻害剤である Cetuximab が、米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) により承認されている。食道癌における EGFR の発現率が頭頸部癌に次いで非常に高いことから (7, 8)、食道癌に対する分子標的治療の開発が期待されているが、臨床研究結果の報告はない。このような現状において、食道癌に発現する腫瘍抗原を標的とした新規治療の開発が期待される。

腫瘍抗原を標的とした免疫療法の 1 つとして、抗腫瘍活性を有する自己 T リンパ球を投与する細胞療法が積極的に研究されており、複数の臨床試験において有効例が報告されている (9-11)。中でも、米国国立衛生研究所 (National Institutes of Health : NIH) の Rosenberg SA らのグループは、転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、体外で増殖させた腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocyte : TIL) を患者に再移入する養子免疫療法を実施し、RECIST ガイドラインによる判定として 51% の腫瘍縮小効果を報告している (11)。

このように、体外で増殖させた腫瘍抗原反応性 T リンパ球の再移入による抗腫瘍効果が報告されているが、投与細胞が体内での腫瘍細胞に対する傷害活性を発揮させるために、

これまで通常  $10^8 \sim 10^{11}$  個の細胞が投与され、生体内での一定期間の維持が確認された(9-12)。このような細胞数を準備するために、これまでは、体外での抗原刺激、オルソクローン OKT3 (Orthoclone OKT3 : OKT3) 及びインターロイキン 2 (interleukin 2 : IL-2) 等を用いて T リンパ球を活性化し、2~3 週間培養して増殖させたものが用いられてきた。投与細胞としては、複数のクローンを含む腫瘍浸潤リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocyte : TIL)、又は患者自己末梢血リンパ球あるいは TIL から樹立された腫瘍抗原反応性 T 細胞クローンが用いられてきた。しかし、これらの方法では患者自身の病態により細胞入手可能例がごく少数に限られ、また、十分量の細胞数を得られない症例もあり、実際の治療応用には多くの制限がある。

これら養子免疫療法における従来の細胞調製法と比較して、本遺伝子治療では、HLA-A2402 陽性患者の T リンパ球に MAGE-A4 特異的 TCR 遺伝子を導入することによって、腫瘍細胞に対する傷害活性を付与するものであり、必要量の MAGE-A4 抗原特異的 T リンパ球を調製することが可能である。実際に、当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが *in vitro* において確認されている(添付資料、38 ページ)。また、免疫不全マウスに MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性のヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な腫瘍径増大の抑制効果が認められた(添付資料、42 ページ)。なお、上記の NIH Rosenberg SA らのグループは、腫瘍抗原 MART-1 特異的 TCR 遺伝子を導入した T リンパ球を投与した臨床試験において、悪性黒色腫患者 17 名中 2 名について転移腫瘍巢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(13)。

以上より、本研究で実施を計画している遺伝子治療は、患者自己末梢血リンパ球から腫瘍傷害性 T リンパ球を大量に調製する方法を基礎としており、将来他の癌種への応用により幅広い患者を対象とすることが期待される。本臨床研究では、大量調製された腫瘍傷害性 T リンパ球の安全性、体内動態及び臨床効果を評価することを計画している。

## V.5 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与を併用する理由

### V.5.1 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与の根拠

近年の T 細胞の養子免疫療法における研究により、移入 T 細胞を *in vitro* において刺激し長期培養することにより、T 細胞は活性化フェノタイプを持つと共に *in vitro* における抗腫瘍活性を増強させるが、同時に終末期活性化 T 細胞あるいは疲弊化 T 細胞となり、移入後の生体内においては長期維持されずに結果としてより減弱した抗腫瘍効果しか示さないことが明らかとなってきた(14)。したがって、むしろ可能な限り短期の培養において必要な移入量を達成し、担癌宿主への移入後に *in vivo* において抗原刺激を加え活性化することにより効果的な抗腫瘍効果が得られると考えられている(14-20)。今回使用するペプチ

ドとは異なるが、これまでに、抗原ペプチドと不完全フロイントアジュバントのエマルジョン、抗原ペプチド産生ウイルス、又は抗原ペプチドパルス樹状細胞といった様々な形態のワクチンの投与を腫瘍抗原特異的 T 細胞の輸注療法に組み合わせることにより、輸注された T 細胞の増殖、サイトカイン産生、及び腫瘍への浸潤を誘導し、輸注療法の抗腫瘍効果を増大させることが動物実験により報告されている(14, 16-20)。また、これらの動物実験の結果を踏まえて、臨床試験においても同様に抗原ペプチドと不完全フロイントアジュバントのエマルジョン、抗原ペプチド産生ウイルス、又は抗原ペプチドパルス樹状細胞を腫瘍抗原特異的 T 細胞療法と組み合わせてメラノーマ患者の治療が試みられている(12, 21)。このような知見に基づき、本臨床研究においては試験細胞の *in vitro* 培養を短期間とし、試験細胞の患者への移入後 2 週目と 4 週目に MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドを投与することを計画した。本治療スケジュールにより、まず患者体内における MAGE-A4 反応性 T 細胞の頻度を飛躍的に増大させ、その後に抗原ペプチドを投与することにより輸注した MAGE-A4 反応性 T 細胞を患者体内で活性化すると共にさらなる増殖を引き起こし、より高い免疫応答と臨床効果を期待するものである。

#### V. 5. 2 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド投与量の設定根拠

実験動物、特にマウスを用いた研究において、腫瘍抗原ペプチド特異的な免疫応答を誘導するために、約 100  $\mu\text{g}$  のペプチドを不完全フロイントアジュバントとエマルジョン化して用いると有効であることが示されてきた(22, 23)。1990 年代よりヒト腫瘍においても腫瘍関連抗原が同定され始め、これらの腫瘍抗原由来の抗原ペプチドを用いた腫瘍に対するワクチン療法の臨床研究が国内外において精力的に行われてきた(24-28)。その過程において、MART-1/Melan A や gp100 等の腫瘍抗原由来ペプチドを用いた初期のペプチドワクチン療法の臨床試験では当初 100  $\mu\text{g}$  から 10 mg の投与量の範囲で用いられたが、その最大投与量においても毒性は認められなかった。加えて、ワクチン投与患者の末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)を用いた *in vitro* の解析において、ワクチン投与による抗原特異的な T 細胞免疫応答の誘導と投与ペプチド量との間には特定の相関を認めるに至っていない(29-33)。これらの結果に基づき、以後の第 I 相臨床試験の多くでは、100  $\mu\text{g}$  から 1 mg 程度の固定した投与量が設定されており、これまでに重篤な副作用は報告されていない(29, 34)。このような経緯と、従来の化学療法剤と腫瘍ワクチンとの根本的な性質の違いから、腫瘍抗原ペプチドを用いたワクチン療法の臨床試験においては用量試験の意義は限られていると考えられている(29)。これらの知見に基づき、本臨床研究においては安全に投与可能であり、かつ免疫反応を誘導することが期待される投与量として 300  $\mu\text{g}$  を設定した。

## VI. 遺伝子の種類及びその導入方法

### VI. 1 人に導入する遺伝子の構造と性質

本臨床研究において発現する遺伝子は TCR  $\alpha$  鎖及び  $\beta$  鎖遺伝子である。ベクターDNA 等の構造と性質は、「VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入」の項で述べられている。

#### VI. 1. 1 人に導入する遺伝子の構造

##### VI. 1. 1. 1 T 細胞受容体 (TCR) $\alpha$ 鎖遺伝子

TCR  $\alpha$  鎖遺伝子は、TCR  $\alpha$  鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR  $\alpha$  8-1 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28(35) から単離され、272 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 816 塩基対と終止コドン TGA より成り立っている。この遺伝子にコードされる蛋白は、111 アミノ酸からなる V8-1 領域、20 アミノ酸からなる J10 領域、141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなっている。図 1 に TCR  $\alpha$  8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

1	ATG CTC CTG TTG CTC ATA CCA GTG CTG GGG ATG ATT TTT GCC CTG	45	
1	M L L L L I P V L G M I F A L	15	
46	AGA GAT GCC AGA GCC CAG TCT GTG AGC CAG CAT AAC CAC CAC GTA	90	
16	R D A R A Q S V S Q H N H H V	30	
91	ATT CTC TCT GAA GCA GCC TCA CTG GAG TTG GGA TGC AAC TAT TCC	135	
31	I L S E A A S L E L G C N Y S	45	
136	TAT GGT GGA ACT GTT AAT CTC TTC TGG TAT GTC CAG TAC CCT GGT	180	
46	Y G G T V N L F W Y V Q Y P G	60	V8-1 領域
181	CAA CAC CTT CAG CTT CTC CTC AAG TAC TTT TCA GGG GAT CCA CTG	225	
61	Q H L Q L L L K Y F S G D P L	75	
226	GTT AAA GGC ATC AAG GGC TTT GAG GCT GAA TTT ATA AAG AGT AAA	270	
76	V K G I K G F E A E F I K S K	90	
271	TTC TCC TTT AAT CTG AGG AAA CCC TCT GTG CAG TGG AGT GAC ACA	315	
91	F S F N L R K P S V Q W S D T	105	
316	GCT GAG TAC TTC TGT GCC GGG AGG GGA GGA GGA AAC AAA CTC ACC	360	
106	A E Y F C A G R G G G N K L T	120	J10 領域
361	TTT GGG ACA GGC ACT CAG CTA AAA GTG GAA CTC AAT ATC CAG AAC	405	
121	F G T G T Q L K V E L N I Q N	135	
406	CCT GAC CCT GCC GTG TAC CAG CTG AGA GAC TCT AAA TCC AGT GAC	450	
136	P D P A V Y Q L R D S K S S D	150	
451	AAG TCT GTC TGC CTA TTC ACC GAT TTT GAT TCT CAA ACA AAT GTG	495	
151	K S V C L F T D F D S Q T N V	165	
496	TCA CAA AGT AAG GAT TCT GAT GTG TAT ATC ACA GAC AAA ACT GTG	540	
166	S Q S K D S D V Y I T D K T V	180	
541	CTA GAC ATG AGG TCT ATG GAC TTC AAG AGC AAC AGT GCT GTG GCC	585	
181	L D M R S M D F K S N S A V A	195	C 領域
586	TGG AGC AAC AAA TCT GAC TTT GCA TGT GCA AAC GCC TTC AAC AAC	630	
196	W S N K S D F A C A N A F N N	210	
631	AGC ATT ATT CCA GAA GAC ACC TTC TTC CCC AGC CCA GAA AGT TCC	675	
211	S I I P E D T F F P S P E S S	225	
676	TGT GAT GTC AAG CTG GTC GAG AAA AGC TTT GAA ACA GAT ACG AAC	720	
226	C D V K L V E K S F E T D T N	240	
721	CTA AAC TTT CAA AAC CTG TCA GTG ATT GGG TTC CGA ATC CTC CTC	765	
241	L N F Q N L S V I G F R I L L	255	
766	CTG AAA GTG GCC GGG TTT AAT CTG CTC ATG ACG CTG CGG CTG TGG	810	
256	L K V A G F N L L M T L R L W	270	
811	TCC AGC TGA	819	
271	S S *		

図1 TCR $\alpha$ 8-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

#### VI. 1. 1. 2 T細胞受容体 (TCR) $\beta$ 鎖遺伝子

TCR  $\beta$ 鎖遺伝子は、TCR  $\beta$ 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR  $\beta$  7-9 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4<sub>143-151</sub> ペプチド特異的な CTL クローン #2-28(35) から単離され、313 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 939 塩基対と終止コドン TAG より成り立っている。この遺伝子にコードされる蛋白は、116 アミノ酸からなる V7-9 領域、3 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-5 領域、179 アミノ酸からなる C2 領域という構造からなっている。図 2 に TCR  $\beta$  7-9 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。

1	ATG GGC ACC AGC CTC CTC TGC TGG ATG GCC CTG TGT CTC CTG GGG	45	
1	M G T S L L C W M A L C L L G	15	
46	GCA GAT CAC GCA GAT ACT GGA GTC TCC CAG AAC CCC AGA CAC AAG	90	
16	A D H A D T G V S Q N P R H K	30	
91	ATC ACA AAG AGG GGA CAG AAT GTA ACT TTC AGG TGT GAT CCA ATT	135	
31	I T K R G Q N V T F R C D P I	45	
136	TCT GAA CAC AAC CGC CTT TAT TGG TAC CGA CAG ACC CTG GGG CAG	180	
46	S E H N R L Y W Y R Q T L G Q	60	V7-9 領域
181	GGC CCA GAG TTT CTG ACT TAC TTC CAG AAT GAA GCT CAA CTA GAA	225	
61	G P E F L T Y F Q N E A Q L E	75	
226	AAA TCA AGG CTG CTC AGT GAT CGG TTC TCT GCA GAG AGG CCT AAG	270	
76	K S R L L S D R F S A E R P K	90	
271	GGA TCT TTC TCC ACC TTG GAG ATC CAG CGC ACA GAG CAG GGG GAC	315	
91	G S F S T L E I Q R T E Q G D	105	N 領域
316	TCG GCC ATG TAT CTC TGT GCC AGC AGC TTA GCC CAG GGA GCG GGA	360	
106	S A M Y L C A S S L A Q G A G	120	J2-5 領域
361	GAG ACC CAG TAC TTC GGG CCA GGC ACG CGG CTC CTG GTG CTC GAG	405	
121	E T Q Y F G P G T R L L V L E	135	
406	GAC CTG AAA AAC GTG TTC CCA CCC GAG GTC GCT GTG TTT GAG CCA	450	
136	D L K N V F P P E V A V F E P	150	
451	TCA GAA GCA GAG ATC TCC CAC ACC CAA AAG GCC ACA CTG GTA TGC	495	
151	S E A E I S H T Q K A T L V C	165	
496	CTG GCC ACA GGC TTC TAC CCC GAC CAC GTG GAG CTG AGC TGG TGG	540	
166	L A T G F Y P D H V E L S W W	180	
541	GTG AAT GGG AAG GAG GTG CAC AGT GGG GTC AGC ACA GAC CCG CAG	585	
181	V N G K E V H S G V S T D P Q	195	C2 領域
586	CCC CTC AAG GAG CAG CCC GCC CTC AAT GAC TCC AGA TAC TGC CTG	630	
196	P L K E Q P A L N D S R Y C L	210	
631	AGC AGC CGC CTG AGG GTC TCG GCC ACC TTC TGG CAG AAC CCC CGC	675	
211	S S R L R V S A T F W Q N P R	225	
676	AAC CAC TTC CGC TGT CAA GTC CAG TTC TAC GGG CTC TCG GAG AAT	720	
226	N H F R C Q V Q F Y G L S E N	240	
721	GAC GAG TGG ACC CAG GAT AGG GCC AAA CCC GTC ACC CAG ATC GTC	765	
241	D E W T Q D R A K P V T Q I V	255	
766	AGC GCC GAG GCC TGG GGT AGA GCA GAC TGT GGC TTC ACC TCC GAG	810	
256	S A E A W G R A D C G F T S E	270	
811	TCT TAC CAG CAA GGG GTC CTG TCT GCC ACC ATC CTC TAT GAG ATC	855	
271	S Y Q Q G V L S A T I L Y E I	285	
856	TTG CTA GGG AAG GCC ACC TTG TAT GCC GTG CTG GTC AGT GCC CTC	900	
286	L L G K A T L Y A V L V S A L	300	
901	GTG CTG ATG GCC ATG GTC AAG AGA AAG GAT TCC AGA GGC TAG	942	
301	V L M A M V K R K D S R G *		

図2 TCR β 7-9遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列