

遺伝子治療臨床研究実施計画書

課題名「MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注
による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究」

大阪大学医学部附属病院

第 1.2 版：平成 23 年 9 月 22 日作成

記号・略号一覧表

記号・略号	一般名等
ALT	alanine aminotransferase (GPT) (アラニンアミノトランスフェラーゼ)
APTT	activated partial thromboplastin time (活性化部分トロンボプラスチン時間)
AST	aspartate aminotransferase (GOT) (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)
BUN	blood urea nitrogen (尿素窒素)
cDNA	complementary DNA (相補的DNA)
CDR	complementarity determining region (相補性決定領域)
CEA	carcinoembryonic antigen (癌胎児性抗原)
Cr	creatinine (クレアチニン)
CRP	C reactive protein (C反応性蛋白)
CT	computed tomography (コンピューター断層撮影)
CTL	cytotoxic T lymphocyte (細胞傷害性Tリンパ球)
D-bil	direct bilirubin (直接ビリルビン)
DNA	deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
EGFR	epidermal growth factor receptor (上皮細胞成長因子受容体)
ELISPOT	enzyme-linked immunospot
Fbg	fibrinogen (フィブリノゲン)
FDA	Food and Drug Administration (《米》食品医薬品局)
FDP	fibrin degradation products (フィブリン分解産物)
GaLV	Gibbon ape leukemia virus
GMP	Good Manufacturing Practice (医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準)
GVHD	graft-versus-host disease (移植片対宿主病)
HBV	hepatitis B virus (B型肝炎ウイルス)
HCV	hepatitis C virus (C型肝炎ウイルス)
HIV	human immunodeficiency virus (ヒト免疫不全ウイルス)
HLA	human leukocyte antigen (ヒト白血球抗原)
HSA	human serum albumin (ヒト血清アルブミン)
HTLV-1	human T-lymphotrophic virus type 1 (ヒトT細胞向性ウイルス1型)
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (日米EU医薬品規制調和国際会議)

IL-2	interleukin 2 (インターロイキン2)
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
LAM-PCR	linear amplification mediated-PCR
LTR	long terminal repeat (末端反復配列)
MAGE-A4	melanoma associated antigen-A4
MART-1	melanoma antigen recognized by T cells-1 (メラノーマ抗原-1)
MCB	master cell bank (マスターセルバンク)
MHC	major histocompatibility complex (主要組織適合抗原)
MLV	murine leukemia virus (マウス白血病ウイルス)
MoMLV	Moloney murine leukemia virus (モロニーマウス白血病ウイルス)
MSCV	murine stem cell virus (マウス幹細胞ウイルス)
NCI	National Cancer Institute (《米》国立癌研究所)
NIH	National Institutes of Health (《米》国立衛生研究所)
OKT3	Orthoclone OKT3 (オルソクローン OKT3: 抗 CD3 抗体)
PBL	peripheral blood lymphocyte (末梢血リンパ球)
PBMC	peripheral blood mononuclear cell (末梢血単核球)
PCMV	PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus
PCR	polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
PET	positron emission tomography (陽電子放出断層撮影)
PGK	phosphoglycerate kinase (ホスホグリセリンキナーゼ)
PR	partial response (部分奏効)
PT	prothrombin time (プロトロンビン時間)
QOL	quality of life (クオリティ・オブ・ライフ: 生活の質)
RCR	replication competent retrovirus (増殖性レトロウイルス)
rhIL-2	recombinant human interleukin 2 (組換えヒトインターロイキン2)
SCC	squamous cell carcinoma related antigen (扁平上皮癌関連抗原)
T-bil	total bilirubin (総ビリルビン)
TCR	T cell receptor (T細胞受容体)
TIL	tumor-infiltrating lymphocyte (腫瘍浸潤リンパ球)
TRALI	transfusion-related acute lung injury (輸血関連急性肺障害)
UA	ureic acid (尿酸)

目 次

	頁
I. 遺伝子治療臨床研究の名称	9
II. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	10
II.1 総括責任者の氏名	10
II.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割	10
III. 実施施設の名称及びその所在地	12
III.1 当該実施施設の名称及び所在地	12
III.2 細胞を調製する施設の名称及び所在地	12
III.3 当該実施施設以外に本臨床研究の実施を予定する施設の名称及びその所在地	12
IV. 遺伝子治療臨床研究の目的	13
V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	14
V.1 研究の区分	14
V.2 対象疾患に関する現時点での知見	14
V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要	14
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	15
V.5 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由	16
V.5.1 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与の根拠	16
V.5.2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与量の設定根拠	17
VI. 遺伝子の種類及びその導入方法	18
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	18
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造	18
VI.1.1.1 T細胞受容体 (TCR) α鎖遺伝子	18
VI.1.1.2 T細胞受容体 (TCR) β鎖遺伝子	20
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	22
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	23
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	24
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	24
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	24
VI.4.1 遺伝子導入方法の概略	24
VI.4.2 当該導入法を選択した理由	24
VI.4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠	25

VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	25
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	25
VI. 5.2 ウイルスベクターの作製方法	26
VI. 5.2.1 ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa の構築	26
VI. 5.2.2 パッケージング細胞株の構築	33
VI. 5.2.3 ウイルス産生細胞株の構築	33
VI. 5.2.4 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造	34
VI. 5.3 ウイルスベクターの構造	34
VI. 5.4 ウイルスベクターの生物学的特徴	34
VII. 安全性についての評価（ウイルスベクター、遺伝子産物、細胞及びペプチド）	35
VII. 1 遺伝子導入方法の安全性	35
VII. 1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	35
VII. 1.1.1 MCB の作製法	35
VII. 1.1.2 レトロウイルスベクターMs-bPa の製造方法	36
VII. 1.2 患者に投与する物質の純度及びその安全性	38
VII. 1.3 増殖性ウイルス出現の可能性	38
VII. 1.3.1 レトロウイルスベクターの安全性	38
VII. 1.3.2 パッケージング細胞の安全性	39
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	42
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	42
VII. 1.6 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	43
VII. 1.7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	43
VII. 1.8 癌原性の有無	43
VII. 2 遺伝子産物の安全性	44
VII. 3 細胞の安全性	45
VII. 3.1 遺伝子導入細胞の調製方法	45
VII. 3.2 培養細胞の純度	48
VII. 3.3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性	49
VII. 3.4 被験者に投与する細胞の安全性	50
VII. 4 ペプチドの安全性	51
VII. 4.1 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの純度	51
VII. 4.2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの安全性	51
VIII. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	52
IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	54

IX. 1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	54
IX. 1. 1 臨床研究実施体制	54
IX. 1. 1. 1 本臨床研究の実施に際し医療機関内に設置される委員会	54
IX. 1. 1. 2 安全・効果評価・適応判定中央部会	55
IX. 1. 1. 3 遺伝子治療臨床研究審査委員会遺伝子製剤検証部会	56
IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順	57
IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準	58
IX. 2. 1 一次登録	58
IX. 2. 1. 1 選択基準（一次登録）	59
IX. 2. 1. 2 除外基準（一次登録）	59
IX. 2. 2 二次登録	60
IX. 2. 2. 1 選択基準（二次登録）	60
IX. 2. 2. 2 除外基準（二次登録）	61
IX. 3 被験者の同意の取得方法	61
IX. 4 実施期間及び目標症例数	63
IX. 5 遺伝子治療臨床研究の実施方法	64
IX. 5. 1 対照群の設定方法	64
IX. 5. 2 遺伝子導入方法	64
IX. 5. 2. 1 PBMC の採取	64
IX. 5. 2. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球の調製	64
IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入リンパ球の投与	64
IX. 5. 3 前処置及び併用療法の有無	65
IX. 5. 3. 1 前処置	65
IX. 5. 3. 2 MAGE-A4 ₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与	65
IX. 5. 3. 3 併用禁止療法及び併用禁止薬	65
IX. 5. 4 臨床検査項目及び観察項目	65
IX. 5. 5 予測される副作用及びその対処方法	73
IX. 5. 5. 1 アフェレーシスに伴う副作用	73
IX. 5. 5. 2 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注に伴う副作用	74
IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用	74
IX. 5. 6 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	75
IX. 5. 6. 1 主要評価項目	75
IX. 5. 6. 2 副次的評価項目	76
IX. 5. 6. 3 中止基準	78
IX. 5. 7 有害事象が発現した場合の措置	79

IX. 5. 7. 1 有害事象が発現した場合	79
IX. 5. 7. 2 重篤な有害事象が発現した場合	79
IX. 5. 8 症例記録に関する記録用紙等の様式	80
IX. 5. 9 記録の保存及び成績の公表の方法	80
IX. 5. 10 個人情報の保護の徹底	80
IX. 5. 10. 1 個人情報保護に関する責務	80
IX. 5. 10. 2 個人情報の取得と利用に関する制限	81
IX. 5. 10. 3 個人情報保護に関する安全管理措置	82
IX. 5. 10. 4 第三者提供の制限	82
IX. 5. 10. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等	83
X. その他必要な事項	84
X. 1 遵守する法令/省令等	84
X. 2 引用文献	85
X. 3 検査・観察スケジュール	91
X. 4 TNM 病期分類 (TNM Classification of Malignant Tumours)	92
X. 5 Performance Status (Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG))	93
X. 6 RECIST ガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)	94
X. 7 同意・説明文書	96

<実施計画書に添付すべき資料>

遺伝子治療臨床計画実施計画書添付資料

- I 研究者の略歴及び研究業績
- II 実施施設の施設設備の状況
- III 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果
- IV 遺伝子治療臨床研究に関する実施施設以外の内外の研究状況
- V その他必要な資料

<参考資料>

- 参考資料 1： レトロウイルスベクターMS-bPa の全塩基配列
- 参考資料 2： マスターセルバンクの作製方法
- 参考資料 3： マスターセルバンク試験成績書
- 参考資料 4： マスターセルバンクの品質試験
- 参考資料 5： レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法

- 参考資料 6： 製造施設（位置・構造設備）
- 参考資料 7： レトロウイルスベクター試験成績書
- 参考資料 8： レトロウイルスベクターMS-bPa の品質試験
- 参考資料 9： SEPPIC 社 MONTANIDE™ 資料
- 参考資料 10： 遺伝子導入細胞調製に使用する培地等の資料
- 参考資料 11： 遺伝子導入細胞試験成績書
- 参考資料 12： 遺伝子導入調製細胞構成
- 参考資料 13： FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1
- 参考資料 14： 遺伝子導入リンパ球の品質試験
- 参考資料 15： ペプチド製造工程・品質試験報告書
- 参考資料 16： ラット単回皮下投与急性毒性試験
- 参考資料 17： MAGE-A4 抗原発現検査プロトコール
- 参考資料 18： 血液・遺伝子導入細胞の搬送手順書

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子導入リンパ球輸注による治療抵抗性食道癌に対する遺伝子治療臨床研究

II. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療研究において果たす役割

II.1 総括責任者の氏名

土岐 祐一郎

大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科 教授
遺伝子治療臨床研究の総括

II.2 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

氏名	所属	役職	役割分担
和田 尚	大阪大学医学部附属病院 消化器外科	臨床 登録医	試験登録患者の診療
山崎 誠	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科	助教	試験登録患者の診療
宮田 博志	大阪大学大学院医学系研究科 外科系臨床医学専攻 外科学講座 消化器外科	助教	試験登録患者の診療
富山 佳昭	大阪大学医学部附属病院 輸血部	部長 講師	アフエレーシスの管理
珠玖 洋	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	教授	多施設共同臨床研究代表者、 臨床研究薬品質管理者
影山 慎一	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	准教授	レトロウイルスベクター製剤の 品質管理責任者、遺伝子導入細胞 製剤の品質管理責任者
池田 裕明	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	准教授	レトロウイルスベクター製剤の 製造管理責任者、遺伝子導入細胞 製剤の製造管理責任者 遺伝子導入細胞製剤の体内動態 及び免疫反応の評価
今井 奈緒子	三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講座	助教	遺伝子導入細胞製剤の体内動態 及び免疫反応の評価
佐藤 永一	東京医科大学 人体病理学講座	助教	病理組織学的診断

外部協力者

氏名	所属	役職	役割分担
峰野 純一	タカラバイオ株式会社 細胞・遺伝子治療センター	センター 長	ウイルスベクターに関する基礎 的助言及び遺伝子導入 T リンパ 球調製技術の提供と助言、遺伝 子導入細胞製剤の体内動態検 査、RCR 検査及び LAM-PCR に関 する技術提供

Ⅲ. 実施施設の名称及びその所在地

Ⅲ.1 当該実施施設の名称及び所在地

名称：大阪大学医学部附属病院

所在地：〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2番15号

TEL. 06-6879-5111 FAX. 06-6879-3259

Ⅲ.2 細胞を調製する施設の名称及び所在地

名称：三重大学医学部附属病院

所在地：三重県津市江戸橋二丁目174番地

TEL：059-232-1111 FAX：059-321-5276

Ⅲ.3 当該実施施設以外に本臨床研究の実施を予定する施設の名称及びその所在地

名称：三重大学医学部附属病院

所在地：三重県津市江戸橋二丁目174番地

TEL：059-232-1111 FAX：059-321-5276

名称：財団法人 田附興風会医学研究所 北野病院

所在地：大阪市北区扇町2丁目4番20号

TEL：06-6312-8831 FAX：06-6312-8867

IV. 遺伝子治療臨床研究の目的

本臨床研究は、標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）による効果が期待できない治療抵抗性の食道癌患者を対象として、腫瘍抗原 MAGE-A4 を HLA-A2402 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体（T cell receptor : TCR） α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球（TCR 遺伝子導入リンパ球）輸注について、その安全性、体内動態及び臨床効果を以下のエンドポイントにより評価することを目的とする。

① 主要エンドポイント

- 本遺伝子治療の安全性〔有害事象、臨床検査、増殖性レトロウイルス（replication competent retrovirus : RCR）、linear amplification mediated-PCR (LAM-PCR)〕

② 副次エンドポイント

- TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤
- 腫瘍特異的免疫反応
- 腫瘍縮小効果

V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

V.1 研究の区分

遺伝子治療臨床研究

遺伝子標識臨床研究

V.2 対象疾患に関する現時点での知見

食道癌は60歳代男性に多くみられる疾患であり、本邦での年間罹患数（2003年、年齢調整）は男性13,658人、女性2,742人、死亡数（2007年、年齢調整）は男性9,900人、女性1,769人である（文献1：以下(1)と略す）。

食道癌の発生因子として、喫煙、飲酒及び熱い飲食物の嗜好が密接に関係するといわれている。また、アルコール代謝酵素の遺伝子多型と強く関連し、アルコールの第一代謝産物であるアセトアルデヒドの蓄積が原因である可能性が示唆されている(2)。

本邦の食道癌の特徴として、扁平上皮癌が全体の90%以上を占め、また、発生部位が胸部中部食道に多く、欧米の下部食道に多く発生する腺癌とは異なっている。食道癌は縦隔等へ浸潤傾向が強く、また、早期からリンパ節転移をきたす治療困難例が多いため、予後不良癌とされている。

食道癌の治療法はその進行度により、内視鏡的粘膜切除、手術、放射線療法及び化学療法から選択される。近年、食道癌の治療成績は手術や補助療法の進歩により改善が得られているが、全国食道癌登録調査報告書によれば、全体の5年生存率〔TNM病期分類（X.4「TNM病期分類」参照）〕は、0期：70.2%、I期：64.5%、IIa期：51.5%、IIb期：34.0%、III期：19.8%、IVa期：13.7%、IVb期：5.5%と未だ予後不良である(3)。

現在、病期進行食道癌に対する治療法として、シスプラチン（CDDP：白金系抗腫瘍剤）/5-フルオロウラシル（5-FU：葉酸代謝拮抗剤）による化学療法と放射線療法の併用療法（化学放射線療法）が標準的治療法として選択されているが、無効例も少なくない。また、CDDP/5-FUの他、ドセタキセルやパクリタキセル（本邦では食道癌の適応未承認）等のタキソイド系製剤の併用が検討されている。

食道癌では、初回治療が適正に行われたにもかかわらず再発を認めることが多く、再発食道癌に対する治療法は、現在のところ一定の見解が得られていない。その治療にあたっては、もっぱら延命効果の期待あるいは患者の生活の質（quality of life：QOL）改善を目的とし(4)、再発食道癌の50%生存期間は約6ヶ月とされている。

V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本臨床研究では、治療抵抗性の食道癌患者〔ヒト白血球抗原（human leukocyte antigen：HLA）-A2402陽性、腫瘍組織中にMAGE-A4が発現〕から採取した末梢血リンパ球に、MAGE-A4

特異的 TCR α 鎖及び β 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド (9 アミノ酸: NYKRCFPVI) 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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、45 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巣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)。更に、同グループは、高親和性ヒト MART-1 特異的 TCR 遺伝子 (DMF5)、又はマウス由来の gp100 特異的 TCR 遺伝子 (gp100(154)) を導入した T リンパ球を使用することにより、悪性黒色腫患者 36 名中 9 名について腫瘍退縮を観察している (14)。

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-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与を併用する理由

V. 5. 1 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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 (15)。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(15-21)。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ション、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(15, 17-21)。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ション、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, 22)。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-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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 μ 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ション化して用いると有効であることが示されてきた(23, 24)。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(25-29)。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 μ 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(30-34)。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 μ 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(30, 35)。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(30)。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 μ g を設定した。