

8. 産生ウイルスの力価試験
9. 導入遺伝子の機能確認

VII. 1. 2 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS-bPa により TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した患者由来 T リンパ球であるため、その安全性については「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に記載する。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（「VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法」参照）。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 年来の末梢血幹細胞採取・保存・解凍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、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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 98.3% 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（「VII. 4 ペプチドの安全性」参照）。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 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 (参考資料 9-1 及び 2) によると、これまでに AIDS や悪性腫瘍のワクチンの臨床試験において、4,000 人以上の患者に約 40,000 回の投与がなされており、副作用は多くの場合投与部位の発赤等の一過性の局所反応のみであることが示されている。また、その他の副作用としては、一過性のインフルエンザ様の全身症状が時に観察されている。以上より MONTANIDE™ ISA 51 は安全に人へ投与されるものであると考えられている (参考資料 9-1)。

VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性

VII. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクターMS-bPa のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子を完全に欠如している。また、一過性にエコトロピックウイルスベクターMS-bPa 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MS-bPa の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性のレトロウイルスベクターだけを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中の RCR を測

定する。

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蛋白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産生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（ウイルス蛋白をコードする gag、pol、env 遺伝子を含む）をあらかじめ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 を導入したプロデューサー細胞を樹立することにより、高力価のレトロウイルスベクターを大量に調製することが可能になった(52)。図 10 にその概念図を示す。

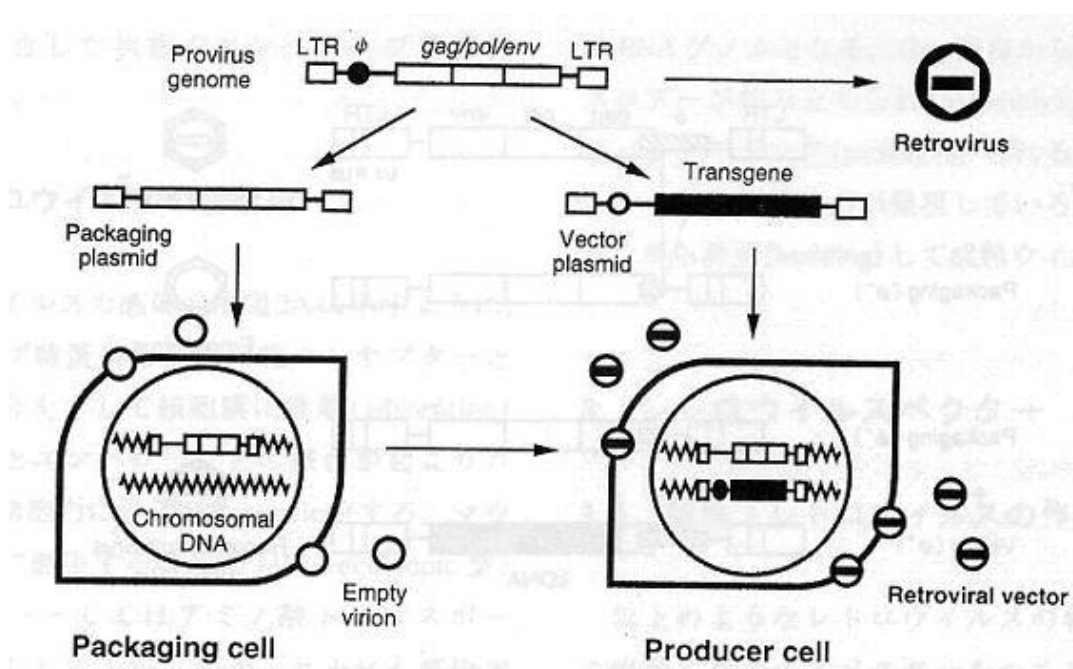


図 10 レトロウイルスベクターの産生（引用文献 52 より転載）

ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa 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。さらに、レトロウイルスベクター MS-bPa を作製する際に使用されるパッケージング細胞 PG13 は、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。したがって、ウイルスプラスミドベクター pMS-bPa 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 MS-bPa 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。

表 1 に各世代のパッケージング細胞の特徴を、図 11 に各世代のパッケージング細胞と対応するレトロウイルスベクターの構造を記載する(52)。

表 1 各世代のパッケージング細胞の特徴

	パッケージングプラスミドの構造	RCR 出現の機構
<p>第1世代パッケージング細胞</p> <p>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の A)</p>	<p>パッケージングシグナルだけを除いたもの。効率よくベクターを作るために、ベクタープラスミド側に gag 遺伝子の一部を残しておく必要がある。</p>	<p>パッケージング配列とベクター配列に共通する gag 部分で相同組換えが起こると RCR が出現する。</p>
<p>第2世代パッケージング細胞</p> <p>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の B)</p>	<p>パッケージングシグナルを除去し、さらに 3' -LTR を polyA 付加シグナルで置換したもの。</p>	<p>RCR が出現するためには、gag 部分と 3' -LTR 部分の 2 ヶ所で同時に相同組換えがおこる必要があり、その可能性は非常に低いと考えられている。</p>
<p>第3世代パッケージング細胞</p> <p>(パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 : 図 11 中の C)</p>	<p>パッケージングシグナルを除去して 3' -LTR を polyA 付加シグナルで置換し、さらにウイルス蛋白のコーディング領域を gag-pol と env の 2 種類に分割して発現させるようにしたもの。</p>	<p>RCR が出現するためには、gag 部分と pol 部分と 3' -LTR 部分の 3 回の相同組換えが同時に起こる必要があり、その可能性は極めて低いと考えられている。</p>

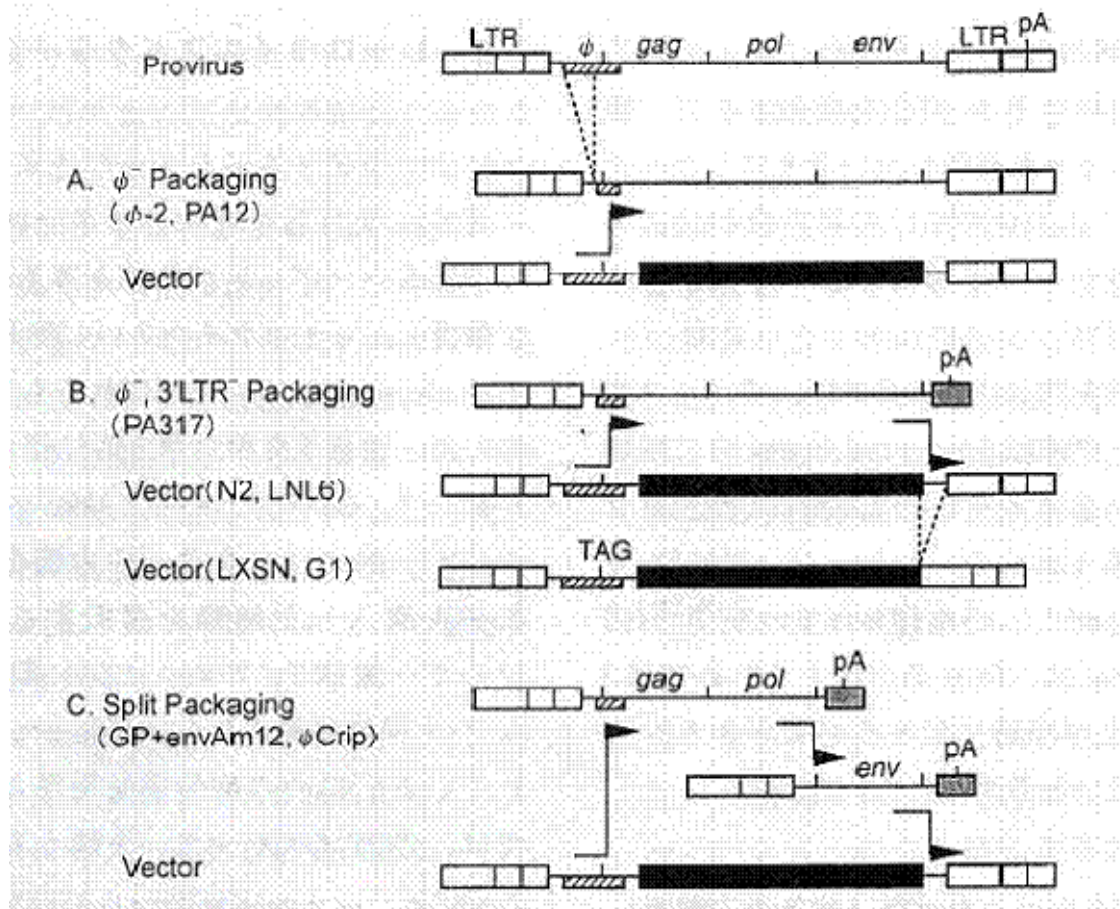


図 11 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 52 より転載)

続いて図 12 に、パッケージング細胞株 PG13 を作製するために用いた 2 種のプラスミド、pLGPS と pMOV-GaLV Seato env の構造を示す。

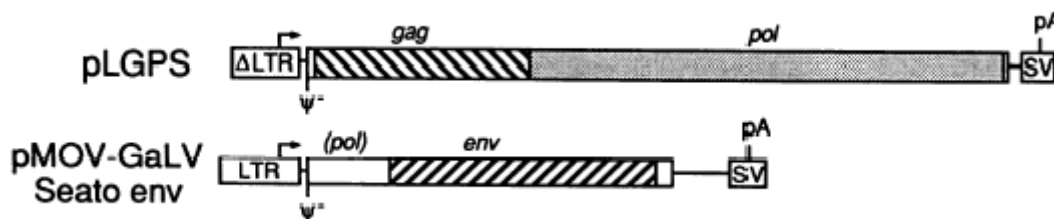


図 12 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造 (引用文献 45 より転載)

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。

PG13 と同じ第 3 世代のアンフォトロピック系パッケージング細胞株 GP+envAm12 を用いて産生したレトロウイルスベクター中に RCR を検出したことが 1996 年に Chong ら (53) により初めて報告された。RCR 出現の頻度を測定することは困難であるが、過去 4 年間、GP+envAm12 細胞を用いてウイルス産生細胞株を樹立し、60 以上のウイルスについて RCR チェックを試みたが検出されなかったため、極めて低い頻度と考察されている (53)。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。

VII. 1.4 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入過程において、細胞を傷害することはないと考えられている。一方、細胞染色体上の遺伝子導入位置によっては細胞の生存・増殖に必須な遺伝子の発現が抑制され、細胞が死に至ることがありうる。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。

VII. 1.5 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、標的細胞としての患者 T リンパ球に ex vivo (生体外) で TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用した

レトロウイルスベクターMS-bPaはこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株により生産されたレトロウイルスベクターはヒト血清中の補体により速やかに不活化される(54)ため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。

また、レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者Tリンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCRが出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

VII. 1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業者に遺伝子が導入される可能性は極めて低いと考えられる。

遺伝子導入操作はP2レベルの細胞調製施設において、可能な作業は閉鎖系で行い、開放系での作業は細胞調製施設内に設置されたクラスII安全キャビネット内で行う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧蒸気滅菌後に廃棄される。以上のようにしてレトロウイルスベクターMS-bPaの環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。

レトロウイルスベクターMS-bPaは増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量のRCRが患者体内に存在しない限り非常に低い。

VII. 1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。細胞の生存や増殖に重要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合には細胞は死に至る可能性がある。ただし、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、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。

VII. 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 (55-57)。この白血病発症については、①免疫系が成熟していない幼少の患者が対象であること、②遺伝子導入の標的細胞が分化・増殖能が旺盛な造血幹細胞であること、③導入された治療遺伝子 (IL-2 受容体 γc 鎖) が細胞増殖に直接関与する機能を有すること等、この遺伝子治療に特殊な事情が重なることにより遺伝子導入細胞の癌化が発生したことが示唆されている (58)。なお、同様に X-SCID に対し、レトロウイルスベクターにより IL-2 受容体 γc 鎖遺伝子を CD34 陽性細胞に導入するイギリスでの遺伝子治療においても、10 例中 1 例に白血病が発症したことが 2007 年 12 月に報告された (59, 60)。また、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞とした慢性肉芽腫症 (CGD) のドイツでの遺伝子治療において、2 例中 2 例の骨髄異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている (61, 62)。一方、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症のイタリアでの遺伝子治療においては、10 例中 8 例で酵素補充療法の必要がなくなり、遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、長期フォローアップにおいて癌化が見られなかったと報告されている (63)。このように、レトロウイルスベクターによる癌化の頻度は対象疾患、遺伝子導入の標的細胞、ベクターの種類等により大きく異なっており、本研究で行う分化した末梢リンパ球に対する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化の報告はない (13, 36-39)。

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 (64)。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 (65)。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 (66)。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるクローン増殖を 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。

Ⅶ. 2 遺伝子産物の安全性

本臨床研究において、遺伝子導入の標的細胞は、PBMC を OKT3 により刺激増殖させた T 細胞である。これら T 細胞の大半は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。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。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。

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 (67, 68) において、ex vivo で培養、増殖させた約 10^{10} 個の細胞が投与された。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による毒性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を併用するものであり、血液学的又はそれ以外の毒性（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小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半はTCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たにMAGE-A4に対するTCR遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において2種類の配列の α 鎖及び β 鎖が発現する。このため、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(69)。

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TCR2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。
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。
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患者のHLAアレル（対立遺伝子）との複合体の立体構造に酷似する場合、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(13)。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ものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

Ⅶ.3 細胞の安全性

Ⅶ.3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す細胞培養にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置されたP2レベルの細胞調製施設内で行われる。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、他の患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MS-bPa を用いた遺伝子導入 T リンパ球調製工程について、細胞培養における操作概要を表 2 に、操作手順の概略図を図 13 にそれぞれ示す。

表 2 細胞培養における操作概要

日	操作内容
第 0 日	リンパ球刺激工程
第 2 日	ウイルス結合バッグ調製工程
第 3 日	遺伝子導入工程 (1 回目)
第 4 日	遺伝子導入工程 (2 回目)
第 7~9 日	最終産物調製工程

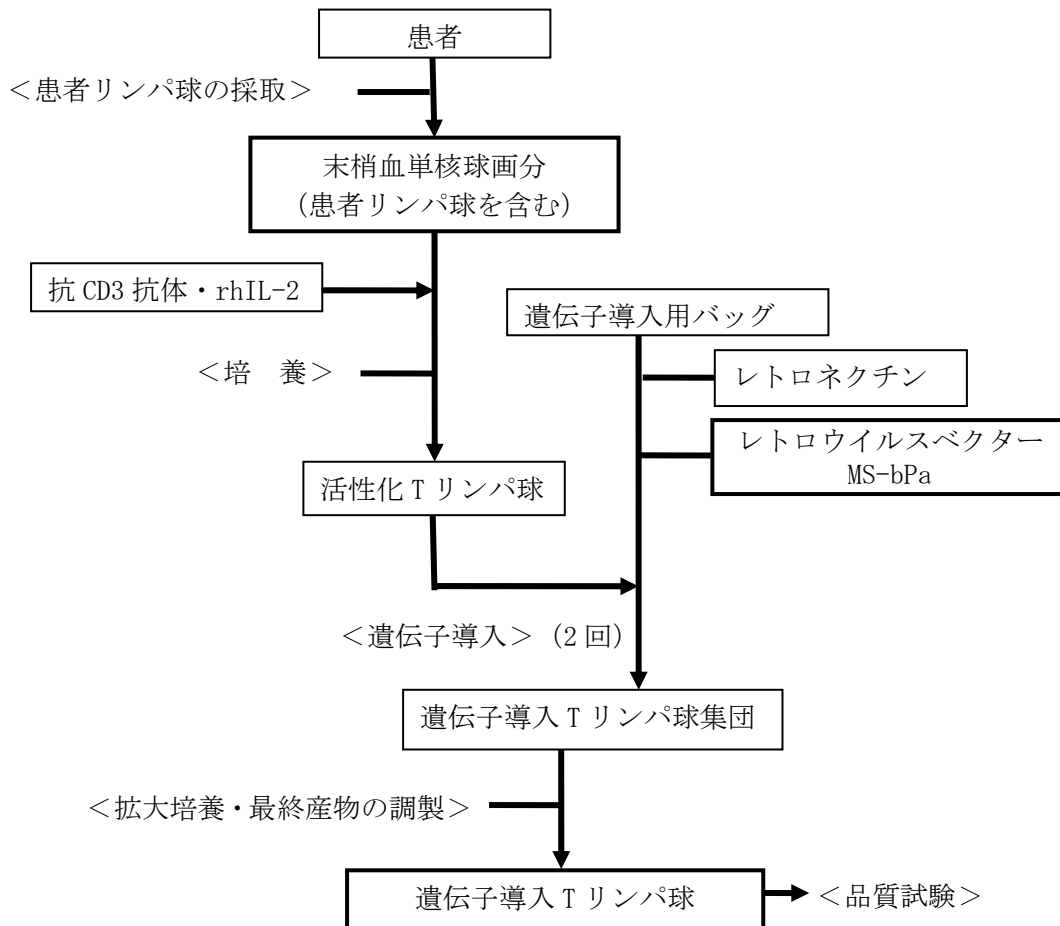


図 13 遺伝子導入細胞調製工程の概略