

バ球表面分子の一つで、抗原提示細胞上にある B7 分子からの刺激を細胞内に伝えて IL-2 の産生を促進して T リンパ球の活性化を推進する機能や、TCR を中心とした免疫シナプスを形成することでより強い TCR シグナルを細胞に伝える機能があり、CD3/CD28 分子の共刺激は遺伝子導入 T リンパ球の効果的な活性化に広く用いられる。欧米では GMP 基準に適合した臨床用の抗 CD3/CD28 抗体結合磁気ビーズが販売されており、それを用いたいくつかの臨床研究が報告されている (Laport GG et al. *Blood* 2003, Porter DL et al. *Blood*, 2006, Rapoport AP et al. *Nat. Med.* 2005)。我々の臨床研究では初期 5 例において体外遺伝子導入に伴う T リンパ球の終末分化が顕著であったため、臨床グレードの抗 CD3/CD28 抗体結合磁気ビーズを採用した HSV-TK 遺伝子導入プロトコルを開発し、同プロトコルで樹立された T リンパ球が抗原反応性を充分保っている長命な CM-T リンパ球であり、安全性確保に充分な GCV 感受性を備えていることを *in vitro* と *in vivo* (ヒト化動物モデル) で示した。具体的には、また抗 CD3/CD28 抗体刺激の採用により、T リンパ球の活性化に必要な時間が短縮され、刺激 48 時間後の活性化分子マーカーの発現が従来の 72 時間以降の同マーカー発現と同等以上であることを確認した (Kaneko S et al. *Blood*, 2008, 図 4.5)。以上の研究結果ならびに欧米におけるフェイズ I 試験で CD3/CD28 刺激同種リンパ球の安全性が確認されたことから (Porter DL et al. *Blood*, 2006)、本遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入プロトコルとして抗 CD3/CD28 抗体による刺激を採用した。(別添 17、18、19) なお ClinExVivo は米国 FDA により承認された Clinical grade の製品であり、本邦では Invitrogen 社の正規代理店であるベリタス社が、臨床研究用試薬として輸入・販売している。また、遺伝子導入プロトコル変更が治療成績へ影響を与える可能性があるため、改定プロトコルにより治療される症例(5名を予定)は治療の終了した 5 名とは別群として各種解析と評価を行う予定である。

②現在、本邦においてはセロイク (武田薬品)、イムネース (塩野義製薬) に加えてプロロイキン (カイロン/ニプロ) が GMP グレードの rhIL-2 として入手可能であるため、追記した。

③副総括責任者職を廃止したため、同職に関する記述を削除した。

④動物モデルによる基礎実験、ならびにイタリアにおける本遺伝子治療症例において、GVHD のコントロールのために 7 日間以上の GCV 投与が有効な例があったため、総括責任者の判断において GCV 投与を延長することができることとした。

9. 本プロトコルを遵守した場合、特に外来での経過観察症例において、医療上・研究上ともに必要と思われる以上に頻回の検体採取がなされる例があったため。

10. 本臨床研究に深く関連する最新の論文を追加した。

11. 2007 年 12 月に英国において遺伝子治療に関連する白血病の発症例があったため。

12. 筑波大学附属病院内に新たに、従来の施設に比して清浄度とセキュリティレベルの高い P2 レベル CPF が設置されたため、体外無菌操作を同所にて行う。

13. SFCMM-3 ベクターを用いた末梢血 T リンパ球への HSV-TK 遺伝子導入法について、最新のものに改訂した。また、実行委員会委員名簿を添付した。

14. 症例登録再開にあたり、現在までの 5 例の治療成績と今回の計画変更点についての情報提供が必要と考えたため。

表1 Characteristics of patients treated by TK-DLI

Pt.	Age / Sex	Diagnosis	Type of Transplant	Time from HSCT to Relapse (M)	Time from Relapse to TK cell infusion (wk)	Clinical status before TK-DLI
3	60/M	2ndary AML (M7)	MR,NST	9	16	HR, Blast 75% in BM, CTx refractory
5	50/M	MDS (RAEB-t)	MR, NST	4	10	HR, Blast 5% in BM, Discharge of IS
7	14/M	ALL (Precursor B)	MMR	30	12	HR, Blast 93% in BM
8	48/M	AML with t(11;21)	MR	129	190	HR, Blast 51% in BM
9	50/M	ALLL (Precursor T)	MR	7	26	HR, LN infiltration

MR,matched related donor, MMR, mismatched related donor, NST; non-myeloablative stem cell transplantation, HR; hematological relapse, BM: bone marrow, CTx; chemotherapy, IS; Immunosuppressant, LN; Lymph node

表2 Clinical outcome of patients treated by TK-DLI

Pt.No	Diagnosis	Blast count in TK-DLI	Infiltrated cells, $\times 10^6/kg$		Time to CR/CRi, median (range) (M)	Survival time after TK-DLI (months)
			LN	BM		
3	2ndary AML (M7)	75% in BM	7.7	-	1.8% Day 7	1.97
5	MDS (RAEB-t)	CR in BM	3.5	-	9.6% Day 37	1.30
7	ALL (Precursor B)	9% in BM	6.7	17.0	NA	0.61
8	AML with t(11;21)	CR in BM	8.5	8.5	3.2% Day 1	0.62
9	ALLL (Precursor T)	LN infiltration	8.6	4.1	3.4% Day 7	0.96
Mean			8.2±1.4	8.9±6.8		1.21±0.4

Pt.No	Diagnosis	Outcome after TK-DLI	Overall death (TK-DLI)	DLI outcome	CR, days after TK-DLI	CR, days after TK-DLI
3	2ndary AML (M7)	PD	acute (grade II from day 18)*	mixed ***	18	38†
5	MDS (RAEB-t)	CR	stable (relapse-free)	-	147	147
7	ALL (Precursor B)	PD	-	-	14	954†
8	AML with t(11;21)	PD	-	-	51	1520†
9	ALLL (Precursor T)	PD	-	-	58	2911
Mean					81	854

CR: complete remission, BM: bone marrow, PD: Progressive disease, *: with stage 1 skin lesion and stage 1 liver injury, †: set on day 24 as stage 1 skin lesion then progressed and extended with lip injury, ***: complete remission in skin injury with drastic elimination of TK-T lymphocytes, but liver injury progressed due to an infiltration of leukemia cells, LN; Lymph node, ‡: dead patient, §: additional SCT from a matched unrelated donor have been performed on Dec/2006.

表3 Preparation and immuno-phenotypic characterization of genetically modified donor lymphocytes

Patient no.	Transfused lymphocytes %	NK/IFN- γ selection efficiency		NK/IFN- γ cells, $\times 10^6$ ($\times 10^6$ /kg of Patient)	Yield at the end of production
		Viable %	Purity %		
3	18.7	68.8	97.2	10.0 (23)	1.72
6	15.8	75.7	95.1	24.4 (31)	4.63
7	10.6	83.0	94.9	7.9 (28)	4.94
8	10.5	90.0	90.7	16.0 (29)	3.54
9*	16.6	94.2	91.7	7.2 (18)	2.92
Mean \pm SD	14.8 \pm 3.4	83.9 \pm 6.7	93.9 \pm 2.7	18.8 \pm 7.1	4.21 \pm 1.6

Patient no.	CD antigens on NK/IFN- γ cells %									
	CD4	CD44	CD45	CD56	CD71*	CD14	CD34	CD35	CD45RO	CD45RA
3	96.6	10.7	85.9	3.4	<1.0	<1.0	<1.0	15.6	NA	NA
6	96.7	40.0	43.8	13.2	<1.0	NA	NA	28.8	NA	NA
7	96.9	52.1	42.7	7.4	<1.0	NA	NA	31.1	96.7	34.4
8	96.4	34.7	70.7	7.5	<1.0	NA	NA	10.1	98.3	18.1
9*	97.3	28.8	64.9	7.1	<1.0	NA	NA	40.3	98.5	63.3
Mean \pm SD	96.7 \pm 0.7	37.3 \pm 11.7	61.8 \pm 10.2	7.7 \pm 3.3	<1.0	NA	NA	31.1 \pm 11.2	98.2 \pm 0.3	34.7 \pm 12.7

*: Ex vivo TK-T cell manipulation was finished on day 11, then TK-T lymphocytes were harvested and stored.

图1 Progressive elimination of TK-T lymphocytes in patients

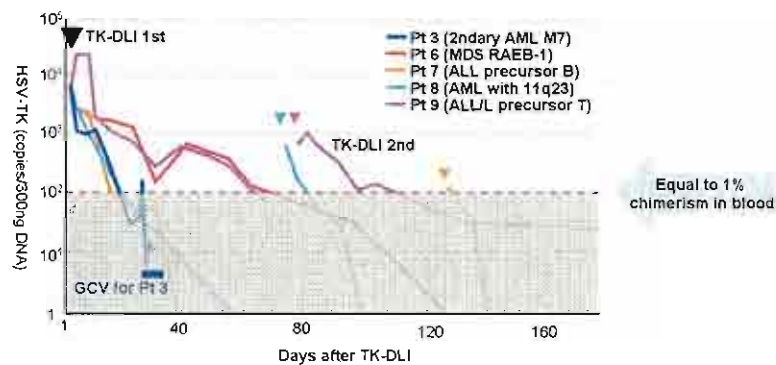


图2

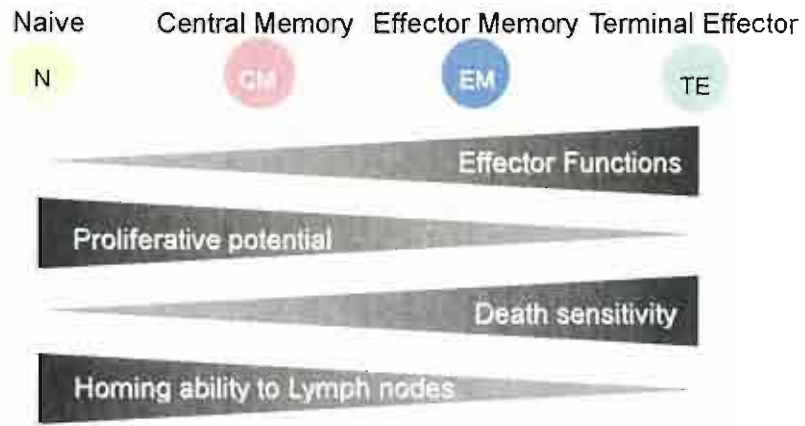


图3

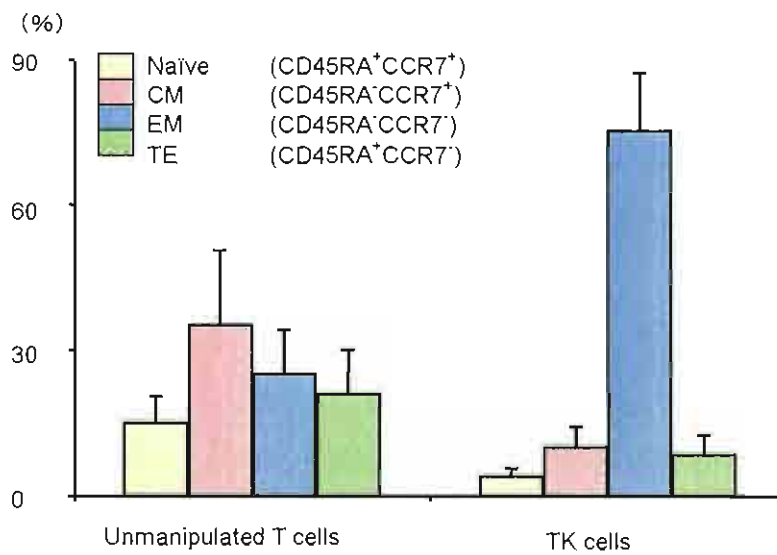


図4

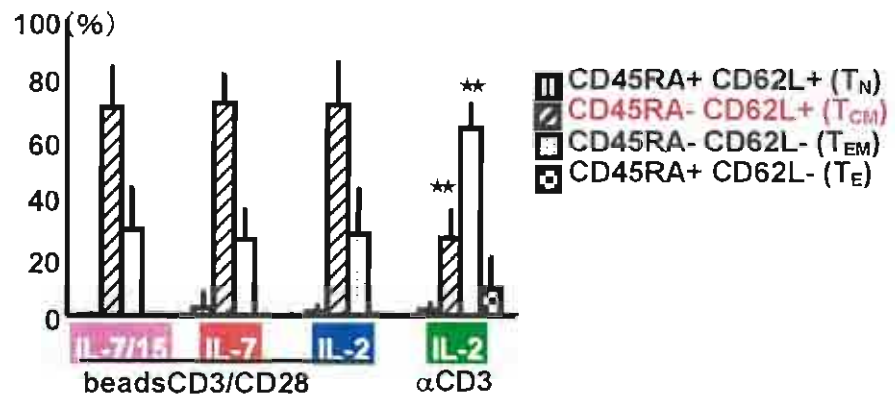
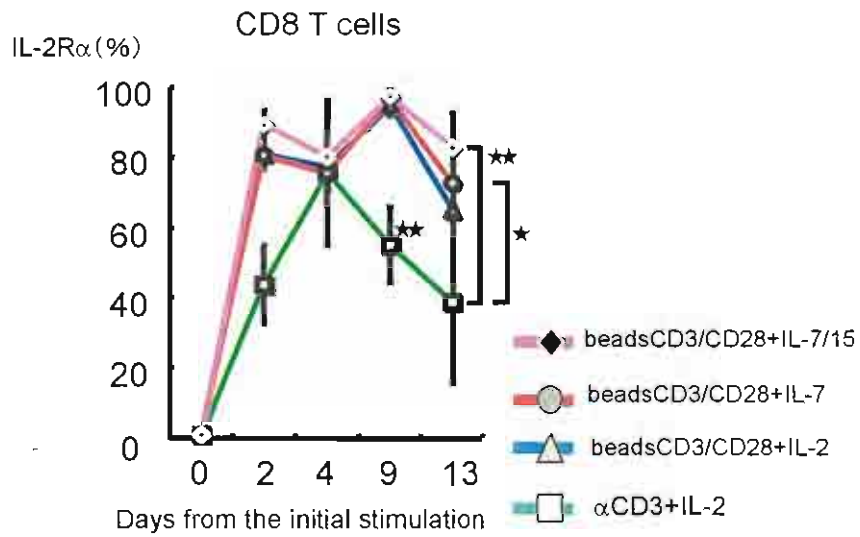


図5



「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

この文書は、あなたにお渡しした同意説明書の内容をおぎなう目的で2009年7月に作られました。

この治療研究が2003年に始まってから、すでに5人の患者さんがこの治療を受けました。その結果、遺伝子治療（遺伝子導入ドナーリンパ球輸注療法）をおこなっても、予想をしていなかったような重い副作用はおこらず、この治療が安全であることや、「ガンシクロビル」というお薬が患者さんの体の中から遺伝子の入ったリンパ球を除去する作用があることを確認しました。今後さらに、あなたを含めて5人の患者さんにこの治療を行い、安全であることを確かめたいと考えています。効果については、この遺伝子治療を行ったのち特別な治療を行わずに4年以上白血病が再発していない患者さんがいらっしゃる一方で、白血病細胞に対する治療効果が不十分で、別のドナーさんからもう一度移植をしたり、あるいはお亡くなりになったりした患者さんもいらっしゃいます。今、生存なさっている方は5人中2人ですが、遺伝子治療を行ったのち治療をしていない患者さんはこの2人中1人のみで、もう1人は別のドナーさんからもう一度移植を受けて生存していらっしゃいます。つまりこの遺伝子治療が効いた方は、現時点で20%です。この成績は決して満足できるものではなく、より効果のある治療法を開発するために、私たちははじめに治療した5人の患者さんの治療の内容や外国で行われている同じような治療法の内容を分析し、また試験管の中での実験や動物を用いた実験を繰り返して、より効果が出るように改良を加えました。

改良したのは、ドナーさんからのリンパ球を増やす方法です。同意説明書に書いてあるように、「レトロウイルスベクター」という「遺伝子の運び屋」を使って治療のための遺伝子をリンパ球に入れますが、そのためにドナーさんのTリンパ球に加える薬品を、今までの「抗CD3抗体」から、「抗CD3/CD28抗体結合ビーズ」へと変更したのです。このことによって最終的に得られる治療用ドナーTリンパ球の質がかなり良くなりました。動物実験では、白血病細胞が表面に出している「めじるし」を攻撃する力が強くなり、患者さんの体の中で治療用のTリンパ球が長く生き残るようになりました。一方、このリンパ球を「ガンシクロビル」でいつでも除去できるという特長に変わりはなく、「移植片対宿主病」などの危険な副作用がおこってもこれを止めることができることには変わりはありません。また、治療用ドナーTリンパ球を作る期間が短くなるので、いままでよりも一ヶ月ほど早く治療を受けられる可能性があります。

なお今までにこの研究で遺伝子治療を行った5人の患者さんの治療の内容、海外での成績や基礎的な実験（培養実験と動物実験）の結果、あるいは細胞調製法の詳しい内容などについて、更にお知りになりたい場合は、担当医までご相談ください。

説明者 _____ 説明日 _____