

(3) 1 2. 担当医連絡先 (追記) (別添1-1)

1 1. 担当医連絡先 (追記) (別添1-2)

ご心配なことがございましたら、なんなりと下記ま

でご連絡ください。

担当医師氏名

連絡先 (直通電話)

1. _____
2. _____
3. _____

4 別添2 「同意取得の際に用いられる説明および同意書」(ドナー一用)

(1) 7. 遺伝子解析の御協力のお願い

2002年、フランスで行われた先天性免疫不全症に対する遺伝子治療において、治療用のレトロウイルスベクターによって白血病が発症したとの報告がありました。現在まで遺伝子治療を受けられて白血病を発症した方は4名おられ、うち1

4 別添2 「同意取得の際に用いられる説明および同意書」(ドナー一用)

(1) 7. 遺伝子解析の御協力のお願い

2002年、フランスで行われた遺伝子治療において、治療用のレトロウイルスベクターによって白血病が発症したとの報告がありました。詳しい検査の結果、これは使用したレトロウイルスベクターが細胞に感染した際、がんになり

名の方は残念ながら白血病のために亡くなっております。ただ、同様の治療を行っているイギリスのグループでも 10 症例中 1 名の患者に白血病を発症しております (平成 20 年夏時点)。ただ、私たちと同様の遺伝子治療を受けられた 50 名以上の方においても同様の副作用を全く認めていません。詳しい検査の結果、これは使用したレトロウイルスベクターが細胞に感染した際、がんになりやすい遺伝子の近くに入り込んだためということがわかりました。

- 5 別添 1 7 Bonodanza A. et al. Suicide gene therapy of graft-versus-host disease induced by central memory human T lymphocytes. Blood 107 : 1828 - 36 , 2006.
- 6 別添 1 8 Kaneko S. et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. Blood. 113 : 1006 - 15 , 2009.
- 7 別添 1 9 Porter D. et al. A phase 1 trial of donor lymphocyte infusions expanded and activated ex vivo via CD3/CD28 costimulation . Blood. 107 : 1325 - 31 , 2006.

やすい遺伝子の近くに入り込んだためということがわかりました。

(略)

<p>8 資料</p> <p>(1) 添付資料 3 A <u>SFCMM-3</u> ベクターを用いた末梢血 T リンパ球への <u>HSV-TK 遺伝子導入法 (電子ファイル版)</u></p> <p>添付資料 3 B <u>SFCMM-3</u> ベクターを用いた末梢血 T リンパ球への <u>HSV-TK 遺伝子導入法 (遺伝子導入 SOP)</u></p> <p>[○ 最新のものに改訂した。改定部分は本文中に赤字で表示した。]</p> <p>添付資料 3 C <u>末梢血 T リンパ球への HSV-TK 遺伝子導入法 (SOP 定義マニュアル)</u></p> <p>添付資料 5 <u>遺伝子治療実行委員会委員名簿</u></p> <p>[○ 実行委員会委員名簿を添付した。]</p>	<p>8 資料</p> <p>(1) 添付資料 3 SFCMM-3 ベクターを用いた末梢血 T リンパ球への HSV-TK 遺伝子導入法</p>
<p>(2) 2. 実施施設の施設設備の状況</p> <p>当該遺伝子治療臨床研究は、筑波大学附属病院の遺伝子・細胞治療室及び細胞調製室 (Cell Processing Factory) にて行う。これらの室内にはクラス II 安全キャビネット、遠心器や高圧滅菌器を備えており、その物理的封じ込めレベルは P2 である (添付資料 1)。</p>	<p>(2) 2. 実施施設の施設設備の状況</p> <p>当該遺伝子治療臨床研究は、筑波大学附属病院の遺伝子・細胞治療室及び細胞調製室 (Cell Processing Factory) にて行う。これらの室内にはクラス II 安全キャビネット、遠心器や高圧滅菌器を備えており、その物理的封じ込めレベルは P2 である (添付資料 1)。</p>

9 別紙3

「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジンキナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究に参加される皆様へ」

〔○ 今回の計画変更も含め、これまでの臨床研究に関し、被験者に対する適切な情報提供をするために追加した。〕

「遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書」変更理由

我々の研究グループでは2003年12月より「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対する自殺遺伝子導入ドナーリンパ球輸注療法の臨床研究」を開始し、現在までに5症例に対して自殺遺伝子導入ドナーリンパ球輸注(TK-DLI)を行った(表1、2)。

投与時からTKリンパ球が末梢血中から検出されなくなるまでの期間(中央値28日、図1)に予想外の有害事象は観察されていないことや、体外で調製したTKリンパ球ならびに投与後の患者検体に増殖性レトロウイルスを含む微生物汚染が検出されていないことから、治療そのものは安全に行われており、第一相試験としての成果は得られつつある。また一例ではあるがガンシクロビル(GCV)使用例において、使用直後からHSV-TK遺伝子コピー数とTKリンパ球クローンの減少を認め、TKリンパ球がヒト体内においてもガンシクロビル感受性を保持していることが確認された。これらの中間結果に更に5例の症例を追加することでより確実性の高い情報が得られると考えられる。

一方TK-DLIの治療効果については、骨髓異形成症候群(MDS)患者1例がTK-DLI後も約4年間に亘り完全寛解を維持しているが、その他の急性白血病4症例ではいずれも60日以内に原病の増悪を確認し、5例終了時点での長期奏効率も20%と満足できる結果ではなかった。自験例の臨床経過とTリンパ球輸注療法に関する基礎研究・臨床研究の報告(後述)を検討し、再発早期のTK-DLIとTKリンパ球のクオリティ向上が治療効果の改善に寄与すると考え、後半5症例を対象に今回の変更申請に至った。以下にまずその概要に触れ、詳細は個々の変更内容として列記する。

- 1、再発早期のTK-DLI：一般にTリンパ球数とターゲット細胞数の比(E:T ratio)が高いほどTリンパ球のターゲット細胞障害効果が高くなることが知られる。したがってTK遺伝子の有無に関わらずDLI時の腫瘍量は少ないほど治療効果が期待される(Kolb et al, *Blood*, 2008)。腫瘍量が少ない段階での治療は、再発検出後にTKリンパ球を速やかに調製し、安全性検査を迅速に終えてTK-DLIを行うことで達成されうる。前回の変更申請では、投与前検体の検査はenv遺伝子PCR増幅および逆転写酵素活性検査によって代替し、同じ検体を用いたS+L-テストは投与前検体の安全性確認を補足する検査として位置付け直した。これにより従来は40日以上かかっていた安全性検査を1週間程度に短縮できる。また、今回の変更申請における後述の遺伝子導入プロトコール変更により、安全性を損なうことなくTKリンパ球の体外培養期間を14日から10日に短縮できる。つまり現行法に比べて合計で約一ヶ月の短縮が可能であり、症例の治療成績向上に寄与すると考え、変更申請した。
- 2、TKリンパ球のクオリティ：現行プロトコールを用いて遺伝子導入と14日間の体外培養を行った場合、十分な細胞数は得られるものの、培養開始前のドナーTリンパ球に比してドナーリンパ球の抗原反応性や生体内での生存能が著しく減少する

ことが、初回申請後の 2002 年からの数年間のうちに前臨床試験ならびに臨床試験の双方において広く知られるようになった (Sauce D, *Blood*, 2002、 Merktel S, *Blood*, 2002、 Bondanza A, *Blood*, 2006、 Kaneko S, *Blood*, 2009)。また、機能低下のメカニズムがフェノタイプの変化を伴う“細胞疲労”であることについても多くの知見が得られるようになった (June CH, *JCI*, 2007)。実際、我々の 5 症例においても、投与時点で TK リンパ球は活性化マーカー CD25 の発現を既に減じており、移植後に検出可能であった期間も PCR レベルで中央値 28 日と効果を発揮するには不十分であった (表 3)。近年、欧米において自家移植あるいは同種移植後の双方で CD3/CD28 共刺激を用いた T リンパ球養子免疫療法の臨床試験が報告され、急性白血病 (Porter DL et al, *Blood*, 2006) 悪性リンパ腫 (Laport GG, *Blood*, 2003)、骨髄腫に伴う免疫不全 (Rapoport AP et al, *Nat Med*, 2005) においても治療成績向上が認められている。そこで我々は抗 CD3/CD28 抗体による CD3/CD28 共刺激を採用したプロトコールによって産生した TK-T リンパ球と現行プロトコールによって産生した TK-T リンパ球との相違点を、*in vitro* ならびにヒト化マウス *in vivo* モデルを用いて詳細に検討した (Bondanza A, Kaneko S)。その結果、CD3/CD28 共刺激による TK リンパ球は、従来の TK リンパ球に比して同種抗原反応性が有意に高く、生体内での生存も長期であり、通常の DLI に比した場合でも非劣勢であることが明らかになった。その一方で GCV 感受性に変化は無く、*in vitro*、*in vivo* とも GCV 投与で従来の TK リンパ球同様の細胞死を誘導可能であり、安全性に変化をもたらさないことを確認した。更には CD3/CD28 共刺激が細胞周期回転と活性化を促進し、細胞死を抑制することから、遺伝子導入率と体外培養中の増殖率が向上し計 10 日間で目的の細胞数が得られるようになった。細胞調製ならびに同種抗原反応性、輸注リンパ球の生存可能性が有意に向上していること、GCV 感受性に変化がなく安全性が担保されていること、欧米では Phase I/II 試験が展開され一定の成績を収めていることなどから、本研究における細胞調製にも CD3/CD28 共刺激を取り入れることが、治療成績の向上、対象症例の利益につながると考え、変更申請を行った。

以下は変更報告書の各項目に対応する。

1. 総括責任者、総括責任者以外の研究者の異動があったため。
2. 一部の研究施設(東京大学・医科学研究所)で改組があったため。
3. 研究者の異動に伴い、担当できる役割分担に制限が生じたため。
4. S⁺L⁻テストは検査結果が確定するまでに 40 日を要する。S⁺L⁻テストの結果を待つと適切な治療時期を逃す可能性が高いため、投与前検体の検査は *env* 遺伝子 PCR 増幅および逆転写酵素活性検査によって代替し、同じ検体を用いた S⁺L⁻テストは投与前検体の安全性確認を補足する検査として位置付け直した。具体的には、3 種の検査を投与前に提出後、*env* 遺伝子 PCR 増幅および逆転写酵素活性検査の結果をもって投与を開始し、検査提出 40 日後に S⁺L⁻テストの結果が陽性であった場合は、速やかに投与後の患者末梢血ならびに血漿を用いて *env* 遺伝子 PCR および逆転写酵素活性検査を行い、いずれの一つでも陽性と判明したときは RCR 陽性と判断し、ガンシクロビル投与を行う。いずれも陰性の場合 S⁺L⁻テストを再度行い、陽性の場合ガンシクロビル投与を行う。S⁺L⁻テスト陰性であれば次の定期検査までの経過観察とする。遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後の定期検査中に、上記 2 検査により再び RCR 陽性が疑われた場合には、S⁺L⁻テストによる確認検査を提出し、その結果を待たずに速やかにガンシクロビル投与を開始する。
5. SRL 社へコンサルトの結果、筑波大学附属病院検査部において施行可能な検査項目（無菌性試験、*env* 遺伝子 PCR 増幅、*Mus dunni* 細胞との共培養後の PG-4 S⁺L⁻テスト）が増えたため。
6. 抗 CD3 抗体 (OKT3) に替えて抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ (ClinExVivo) を用いる予定のため。
7. 初回申請後に一部の研究者が、本研究の遂行に直接的に有用な知見を得る機会を持ったため。
- 8①一般に末梢血 T リンパ球はナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞への終末分化に伴い細胞障害性は増強するものの、リンパ節へのホーミング機能や抗原反応性を減じ、細胞死感受性が高くなることが知られている (Sallusto F, *Nature*, 1999, 図 2)。特に抗 CD3 抗体と高濃度 IL-2 を用いた末梢血 T リンパ球の長期体外培養は上述の終末分化を促進する。同条件によって 10 日間を超える拡大培養を行った結果、大部分の T リンパ球がエフェクターメモリー T リンパ球 (EM) あるいはエフェクター T リンパ球 (TE) となり、免疫記憶と抗原反応性の維持に関わるナイーブ T リンパ球ならびにセントラルメモリー (CM) T リンパ球を豊富に含む新鮮末梢血リンパ球と比較して、大きくその分布を変えることが知られる (Bondanza A *et al. Blood*, 2006, 図 3)。さらには、T リンパ球レパトワの偏移現象が起きることも知られており (Coito S *et al. Stem Cells Dev*, 2004)、結果的に抗原反応性が低く、細胞死感受性の高い短命なリンパ球集団、すなわち治療効果を期待し難い T リンパ球集団が長期拡大培養により産生されている。CD28 分子は T リン