

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 α 鎖及び β 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) α 鎖遺伝子

TCR α 鎖遺伝子は、TCR α 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR α 8-1 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドに特異的な CTL クローン #2-28(36)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 α 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
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
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
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	*													

V8-1 領域

J10 領域

C 領域

V8-1 領域

J10 領域

C 領域

図1 TCR α 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) β 鎖遺伝子

TCR β 鎖遺伝子は、TCR β 鎖をコードする cDNA で、本臨床研究に用いる遺伝子は TCR β 7-9 である。本遺伝子は HLA-A2402 拘束性 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド特異的な CTL クローン #2-28(36)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 β 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
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
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
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
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 TCRβ 7-9遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

VI. 1.2 人に導入する遺伝子の性質

本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa が細胞に感染すると、MS-bPa のゲノム (図 7 参照) は逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、プロウイルスとなる。プロウイルスは図 3 に示すウイルスプラスミドベクターpMS-bPa と同様の構造を有するが、後述するように、5' -LTR 及び 3' -LTR の由来が異なる。

本臨床研究において導入する遺伝子は、TCR α 鎖と β 鎖をコードする cDNA である。TCR は T 細胞に特異的に発現する抗原認識レセプターであり、免疫系における T 細胞の抗原特異性を決定している。機能的 TCR 分子は抗原認識を行う TCR α β 鎖又は γ δ 鎖のヘテロダイマーからなり、細胞内への直接シグナル伝達を担う CD3 分子群と会合し、TCR-CD3 複合体を形成している。ヒトにおいて TCR α 鎖は 14 番染色体上に、 β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクロノタイプが存在する。

TCR 遺伝子は免疫グロブリン (Ig) と同様に多数の亜型からなる V (variable)、D (diversity)、J (joining) の可変領域と少数の C (constant) の定常領域からなる。その中で α 鎖の可変領域は V-J で β 鎖の可変領域は V-D-J で形成される。TCR 遺伝子は T 細胞の分化に伴い、これらの領域の遺伝子再構成という特徴的な過程を経て機能的遺伝子を形成する。まず D-J の遺伝子再構成が起こり、続いて V-DJ の再構成が生じる。再構成に伴い V-D 及び D-J 間にランダムな塩基配列 (N 領域) が組み込まれ TCR の多様性はさらに増加する。本臨床研究にはこの再構成を経た後の TCR 遺伝子の cDNA を導入する。われわれの使用する TCR α 鎖は V α 8-1、J α 10、C であり、TCR β 鎖は V β 7-9、J β 2-5、C2 の配列である。

レトロウイルスベクターMS-bPa により遺伝子導入された細胞において、TCR α 鎖遺伝子はマウスホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK) 遺伝子プロモーター (P_{PGK}) によって転写される (図 7 参照)。PGK は解糖系の酵素であり、ほとんどの組織において構成的に発現している。マウス P_{PGK} はヒトを含む広範囲の哺乳類細胞において、細胞が増殖中であるか否かを問わずに機能するプロモーターであり、レトロウイルスベクターMS-bPa により導入される P_{PGK} は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。

TCR β 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される (図 7 参照)。レトロウイルスベクターMS-bPa ゲノム RNA の 5' -LTR は R 領域と U5 領域、3' -LTR は U3 領域と R 領域からなり、U5 領域と両端の R 領域は Moloney murine leukemia virus (MoMLV) 由来、U3 領域は murine stem cell virus (MSCV) 由来である。細胞に遺伝子導入されてプロウイルスになると、両末端の LTR はいずれも U3-R-U5 領域の構造をとる。LTR 中では、MSCV 由来の U3 領域が強いプロモーター活性とエンハンサー活性を有する。MSCV LTR は PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus (PCMV) 由来であり、PCMV は murine leukemia virus (MLV) を実験室で継代することにより得られた変異株である。MSCV LTR は胚性幹細胞、胎児癌細胞及びその他の哺乳動物細胞において高い発現レベルを持続的に保持することが可能である。

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

TCR 遺伝子からの生成物は T 細胞における抗原認識レセプター分子である。TCR α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な TCR 分子を構成している。TCR 分子は主要組織適合抗原 (MHC) 拘束性に標的細胞の MHC 分子と抗原ペプチドの複合体を認識する。このことにより、T 細胞は抗原特異性を示す。抗原認識の際の結合力の強弱や補助レセプターからのシグナルの有無により、T 細胞の活性化、アナジの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。

TCR 鎖は Ig スーパーファミリー (IgSF) 分子に属し、2 つの Ig ドメインからなる細胞外領域、20 アミノ酸からなる膜貫通領域、数個のアミノ酸からなる細胞内領域で構成される。2 つの Ig ドメインのうち、N 末端側が可変領域、C 末端側が定常領域に相当する。 α 鎖が 45-60 kDa、 β 鎖が 40-50 kDa で α 鎖と β 鎖は S-S 結合でヘテロ 2 量体を形成し、2 つの Ig ドメインをもってペプチド+MHC との接合面を構成している。

細胞外領域に存在する相補性決定領域 (complementarity determining region : CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に貢献し、CDR3 領域は主としてペプチドを認識するのに必要とされる。つまり、比較的一定のアミノ酸配列による蛋白構造を持つ CDR1、CDR2 領域を介して MHC を認識し、フレキシブルな CDR3 領域が構造変化をとりながらペプチドと結合し、安定化する。また、TCR は MHC の溝に対して、MHC class I 分子とは斜めに、MHC class II 分子とは直角に結合する。

TCR の発現とシグナル伝達には TCR と複合体を形成する 4 種類の CD3 鎖が重要である。細胞外領域に Ig ドメインを 1 つ持ち細胞内領域に活性化モチーフの ITAM を 1 つ持つ CD3 γ 、 δ 、 ϵ 鎖がそれぞれ γ - ϵ 、 δ - ϵ の 2 量体を作り、また、9 アミノ酸の短い細胞外領域と細胞内領域に 4 個の ITAM を持つ ζ 鎖は S-S 結合でホモ 2 量体となり、これら全部を含めて TCR と複合体を 1 単位として形成している。

本遺伝子治療において導入する MAGE-A4 特異的 TCR は、 α 鎖が 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、及び 141 アミノ酸からなる C 領域という構造からなり (図 1 参照)、 β 鎖は 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、及び 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 参照)。これら TCR α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な MAGE-A4 特異的 TCR 分子を構成している。この MAGE-A4 特異的 TCR 分子は、標的細胞あるいは抗原提示細胞上の MHC-class I 分子である HLA-A2402 分子と MAGE-A4 分子由来の抗原ペプチドである MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体によって形作られる構造を特異的に認識し、結合する。T 細胞表面上に存在する CD8 分子は、HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体が MAGE-A4 特異的 TCR 分子と結合する際の結合の安定化に必要であり、CD8 分子の非存在下では本 MAGE-A4 特異的 TCR 分子は機能しない。

本遺伝子治療において T 細胞に導入された本 MAGE-A4 特異的 TCR 分子は、導入された T 細胞が本来持っている CD3 分子鎖群と複合体を形成し、標的細胞あるいは抗原提示細胞上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体を認識するが、認識に際しては CD8 分

子による安定化が必要である為に、CD8 陽性 T 細胞に導入された場合のみに機能的である。導入された MAGE-A4 特異的 TCR による HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの複合体の認識が起こると、複合体を形成した CD3 分子群を通して遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞の分裂・増殖、IFN- γ をはじめとしたサイトカインの産生、及びグランザイム B、パーフォリン等の細胞傷害性分子の放出が起こり、標的細胞の破壊を導く。

VI. 2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

本計画では使用しない。

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

本臨床研究における標的細胞は、治療抵抗性食道癌患者（HLA-A2402 陽性、腫瘍組織に MAGE-A4 発現）末梢血由来の T リンパ球である。その生物学的特徴として、①CTL は癌細胞を認識して破壊する能力を有する、②自己の T リンパ球を輸注した場合は、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病（graft-versus-host disease : GVHD）等の副作用がないことが挙げられる。T リンパ球を標的として 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することで、腫瘍細胞表面上の HLA-A2402 分子と MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己 T 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が期待される。

レトロウイルスベクターは増殖中の細胞に高効率で遺伝子導入することから、本臨床研究では、OKT3 による活性化と T リンパ球増殖因子である IL-2 の存在下で増殖する T リンパ球が標的細胞として使用される。

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

VI. 4. 1 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球（peripheral blood lymphocyte : PBL）に TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するにあたっては、組換えフィブロネクチンフラグメント（レトロネクチン CH-296 ; タカラバイオ（株））をコートした培養バッグ中にて、T リンパ球にレトロウイルスベクター MS-bPa を感染させる。

VI. 4. 2 当該導入法を選択した理由

レトロウイルスベクターは感染した後に逆転写を経て細胞染色体に組み込まれ、細胞ゲノムの複製に伴って複製されるために、導入遺伝子を長期にわたり発現しうる。また、レトロウイルスベクターによる末梢血 T リンパ球への遺伝子導入効率が高いことが知られている。さらに、多くの MoMLV ベースのレトロウイルスベクターがヒト血液細胞への遺伝子導入に利用されており（37-41）、過去の T 細胞遺伝子治療において重篤な副作用は報告され

ていない(13, 37-40)。以上の理由により、自己 PBL への TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入する方法として、レトロウイルスベクターを選択した。

VI. 4.3 レトロウイルスベクターの選択根拠

他の遺伝子導入ベクターとして、アデノウイルスベクターやウイルスを利用しない Naked DNA ベクターが使用されるが、それらは導入遺伝子が細胞染色体に組み込まれて長期にわたり安定に発現する効率が低いことが知られている。例えば、電気穿孔法により Naked DNA が細胞染色体に組み込まれる確率は $1.5/1 \times 10^4$ (42) 又は $1/1 \times 10^4$ (43) 程度であり、アデノウイルスベクターがウイルス自身の DNA を標的細胞のゲノムに組み込む確率は $1/1 \times 10^{3 \sim 5}$ 程度であると報告されている (44)。すなわち、細胞染色体に組み込まれ、長期にわたって導入遺伝子が安定して発現する効率は、これらベクターでは非常に低いものである。

一方、レトロウイルスにより遺伝子導入された細胞において、導入遺伝子は全て細胞染色体に組み込まれている。レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が 50%以上であるとの報告もあり、他の方法に比べると格段に高く (45)、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べて効率よく遺伝子を細胞染色体に組み込むことが可能である。

レトロウイルスベクター MS-bPa を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もともとなる MS-bPa DNA は、野生型レトロウイルス由来の gag、pol、env をコードする遺伝子の全てを欠如しており、この DNA のみを通常の細胞に導入したのではウイルス粒子を産生することはない。また、ウイルスベクター製造に用いるパッケージング細胞株 PG13 は、すでに世界的に広く使用されているパッケージング細胞株であり、American Type Culture Collection (ATCC) から購入可能である (CRL-10686)。本パッケージング細胞株において、gag、pol をコードする DNA 断片と env をコードする DNA 断片とが染色体上の異なった位置に導入されているため、RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられる (46)。

VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

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

レトロウイルスベクター MS-bPa のもともとなる野生型ウイルスは MoMLV であり、以下のようなウイルス学的特徴を持つ (47, 48)。

形態的には直径約 100 nm の球形の C 型粒子に分類され、ウイルスコアをエンベロープが囲っている。ウイルスゲノムは分子量約 3×10^6 の 1 本鎖 RNA で、相同の RNA 分子が 2 分子、ウイルスコア中に存在する。

レトロウイルス科は、オルソレトロウイルス (orthoretrovirus) 及びスプーマレトロウイルス (spumaretrovirus) の 2 つの亜科に分類される。MoMLV はオルソレトロウイルス亜科のガンマレトロウイルス属に属する、マウスを宿主とする白血病ウイルスの一種である。

マウス白血病ウイルスは AKR や C58 系マウスの自然発症白血病の病原ウイルスであるが、MoMLV は実験室内での継代により病原性の高いウイルス株として単離されたものである。オ

ルソレトロウイルスの病原性として、主体となるものは、肉腫、急性白血病、白血病、癌であり、野生マウスの後肢麻痺を招く神経向性ウイルスも知られている。肉腫ウイルスや急性白血病ウイルスはウイルスと細胞の間での遺伝子の組換えにより形成されるが、MoMLVは細胞由来の遺伝子を持たないウイルスであり、AKR や C58 系マウスでのみ白血病を誘発する。病理学的には胸腺リンパ腫を原発とした白血病所見を示し、脾臓への浸潤が顕著に認められる。AKR マウスの自然発症白血病に対しては抗 AKR MLV 血清が効果を示し、発症を遅延させることが報告されているが、MoMLV に対する血清の効果については不明である。ヒトへの感染の報告はない。

VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法

VI. 5. 2. 1 ウイルスプラスミドベクターpMS-bPa の構築

本臨床研究で用いられるレトロウイルスベクターMS-bPa は、レトロウイルスベクターMS-bPa 産生細胞から産生される。この産生細胞は、レトロウイルスベクターMS-bPa のプロウイルス配列をパッケージング細胞 PG-13 の染色体に挿入することにより作製された。レトロウイルスベクターMS-bPa 産生細胞株の構築に使用したウイルスプラスミドベクターpMS-bPa は、標準的な遺伝子工学的手法を用いて構築された。以下に構築手順を述べる。

MS-bPa のベースとなるウイルスプラスミドベクターは pMS で、pMS のマルチプルクロニングサイトに TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{PGK} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域を組み込んだものが pMS-bPa であり、大腸菌プラスミドベクターに由来する部分を省略した遺伝子概略を図 3 に示す。

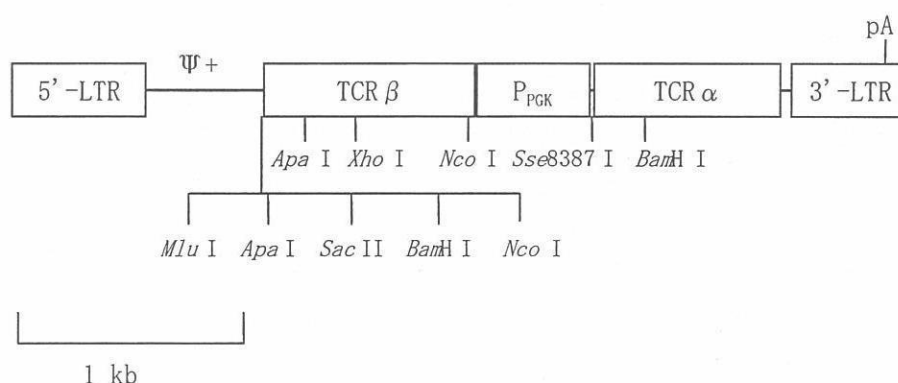


図 3 pMS-bPa の遺伝子概略

TCR β : TCR β 鎖遺伝子のコード域、TCR α : TCR α 鎖遺伝子のコード域、pA: polyA 付加シグナル
 Ψ +: パッケージングシグナル、5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来である。
 大腸菌プラスミドベクターに由来する部分は省略した。

ウイルスプラスミドベクターpMS は、ウイルスプラスミドベクターpMT の 3'-LTR (long terminal repeat; 末端反復配列) を MSCV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものである (49)。ウイルスプラスミドベクターpMT は MoMLV プロウイルスの 5'-LTR 及び 3'-LTR を含み、ウイルス蛋白をコードする配列を全く含まないウイルスプラスミドベクターである (50, 51)。pMS の遺伝子の大腸菌プラスミドベクターに由来する部分を省略した遺伝子概略を図 4 に、pMS の構築手順を図 5 に示す。

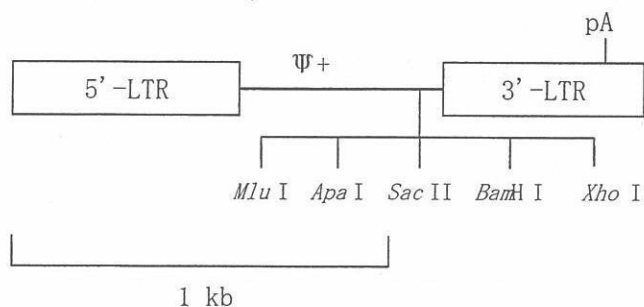


図 4 pMS の遺伝子概略

$\Psi+$: パッケージングシグナル、pA: polyA 付加シグナル
 5'-LTR は MoMLV 由来、3'-LTR は MSCV 由来である。
 大腸菌プラスミドベクターに由来する部分は省略した。

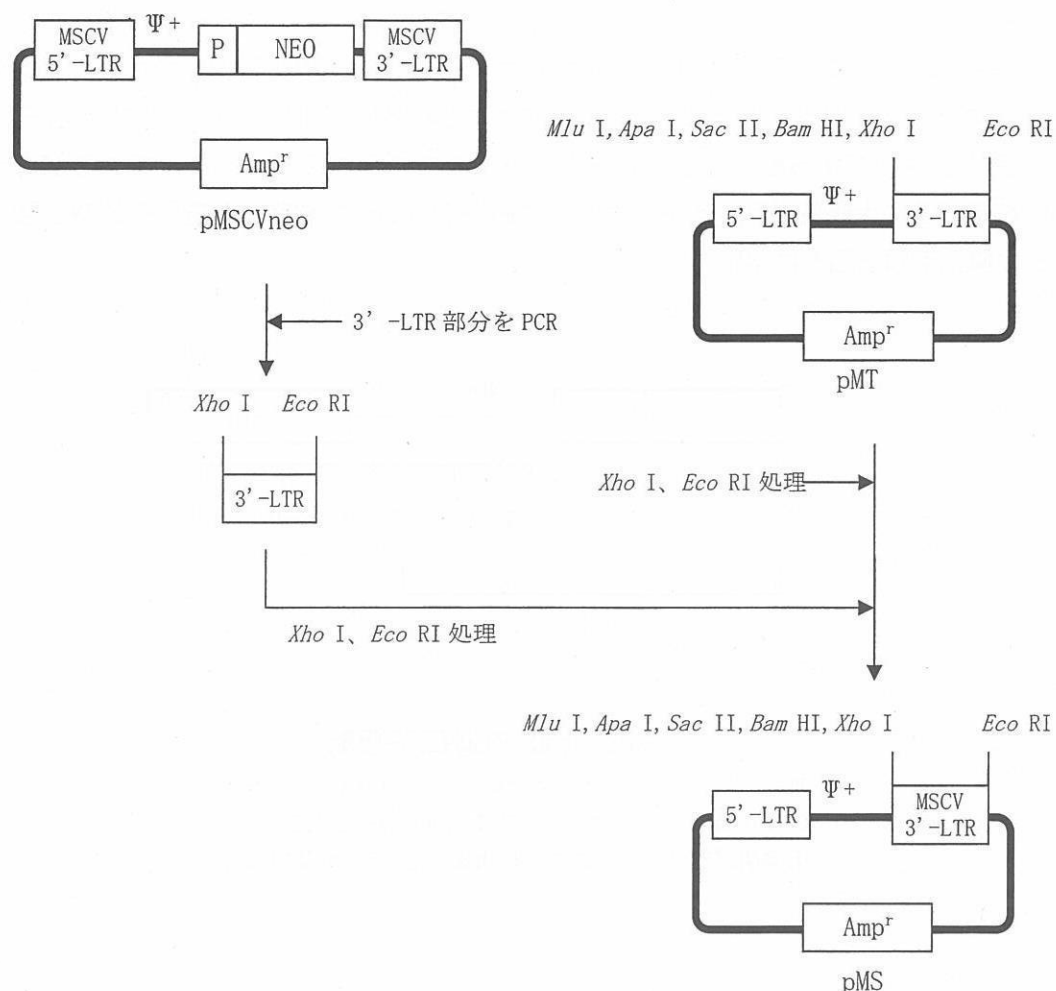


図 5 pMS の構築手順

pMSCVneo(Clontech, Mountain View, CA)を鋳型に、制限酵素 Xho I の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Eco RI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、3'-LTR 部位を増幅して Xho I と Eco RI で切断、pMT ベクターの Xho I - Eco RI サイトにクローニングし、pMS を作製した。

次に pMS-bPa の構築手順を図 6 (29 頁～31 頁) に示す。

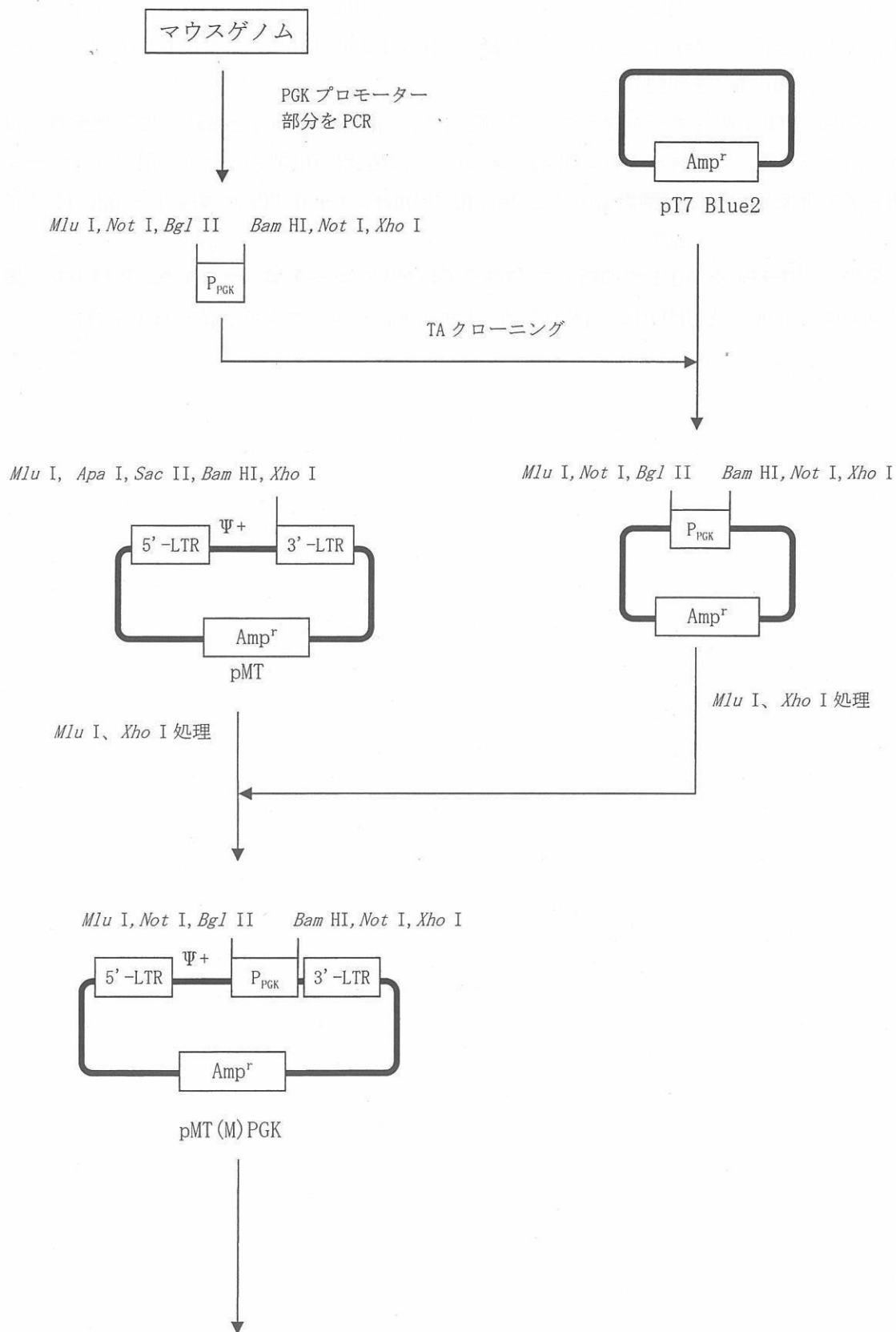
マウスゲノム DNA を鋳型に、制限酵素 Mlu I, Not I 及び Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I, Not I 及び Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い P_{PGK} 配列を増幅し、pT7 Blue2 ベクターに TA クローニングした。次に、このプラスミドから制限酵素 Mlu I と Xho I で P_{PGK} 部位を切り出し、pMT ベクターの Mlu I - Xho I サイトにクローニングし、pMT(M)PGK を作製した。

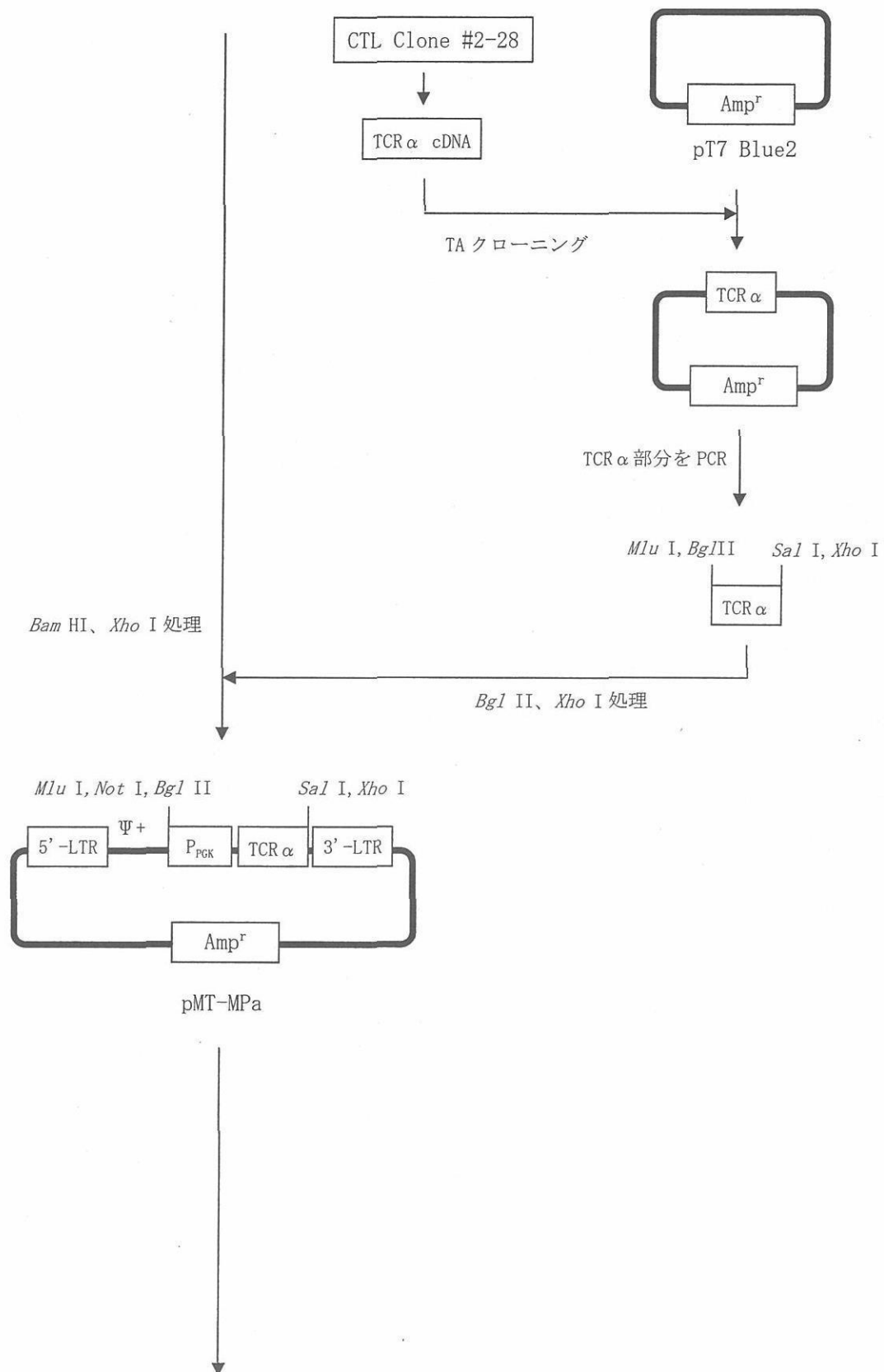
MAGE-A4 CTL Clone #2-28 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA 及び TCR β cDNA のコード域を増幅しそれぞれ pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

TCR α のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Mlu I と Bgl II の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho I と Sal I の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、Bgl II と Xho I で切断、pMT(M)PGK の Bam HI - Xho I サイトにクローニングし、pMT-MPa を作製した。

同様に、TCR β のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Mlu I と Sal I の認識配列が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Bam HI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて PCR を行い、制限酵素 Mlu I と Bam HI で切断して pMT-MPa の Mlu I - Bgl II サイトにクローニングし、pMT-bPa を作製した。

最後に pMT-bPa を Sal I で切断して「TCR β 鎖 cDNA のコード域、マウス P_{PGK} 及び TCR α 鎖 cDNA のコード域」を切り出し、pMS の Xho I サイトにクローニング、pMS-bPa を得た。





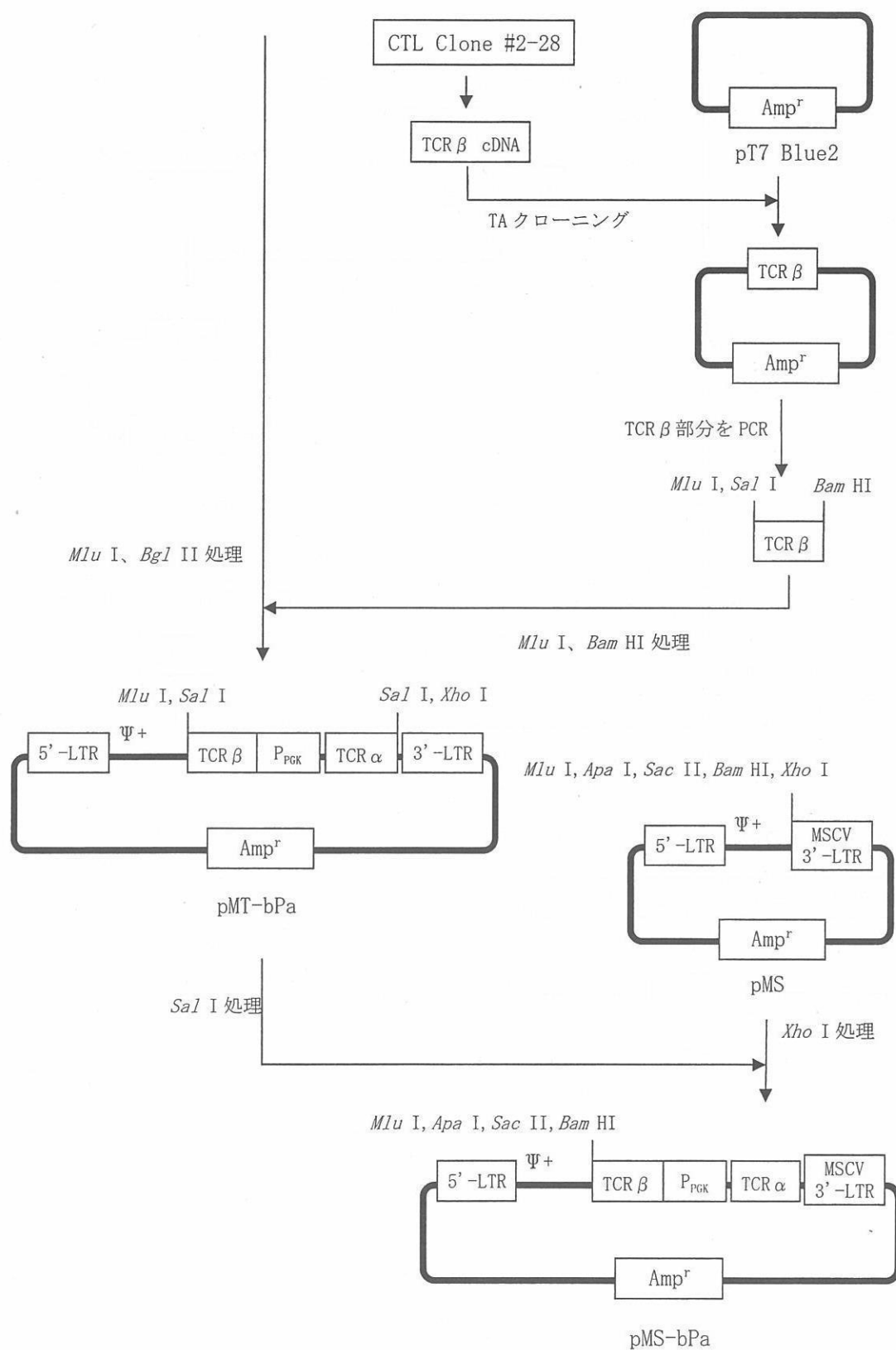


図 6 pMS-bPa の構築手順

VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築

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須な遺伝子である gag、pol、env を欠いているため、この DNA を通常の細胞に導入してもウイルス粒子を産生することはない。したがって、ウイルス粒子の産生にはパッケージング細胞が必要となる。本臨床研究において使用するパッケージング細胞株は、PG13 (ATCC CRL-10686) (46) で、パッケージングに必要なウイルス遺伝子を 2 種類のプラスミド (1 つは gag と pol、もう 1 つは env 遺伝子) で別々に導入した細胞株である。古い世代のパッケージング細胞株と比較して、このアプローチは RCR 出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

以下に、文献 (46, 52) をもとにパッケージング細胞株 PG13 の構築手順を示す。

- 1) MoMLV の gag 遺伝子、pol 遺伝子及び選択マーカーの gpt 遺伝子配列を持ち、かつΨパッケージングシグナル及び 3' -LTR を欠失しており、truncated 5' -LTR プロモーターを持つプラスミド pLGPS、及び単純ヘルペスウイルス 1 型ーチミジンキナーゼ遺伝子がクローニングされた pBR322 プラスミドを、マウス繊維芽細胞株 NIH 3T3 TK に共にトランスフェクションし、HAT 培地 (Hypoxanthine、Amethopterin、Thymidine) で遺伝子導入細胞を選択した。
- 2) 選択した細胞株に、Gibbon ape leukemia virus (GaLV) 由来の env 遺伝子を持ち、かつΨパッケージングシグナルと 3' -LTR を持たないプラスミド pMOV-GaLV Seato env 及び変異型 Dihydrofolate reductase 遺伝子を持つプラスミド pFR400 を共にトランスフェクションし、Methotrexate で env 遺伝子導入細胞を選択した。使用した全てのプラスミドは、Ψパッケージングシグナルと 3' -LTR を持たないため、この方法により、ウイルス由来の gag、pol、env は発現するが RCR を産生しないパッケージング細胞株 PG13 を樹立した。

VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築

gag-pol 遺伝子発現プラスミドである pGP、エコトロピック env 遺伝子発現プラスミドである pE-eco 及びウイルスプラスミドベクターpMS-bPa を 293T 細胞にコトランスフェクトした。培養上清中には、マウス由来のパッケージング細胞である PG13 に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクターMS-bPa が一過性に産生される。この培養上清を PG13 細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから産生されるレトロウイルスベクターMS-bPa の力価をリアルタイム RT-PCR により測定し、高力価なアンフォトロピックウイルスを産生するクローン MS-bPa #20 を得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。

VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造

本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa は、ウイルス産生細胞株のMCBを培養し、その上清中にウイルス粒子の状態で存在する。

製造は全て管理された製造エリアにて医薬品の製造管理及び品質管理に関する基準 (Good Manufacturing Practice : GMP) 遵守下で行われる。

VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造

レトロウイルスベクターMS-bPa のゲノム構造の概略を図 7 に示す。また、全塩基配列を参考資料 1「レトロウイルスベクターMS-bPa の全塩基配列」に示す。レトロウイルスベクターMS-bPa はパッケージングシグナルとして Ψ^+ を有し、gag、pol、env をコードする配列を持たない。

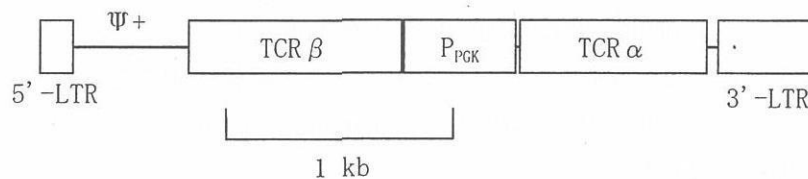


図 7 MS-bPa ベクターのゲノム構造概略

5'-LTR 及び 3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来、3'-LTR の U3 領域は MSCV 由来である。

VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴

パッケージング細胞株 PG13 は、GaLV のエンベロープ蛋白を持つレトロウイルスベクターを製造するためのパッケージング細胞株で、この細胞により産生されるレトロウイルスベクターはラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。レトロウイルスは増殖中の細胞にのみ感染するので、遺伝子導入に先立って標的細胞を組換えヒトインターロイキン 2 (rhIL-2) と OKT3 で刺激する。これにより高い遺伝子導入効率が期待できる。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、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。

「VI. 4. 3 レトロウイルスベクターの選択根拠」の項で述べたように、レトロウイルスベクターを用いた場合、他のベクターに比べてより効率よく遺伝子を導入し、細胞染色体に組み込むことが可能である。

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）

VII.1 遺伝子導入方法の安全性

VII.1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

本臨床研究に用いるレトロウイルスベクターMS-bPa は、パッケージング細胞 PG13 を用いて樹立したウイルス産生細胞 MS-bPa #20 から産生される。レトロウイルスベクターMS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生源産のものを使用する。

VII.1.1.1 MCB の作製法

MCB の作製フローを図 8 に示す。ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより、Primary Seed Bank が作製された。GMP 製造施設の管理区域にて 1 バイアルの Primary Seed Bank が拡大培養され、最終的に 114 バイアルのウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。なお、作製に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 2「マスターセルバンクの作製方法」に記載する。

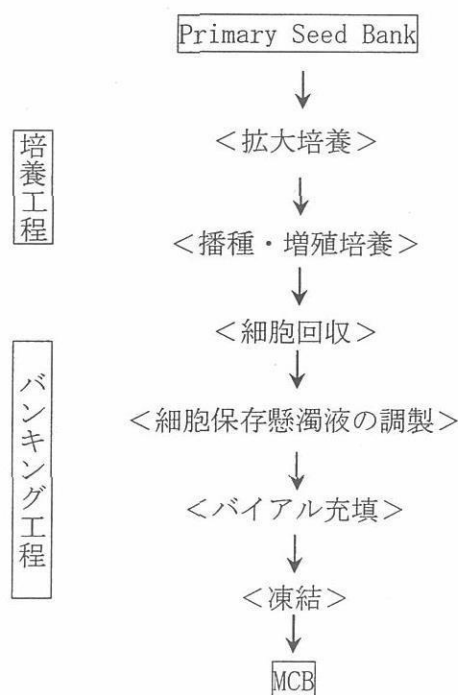


図 8 MCB の作製フロー

作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた（参考資料 3「マスターセルバンク試験成績書」参照）。なお、品質試験方法の概要は、参考資料 4「マスターセルバンクの品質試験」に示す。

1. マイコプラズマ否定試験（培養法、DNA 染色法）
2. in vivo ウイルス試験
3. in vitro ウイルス試験
4. RCR 試験（細胞）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
6. XC プラークアッセイ
7. マウス抗体産生試験（MAP 試験）
8. 無菌試験（日本薬局方）
9. ウシウイルス試験
10. ヒトウイルス試験
11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験
13. 導入遺伝子配列解析
14. 細胞生存率試験（トリパンブルー）
15. 産生ウイルスの力価試験
16. 導入遺伝子の機能確認

VII. 1. 1. 2 レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法

レトロウイルスベクターMS-bPa の製造フローを図 9 に示す。レトロウイルスベクターMS-bPa の製造は、4 バイアルの MCB を用いて行う。MCB の細胞を解凍後、培養を開始し、拡大培養により 5 個の大量静置培養用容器まで増殖させる。大量静置培養用容器において培養細胞が接着面いっぱいに広がった状態に達した後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクター製造工程に用いる。0.22 μm の濾過フィルターによる無菌濾過を経て培養上清液を回収した後、ウイルスベクターとして凍結保存バッグに小分け分注を行い、使用時まで凍結保存する。

製造に使用する培地及び試薬等を含めた詳細な製造工程、培養条件及び保存条件等を参考資料 5「レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法」に記載する。製造は、共同実施施設である三重大学医学部の研究者が製造管理責任者となり、全てタカラバイオ社の管理された製造エリア（参考資料 6「製造施設（位置・構造設備）」）にて GMP 遵守下で行われる。また、タカラバイオ社の製造施設から三重大学医学部内細胞調製施設へのウイルスベクターの輸送は、凍結・ドライアイス詰で、輸送中の温度変化をモニター・記録して行う。

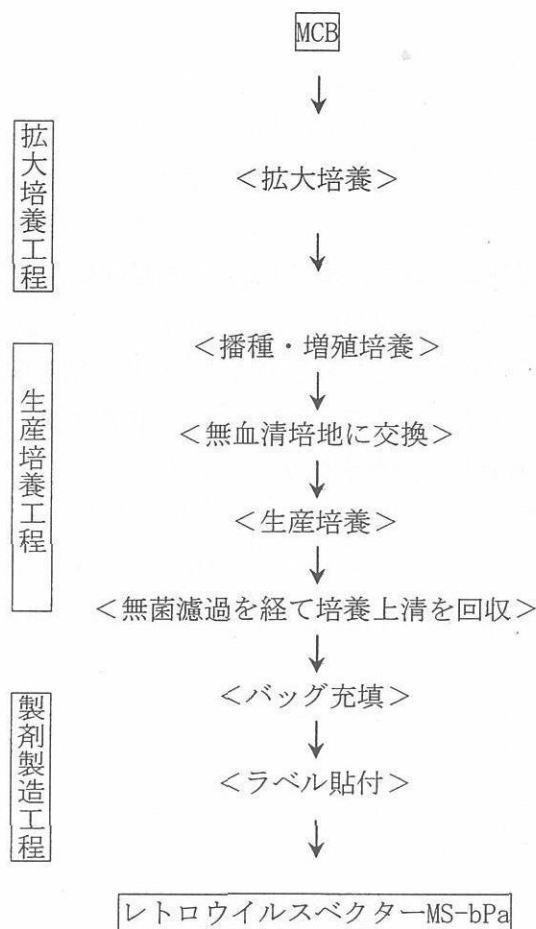


図9 レトロウイルスベクターMS-bPaの製造フロー

レトロウイルスベクターMS-bPa に関しては、以下の品質試験を行う（1 ロットの結果を参考資料7「レトロウイルスベクター試験成績書」に示す）。なお、品質試験方法の概略は、参考資料8「レトロウイルスベクターMS-bPaの品質試験」に示す。

1. マイコプラズマ否定試験（培養法）
2. in vivo ウイルス試験
3. in vitro ウイルス試験
4. RCR 試験（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
5. 無菌試験（日本薬局方）
6. エンドトキシン試験（日本薬局方）
7. 導入遺伝子配列解析
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(53)。図 10 にその概念図を示す。

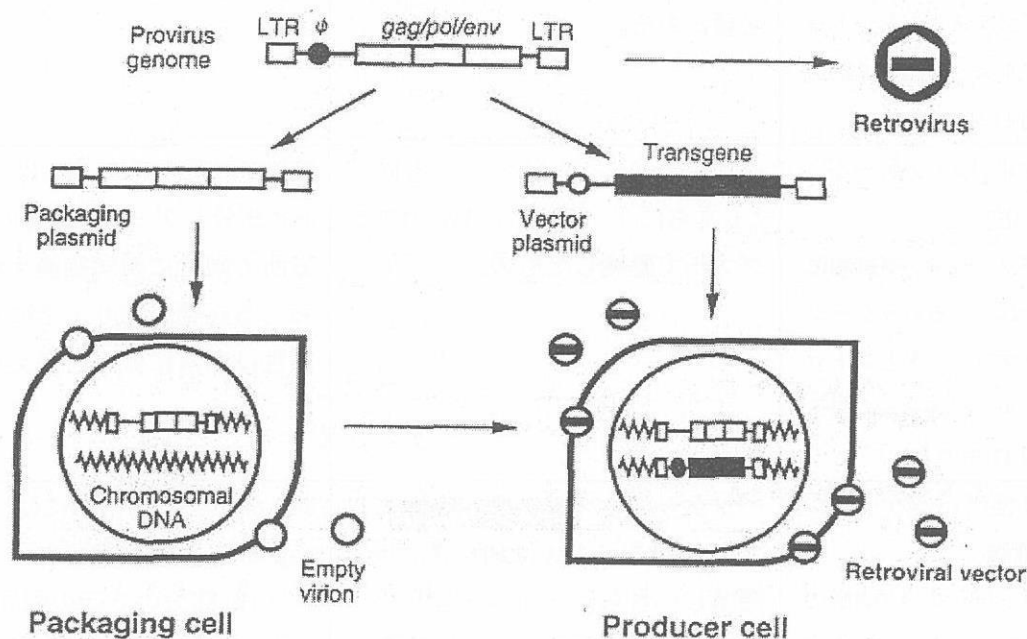


図 10 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 53 より転載)

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(53)。

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
第1世代パッケージング細胞 (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)	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。	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。
第2世代パッケージング細胞 (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)	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。	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。
第3世代パッケージング細胞 (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)	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。	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。

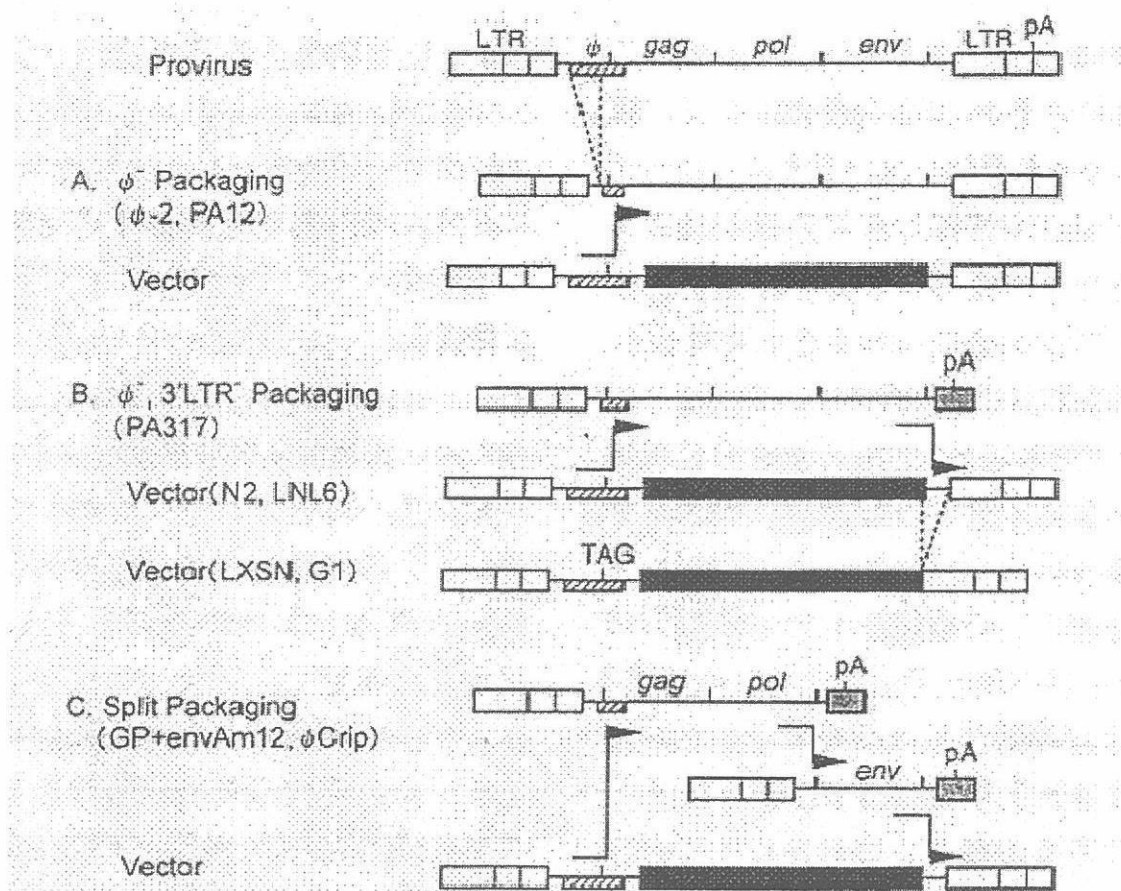


図 11 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 53 より転載)

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。

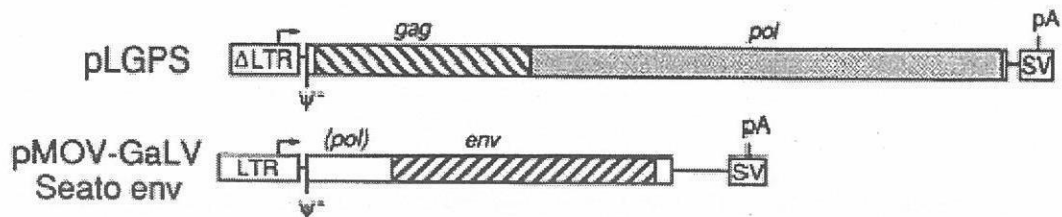


図 12 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造
(引用文献 46 より転載)

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 (54) 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 (54)。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(55)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 (56-58)。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 (59)。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 (60, 61)。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 例の骨髓異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている (62, 63)。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 (64)。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, 37-40)。

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 (65)。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 (66)。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 (67)。

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 (68, 69) 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を単独で使用的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(70)。

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

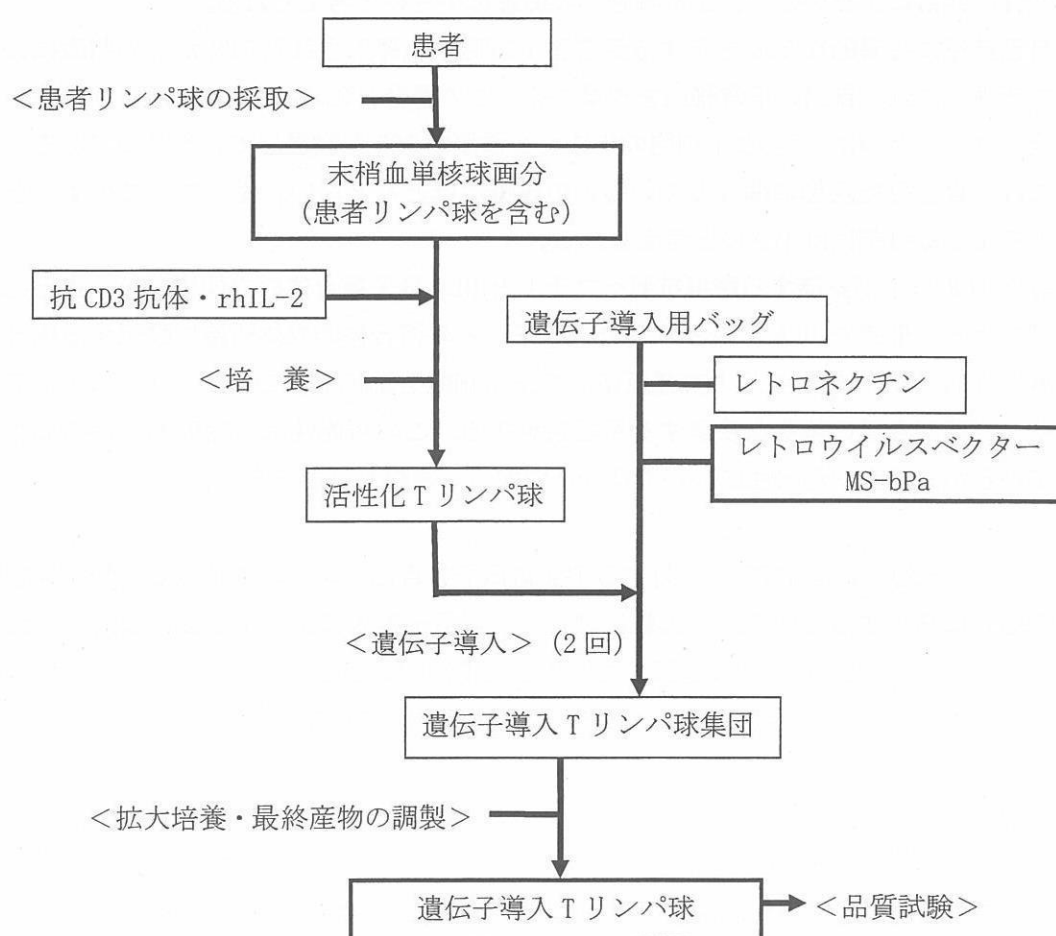


図 13 遺伝子導入細胞調製工程の概略

レトロウイルスベクターMS-bPaを用いた遺伝子導入Tリンパ球調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（ 2×10^8 個、 1×10^9 個、又は 5×10^9 個）から、培養ユニットを決定し、培養ユニットに応じた以下の個数を満たす患者リンパ球を採取し、遺伝子導入細胞の調製に使用する。

培養ユニット数	1	2～4
患者投与に必要な遺伝子導入細胞数（個）	2×10^8 個又は 1×10^9 個	5×10^9 個

患者からのリンパ球と血漿の採取は、大阪大学医学部附属病院輸血部において、血液成分分離装置 COBE SPECTRA（GAMBRO BCT 社）を用いて実施する。

採取された患者リンパ球を三重大学の細胞調製施設に搬送し、セルプロセッサを用いて患者リンパ球の濃縮と PBS/11.8% ACD-A 溶液による洗浄を行った後、生細胞数及び細胞生存率を測定する。抗 CD3 抗体（30 ng/mL）を添加した培養用培地〔基本培地 GT-T503、600 IU/mL rhIL-2、1%非働化患者血漿、0.2% HSA 及び $2.5 \mu\text{g/mL}$ アムホテリシン B 含有。〕に患者リンパ球を $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内にて培養を開始する。

遺伝子導入用バッグにレトロネクチン CH-296（ $20 \mu\text{g/mL}$ ）を添加して薬用保冷庫にて保存する。

基本培地 GT-T503 の組成及びレトロネクチン CH-296 の試験成績書を参考資料 10-1 及び 10-2 に示す。

第2日：レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを PBS で洗浄した後に、レトロウイルスベクターMS-bPa を添加（30 mL/バッグ）する。 $2,000 \times g$ 、 32°C 、2 時間遠心した後に、MS-bPa を除き 1.5% HSA/PBS で洗浄した後に、同液を保存液として添加し薬用保冷庫にて保存する。

第3日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数及び細胞生存率を測定し、遠心分離機にて $500 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$ で 20 分間遠心し、細胞を濃縮・回収する。レトロウイルスベクターMS-bPa 結合バッグの保存液を捨てる。ここに活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、 $1,000 \times g$ 、 $32 \pm 3^\circ\text{C}$ で 10 分間遠心する。遺伝子導入操作後、4 時間、5% CO_2 インキュベーターで培養した後、細胞を回収し、新鮮な培養用培地にて $1(\pm 0.1) \times 10^6$ 個/mL となるように懸濁し、ガス透過性培養用バッグを使用し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター内にて培養を開始する。

第4日：第3日と同様の遺伝子導入操作を行う。遺伝子導入操作後の細胞濃度は $0.5(\pm 0.05)$

×10⁶個/mLにて培養する。

第7～9日：セルプロセッサを用いて細胞の洗浄と濃縮をHSA含RPMI1640で行い、1.6～10×10⁷細胞/mLとなるようにRPMI1640に懸濁する。その後、HSA含CP-1と1:1の割合で混合する。HSA含CP-1と混合した遺伝子導入Tリンパ球は、投与に必要な細胞数に相当する液量を凍結保存専用バッグに充填した後に温度管理されたディープフリーザー（-80℃）にて凍結し使用時まで保存する。また、同懸濁液の一部を凍結保存後の細胞生存率試験用に凍結保存用バイアルに分注し同様に凍結保存する。

RPMI1640及びCP-1の組成を参考資料10-3及び10-4に示す。

投与前：凍結保存後の細胞生存率試験として、凍結保存バイアルをディープフリーザー（-80℃）より取り出し、37℃温浴にて急速に解凍した後、遺伝子導入Tリンパ球生存率を測定する。また、輸注用細胞と同時に搬送した凍結保存バイアルを用い実施施設にて凍結保存細胞の生存率を測定する。

投与日：凍結保存バッグにて保存された遺伝子導入Tリンパ球を投与直前に37℃温浴にて急速に解凍し、投与する。

VII. 3. 2 培養細胞の純度

遺伝子導入される細胞は、OKT3により活性化され増殖期にある患者自己由来のTリンパ球である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の遺伝子導入細胞の比率は20%程度であり（参考資料11「遺伝子導入細胞試験成績書」参照）、Tリンパ球が95%以上を占め、若干のBリンパ球が含まれていた（参考資料12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。患者に投与される細胞中にも、遺伝子導入されていないTリンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題ないと考えられる。また、仮にTリンパ球以外に遺伝子導入された場合には、発現したTCR分子は受容体としての機能を発揮しないと考えられることから、生体への影響が発生する可能性は低いと考えられる。

遺伝子導入により、導入遺伝子の本来の機能とは関係なく移入細胞の腫瘍化を誘導する確率が一定程度に存在すると考えられる。ただし造血幹細胞以外の細胞に遺伝子導入された場合には、血液系細胞はいずれもその生理的寿命が限られていることから腫瘍が発生する確率は極めて低いと考えられる。なお、造血幹細胞の混入については、①培養開始時点の患者末梢血リンパ球中の造血幹細胞の比率は極めて低いこと（通常0.1%以下）、②Tリンパ球を活性化させる今回の培養条件ではレトロウイルス感染時に造血幹細胞が分裂増殖している可能性が極めて低いこと、③造血幹細胞の増殖に必要なサイトカイン等を含まない条件で増殖培養されることを総合すると、遺伝子導入された造血幹細胞が混入する可能性は極めて低いと考えられる。実際に、健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝

子導入後の細胞中の CD34 陽性細胞の比率は 0.1%未満（検出限界以下）であった（参考資料 12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。一方、レトロウイルスベクターでの遺伝子導入により白血病発症が認められた、CD34 陽性細胞を遺伝子導入の標的細胞としたフランス及びイギリスの X-SCID 遺伝子治療では、抗 CD34 抗体を用いて純化した CD34 陽性細胞を用いて、FLT3 リガンド、IL-3 及び幹細胞因子等のサイトカインを加えた条件で培養されており（参考資料 13「FDA CBER CTGTAC, March 4, 2005. Table 1」参照）、今回の遺伝子導入細胞の培養条件とは大きく異なっている。ただし、万が一、造血幹細胞に遺伝子導入された場合には腫瘍発生リスクを否定できないことから、投与後の遺伝子導入細胞のクローン増殖をモニタリングする予定である。

培養細胞間の相互汚染及び取違えを防ぐために、細胞調製施設内の同一の部屋で同時に複数バッチの細胞調製は行わない。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作は P2 レベルの細胞調製施設内で行う。細胞やレトロウイルスベクター等が作業エリア内の空気に直接暴露される操作は清浄度クラス 100、クラス II の安全キャビネット内で行い、感染性微生物の混入を防ぐとともにレトロウイルスベクター MS-bPa の環境中への拡散を防止する。

また、細胞培養の際に使用する OKT3 の洗浄後の残留濃度は極めて微量であり、これらの刺激性物質が生体に及ぼす影響は限りなく少ない。

TCR 遺伝子導入リンパ球は、三重大学医学部内に設置した P2 レベルの細胞調製施設において調製され、以下「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に記載の試験によって品質が担保される。

VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

遺伝子導入細胞調製にあたっては、患者リンパ球を OKT3 により刺激した後にレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入を行うとともに、ex vivo での培養を行う。

リンパ球と遺伝子導入細胞の遺伝子型の違いは、後者には TCR α 鎖及び β 鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクター MS-bPa のプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人 PBL であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCR によるモニタリングを行う予定である（「VII. 1. 8 癌原性の有無」参照）。

OKT3 で刺激することによって CD3 陽性細胞が活発に増殖し、その結果として CD3 陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球を ex vivo で培養すると CD4 陽性細胞の割合が減少し、CD8 陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。

2002 年のフランスの Sauce らによる報告では、リンパ球を含む PBMC を OKT3 や IL-2 を含む培地で ex vivo にて培養するとリンパ球表面の CD4/CD8 の比率は減少し、CD62L、CCR7、

CD45RA、CD27、CD28 の発現も徐々に低下する。代わりに、CD45RO、CD25、CD154、CD40、CD80、CD86、CD95、HLA-DR 等の発現は増大する。ただし、レトロウイルスベクターの感染によるリンパ球の表現型の変化は特に認められないことを報告している(71)。

ex vivo で培養したリンパ球や TCR 遺伝子を導入したリンパ球を用いた Rosenberg SA らの臨床研究では、移入 T 細胞の安全性に対する問題は報告されていない(9, 13, 72, 73)。さらに、レトロウイルスベクターにより TCR 遺伝子を導入した臨床試験では、6 日から 9 日という比較的短期間の ex vivo 培養 T リンパ球の群において移入 T リンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている(13)。本計画においても T リンパ球の培養期間はこれと同程度に抑えている。

VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性

被験者に投与する細胞は、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被験者個人由来の T リンパ球である。細胞調製の際に用いられる培地の成分、レトロウイルスベクターMS-bPa の成分、種々の試薬、抗体等に関しては、遺伝子導入細胞を凍結保存する前に RPMI1640 で十分に洗浄される。そのため被験者に投与される量は極めて少なく、これらが直接影響を及ぼすことはないと考えられるが、細胞調製終了後、培養上清又は凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を検体として採取し、以下の試験を行うことにより品質を担保する（品質試験方法の概要を参考資料 14「遺伝子導入リンパ球の品質試験」に、健常人リンパ球での試験調製での結果を参考資料 11「遺伝子導入細胞試験成績書」に示す）。全ての品質試験結果が得られて安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. マイコプラズマ否定試験（PCR 法）
2. RCR 試験（RT-PCR 法）
3. 無菌試験（日本薬局方）
4. エンドトキシン試験（日本薬局方）
5. 細胞生存率試験（トリパンブルー）
6. 細胞数試験
7. 遺伝子導入効率試験
8. 導入遺伝子の機能試験

被験者への投与の際は、凍結保存専用バッグ中に凍結された細胞懸濁液を投与直前に 37℃温浴にて急速に解凍し、RPMI1640 培地と HSA 含 CP-1 とが 1:1 の割合で混合された細胞懸濁液として静脈内投与される（生理食塩水の追加により投与液量を調整する場合がある）。

なお、品質試験の検体を採取した後の工程としては、閉鎖系操作による凍結保存専用バッグへの充填、凍結、解凍、及び閉鎖系操作による輸注用バッグ又は注射器への移し替え

であり、不純物混入のリスクは極めて低いと考えられる。また、凍結・解凍による細胞生存率の低下については、凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を別途バイアルに凍結保存し、投与日以前に細胞生存率を測定することにより確認する。

VII. 4 ペプチドの安全性

VII. 4.1 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの純度

本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは米国 NeoMPS 社において GMP 準拠で製造された。その製造工程の概略と品質試験の結果を参考資料 15「ペプチド製造工程・品質試験報告書」に示す。その純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であった。またエンドトキシンは 0.100 EU/mg 未満であり、無菌試験により無菌性が確認されている。

VII. 4.2 MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの安全性

腫瘍ワクチンの臨床試験はこれまでに国内外ですでに主要なものだけでも 1,300 名以上の対象者につき報告されている(74)。その中でも CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は最も多数行われており、米国の Rosenberg らのグループだけでも 2004 年の時点で総数 381 名の患者に腫瘍抗原ペプチドワクチンを投与している(74)。しかしながらこれら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、現在までに重篤な副作用の報告はない(30)。軽微な副作用として、皮膚反応（注射部位の発赤、腫脹）、微熱、倦怠感等が報告されている。本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドはラットにおける単回皮下投与毒性試験を実施した（株式会社三菱化学安全科学研究所 熊本研究所、熊本県宇土市栗崎町 1285 番地）。ヒトへの投与量として予定している 300 µg/body を投与した結果、一般状態の変化及びペプチド投与に関連する体重の変化は認められず、また病理学的検査においても異常は認められなかった。（参考資料 16「ラット単回皮下投与急性毒性試験」参照。MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは資料中「MAGE-A4-A24」に該当）。以上より MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの投与において重篤な副作用が出現する可能性は極めて小さいと考えられる。なお、有害事象が発現した場合には、「IX. 5. 5. 3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

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

以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。

①臨床ニーズ

再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。

②品質・安全性

本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 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を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。

本臨床研究で遺伝子導入する細胞は、小児由来の造血幹細胞ではなく、成人末梢血由来の T リンパ球であり、T リンパ球への遺伝子導入の場合、レトロウイルスベクターによる癌化のリスクは極めて低く、対象疾患（治療抵抗性食道癌）とのリスク・ベネフィットを総括すると、レトロウイルスベクターを使用した遺伝子治療の施行に問題はない。

免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与群に特異的な毒性所見は観察されなかった（添付資料、52 ページ）。

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg SA らのグループで既の実績がある（添付資料、62～64 ページ）。

③期待される有効性

共同実施施設である三重大学にて調製された 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）。

NIH の Rosenberg SA らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例（12%）に PR（partial response：部分奏効）を認めており（13）（添付資料、62 ページ）、さらに、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) (添付資料、64 ページ)。

したがって、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。

④当施設・研究者の能力

当施設の総括責任者及び研究者 (宮田、山崎、和田、富山) はリンパ球アフェレーシス、細胞品質管理、腫瘍抗原由来蛋白を用いた癌ワクチン臨床試験の実施と末梢血を用いた免疫学的解析の経験者であり、さらに対象疾患である食道癌に対する十分な臨床経験 (食道癌治療 150 例以上) を有している。これらのことから、当施設における研究者は本臨床研究を行うために必要な能力を十分に有していると判断する。

⑤臨床研究薬の調製

被験者へ投与される TCR 遺伝子導入リンパ球は、遺伝子ベクター調製、リンパ球アフェレーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者である三重大学大学院医学系研究科の珠玖、影山、池田による監督・管理下のもとで三重大学にて調製される。

⑥安全・効果評価・適応判定部会

本臨床研究は多施設共同臨床研究として実施されることから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一された評価基準にて行うことが必要である。そのため、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会の委員から安全性や有効性の評価、適応の判定を行うための委員を選出し、安全・効果評価・適応判定部会を設置する。なお、安全・効果評価・適応判定部会の詳細については第Ⅸ章及び別途作成する手順書に従う。