

平成 25 年 3 月 5 日

三重大学医学部附属病院、愛媛大学医学部附属病院、藤田保健衛生大学病院及び名古屋大学医学部附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について

遺伝子治療臨床研究作業委員会

委員長 島田 隆

三重大学医学部附属病院、愛媛大学医学部附属病院、藤田保健衛生大学病院及び名古屋大学医学部附属病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
申請者：三重大学医学部附属病院 病院長 竹田 寛
申請日：平成 24 年 7 月 23 日
2. MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
申請者：愛媛大学医学部附属病院 病院長 檜垣 實男
申請日：平成 24 年 7 月 23 日
3. MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
申請者：藤田保健衛生大学病院 病院長 星長 清隆
申請日：平成 24 年 7 月 23 日
4. MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
申請者：名古屋大学医学部附属病院 病院長 松尾 清一
申請日：平成 24 年 7 月 23 日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名: MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究

(2) 申請年月日: 平成 24 年 7 月 23 日

(3) 実施施設: 1. 三重大学医学部附属病院

代表者: 病院長 竹田 寛

2. 愛媛大学医学部附属病院

病院長 檜垣 実男

3. 藤田保健衛生大学病院

病院長 星長 清隆

4. 名古屋大学医学部附属病院

病院長 松尾 清一

注) 本臨床研究は上記 4 施設による多施設共同研究として実施予定である。

(4) 総括責任者: 1. 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 大学教員 珠玖 洋

2. 愛媛大学大学院医学系研究科

生体統御内科学 教授 安川 正貴

3. 藤田保健衛生大学医学部

血液内科 教授 恵美 宣彦

4. 名古屋大学大学院医学系研究科

血液・腫瘍内科学 教授 直江 知樹

(5) 対象疾患: 急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群

導入遺伝子: WT1 抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖遺伝子

ベクターの種類: レトロウイルスベクター

用法・用量: 腫瘍抗原 WT1 を認識する TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した自己リンパ球を経静脈的に 2 回 (2 回目は初回投与から 28 日後) 投与し、投与後 2 日目及び 16 日目に WT1 ペプチド 300 μ g を皮下投与する。TCR 遺伝子導入リンパ球の投与量は、低用量 (2×10^8 cells)、中用量 (1×10^9 cells)、高用量 (5×10^9 cells) の 3 群とする。

注) TCR 遺伝子導入リンパ球の調製は三重大学の細胞調製施設で行うこととし、三重大学以外の各施設においては、患者から採取した末梢血を三重大学へ輸送し、遺伝子導入が行われた後に元の施設に輸送される。

研究実施期間： 厚生労働大臣より了承された日から2年間

目標症例数： 4施設合計9例（低用量3例、中用量3例、高用量3例。重篤な有害事象が発現した場合には、安全性確認のため症例数の追加を行う。）

(6) 研究の概略：

本研究は、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者を対象として、WT1抗原をHLA-A*24:02存在下で特異的に認識するT細胞受容体（TCR） α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCRにより遺伝子導入した自己リンパ球（TCR遺伝子導入Tリンパ球）輸注の安全性、体内動態及び臨床効果を評価することを目的とした臨床研究である。

また、三重大学医学部内に設置された細胞調製施設より本臨床研究に参画している医療機関へTCR遺伝子導入Tリンパ球を搬送し被験者に投与することで、医療機関の間で安全性や血中動態等の結果に差が無いことを確認することも目的としている。

(7) その他（外国での状況等）：

米国では、悪性黒色腫患者に対して、本臨床研究とは異なる抗原特異的TCR遺伝子を導入したTリンパ球を投与する臨床試験が実施され、2006年及び2009年にその結果が報告されている。2006年の報告では、患者17名を対象としており、Tリンパ球投与による毒性はみられなかったとされている。また、2009年の報告では、患者36名を対象としており、皮膚症状、眼症状、聴力障害といった有害事象がみられたとされている。

また、国内では三重大学において、治療抵抗性食道癌患者に対して、本臨床研究で使用するベクターと類似のレトロウイルスベクターを用いてMAGE-A4抗原特異的TCR遺伝子を導入したTリンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究（2009年に厚生労働大臣が承認）が実施中である。2012年8月末時点で患者7名に対してTリンパ球投与が行われており、現在までに安全性上の問題は起きていないと報告されている。

2. 遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議概要

1) 事前の意見・照会事項及びその回答

作業委員会会合の開催に先立ち、各委員より申請者に対して、平成24年9月20日に遺伝子治療臨床研究実施計画申請書等に係る意見・照会事項を送付し、同10月11日に申請者よりそれに対する回答を得た。主な意見・照会事項及び回答の概要は以下の通りである。

（作業委員会委員からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答）

注）以下において、実施計画書の該当ページを記載する際は三重大学医学部附属病院の実実施計画

書の該当ページを記載しているが、他の施設の実施計画書においても同様に記載されている。

ア. 患者に投与する遺伝子導入リンパ球の細胞生存率を各施設で確認すること。また、凍結状態で搬送されるリンパ球について解凍時の細胞生存率の規格をどのように設定しているか。さらに、各施設における解凍方法は統一されているか。

【回答】各施設において、凍結保存バイアルを用いて細胞生存率を測定するように実施計画書を修正した（実施計画書55ページ）。また、生存率の下限について、FDAのガイダンスを参考に70%に設定する予定である。さらに、解凍方法については、三重大学で現在実施中の類似の遺伝子治療臨床研究において手順書を作成しており、本研究においても各施設で同様の手順書の作成と運用を行う。

イ. 内在性 TCR の発現を抑制するために siRNA 発現ベクターを用いる点に新規性があるが、siRNA の導入によりインターフェロンが高発現するおそれはないか。

【回答】他の研究グループにより siRNA がインターフェロン応答を誘導する可能性が報告されているが、当該反応のメカニズムや、これまでに得られた実験データを検討した結果、本研究においてインターフェロンが高発現する可能性は低いと考えられる。

ウ. WT1 ペプチドの投与によって、TCR 遺伝子導入リンパ球にどのような効果をもたらすのか。あるいは、がんワクチンとして別途 WT1 特異的 CD8、CD4 陽性細胞の誘導を期待するのか。

【回答】WT1 ペプチドの投与により、TCR 遺伝子を導入された CD8 陽性リンパ球の増殖を介して、患者体内での遺伝子導入細胞の生存期間延長に寄与することを第一の目的としている。一方、2 回の WT1 ペプチドの投与だけでは、がんワクチンとして新たに WT1 特異的 CD4、CD8 陽性細胞を誘導する効果は十分ではないと予想される。

エ. 安全性の確認を主目的とする第 I 相試験を、多施設共同で開始する理由を明確にすること。

【回答】がんを含めた多くの難治性疾患について、新しい治療薬をいかに速やかに患者に届けるかが課題であり、申請者らは、生物学的な安全性の確保と検証を最優先にしつつ、臨床試験での速やかでステップワイズなPOC確立を目指している。早期からの多施設共同での臨床試験は、臨床試験の効率的な推進と複数施設による評価の客観性の担保という両面から極めて重要と考える。また、実用化を想定した早期臨床試験において確認されるべき安全性とは、個々の患者における生物学的安全性と共に、投与細胞の製造、運搬を含むシステム全般にわたる安全性としてとらえるべきと考える。申請者らは、共同研究ネットワークの構築を進め、特に、早期臨床試験で用いる細胞製剤作製を単一のGMP施設で行い、それらを複数施設で利用するべく、安全で安定した輸送システムを確立してきた。

オ. 三重大学以外の施設において、治療手技を統一するためにどのような実施体制で行うのか。

【回答】施設間及び投与者間で手技に差異が出ないように、三重大学の細胞調製施設から各施設への遺伝子導入細胞の搬送や、凍結細胞の解凍から投与に至るまでの手順書を作成し、遵守する。そのほか、すでに遺伝子治療臨床研究の実施経験がある三重大学の医師との交流や必要に応じたサポートを実施する。さらに、臨床研究事務局を設置することで各施設における症例登録、検体・細胞搬送などについても共通のチームとして実施・運用する。

カ. 遺伝子導入細胞の搬送に関して、搬送方法や受け入れ試験などの全体像を実施計画書に記載すること。

【回答】実施計画書に追加記載した（実施計画書 70 ページ）。

キ. 各施設に共通の「安全・効果評価・適応判定中央部会」を設置することとされているが、その位置付けを明確にすること。また、当該部会の構成員を示す内規を示すこと。

【回答】「安全・効果評価・適応判定中央部会」は中立の立場で本研究の安全性や有効性に関する評価や意見を行うことを目的としており、独立した組織である。また、本研究の実施者から独立性を確保する目的で、各施設の臨床研究実施者と利害関係を有さない者を委員として選出する。実施計画書を修正するとともに（実施計画書 62 ページ）、当該部会の内規を提出する。

ク. 重篤な有害事象が認められた際の、当該施設での対応と、多施設間での情報の共有について、より具体的に記載すること（特に、総括責任者から当該施設の長及び各施設の総括責任者への報告が72時間以内とされている点については、より早急に対応すること。）。

【回答】24 時間以内に当該施設の長及び各施設の総括責任者へ口頭もしくは電話にて第一報報告を行うとともに、「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」についても同様に、24 時間以内に当該施設の長及び各施設の総括責任者へ提供することとし、実施計画書を修正した（実施計画書 90 ページ）。

ケ. 骨髓異形成症候群の被験者選択基準（治療困難な予後不良の骨髓異形成症候群で造血幹細胞移植適応がない被験者）について、治療困難、予後不良と判断する根拠は何か。

【回答】予後不良とは、骨髓異形成症候群の国際予後判定システム IPSS (International Prognostic Scoring System) 上、高リスク群（骨髓芽球増加、7 番染色体あるいは複雑染色体異常、血球減少）あるいは、白血病移行の例とする。また、治療困難とは、化学療法に対する反応不良あるいは多剤併用化学療法には耐えにくい例を指す。症例毎に状態や経過が異なるため、被験者選択の判断は担当医が総合的に判断する。

コ. 他の研究グループにより報告されているWT1ペプチドワクチンの使用による重篤な細胞傷害（正常造血幹細胞への影響）について、同意説明書において詳細に説明すること。

【回答】同意説明書に追加記載をした（実施計画書 127 ページ）。

サ. 三重大学において先行して実施されている「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」の途中経過の情報を申請資料に記載すること。

【回答】実施計画書に追加記載するとともに（実施計画書 17 ページ）、途中経過の情報を整理した参考資料を追加提出した。

2) 作業委員会における審議

① 開催日時： 平成 24 年 10 月 22 日(月) 15:00～17:45

② 議事概要：

平成 24 年 7 月 23 日付けで三重大学医学部附属病院、愛媛大学医学部附属病院、藤田保健衛生大学病院及び名古屋大学医学部附属病院より申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群）についての審議を行った。

まず、研究実施計画について総括責任者から説明を受けた後、当該説明内容及び提出資料を基に、委員間で実施計画の科学的妥当性等について審議を行った。

その結果、本計画は概ね了承されたが、副作用・有害事象に関する同意説明文書の記載、安全性評価等を行う中央部会（4施設間で共通の基準で安全性評価等を行うために設置される会議）の機能や役割、各施設の臨床研究実施体制等について確認した後、科学技術部会に報告することとされた。

なお、指摘事項は平成 24 年 11 月 19 日に発出され、同 11 月 30 日に申請者より回答が提出された。これらを踏まえた実施計画書等の整備については、同 12 月 14 日に委員長により了承された。指摘事項の内容及び回答の概要は以下の通りである。

（本作業委員会の指摘事項及びそれに対する回答）

ア. 多施設共同研究においては、各施設の臨床研究実施体制が均等に整備されていることが重要であるため、各施設の実施体制（モニタリングの実施、CRC の配置等）について説明すること。

【回答】本研究の実施に際しては、共通の手順書を作成し、それをもとに各施設における各種作業の標準化を図る。また、本研究の運営・管理のコアとなる組織として、多施設共同研究事務局を設置して、臨床試験調整医師の指示の下で各施設における業務の管理・補助を行う。さらに、各施設において、モニタリングの実施や CRC の配置などの体制を整備している。

イ. 安全・効果評価・適応判定中央部会について、①重篤な有害事象が発生したときの対応（とくに、中央部会が研究を中止すべきと判断した場合に各施設で統一的な

対応が行われる仕組み)や、②中央部会の委員の選定基準(とくに、研究実施者が委員になることができるか。)や選定手続きを明確にすること。

【回答】各施設は中央部会の判断を最大限尊重することとし、重篤な有害事象が発生した際に、中央部会が臨床研究を中止すべきと判定した場合には、各施設はその意見に従うこととする。また、中央部会の委員選定基準として「本臨床研究の実施者と利害関係を有さない者」とし、委員選定に関しては、多施設共同臨床研究代表者及び各施設の総括責任者の総意として指名を行い、各施設の遺伝子治療臨床研究審査委員会にて承認を得る。以上の点について、実施計画書(実施計画書 63 ページ)や中央部会の内規に明記する。

ウ. 各施設における被験者の登録にばらつきが生じないように、被験者の選択基準を出来るだけ具体的に定めること。

【回答】骨髓異形成症候群での適格基準について、作業委員会前の意見・照会事項(上記 1)ケ)を踏まえ、実施計画書を修正した(実施計画書 66 ページ)。急性骨髄性白血病については、現在の選択基準で十分に特定可能と考える。

エ. 副作用・有害事象として、WT1 ペプチド投与に伴う局所反応や、WT1 を発現する正常組織(腎糸球体や漿膜)への傷害作用の可能性についても、同意説明書に記載すること。

【回答】同意説明書を修正した(実施計画書 128、129 ページ)。

3. 遺伝子治療臨床研究作業委員会の検討結果

三重大学医学部附属病院、愛媛大学医学部附属病院、藤田保健衛生大学病院及び名古屋大学医学部附属病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画(対象疾患:急性骨髄性白血病、骨髓異形成症候群)に関して、遺伝子治療臨床研究作業委員会は、主として科学的観点から以上のとおり論点整理を進め、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。その上で、本作業委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会 遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員名簿

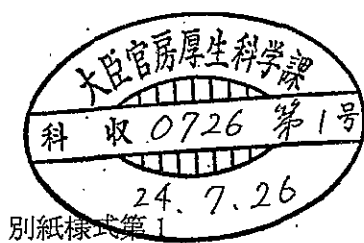
【三重大学病院、愛媛大学病院、藤田保健衛生大学病院、名古屋大学病院】
「MS3-WT1-siTCRベクターを用いたWT1抗原特異的TCR遺伝子導入Tリンパ球輸注
による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究」

氏 名	所 属
あらと てるよ 荒戸 照世	北海道大学大学院 医学研究科教授
おおはし とうや 大橋 十也	東京慈恵会医科大学 DNA医学研究所教授
おのであら まさあみ 小野寺 雅史	(独)国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
さいとう いずみ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
だに けんざぶろう 谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
なす やすとも 那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
みずぐち ひろゆき 水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

疾患専門

おおやしき かずま 大屋敷 一馬	東京医科大学 血液内科主任教授
---------------------	-----------------

○：委員長（五十音順 敬称略）



正 本

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 申 請 書

平成 24 年 7 月 23 日

厚生労働大臣 殿

実 施 設	所 在 地	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (郵便番号 514-8507)
	名 称	国立大学法人三重大学医学部附属病院 (電話番号 059-232-1111) (FAX番号 059-321-5645)
	代 表 者 役職名・氏名	国立大学法人三重大学医学部附属病院 病院長・竹田 寛 (職印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
MS3-WT1-siTCRベクターを用いたWT1抗原特異的TCR遺伝子導入Tリンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究	国立大学法人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・ 大学教員・珠玖 洋



遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成24年7月23日

(申請年月日)

研究の名称	MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	承認日から2年間

総括責任者	所属部局 の所在地	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (郵便番号 514-8507)	
	所属機関・ 部局・職	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・大学教員	
	氏 名	珠玖 洋 	
実施の場所	所 在 地	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (郵便番号 514-8507)	
	名 称	三重大学医学部附属病院	
	連 絡 先	三重県津市江戸橋二丁目174番地 (電話番号 059-231-5187) 遺伝子・免疫細胞治療学講座	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	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	遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者 被験者の診療
	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	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 被験者の診療
	宮原 慶裕	三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン講座 講師	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び 免疫反応の評価 被験者の診療
	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 被験者の診療
	齋藤 佳菜子	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教	被験者の診療
外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	レトロウイルスベクター製剤の製造・品質管理責任者、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

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	本臨床研究は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日 文部科学省・厚生労働省告示第1号（平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正）」の必要な条件を満たしていると認める。 本臨床研究で遺伝子導入する細胞はレトロウイルスベクターによる癌化リスクは低く、対象疾患の利益が不利益を上回ることが十分予測されるものであった。 また、本臨床研究実施計画に先立ち施行された実験動物に遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性試験の結果、遺伝子導入細胞投与群に毒性所見は観察されなかった。 更に、遺伝子導入細胞は本学内細胞調製施設においてGMP基準に準拠して調製され、細胞品質は調製時毎に確認される。多施設との細胞搬送システムが確立され多施設共同研究（愛媛大学、藤田保健衛生大学、名古屋大学）の体制が整備されている。本臨床研究を担当する研究者は、遺伝子ベクター調製、細胞治療等の経験者であり計画施行に適切な構成である。 以上より、本臨床研究の実施は適当と認める。	
	審査委員会の長の職名	氏名
三重大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会・委員長 三重大学大学院医学系研究科・臨床医学系講座・検査医学分野・教授	登 勉 	

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	本臨床研究は、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者を対象として、WT1 抗原を HLA-A*24:02 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクター-MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球) 輸注の安全性、体内動態及び臨床効果を以下の項目について評価することを目的とする。 1) 主要評価項目 a) 本遺伝子治療の安全性 ・有害事象発現の有無 ・臨床検査値異常変動の有無 ・増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の有無 ・TCR 遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティの検討 2) 副次評価項目 a) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態 b) 血液学的効果 (PCR 等を用いた分子生物学的完全寛解の確認を含む) c) 免疫機能解析 また、TCR 遺伝子治療を実用化し、多くの患者へ投与するためには、細胞調製施設を有していない医療機関においても遺伝子導入細胞を投与することが必要となる。そのため、本臨床研究ではあらかじめ構築した搬送体制を利用し、三重大学医学部内に設置された細胞調製施設より本臨床研究に参画している医療機関へ TCR 遺伝子導入 T リンパ球を搬送し、被験者に投与することで医療機関の間で安全性や血中動態等の結果に差が無いことを確認することも目的としている。	

対象疾患及びその選 定理由	1. 対象疾患及び被験者 薬物療法等の標準的な治療の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者のうち、HLA-A*24:02 陽性、腫瘍細胞に WT1 抗原が発現している被験者。 2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要 被験者から採取した末梢血リンパ球に、WT1 特異的 TCRα 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後、培養増殖させ、その自己リンパ球を 2 回経静脈的に投与する。2 回目の TCR 遺伝子導入 T リンパ球を輸注後、被験者体内での TCR 遺伝子導入 T リンパ球の活性化（あるいは増殖）を図る目的で、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを皮下投与し、安全性及び有効性を確認する。 3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由 治療抵抗性となった急性骨髄性白血病に対して、白血病細胞の増殖の病勢を抑える程度の化学療法が実施されるものの予後は数か月未満である。MDS は急性転化しなければ保存的治療で年単位の予後が見込めるが、輸血合併症、反復感染症をきたす場合、多くの予後は 1 年未満となる。 急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群に対する化学療法以外の治療として、分子標的治療薬が開発されているが、それら薬剤においても寛解導入がなされない症例は、依然として絶対予後不良であり、免疫的機序による白血病抗原などを標的とする新規治療法が開発が期待されている。 以上より、本臨床研究で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。
遺伝子の種類及びそ の導入方法	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 TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子である。また、内在性の TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子に干渉する siRNA 発現配列も導入される。 1.1 人に導入する遺伝子の構造 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 TCRα 鎖は V20、J33、C であり、TCRβ 鎖は V5-1、N、J2-1、C2 の配列である。 また本臨床研究では内在性のヒト TCR の発現を抑制する為にショートヘアピン型 DNA (shDNA) 配列を導入する。これは、ヒト 13 番染色体上に存在するマイクロ RNA has-mir-17、has-mir-18、has-mir-19、has-mir-20 のクラスター配列中の 4 種類のマイクロ RNA 配列を、ヒト TCRα の C 領域に相同な 2 種類の shDNA とヒト TCRβ の C 領域に相同な 2 種類の shDNA 並びにこれらに相補的な配列により置換したものである。 1.2 人に導入する遺伝子の性質 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 TCRα 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 TCRα 鎖は 14 番染色体上に、β 鎖は 7 番染色体上にコードされ、多様なクローンタイプが存在する。 レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、

TCR β 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 (PPGK) によって転写される。マウス PPGK 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MS3-WT1-siTCRにより導入される PPGK は 513 bp のマウスゲノム由来 DNA 断片に含まれる。

TCR α 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される。レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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 MoMLV 由来、U3 領域は MSCV 由来である。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。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 領域の構造をとり、MSCV 由来 (すなわち PCMV 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。なお、PCMV の U3 領域は、MoMLV と比較して一部分が欠失、点変異しており、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。また、TCR α 鎖遺伝子の upstream に位置するヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域は、スプライシング能の高いイントロンのスプライシングアクセプター周辺の配列を含んでおり、その下流に位置する遺伝子の意図しないスプライシングを防ぐことにより遺伝子発現転写能を高めている。

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、ヒト TCR α の C 領域配列/ヒト TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列は TCR α 鎖 mRNA の下流に連結された形で LTR プロモーターによって転写される。これらの siRNA 配列は、レトロウイルスベクターが導入された T 細胞の内在性 TCR の発現を特異的に抑制する効果がある。T 細胞の内在性 TCR の存在は、内在性 TCR と導入 TCR による CD3 分子の競合と内在性 TCR と導入 TCR の間でのミスペアリングにより本来目的とする腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させると共に、予測不可能な特異性を有する TCR が出現する可能性も示唆している。従ってレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR に含まれる siRNA 配列は導入 TCR の発現効率を上昇し、TCR ミスペアリングの危険性を低下させる。なお、導入する WT1 特異的 TCR 遺伝子にはコドン修飾がなされ、siRNA の影響を受けない。

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 α 鎖及び β 鎖のヘテロダイマーによって機能的な TCR 分子を構成する。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、アナジューの誘導、分化、生存と細胞死等を司る。

TCR 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 (CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に寄与し、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。

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。

WT1 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-A*24:02 分子と WT1 分子由来の抗原ペプチドである WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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。

本遺伝子治療において T 細胞に導入された WT1 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-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの複合体を認識する。導入された WT1

特異的 TCR による HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、TCR 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が起こり、TCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞では更にグランザイム 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。

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。

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遺伝子を導入する標的細胞は、造血幹細胞移植適応がない急性骨髄性白血病もしくは骨髄異形成症候群患者 (HLA-A*24:02 陽性、腫瘍細胞に WT1 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、①様々な抗原を特異的な受容体で認識する。②抗原の認識に続き活性化され、増殖すると共に各種サイトカインの産生や抗原を発現する標的細胞を特異的に傷害する能力をもつ。③活性化された後に一部はメモリー T リンパ球となり、長期に生存し抗原に再遭遇した場合、急速に強く反応し得る。なお、自己 T リンパ球を輸注した場合、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病 (GVHD) 等の副作用がない長所がある。WT1 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 T リンパ球へ遺伝子導入することで、腫瘍細胞表面上の HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己 T リンパ球を作製可能である。本遺伝子導入 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。

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

4.1 遺伝子導入方法の概略

自己末梢血リンパ球 (PBL) へ TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するために、レトロネクチン CH-296 をコートした培養バッグ中にて、T リンパ球をレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR に感染させる。

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、プロウイルスとなり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は末梢血 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、過去の T 細胞遺伝子治療においてレトロウイルスベクターの使用に起因する重篤な副作用は報告されていない。以上の理由により、自己 PBL に 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。

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。一方、レトロウイルスベクター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、効率的に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 MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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、MS3-WT1-siTCR 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、既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、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。

5. ウイルスベクターを用いた遺伝子導入

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 MS3-WT1-siTCR のもとに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。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及びスプーマレトロウイルスの 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原因ウイルスであるが、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。なお、ヒトへの感染の報告はない。

5.2 ウイルスベクターの作製方法

5.2.1 ウイルスプラスミドベクター pMS3-WT1-siTCR の構築

ウイルスプラスミドベクター pMS3-WT1-siTCR 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。

pMS3-WT1-siTCR 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ヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域、HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR α 鎖遺伝子の C 領域をコード最適化した cDNA のコード域、TCR α の C 領域配列及び TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列、マウス PPGK、並びに HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR β 鎖遺伝子の C 領域をコード最適化した cDNA のコード域を組み込んだものが pMS3-WT1-siTCR である。

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 (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。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。

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 pMS3-WT1-siTCR の構築手順を示す。

pDON-5 ベクターを制限酵素 Mlu I と Not I で切断して、ヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域を切り出し、pMS ベクターの Mlu I - Not I サイトにクローニングし、pMS3 を得た。

HLA-A*24:02 拘束性 WT1 CTL Clone TAK-1 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA のコード域を増幅し 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 Apa I が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Sfa NI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて TCR α cDNA の V-J 領域の PCR を行い制限酵素 Sfa NI で切断した。この時、制限酵素 Sfa NI で切断すると Bgl II の切断配列が生じるように 3' 用プライマーをデザインした。また、コドンを最適化した TCR α 遺伝子 C 領域を合成して、制限酵素 Sal I が付加さ

れた 5' 用プライマーと制限酵素 Bgl II 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 Sal I で切断した。両断片をライゲーションし、C 領域がコドン最適化された TCR α 断片を得た。

TCR α 遺伝子の C 領域と TCR β 遺伝子の C 領域に特異的な siRNA 発現配列をそれぞれ 2 種類ずつ含む siRNA クラスター (siRNAs) を合成した。また、C 領域がコドン最適化された TCR α 断片を Bgl II で切断した。これら両断片を pMS3 の Apa I-Not I サイトにクローニングして pMS3-WT1-A-si を得た。

A*24:02 拘束性 WT1 CTL Clone TAK-1 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR β cDNA のコード域を増幅し pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

TCR β のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Bam HI が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Sfa NI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて TCR β cDNA の V-J-D 領域の PCR を行い制限酵素 Sfa NI で切断した。この時、制限酵素 Sfa NI で切断すると Bgl II の切断配列が生じるように 3' 用プライマーをデザインした。また、コドンを最適化した TCR β 遺伝子 C2 領域を合成して、制限酵素 Bgl II が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho 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、制限酵素 Bgl II で切断した。両断片をライゲーションし、C2 領域がコドン最適化された TCR β 断片を得た。

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 PPGK 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 Not I と Bam HI で PPGK 部位を切り出した。

最後に、C2 領域がコドン最適化された TCR β 断片を制限酵素 Bam HI と Xho I で切断し、PPGK 部位を Not I と Bam HI で切断し、両断片を pMS3-WT1-A-si の Not I-Xho I サイトにクローニング、pMS3-WT1-siTCR を得た。得られた pMS3-WT1-siTCR の全塩基配列解析を実施し、予期せぬ変異等が含まれていないことを確認した。

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 pMS3-WT1-siTCR 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 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。従って、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) 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 (一方は gag と pol、もう一方は 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、この方法は RCR 出現のリスクは極めて少ないことが知られている。

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 pMS3-WT1-siTCR を 293T 細胞へ共にトランスフェクションした。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 MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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 #S45 を得た。これをマスター/ワーキングセルバンク (M/WCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して M/WCB を作製した。

5.2.4 レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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 (GMP) 遵守下で行われる。

	5.3 ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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。 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する。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 OKT3 及びレトロネクチン CH-296 で活性化し、増殖させる。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MS3-WT1-siTCR 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。従って、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。
安全性についての評価	1. 遺伝子導入方法の安全性 1.1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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。M/WCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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国産のものを使用する。 1.1.1 M/WCB の作製法 GMP 製造施設の管理区域にて3バイアルの Primary Seed Bank (クローン WT1-siTCR preMCB S45) より拡大培養され、最終的に 181 バイアルのウイルス産生細胞 M/WCB が GMP 遵守下で作製された。M/WCB 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、作製された M/WCB に関しては、以下の品質試験が行われた。 1. マイコプラズマ否定試験 (培養法、DNA 染色法) 2. <i>in vivo</i> ウイルス試験 3. <i>in vitro</i> ウイルス試験 4. RCR 試験 (細胞) (293 細胞で増幅、PG-4 S+L-アッセイ) 5. RCR 試験 (上清) (293 細胞で増幅、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 (HIV-1、HIV-2、HTLV-1/2、HAV、HBV、HCV、hCMV、HHV-6、HHV-7、HHV-8、EBV、SV40、Human Parvovirus B19) 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. ベクター遺伝子の組み込み数試験 (サザンブロット) 13. ベクター遺伝子の完全性試験 (サザンブロット) 14. 導入遺伝子配列解析 15. 細胞生存率試験 16. ウイルスベクター産生能確認 (産生ウイルス RNA コピー数 : real-time PCR 法)

17. 産生ウイルスベクター機能確認試験①：TCR 発現性試験

(SupT1 細胞感染/FCM)

18. 産生ウイルスベクター機能確認試験②：野生型 TCR 発現抑制確認

(J45.01 細胞感染/real-time PCR 法)

1.1.2 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造方法

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造は、1 バイアルの M/WCB を用いて行う。凍結保存している M/WCB の細胞を解凍後、培養を開始し、拡大培養及び細胞継代を行い、5 個の大量静置培養用容器にて培養する。大量静置培養用容器において培養細胞が接着面全体に広がった後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清液は、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。

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR に関しては、以下の品質試験を行う。

Virus supernatant

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. ウイルス RNA コピー数 (real-time PCR 法)
9. TCR 発現性試験 (SupT1 細胞感染/FCM)
10. 野生型 TCR 発現抑制確認 (J45.01 細胞感染/real-time PCR 法)
- End of Production Cells (EPC)
11. マイコプラズマ否定試験 (培養法)
12. マイコプラズマ否定試験 (DNA 染色法)
13. RCR 試験 (293 細胞で増幅、PG-4 S+L-アッセイ)

1.2 被験者に投与する物質の純度及びその安全性

被験者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した被験者由来 T リンパ球である。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。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 年以上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、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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 91.8% 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。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 VG 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 社の資料によると、MONTANIDE® ISA-51 は、AIDS や癌患者に対して、既に 5,000 人以上に投与され、延べ約 50,000 回以上の投与の実績がある。その副作用として、一過性の局所反応が報告されている。また、インフルエンザ様症状が現れることも報告されているが、一過性であり、発現頻度も低いことから MONTANIDE® ISA-51VG は安全に人へ投与することが可能と考えられている。

1.3 増殖性ウイルス出現の可能性

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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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のみを臨床使用する。また、遺伝子導入 T リンパ球投与後には被験者末梢血中の RCR を測定する。

1.3.2 パッケージング細胞の安全性

ウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR 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。更に、レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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。従って、ウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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。pLGP5 と pMOV-GaLV Seato env は、どちらも 5' 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。

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。

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・増殖に必要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。

1.5 体内の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、被験者 T リンパ球を ex vivo (生体外) で遺伝子導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に被験者に投与する。使用したレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR はこの過程でほぼ完全に除去される。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。そのため、例えばレトロウイルスベクター粒子が被験者体内に侵入しても、被験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MS3-WT1-siTCR は増殖能を欠いているため、遺伝子導入した被験者 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。RCR が出現しない限り体内の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

1.6 被験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 MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR は増殖能欠損型なので、被験者を介して被験者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が被験者体内に存在しない限り非常に低い。

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。細胞が生存や増殖するため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、被験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。

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。

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。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。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。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の被験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。

2. 遺伝子産物の安全性

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。従って、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。今回は内在性 TCR に対する siRNA 発現配列が遺伝子導入されるので、内在性 TCR の関与した反応性の低下が予想される。また一般に、siRNA の配列によってはインターフェロン経路遺伝子の発現上昇などのオフターゲット効果が見られることが知られているが、本臨床研究に用いる siRNA 構造を持つ 2 種類のレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 及び MS-MA24-siTCR を用いて遺伝子導入した細胞に特異的に発現上昇または発現減少する遺伝子はなかった。したがって、オフターゲット作用のリスクは低いと考えられる。

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 件の臨床試験において、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 による有害事象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 を併用したものであり、血液学的又はそれ以外の有害事象 (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少ないと考えられる。

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である細胞の大半は TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たに WT1 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。

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 TCR 2 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。また、今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成を低減すると考えられる。
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。また、この場合も今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、本メカニズムが出現するリスクも低減すると考えられる。
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被験者の 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 T 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と共にメラノサイト分化抗原である 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。その後、メラノサイト分化抗原 MART-1 及び gp100 に対する高親和性 TCR 遺伝子を用いた転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、これらの抗原を発現する正常組織（皮膚、眼、内耳）に対する傷害性が報告されたがいずれも生命に危機をもたらすものでなくコントロール可能であった。この Johnson らの報告例では輸注を受けた患者は、輸注前に体内のリンパ球を減少させる化学療法を前処置として施され、細胞輸注後は高用量 IL-2 (72000 U/kg) を投与された。これらの処置は輸注細胞を強力に刺激する目的で行われている。また輸注細胞は $1.5 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^{11}$ 個と大量であった。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が、輸注する細胞数や補助的処置の方法によりコントロール可能であると考えられる。本臨床試験では化学療法による前処置や IL-2 投与は行わず、 2×10^8 個と少量の輸注細胞数から慎重に開始する。また、難治性の白血病、骨髄異形成症候群の患者を対象とすることにより本臨床試験の対象患者にとってのリスク／ベネフィット比で考慮した場合に実施可能であることを確認して行われる。

3. 細胞の安全性

3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

細胞培養にかかわる以下の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、他の被験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MS3-WT1-siTCR を用いた遺伝子導入 T リンパ球の調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：被験者のコホートに応じて培養開始細胞数を決定し、被験者全血より分離した新鮮または凍結末梢血単核球 (PBMC) を遺伝子導入細胞の調製に使用する。

被験者から全血の採取 (最大採血量 100 mL) は、各医療機関において実施する。

採取した被験者の全血を三重大学内の細胞調製施設へ輸送し、外観試験を実施した後に細胞調製施設内に持ち込み、自己血漿を分離した後に、Ficoll-Paque を用いた被験者 PBMC の分離と 1% HSA 含生理食塩水及び GT-T Retro III 培地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。

リンパ球の刺激には抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグを使用する。すなわち、抗 CD3 抗体 ($5 \mu\text{g/mL}$) CH-296 ($25 \mu\text{g/mL}$) となるように ACD-A 液に希釈した溶液 25 mL をリンパ球刺激用バッグに添加し、CO₂ インキュベーター中で 5~10 時間静置して準備する。培養用培地 (基本培地 GT-T Retro III, 600 IU/mL rhIL-2, 0.6% 非働化被験者血漿, 0.2% HSA, 60 mg/mL 硫酸ストレプトマイシン及び $2.5 \mu\text{g/mL}$ アムホテリシン B 含有。) に被験者リンパ球を 2×10^5 個/mL となるように懸濁し、抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグに加えて、37°C、5% CO₂ 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-T Retro III 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4日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数から 0.4×10^6 個/mL 以下になるように培養用培地で希釈し、レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグあたり 30 mL の細胞懸濁液を加える。1,000×g、32±3°C で 10 分間遠心した後に CO₂ インキュベーター中で第5日まで培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ (1回目、2回目遺伝子導入工程用) は以下のように用意する。レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを 15 mL の ACD-A 液で 2 回洗浄した後に、原液又は HSA/ACD-A/生理食塩水で希釈した MS3-WT1-siTCR を添加 (30 mL/バッグ) する。2,000×g、32±3°C、2 時間遠心した後に、MS3-WT1-siTCR を除き HSA/生理食塩水で洗浄した後に同液を保存液として添加し使用時まで薬用保冷庫にて保存する。

第5日：第4日から培養した活性化 T リンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、1,000×g、32±3°C で 10 分間遠心する。遠心後、第6日まで 5% CO₂ インキュベーター中で培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ (3回目遺伝子導入工程用) を第4日目と同じ方法で作成し、使用時まで薬用保冷庫にて保存する。

第6日：第5日から培養した活性化 T リンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化 T リンパ球懸濁液を添加し、1,000×g、32±3°C で 10 分間遠心する。遠心後、4 時間 + 10 分以内、5% CO₂ インキュベーター中で培養した後、細胞を回収し、新しい培養用培地にて容量が計 2,400 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% CO₂ インキュベーター中にて培養を開始する。

第7日：第5日から培養しているガス透過性培養用バッグに、等量の培養用培地 (自己血漿 0~0.6% 含) を加えて、37°C、5% CO₂ インキュベーター中にて培養をする。

第10-14日：細胞処理装置を用いて細胞の洗浄と濃縮を HSA 含 RPMI1640 で行い、被験者投与に必要な遺伝子導入細胞数に応じて、 $1.6 \sim 6.7 \times 10^7$ 細胞/mL

となるように HSA 含 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 TCR 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 -80°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) の条件下にて使用時まで凍結保存する。

投与前：被験者へ投与する各医療機関に、凍結状態で TCR 遺伝子導入 T リンパ球を輸送する。

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

3.2 培養細胞の純度

遺伝子導入に用いる細胞は、OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化し増殖させた被験者自己由来の T 細胞である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の遺伝子導入細胞の比率は 31.1%程度であり、T リンパ球が 99.7%以上を占めていた。被験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、被験者末梢血より得られた細胞であり問題ないと考えられる。また、T リンパ球以外の細胞に遺伝子が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。

3.3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

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、siRNA 発現配列、並びにレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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 T 細胞であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は非常に低いと考えられるが完全には否定できないため、LAM-PCR によるモニタリングを行う。

OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化することによって 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、これを被験者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。

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。

ex vivo で培養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。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 リンパ球群において移入 T リンパ球が被験者生体内で長期間観察されたことが報告されている。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。

3.4 被験者に投与する細胞の安全性

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 MS3-WT1-siTCR 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。また、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。投与前に品質試験が不合格であることが判明した場合には、再度細胞調製のための採血が可能か検討したうえで、当該被験者における臨床研究の継続・中止の判定を行うこととする。

	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 6. 細胞数試験 7. 遺伝子導入効率及び導入遺伝子機能確認試験 (細胞内 IFN-γ 産生試験) 被験者への投与の際には、凍結保存専用バッグ中に凍結保存している細胞懸濁液を投与直前に 37℃ 温浴にて急速解凍し、静脈内投与する (生理食塩水にて投与液量を調整することも可能とする)。 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・解凍後の細胞生存率については、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、投与日以前に解凍し細胞生存率を測定する。
遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由	以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断した。 ①開発意義 急性骨髄性白血病は標準的化学療法により 70-80% の完全寛解率が得られているにもかかわらず、長期生存率は 30-40% である。そのため化学療法による治療効果は、まだ十分なものとは言えない。近年、新たな薬剤であるゲムツズマブオゾガマイシンが登場したものの、効果は限定的である。治療の一つとして同種造血幹細胞移植があるが、高齢者や適切なドナーが得られないなど同種造血幹細胞移植を行えない症例も多い。 また、骨髄異形成症候群は、同種造血幹細胞移植が有効であるが、適切なドナーが得られないことや、高齢者においては同種造血幹細胞移植による治療関連毒性に耐えられないなどの問題も多い。また、抗癌剤による治療効果も低く、新たな治療戦略の必要性が指摘されている。 これらのことから、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者に対する有効な治療手段の開発が強く望まれており、本遺伝子治療臨床研究の開発意義は高く、医療現場における需要は存在すると考える。 ②品質・安全性 本臨床研究は、腫瘍抗原 WT1 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被験者に投与する。この製造過程は十分に確立され、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入 T 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 (治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病、治療不応性の骨髄異形成症候群) 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と考えられる。 免疫不全マウスに本 TCR 遺伝子導入ヒト T リンパ球を投与した安全性試験において、比較対照とした非遺伝子導入ヒト T リンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒト T 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Ⅲ)。 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 T リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg SA らのグループで既に実績がある。

	本臨床研究において標的とする WT1 抗原は白血病細胞において強発現することが知られている。一方、正常細胞における WT1 発現は腎臓の糸球体上皮細胞、胸膜や腹膜の中皮細胞等の限られた細胞にみられる。これまでに WT1 を標的としたペプチドワクチンの臨床試験が国内外において精力的に実施されているが、正常細胞の傷害に起因すると考えられる重篤な副作用はこれまでのところ知られていない。対象疾患（治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病または、治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群）とのリスク・ベネフィットを総括すると、低用量のリンパ球輸注より慎重に実施することにより本臨床研究の実施は可能であると考えられる。 ③本臨床研究の期待される有効性 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR を用いて調製された WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、WT1 陽性・HLA-A*24:02 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して抗原特異的な細胞傷害活性を示すことが <i>in vitro</i> において確認されている。また、免疫不全マウスに WT1 陽性・HLA-A*24:02 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 T リンパ球投与群で腫瘍の抑制効果が認められた。 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 T 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 を認めており、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 例中 9 例について腫瘍退縮を観察している。 従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれると考えられる。 ④当施設における研究者の能力 当施設の総括責任者及び研究者（影山、池田、宮原、今井、齋藤）は対象疾患である造血器腫瘍に対する十分な臨床経験（急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群の治療 120 例）及び臨床研究（JALSG 多施設共同研究、CHP がんワクチン：文部科学省がんトランスレーショナル事業）に対する知識を有している。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。 また、三重大学内に設置された細胞調製施設は GMP 準拠で運営・管理される体制にあり、TCR 遺伝子導入 T リンパ球は同基準に準拠し調製される。三重大学内にて細胞調製に携わる者は、遺伝子導入、細胞培養、品質管理について事前に十分な教育訓練を受けた経験者により構成される。これらのことから、三重大学には TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製に必要な設備・技術が十分備わっていると判断する。 更に、本臨床研究は三重大学を中心とした複数の医療機関（愛媛大学、藤田保健衛生大学、名古屋大学）と共同で実施することから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一し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・適応判定中央部会を設置する。
実 施 計 画	1. 本臨床研究の実施手順 患者へ臨床研究の内容を説明し、十分な理解を得たうえで文書にて同意を取得する。その後、一次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、一次登録を行う。 採取した末梢血を三重大学の細胞調製施設へ搬送する。細胞調製施設にて自己 PBL に WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを認識する TCRα 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られた TCR 遺伝子導入 T リンパ球を <i>ex vivo</i> 培養し、凍結保存する。 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製終了後、品質の確認を行う。その際に、コホート毎に規定された細胞数に満たない場合や品質試験により被験者への投与が不適

格と判断された場合には、担当医師と臨床研究薬品質管理者間で協議し、被験者の状態を考慮したうえで被験者からの了承が得られれば、再び採血・細胞調製を行うことを可能とする。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前に再度文書にて同意を取得する。その後、二次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、二次登録を行う。

三重大大学の細胞調製施設より搬送された TCR 遺伝子導入 T リンパ球を経静脈的に投与する。原則として二次登録後、速やかに TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与することとしているが、安全性及び有効性を適正に評価するため、被験者の状態に応じて、初回投与開始日及び 2 回目投与日を変更することも可能とする。ただし、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の有効期限内に 2 回目の投与を終えることとする。

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 28 日後 (±7 日) に 2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与する。2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 2 日後及び 16 日後の計 2 回、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 300 μg を皮下へ投与する。初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 58 日後 (±7 日) に臨床研究終了時検査を実施し、本臨床研究を終了とする。なお、2 回目のペプチド投与は外来にて行うことも可能とする。

被験者の生存期間中 (FDA のガイドラインに従い、最短 15 年間) は 1 年に 1 回の頻度で被験者の安全性確保を目的に所定の検査を実施する。

本臨床研究では、安全性 (有害事象、臨床検査、RCR 発生の有無、クローナリテーの検討)、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態、腫瘍特異的免疫反応及び血液学的効果を評価する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球数の設定

本臨床研究におけるコホートは 3 群 (2×10^8 cells、 1×10^9 cells、 5×10^9 cells) とし、各コホートの症例数は 3 例とする。各コホートにおいて 2 回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与し、その後 2 回ペプチド (各 300 μg) の投与を行う。

2. 被験者の選択基準及び除外基準

2.1 一次登録

患者より文書同意取得後、一次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認したうえで、一次登録を行う。

2.1.1 選択基準 (一次登録)

1) 以下のいずれかの疾患と診断された被験者

- a) 再発期または初回寛解導入不能な急性骨髄性白血病 (非定型白血病と骨髄異形成症候群よりの移行例を含む) で造血幹細胞移植適応がない被験者
- b) 治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群で造血幹細胞移植適応がない被験者

2) HLA-A*24:02 陽性の被験者

3) PCR 法にて腫瘍細胞に WT1 の発現が確認されている被験者

4) ECOG Performance Status 0~2 の被験者

5) 一次登録時の年齢が 20 歳以上の被験者

6) 遺伝子を導入する T リンパ球採取時に前治療 (化学療法等) 終了から十分な回復が見込める被験者

7) 主要臓器 (心、肺、肝、腎等) に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす被験者

- | | |
|----------------------|----------------|
| ・総ビリルビン (T-Bil) | 施設基準値の上限 3 倍未満 |
| ・AST (GOT)、ALT (GPT) | 施設基準値の上限 5 倍未満 |
| ・血清クレアチニン (Cr) | 施設基準値の上限 3 倍未満 |
| ・左室駆出率 | 55%以上 |
| ・動脈血酸素飽和度 | 94%以上 |

8) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた被験者

2.1.2 除外基準（一次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する被験者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する被験者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞、心不全
 - ・制御困難な糖尿病又は高血圧症
 - ・制御困難な感染症
 - ・間質性肺炎又は肺線維症
 - ・活動性の自己免疫疾患
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する被験者
- 3) HBV、HCV、HIV、HTLV-1 に感染している被験者
- 4) 同意取得後、4ヶ月以上の生命予後が見込めない被験者
- 5) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する被験者
- 6) 安全性評価が困難となるような脳脊髄病変（脳内転移を含む）を有する被験者
- 7) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾロン換算にて0.5mg/kg/day以上）を使用している被験者
- 8) 本臨床研究の参加同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する被験者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。又は挙子希望の被験者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
- 10) 一次登録前4ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している被験者
- 11) 同種造血幹細胞移植を施行した被験者
- 12) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

2.2 二次登録

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前に再度文書にて同意を取得する。その後、二次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、二次登録を行う。

2.2.1 選択基準（二次登録）

以下の全ての基準を満たす被験者を対象とする。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製が終了し、最小輸注量 (1.6×10^8 cells) 以上の投与が可能かつ、使用期限内に投与が完了する見込みのある被験者
- 2) ECOG Performance Status 0~2 の被験者
- 3) 主要臓器（心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす被験者

・総ビリルビン（T-Bil）	施設基準値の上限 3 倍未満
・AST（GOT）、ALT（GPT）	施設基準値の上限 5 倍未満
・血清クレアチニン（Cr）	施設基準値の上限 3 倍未満
・左室駆出率	55%以上
・動脈血酸素飽和度	94%以上

- 4) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた被験者

2.2.2 除外基準（二次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する被験者は除外する。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後に3ヶ月以上の生存が見込めない被験者
- 2) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾロン換算にて0.5mg/kg/day以上）を使用している被験者
- 3) 本臨床研究の参加同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する被験者
- 4) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。又は挙子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、

- その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない)
- 5) TCR 遺伝子導入 T リンパ球が自己細胞反応性を持つ被験者※
- 6) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

3. 被験者の同意の取得方法

総括責任者又は分担研究者は、医療機関内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を被験者に説明前又は説明時に提供し、同意・説明文書に記載されている内容を口頭で詳しく説明する。その後、被験者より自由意思による文書同意を取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計二回行う）。なお、同意取得前に、被験者本人に質問する機会と本臨床研究参加を判断するための時間を十分に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、担当医師以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。

4. 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から2年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後 58 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間 (FDA のガイドラインに従い、最短 15 年間) にわたり、1 年に 1 回の頻度で被験者の生存状況や TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発癌や RCR の有無について追跡調査を実施する。

本臨床研究における目標症例数は合計で 9 例とする。ただし、本臨床研究との因果関係を否定できない重篤な有害事象が発生した場合には、安全性確認のため症例数の追加を行う。なお、実施計画書に規定された細胞数及びペプチドが投与されなかった場合は症例数として数えないこととする。

各コホートにおける症例数と TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量

	症例数	TCR 遺伝子導入 T リンパ球 初回・2 回目輸注量	改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 初回・2 回目投与量
コホート 1	3 症例	各 2×10^8 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g
コホート 2	3 症例	各 1×10^9 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g
コホート 3	3 症例	各 5×10^9 cells ($\pm 20\%$)	各 300 μ g

5. 臨床検査項目及び観察項目

検査・観察スケジュール (別紙) に定められたとおりに検査・観察を実施する。これらの項目で、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与以降に生じるあらゆる好ましくないあるいは意図しない症状、徴候 (臨床検査値の異常も含む) 又は疾患のことを有害事象とする。発現した有害事象について、その内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置 (継続・中止の別等)、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係を調査する。有害事象のグレードは、2009 年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.02 (CTCAE v4.02) 有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2009 年 12 月 28 日」に従い、判定を行う。

6. 安全・効果評価・適応判定中央部会

有効性や安全性の評価基準を統一する目的で、本臨床研究では、各医療機関に共通の安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。

重篤な有害事象発現時には、安全・効果評価・適応判定中央部会は、総括責任者より提出された重篤な有害事象に関する報告書をもとに、本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会へ報告する。なお、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会からの判定結果をもとに臨床研究の継続に関する審査を行い、医療機関の長及び総括責任者へ審査結果を報告する。

	7. 個人情報の保護の徹底 三重大学における保有個人情報の管理に関する事務を総括するものとして理事（情報公開・個人情報担当）を総括保護管理者に置き、総括保護管理者の下に保護管理者、保護担当者を置くことにより、個人情報保護管理の徹底を行っている。三重大学医学部附属病院においては、病院長が総括保護管理者から保護管理者として指名を受けており、三重大学医学部附属病院は国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程（平成 17 年 4 月 1 日施行）に従い、組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である三重大学医学部附属病院はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置を講ずることができる。
備 考	

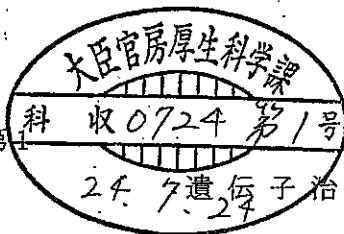
(別紙) 検査・観察スケジュール

	一次登録時	採血前※1	初回投与 day0		day					2回目投与 day28		day							中止 終了時 day58	研究終了 後の追跡 調査 ※3
			前	後	1	2	3	7	14	前	後	29	30	31	35	44	45	51		
同意取得	●		●																	
被験者登録	●		●																	
被験者背景	●																			
TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与				●						●										
WT1 ペプチド投与													●			●				
問診、PS、SpO ₂ 、バイタルサイン	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
感染症検査	●																			
血液検査	●	●	●		●			●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
PCR 法による WT1 測定	●		●							●									●	
胸部 X 線検査	●		●							●									●	
血液像検査 (末梢血)	●		●							●									●	
骨髄検査 (実施可能例)			●							●									●	
心臓超音波検査	●		●							●									●	
12 誘導心電図	●		●							●									●	
血中動態測定			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
免疫機能解析			●							●						●			●	
RCR の測定					●														●	●
LAM-PCR			●																●	●
長期保存用検体の採血			●							●									●	
採血量 (mL) (免疫機能解析を除く)	17	11	42	60	31	15	15	26	26	37	60	26	26	26	26	26	26	26	47	36
免疫機能解析用採血量 (mL) ※2			20 ～ 50							20 ～ 50						20 ～ 50			20 ～ 50	
有害事象																				

※1 一次登録と同日に TCR 遺伝子を導入する T リンパ球を採取する場合は、一次登録時の検査にて代用を可能とする。

※2 被験者の Hb 値を考慮したうえで採血量 (20mL、30mL、40mL、50mL) を決定する。

※3 1 年に 1 回の頻度で FDA ガイドラインに従い最短 15 年間にわたり検査を実施する。

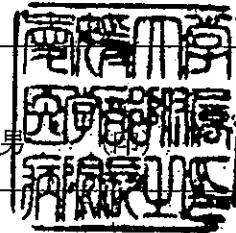


24. 7. 24 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 24 年 7 月 23 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	愛媛県東温市志津川 (郵便番号 791-0295)
	名称	愛媛大学医学部附属病院 (電話番号 089-960-5296)
	代表者 役職名・氏名	愛媛大学医学部附属病院 病院長 檜垣 實男



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び 骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究	愛媛大学大学院 医学系研究科生体統御内科学 教授 安川 正貴

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成24年7月23日

(申請年月日)

研究の名称	MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的.TCR 遺伝子導入 T リンパ球 輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する 遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	承認日から2年間

総括責任者	所属部局 の所在地	愛媛県東温市志津川 (郵便番号 791-0295)	
	所属機関・ 部局・職	愛媛大学大学院 医学系研究科生体統御内科学 教授	
	氏 名	安川 正貴 	
実施場所	所 在 地	愛媛県東温市志津川 (郵便番号 791-0295)	
	名 称	愛媛大学医学部附属病院	
	連 絡 先	愛媛県東温市志津川 (電話番号 089-960-5296)	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	藤原 弘	愛媛大学医学部附属病院 第一内科 講師	被験者の診療
	東 太地	愛媛大学医学部附属病院 第一内科 講師	被験者の診療
	成見 弘	愛媛大学医学部附属病院 第一内科 講師 造血幹細胞移植センター長	被験者の診療
	山之内 純	愛媛大学医学部附属病院 第一内科 講師	被験者の診療

総括責任者以外の研究者	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	遺伝子導入細胞製剤の製造及び品質管理 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	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	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
外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	レトロウイルスベクター製剤の 製造・品質管理責任者 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

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	レトロウイルスベクターの安全性、ペプチド・アジュバント投与理由と安全性、多施設共同臨床研究体制の在り方等について審査委員会にて議論し、実施に問題ないと判断したが、有害事象発生時に遺伝子治療の影響を遡って検証するため、臨床検体の一部を保存するよう申請者へ実施計画書の一部変更を求め、改訂が行われた。また、本臨床研究を担当する研究者は必要な知識と経験を有しており、臨床研究を適正に進めることが可能と考える。 以上のことから、本臨床研究と対象疾患の利益・不利益を総括すると本臨床研究の実施に問題は少なく本臨床研究の実施が適当と判断した。		
	審査委員会の長の職名		氏名
	愛媛大学医学部附属病院 遺伝子治療審査委員会 委員長 愛媛大学プロテオ医学研究センター 加齢制御ゲノミクス部門 教授		三木 哲郎 



遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成24年7月23日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 (郵便番号 470-1192)	
	名称	藤田保健衛生大学病院 (電話番号 0562-93-2111)	
	代表者 役職名・氏名	藤田保健衛生大学病院 病院長 星長 清	

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究	藤田保健衛生大学医学部 血液内科 教授 恵美 宣彦

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成24年7月23日

(申請年月日)

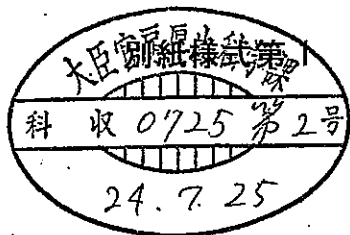
研究の名称	MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	承認日から2年間

総括責任者	所属部局 の所在地	愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 (郵便番号 470-1192)	
	所属機関・ 部局・職	藤田保健衛生大学医学部血液内科 教授	
	氏 名	恵美 宣彦 	
実施場所	所 在 地	愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 (郵便番号 470-1192)	
	名 称	藤田保健衛生大学病院	
	連 絡 先	愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1番地98 (電話番号 0562-93-2111)	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	赤塚 美樹	藤田保健衛生大学医学部 血液内科・准教授	被験者の診療
	都築 基弘	藤田保健衛生大学医学部 血液内科・講師	被験者の診療
	山本 幸也	藤田保健衛生大学医学部 血液内科・講師	被験者の診療
総括責任者以外の研究者	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	遺伝子導入細胞製剤の製造及び品質管理者
	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	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	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

外部協力者	峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	レトロウイルスベクター製剤の 製造・品質管理責任者 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
-------	-------	--	---

審査委員会が研究 計画の実施を適当 と認める理由	学術的に十分に練られた研究で、倫理的な配慮も含め適正な計画である。委員 全員の合意をもって承認との結論に達した。	
	審査委員会の長の職名	氏名
	藤田保健衛生大学 遺伝子治療・ヒト幹細胞臨床研究審査委員会 委員長代行	松浦晃洋 

研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究
研究の目的	本臨床研究は、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者を対象として、WT1 抗原を HLA-A*24:02 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクター-MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球) 輸注の安全性、体内動態及び臨床効果を以下の項目について評価することを目的とする。 1) 主要評価項目 a) 本遺伝子治療の安全性 ・有害事象発現の有無 ・臨床検査値異常変動の有無 ・増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の有無 ・TCR 遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティの検討 2) 副次評価項目 a) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態 b) 血液学的効果 (PCR 等を用いた分子生物学的完全寛解の確認を含む) c) 免疫機能解析	

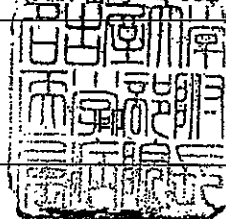


遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 24 年 7 月 23 日

厚生労働大臣 殿

実 施 設	所 在 地	愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65 番地 (郵便番号 466-8560)
	名 称	名古屋大学医学部附属病院 (電話番号 052-741-2111) (FAX 番号 052-744-2161)
	代 表 者 役職名・氏名	名古屋大学医学部附属病院 病院長 松尾清一



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	統括責任者の所属・職・氏名
MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究	名古屋大学大学院 医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授 直江知樹

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

申請年月日

平成24年7月23日

研究の名称	MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	承認日から2年間

総括責任者	所属部局の所在地	愛知県名古屋市中区鶴舞町 65 番地（郵便番号 466-8560）	
	所属機関・部局・職	名古屋大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 教授	
	氏 名	直江 知樹 	
実施の場所	所 在 地	愛知県名古屋市中区鶴舞町 65 番地	
	名 称	名古屋大学医学部附属病院	
	連 絡 先	電話番号：052-744-2145	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	村田 誠	名古屋大学医学部附属病院 血液内科・講師	被験者の診療
	西田 徹也	名古屋大学医学部附属病院 血液内科・助教	被験者の診療
	寺倉 精太郎	名古屋大学医学部附属病院 血液内科・医員	被験者の診療
外部共同研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	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	遺伝子導入細胞製剤の製造及び品質管理者
	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	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	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

峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	レトロウイルスベクター製剤の製造・品質管理責任者 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
審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	審査委員会で研究内容について以下のような確認を行い、審議の結果、実施を適当と認めた。 ①本試験に参加しない場合の患者予後の見込みについて、治療抵抗性となった場合、化学療法を実施しても1年程度である。 ②正常組織に発現する WT-1 に対して作用することで発生する副作用の予測について、中胚葉由来の細胞などで WT-1 の強発現があり、充分注意して実施する必要があるが、ターゲットの異なる遺伝子治療の結果では、正常組織の異常による副作用は報告されていない。 ③二次登録の除外基準「1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後に3か月以上の生存が見込めない被験者」の判断基準について、他の治療などを通して得られるデータから、腫瘍の増殖スピードを考慮して判断する。 ④健常者から採取した T 細胞では安全であるデータが得られていることに比べ、被験者から採取した T 細胞中の異常な細胞に遺伝子導入した場合の安全性に対する懸念について、T 細胞だけが増殖する条件下で増殖させるので懸念は少ないと考えられる。 ⑤採取する T 細胞の予定数量に過不足が生じた場合の取扱について、余剰が生じた場合、被験者に再同意を得ない限り破棄するが、一定の期間は保管する予定である。また、不足の場合は使用しない。 ⑥因果関係を否定できない有害事象が発生して症例数を増加することについて、効果安全性評価委員会による因果関係の判定をととして症例数増加を決定する。 ⑦本試験の siRNA 配列の安全性・有効性について、これまで臨床研究で siRNA の投与例はないが、オフターゲット効果に関して検討した結果、他の遺伝子の発現上昇あるいは減少がないことは確認済みである。 生命倫理審査委員会 委員長・植村 和正  バイオ先端介入研究専門審査委員会 委員長・長谷川 好規 	

遺伝子治療臨床研究実施計画書

課題名「MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的
TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び
骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究」

三重大大学医学部附属病院

第 1.6 版：平成 24 年 11 月 27 日作成
計画書 No. siWT-TCR-HT

記号・略号一覧表

記号・略号	英名	和名
ADA	adenosine deaminase	アデノシンデアミナーゼ
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	後天性免疫不全症候群
Alb	albumin	血清アルブミン
allo-HSCT	allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	同種造血幹細胞移植
ALP	alkaline phosphatase	アルカリフォスファターゼ
ALT (GPT)	alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AML	acute myelogenous leukemia	急性骨髄性白血病
APC	adenomatous polyposis coli	大腸腺腫性ポリープ
AST (GOT)	aspartate aminotransferase	アスパラギン酸 アミノトランスフェラーゼ
ATCC	American Type Culture Collection	
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
CR	complete remission	完全寛解
CRP	C reactive protein	C 反応性蛋白
CT	computed tomography	コンピューター断層撮影
CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events	
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
EF1 α	elongation factor 1 alpha	伸長因子 1 α
ELISPOT	enzyme-linked immunospot	
Fbg	fibrinogen	フィブリノゲン
FDA	Food and Drug Administration	米国 食品医薬品局
FDP	fibrin degradation products	フィブリン分解産物
GaLV	Gibbon ape leukemia virus	

記号・略号	英名	和名
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
Gy	gray	グレイ
Hb	hemoglobin	ヘモグロビン
HBV	hepatitis B virus	B型肝炎ウイルス
HCV	hepatitis C virus	C型肝炎ウイルス
HER2	human EGFR-related 2	ヒト EGFR 関連物質 2
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
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
Ht	hematocrit	ヘマトクリット
HTLV-1	human T-lymphotrophic virus type 1	ヒト T 細胞好性ウイルス 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
IFN- γ	interferon- γ	インターフェロンガンマ
IGF-II	insulin-like growth factors-2	インスリン様成長因子
IL-2	interleukin 2	インターロイキン 2
IPSS	international prognostic scoring system	
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif	
JALSG	Japan Adult Leukemia Study Group	成人白血病治療共同研究グループ
LAM-PCR	linear amplification mediated-PCR	
LDH	lactate Dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LTR	long terminal repeat	末端反復配列
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
MDS	myelodysplastic syndromes	骨髄異形成症候群
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

記号・略号	英名	和名
MoMLV	Moloney murine leukemia virus	モロニーマウス白血病ウイルス
MRI	magnetic resonance imaging	核磁気共鳴画像法
MSCV	murine stem cell virus	マウス幹細胞ウイルス
NCI	National Cancer Institute	米国 国立癌研究所
NIH	National Institutes of Health	米国 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
PDGF α 鎖	platelet-derived growth factor	血小板由来成長因子
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
PS	performance status	パフォーマンスステータス
QOL	quality of life	クオリティ・オブ・ライフ (生活の質)
RAEB	refractory anemia with excess blasts	芽球の多い不応性貧血
RBC	red blood cell	赤血球
RCR	replication competent retrovirus	増殖性レトロウイルス
RCT	randomized controlled trial	ランダム化比較試験
RECIST	Response Evaluation Criteria In Solid Tumors	
rhIL-2	recombinant human interleukin 2	組換えヒトインターロイキン 2
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SCC	squamous cell carcinoma related antigen	扁平上皮癌関連抗原
shDNA	short hairpin DNA	
siRNA	small interfering RNA	

記号・略号	英名	和名
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
TP	total protein	総蛋白
TRALI	transfusion-related acute lung injury	輸血関連急性肺障害
UA	ureic acid	尿酸
VEGF	vascular endothelial growth factor	血管内皮細胞増殖因子
WBC	white blood cell	白血球
WCB	working cell bank	ワーキングセルバンク
WHO	World Health Organization	世界保健機関
WT1	Wilms' tumor 1	ウイルムス腫瘍 1
X-SCID	X-linked severe combined immune deficiency	X 連鎖重症複合免疫不全症
γ -GTP	γ -glutamyl transpeptidase	γ -グルタミルトランス ペプチターゼ

目 次

	頁
I. 遺伝子治療臨床研究の名称	11
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	12
II.1 総括責任者の氏名及びその担当する役割	12
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	12
III. 本臨床研究を実施する施設の名称及びその所在地	13
III.1 当該実施施設の名称及び所在地	13
III.2 細胞を調製する施設の名称及び所在地	13
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	13
IV. 遺伝子治療臨床研究の目的	14
V. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	15
V.1 研究の区分	15
V.2 対象疾患に関する現時点での知見	15
V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要	16
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	17
V.5 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与を併用する理由	18
V.5.1 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与の根拠	18
V.5.2 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与量の設定根拠	19
VI. 遺伝子の種類及びその導入方法	20
VI.1 人に導入する遺伝子の構造と性質	20
VI.1.1 人に導入する遺伝子の構造	20
VI.1.1.1 T細胞受容体 (TCR) α鎖遺伝子	20
VI.1.1.2 T細胞受容体 (TCR) β鎖遺伝子	20
VI.1.1.3 ヒト TCRα の C 領域配列及びヒト TCRβ の C 領域配列に対する siRNA 発現配列	21
VI.1.2 人に導入する遺伝子の性質	27
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	28
VI.2 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	29
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	29
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	29
VI.4.1 遺伝子導入方法の概略	29

VI. 4. 2 当該導入法を選択した理由	30
VI. 4. 3 レトロウイルスベクターの選択根拠	30
VI. 5 ウイルスベクターを用いた遺伝子導入	30
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	30
VI. 5. 2 ウイルスベクターの作製方法	31
VI. 5. 2. 1 ウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR の構築	31
VI. 5. 2. 2 パッケージング細胞株の構築	38
VI. 5. 2. 3 ウイルス産生細胞株の構築	38
VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造	39
VI. 5. 3 ウイルスベクターの構造	39
VI. 5. 4 ウイルスベクターの生物学的特徴	39
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）	40
VII. 1 遺伝子導入方法の安全性	40
VII. 1. 1 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	40
VII. 1. 1. 1 M/WCB の作製法	40
VII. 1. 1. 2 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造方法	41
VII. 1. 2 被験者に投与する物質の純度及びその安全性	43
VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性	44
VII. 1. 3. 1 レトロウイルスベクターの安全性	44
VII. 1. 3. 2 パッケージング細胞の安全性	44
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	48
VII. 1. 5 体内の細胞への遺伝子導入の可能性	49
VII. 1. 6 被験者以外の人に遺伝子が導入される可能性	49
VII. 1. 7 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	49
VII. 1. 8 癌原性の有無	50
VII. 2 遺伝子産物の安全性	50
VII. 3 細胞の安全性	52
VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法	52
VII. 3. 2 培養細胞の純度	55
VII. 3. 3 細胞の遺伝子型、表現型の安定性	56
VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性	57
VII. 4 ペプチドの安全性	58
VII. 4. 1 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの純度	58
VII. 4. 2 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの安全性	58

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	59
IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	62
IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	62
IX.1.1 本臨床研究の実施体制	62
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	62
IX.1.1.2 安全・効果評価・適応判定中央部会	62
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	64
IX.1.2 本臨床研究の実施手順	64
IX.2 被験者の選択基準及び除外基準	66
IX.2.1 一次登録	66
IX.2.1.1 選択基準（一次登録）	66
IX.2.1.2 除外基準（一次登録）	67
IX.2.2 二次登録	67
IX.2.2.1 選択基準（二次登録）	68
IX.2.2.2 除外基準（二次登録）	68
IX.3 被験者の同意の取得方法	68
IX.4 実施期間及び目標症例数	69
IX.5 遺伝子治療臨床研究の実施方法	69
IX.5.1 対照群の設定方法	69
IX.5.2 遺伝子導入方法	70
IX.5.2.1 採血	70
IX.5.2.1.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球のながれ	70
IX.5.2.2 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製	70
IX.5.2.3 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸送	70
IX.5.3 TCR 遺伝子導入 T リンパ球及び改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与	70
IX.5.3.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与	70
IX.5.3.1.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与方法	71
IX.5.3.2 改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの投与方法	71
IX.5.4 前処置及び併用療法の有無	71
IX.5.4.1 前処置	71
IX.5.4.2 臨床研究期間中に行うその他の治療	71
IX.5.4.2.1 併用禁止療法及び併用禁止薬	71
IX.5.4.2.2 併用制限薬	71
IX.5.5 臨床検査項目及び観察項目	72
IX.5.6 予測される副作用及びその対処方法	82

IX. 5. 6. 1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注に伴う副作用	82
IX. 5. 6. 2 ペプチド投与に伴う副作用	83
IX. 5. 7 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	83
IX. 5. 7. 1 主要評価項目	83
IX. 5. 7. 2 副次評価項目	85
IX. 5. 7. 3 中止基準	89
IX. 5. 8 有害事象発現時の措置	90
IX. 5. 8. 1 有害事象発現時	90
IX. 5. 8. 2 重篤な有害事象発現時	90
IX. 5. 9 症例記録に関する記録用紙等の様式	91
IX. 5. 10 記録の保存及び成績の公表の方法	91
IX. 5. 11 個人情報の保護の徹底	91
IX. 5. 11. 1 個人情報保護に関する責務	91
IX. 5. 11. 2 個人情報の取得と利用に関する制限	92
IX. 5. 11. 3 個人情報保護に関する安全管理措置	93
IX. 5. 11. 4 第三者提供の制限	93
IX. 5. 11. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等	93
X. その他必要な事項	95
X. 1 遵守する法令/省令等	95
X. 2 引用文献	96
X. 3 検査スケジュール	102
X. 4 Performance Status (ECOG)	103
X. 5 血液学的効果	103
X. 6 同意・説明文書	104

<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

添付資料Ⅰ. 研究者の略歴及び研究業績

添付資料Ⅱ. 実施施設における設備状況

添付資料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

添付資料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

添付資料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MS3-WT1-siTCR の全塩基配列
- 参考資料 2: マスター/ワーキング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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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 T 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: WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」添付文書
- 参考資料 18: 自己細胞反応性試験の方法
- 参考資料 19: 三重大学で実施中の MAGE-A4 抗原特異的 TCR 遺伝子治療臨床研究の情報
- 参考資料 20: 凍結保存細胞の運搬方法と温度管理試験

I. 遺伝子治療臨床研究の名称

MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による
急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群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臨床研究において果たす役割

II.1 総括責任者の氏名及びその担当する役割

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 大学教員

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	役割分担
影山 愼一	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	遺伝子導入細胞製剤の品質管理責任者 被験者の診療
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	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 被験者の診療
宮原 慶裕	三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン講座 講師	遺伝子導入細胞製剤の体内動態及び 免疫反応の評価 被験者の診療
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 被験者の診療
齋藤 佳菜子	三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教	被験者の診療
峰野 純一	タカラバイオ株式会社 遺伝子医療事業部門副本部長 細胞・遺伝子治療センター長	レトロウイルスベクター製剤の製造・ 品質管理責任者 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. 本臨床研究を実施する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：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.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：愛媛大学医学部附属病院

所在地：愛媛県東温市志津川

TEL：089-960-5296 FAX：089-960-5299

名称：藤田保健衛生大学病院

所在地：愛知県豊明市杣掛町田楽ヶ窪 1 番地 98

TEL：0562-93-2111 FAX：0562-95-0016

名称：名古屋大学医学部附属病院

所在地：愛知県名古屋市昭和区鶴舞町 65

TEL：052-741-2111 FAX：052-744-2161

IV. 遺伝子治療臨床研究の目的

本臨床研究は、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髄性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群患者を対象として、WT1 抗原を HLA-A*24:02 存在下で特異的に認識する T 細胞受容体 (TCR) α 鎖及び β 鎖の遺伝子をレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した自己リンパ球 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球) 輸注の安全性、体内動態及び臨床効果を以下の項目について評価することを目的とする。

① 主要評価項目

- 本遺伝子治療の安全性
 - 有害事象発現の有無
 - 臨床検査値異常変動の有無
 - 増殖性レトロウイルス (RCR) 出現の有無
 - TCR 遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティの検討

② 副次評価項目

- TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態
- 血液学的効果 (PCR 等を用いた分子生物学的完全寛解の確認を含む)
- 免疫機能解析

また、TCR 遺伝子治療を実用化し、多くの患者へ投与するためには、細胞調製施設を有していない医療機関においても遺伝子導入細胞を投与することが必要となる。そのため、本臨床研究ではあらかじめ構築した搬送体制を利用し、三重大学医学部内に設置された細胞調製施設より本臨床研究に参画している医療機関へ TCR 遺伝子導入 T リンパ球を搬送し、被験者に投与することで医療機関の間で安全性や血中動態等の結果に差が無いことを確認することも目的としている。

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

急性骨髄性白血病 (AML)

急性骨髄性白血病は発症頻度約 3 人/10 万人で、65 歳を中央値とする代表的な造血器悪性腫瘍である(1)。AML の標準的化学療法では、70-80%の患者において完全寛解 (CR) が得られているにもかかわらず、長期生存率は 30-40%に留まっている(2-4)。このように化学療法による治療効果は、まだ十分なものとは言えない。その理由の一つとして、抗癌剤が腫瘍細胞のみならず正常細胞にも傷害をもたらすため、様々な程度の骨髄抑制やその他の臓器障害を合併することから、化学療法は長期間の入院を必要とし、3-5%の患者で治療関連死が見られる。また、抗癌剤の毒性に対する耐性が低い高齢者では、十分な量の抗癌剤を投与出来ず、結果として治療成績が低くなる悪循環が見られる。高齢者に限らず、臓器障害を持つ患者では化学療法の施行そのものが困難な場合もある。現在臨床の場で使用可能な AML に対する抗体療法としてヒト化抗 CD33 抗体と抗腫瘍性抗生物質であるカリケアマイシンの誘導体を結合した抗悪性腫瘍薬ゲムツズマブオゾガマイシンがある。「再発又は難治性の CD33 陽性の急性骨髄性白血病」が適応症であるが、全生存期間中央値は 4.9 カ月、無再発生存中央値は 5.2 カ月と効果は限られる。また、重篤な骨髄抑制や肝障害が高率に発生し、約 10%の患者に治療関連死が見られている。これらの所見から、ゲムツズマブオゾガマイシンの適応も効果も限定的といえる (5)。

寛解導入療法で CR とならない患者や、CR となった後に再発した患者は通常の化学療法のみでは長期生存の可能性は低く、同種造血幹細胞移植 (allo-HSCT) 治療の方が治療成績が良い (6)。第 1 寛解期症例でも寛解到達困難例等の高リスク群では、allo-HSCT の成績の方が優れている (7)。従って、急性骨髄性白血病患者のうち 50 歳以下で、HLA が一致するドナーがおり、allo-HSCT 可能な症例に対しては allo-HSCT が適応になると考えられる。しかし、高齢者や適切なドナーが適時的に得られない症例、移植までに病状が進行し移植に至らない症例など allo-HSCT を受けられない症例が約半数以上存在する。また、allo-HSCT は、レシピエントのドナーと異なった組織適合性抗原を標的とした免疫療法であり、当然、正常組織に発現する組織適合性抗原も標的となるため、白血病細胞のみならず、正常臓器にも傷害をもたらす (GVHD)。加えて、移植前処置として大量に用いられる抗癌剤や放射線の毒性、免疫不全に伴う感染症等の合併症により、HLA 一致同胞ドナーからの移植でも 10-20% 程度の患者で治療関連死が見られ、非血縁者や HLA 不一致ドナーからの移植においては、治療関連死の可能性は更に高くなる。高齢者では、この点は更に深刻である。これらの問題点は、世界的な鋭意努力にも関わらず、現時点でも解決されていない。

以上から、より有害事象が少なく、より広い範囲の患者に適応できる有効な治療法の確立が求められている。

骨髓異形成症候群 (MDS)

骨髓異形成症候群は、その疾患頻度が3~5人/10万人で、70歳以上ではその2倍以上の頻度に達し、高齢者に多い(1)。その治療は、骨髓中の骨髓芽球の頻度や、末梢血中の血球減少の程度、骨髓細胞の染色体異常を元に作成されたIPSS(8)に基づいた疾患重症度に応じて、異なっている。特に白血病化し易いIPSS INT-2以上のハイリスクMDSに対する治療は、急性骨髓性白血病に準じて行われる。MDSから移行したAMLに対しても同種造血幹細胞移植(allo-HSCT)の有効性が指摘されているが(9)、高齢者においては、HLA一致同胞ドナーを含めて、適切なドナーが適時的に得られないことも多く、そもそもallo-HSCT自体の持つ治療関連毒性に耐えられないことが多い。一方で、日本成人白血病治療共同研究グループ(JALSG)がハイリスクMDS及びMDSから移行したAML(MDS-AML)患者120名を対象に行った標準治療確立を目的とした臨床研究(JALSG MDS200 Study)の結果によれば、イダルビシンとシトシンアラビノシドを併用した通常の抗癌剤治療(IDA/Ara-C)による寛解導入療法を受けた患者群と、骨髓低形成などの理由でIDA/Ara-Cによる治療が受けられなかった為に治療強度を落とした低用量のシトシンアラビノシドとアクトラルビシンを併用した治療法(CA)を受けた2群間で比較した時、2年生存率はIDA/Ara-C群が28.1%であったのに対してCA群が32.1%と両者間に差が無く、抗癌剤治療とは異なる概念での新たな治療戦略の必要性が指摘されている(10)。現在、様々な新規抗癌剤や分子標的薬などが研究開発されているが、何れもその評価が定まっていない。このように、抗癌剤毒性に対する耐性が低い高齢者に多いMDS、特にハイリスクMDSとMDSから移行したAMLに対する新たな治療法の開発は、今後急速な高齢化により、患者数の増加が予測されることから、その意義が非常に大きいと考えられる。

V.3 当該遺伝子治療臨床研究の概要

本臨床研究では、薬物療法等の標準的な治療法の実施が困難である非寛解期の急性骨髓性白血病、あるいは治療困難な予後不良の骨髓異形成症候群患者のうち、HLA-A*24:02陽性、腫瘍細胞にWT1抗原が発現している被験者から採取した末梢血リンパ球に、WT1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後、培養増殖させ、その自己リンパ球を経静脈的に投与する。2回目のTCR遺伝子導入Tリンパ球を輸注後、WT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチドのN末端より2番目のメチオニンをチロシンに変更した改変型WT1₂₃₅₋₂₄₃ペプチド(9アミノ酸:CYTWNQMN_L)を皮下投与し、被験者体内でのTCR遺伝子導入Tリンパ球の活性化(あるいは増殖)を図る。本臨床研究は、HLA-A*24:02拘束性WT1特異的TCR遺伝子導入Tリンパ球を輸注することにより、腫瘍特異的免疫反応、更には臨床効果を期待するものである。

WT1は急性骨髓性白血病(骨髓異形成症候群よりの移行例含む)、急性リンパ性白血病、多発性骨髓腫、慢性骨髓性白血病、骨髓異形成症候群に発現する抗原であり、またHLA-A*24:02は日本人の約60%が有する主要組織適合抗原である。

WT1遺伝子は、Wilms腫瘍の原因遺伝子の1つとして単離された遺伝子に由来し、成長因

子遺伝子 (PDGF α 鎖、CSF-1、IGF-II)、成長因子レセプター遺伝子 (IGF-IR、EGFR) や、その他の遺伝子 (RAR- α 、C-myb、C-myc、bcl-2、オルニチン脱炭酸酵素、N-myc) の転写を抑制する。他方、WT1 遺伝子は、RbAp46、Dax-1、bcl-2 遺伝子の転写を促進することが知られている。WT1 遺伝子は、白血病や種々の固形癌にて高頻度で発現しており、これらの疾患において、WT1 遺伝子は、腫瘍発生に関与した機能を果たしており、固形癌や造血器腫瘍の発症や進展に重要な役割を果たしていると考えられている。

TCR 遺伝子導入 T 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 (CTL) 表面上の WT1 特異的 TCR が、腫瘍細胞表面上の HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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。

本臨床研究における評価項目は、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の安全性、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

治療抵抗性となった急性骨髄性白血病に対して、白血病細胞の増殖の病勢を抑える程度の化学療法が実施されるものの予後は数か月未満である。MDS は急性転化しなければ保存的治療で年単位の予後が見込めるが、輸血合併症、反復感染症をきたす場合、多くの予後は1年未満となる。

造血器腫瘍、骨髄異形成症候群に対する化学療法以外の治療として、分子標的治療薬が開発されている。急性骨髄性白血病に対する抗体療法としてヒト化抗 CD33 抗体と抗腫瘍性抗生物質であるカリケアマイシンの誘導体を結合した抗悪性腫瘍薬ゲムツズマブオゾガマイシンが承認され、またフィラデルフィア染色体陽性白血病に対するチロシンキナーゼ阻害薬も複数開発されている。しかし、これらに薬剤においても寛解導入がなされない症例は、依然として絶対予後不良であり、免疫的機序による白血病抗原などを標的とする新規治療法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。中でも、米国国立衛生研究所 (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 (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 49~72% の腫瘍縮小効果 (PR + CR) を報告している (11)。

このように、体外で増殖させた TIL 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 $10^8 \sim 10^{11}$ 個の細胞が投与され、体内で一定期間の維持が確認されている。必要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 (OKT3) 及びインターロイキン 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 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十分量の細胞数を得られない症例もあり、細胞入手可能例がごく少数に限られることから、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-A*24:02 陽性患者の T リンパ球に WT1 特異的 TCR 遺伝子を導入することで腫瘍細胞に対する傷害活性を付与するものであり、体外にて培養・増殖させることにより必要量の WT1 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、レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR により調製された WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、WT1 陽性・HLA-A*24:02 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して抗原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。また、免疫不全マウスに WT1 陽性・HLA-A*24:02 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 T リンパ球投与群で腫瘍の抑制効果が認められた。

なお、上記の 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 (12)、有望な新規癌治療法となる可能性を示唆している。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 (13)。

また、国内では三重大学において、本遺伝子治療臨床研究で使用されるベクターと類似のレトロウイルスベクターを用いて、治療抵抗性食道癌患者を対象とした遺伝子治療臨床研究が実施されており、現在までに RCR を含めた安全性の問題は起きていない (参考資料 19)。

以上より、本臨床研究で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。

V.5 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与を併用する理由

V.5.1 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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、採取した 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、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 (14)。従って、可能な限り短期間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 (14-20)。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ジョン、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、輸注した 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、輸注した T 細胞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(14, 16-20)。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ジョン、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悪性黒色腫患者の治療が試みられている(13, 21)。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、被験者への 2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後 2 日目と 16 日目に改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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では、まず TCR 遺伝子導入 T リンパ球を輸注することにより被験者体内における WT1 反応性 T 細胞数を飛躍的に増大させ、その後改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを投与することにより輸注した WT1 反応性 T 細胞を被験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。

WT1 ペプチドワクチンを追加投与するに際して、本臨床研究で使用する TCR 遺伝子が認識する天然型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの第 2 アミノ酸残基をチロシンに改変して HLA-A24 分子への結合親和性を増強することが大阪大学を中心とした複数のグループにより報告されている。また、複数の種類の癌腫に対して改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを投与する臨床試験から、これまでに少なくとも 50 例以上の悪性腫瘍患者に投与されたが、特筆すべき有害事象は見られず、有効性と安全性に関する報告がされている(22-24)。更に、本臨床研究で使用する TCR を有する T 細胞も、この改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを含むテトラマーで良好に染色されることから、免疫応答を検討する系としても問題がない。最後に、*in vitro* の検討で、この改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを用いて、本 TCR 遺伝子を導入した T 細胞を増幅できることを確認している。以上の理由により、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの使用は合理的であると判断する。

V.5.2 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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ジョン化して用いると有効であることが示されてきた(25, 26)。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(27-31)。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 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(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(32-36)。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(32, 37)。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ると考えられている(32)。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。

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。また、内在性の TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子に干渉する siRNA 発現配列も導入される。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

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 V20、J33、C であり、TCR β 鎖は V5-1、N、J2-1、C2 の配列である。

また本臨床研究では内在性のヒト TCR の発現を抑制する為にショートヘアピン型 DNA (shDNA) 配列を導入する。これは、ヒト 13 番染色体上に存在するマイクロ RNA has-mir-17、has-mir-18、has-mir-19、has-mir-20 のクラスター配列中の 4 種類のマイクロ RNA 配列を、ヒト TCR α の C 領域に相同な 2 種類の shDNA とヒト TCR β の C 領域に相同な 2 種類の shDNA 並びにこれらに相補的な配列により置換したものである。

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 20 である。本遺伝子は HLA-A*24:02 拘束性 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドに特異的な CTL クローン TAK-1 (38) から単離され、273 アミノ酸からなるポリペプチドをコードする 819 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、112 アミノ酸からなる V20 領域、20 アミノ酸からなる J33 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 C 領域を最適化した TCR α 20 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。図 2 に最適化前後の TCR α 20 遺伝子の塩基配列を示す。

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 5-1 である。本遺伝子は HLA-A*24:02 拘束性 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドに特異的な CTL クローン TAK-1 (38)

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 (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、114 アミノ酸からなる V5-1 領域、5 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-1 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 3 に C 領域を最適化した TCR β 5-1 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列を示す。図 4 に最適化前後の TCR β 5-1 遺伝子の塩基配列を示す。

VI. 1. 1. 3 ヒト TCR α の C 領域配列及びヒト TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列

ヒト T リンパ球に任意の TCR 遺伝子を外部から導入する際に、大きな問題点の一つと考えられているのが、リンパ球が元来有する内在性 TCR の存在である。遺伝子導入された腫瘍特異的 TCR と内在性 TCR はリンパ球上の CD3 分子を競合的に取り合う。リンパ球上の CD3 分子には限りがあるので、結果的に導入 TCR の発現を阻害することとなる。さらに、遺伝子導入された TCR の α 鎖と β 鎖は内在性 TCR の α 鎖と β 鎖との間でヘテロダイマーを形成する可能性がある。このことは、本来目的とする腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させると共に、予測不可能な特異性を有する TCR が出現する可能性も示唆している。マウスを用いた TCR 改変 T 細胞療法モデルにおいて、遺伝子導入された TCR と内在性 TCR の α 鎖 β 鎖との間におけるミスペアリングの結果、形成された TCR ヘテロダイマーが自己反応性を獲得し、輸注療法後に移植片対宿主病 (GVHD) を引き起こすことが報告された (39)。これまでに米国 NCI のグループで実施された 160 例を超える TCR 遺伝子治療の臨床試験では明らかな GVHD 反応は 1 例も報告されておらず、上記マウスモデルの臨床的意義は今後検討を必要とするが、TCR のミスペアリングを可能な限り防ぐ手だてが推奨されている (40)。

上記問題を解決するために、腫瘍抗原特異的 TCR 遺伝子の発現と共にリンパ球の内在性 TCR 遺伝子に対する siRNA を発現するレトロウイルスベクターを開発した。導入する腫瘍特異的 TCR は siRNA の影響を受けないようにコドン修飾を行い、導入 TCR 遺伝子と共に siRNA 配列を sh RNA として含む 18 通りのベクター構造と pri-miRNA として含む 12 通りのベクター構造の計 30 種類の中から最も効率良く内在性 TCR を抑制し導入 TCR を発現させるものを選び出した (41)。最終的に選択された配列はヒト 13 番染色体上に存在するマイクロ RNA hsa-mir-17、hsa-mir-18、hsa-mir-19、hsa-mir-20 のクラスター配列中の、4 種類のマイクロ RNA 配列をヒト TCR α の C 領域に対する shDNA 2 種類とヒト TCR β の C 領域に対する shDNA 2 種類の shDNA で置換したものである。図 5 に塩基配列を示す。

A1	ATGGAGAAAATGTTGGAGTGTGCATTAGTCTTGTGGCTTCAGCTTGGCTGGTTGAGT	60	
	M E K M L E C A F I V L W L Q L G W L S		
61	GGAGAAGACCAGGTGACGCAGAGTCCCGAGGCCCTGAGACTCCAGGAGGGAGAGAGTAGC	120	
	G E D Q V T Q S P E A L R L Q E G E S S		
121	AGTCTCAACTGCAGTTACACAGTCAGCGGTTTAAGAGGGCTGTTCTGGTATAGGCAAGAT	180	
	S L N C S Y T V S G L R G L F W Y R Q D		V20 領域
181	CCTGGGAAAGGCCCTGAATTCCTCTTCACCCTGTATTACAGCTGGGGAAGAAAAGGAGAAA	240	
	P G K G P E F L F T L Y S A G E E K E K		
241	GAAAGGCTAAAAGCCACATTAACAAAGAAGGAAAGCTTTCTGCACATCACAGCCCCTAAA	300	
	E R L K A T L T K K E S F L H I T A P K		
301	CCTGAAGACTCAGCCACTTATCTCTGTGCTGTGCAGGCGGTGGATAGCAACTATCAGTTA	360	
	P E D S A T Y L C A V Q A V D S N Y Q L		J33 領域
361	ATCTGGGGCGCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGATATCCAGAACCCTGACCCTGCC	420	
	I W G A G T K L I I K P D I Q N P D P A		
421	GTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTC	480	
	V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F		
481	GACAGCCAGACCAACGTGAGCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGACAAGACC	540	
	D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T		C 領域
541	GTGCTGGACATGCGGAGCATGGAAGTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAG	600	
	V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K		
601	AGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATCATCCCGAGGACACCTTTTTC	660	
	S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F		
661	CCCAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAACTGGTGGAGAAGAGCTTCGAGACCGACACC	720	
	P S P E S S C D V K L V E K S F E T D T		
721	AACCTGAACTTCCAGAATCTGAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAAGTGGCC	780	
	N L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A		
781	GGCTTCAATCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGAGCAGCTGA	822	
	G F N L L M T L R L W S S *		

図1 TCR α 20 遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

wTCRa	ATGGAGAAAA	TGTTGGAGTG	TGCATTGATA	GTCTTGTTGGC	TTCAGCTTGG	CTGGTTGACT	60
coTCRa	ATGGAGAAAA	TGTTGGAGTG	TGCATTGATA	GTCTTGTTGGC	TTCAGCTTGG	CTGGTTGACT	60
wTCRa	GGAGAAGACC	AGGTGACGCA	GAGTCCCGAG	GCCCTGAGAC	TCCAGGAGGG	AGAGAGTAGC	120
coTCRa	GGAGAAGACC	AGGTGACGCA	GAGTCCCGAG	GCCCTGAGAC	TCCAGGAGGG	AGAGAGTAGC	120
wTCRa	AGTCTCAACT	GCAGTTACAC	AGTCAGCGGT	TTAAGAGGGC	TGTTCTGGTA	TAGGCAAGAT	180
coTCRa	AGTCTCAACT	GCAGTTACAC	AGTCAGCGGT	TTAAGAGGGC	TGTTCTGGTA	TAGGCAAGAT	180
wTCRa	CCTGGGAAAG	GCCCTGAATT	CCTCTTCACC	CTGTATTGAG	CTGGGGAAGA	AAAGGAGAAA	240
coTCRa	CCTGGGAAAG	GCCCTGAATT	CCTCTTCACC	CTGTATTGAG	CTGGGGAAGA	AAAGGAGAAA	240
wTCRa	GAAAGGCTAA	AAGCCACATT	AACAAAGAAG	GAAAGCTTTC	TGCACATCAC	AGCCCCTAAA	300
coTCRa	GAAAGGCTAA	AAGCCACATT	AACAAAGAAG	GAAAGCTTTC	TGCACATCAC	AGCCCCTAAA	300
wTCRa	CCTGAAGACT	CAGCCACTTA	TCTCTGTGCT	GTGCAGGCGG	TGGATAGCAA	CTATCAGTTA	360
coTCRa	CCTGAAGACT	CAGCCACTTA	TCTCTGTGCT	GTGCAGGCGG	TGGATAGCAA	CTATCAGTTA	360
wTCRa	ATCTGGGGCG	CTGGGACCAA	GCTAATTATA	AAGCCAGATA	TCCAGAACCC	TGACCCCTGCC	420
coTCRa	ATCTGGGGCG	CTGGGACCAA	GCTAATTATA	AAGCCAGATA	TCCAGAACCC	TGACCCCTGCC	420
wTCRa	GTGTACCAGC	TGAGAGACTC	TAAATCCAGT	GACAAGTCTG	TCTGCCTATT	CACCGATTTT	480
coTCRa	GTGTACCAGC	TGAGAGACTC	TAAATCCAGT	GACAAGTCTG	TCTGCCTATT	CACCGATTTC	480
wTCRa	GATTCTCAAA	CAAATGTGTC	ACAAAGTAAG	GATTCTGATG	TGTATATCAC	AGACAAAAC	540
coTCRa	<u>GACAGCCAGA</u>	<u>CCAACGTGAG</u>	<u>CCAGAGCAAG</u>	<u>GACAGCGACG</u>	<u>TGTACATCAC</u>	<u>CGACAAGACC</u>	540
wTCRa	GTGCTAGACA	TGAGGTCTAT	GGACTTCAAG	AGCAACAGTG	CTGTGGCCTG	GAGCAACAAA	600
coTCRa	GTGCT <u>GGACA</u>	<u>TGCGGAGCAT</u>	GGACTTCAAG	AGCAACAGCG	<u>CCGTGGCCTG</u>	<u>GTCCAACAAG</u>	600
wTCRa	TCTGACTTTG	CATGTGCAAA	CGCCTTCAAC	AACAGCATT	TTCCAGAAGA	CACCTTCTTC	660
coTCRa	<u>AGCGACTTCG</u>	<u>CCTGCGCCAA</u>	CGCCTTCAAC	AACAGCATCA	<u>TCCCCGAGGA</u>	<u>CACCTTTTTC</u>	660
wTCRa	CCCAGCCCAG	AAAGTTCTTG	TGATGTCAAG	CTGGTCGAGA	AAAGCTTTGA	AACAGATACG	720
coTCRa	CCCAGCCCCG	<u>AGAGCAGCTG</u>	<u>CGACGTGAAA</u>	CTGGTGGAGA	<u>AGAGCTTCGA</u>	<u>GACCGACACC</u>	720
wTCRa	AACCTAAACT	TTCAAAACCT	GTCAGTGATT	GGGTTCCGAA	TCCTCCTCCT	GAAAGTGGCC	780
coTCRa	AACCTGAACT	<u>TCCAGAATCT</u>	<u>GAGCGTGATC</u>	<u>GGCTTCCGGA</u>	<u>TCCTGCTGCT</u>	GAAAGTGGCC	780
wTCRa	GGGTTTAATC	TGCTCATGAC	GCTGCGGCTG	TGGTCCAGCT	GA	822	
coTCRa	<u>GGCTTCAATC</u>	<u>TGCTGATGAC</u>	<u>CCTGCGGCTG</u>	<u>TGGAGCAGCT</u>	GA	822	

図 2 C 領域最適化前後の TCR α 20 遺伝子の塩基配列

wTCRa : 最適化前の TCR α 20 遺伝子塩基配列

coTCRa : 最適化後の TCR α 20 遺伝子塩基配列 (下線 : 変換した塩基)

1	ATGGGCTCCAGGCTGCTCTGTTGGGTGCTGCTTTGTCTCCTGGGAGCAGGCCAGTAAAG	60	
	M G S R L L C W V L L C L L G A G P V K		
61	GCTGGAGTCACTCAAACCTCAAGATATCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGTGACACTG	120	
	A G V T Q T P R Y L I K T R G Q Q V T L		V5-1 領域
121	AGCTGCTCCCCTATCTCTGGGCATAGGAGTGTATCCTGGTACCAACAGACCCCAGGACAG	180	
	S C S P I S G H R S V S W Y Q Q T P G Q		
181	GGCCTTCAGTTCCTCTTTGAATACTTCAGTGAGACACAGAGAAACAAAGGAACTTCCT	240	
	G L Q F L F E Y F S E T Q R N K G N F P		
241	GGTCGATTCTCAGGGCGCCAGTTCTCTAACTCTCGCTCTGAGATGAATGTGAGCACCTTG	300	
	G R F S G R Q F S N S R S E M N V S T L		N 領域
301	GAGCTGGGGGACTCGGCCCTTTATCTTTGCGCCAGCAGCTTG	360	
	E L G D S A L Y L C A S S L G W R E T Y		J2-1 領域
361	AATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGCTCACCCTGCTAGAGGACCTGAAAAACGTG	420	
	N E Q F F G P G T R L T V L E D L K N V		
421	TCCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAGAAA	480	
	F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K		
481	GCCACCCTGGTGTGCCTGGCCACCGGCTTCTACCCGACCACGTGGAGCTGTCTTGGTGG	540	
	A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W		
541	GTGAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAG	600	
	V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q		C2 領域
601	CCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCCTGAGCAGCCGGCTGAGAGTGAGCGCCACCTTC	660	
	P A L N D S R Y C L S S R L R V S A T F		
661	TGGCAGAACCCAGGAACCACTTCCGCTGTCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAAC	720	
	W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N		
721	GACGAGTGGACCCAGGACAGAGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGAGCGCCGAGGCCTGG	780	
	D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W		
781	GGCAGAGCCGACTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCCGCCACC	840	
	G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L S A T		
841	ATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCTGTACGCGTGCTGGTGTCCGCCCTG	900	
	I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L		
901	GTGCTGATGGCCATGGTGAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCTGA	942	
	V L M A M V K R K D S R G *		

図3 TCR β 5-1遺伝子の塩基配列とコードするアミノ酸配列

wTCRb	ATGGGCTCCA	GGCTGCTCTG	TTGGGTGCTG	CTTTGTCTCC	TGGGAGCAGG	CCCAGTAAAG	60
coTCRb	ATGGGCTCCA	GGCTGCTCTG	TTGGGTGCTG	CTTTGTCTCC	TGGGAGCAGG	CCCAGTAAAG	60
wTCRb	GCTGGAGTCA	CTCAAACTCC	AAGATATCTG	ATCAAAACGA	GAGGACAGCA	AGTGACACTG	120
coTCRb	GCTGGAGTCA	CTCAAACTCC	AAGATATCTG	ATCAAAACGA	GAGGACAGCA	AGTGACACTG	120
wTCRb	AGCTGCTCCC	CTATCTCTGG	GCATAGGAGT	GTATCCTGGT	ACCAACAGAC	CCCAGGACAG	180
coTCRb	AGCTGCTCCC	CTATCTCTGG	GCATAGGAGT	GTATCCTGGT	ACCAACAGAC	CCCAGGACAG	180
wTCRb	GGCCTTCAGT	TCCTCTTTGA	ATACTTCAGT	GAGACACAGA	GAAACAAAGG	AAACTTCCCT	240
coTCRb	GGCCTTCAGT	TCCTCTTTGA	ATACTTCAGT	GAGACACAGA	GAAACAAAGG	AAACTTCCCT	240
wTCRb	GGTCGATTCT	CAGGGCGCCA	GTTCTCTAAC	TCTCGCTCTG	AGATGAATGT	GAGCACCTTG	300
coTCRb	GGTCGATTCT	CAGGGCGCCA	GTTCTCTAAC	TCTCGCTCTG	AGATGAATGT	GAGCACCTTG	300
wTCRb	GAGCTGGGGG	ACTCGGCCCT	TTATCTTTGC	GCCAGCAGCT	TGGGGTGGCG	GGAGACTTAC	360
coTCRb	GAGCTGGGGG	ACTCGGCCCT	TTATCTTTGC	GCCAGCAGCT	TGGGGTGGCG	GGAGACTTAC	360
wTCRb	AATGAGCAGT	TCTTCGGGCC	AGGGACACGG	CTCACCGTGC	TAGAGGACCT	GAAAAACGTG	420
coTCRb	AATGAGCAGT	TCTTCGGGCC	AGGGACACGG	CTCACCGTGC	TAGAGGACCT	GAAAAACGTG	420
wTCRb	TTCCACCCG	AGGTCGCTGT	GTTTGAGCCA	TCAGAAAGCAG	AGATCTCCCA	CACCCAAAAG	480
coTCRb	TTCCACCCG	AGGTCGCTGT	GTTTGAGCCA	TCAGAAAGCAG	AGATCTCCCA	CACCCAGAAA	480
wTCRb	GCCACACTGG	TGTGCCTGGC	CACAGGCTTC	TACCCCGACC	ACGTGGAGCT	GAGCTGGTGG	540
coTCRb	GCCAC <u>C</u> CTGG	TGTGCCTGGC	CAC <u>C</u> GGCTTC	TACCCCGACC	ACGTGGAGCT	<u>GTCT</u> TGGTGG	540
wTCRb	GTGAATGGGA	AGGAGGTGCA	CAGTGGGGTC	AGCACAGACC	CGCAGCCCCT	CAAGGAGCAG	600
coTCRb	GTGAAC <u>G</u> GGA	AAGAGGTGCA	CAG <u>C</u> GGGTC	AGCAC <u>C</u> AGACC	<u>C</u> GCAGCCCCT	<u>G</u> AAAGAGCAG	600
wTCRb	CCCGCCCTCA	ATGACTCCAG	ATACTGCCTG	AGCAGCCGCC	TGAGGGTCTC	GGCCACCTTC	660
coTCRb	CCCGCCCT <u>G</u> A	<u>AC</u> GACAG <u>C</u> CG	<u>G</u> TA <u>C</u> TGCCTG	AGCAGCC <u>G</u> GC	TGAG <u>A</u> GT <u>G</u> AG	<u>C</u> GCCACCTTC	660
wTCRb	TGGCAGAACC	CCCGCAACCA	CTTCCGCTGT	CAAGTCCAGT	TCTACGGGCT	CTCGGAGAAT	720
coTCRb	TGGCAGAACC	CCAGGAACCA	CTTCCGCTGT	CAG <u>G</u> TG <u>C</u> AGT	TCTACGG <u>C</u> CT	<u>GAGC</u> GAGA <u>A</u> C	720
wTCRb	GACGAGTGGA	CCCAGGATAG	GGCCAAACCT	GTCACCCAGA	TCGTACGCGC	CGAGGCCTGG	780
coTCRb	GACGAGTGGA	CCCAGG <u>A</u> CAG	<u>A</u> GCCAA <u>G</u> CCC	GT <u>G</u> ACCCAGA	TCGT <u>A</u> GCGC	CGAGGCCTGG	780
wTCRb	GGTAGAGCAG	ACTGTGGCTT	CACCTCCGAG	TCTTACCAGC	AAGGGGTCCT	GTCTGCCACC	840
coTCRb	GGCAGAG <u>C</u> CG	ACTG <u>C</u> GGCTT	CACCAG <u>C</u> GAG	<u>A</u> GCTACCAGC	AGGG <u>C</u> GTGCT	GTCCGCCACC	840
wTCRb	ATCCTCTATG	AGATCTTGCT	AGGGAAGGCC	ACCTTGATG	CCGTGCTGGT	CAGTGCCCTC	900
coTCRb	ATCCTG <u>T</u> ACG	AGATC <u>T</u> GCT	<u>G</u> GGCAAGGCC	ACC <u>T</u> GTACG	CCGTGCTGGT	<u>G</u> TCCGCCCTG	900
wTCRb	GTGCTGATGG	CCATGGTCAA	GAGAAAGGAT	TCCAGAGGCT	AG	942	
coTCRb	GTGCTGATGG	CCATGGT <u>G</u> AA	<u>G</u> CGGAAGGAC	<u>A</u> GCCGGGGCT	<u>GA</u>	942	

図4 最適化前後の TCR β 5-1 遺伝子の塩基配列

wTCRb : 最適化前の TCR β 5-1 遺伝子塩基配列

coTCRb : 最適化後の TCR β 5-1 遺伝子塩基配列 (下線 : 変換した塩基)

TATTTCAAAT TTAGCAGGAA AAAAGAGAAC ATCACCTTGT AAAACTGAAG ATTGTGACCA 60
GTCAGAATAA TGTGTAAGGA TTCTGATGTG TACACAGGGA AGCGAGTCTG TACACATCAG 120
①
AATCCTTACA GCATTATGGT GACAGCTGCC TCGGGAAGCC AAGTTGGGCT TTAAAGTGCA 180
GGCCTGCTG ATGTTGAGTG CTTTTGTTC CCACCATCCT CTATGAGATT AGTGCTCCTG 240
③
GTTGATCTCA TAGAGGATGG TGGGGCATAA GAAGTTATGT ATTCATCCAA TAATCAAGC 300
CAAGCAAGTA TATAGGTGTT TTAATAGTTT TTGTTTGCAG TCCTGTGTTT CATGGTCAAG 360
AGAAAGGACA TGCTACAGTC AAGATGTCCT TTCTCTTGAC CATGGTGGTG GCCTGCTATT 420
④
TCCTTCAAAT GAATGATTTT TACTAATTTT GTGTACTTTT ATTGTGTCGA TGTAGAATCT 480
GCCTGGTCTA TCTGATGTGA CAGCTTCTGT AGCACCAACA AATCTGACTT TGCAACTGTG 540
②
CTCTGAGAAG CTGCAAAGTC AGATTTGTTG TACTGCTAGC TGTAGAACTC CAGCTTCGGC 600
CTGTCGCCCA ATCAAAGTGT CCTGTTACTG 630

図5 siRNA発現配列の塩基配列

下線：ヒト TCR α の C 領域配列に相同な shDNA2 種類 (①、②)、
及びヒト TCR β の C 領域配列に相同な shDNA2 種類 (③、④)

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MS3-WT1-siTCR が細胞に感染すると、MS3-WT1-siTCR のゲノム (図 10 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 6 に示すウイルスプラスミドベクターpMS3-WT1-siTCR 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、多様なクロータイプが存在する。

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、TCR β 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 10 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MS3-WT1-siTCR 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 α 鎖遺伝子は LTR プロモーターによって転写される (図 10 参照)。レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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 MoMLV 由来、U3 領域は PCMV (PCC4-cell-passaged myeloproliferative sarcoma virus) 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。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 領域の構造をとり、PCMV 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。なお、PCMV の U3 領域は、MoMLV と比較して一部分が欠失、点変異しており、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。また、TCR α 鎖遺伝子の上流に位置するヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域は、スプライシング能の高いイントロンのスプライシングアクセプター周辺の配列を含んでおり、その下流に位置する遺伝子の意図しないスプライシングを防ぐことにより遺伝子発現転写能を高めている (42)。

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入された細胞において、ヒト TCR α の C 領域配列/ヒト TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列は TCR α 鎖 mRNA の下流に連結された形で LTR プロモーターによって転写される (図 10 参照)。これらの siRNA 配列は、レトロウイルスベクターが導入された T 細胞の内在性 TCR の発現を特異的に抑制する効果がある。「VI. 1. 1. 3 ヒト TCR α の C 領域配列及びヒト TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列」の項の記述にあるように、T 細胞の内在性 TCR の存在は、内在性 TCR と導入 TCR による CD3 分子の競合と内在性 TCR と導入 TCR の間でのミスペアリングにより本来目的とす

る腫瘍特異的 TCR のヘテロダイマー形成の確率を減少させると共に、予測不可能な特異性を有する TCR が出現する可能性も示唆している。従ってレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR に含まれる siRNA 配列は導入 TCR の発現効率を上昇し、TCR ミスペアリングの危険性を低下させる。なお、導入する WT1 特異的 TCR 遺伝子にはコドン修飾がなされ、siRNA の影響を受けない。

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 分子を構成する。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 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 (CDR) 1、CDR2 領域は MHC との結合に寄与し、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 $\gamma-\epsilon$ 、 $\delta-\epsilon$ 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 WT1 特異的 TCR は、 α 鎖が 112 アミノ酸からなる V20 領域、20 アミノ酸からなる J33 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 114 アミノ酸からなる V5-1 領域、5 アミノ酸からなる N 領域、15 アミノ酸からなる J2-1 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 3 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 WT1 特異的 TCR 分子を構成している。この WT1 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-A*24:02 分子と WT1 分子由来の抗原ペプチドである WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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。

本遺伝子治療において T 細胞に導入された WT1 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-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの複合体を認識する。導入された WT1 特異的 TCR による HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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 T 細胞内に活性化シグナルが伝達され、TCR 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が起こり、TCR 遺伝子導入 CD8 陽性 T 細胞では更にグランザイム 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遺伝子を導入する標的細胞は、造血幹細胞移植適応がない急性骨髄性白血病もしくは骨髄異形成症候群患者（HLA-A*24:02 陽性、腫瘍細胞に WT1 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、①様々な抗原を特異的な受容体で認識する。②抗原の認識に続き活性化され、増殖すると共に各種サイトカインの産生や抗原を発現する標的細胞を特異的に傷害する能力をもつ。③活性化された後に一部はメモリー T リンパ球となり、長期に生存し抗原に再遭遇した場合、急速に強く反応し得る。なお、自己 T リンパ球を輸注した場合、非自己では生じる可能性のある移植片対宿主病（GVHD）等の副作用がない長所がある。WT1 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 T リンパ球へ遺伝子導入することで、腫瘍細胞表面上の HLA-A*24:02 分子と WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド複合体の特異的認識能を獲得した自己 T リンパ球を作製可能である。本遺伝子導入 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出来ることから、本臨床研究では、OKT3 及び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））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（PBL）へ TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入するために、レトロネクチン CH-296 をコートした培養バッグ中にて、T リンパ球をレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR に感染させる。

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、プロウイルスとなり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は末梢血 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(43-47)、過去の T 細胞遺伝子治療においてレトロウイルスベクターの使用に起因する重篤な副作用は報告されていない(43)。以上の理由により、自己 PBL に 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 1.5×10^{-4} (48) 又は 1×10^{-4} (49) 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 $1 \times 10^{-(3 \sim 5)}$ 程度であると報告されている(50)。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、これらの方法では非常に低いものである。

一方、レトロウイルスベクター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(51)、効率的に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 MS3-WT1-siTCR を選択したもうひとつの根拠は安全性である。すなわち、もともになる MS3-WT1-siTCR 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、MS3-WT1-siTCR 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、既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、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(52)。

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 MS3-WT1-siTCR のもともに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(53, 54)。

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及びスプーマレトロウイルスの 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原因ウイルスであるが、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。なお、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 pMS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR は、レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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 pMS3-WT1-siTCR 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。

pMS3-WT1-siTCR のベースとなるウイルスプラスミドベクターは pMS で、pMS のマルチクローニングサイトにヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域、HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR α 鎖遺伝子の C 領域をコドン最適化した cDNA のコード域、TCR α の C 領域配列及び TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列、マウス P_{PGK}、並びに HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR β 鎖遺伝子の C 領域をコドン最適化した cDNA のコード域を組み込んだものが pMS3-WT1-siTCR である。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 6 に示す。

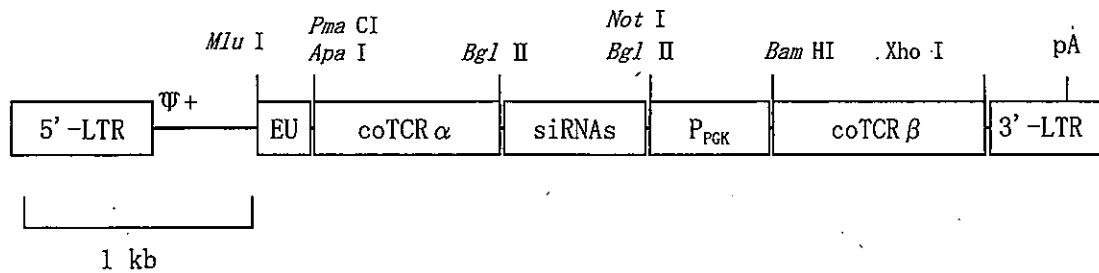


図6 pMS3-WT1-siTCR の遺伝子概略

- EU : ヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域
 coTCR α : HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR α 鎖遺伝子の C 領域をコドン最適化したコード域
 siRNAs : TCR α の C 領域配列及び TCR β の C 領域配列に対する siRNA 発現配列
 P_{PGK} : マウス PGK プロモーター
 coTCR β : HLA-A*24:02 拘束性 WT1 特異的 TCR β 鎖遺伝子の C 領域をコドン最適化したコード域
 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 PCMV 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 (末端反復配列) を PCMV プロウイルスの 3'-LTR で置換したものである (55)。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 (56, 57)。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 7 に、pMS の構築手順を図 8 に示す。

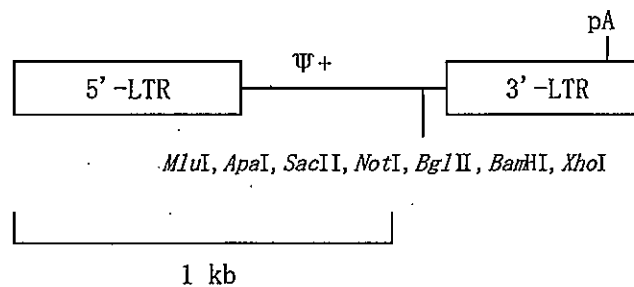


図7 pMS の遺伝子概略

- 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 PCMV 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。

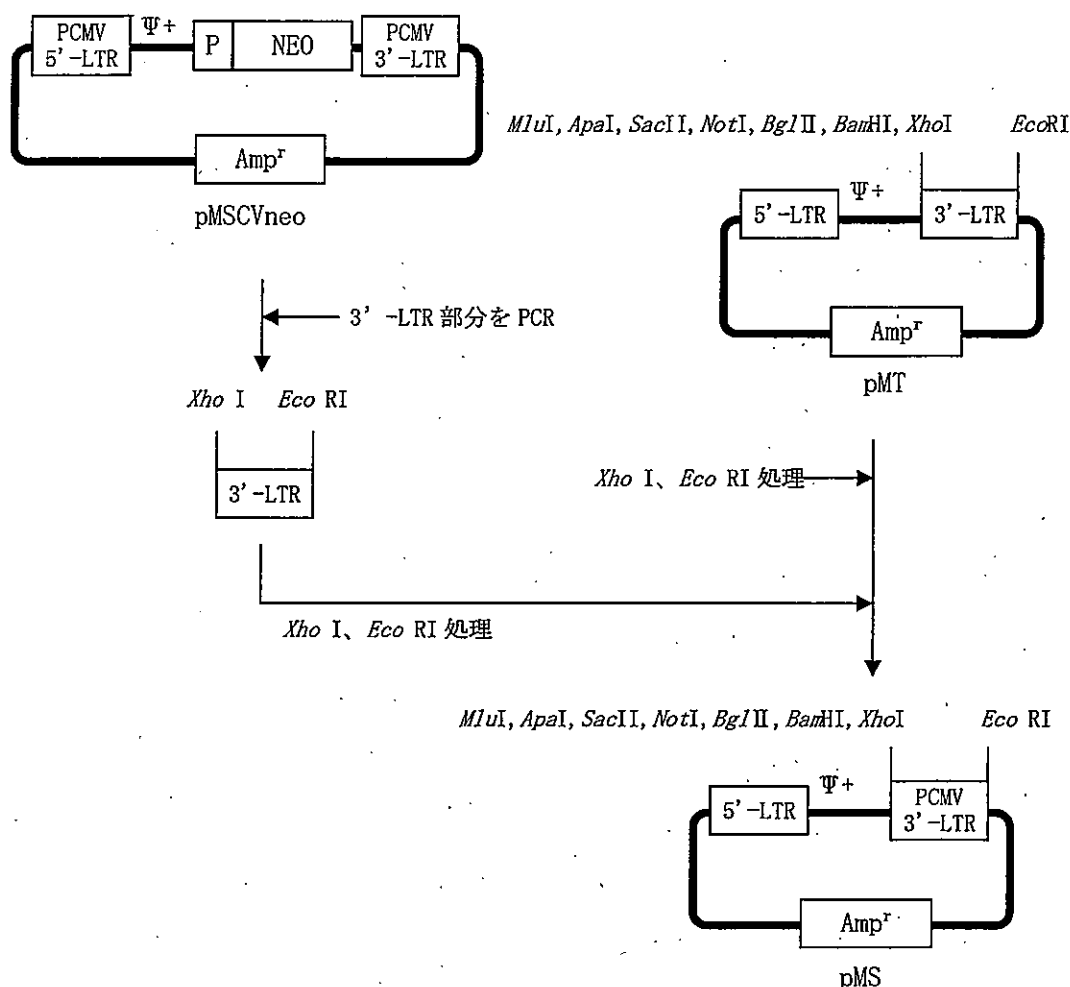


図 8 pMS の構築手順

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 pMS3-WT1-siTCR の構築手順を図 9 に示す。

pDON-5 ベクターを制限酵素 Mlu I と Not I で切断して、ヒト EF1 α の 5' 非翻訳領域を切り出し、pMS ベクターの Mlu I-Not I サイトにクローニングし、pMS3 を得た。

HLA-A*24:02 拘束性 WT1 CTL Clone TAK-1 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR α cDNA のコード域を増幅し 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 Apa I が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Sfa NI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて TCR α cDNA の V-J 領域の PCR を行い制限酵素 Sfa NI で切断した。この時、制限酵素 Sfa NI で切断すると Bgl II

の切断配列が生じるように 3' 用プライマーをデザインした。また、コドン最適化した TCR α 遺伝子 C 領域を合成して、制限酵素 Sal I が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Bgl II 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 Sal I で切断した。両断片をライゲーションし、C 領域がコドン最適化された TCR α 断片を得た。

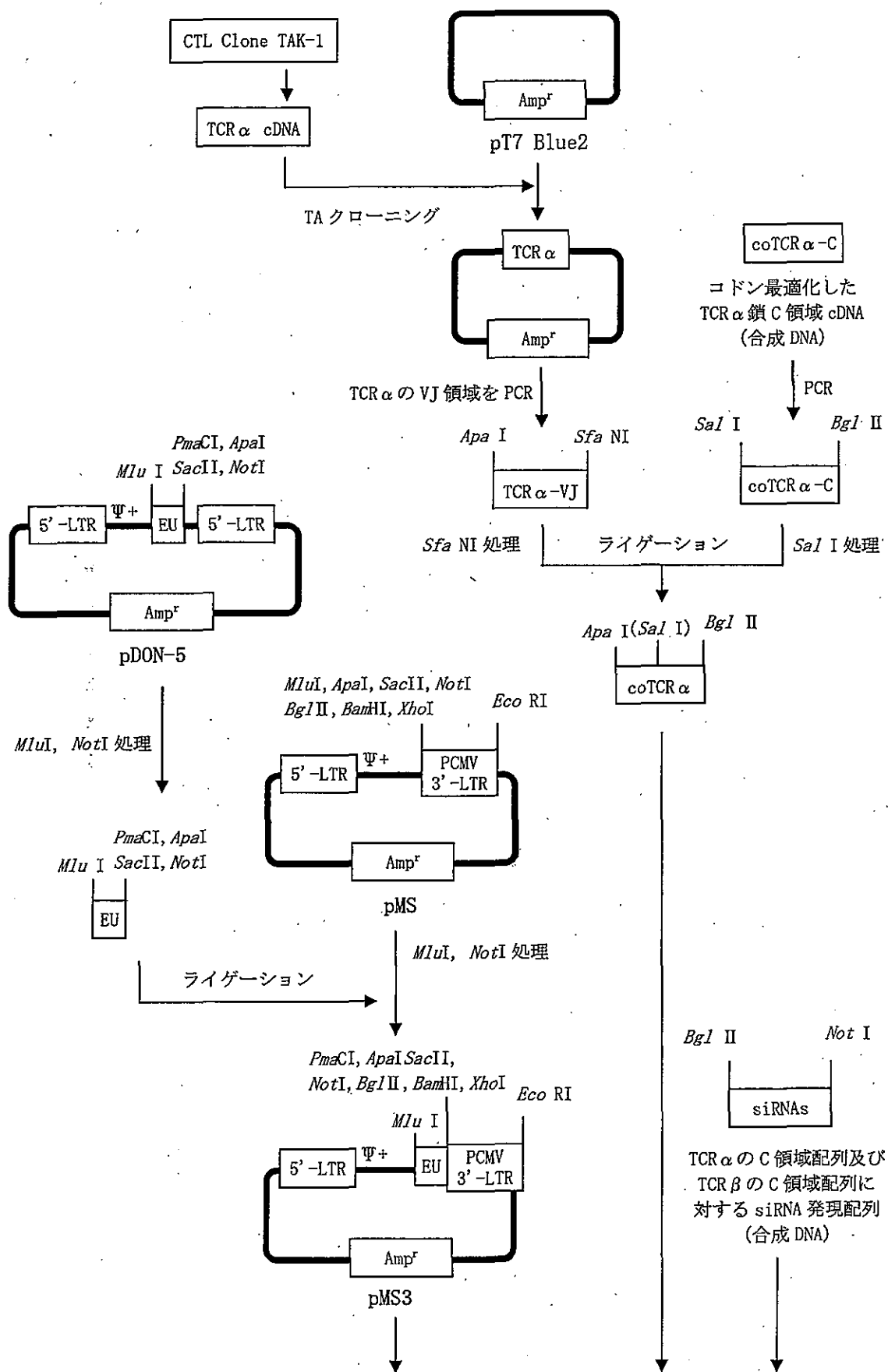
TCR α 遺伝子の C 領域と TCR β 遺伝子の C 領域に特異的な siRNA 発現配列をそれぞれ 2 種類ずつ含む siRNA クラスター (siRNAs) を合成した。また、C 領域がコドン最適化された TCR α 断片を Bgl II で切断した。これら両断片を pMS3 の Apa I-Not I サイトにクローニングして pMS3-WT1-A-si を得た。

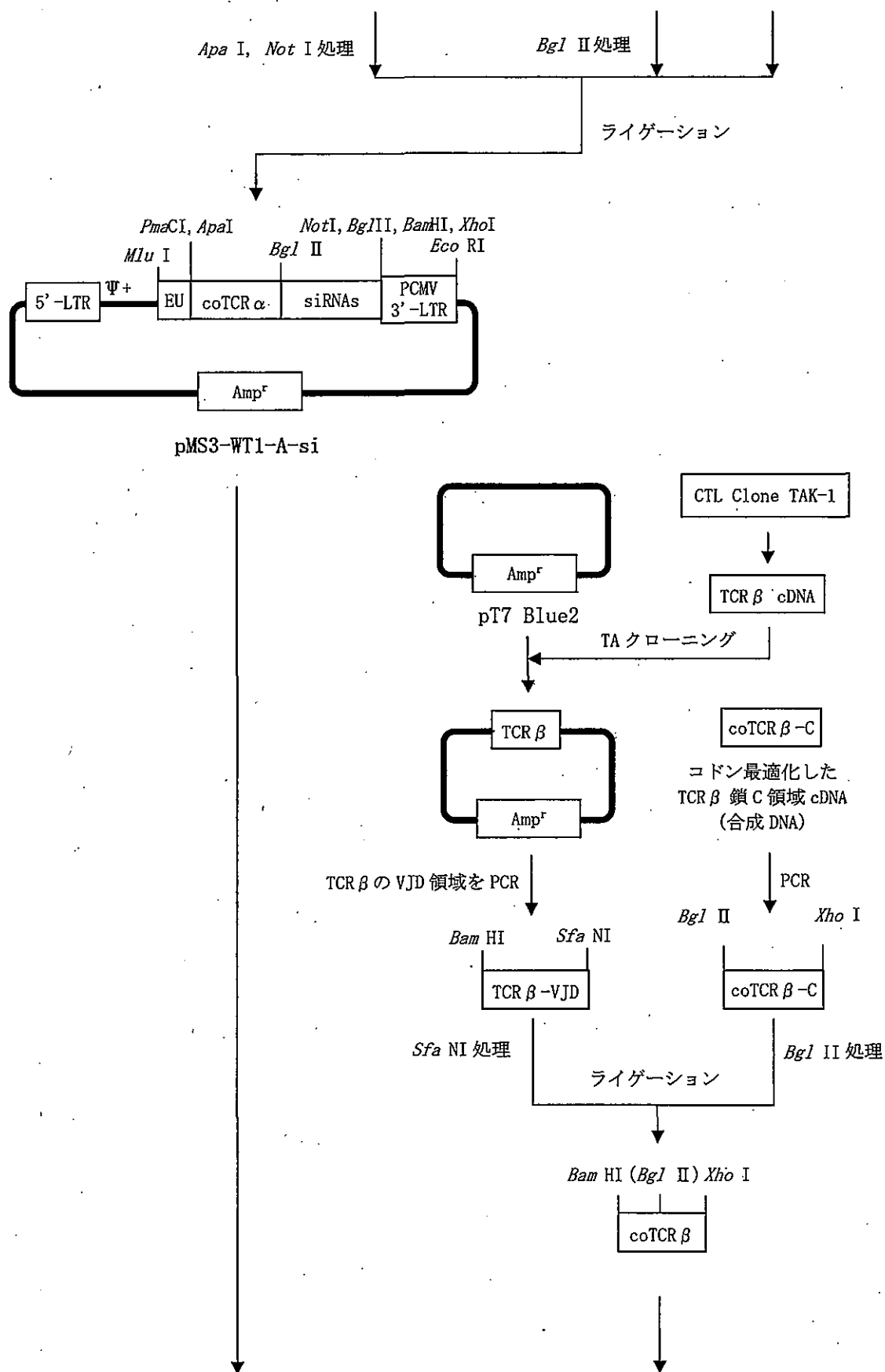
A*24:02 拘束性 WT1 CTL Clone TAK-1 より total RNA を抽出、RT-PCR により TCR β cDNA のコード域を増幅し pT7Blue2 ベクターに TA クローニングした。

TCR β のクローンプラスミドを鋳型に、制限酵素 Bam HI が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Sfa NI の認識配列が付加された 3' 用プライマーを用いて TCR β cDNA の V-J-D 領域の PCR を行い制限酵素 Sfa NI で切断した。この時、制限酵素 Sfa NI で切断すると Bgl II の切断配列が生じるように 3' 用プライマーをデザインした。また、コドン最適化した TCR β 遺伝子 C2 領域を合成して、制限酵素 Bgl II が付加された 5' 用プライマーと制限酵素 Xho 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、制限酵素 Bgl II で切断した。両断片をライゲーションし、C2 領域がコドン最適化された TCR β 断片を得た。

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 Not I と Bam HI で P_{PGK} 部位を切り出した。

最後に、C2 領域がコドン最適化された TCR β 断片を制限酵素 Bam HI と Xho I で切断し、P_{PGK} 部位を Not I と Bam HI で切断し、両断片を pMS3-WT1-A-si の Not I-Xho I サイトにクローニング、pMS3-WT1-siTCR を得た。得られた pMS3-WT1-siTCR の全塩基配列解析を実施し、予期せぬ変異等が含まれていないことを確認した。





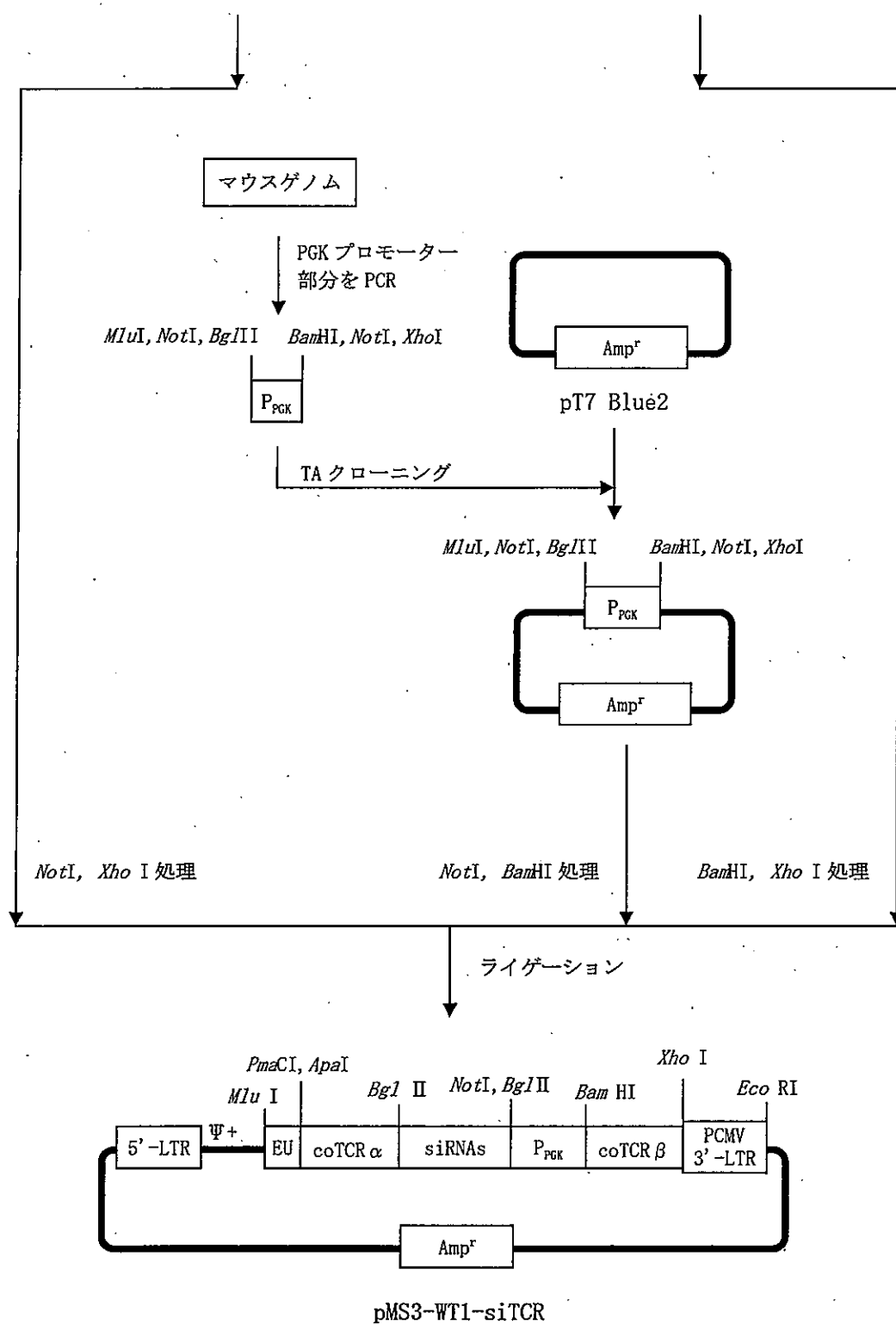


図9 pMS3-WT1-siTCR の構築手順

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pMS3-WT1-siTCR 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 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。従って、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) (52) 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 (一方は gag と pol、もう一方は 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、この方法は 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 (52, 58) 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-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 へ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、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pMS3-WT1-siTCR を 293T 細胞へ共にトランスフェクションした。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MS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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 #S45 を得た。これをマスター/ワーキングセルバンク (M/WCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して M/WCB を作製した。

VI. 5. 2. 4 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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MS3-WT1-siTCR 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 (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MS3-WT1-siTCR のゲノム構造の概略を図 10 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MS3-WT1-siTCR の全塩基配列」に示す。レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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。

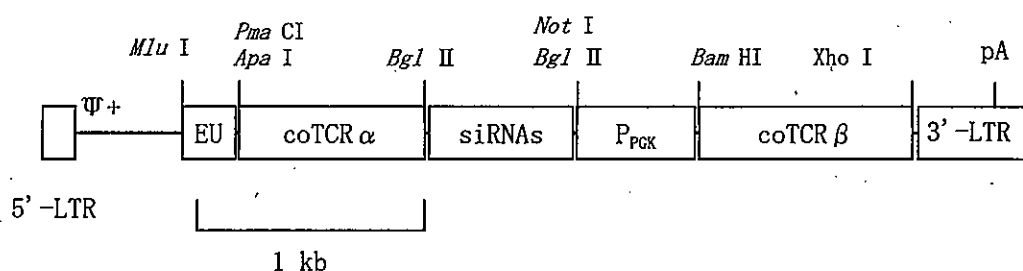


図 10 MS3-WT1-siTCR ベクターのゲノム構造概略

siRNAs : 内在性 TCR を干渉する siRNA 発現配列 4 種類

EU : ヒト EF-1 α 非翻訳領域

5'-LTR 及び 3'-LTR の R 領域は MoMLV 由来、3'-LTR の U3 領域は PCMV 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する。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 OKT3 及びレトロネグチン CH-296 で活性化し、増殖させる。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MS3-WT1-siTCR 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。従って、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MS3-WT1-siTCR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MS3-WT1-siTCR #S45から産生される。レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR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。M/WCBの作製・保存及びレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR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国産のものを使用する。

VII.1.1.1 M/WCBの作製法

M/WCBの作製フローを図11に示す。GMP製造施設の管理区域にて3バイアルのPrimary Seed Bank（クローンWT1-siTCR preMCB S45）より拡大培養され、最終的に181バイアルのウイルス産生細胞M/WCBがGMP遵守下で作製された。M/WCB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/ワーキングセルバンクの作製方法」に記載する。

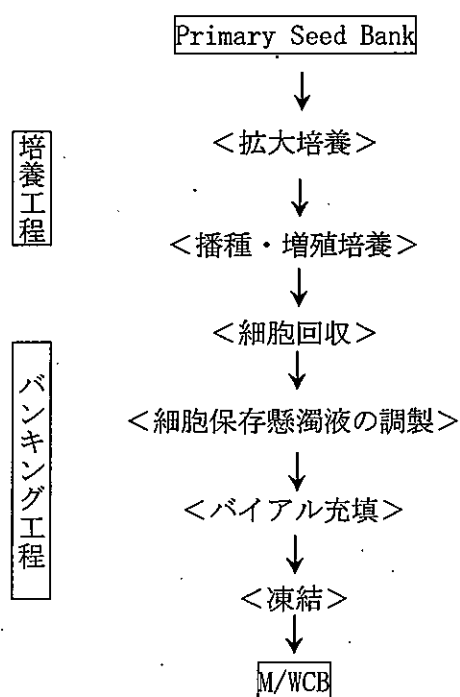


図11 M/WCBの作製フロー

作製された M/WCB 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/ワーキング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/ワーキング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、PG-4 S+L-アッセイ）
5. RCR 試験（上清）（293 細胞で増幅、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
（HIV-1、HIV-2、HTLV-1/2、HAV、HBV、HCV、hCMV、HHV-6、HHV-7、HHV-8、EBV、SV40、Human Parvovirus B19）
11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定
12. ベクター遺伝子の組み込み数試験（サザンブロット）
13. ベクター遺伝子の完全性試験（サザンブロット）
14. 導入遺伝子配列解析
15. 細胞生存率試験
16. ウイルスベクター産生能確認
（産生ウイルス RNA コピー数：real-time PCR 法）
17. 産生ウイルスベクター機能確認試験①：TCR 発現性試験
（SupT1 細胞感染/FCM）
18. 産生ウイルスベクター機能確認試験②：野生型 TCR 発現抑制確認
（J45.01 細胞感染/real-time PCR 法）

VII.1.1.2 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造方法

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造フローを図 12 に示す。レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR の製造は、1 バイアルの M/WCB を用いて行う。凍結保存している M/WCB の細胞を解凍後、培養を開始し、拡大培養及び細胞継代を行い、5 個の大量静置培養用容器にて培養する。大量静置培養用容器において培養細胞が接着面全体に広がった後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清液は、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MS3-WT1-siTCRの製造方法」に記載する。製造は、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。

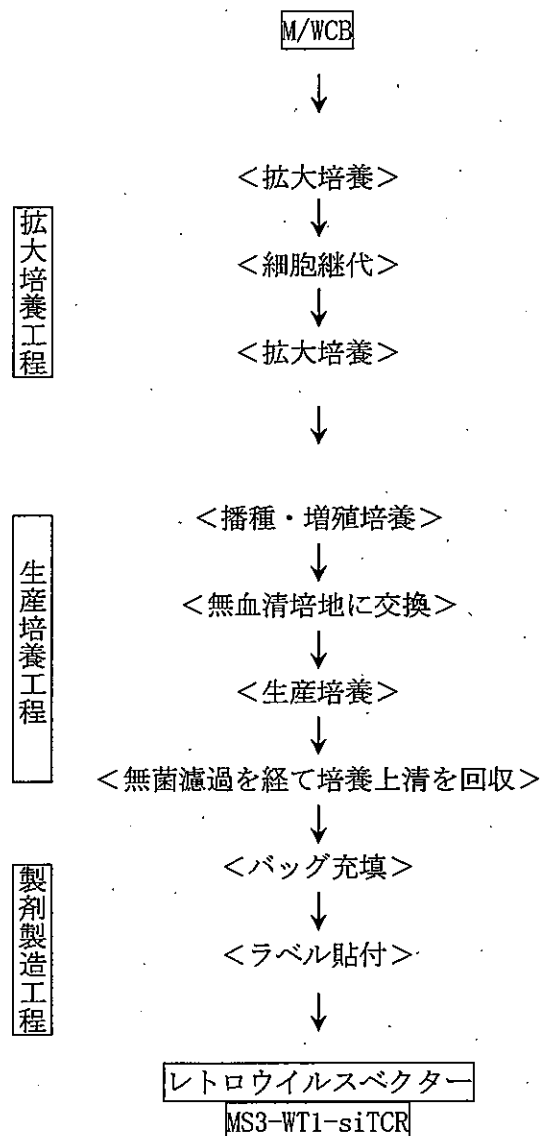


図12 レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCRの製造フロー

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR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MS3-WT1-siTCRの品質試験」に示す。

Virus supernatant

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. ウイルス RNA コピー数（real-time PCR 法）
9. TCR 発現性試験（SupT1 細胞感染/FCM）
10. 野生型 TCR 発現抑制確認（J45.01 細胞感染/real-time PCR 法）

End of Production Cells (EPC)

11. マイコプラズマ否定試験（培養法）
12. マイコプラズマ否定試験（DNA 染色法）
13. RCR 試験（293 細胞で増幅、PG-4 S+L-アッセイ）

VII.1.2 被験者に投与する物質の純度及びその安全性

被験者に投与されるのはレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR により遺伝子導入した被験者由来 T リンパ球である。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 年以上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、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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 91.8%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 VG 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 社の資料によると、MONTANIDE® ISA-51 は、AIDS や癌患者に対し

て、既に 5,000 人以上に投与され、延べ約 50,000 回以上の投与の実績がある。その副作用として、一過性の局所反応が報告されている。また、インフルエンザ様症状が現れることも報告されているが、一過性であり、発現頻度も低いことから MONTANIDE® ISA-51VG は安全に人へ投与することが可能と考えられている（参考資料 9）。

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 MS3-WT1-siTCR 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、一過性にエクトロピックウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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のみを臨床使用する。また、遺伝子導入 T リンパ球投与後には被験者末梢血中の RCR を測定する。

なお、本臨床研究に使用されるレトロウイルスベクターと同様に作製されたレトロウイルスベクター（MS-bPa）を使用した三重大学で実施中の遺伝子治療臨床研究においても、同ベクターを使用した 12 例の遺伝子導入細胞調製及び 7 例の被験者に対する遺伝子導入細胞投与が行われているが、これまでに RCR は検出されていない（2012. 8. 31 現在、参考資料 19）。

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ス細胞を樹立することにより、高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(59)。図 13 にその概念図を示す。

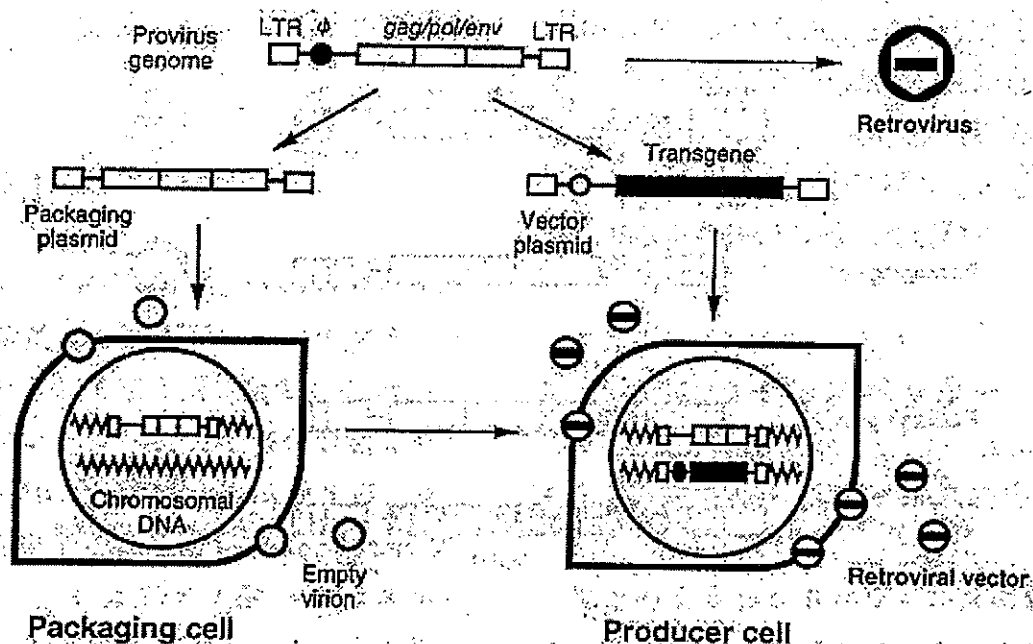


図 13 レトロウイルスベクターの産生 (引用文献 59 より転載)

ウイルスプラスミドベクター pMS3-WT1-siTCR 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。更に、レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 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。従って、ウイルスプラスミドベクター pMS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR 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 14 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 (59)。

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 14 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 14 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 カ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 14 中の C)	パッケージングシグナルを除去し 3'-LTR を polyA 付加シグナルで置換したもの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。

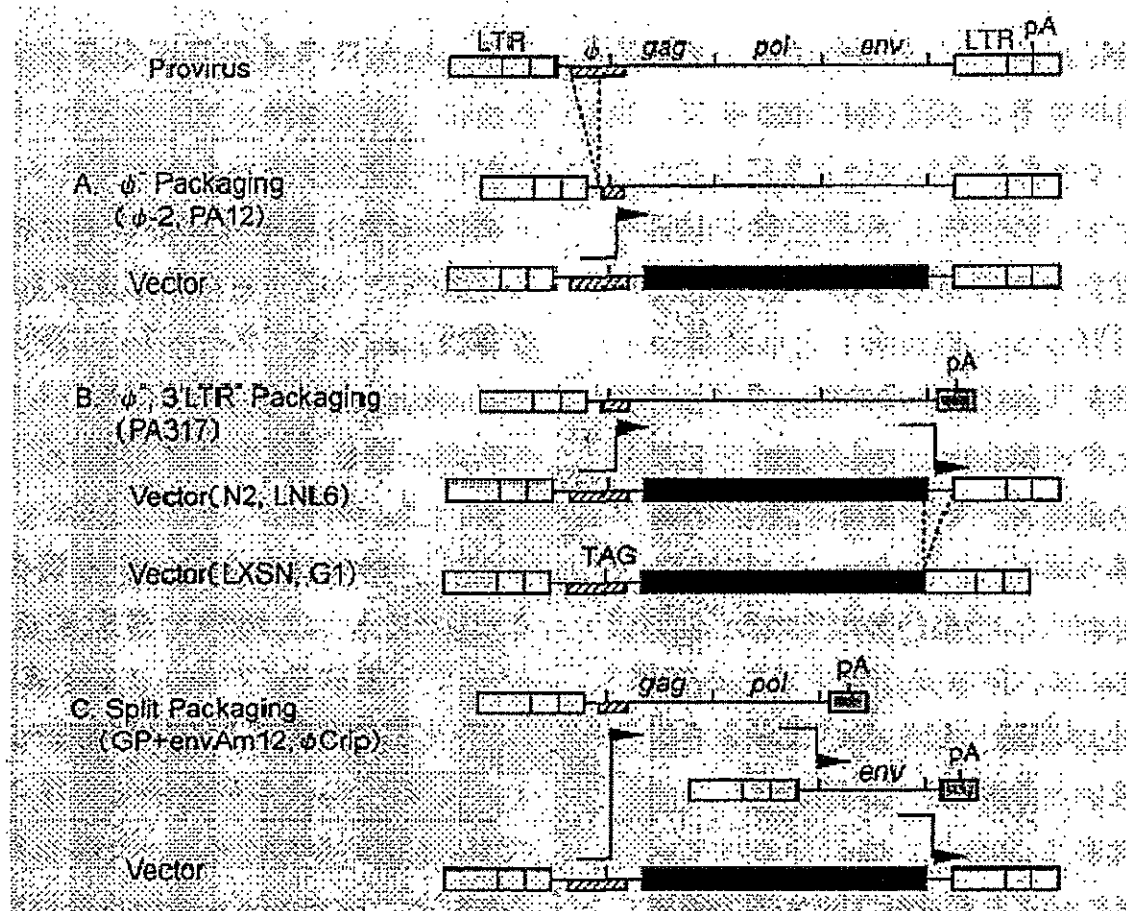


図 14 パッケージング細胞に使われているパッケージングプラスミドとレトロウイルスベクターの構造 (引用文献 59 より転載)

続いて図 15 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。

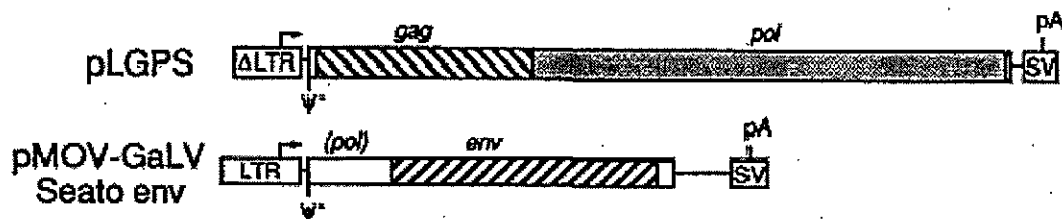


図 15 パッケージング細胞構築用プラスミド pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env の構造
(引用文献 52 より転載)

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 (60) 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 (60)。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。日本においても三重大学で実施中の遺伝子治療臨床研究において PG13 を用いて作製されたレトロウイルスベクター (MS-bPa) が使用されており、同ベクターを使用した 12 例の遺伝子導入細胞調製及び 7 例の被験者に対する遺伝子導入細胞投与が行われているが、これまでに RCR は検出されていない (2012. 8. 31 現在、参考資料 19)。

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 体内の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、被験者 T リンパ球を *ex vivo* (生体外) で遺伝子導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に被験者に投与する。使用したレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR はこの過程ではほぼ完全に除去される。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(61)。そのため、例えレトロウイルスベクター粒子が被験者体内に侵入しても、被験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 MS3-WT1-siTCR は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した被験者 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない、RCR が出現しない限り体内の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

VII. 1.6 被験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、細胞調製作業中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 MS3-WT1-siTCR 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 MS3-WT1-siTCR は増殖能欠損型なので、被験者を介して被験者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が被験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。細胞が生存や増殖するため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、被験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 (62-64)。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導入された遺伝子 (IL-2 受容体 γ_c 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 (65)。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 γ_c 鎖遺伝子を CD34 陽性細胞に導入したイギリスでの遺伝子治療においても、10 例中 1 例に白血病を発症したことが 2007 年 12 月に報告された (66, 67)。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 例に骨髓異形成症候群 (MDS) の発症が報告されている (68, 69)。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 (70)。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、本臨床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 (12, 43-46)。

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 (71)。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 (72)。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 (73)。

なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の被験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 及びレトロネクチン CH-296 により活性化して増殖させた 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 と同様の蛋白である。従って、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。今回は内在性 TCR に対する siRNA 発現配列が遺伝子導入されるので、内在性 TCR の関与した反応性の低下が予想される。また一般に、siRNA の配列によってはインターフェロン経路遺伝子の発現上昇などのオフターゲット効果が見られることが知られているが、添付資料Ⅲ.1.4.2 「siRNA のオフターゲットの検証」の項に示す如く本臨床研究に用いる siRNA 構造を持つ 2 種類のレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR 及び MS-MA24-siTCR を用いて遺伝子導入した細胞に特異的に発現上昇または発現減少する遺伝子はなかった。したがって、オフターゲット作用のリスクは低いと考えられる。

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 (74, 75) において、ex vivo で培養、増殖させた約 1×10^{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 による有害事象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 を併用したものであり、血液学的又はそれ以外の有害事象 (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少ないと考えられる。

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である細胞の大半は TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たに WT1 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 (76)。

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 TCR 2 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。また、今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成を低減すると考えられる。
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。また、この場合も今回使用するレトロウイルスベクターは内在性 TCR の発現低下を誘導する siRNA 構造を有するため、本メカニズムが出現するリスクも低減すると考えられる。
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被験者の 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 T

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と共にメラノサイト分化抗原である 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(12)。その後、メラノサイト分化抗原 MART-1 及び gp100 に対する高親和性 TCR 遺伝子を用いた転移性悪性黒色腫患者を対象とした臨床試験において、これらの抗原を発現する正常組織（皮膚、眼、内耳）に対する傷害性が報告されたがいずれも生命に危機をもたらすものでなくコントロール可能であった(13)。この Johnson らの報告例では輸注を受けた患者は、輸注前に体内のリンパ球を減少させる化学療法を前処置として施され、細胞輸注後は高用量 IL-2 (72000 U/kg) を投与された。これらの処置は輸注細胞を強力に刺激する目的で行われている。また輸注細胞は $1.5 \times 10^9 \sim 1.1 \times 10^{11}$ 個と大量であった。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が、輸注する細胞数や補助的処置の方法によりコントロール可能であると考えられる。本臨床試験では化学療法による前処置や IL-2 投与は行わず、 2×10^8 個と少量の輸注細胞数から慎重に開始する。また、難治性の白血病、骨髄異形成症候群の患者を対象とすることにより本臨床試験の対象患者にとってのリスク／ベネフィット比で考慮した場合に実施可能であることを確認して行われる。

VII. 3 細胞の安全性

VII. 3.1 遺伝子導入細胞の調製方法

細胞培養にかかわる以下の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、他の被験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 MS3-WT1-siTCR 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 16 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	リンパ球活性化工程
第 4 日	ウイルス結合バッグ調製工程、遺伝子導入工程 (1 回目)
第 5 日	ウイルス結合バッグ調製工程、遺伝子導入工程 (2 回目)
第 6 日	遺伝子導入工程 (3 回目)
第 7 日	拡大培養工程
第 10-14 日	最終製剤調製工程

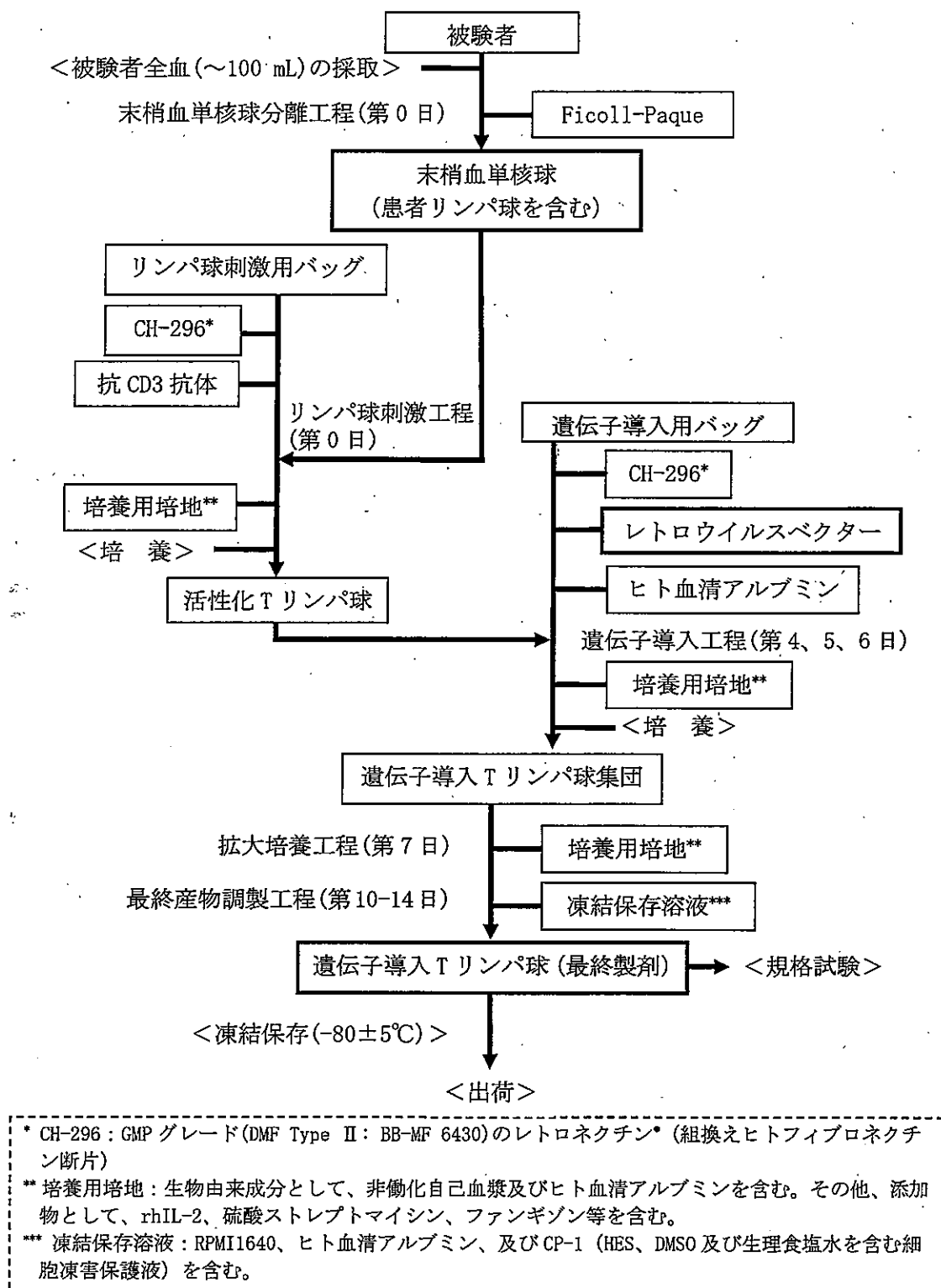


図16 遺伝子導入細胞調製工程の概略

レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCRを用いた遺伝子導入Tリンパ球の調製は、以下に示す標準操作法に従い調製される。

第0日：被験者のコホートに応じて培養開始細胞数を決定し、被験者全血より分離した新鮮または凍結末梢血単核球（PBMC）を遺伝子導入細胞の調製に使用する。

	コホート1又は2	コホート3
培養開始細胞数	1.5×10^7 個以上	3.0×10^7 個以上

被験者から全血の採取（最大採血量 100 mL）は、各医療機関において実施する。採取した被験者の全血を三重大学内の細胞調製施設へ輸送し、外観試験を実施した後に細胞調製施設内に持ち込み、自己血漿を分離した後に、Ficoll-Paque を用いた被験者 PBMC の分離と 1% HSA 含生理食塩水及び GT-T Retro III 培地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。

リンパ球の刺激には抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグを使用する。すなわち、抗 CD3 抗体（5 μ g/mL）CH-296（25 μ g/mL）となるように ACD-A 液に希釈した溶液 25 mL をリンパ球刺激用バッグに添加し、CO₂ インキュベーター中で 5～10 時間静置して準備する。培養用培地（基本培地 GT-T Retro III、600 IU/mL rhIL-2、0.6% 非働化被験者血漿、0.2% HSA、60 mg/mL 硫酸ストレプトマイシン及び 2.5 μ g/mL アムホテリシン B 含有。）に被験者リンパ球を 2×10^5 個/mL となるように懸濁し、抗 CD3 抗体及び CH-296 を結合させたリンパ球刺激用バッグに加えて、37°C、5% CO₂ 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 μ g/mL）を添加して薬用保冷庫にて保存する。

基本培地 GT-T Retro III 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4日：第0日から培養した活性化 T リンパ球の生細胞数から 0.4×10^6 個/mL 以下になるように培養用培地で希釈し、レトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグあたり 30 mL の細胞懸濁液を加える。1,000×g、32±3°Cで 10 分間遠心した後に CO₂ インキュベーター中で第5日まで培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ（1 回目、2 回目遺伝子導入工程用）は以下のように用意する。レトロネクチン CH-296 を添加した遺伝子導入用バッグを 15 mL の ACD-A 液で 2 回洗浄した後に、原液又は HSA/ACD-A/生理食塩水で希釈した MS3-WT1-siTCR を添加（30 mL/バッグ）する。2,000×g、32±3°C、2 時間遠心した後に、MS3-WT1-siTCR を除き HSA/生理食塩水で洗浄した後に同液を保存液として添加し使用時まで薬用

保冷庫にて保存する。

第5日：第4日から培養した活性化Tリンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化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。遠心後、第6日まで5% CO_2 インキュベーター中で培養する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグ（3回目遺伝子導入工程用）を第4日目と同じ方法で作成し、使用時まで薬用保冷庫にて保存する。

第6日：第5日から培養した活性化Tリンパ球を回収する。MS3-WT1-siTCR 結合遺伝子導入用バッグの保存液を除去する。ここに回収した活性化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。遠心後、4時間+10分以内、5% CO_2 インキュベーター中で培養した後、細胞を回収し、新しい培養用培地にて容量が計2,400 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 インキュベーター中にて培養を開始する。

第7日：第5日から培養しているガス透過性培養用バッグに、等量の培養用培地（自己血漿0~0.6%含）を加えて、 37°C 、5% CO_2 インキュベーター中にて培養をする。

第10-14日：細胞処理装置を用いて細胞の洗浄と濃縮をHSA 含 RPMI1640 で行い、被験者投与に必要な遺伝子導入細胞数に応じて、 $1.6\sim 6.7\times 10^7$ 細胞/mL となるようにHSA 含 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TCR 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 -80°C ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) の条件下にて使用時まで凍結保存する。

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：被験者へ投与する各医療機関に、凍結状態でTCR 遺伝子導入Tリンパ球を輸送する。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したTCR 遺伝子導入Tリンパ球の生存率を測定する。

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

VII. 3. 2 培養細胞の純度

遺伝子導入に用いる細胞は、OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化し増殖させた被験者自己由来のT細胞である。健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の遺伝子導入細胞の比率は31.1%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99.7%以上を占めていた（参考資料 12「遺伝子導入調製細胞構成」参照）。被験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、被験者末梢血より得られた細胞であり問題ないと考えられる。また、Tリンパ球以外の細胞に遺伝子が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培養開始時点の被験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、健康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。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 MS3-WT1-siTCR 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、レトロネクチン CH-296、rhIL-2 等の洗浄後の残留濃度は極めて微量であり、これらの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 T 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

遺伝子導入細胞の調製にあたっては、被験者リンパ球を OKT3 及びレトロネクチン CH-296 により活性化した後、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、

siRNA 発現配列、並びにレトロウイルスベクターMS3-WT1-siTCR 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 T 細胞であり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は非常に低いと考えられるが完全には否定できないため、LAM-PCR によるモニタリングを行う（「VII. 1. 8 癌原性の有無」参照）。

OKT3 及びレトロネクチンCH-296 により活性化することによって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、これを被験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(77)。

ex vivo で培養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(78, 79)。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 リンパ球群において移入 T リンパ球が被験者生体内で長期間観察されたことが報告されている(12)。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

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MS3-WT1-siTCR 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 T 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）。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。投与前に品質試験が不合格であることが判明した場合には、再度細胞調製のための採血が可能か検討したうえで、当該被験者における臨床研究の継続・中止の判定を行うこととする。

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
6. 細胞数試験
7. 遺伝子導入効率及び導入遺伝子機能確認試験 (細胞内 IFN- γ 産生試験)

被験者への投与の際には、凍結保存専用バッグ中に凍結保存している細胞懸濁液を投与直前に 37℃温浴にて急速解凍し、静脈内投与する (生理食塩水にて投与液量を調整することも可能とする)。

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・解凍後の細胞生存率については、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、投与日以前に解凍し細胞生存率を測定する。

VII. 4 ペプチドの安全性

VII. 4. 1 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの純度

本臨床研究に用いる WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドは米国 PolyPeptide 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 を用いた分析により 91.8%であった。またエンドトキシンは 0.1 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 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ 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主要なものだけでも 1,300 名以上の被験者を対象に行われている (80)。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 名の被験者に腫瘍抗原ペプチドワクチンを投与している (80)。しかしながら、これら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、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が、現在までに重篤な副作用の報告はない (32)。

本臨床研究に用いられる改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 300 μ g/body をラットに皮下投与し単回投与時の毒性を確認した。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)。

以上のことから、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの投与により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. 6. 2 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した。

①開発意義

急性骨髄性白血病は標準的化学療法により 70-80%の完全寛解率が得られているにもかかわらず、長期生存率は 30-40%である。そのため化学療法による治療効果は、まだ十分なものとは言えない。近年、新たな薬剤であるゲムツズマブオゾガマイシンが登場したものの、効果は限定的である。治療の一つとして同種造血幹細胞移植があるが、高齢者や適切なドナーが得られないなど同種造血幹細胞移植を行えない症例も多い。

また、骨髄異形成症候群は、同種造血幹細胞移植が有効であるが、適切なドナーが得られないことや、高齢者においては同種造血幹細胞移植による治療関連毒性に耐えられないなどの問題も多い。また、抗癌剤による治療効果も低く、新たな治療戦略の必要性が指摘されている。

これらのことから、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者に対する有効な治療手段の開発が強く望まれており、本遺伝子治療臨床研究の開発意義は高く、医療現場における需要は存在すると考える。

②品質・安全性

本臨床研究は、腫瘍抗原 WT1 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被験者に投与する。この製造過程は十分に確立され、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入 T 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（治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病、治療不応性の骨髄異形成症候群）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と考えられる。

免疫不全マウスに本 TCR 遺伝子導入ヒト T リンパ球を投与した安全性試験において、比較対照とした非遺伝子導入ヒト T リンパ球投与群と比較して、TCR 遺伝子導入ヒト T 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Ⅲ）。

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 T リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg SA らのグループで既に実績がある(12, 13)。

本臨床研究において標的とする WT1 抗原は白血病細胞において強発現することが知られている。一方、正常細胞における WT1 発現は腎臓の糸球体上皮細胞、胸膜や腹膜の中皮細胞

胞等の限られた細胞にみられる。これまでに WT1 を標的としたペプチドワクチンの臨床試験が国内外において精力的に実施されているが、正常細胞の傷害に起因すると考えられる重篤な副作用はこれまでのところ知られていない。対象疾患（治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病または、治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群）とのリスク・ベネフィットを総括すると、低用量のリンパ球輸注より慎重に実施することにより本臨床研究の実施は可能であると考えられる。

本臨床試験に用いるレトロウイルスベクターは T リンパ球の内在性 TCR 発現を抑制する siRNA を発現する。一般に、siRNA の配列によってはオフターゲット効果が見られることが知られているが、添付資料Ⅲ.1.4.2 「siRNA のオフターゲットの検証」の項に示す如く本臨床研究に用いる siRNA 構造を持つレトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR を用いて遺伝子導入した細胞に特異的に発現上昇または発現減少する遺伝子はなかった。したがって、オフターゲット作用のリスクは低いと考えられる。

③本臨床研究の期待される有効性

レトロウイルスベクター MS3-WT1-siTCR を用いて調製された WT1 抗原特異的 TCR 遺伝子導入 T リンパ球は、WT1 陽性・HLA-A*24:02 陽性のヒト腫瘍細胞株に対して抗原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Ⅲ）。また、免疫不全マウスに WT1 陽性・HLA-A*24:02 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 T リンパ球投与群で腫瘍の抑制効果が認められた（添付資料Ⅲ）。

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 T 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 を認めており（添付資料Ⅳ）、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 例中 9 例について腫瘍退縮を観察している（13）（添付資料Ⅳ）。

従って、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれると考えられる。

④当施設における研究者の能力

当施設の総括責任者及び研究者（影山、池田、宮原、今井、齋藤）は対象疾患である造血器腫瘍に対する十分な臨床経験（急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群の治療 120 例）及び臨床研究（JALSG 多施設共同研究、CHP がんワクチン：文部科学省がんトランスレーショナル事業）に対する知識を有している。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。

また、三重大学内に設置された細胞調製施設は GMP 準拠で運営・管理される体制にあり、TCR 遺伝子導入 T リンパ球は同基準に準拠し調製される。三重大学内にて細胞調製に携わる者は、遺伝子導入、細胞培養、品質管理について事前に十分な教育訓練を受けた経験者に

より構成される。これらのことから、三重大学には TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製に必要な設備・技術が十分備わっていると判断する。

更に、本臨床研究は三重大学を中心とした複数の医療機関と共同で実施することから、安全性や有効性の評価、被験者登録の可否について統一し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・適応判定中央部会を設置する。(安全・効果評価・適応判定中央部会の詳細については第IX章を参照。)

IX. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

IX.1 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

IX.1.1 本臨床研究の実施体制

本臨床研究は三重大学医学部附属病院を中心とした複数の医療機関にて実施を計画している。また、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製は細胞調製施設を有する三重大学にて行う。更に、本臨床研究は複数の医療機関にて行うことから、以下の図 17 に示す実施体制にて本臨床研究を実施する。

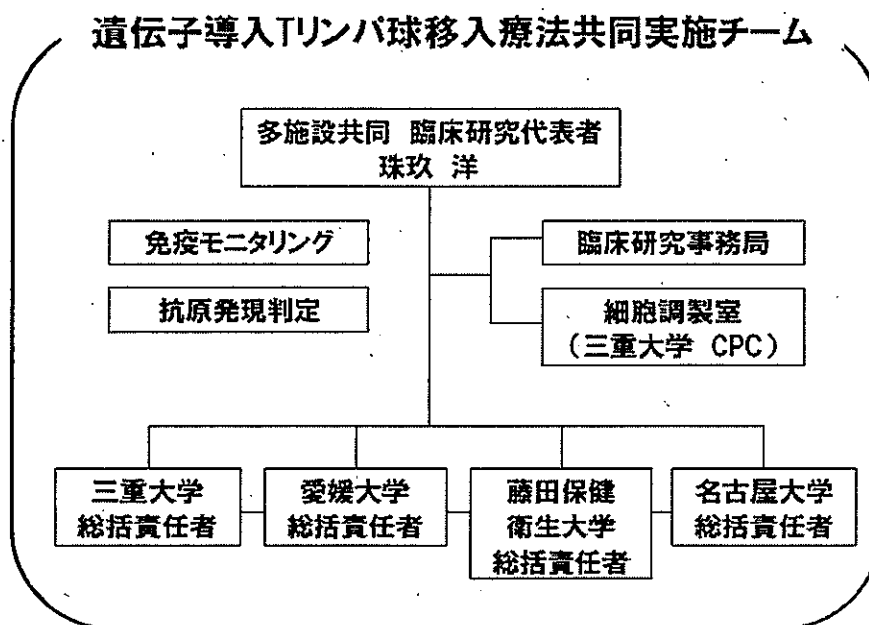


図 17 本臨床研究の実施体制

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

本臨床研究実施の適否及びその他本臨床研究に関する調査審議を行うため、医療機関毎に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置する。なお、遺伝子治療臨床研究審査委員会の運営に関しては、医療機関毎に作成した手順書に従うものとする。

IX.1.1.2 安全・効果評価・適応判定中央部会

有効性や安全性の評価基準を統一する目的で、本臨床研究では、各医療機関に共通の安全・効果評価・適応判定中央部会を設置する。

安全・効果評価・適応判定中央部会は、本臨床研究の安全性、効果並びに被験者の適応性に関する具体的事項について評価及び判定を行い、その適否及び留意事項、改善事項等について各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。

なお、安全・効果評価・適応判定中央部会は本臨床研究の実施者（遺伝子導入 T リンパ

球移入療法共同実施チーム) から独立した組織とする目的で、本臨床研究の実施者と利害関係を有さない者を各医療機関から委員として選出する。

1) 適応性評価

被験者の本臨床研究への登録は、各医療機関の適応判定委員会において適格性判定が行われた後、その判定結果を安全・効果評価・適応判定中央部会が確認・審査することで行われる。なお、安全・効果評価・適応判定中央部会への被験者登録用紙を提出する前に、本臨床研究参加医療機関の総括責任者に対して被験者情報の提供を行い、適格性判定に関する総意を得る。

安全・効果評価・適応判定中央部会は適応判定委員会の判定結果をもとに、被験者が全ての選択基準を満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認し、本臨床研究の対象被験者として適切かどうかを判定する。得られた判定結果については被験者登録を行った医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。

2) 用量増加における評価

コホート毎に規定された症例数を満了した場合、安全・効果評価・適応判定中央部会はコホート毎の各被験者から得られた、臨床研究終了・中止時検査までのデータをもとにコホート毎の安全性を判定する。安全性に問題がないと判定された場合、全ての医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告したうえで、次のコホートに移行する。

3) 重篤な有害事象発現時の対応

安全・効果評価・適応判定中央部会は、総括責任者より提出された重篤な有害事象に関する報告書(詳細報)をもとに、本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会へ意見として報告する。なお、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会からの意見をもとに臨床研究の継続に関する審査を行い、医療機関の長及び総括責任者へ審査結果を報告する。安全・効果評価・適応判定中央部会が臨床研究を中止すべきと判定した場合には、各医療機関はその意見に従うものとする。

4) 臨床研究の総合判定

臨床研究終了後、安全・効果評価・適応判定中央部会は本臨床研究に参加した全ての被験者から得られたデータをもとに本臨床研究の安全性並びに効果について総合的に判定する。得られた判定結果については、各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会及び総括責任者へ報告する。

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

遺伝子製剤検証部会は、本臨床研究に用いる遺伝子導入細胞製剤の検証及びその品質の評価を行い、その結果を遺伝子治療臨床研究審査委員会に提出する。

IX. 1. 2 本臨床研究の実施手順

本臨床研究の治療計画は以下の図 18 のとおりである。

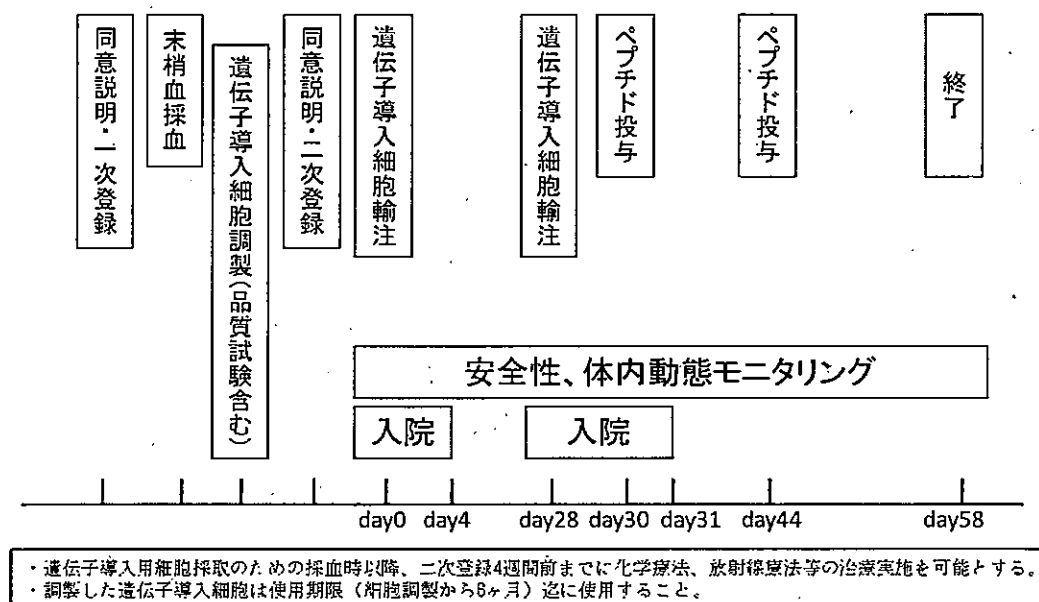


図 18 TCR 遺伝子導入 T リンパ球調製及び輸注計画

患者へ臨床研究の内容を説明し、十分な理解を得たうえで文書にて同意を取得する。その後、一次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、一次登録を行う。

採取した末梢血を三重大大学の細胞調製施設へ搬送する。細胞調製施設にて自己 PBL に WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドを認識する TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子をレトロウイルスベクターにて導入し、得られた TCR 遺伝子導入 T リンパ球を ex vivo 培養し、凍結保存する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製終了後、品質の確認を行う。その際に、コホート毎に規定された細胞数に満たない場合や品質試験により被験者への投与が不適格と判断された場合には、担当医師と臨床研究薬品質管理者間で協議し、被験者の状態を考慮したうえ被験者からの了承が得られれば、再び採血・細胞調製を行うことを可能とする。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前に再度文書にて同意を取得する。その後、二次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、二次登録を行う。

三重大大学の細胞調製施設より搬送された TCR 遺伝子導入 T リンパ球を経静脈的に投与する。原則として二次登録後、速やかに TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与することとしているが、安全性及び有効性を適正に評価するため、被験者の状態に応じて、初回投与開始日及び2回目投与日を変更することも可能とする。ただし、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の有効期限内に2回目の投与を終えることとする。

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 28 日後（±7 日）に 2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与する。2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 2 日後及び 16 日後の計 2 回、改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 300 μg を皮下へ投与する。初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 58 日後（±7 日）に臨床研究終了時検査を実施し、本臨床研究を終了とする。なお、2 回目のペプチド投与は外来にて行うことも可能とする。

被験者の生存期間中（FDA のガイドライン（81）に従い、最短 15 年間）は 1 年に 1 回の頻度で被験者の安全性確保を目的に所定の検査を実施する。

本臨床研究では、安全性（有害事象、臨床検査、RCR 発生の有無、クローナリティーの検討）、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態、腫瘍特異的免疫反応及び血液学的効果进行评估する。

TCR 遺伝子導入 T リンパ球数の設定

本臨床研究におけるコホートは 3 群とし、各コホートの症例数は 3 例とする。各コホートにおいて 2 回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与し、その後 2 回ペプチドの投与を行う。各コホートにおける投与量は以下の表.3 のとおりとする。

表.3 各コホートにおける症例数と投与量

	症例数	TCR 遺伝子導入 T リンパ球 初回・2 回目投与量	改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与 初回・2 回目投与量
コホート 1	3 症例	各 2×10^8 cells (±20%)	各 300 μg
コホート 2	3 症例	各 1×10^9 cells (±20%)	各 300 μg
コホート 3	3 症例	各 5×10^9 cells (±20%)	各 300 μg

腫瘍浸潤リンパ球や T 細胞クローンを体外で増殖後に投与する自家培養リンパ球輸注が米国を中心に行われている。 $3 \times 10^9 \sim 4 \times 10^{11}$ 個のリンパ球が投与され、細胞輸注に起因する重篤な有害事象の報告はない(82)。本臨床研究では安全性を評価するために、上述の治療にて用いられている細胞数より少ない 2×10^8 個を初期投与数と設定した。また、臨床試験のプロトコールに従うと、体外にて遺伝子導入細胞調製時に培養増殖される細胞数が 1×10^{10} 程度と予想される。そのため、本臨床研究では 2 回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与を行うことから、投与可能な最大リンパ球数を 5×10^9 個と設定した。

投与量増加の判定を行う際の基準は、以下のとおりとする（有害事象のグレードについ

ては「IX. 5. 7 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」参照)。

- 1) 3 例のうち 1 例も「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現しなかった場合、次のコホートに移行することが出来る。
- 2) 3 例のうち 1 例に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、同じコホートに 3 例追加し安全性を確認する。
- 3) 3 例のうち 2 例以上に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発現した場合、投与量の増加は中止される。また、3 例目の被験者へ TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与する前に 1 例目、2 例目の被験者共に「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が発生した場合は、当該コホートにおける被験者登録を中止し 3 例目の被験者へ TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与しないこととする。
- 4) 上記 2) に従い、追加登録した 3 例について「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が臨床研究終了時までには発現しなかった場合、投与量の増加は続けられる。
- 5) 上記 2) に従い、追加登録した 3 例のうち 1 例でも「本治療との因果関係を否定できないグレード 3 以上の有害事象」が臨床研究終了時までには発現した場合、投与量の増加はそこで中止される。

IX. 2 被験者の選択基準及び除外基準

IX. 2. 1 一次登録

患者より文書同意取得後、一次登録時の選択基準を全て満たし、かつ除外基準のいずれにも抵触しないことを確認したうえで、一次登録を行う。

IX. 2. 1. 1 選択基準 (一次登録)

- 1) 以下のいずれかの疾患と診断された被験者
 - a) 再発期または初回寛解導入不能な急性骨髄性白血病 (非定型白血病と骨髄異形成症候群よりの移行例を含む) で造血幹細胞移植適応がない被験者
 - b) 治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群で造血幹細胞移植適応がない被験者
(予後不良とは骨髄芽球増加、7 番染色体あるいは複雑染色体異常あるいは血球減少を伴う例、白血病移行例など、治療困難とは化学療法に対する反応不良あるいは多剤併用化学療法には耐えにくい例)
- 2) HLA-A*24:02 陽性の被験者
- 3) PCR 法にて腫瘍細胞に WT1 の発現が確認* されている被験者
- 4) ECOG Performance Status 0~2 の被験者
- 5) 一次登録時の年齢が 20 歳以上の被験者
- 6) 遺伝子を導入する T リンパ球採取時に前治療 (化学療法等) 終了から十分な回復が見

込める被験者

- 7) 主要臓器（心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす被験者

・総ビリルビン (T-Bil)	施設基準値の上限 3 倍未満
・AST (GOT)、ALT (GPT)	施設基準値の上限 5 倍未満
・血清クレアチニン (Cr)	施設基準値の上限 3 倍未満
・左室駆出率	55%以上
・動脈血酸素飽和度	94%以上

- 8) 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた被験者

*:試験方法は参考資料 17 WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」添付文書参照。

IX. 2. 1. 2 除外基準（一次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する被験者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する被験者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞、心不全
 - ・制御困難な糖尿病又は高血圧症
 - ・制御困難な感染症
 - ・間質性肺炎又は肺線維症
 - ・活動性の自己免疫疾患
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する被験者
- 3) HBV、HCV、HIV、HTLV-1 に感染している被験者
- 4) 同意取得後、4 ヶ月以上の生命予後が見込めない被験者
- 5) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する被験者
- 6) 安全性評価が困難となるような脳脊髄病変（脳内転移を含む）を有する被験者
- 7) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾロン換算にて 0.5mg/kg/day 以上）を使用している被験者
- 8) 本臨床研究の参加同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する被験者
- 9) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。
又は挙子希望の被験者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
- 10) 一次登録前 4 ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している被験者
- 11) 同種造血幹細胞移植を施行した被験者

- 12) 本臨床研究の対象疾患以外の悪性腫瘍を有する被験者
- 13) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

IX. 2. 2 二次登録

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前に再度文書にて同意を取得する。その後、二次登録時の選択基準に適合し、除外基準に該当しないことを確認し、二次登録を行う。

IX. 2. 2. 1 選択基準（二次登録）

以下の全ての基準を満たす被験者を対象とする。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製が終了し、最小輸注量 (1.6×10^8 cells) 以上の投与が可能かつ、使用期限内に投与が完了する見込みのある被験者
- 2) ECOG Performance Status 0~2 の被験者
- 3) 主要臓器（心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査が以下の基準を満たす被験者

・総ビリルビン (T-Bil)	施設基準値の上限 3 倍未満
・AST (GOT)、ALT (GPT)	施設基準値の上限 5 倍未満
・血清クレアチニン (Cr)	施設基準値の上限 3 倍未満
・左室駆出率	55%以上
・動脈血酸素飽和度	94%以上
- 4) 一次登録後に同意撤回がなく、治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた被験者

IX. 2. 2. 2 除外基準（二次登録）

以下のいずれかの基準に抵触する被験者は除外する。

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後に 3 ヶ月以上の生存が見込めない被験者
- 2) 局所投与を除く免疫抑制剤又は副腎皮質ステロイド剤（プレドニゾン換算にて 0.5mg/kg/day 以上）を使用している被験者
- 3) 本臨床研究の参加同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する被験者
- 4) 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある被験者又は妊娠を希望している被験者。又は挙子希望の男性患者（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合は該当しない）
- 5) TCR 遺伝子導入 T リンパ球が自己細胞反応性を持つ被験者※
- 6) その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた被験者

※試験方法については参考資料 18 自己細胞反応性試験の方法を参照。

IX.3 被験者の同意の取得方法

総括責任者又は分担研究者は、医療機関内に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認が得られた同意・説明文書を被験者に説明前又は説明時に提供し、同意・説明文書に記載されている内容を口頭で詳しく説明する。その後、被験者より自由意思による文書同意を取得する（文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計二回行う）。なお、同意取得前に、被験者本人に質問する機会と本臨床研究参加を判断するための時間を十分に与え、全ての質問に対して被験者が満足するように答えるものとする。また、担当医師以外の臨床研究コーディネーター等が説明補助を行うことも可能とする。

IX.4 実施期間及び目標症例数

実施期間は厚生労働大臣から実施が差し支えない旨の回答を得た時点から2年間とする。症例毎の実施期間はTCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注後 58 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間（FDA のガイドライン(81)に従い、最短 15 年間）にわたり、1 年に 1 回の頻度で被験者の生存状況や TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態及び二次発癌や RCR の有無について追跡調査を実施する。

本臨床研究における目標症例数は合計で 9 例とする。ただし、本臨床研究との因果関係を否定できない重篤な有害事象が発生した場合には、安全性確認のため症例数の追加を行う。また、有害事象については、「IX.1.2 本臨床研究の実施手順」の投与量増加基準に従って、安全性を評価する。なお、実施計画書に規定された細胞数及びペプチドが投与されなかった場合は症例数として数えないこととする。

各コホートにおける症例数と TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量および症例の取り扱いについては以下のとおりとする。

表.4 各コホートにおける症例数と TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注量

	症例数	TCR 遺伝子導入 T リンパ球 初回・2 回目輸注量	改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド 初回・2 回目投与量
コホート 1	3 症例	各 2×10^8 cells (±20%)	各 300 µg
コホート 2	3 症例	各 1×10^9 cells (±20%)	各 300 µg
コホート 3	3 症例	各 5×10^9 cells (±20%)	各 300 µg

- ・各コホートにて規定された細胞数とペプチドを投与した被験者を各コホートにおける症例数として数える。
- ・規定の細胞数量又はペプチド投与に至らなかった症例については該当コホートにおける症例数として数えない。
- ・同意撤回等により一度も投与に至らなかった症例については、症例数として数えない。
- ・本臨床研究における投与毎の最小輸注量は 1.6×10^8 cells とする。最小輸注量に満たない

場合には投与しない。

IX. 5 遺伝子治療臨床研究の実施方法

IX. 5. 1 対照群の設定方法

本臨床研究では対照群を設定しない。

IX. 5. 2 遺伝子導入方法

IX. 5. 2. 1 採血

遺伝子を導入するための T リンパ球を得るため、被験者より末梢血を最大 100mL 採血する。採血には、手技に習熟した医師又は医師の指示に従い看護師が被験者の状態を十分に観察しながら実施する。

被験者の採血時の実施条件

- ・身体的、精神的状態が良好であること
- ・37.5℃を超える発熱を有しないこと
- ・重度の高血圧や低血圧でないこと
- ・その他、担当医師が採血に不適と判断した場合は実施を延期する。

IX. 5. 2. 1. 1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球のながれ

被験者より採血した全血は、三重大学に設置している細胞調製施設へ搬送する。また、三重大学にて細胞調製完了後、凍結保存した TCR 遺伝子導入用 T リンパ球は各医療機関へ搬送される。なお、細胞調製施設と各医療機関の搬送方法、条件については別途手順書にて定める。

IX. 5. 2. 2 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の調製

被験者より採血した全血を用いて、「VII. 3. 1 遺伝子導入細胞の調製方法」に従い、細胞調製を行う。細胞調製後、「VII. 3. 4 被験者に投与する細胞の安全性」に示した各種試験を行ったうえで投与に用いる。

細胞調製後、コホート毎に規定された細胞数量に満たない場合や品質試験により被験者への投与が不適格と判断された場合には、担当医師と臨床研究薬品質管理者で協議し、被験者の状態を考慮したうえで再び採血・細胞調製を行えることとする。

IX. 5. 2. 3 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の輸送

三重大学に設置された細胞調製施設で作製された遺伝子導入 T リンパ球は、参考資料 20 に定められた条件により各施設に輸送され、投与に用いられる。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。

IX. 5.3 TCR 遺伝子導入 T リンパ球及び改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与

IX. 5.3.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与

原則として、2 回目の TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与は初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 28 日後（±7 日）に行うこととする。しかし、感冒などの一過性有害事象や原疾患に伴う症状等により、安全性、有効性評価の面から規定された日程の範囲内での投与が好ましくない場合も考えられる。そのため、TCR 遺伝子導入 T リンパ球が使用期限内であれば、投与日を延期することも可能とする。

IX. 5.3.1.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与方法

凍結保存された TCR 遺伝子導入 T リンパ球を含むバッグを 37℃恒温槽にて解凍し、被験者静脈内へ投与する。投与时より十分な経過観察を行う。有害事象が発現した場合には、「IX. 5.6.1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

IX. 5.3.2 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの投与方法

不完全フロイントアジュバント（商品名：MONTANIDE® ISA-51VG、SEPPIC 社）と懸濁した改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド（300 μg）を皮下へ 2 回投与する。投与は、2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与から 2 日後及び 16 日後（±3 日）の計 2 回行う。有害事象が発現した場合には、「IX. 5.6.2 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。

IX. 5.4 前処置及び併用療法の有無

IX. 5.4.1 前処置

前処置は行わない。

IX. 5.4.2 臨床研究期間中に行うその他の治療

IX. 5.4.2.1 併用禁止療法及び併用禁止薬

併用禁止薬及び併用禁止療法

以下の薬剤及び併用療法について、遺伝子を導入するための T リンパ球を採取する日より 4 週間以内および、二次登録 4 週間前から臨床研究終了時までの間、使用・実施を禁止する。

- 1) 抗癌剤
- 2) 免疫抑制剤（局所投与を除く）
- 3) 放射線療法

IX. 5.4.2.2 併用制限薬

局所投与を除く副腎皮質ステロイドについて、遺伝子を導入するための T リンパ球を採取する日より 4 週間以内および、二次登録 4 週間前から臨床研究終了時までの間、投与を

以下のとおり制限する。

- 1) 規定期間中、発熱などの症状緩和を目的とした投与は可能とする。ただし、投与は連続5日以内とし、1日の投与量はプレドニゾン換算にて0.5 mg/kg/day 以下、ヒドロコルチゾンとして2.0 mg/kg/day 以下とする。

IX. 5.5 臨床検査項目及び観察項目

以下のとおり検査・観察を実施する。検査・観察スケジュールについては「X.3 検査・観察スケジュール」に記載する。なお、TCR 遺伝子導入Tリンパ球血中動態（リアルタイムPCR、テトラマー解析）、免疫機能解析（テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色）、TCR 遺伝子導入Tリンパ球の腫瘍組織浸潤度測定、WT1 抗原発現検査（RT-PCR 法によるWT1 発現検査）、増殖性レトロウイルス（RCR）出現の有無確認、LAM-PCR を用いたTCR 遺伝子導入Tリンパ球のクローナリティの検討については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にて行うものとし、当該検査のうち、PCR 法の工程はタカラバイオ（株）が担当する。

臨床研究参加時検査（一次登録）

- 1) 同意取得
- 2) 被験者背景
 - ・性別、生年月日、診断名、身長、体重、既往歴、合併症、過敏症の有無、前治療、併用療法・併用薬、妊娠の有無（閉経前の女性のみ）、HLA 型、WT1 発現の有無（PCR 法）、他の臨床試験（臨床研究）への参加の有無
- 3) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 4) Performance status
- 5) 感染症検査
 - ・HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体
- 6) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	PCR 検査
Cl		C 反応性蛋白	WT1 定量
Ca		(CRP)	(末梢血、骨髓※)
			※必要に応じて

- 7) 血液像検査（末梢血）
- 8) 画像診断
 - ・胸部 X 線検査、心臓超音波検査
- 9) 12 誘導心電図
- 10) 一次登録

遺伝子を導入するための T リンパ球採取時検査

※一次登録と同日に遺伝子を導入するための T リンパ球を採血するのであれば、以下の検査については一次登録時のデータにて代替可能とする。ただし、TCR 遺伝子導入用 T リンパ球の採血については必ず一次登録完了後に行うこととする。

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前迄

- 1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球による自己細胞反応性確認試験

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前検査 (day 0)

※以下の実施項目については TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前 7 日から実施を可能とする。

- 1) 同意取得
- 2) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 3) Performance status
- 4) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血)
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	

ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査 (赤血球・白血球)
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	PCR 検査
Cl		C 反応性蛋白 (CRP)	WT1 定量 (末梢血、骨髓※) ※必要に応じて
Ca			

5) 画像診断

- ・胸部 X 線検査、心臓超音波検査

6) 12 誘導心電図

7) 血液像検査 (末梢血)

8) 骨髓検査

染色体異常が認められる場合には、染色体検査等も併せて実施すること
(骨髓穿刺不能例、リスクを伴う場合は除く)

9) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

10) 免疫機能解析

- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色

11) WT1 抗原発現検査

- ・RT-PCR 法による WT1 発現

12) LAM-PCR

13) 長期保存用検体の採血

14) 二次登録

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 0)

1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (投与 1 時間後 (±10 分)、3 時間後 (±30 分)、6 時間後 (±1 時間) 及び 12 時間後 (±2 時間))

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

2) 有害事象の発現状況確認

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 1)

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度

2) Performance status

3) 臨床検査

血液生化学的検査	血液学的検査	尿検査
----------	--------	-----

AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白	
Ca		(CRP)	

- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 24 時間後 (±4 時間))
・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)
- 6) RCR 出現の有無

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 2)

- 1) 問診、バイタルサイン
・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 48 時間後 (±4 時間))
・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 3)

- 1) 問診、バイタルサイン
・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 72 時間後 (±4 時間))
・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 4) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 7±1 日)

- 1) 問診、バイタルサイン
・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査

LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 14±3 日)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

2回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与前検査 (day 28±7 日)

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)

γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)		
Cl		免疫血清	PCR 検査
Ca		C 反応性蛋白 (CRP)	WT1 定量 (末梢血、骨髄※) ※必要に応じて

4) 画像診断

- ・胸部 X 線検査、心臓超音波検査

5) 12 誘導心電図

6) 血液像検査 (末梢血)

7) 骨髄検査

染色体異常が認められる場合には、染色体検査等も併せて実施すること
(骨髄穿刺不能例、リスクを伴う場合は除く)

8) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

9) 免疫機能解析

- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色

10) WT1 抗原発現検査

- ・PCR 法による WT1 発現

11) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

12) 長期保存用検体の採血

2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 28±7 日)

1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (投与 1 時間後 (±10 分)、3 時間後 (±30 分)、6 時間後 (±1 時間) 及び 12 時間後 (±2 時間))

- ・リアルタイム PCR、テトラマー解析

2) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後検査 (day 29±7 日)

1) 問診、バイタルサイン

- ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度

2) Performance status

3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	尿沈査
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	

Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)		
Cl		免疫血清	
Ca		C 反応性蛋白 (CRP)	

4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 24 時間後 (±4 時間))

・リアルタイム PCR、テトラマー解析

5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与前検査 (day30±7 日)

※本検査は、2 回目 TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後 2 日目に実施する

1) 問診、バイタルサイン

・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度

2) Performance status

3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	尿沈査
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白	
Ca		(CRP)	

4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態 (TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与 48 時間後 (±4 時間))

・リアルタイム PCR、テトラマー解析

5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後検査 (day31±7 日)

※本検査は、初回 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後 1 日目に実施する

1) 問診、バイタルサイン

・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度

2) Performance status

3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	(糖・蛋白・潜血)
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	尿沈査

LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR遺伝子導入Tリンパ球血中動態(TCR遺伝子導入Tリンパ球投与72時間後(±4時間))
・リアルタイムPCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

初回 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後検査 (day 35±7 日)

※本検査は、初回 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後5日目 (±1日) に実施する

- 1) 問診、バイタルサイン
・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR遺伝子導入Tリンパ球血中動態
・リアルタイムPCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

2回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与前検査 (day 44±7 日)

※本検査は、2回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与前に実施する

- 1) 問診、バイタルサイン
・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	

LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	(赤血球・白血球)
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 免疫機能解析
 - ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 6) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

2 回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後検査 (day 45±7 日)

※本検査は、2 回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後 1 日目に実施する

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白 (CRP)	
Ca			

- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態
 - ・リアルタイム PCR、テトラマー解析
- 5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

2 回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後検査 (day 51±7 日)

※本検査は、2 回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後 7 日目 (±1 日) に実施する

- 1) 問診、バイタルサイン
 - ・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度
- 2) Performance status
- 3) 臨床検査

血液生化学的検査	血液学的検査	尿検査
----------	--------	-----

AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	総ビリルビン (T-Bil)	白血球分画	
ALP	血糖値	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白	
Ca		(CRP)	

4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

・リアルタイム PCR、テトラマー解析

5) 有害事象の発現状況確認 (臨床検査値の異常変動含む)

臨床研究終了・中止時検査 (day 58±7 日)

※本検査は、2 回目 改変型 WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチド投与後 14 日目 (±3 日) に実施する

1) 問診、バイタルサイン

・血圧、体温、脈拍数、経皮的動脈血酸素飽和度

2) Performance status

3) 臨床検査

血液生化学的検査		血液学的検査	尿検査
AST (GOT)	尿酸 (UA)	白血球数 (WBC)	尿定性 (糖・蛋白・潜血) 尿沈査 (赤血球・白血球)
ALT (GPT)	血糖値	白血球分画	
ALP	総ビリルビン (T-Bil)	赤血球数 (RBC)	
LDH	総蛋白 (TP)	ヘモグロビン (Hb)	
γ-GTP	アルブミン (Alb)	ヘマトクリット (Ht)	
Na	尿素窒素 (BUN)	血小板数	PCR 検査 WT1 定量 (末梢血、骨髓※) ※必要に応じて
K	クレアチニン (Cr)	免疫血清	
Cl		C 反応性蛋白	
Ca		(CRP)	

4) 画像診断

・胸部 X 線検査、心臓超音波検査

5) 12 誘導心電図

6) 血液像検査 (末梢血)

7) 骨髓検査

染色体異常が認められる場合には、染色体検査等も併せて実施すること

(骨髓穿刺不能例、リスクを伴う場合は除く)

8) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

・リアルタイム PCR、テトラマー解析

9) 免疫機能解析

- ・テトラマー解析、ELISPOT アッセイ、細胞内サイトカイン染色
- 10) WT1 抗原発現検査
 - ・PCR 法による WT1 発現
- 11) RCR 出現の有無
- 12) LAM-PCR
- 13) 有害事象（臨床検査値の異常変動含む）
- 14) 長期保存用検体の採血

研究終了後の追跡調査

- 1) 生存状況の確認
- 2) RCR 出現の有無
- 3) LAM-PCR
- 4) TCR 遺伝子導入 T リンパ球血中動態

※上記の調査項目全てについて生存期間（FDA のガイドライン(81)に従い、最短 15 年間）にわたり、1 年に 1 回の頻度で検査を実施する。なお、追跡調査は本臨床研究における臨床研究実施期間に含まないものとする。

なお、臨床研究終了後の経過観察については、被験者や家族、他院・他科の主治医等との連絡を電話や FAX 等を用いて定期的に行う。

IX. 5. 6 予測される副作用及びその対処方法

IX. 5. 6. 1 TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注に伴う副作用

- 1) 発熱、発疹、アレルギー類似反応等

解凍した TCR 遺伝子導入 T リンパ球を投与した際に、解凍により一部崩壊した細胞内のサイトカイン等による発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性がある。それらの有害事象が発生した場合には、必要に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤の投与等、適切な処置を行う。また、グレード 3 以上の有害事象に該当する場合には副腎皮質ステロイド剤の投与等、適切な処置を行う。

- 2) 肺障害

重篤な輸血副作用として輸血関連急性肺障害（TRALI）が知られている。TRALI は抗白血球抗体（抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体）による抗原抗体反応が原因と推測されているが、詳細は不明である。本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、TRALI 類似病態発症の可能性は考えにくい。TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後の肺障害に留意すべきと考えられる。TRALI が発症した場合には、副腎皮質ステロイド剤の大量投与等、適切な処置を行う。

- 3) 免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原である WT1 は、胎児期においては腎臓や生殖隆起などの形成に必須

であるが、成人ではその発現は腎臓の糸球体上皮細胞や胸膜、腹膜の中皮細胞などに限局している。またこれまで実施されたWT1を標的としたペプチドワクチン臨床試験では正常組織の傷害による重篤な有害事象は知られていない。しかし、正常組織の傷害には常に留意する必要がある。それらの有害事象が発生した場合には、症状に応じて副腎皮質ステロイド剤を投与する等、適切な処置を行う。

4) レトロウイルスベクターを用いる危険性

「VII. 1. 3 増殖性ウイルス出現の可能性」に記載のとおり、本臨床研究においてはRCRが出現する可能性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。よって、本臨床研究では被験者体内におけるRCR出現をRT-PCR法によってモニタリングすることにより、評価を行う予定である。万が一、RCRが出現した場合には、抗ウイルス剤によるウイルス感染症治療等の最善の治療を行う。

「VII. 1. 8 癌原性の有無」に記載のとおり、レトロウイルスベクターで遺伝子導入したTリンパ球を投与することによる癌化の危険性は極めて低いと考えられるが、完全には否定できない。そのため、本臨床研究では遺伝子導入細胞の被験者体内におけるクローン増殖をLAM-PCRによってモニタリングし、評価を行う。万が一、異常増殖が認められた場合には、化学療法等の最善の治療を行うとともに当該クローンの遺伝子導入位置の同定や染色体検査等を行う。

IX. 5. 6. 2 ペプチド投与に伴う副作用

改変型WT1₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドは不完全フロイントアジュバント（商品名：MONTANIDE® ISA-51VG、SEPPIC社）に懸濁し2回皮下投与される。CTL認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は種々行われており、現在までに重篤な副作用の報告はない。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。本臨床研究ではペプチド反応性T細胞の頻度を上昇させた状態においてペプチドを投与する。したがって、輸注したペプチド反応性T細胞の活性化、機能増強に伴う微熱、倦怠感等の症状、あるいは予測できない症状が出現する可能性は否定できないが、これまでの異なるペプチド等の抗原とT細胞を用いた同様な臨床試験ではそのような機序によると考えられる副作用の出現は報告されていない。副作用発生時の対処法は、症状に応じて副腎皮質ステロイド剤を投与する等、適切な処置を行う。

IX. 5. 7 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

IX. 5. 7. 1 主要評価項目

安全性の評価

1) 有害事象

有害事象とは、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与以降に生じるあらゆる好ましくないあるいは

は意図しない症状、徴候（臨床検査値の異常も含む）又は疾患のことである。原則として、当該治療との因果関係の有無は問わない。ただし、死亡を除き本臨床研究の対象疾患の進行に伴う各種症状の発現や悪化及び入院については有害事象とはしない。

重篤な有害事象とは、以下のものをいう。

1. 死亡に至るもの
2. 死亡につながるおそれのあるもの
3. 治療のため入院又は入院期間の延長が必要なもの
4. 障害（永続的又は顕著な障害もしくは機能不全に陥るもの）
5. 障害につながるおそれのあるもの
6. 上記 1 から 5 に準じて重篤であるもの
7. 後世代における先天性の疾病又は異常をきたすもの

総括責任者又は分担研究者は、TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与後に発現した有害事象について、その内容、発現日、グレード、本臨床研究の処置（継続・中止の別等）、その他の処置、転帰、転帰日、本臨床研究との因果関係を調査する。なお、因果関係の有無については以下の表. 5 因果関係の判定基準に従い判定を行う。有害事象は原則として、転帰が消失となるまで追跡調査を行う。

表. 5 因果関係の判定基準

明らかに関連あり	時間的に明白な相関関係が認められ、再投与により同様の症状、所見を認めた場合。もしくは、既知の有害事象であり、原疾患や合併症、併用薬などの要因が否定でき、TCR 遺伝子導入 T リンパ球もしくは、改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドによるものと考えられる場合。
多分関連あり	時間的に明白な相関関係が認められ、原疾患や合併症、併用薬などの要因がほぼ除外され TCR 遺伝子導入 T リンパ球もしくは、改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの可能性が強く示唆される場合。
関連あるかもしれない	原疾患や合併症、併用薬などの要因が強く示唆されるが、TCR 遺伝子導入 T リンパ球や改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドによる可能性も否定できない場合。
関連なし	時間的な相関関係が認められない場合。原疾患や合併症、併用薬などの要因によると考えられる場合。または、偶発的な事象であり、TCR 遺伝子導入 T リンパ球もしくは、改変型 WT1 ₂₃₅₋₂₄₃ ペプチドの影響と判断することが合理的ではない場合。

発現した有害事象のグレードは、2009年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v4.02 (CTCAE v4.02) 有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2009年12月28日」に従い、判定を行う(表.6)。また、CTCAE v4.02 に記載のないもので、発現が予想される有害事象についても CTCAE v4.02 に準じて判定を行うものとする。

表.6 有害事象のグレード

Grade 1	軽度の有害事象
Grade 2	中等度の有害事象
Grade 3	高度の有害事象
Grade 4	生命を脅かす又は活動不能とする有害事象
Grade 5	有害事象による死亡

2) 臨床検査

総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の正常・異常について判定する(医療機関の臨床検査基準値から逸脱した場合、「異常」と判定する)。

また、総括責任者又は分担研究者は、臨床検査値の異常変動の有無について判定する。異常変動の判定基準については別途記載する「異常変動の判定基準」を参考に判定する。また、「異常変動の判定基準」による判定と担当医師の見解が異なる場合には、臨床経過を踏まえて考察を行う。

3) RCR 出現の有無

本臨床研究期間中の RCR 出現の有無を検討する。検体から total RNA を調製し、ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行い、GaLV のエンベロープ遺伝子領域に設定した検出用プライマーを用いて PCR を行う。PCR 生成物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマ이드染色を行い特異的増幅バンドの有無を確認する。

4) LAM-PCR

TCR 遺伝子導入 T リンパ球のクローナリティーを検討する。検体から調製したゲノム DNA を鋳型として LAM-PCR 反応を行い、反応産物をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマ이드染色による泳動パターンによりクローナリティーを確認する。

IX.5.7.2 副次評価項目

TCR 遺伝子導入 T リンパ球の血中動態

被験者から末梢血を採取し、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にて、以下の試験を行う。

1) TCR 遺伝子導入細胞の定量

Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC より QIAamp DNA Blood Midi Kit (QIAGEN 社) や PUREGENE Genomic DNA Purification Kit (Gentra Systems 社) 等のキットを用いてゲノム DNA を調製する。調製したゲノム DNA をテンプレートとして、ベクター及び IFN- γ の定量的 PCR を行う。また、末梢血リンパ球における導入 TCR の定量化を行う。

2) テトラマー解析を用いた末梢血中 TCR 発現細胞の比率測定

Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC と PE 標識化 HLA-A*24:02/ WT1₂₃₅₋₂₄₃ テトラマーを反応させ、その後、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

免疫機能解析

被験者から末梢血を採取し、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にて、以下の試験を行う。

1) ELISPOT アッセイによる WT1 反応性 T リンパ球の定量

Ficoll 等を用いた比重遠心法により分離した PBMC を更に CD8 陽性細胞と CD8 非陽性細胞に分離する。CD8 非陽性細胞を刺激用細胞として調製し、CD8 陽性細胞と作製した刺激用細胞を IL-2 等の存在下で培養する。その後、WT1 特異的 T 細胞の存在を ELISPOT アッセイにて確認する。

2) テトラマーによる WT1 反応性 T リンパ球の定量

分離した PBMC から調製した CD8 陽性 T 細胞に、PE 標識化 HLA-A*24:02/ WT1₂₃₅₋₂₄₃ テトラマーを反応させ、細胞表面マーカーに対する抗体を用いた染色を加えた後洗浄し、フローサイトメトリー解析を行い、末梢血 T 細胞中の導入 TCR 発現細胞の比率を測定する。

3) 細胞内サイトカイン染色による WT1 反応性 T リンパ球の反応特性の解析

採取 PBMC 量が十分である場合には、上記テトラマー解析の際に抗サイトカイン抗体を用いて細胞内サイトカイン染色を行い、WT1 反応性 T リンパ球の反応特性の解析を行う。

血液学的効果

1) TCR 遺伝子導入 T リンパ球の骨髓組織への浸潤度

生検または穿刺吸引可能な骨髓病変を有し、侵襲的検査のリスクが少なく実施可能と判断される場合には生検または骨髓穿刺を行う。採取した試料は、各医療機関の検査室（外注の検査機関を含む）もしくは三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学講

座にて所定の検査を行う。

2) 腫瘍における抗原の発現の評価*

WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」を用いて測定する。すなわち、抽出した RNA を調製し、希釈ランダムプライマー液と逆転写反応を行い、cDNA 検体とする。チューブ (又はトレイ) に WT1-PCR 混和液を分注し、WT1 標準液又は cDNA 検体を加える。その後、WT1 mRNA 量をリアルタイム PCR 装置で測定する。

*: 詳細な測定方法は参考資料 17 WT1 mRNA 測定キット「オーツカ」添付文書 参照。

3) 血液学的効果判定

以下の基準に従い、効果判定を行う (X.6)。

(1) 急性骨髄性白血病

Cheson らの基準を用いる。(83, 84)

・血液学的寛解 (CR)

末梢血中に芽球を認めず、骨髓中の芽球 < 5%、好中球 > 1,000/ μ L、血小板数 $\geq$ 100,000/ μ L、髓外白血病を認めない。

・血球回復が不完全な血液学的寛解 (CRi)

好中球数及び血小板数、又はそのいずれかが定義を満たさないが、その他の因子が血液学的寛解の定義を満たす場合。

・血液学的部分寛解 (PR)

骨髓中の芽球割合が 50-100% の例では治療後芽球割合が 5-25% になった場合であり、治療前芽球割合が 10-49% の例では、治療後の芽球割合が治療前と比較して半分以下になった場合となる。治療前芽球割合が 5-9% の症例では部分寛解の判定は行わない。

・細胞遺伝学的寛解 (CRc)

血液学的に CR 又は CRi を満たす例において、骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて、白血病細胞特異的と考えられる核型異常が消失した場合。

・分子生物学的寛解 (CRm)

血液学的に CR 又は CRi を満たす例において、白血病細胞特異的と考えられるキメラ遺伝子 mRNA が定量的 RT-PCR 法による検索にて、2 ポイント以上の連続した検体で消失した場合。

〈Response の定義〉

以下の全てを Response ありと定義する。

血液学的再発 CR、CRi、CRc、CRm、PR

細胞遺伝学的再発 CRc、CRm

分子生物学的再発 CRm

(2) 骨髓異形成症候群 (MDS)

Cheson らの基準を用いる。なお、血液学的改善 (HI) の総合判定は、Silverman の評価方法を参考に一部修正、設定した。(85, 86) へ

〈治療反応の定義〉

・血液学的寛解 (CR)

骨髓所見：芽球 < 5% (骨髓中の赤芽球が 50% 以上の際には、非赤芽球系有核細胞に対する割合で判定する)、形態学的に異形成を認めない。

末梢血所見 (2 カ月以上継続する所見として以下を全て満たす)

芽球を認めず、形態学的に異形成を認めない。

ヘモグロビン濃度 > 11g/dL、好中球数 $\geq 1,500/\mu\text{L}$ 、血小板数 $\geq 100,000/\mu\text{L}$

髓外白血病を認めない。

・血球回復が不完全な血液学的寛解 (CRi)

好中球数、血小板数、及びヘモグロビン値のいずれかが血液学的定義を満たさないが、その他の因子が血液学的寛解の定義を満たす場合。

・血液学的部分寛解 (PR)

骨髓中の芽球割合が治療前と比較して、50% 以上減少した、もしくは FAB 分類上より重症度の低い分類に移行した場合。末梢血所見は CR の定義を満たしていることを必要とする。

・細胞遺伝学的寛解 (CRc)

血液学的に CR または CRi を満たす例において、骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて、MDS クローン特異的と考えられる核型異常が消失した場合。

・細胞遺伝学的部分寛解 (PRc)

骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて、MDS クローン特異的と考えられる核型異常が 50% 以上減少した場合。

・分子生物学的寛解 (CRm)

血液学的に CR 又は CRi を満たす例において、MDS クローン特異的と考えられるキメラ遺伝子 mRNA が定量的 RT-PCR 法による検索にて、2 ポイント以上の連続した検体で消失した場合。

・血液学的改善 (HI)

少なくとも、2 カ月以上以下の状態を満たす場合に診断する。「HI-E」かつ、「HI-P」または「HI-N」であるとき「HI」と総合判定する。

・赤芽球系改善 (HI-E)

治療前ヘモグロビン値が 11g/dL 未満であった例において、治療前値より 1-2g/dL 上昇した場合。治療前輸血依存であった例においては輸血頻度が 50% 以上減少した場合。

・巨核球系改善 (HI-P)

治療前の血小板数が 100,000/ μL 未満であった例において、治療前から 50% 以上上

昇した場合。

- ・顆粒球系改善 (HI-N)

治療前の好中球数が $1,500/\mu\text{L}$ 未満であった例において、治療前値より 50%以上上昇した場合。

〈Response の定義〉

以下の全てを Response ありと定義する。

血液学的再発 CR、CRi、CRc、CRm、PR、PRc、HI

細胞遺伝学的再発 CRc、CRm

分子生物学的再発 CRm

IX. 5. 7. 3 中止基準

- ・被験者ごとの中止基準

本臨床研究期間中に以下のいずれかに該当する場合、総括責任者又は分担研究者は当該被験者における本臨床研究を中止する。また、被験者毎の臨床研究中止時には必要な検査・観察（臨床研究終了時検査等）を行うとともに、必要に応じて医療機関の長に本臨床研究を中止した旨を連絡する。ただし、TCR 遺伝子導入 T リンパ球の投与後については、中止後も被験者の安全性確保のため、生存期間（FDA のガイドライン(81)に従い、最短 15 年間）にわたり、1 年に 1 回の頻度で研究終了後の追跡調査と同様の検査を実施する。なお、有害事象の発現等、安全性に問題が生じ中止した場合、総括責任者又は分担研究者は速やかに適切な処置を行い、被験者の安全性が確認されるまで追跡調査を実施する。

- 1) 被験者が同意を撤回した場合
- 2) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 3) 培養した TCR 遺伝子導入 T リンパ球が最小輸注量に満たない場合
- 4) 本臨床研究継続困難な有害事象が発現した場合
- 5) 対象疾患の進行により死亡又は本臨床研究の継続が困難となった場合
- 6) その他、総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

- ・研究全体の中止

安全・効果評価・適応判定中央部会は、総括責任者より提出された重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）をもとに、本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会の判定結果をもとに院内の本臨床研究全体の継続・中止について決定する。また、中止の際には総括責任者は臨床研究参加中の全ての被験者へ必要な検査・観察を行うとともに医療機関の長に中止した旨を報告する。

- 1) 本臨床研究との因果関係を否定できない重篤な有害事象が発生した場合（他施設からの情報提供を含む）
- 2) 総括責任者又は分担研究者が本臨床研究の継続が不適切であると判断する情報を入手した場合

IX.5.8 有害事象発現時の措置

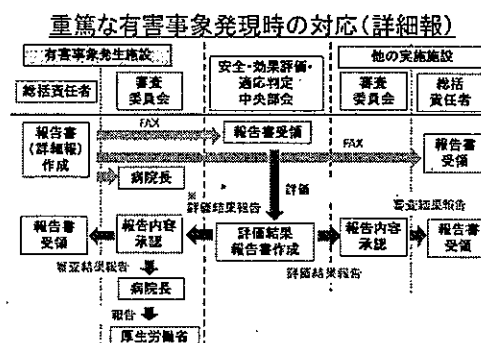
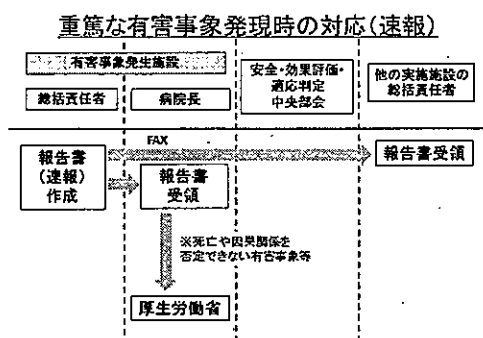
IX.5.8.1 有害事象発現時

総括責任者又は分担研究者は、有害事象が発生した場合には被験者にその旨を説明し、安全確保に留意し適切な処置を行う。また、有害事象の原因究明及び因果関係判定の際には必要に応じて長期保存用検体を使用する。

IX.5.8.2 重篤な有害事象発現時

総括責任者又は分担研究者は重篤な有害事象の発生を察知した場合は、「IX.5.7.1 主要評価項目」の対応を行う。また、総括責任者は、本臨床研究との因果関係の有無に係わらず、重篤な有害事象の発現を察知した時点から24時間以内に医療機関の長及び本臨床研究を実施している全ての総括責任者へ口頭もしくは電話（必要に応じてE-mail）等の手段を用いて報告を行う。また、当該医療機関の長へ「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」の原本を提出する。さらに本臨床研究を実施している全ての総括責任者へは「重篤な有害事象に関する報告書（速報）」の写しをもって報告を行う。なお、関係各所への報告については分担研究者が行うことも可能とする。

総括責任者は、重篤な有害事象の発現を察知した時点から7日以内に当該医療機関の長へ「重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）」の原本を提出する。本臨床研究を実施している全ての総括責任者及び安全・効果評価・適応判定中央部会へは「重篤な有害事象に関する報告書（詳細報）」の写しをもって報告を行う。なお、関係各所への報告は分担研究者が行うことも可能とする。



なお、三重大学医学部附属病院 病院長は、被験者が死亡もしくは因果関係の否定出来ない重篤な有害事象（因果関係：『関連なし』以外）に関する報告を受けた場合には、速やかにその概況及び対処の方針を第一報として厚生労働省大臣官房厚生科学課に報告し、15日以内を目安に文書にて厚生労働大臣に報告する。

表.7 有害事象報告の必要性の有無について

	重篤な有害事象			非重篤な有害事象
	死亡 (因果関係問わず)	因果関係		
		否定 できない	なし	
厚生科学課及び大臣への報告	必要	必要	不要	不要
安全・効果評価・適応判定中央部会 医療機関の長への報告	必要	必要	必要	不要

安全・効果評価・適応判定中央部会は提出された重篤な有害事象に関する報告書をもとに本臨床研究との因果関係並びに本臨床研究継続の可否について判定する。得られた判定結果については各医療機関の遺伝子治療臨床研究審査委員会を通じて総括責任者へ報告する。遺伝子治療臨床研究審査委員会は、安全・効果評価・適応判定中央部会からの判定結果をもとに臨床研究の継続に関する審査を行い、三重大学医学部附属病院 病院長及び総括責任者へ審査結果を報告する。

IX.5.9 症例記録に関する記録用紙等の様式

総括責任者又は分担研究者は、本臨床研究専用の症例報告書を記載する。症例報告書に記載されたデータのうち、総括責任者又は分担研究者のコメント及び有害事象の重篤性、本臨床研究との因果関係の判定等、医学的判断を伴う事項については症例報告書の記載を原データとして取り扱う。なお、カルテ等の原資料に総括責任者又は分担研究者が記載した事項を他の分担研究者（臨床研究コーディネーターを含む）が転記することは可能とする。

IX.5.10 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は医療機関の長が指名した保管責任者が行う。保管責任者は適切な状態の下で、本臨床研究終了後少なくとも5年間保存するものとする。

成績の公表は、被験者の同意のもと、研究者全員の合意を得て行う。公表の際には、被験者のプライバシーに十分配慮し、個人情報が特定できないよう必要な措置を講じる。

IX. 5. 11 個人情報の保護の徹底

IX. 5. 11. 1 個人情報保護に関する責務

三重大学における個人情報の取扱いに関しては、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律（平成 15 年 5 月 30 日法律第 59 号）その他関係法令に定めるものの他、国立大学法人三重大学個人情報保護規程（平成 22 年 4 月 1 日施行）に必要な事項を定めている。

三重大学における保有個人情報の管理に関する事務を総括するものとして理事（情報公開・個人情報担当）を総括保護管理者に置き、総括保護管理者の下に保護管理者、保護担当者を置くことにより、個人情報保護管理の徹底を行っている。

三重大学医学部附属病院においては、三重大学医学部附属病院 病院長が総括保護管理者から保護管理者として指名を受けており、三重大学医学部附属病院 病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程（平成 17 年 4 月 1 日施行）に従い、組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である三重大学医学部附属病院 病院長はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置を講ずることができる。

IX. 5. 11. 2 個人情報の取得と利用に関する制限

1) 診療・教育機関としての三重大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱い

三重大学医学部附属病院は法令の定める業務を遂行するために必要な場合に限り、目的を特定したうえで保有個人情報を利用する。この使用に関しては、個人情報の保護の法律に基づいた国立大学法人三重大学個人情報保護規程、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程、研究活動の実施に関する法令や倫理指針等を遵守したうえで取り扱われる。また、三重大学医学部附属病院を受診する患者には、三重大学医学部附属病院で使用する個人情報の目的についての理解と協力を求めている。

2) その他本臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取扱い

上記の診療・教育機関としての三重大学医学部附属病院における個人情報の一般的な取扱いに加え、本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取扱いについて、本臨床研究で扱う被験者の診療録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡等、被験者の生命を守るために使用する。その他、特別な目的で使用する場合は、事前に被験者に説明し、了承を得てから使用する。

また、本臨床研究の結果検討時や医療向上のため等を目的に本臨床研究成績等を公表・公開する場合は、個人を特定できない形、すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者への同意・説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護及び使用目的について通知し、同意を得る計画とした。

被験者の同意取得は、自由意思によるものであり、本臨床研究に参加しない場合であっ

ても被験者の不利益はない。このことは医学研究を行ううえで大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意・説明文書に記載し、被験者へ通知する。

総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲内において、個人情報と正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

IX. 5. 11. 3 個人情報保護に関する安全管理措置

三重大学医学部附属病院 病院長は国立大学法人三重大学個人情報保護規程及び三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、個人情報保護に関して、組織的、人的、物理的及び技術的に安全管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失又は棄損の防止に対する措置を講じている。一方で個人情報の漏洩等に係わる新しい犯罪手法等が急速な勢いで多様化していることを鑑み、本臨床研究では規程等の柔軟な運用をもって、個別に適切な対応を行う。

さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報が死者の人としての尊厳や遺族の感情及び遺伝情報が血縁者と共通していることに鑑み、生存する個人に関する情報と同様に死者に関する個人情報についても同様の措置を講じている。

IX. 5. 11. 4 第三者提供の制限

本臨床研究では第三者へ個人情報の提供を予定していない。もし、個人情報を第三者に提供する場合、総括責任者は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」第六章第九で掲げる内容に従い、適切な目的であることを確認し、被験者から同意を得たうえで第三者に個人情報を提供することとする。また、本臨床研究では、タカラバイオ（株）が外部協力者として「レトロウイルスベクター製剤の製造・品質管理及び遺伝子導入 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」に限定し、間接的に関与する。したがって、タカラバイオ（株）の担当者が研究協力のために一部データを閲覧する。そのため、治験と同様に被験者識別コードを用いることにより個人を特定できない措置を講じて個人情報を保護する。なお、被験者識別コードから被験者を特定する情報については、総括責任者が厳重に管理するものとする。また、事前にタカラバイオ（株）の関係者が個人情報の一部データを閲覧することを被験者に通知し、文書にて同意を取得する（一部データとは、ウイルスベクター及び遺伝子導入 T リンパ球の調製に限定されたものであり、本臨床研究のデータの客観的かつ公正な記録はその意向に影響を受けることはない）。

IX. 5. 11. 5 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は、以下の事項について同意・説明文書に明記したうえで被験者へ説明する。

- 1) 臨床研究実施機関の名称
- 2) 個人情報の利用目的

3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き方法

4) 苦情の申し出先

総括責任者は被験者から保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について求めがあった場合は、三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程に従い、遅滞なく必要な対応を行う他、対応結果について被験者に通知しなければならない。

さらに、三重大学医学部附属病院では苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応するために以下の相談・苦情の窓口を設置していることを被験者へ説明する。

【個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口】

三重大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

診療に関すること：医療サービス課 診療案内係（TEL：059-231-5072）

教育・研究に関すること：総務課 企画第1係（TEL：059-231-5261）

X. その他必要な事項

X.1 遵守する法令/省令等

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

1. 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
(平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第一号、平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 20 年 12 月 1 日一部改正)
2. 「臨床研究に関する倫理指針」
(厚生労働省告示第四百十五号、平成 20 年 7 月 31 日)
3. 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」
(薬食発第 0219011 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成 16 年 2 月 19 日)
4. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」
(薬発第 1062 号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成 7 年 11 月 15 日)
5. 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」
(医薬発第 329004 号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成 14 年 3 月 29 日)
6. 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」
(平成 15 年 6 月 18 日法律第 97 号)

X.2 参考文献

1. Swerdlow SH, et al. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th edition. 2008.
2. Ohno R, Kobayashi T, Tanimoto M, et al. Randomized study of individualized induction therapy with or without VCR, and of maintenance/induction therapy between 4 or 12 courses in adult myeloid leukemia; Japan Adult Leukemia Study Group AML-87 Study. *Cancer* 71(12):3888-3895, 1993.
3. Kobayashi T, Miyawaki S, Tanimoto, et al. Randomised trial between behenoyl cytarabine (BHAC) or cytarabine in combination induction and consolidation chemotherapy, and with or without ubenimex after maintenance/intensification therapy in adult myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 14(1):204-213, 1996.
4. Miyawaki S, Tanimoto T, Kobayashi T, et al. No beneficial effect of etoposide added to daunorubicin, cytarabine and 6-mercaptoprine individualized induction therapy f adult acute myeloid leukemia: The JALSG-AML92 Study. *Int J Hematol* 70(2):97-104, 1999.
5. Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, et al. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotag) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer* 104(7):1442-1452, 2005.
6. Gale RP, Horowitz MM, Rees JKH, et al: Chemotherapy versus transplants for acute myelogenous leukemia in second remission. *Leukemia* 10(1):13-19, 1996.
7. Sebban C, Lepage E, Vernant JP, et al: Allogeneic bone marrow transplantation in adult acute lymphoblastic leukemia in first remission: A comparative study. *J Clin Oncol* 12(12):2580-2587, 1994.
8. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 89(6):2079-2088, 1997.
9. Taguchi J, Miyazaki Y, Yoshida S, et al. Allogeneic bone marrow transplantation improves the outcome of de novo AML with trilineage dysplasia (AML-TLD). *Leukemia* 14(11):1861-1866, 2000.
10. Morita Y, Kanamaru A, Miyazaki Y, et al. Comparative analysis of remission induction therapy for high-risk MDS and AML progressed from MDS in the MDS200 study of Japan Adult Leukemia Study Group. *Int J Hematol* 91(1):97-103, 2010.
11. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26(32):5233-5239, 2008.
12. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314(5796):126-129, 2006.
13. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 114(3):535-546, 2009.

14. Gattinoni L, Klebanoff CA, Palmer DC, et al. Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8⁺ T cells. *J Clin Invest* 115(6):1616-1626, 2005.
15. Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, et al. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5):383-393, 2006.
16. Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, et al. Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 198(4):569-580, 2003.
17. Lou Y, Wang G, Lizée G, et al. Dendritic cells strongly boost the antitumor activity of adoptively transferred T cells in vivo. *Cancer Res* 64(18):6783-6790, 2004.
18. Antony PA, Piccirillo CA, Akpınarli A, et al. CD8⁺ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4⁺ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591-2601, 2005.
19. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 202(7):907-912, 2005.
20. Wrzesinski C, Paulos CM, Gattinoni L, et al. Hematopoietic stem cells promote the expansion and function of adoptively transferred antitumor CD8 T cells. *J Clin Invest* 117(2):492-501, 2007.
21. Powell DJ Jr, Dudley ME, Hogan KA, et al. Adoptive transfer of vaccine-induced peripheral blood mononuclear cells to patients with metastatic melanoma following lymphodepletion. *J Immunol* 177(9):6527-6539, 2006.
22. Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, et al. WT1 peptide vaccine as a paradigm for "cancer antigen-derived peptide"-based immunotherapy for malignancies: successful induction of anti-cancer effect by vaccination with a single kind of WT1 peptide. *Anticancer Agents Med Chem* 9(7):787-797, 2009.
23. Oka Y, Tsuboi A, Oji Y, et al. WT1 peptide vaccine for the treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* 20(2):211-220, 2008.
24. Oka Y, Tsuboi A, Taguchi T, et al. Induction of WT1 (Wilms' tumor gene)-specific cytotoxic T lymphocytes by WT1 peptide vaccine and the resultant cancer regression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(38):13885-13890, 2004.
25. Noguchi Y, Chen YT and Old LJ. A mouse mutant p53 product recognized by CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):3171-3175, 1994.
26. Nava-Parada P, Forni G, Knutson KL, et al. Peptide vaccine given with a Toll-like receptor agonist is effective for the treatment and prevention of spontaneous breast tumors. *Cancer Res* 67(3):1326-1334, 2007.
27. Boon T and Old LJ. Cancer Tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9(5):681-683, 1997.
28. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, et al. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208, 2006.

29. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4(3):321-327, 1998.
30. Rosenberg SA. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835):380-384, 2001.
31. Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188:22-32, 2002.
32. Simon RM, Steinberg SM, Hamilton M, et al. Clinical trial designs for the early clinical development of therapeutic cancer vaccines. *J Clin Oncol* 19(6):1848-1854, 2001.
33. Weber JS, Hua FL, Spears L, et al. A phase I trial of an HLA-A1 restricted MAGE-3 epitope peptide with incomplete Freund's adjuvant in patients with resected high-risk melanoma. *J Immunother* 22(5):431-440, 1999.
34. Cormier JN, Salgaller ML, Prevette T, et al. Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A. *Cancer J Sci Am* 3(1):37-44, 1997.
35. Salgaller ML, Marincola FM, Cormier JN, et al. Immunization against epitopes in the human melanoma antigen gp100 following patient immunization with synthetic peptides. *Cancer Res* 56(20):4749-4757 1996.
36. Wang F, Bade E, Kuniyoshi C, et al. Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5(10): 2756-2765 1996.
37. Odunsi K, Qian F, Matsuzaki J, et al. Vaccination with an NY-ESO-1 peptide of HLA class I/II specificities induces integrated humoral and T cell responses in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(31):12837-12842, 2007.
38. Ohnishi H, Yasukawa M and Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. *Blood* 95(1):286-293, 2000.
39. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med* 16(5):565-570, 2010.
40. Brenner M. T cell receptors and cancer: gain gives pain. *Nat Med* 16(5):520-521, 2010.
41. Okamoto S, Mineno J, Ikeda H, et al. Improved expression and reactivity of transduced tumor-specific TCRs in human lymphocytes by specific silencing of endogenous TCR. *Cancer Res* 69(23):9003-9011, 2009.
42. Kim SH, Yu SS, Park JS, et al. Construction of retroviral vectors with improved safety, gene expression, and versatility. *J Virol* 72(2):994-1004, 1998.
43. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270:475-480, 1995.

44. Onodera M, Ariga T, Kawamura N, et al. Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91:30-36, 1998.
45. Riddell SR, Elliott M, Lewinsohn DA, et al. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med* 2:216-223, 1996.
46. Heslop HE, Ng CY, Li C, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2:551-555, 1996.
47. Dunbar C, Kohn D. Retroviral mediated transfer of the cDNA for human glucocerebrosidase into hematopoietic stem cells of patients with Gaucher disease. A phase I study. *Hum Gene Ther* 7:231-253, 1996.
48. Toneguzzo F, Hayday AC, Keating A. Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells. *Mol Cell Biol* 6:703-706, 1986.
49. Ohtani K, Nakamura M, Saito S, et al. Electroporation: application to human lymphoid cell lines for stable introduction of a transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I. *Nucleic Acids Res* 17:1589-1604, 1989.
50. Harui A, Suzuki S, Kochanek S, et al. Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol* 73:6141-6146, 1999.
51. Hanazono Y, Brown KE, Dunbar CE. Primary T Lymphocytes as Targets for Gene Therapy. *J Hematother Stem Cell Res* 9:611-622, 2000.
52. Miller AD, Garcia JV, von Suhr, et al. Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* 65:2220-2224, 1991.
53. 渡辺 格、福見秀雄 編集. ウイルスの研究 181, 1984.
54. Weiss R, et al. RNA TUMOR VIRUSES, 901-911, 1982.
55. Kim S, Lee K, Kim MD, et al. Factors affecting the performance of different long terminal repeats in the retroviral vector. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4):1017-1022, 2006.
56. Yu SS, Kim J-M, Kim S. High efficiency retroviral vectors that contain no viral coding sequences. *Gene Therapy* 7:797-804, 2000.
57. Lee J-T, Yu SS, Han E, et al. Engineering the splice acceptor for improved gene expression and viral titer in an MLV-based retroviral vector. *Gene Therapy* 11:94-99, 2004.
58. Miller AD, Buttimore C. Redesign of retrovirus packaging cell lines to avoid recombination leading to helper virus production. *Mol Cell Biol* 6:2895-2902, 1986.
59. 早川堯夫、山崎修道、延原正弘 編集. バイオ医薬品の品質・安全性評価 第2部、第1章、第1節 レトロウイルスベクター, 351-363.
60. Chong H, Vile RG. Replication-competent retrovirus produced by a 'split-function'

- third generation amphotropic packaging cell line. *Gene Therapy* 3:624-629, 1996.
61. Takeuchi Y, Cosset FL, Lachmann PJ, et al. Type C retrovirus inactivation by human complement is determined by both the viral genome and the producer cell. *J Virol* 68:8001-8007, 1994.
 62. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302:415-419, 2003.
 63. Check E. Gene therapy put on hold as third child develops cancer. *Nature* 433:561, 2005.
 64. Commentary from the Board of the European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT) Fourth case of leukaemia in the first SCID-X1 gene therapy trial, and the diversity of gene therapy.
 65. Recommendations of the Gene Therapy Advisory Committee/Committee on Safety of Medicines Working Party on Retroviruses. *Hum Gene Ther* 16:1237-1239, 2005.
 66. Thrasher A and Gaspar B. Severe Adverse Event in Clinical Trial of Gene Therapy for X-SCID. (http://www.esgct.org/upload/X-SCID_statement_AT.pdf) December 18, 2007.
 67. Board of the European Society of Gene and Cell Therapy; Executive Committee of the Clinigene Network of Excellence, Executive of the Consort Integrated Project. Case of Leukaemia Associated with X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Gene Therapy Trial in London. *Hum Gene Ther* 19(1):3-4, 2008.
 68. Williams DA. An international conversation on Stem Cell Gene Therapy. 4th Stem Cell Conference on Stem Cell Gene Therapy, Thessaloniki, Greece, 13-17 September 2007. *Mol Ther* 15(12):2058-2059, 2007.
 69. Fischer A and Cavazzana-Calvo M. Gene therapy of inherited diseases. *Lancet* 371:2044-2047, 2008.
 70. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. *N Engl J Med* 360(5):447-458, 2009.
 71. Considerations from the Gene Therapy Discussion Group meeting June 10, 2004 (Revised in February 2005)
 72. Baum C, Kustikova O, Modlich U, et al. Mutagenesis and oncogenesis by chromosomal insertion of gene transfer vectors. *Hum Gene Ther* 17:253-263, 2006.
 73. Recchia A, Bonini C, Magnani Z, et al. Retroviral vector integration deregulates gene expression but has no consequence on the biology and function of transplanted T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1457-1462, 2006.
 74. Dudley ME, Wunderlich J, Nishimura MI, et al. Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 24:363-373, 2001.
 75. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, et al. A phase I study of nonmyeloablative

- chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 25:243-251, 2002.
76. Schumacher TNM. T-cell-receptor gene therapy. *Nature Rev Immunol* 2:512-519, 2002.
 77. Sauce D, Tonnelier N, Duperrier A, et al. Influence of ex vivo expansion and retrovirus-mediated gene transfer on primary T lymphocyte phenotype and functions. *J Hematother Stem Cell Res* 11:929-940, 2002.
 78. Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nature Rev Cancer* 3:666-675, 2003.
 79. Bollard CM, Aguilar L, Straathof KC, et al. Cytotoxic T lymphocyte therapy for Epstein-Barr virus+ Hodgkin's disease. *J Exp Med* 200:1623-1633, 2004.
 80. Rosenberg SA, Yang JC and Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9):909-915, 2004.
 81. Guidance for Industry Gene therapy Clinical Trials - Observing Subjects for Delayed Adverse Events
 82. Rosenberg SA, Dudley ME. Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14639-14645, 2004.
 83. Cheson BD, Cassileth PA, Head DR, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 8(5):813-819, 1990.
 84. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 21(24):4642-4649, 2003.
 85. Cheson BD, Bennett JM, Kantarjian H, et al. Report of an international working group to standardize response criteria for myelodysplastic syndromes. *Blood* 96(12):3671-3674, 2000.
 86. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, et al. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol* 20(10):2429-2440, 2002.

X.3 検査スケジュール

	一次登録時	採血前 ※1	初回投与 day0		day					2回目投与 day28		day							中止 終了時 day58	研究終了 後の追跡 調査 ※3
			前	後	1	2	3	7	14	前	後	29	30	31	35	44	45	51		
同意取得	●		●																	
被験者登録	●		●																	
被験者背景	●																			
TCR 遺伝子導入 T リンパ球投与				●						●										
WT1 ペプチド投与													●			●				
問診、PS、SpO ₂ 、バイタルサイン	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
感染症検査	●																			
血液検査	●	●	●		●			●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●
PCR 法による WT1 測定	●		●							●									●	
胸部 X 線検査	●		●							●									●	
血液像検査（末梢血）	●		●							●									●	
骨髄検査（実施可能例）			●							●									●	
心臓超音波検査	●		●							●									●	
12 誘導心電図	●		●							●									●	
血中動態測定			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
免疫機能解析			●							●						●			●	
RCR の測定					●														●	●
LAM-PCR			●																●	●
長期保存用検体の採血			●							●									●	
採血量（mL）（免疫機能解析を除く）	17	11	42	60	31	15	15	26	26	37	60	26	26	26	26	26	26	26	47	36
免疫機能解析用採血量（mL）※2			20 ～ 50							20 ～ 50						20 ～ 50			20 ～ 50	
有害事象																				

※1 一次登録と同日に TCR 遺伝子を導入する T リンパ球を採取する場合は、一次登録時の検査にて代用を可能とする。

※2 被験者の Hb 値を考慮したうえで採血量（20mL、30mL、40mL、50mL）を決定する。

※3 1年に1回の頻度で FDA ガイドラインに従い最短15年間にわたり検査を実施する。

X.4 Performance Status (ECOG)

表.8 Performance Status

Grade	Performance Status (PS)
0	無症状で社会活動ができ、制限を受けることなく、発病前と同等にふるまえる。
1	軽度の症状があり、肉体労働は制限を受けるが、歩行、軽労働や坐業はできる。 例えば軽い家事、事務等。
2	歩行や身の廻りのことはできるが、時に少し介助が要することもある。軽労働はできないが、日中の 50%以上は起居している。
3	身の廻りのある程度のことはできるが、しばしば介助が要り、日中の 50%以上は就床している。
4	身の廻りのこともできず、常に介助が要り、終日就床を必要としている。

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

この基準は全身状態の指標であり、骨折や感冒など原疾患以外の疾患により、一時的に活動性が制限されている場合は、それらによる機能低下を排除し評価を行う。

〔出典先 : Am J Clin Oncol 5:649-655, 1982〕

X.5 血液学的効果

急性骨髄性白血病における効果判定基準

	条件										
CRm (分子生物学的完全寛解)	血液学的に CR 又は CRi を満たす例において、白血病細胞特異的と考えられるキメラ遺伝子 mRNA が定量的 RT-PCR 法による検索にて、2 ポイント以上の連続した検体で消失した場合。										
CRc (細胞遺伝学的完全寛解)	血液学的に CR 又は CRi を満たしており、骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて、白血病細胞特異的と考えられる核型異常が消失した場合。										
CR (血液学的完全寛解)	末梢血中に芽球を認めず、骨髓中の芽球<5%、好中球数>1000/ μ l、血小板数 $\geq$ 100,000/ μ l、髄外白血病を認めない。										
CRi (血球回復が不完全な血液学的寛解)	末梢血中に芽球を認めず、骨髓中の芽球<5%、髄外白血病を認めず、好中球数及び血小板数、の両方もしくはどちらかが血液学的寛解の定義（好中球数>1000/ μ l、血小板数 $\geq$ 100,000/ μ l）を満たさない場合。										
PR (血液学的部分寛解)	以下の診断基準に従う <table border="1"> <tr> <th colspan="2">芽球割合</th></tr> <tr> <th>治療前</th><th>治療後</th></tr> <tr> <td>50-100%</td><td>5-25%</td></tr> <tr> <td>10-49%</td><td>治療前の半分以下</td></tr> <tr> <td>5-9%</td><td>部分寛解の判定は行わない</td></tr> </table>	芽球割合		治療前	治療後	50-100%	5-25%	10-49%	治療前の半分以下	5-9%	部分寛解の判定は行わない
芽球割合											
治療前	治療後										
50-100%	5-25%										
10-49%	治療前の半分以下										
5-9%	部分寛解の判定は行わない										

<Response の定義>

以下の全てを Response ありと定義する。

血液学的再発	CR、CRi、CRc、CRm、PR
細胞遺伝学的再発	CRc、CRm
分子生物学的再発	CRm

骨髓異形成症候群における効果判定基準

	条件
CRm (分子生物学的完全寛解)	血液学的に CR 又は CRi を満たしており、MDS クローン特異的と考えられるキメラ遺伝子 mRNA が定量的に RTPCR 法による検索にて、2 ポイント以上の連続した検体で消失した場合。
CRc (細胞遺伝学的完全寛解)	血液学的に CR 又は CRi を満たしており、骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて MDS クローン特異的と考えられる核型異常が消失した場合。
PRc (細胞遺伝学的部分寛解)	骨髓又は末梢血を用いた染色体分析にて、MDS クローン特異的と考えられる核型異常が 50%以上減少した場合。
CR (血液学的寛解)	骨髓所見：芽球<5% (骨髓中の赤芽球が 50%以上の際には、非赤芽球系有核細胞に対する割合で判定する) 末梢血所見：芽球を認めず、形態学的に異常を認めない。 ヘモグロビン濃度>11g/dl、好中球数 $\geq 1,500/\mu\text{l}$ 、 血小板数 $\geq 100,000/\mu\text{l}$ 、髄外所見を認めない
CRi (血球回復が不完全な血液学的寛解)	好中球数、血小板数、及びヘモグロビン値のいずれかが血液学的定義を満たさないが、その他の因子が血液学的寛解の定義を満たす場合。
PR (血液学的部分寛解)	骨髓中の芽球割合が治療前と比較して、50%以上減少した、もしくは FAB 分類上より重症度の低い分類に移行した場合。末梢血所見は CR の定義を満たしていることを必要とする。
HI (血液学的改善)	少なくとも 2 カ月以上、以下の状態を満たす場合に診断する。 「HI-E」かつ、「HI-P」または「HI-N」に該当する場合は「HI」と総合判定する。 ・赤芽球系改善 (HI-E)：治療前ヘモグロビン値が 11g/dl 未満であり、治療後ヘモグロビン値が 1-2g/dl 上昇した場合。治療前輸血依存であった例においては輸血頻度が 50%以上減少した場合 ・巨核球系改善 (HI-P)：治療前の血小板数が 100,000/ μl 未満であった例において、治療前から 50%以上増加した場合。 ・顆粒球系改善 (HI-N)：治療前の好中球数が 1,500/ μl 未満であった例において、治療前値より 50%以上増加した場合。

<Response の定義>

以下の全てを Response ありと定義する。

血液学的再発	CR、CRi、CRc、CRm、PR、PRc、HI
細胞遺伝学的再発	CRc、CRm
分子生物学的再発	CRm

臨床研究ご参加についての説明文書

エムエス ダブリュウティワン エスアイティーシーアール
MS3-WT1 -siTCR ベクターを用いた

ダブリュウティ ティーシーアール ティー
WT1 抗原特異的TCR 遺伝子導入Tリンパ球輸注による
急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する
遺伝子治療臨床研究

この臨床研究の内容は人権と安全性に最大限の配慮をして、当院に設置されている遺伝子治療臨床研究審査委員会において、患者さまの人権が保護され、科学的・倫理的に妥当であることが確認されています。

(遺伝子治療臨床研究審査委員会 承認日： 年 月 日)

第 1.6 版 作成年月日：2012 年 11 月 27 日

目次

1. 臨床研究とは	3
2. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて	4
3. 本臨床研究の方法と目的	4
4. 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間	5
5. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び 他の組織との関わり	5
6. あなたの費用負担について	5
7. 健康被害の補償について	5
8. 新たな情報のお知らせについて	6
9. あなたに守っていただきたいこと	6
10. 保存サンプル及び検体提供に関するお願い	7
11. 個人情報の保護について	7
12. 個人情報の第三者への提供制限について	8
13. 知的財産権の帰属について	8
14. 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について	9
15. あなたの病気について	9
16. 他の治療法について	11
17. 本臨床研究に参加できる方、参加できない方	11
18. 本臨床研究の概要（スケジュール）について	12
19. 本臨床研究の中止について	17
20. 期待される効果と原理について	17
21. TCR ^{テイスター} 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について	19
22. 予想される危険性および副作用	20
23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について	25
24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制	25

1. 臨床研究とは

これまでに多くの病気の原因が解明され、たくさんの「お薬」や「治療法」が開発されました。どの「お薬」や「治療法」も、患者さまに安心して使っていただくためには、効果（有効性）や安全性を確認する必要があります。そのためには、最初に目的とする効果を有する候補物質を探索し、動物を使って有効性や安全性を調べる実験が行われます。動物で有効性と安全性が確認されたうえで、最終的に患者さまに使用していただき、有効性と安全性を検討する必要があります。

新たな「お薬」や「治療法」を患者さまに使用していただき、安全性や有効性を評価することを臨床研究といいます（臨床試験ともいいます）。一般的に臨床試験には、第Ⅰ相試験、第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験があります。それぞれの試験の目的は以下のとおりです。臨床試験は、一般的に第Ⅰ相試験から始め第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験と段階を踏みながら慎重に進んでいきます。このように臨床研究および臨床試験には、研究的な一面があることを十分ご理解ください。

	目的
第Ⅰ相試験	一般的なお薬では、少数の健康な男性もしくは患者さまに使用していただき、安全性と適切な投与量を確認します。 抗癌剤等の副作用が強いと考えられるお薬の場合には、対象となる少数の患者さまに使用していただき、安全性と適切な投与量を確認することがあります。
第Ⅱ相試験	一般的なお薬では、少数で比較的軽症な患者さまに使用していただき、有効性と安全性を確認します。 抗癌剤等の副作用が強いと考えられるお薬の場合には、軽症な患者さまだけではなく、重症な患者さまも対象として、有効性と安全性を確認することがあります。
第Ⅲ相試験	第Ⅱ相試験よりも多数もしくは重症な患者さまに使用していただき、有効性と安全性を確認します。

今回、患者さまに説明する臨床研究は、安全性を調べることを目的とした臨床研究（第Ⅰ相試験）に相当するものです。本臨床研究は、国が定めた指針に基づいて計画され、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会（臨床研究を実施する者から独立した委員会）と国の審議会の審査を受け、承認されたものです。なお、本臨床研究は必ず、患者さまの同意をいただいたうえで行うことが義務付けられています。

なお、本臨床研究は、三重大学大学院医学系研究科 遺伝子・免疫細胞治療学（タカラバイオ株式会社との産学連携講座）を含む複数の医療機関とタカラバイオ株式会社との共同研究に基づいて、三重大学医学部附属病院で実施します。

2. 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて

この臨床研究に参加するかどうかは、あなたの意思で決めてください。たとえ臨床研究への参加を断られても、あなたが不利益を受けることは一切ありません。お断りになられた場合には、その時点において最も良いと考えられる治療を行います。

また、この臨床研究へ参加することを同意された後でも、あなたの意思でいつでも参加を取りやめることができます。中止を希望される場合には、担当医師に申し出てください。その場合でもあなたが不利益を受けることは一切ありません。ただし、^{ティーシーアール}TCR⁺ 遺伝子導入 ^{ティー}Tリンパ球の輸注を受けた後は、あなたの体内から^{ティーシーアール}TCR⁺ 遺伝子導入 ^{ティー}Tリンパ球を取り除くことはできません。また、^{ティーシーアール}TCR⁺ 遺伝子導入 ^{ティー}Tリンパ球輸注の後に本臨床研究への参加の中止を申し出られても、あなたの安全を確認するために必要な検査等を実施することにご協力ください。

3. 本臨床研究の方法と目的

本臨床研究は、所定の条件を満たした急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群の患者さまに対する治療効果を期待して、^{ダブリュウティーワン}WT1⁺ を認識する^{ティーシーアール}TCR⁺ 遺伝子を導入した ^{ティー}Tリンパ球と改変型^{ダブリュウティーワン}WT1⁺ ペプチドを投与し、好ましくない影響が起こっていないか（安全性）、急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群がどの程度良くなったか（有効性）を確認することを目的として行われます。

4. 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間

本臨床研究は、治療困難な非寛解期の急性骨髄性白血病又は治療不応性の骨髄異形成症候群の患者さまを対象に行われます。なお、参加していただく患者さまは、9名を予定しています。

この臨床研究の実施期間は 20__年__月__日～20__年__月__日迄を予定しています。あなたが本臨床研究に参加いただく期間（同意取得から

終了時の検査を終えるまで)は、約 60~90 日間(入院約 1 週間、外来通院約 8 週間)を予定しています(TCR^{ディージーアール} 遺伝子導入 T^{ディ}リンパ球の準備にかかる時間や副作用の有無により変化します)。

5. 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり

この臨床研究の経費の一部には、共同研究先であるタカラバイオ株式会社から提供された資金が使用されています。

6. あなたの費用負担について

臨床研究には、健康保険等の公的な医療保険は適用されません。その代わり、本臨床研究にかかる費用、たとえばレトロウイルスベクターや TCR^{ディージーアール} 遺伝子導入にかかる費用については、本臨床研究を実施する複数の医療機関等が共同で負担し、遺伝子治療臨床研究の安全性を確認するために必要な検査の費用、および入院中の個室使用料等は当院で負担します。

ただし、今回の臨床研究の期間内であっても、この臨床研究と関係のない病気(例えば、高血圧や糖尿病など)に対する治療費は、通常の診療と同様に患者さまの加入している健康保険が適用され、その治療にかかる費用は患者さまの負担となります。

また、臨床研究終了後、年 1 回程度の安全性確認のための来院時の検査費用等に関しても上記が適用されます。

7. 健康被害の補償について

本臨床研究に関連する健康被害が生じた場合には、適切な治療を行います。本臨床研究と健康被害の間に合理的な可能性があり、少なくとも因果関係が否定できないと判断された、健康被害に関する治療については、あなたの負担はありません。なお、本臨床研究との関連が認められない健康被害については、あなたの加入している健康保険を利用し治療していただき、費用についてはあなたにお支払いしていただきたいと考えております。また、本臨床研究に参加することにより期待される効果が得られなかった場合についても、補償の対象とはなりませんのでご了承ください。

健康被害と臨床研究の関連性についての判定は本臨床研究にて、あなたを担当している医師が行い、その判定結果について、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会が承認します。判定結果について異議がある場合には、あなたからの請求により、本遺伝子治療臨床研究を行っている医療機関が共同で設置した「安

全・効果評価・適応判定中央部会」にて再度判定し、当院の遺伝子治療臨床研究審査委員会が承認します。なお、「安全・効果評価・適応判定中央部会」は私達と利害関係はありません。

また、当院に過失がない限り、補償金が支払われないことをご了承ください。

8. 新たな情報のお知らせについて

本臨床研究に参加中、新しい情報（例えば本臨床研究と同様の試験が国内及び海外で行われた場合の結果等）が得られることがあります。このような新しい情報を知ることによって、あなたが本臨床研究への参加をやめるという判断をされるかもしれません。そのため、本臨床研究を継続して参加されるかどうかについて影響を与えると考えられる情報を入手した場合は、できるだけ速やかにお知らせし、本臨床研究に継続して参加されるかどうかについて、担当医師があらためてお尋ねします。

9. あなたに守っていただきたいこと

- ① 病院内の他科や別の病院にて治療を受けている場合や、本臨床研究の途中で病院内の他科や別の病院にて治療を受ける場合は、必ずその旨をお知らせください。あなたの安全のため、病院内の他科や別の病院の先生へ遺伝子治療の臨床研究に参加している旨の情報を提供したり、通院先でどのような治療を行っているか情報を提供していただく場合があります。しかし、いずれの場合にも、あなたに御了承をいただいたうえで行います。
- ② お薬の種類によっては副作用が起こりやすくなったり、本臨床研究に影響を及ぼす可能性がありますので、新たにお薬の服用を開始される場合には、担当医師へお伝えください。
- ③ 担当医師の指示に従い、定められた来院日には必ず来院してください。その際には診察や定められた検査を行います。どうしても来院できない場合には、できるだけ早く担当医師にお知らせください。
- ④ 本臨床研究期間中、今までと比べて身体の調子がおかしいと感じたときは、来院日まで我慢せず担当医師等に相談したり、当院（通院困難な場合には近隣の医療機関）を受診してください。
- ⑤ 本臨床研究での^{ティ-シーアール}TCR 遺伝子導入^{ティ-}Tリンパ球による生殖器や胎児への影響に関する十分な検討がなされておりません。そのため、本臨床研究参加から終了後5年間は避妊することをお願いします。

10. 保存サンプル及び検体提供に関するお願い

あなたから採取した血液等の検体について、この臨床研究で予定された検査に使用された後は、一定期間保存したいと考えております。この検体（保存サンプル）は、将来予期せぬ副作用などが発生した際に原因を確認するために必要な検査に使用されます。保存期間は10年間を予定しています。保存サンプルは匿名化され、保存サンプルから個人が特定されることはありません。また、保存期間を超えた保存サンプルは自動的に破棄されますが、副作用が発生し検査をさらに追加する必要がある場合には保存期間を延長する場合があります。

また、本臨床研究のために、あなたからいただいた細胞や組織、それらから作製した^{ライナー}T^{CR} 遺伝子導入^{ライナー}Tリンパ球は、遺伝子治療の研究を行ううえで非常に貴重なものです。もし、投与や検査の後に使用されなかった検体がある場合には、院内もしくは三重大大学の細胞調製施設にて保管し、本臨床研究の更なる発展や、新たな診断法や治療法の開発のために使用させていただきたいと考えております。また、万が一あなたに何らかの副作用が発生し、担当医師が必要と判断した際には、原因を解明するために長期保存している検体とあわせて使用したいと考えております。いただいた検体等を使用する際には、あなたに新たな肉体的負担や金銭的負担を求めることはございませんし、あなたからいただいた検体に関する情報は、あなたの個人情報と同様に適切かつ厳重に管理されます。

もし、このお願いを断られたとしても、臨床研究に参加することは可能ですし、何ら不利益を被ることはありません。

また、同意をいただいた後でも、同意を撤回したい場合には、その旨を担当医師に申し出ていただければ、検体の保存を中止し破棄するなど、適切な対応をとります。

11. 個人情報の保護について

あなたの診療録をはじめとする個人情報は、「独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律」（平成15年5月30日法律第59号）その他関係法令に定めるものの他、「国立大学法人三重大学個人情報保護規程」（平成22年4月1日施行）および「三重大学医学部附属病院の保有する個人情報管理規程」（平成17年4月1日施行）に従い、適切に管理、保護されます。

本臨床研究で扱うあなたの個人情報は、主として病状の経過観察、緊急事態発生のための連絡等、あなたの安全を守るために使用します。さらに、本臨床研究に参加される全ての患者さまの安全を守るため、本臨床研究に参加してい

る医療機関へ、あなたの臨床研究に関する情報を提供します。情報提供にあたっては、本臨床研究に関与しない第三者に情報漏洩しないよう十分に注意したうえで行います。また、あなたの安全を守るために、本臨床研究に参加している全ての患者さまの臨床研究に関する情報を収集します。

その他、特別な目的で使用する場合には、事前にあなたに説明し、ご了解を頂いてから使用します。また、本臨床研究の結果を検討する時や、医療向上等を目的に本臨床研究の成績を公表・公開する場合には、個人を特定できない形、すなわち個人情報を保護して公開します。

12. 個人情報の第三者への提供の制限について

国の審議会における審査の過程において、厚生労働省の担当官および審議会の委員や、当院の倫理委員会における審査の過程において、審査の客観性を保つために当院以外の外部委員が、あなたの個人情報を取り扱うことがあります。また、本臨床研究の客観性を保証するために当院以外の外部の監査担当者があなたの診療記録を閲覧することがありますので予めご了承ください。なお、本臨床研究を共同で実施する医療機関の研究者等が安全に臨床研究を実施するために、あなたの診療記録等を閲覧することがあります。その際には、あなたの個人情報は本臨床研究に関与しない第三者へ漏洩しないよう細心の注意を払い取り扱われます。

本臨床研究では、タカラバイオ株式会社が外部協力者としてレトロウイルスベクターの製造や^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー} Tリンパ球の調製技術の提供・助言と、遺伝子導入細胞製剤の体内動態検査、RCR 検査及び LAM-PCR に関する技術提供に限定し、間接的に関与しています。調製された^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー} Tリンパ球をあなたに投与した場合の安全性や機能に関する記録は、タカラバイオ株式会社の担当者が閲覧する可能性があります。ただし、個人が特定できないよう被験者識別コードを用いて個人情報を匿名化します（被験者識別コードから患者さまを特定する情報については、担当医師が厳重に管理します）。

13. 知的財産権の帰属について

この臨床研究の結果により、特許権などの知的財産権が生じる可能性があります。その権利はあなたではなく、この臨床研究の実施機関、共同研究機関などに帰属します。

14. 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について

本臨床研究で取り扱う個人情報について、あなたは開示、訂正、利用停止を求めることができます。個人情報に関する疑問等がある場合は、担当医師にお問い合わせください。お申し出に応じ、その手続きに関する詳細を説明します。

また、担当医師とは別に個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口もございますので、疑問等がございましたらお問い合わせください。

【個人情報に関する相談窓口】

三重大学医学部附属病院 個人情報相談窓口

- ・診療に関すること：医療サービス課 診療案内係（TEL：059-231-5072）
- ・教育・研究に関すること：総務課 企画第1係（TEL：059-231-5261）

15. あなたの病気について

【急性骨髄性白血病について】

急性骨髄性白血病とは、骨髄中の血液を作り出す造血幹細胞と呼ばれる細胞が腫瘍化し、異常な血液細胞（白血病細胞と言います）を大量に作り出す病気です。異常な血液細胞が大量に作り出されることにより、正常な血液の産生が抑制されます。また、異常な血液細胞は、血液本来の機能を有していないため、貧血や出血が止まらなくなったり、感染症にかかりやすくなったりします。白血病の発見が遅れるほど異常な血液細胞は増殖し、肝臓や脾臓、リンパ節等の重要な組織へ浸潤します（白血病細胞が臓器へ転移することを浸潤と言います）。白血病細胞が浸潤した臓器により様々な症状が出現します。

白血病の治療は抗がん剤等のお薬により体中の白血病細胞全てを退治することを目標としております。ただし、これらの治療法は白血病細胞だけではなく、正常な造血幹細胞の機能を抑制させるため、バランスをとりながら治療を行うこととなります。そのため、白血病の患者さまに対して、最初は完全寛解を目指して治療を行うこととなります。完全寛解とは白血病細胞の数を減らし、白血病細胞が見当たらなくなった状態のことを言います。ただし、完全寛解となったとしても、治療を継続しなければ身体の中に残ったごくわずかな白血病細胞が再び増殖し白血病を再発することも知られております。そのため、完全寛解したとしても、治療を継続する必要があります。（このことを地固め療法とよびます。）現在の医学技術では、患者さまの体内から白血病細胞が完全に退治できたかを判定する方法がありませんので、完全寛解になってからしばらくの間、

地固め療法を行った後に、3～5年間経過観察を行い、再発がなければ治癒したと判断します。

また、治療法の一つに造血幹細胞移植という方法がありますが、通常の抗がん剤等の治療では効果のない患者さまに対して実施が検討されます。ただし、造血幹細胞移植は拒絶反応等の副作用も強く、患者さまと移植する造血幹細胞の型が一致するか等の制約もあるため、全ての患者さまで行える治療法ではありません。

【骨髓異形成症候群】

骨髓異形成症候群とは、骨髓中の血液を作り出す造血幹細胞と呼ばれる細胞に異常が起こり、機能しない血液が大量に作り出されます。白血病と異なる点は作り出された血液の寿命は非常に短く、骨髓から出る前に死に絶えるという点です。ただし、治療を行わなかった場合は、異常な造血幹細胞に別の異常が起こり、今度は骨髓から出ても生きながらえるようになり、その結果、白血病と同様に異常な血液細胞が観察されるようになります。このことを白血病化と言います。そのため、お薬により白血病化への移行を阻止したり、異常な血液細胞の増加によって減少した正常な血液細胞を輸血により補充することを目的とし治療します。

骨髓異形成症候群の根本的な治療は造血幹細胞移植のみと考えられています。しかし、造血幹細胞移植を行うには年齢的な制限や、移植するための型（組織適合型、HLA）が合う造血幹細胞やその提供者を必要とする等の制約が多く、移植後も副作用等により亡くなる可能性もありますので、全ての患者さまに行える治療法ではありません。

検査の結果、あなたは

- ☐ 造血幹細胞移植の適応がなく、寛解導入が難しい段階の急性骨髓性白血病（非典型白血病、骨髓異形成症候群からの移行を含む）

または、

- ☐ 造血幹細胞移植の適応がなく、既存の治療法では十分な治療効果を得ることが難しい段階の治療不応性骨髓異形成症候群であることがわかりました。

16. 他の治療法について

あなたの病気に対して、これまでに化学療法等の治療を行いましたが、根治には至っておりません。患者さまによって状態が異なるため、現時点ではどの治療法を用いることが最も患者さまにとって有益であるか、結論は出ておりません。また、病状の経過によっては造血幹細胞移植を受けることも可能です。更に新しい治療法としては、分子標的治療の開発が期待されているところですが、まだ確立された治療法ではありません。

その他、最良支持療法という症状緩和を目指す治療（栄養管理やQOL^{キューオーエル}向上のための緩和医療）を受けることもできます。

17. 本臨床研究に参加できる方、参加できない方

本臨床研究に参加できる方は以下の全ての条件を満たす患者さまです。

- ① a) 再発期または初回寛解導入不能な急性骨髄性白血病（非定型白血病と骨髄異形成症候群よりの移行例を含む）で造血幹細胞移植適応がない方
b) 治療困難な予後不良の骨髄異形成症候群で造血幹細胞移植適応がない方
- ② HLA^{エイチエルエイ エイ} -A*24:02（白血球の型）陽性の方
- ③ 腫瘍細胞に^{ダブリュウティーワン} WT 1 の発現が確認されている方
- ④ 日常生活の半分以上は起床している方。
(^{パフォーマンス ステータス} Performance Status 0～2 に該当する方)
- ⑤ 本臨床研究参加時点の年齢が20歳以上の方
- ⑥ 細胞採取時に前治療（化学療法等）終了から4週間以上の経過が見込まれる方
- ⑦ 主要な臓器（心、肺、肝、腎等）に高度な障害がなく、臨床検査に大きな異常値がない方
- ⑧ 治療内容を理解し、本人の自由意思による同意を文書で得られた方
- ⑨ 最小輸注量の^{ティーシーアール} TCR 遺伝子導入^{ティー} Tリンパ球が得られた方（二次登録時）

本臨床研究に参加できない方は以下のいずれかの条件に該当する患者さまです。

- ① 以下の重篤な合併症を有する方
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞、心不全
 - ・コントロール不良な糖尿病又は高血圧症
 - ・活動性の感染症
 - ・^{かんしつせい} 間質性肺炎又は^{はいせんいしょう} 肺線維症

・活動性の自己免疫疾患

- ② 重篤な過敏症の既往歴を有する方
- ③ B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIV^{エイチアイファイ}（ヒト免疫不全ウイルス）、HTLV-1（ヒトTリンパ好性ウイルス）のいずれかに感染している方
- ④ 一次登録時：同意取得後、4カ月以上の生命予後が見込めない方
二次登録時：T^{ティー}CR^{シーアール} 遺伝子導入Tリンパ球投与後3カ月以上の生存が見込めない方
- ⑤ コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水^{しんのう}を有する方
- ⑥ 制御困難な脳内転移を有する方
- ⑦ 免疫抑制剤又は一定量以上の副腎皮質ステロイド剤を使用している方
- ⑧ 本臨床研究参加への同意に影響を及ぼすような精神疾患、薬物依存症等の疾患を有する方
- ⑨ 妊娠中、授乳中、妊娠している可能性のある女性又は妊娠を希望している女性の方。又は挙子希望の男性の方（ただし、遺伝子治療前に精子を凍結保存し、その精子を用いて子供をもうける場合はこの限りではありません）
- ⑩ 一次登録前4ヶ月以内に他の臨床試験（臨床研究）に参加している方
- ⑪ 過去に同種造血幹細胞移植を受けた方
- ⑫ 投与するT^{ティー}CR^{シーアール} 遺伝子導入Tリンパ球による副作用が予測される方
- ⑬ 今回、治療の対象となる疾患以外の悪性腫瘍を有する方
- ⑭ その他、総括責任者又は分担研究者が不適当と認めた方

18. 本臨床研究の概要（スケジュール）について

あなたが先に説明した「参加できる条件」に当てはまる場合、以下に示した方法に従って本臨床研究を実施します。

第Ⅰ段階：T^{ティー}リンパ球へのT^{ティー}CR^{シーアール} 遺伝子の導入

- 1) 腫瘍細胞に癌抗原（本臨床研究で標的としている癌抗原を「WT1^{ダブリュウティーワン}」といいます）が発現し、白血球の型が「HLA-A*24:02^{エイチエルエー エー}」である患者さまから注射器にて血液を最大で100ml採血します。

HLA^{エイチエルエー}（human leukocyte antigen：ヒト白血球抗原）について

HLA^{エイチエルエー}とは白血球の型のことで、細胞の表面に存在し自分の体と外部から侵入した細菌等の異物を区別して認識する重要な抗原（免疫反応を引き起こさせる物質）です。主要なHLA^{エイチエルエー}の型として、A抗原、B抗原、DR^{ディーアール}

抗原があります。さらに^{エー}A抗原、^{ビー}B抗原、^{ディーアール}DR抗原は細分化されます。日本人のおよそ60%が^{エイデルエー}HLA^{エー}-A*24:02を有しています。

- 2) 血液は三重大学内の細胞処理センターへ運ばれ、血液に異物が混入しないよう、細心の注意を払い、血液から^{ディー}Tリンパ球が選別されます。その後、^{ダブリュウディーワン}WT1^{ディー}を認識するアンテナ（これを「^{ディー}T細胞受容体：^{ディーシーアール}TCR^{ディー}」といいます）を^{ディー}Tリンパ球に作らせるために、人工的に作製した遺伝子を^{ディー}Tリンパ球に導入します。遺伝子を^{ディー}Tリンパ球に導入するために、レトロウイルスベクターと呼ばれる運び屋を利用します。

レトロウイルスベクターについて

ベクターとは『運び屋』という意味で、細胞へ人為的に^{ディーエヌエイ}DNA（遺伝情報を担う物質）を入れる際に用いるウイルス等を指します。レトロウイルスは遺伝子を導入するベクターとして最も早く応用が進んだウイルスです。レトロウイルスを用いて遺伝子を細胞に導入することで、導入した遺伝子が標的細胞の染色体（^{ディーエヌエイ}DNAが小さく折りたたまれたもの）に組み込まれるため、細胞が二つに増える時に導入した遺伝子は複製され、どちらの細胞にも確実に伝達されます。そのため、長期間にわたり導入した遺伝子を安定して発現させることが可能となります。

- 3) 患者さまに投与する細胞の調製が完了後一部を抜き取り、調製した細胞に異物が含まれていないか等、品質の確認を行います。確認結果が得られるまで、患者さまに投与するものは冷凍庫にて保存します。そのため、投与可能になるまで、約3週間程度かかることをご了承ください。調製した細胞を投与する予定の日より4週間以内に白血病に対する治療等を行うと遺伝子治療による効果や安全性を確認できなくなるため、原則として無治療で経過を観察させていただきます。ただし、患者さまの状態によっては担当医師の判断により何らかの治療が行われる場合があります。さらに、投与の前に患者さまの身体の状態が定められた基準を満たすことを確認します。細胞調製の結果、予定していた細胞量が得られなかったり、品質に問題があったりするなど、定められた基準を満たしていないことが判明した場合には、患者様の身体の状態等を考慮したうえで、再度採血を行うことにご了承いただければ、再び細胞調製を行うことも可能です。

また、細胞の調製が完了し投与するための品質を満たしていたとしても、患者さまの身体の状態が悪く投与の基準を満たさない場合は、投与ができなくなることをあらかじめご了承ください。

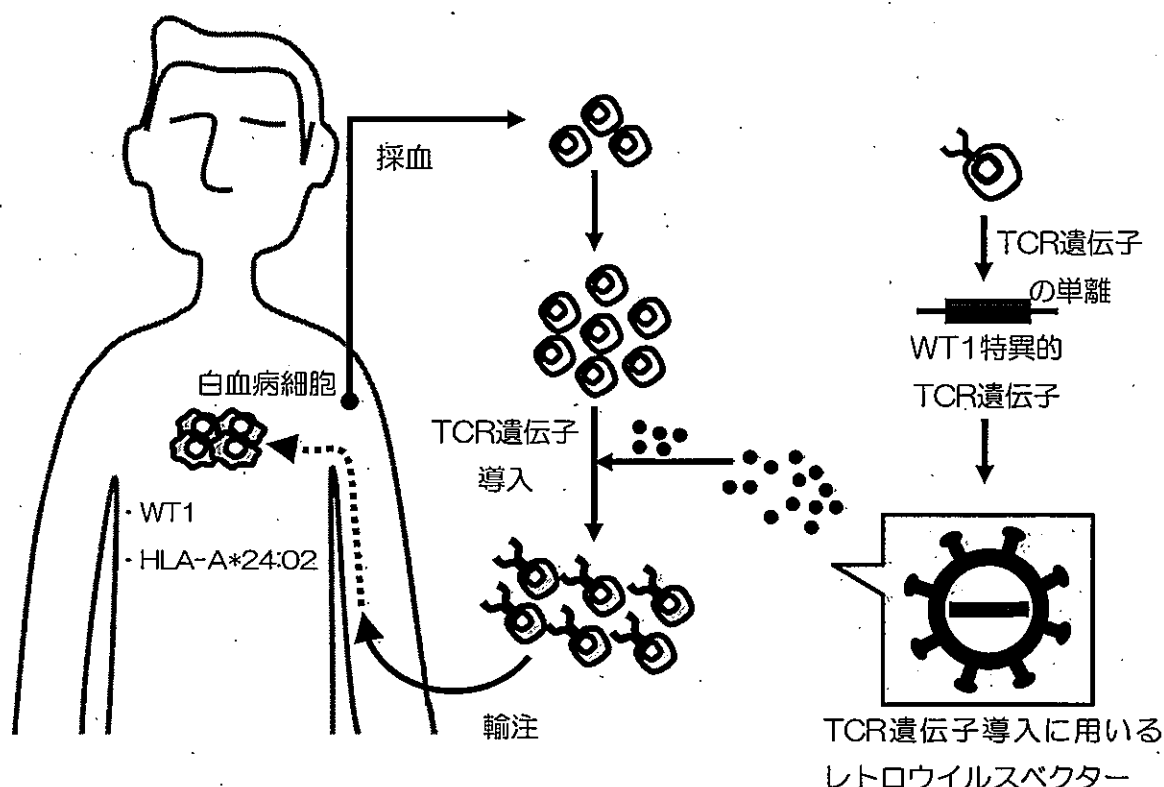


図 1 遺伝子治療臨床研究の概要

第Ⅱ段階：^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球の投与

- 4) ^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球を2回投与しますが、^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球投与から最低5日間は、安全性を確認するために入院していただき各種検査を受けていただくことになります（患者さまの状態によっては、予定よりも長く入院していただくこともあります）。特に、今回使用するレトロウィルスベクターは患者さまの体内で増殖しないように作られています。変異により増殖能力を持つレトロウィルスが患者さまの血液中出现する可能性は否定できません。国の指針等により増殖能力を有するレトロウィルスが出現していないことを確認できるまで、外部環境中にレトロウィルスが放出される可能性を最小限にすることが規定されていますので、初回の^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球投与後、最低3日間は個室に

入院していただく必要があります。また、その個室入院期間中には個室外に出る自由が制限されること、検査等のために個室外に出る際にはマスク及びガウンの着用が義務付けられること、および排泄物が特別な消毒をされること等の措置にご協力していただく必要があります。

なお、現時点では安全かつ有効な投与量が不明であり、適切な投与量を定めるために、低用量、中用量、高用量の3段階の投与量が設定されています。具体的な投与量については以下の表にてご確認ください。患者さまの安全のため、少ない投与量であるグループ1から順に患者さまの登録が行われ、グループ1の投与量が安全であると判断されれば、グループ2の投与量にて投与が可能となり、グループ2の投与量が安全であると判断されればグループ3の投与量にて投与が可能となります。

	初回投与量	2回目投与量
グループ1	2×10^8 個 (2 億個)	2×10^8 個 (2 億個)
グループ2	1×10^9 個 (10 億個)	1×10^9 個 (10 億個)
グループ3	5×10^9 個 (50 億個)	5×10^9 個 (50 億個)

もし、副作用が発生した場合には、適切な処置を行います。また、各グループ3人のうち1人でも重い副作用（重篤な有害事象といいます）が、発生した場合には、適切な治療を行うとともに、さらに詳しく安全性を確認するため、重い副作用が発生した患者さまと同じ細胞数で新たに3人の患者さまに対して投与が行われます。もし、同じグループで2人以上に重い副作用が発生した場合には、その細胞数では重い副作用が起こりやすいものと判断し臨床研究は中断されます。

あなたはグループに振り分けられ、本臨床研究にご協力いただくこととなります。

※ただし、採取した細胞数が少なかったり、採取した細胞の増殖が当初の予定よりも悪かった場合には、投与する細胞数が少なくなる場合があります。また、患者さまの身体の状態等を考慮したうえで、再度採血を行うことにご了承いただければ、再び細胞調製を行うことも可能です。

第Ⅲ段階：改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチドの投与

- 5) 投与した^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ダブリュウティーワン}Tリンパ球を活性化（あるいは増殖）させることを期待し、改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチド（ペプチドとは蛋白質を小さく分解したもので、改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチドは9個のアミノ酸からできています）を1回量^{マイクログラム}300^{マイクログラム}μg（1^{マイクログラム}μgは100万分の1^{グラム}g）、2回目の^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ダブリュウティーワン}Tリンパ球投与から2日後および16日後の計2回投与します。また、投与の際にはさらなる効果を期待し、改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチドにモンタナイド（下記参照）とよばれる物質を混合し投与します。

モンタナイドについて

モンタナイドには植物由来の界面活性剤と鉱物油が含まれており、投与する物質（本臨床研究では改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチド）の免疫反応を増強すると考えられております。また、モンタナイドを使用することにより改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチドが注射した部位に留まりやすくなり、長時間にわたり効果の持続が期待されます。

- 6) 改変型^{ダブリュウティーワン}WT1^{ティー} ペプチドにより活性化された^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ダブリュウティーワン}Tリンパ球が、白血病細胞、骨髄異形成症候群の細胞を攻撃・破壊することが期待されます。

第Ⅳ段階：臨床研究終了後

- 7) 本臨床研究は、^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ダブリュウティーワン}Tリンパ球投与から58日後に終了を予定しています。また、遺伝子治療は長期にわたる安全性が確立しておりませんので、最短でも15年間は年に1回程度は安全性の確認を目的として、投与した^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ダブリュウティーワン}Tリンパ球の生存確認、および新たな癌の発生の有無や増殖能を持つレトロウイルスの有無について調べるため、来院していただくことにご協力ください。

なお、本臨床研究の検査の一部は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にて行われますが、検査に用いた検体から患者さま個人を特定できないよう、特に注意を払い検体の輸送及び検査が行われます。

	一次登録	採血前	初回投与 day0		day						2 回目投与 day28		day								中止 終了時 day58	終了後の 追跡調査
			前	後	1	2	3	7	14	前	後	29	30	31	35	44	45	51				
同意取得	●		●																			
個室入院			←→																			
入院			←→						←→													
細胞投与			●							●												
ペプチド投与												●			●							
問診	●	●	●		●	●	●	●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
感染症検査	●																					
血液検査	●	●	●		●			●	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
画像検査	●		●							●										●		
血液像検査（末梢血）	●		●							●										●		
骨髄検査（実施可能例）			●							●										●		
心電図	●		●							●										●		
長期保存用検体の採取			●							●										●		
血中動態測定及び 免疫機能解析等			●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	
採血量（mL） （免疫機能解析除く）	17	11	42	60	31	15	15	26	26	37	60	26	26	26	26	26	26	26	26	47		
免疫機能解析用 採血量（mL）※1			20 ～ 50							20 ～ 50						20 ～ 50				20 ～ 50	36	
有害事象			←→																			

表 1 遺伝子治療臨床研究の検査・観察のスケジュール

19. 本臨床研究の中止について

あなたに本臨床研究継続参加の意思があったとしても、以下の場合には本臨床研究を中止させていただきます。中止時には、必要な検査・観察を行うとともに、有害事象の発現や対象疾患の悪化により中止した場合には、速やかに適切な処置を行います。また、有害事象については安全性が確認されるまで追跡調査が行われることをご了承ください。ただし、^{ティーシーアール}TCR 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球を投与した後は、中止後もあなたの安全を確保するため、1年に1回の頻度で来院していただき、安全性に関する検査を実施することにご了承ください。

- 1) 本臨床研究開始後に対象として不適格であることが判明した場合
- 2) 有害事象により本臨床研究の継続が困難な場合
- 3) 対象疾患の悪化により本臨床研究の継続が困難な場合
- 4) 担当医師が本臨床研究の中止が必要と判断した場合

20. 期待される効果と原理について

近年、癌細胞の表面に正常な細胞とは異なる“目印”が存在することが解明されました（この目印を「癌抗原」といいます）。また、この癌抗原を認識して、

癌細胞を攻撃・破壊する細胞（この細胞を「細胞傷害性^{ティー}Tリンパ球」といいます）が体内に存在することも証明されました。

本臨床研究では、患者さま自身の血液を採血し、採血した血液中に含まれる細胞傷害性^{ティー}T細胞に^{ダブリュウティーワン}WT1とよばれる癌抗原を認識するために必要な「アンテナ（これを「T細胞受容体：TCR^{ティーシーアール}」といいます）」であるTCR^{ティーシーアール}遺伝子を導入します。その後、点滴により患者さまの体内にTCR^{ティーシーアール}遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球を戻すことにより、急性骨髄性白血病または骨髄異形成症候群に対する治療効果が期待されます。また、本臨床研究では^{ダブリュウティーワン}WT1癌抗原を認識するTCR^{ティーシーアール}遺伝子を導入する際に、患者さまのリンパ球がもともと持っている別のアンテナ（すなわち導入するTCR^{ティーシーアール}とは別の種類のTCR^{ティーシーアール}）を減らす工夫が施してあります。この工夫では導入するTCR^{ティーシーアール}以外のTCR^{ティーシーアール}遺伝子を選択的に妨害する^{アールエヌエーアイ}RNAiというRNA配列を遺伝子導入する技術が用いられています。この工夫により、^{ダブリュウティーワン}WT1癌抗原を認識するTCR^{ティーシーアール}の発現が高まり、TCR^{ティーシーアール}遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球が目的とする癌細胞を効率よく攻撃・破壊することが期待できます。また正常な細胞への攻撃・破壊を抑制する効果も期待されます。

^{ティー}Tリンパ球について

血液は、血漿という液体成分と血球という細胞成分から構成されており、血球には赤血球、白血球、血小板の3種類の細胞が含まれています。白血球にはさまざまな種類があり、その中の一つであるリンパ球は、白血球の約25%を占めています。さらに、リンパ球は免疫系にかかわる^{ビー}Bリンパ球、^{ティー}Tリンパ球等から構成されています。

^{ティーシーアール}TCRについて

^{ティー}Tリンパ球とは、例えば癌細胞のような標的細胞を攻撃する役割と、抗体（免疫反応に関連する物質）の産生を調節する役割を担う重要な細胞であり、免疫系の司令塔的な役割を担っています。^{ティー}Tリンパ球の表面に出ている、抗原を認識するためのアンテナを^{ティー}T細胞受容体（TCR^{ティーシーアール}）といいます。

^{ダブリュウティーワン}WT1について

癌抗原の一つである^{ダブリュウティーワン}WT1は白血病細胞に発現していることが報告されており、白血病の発症や進展に大きく関与していると言われています。本臨床

研究にて使用する^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子導入^{ディー}Tリンパ球は、白血病細胞に^{ダブリュティーワン}WT1^{ダブリュティーワン}が発現していることにより治療効果を発揮すると考えられていますので、本臨床研究に参加していただくためには、白血病細胞に^{ダブリュティーワン}WT1^{ダブリュティーワン}が発現していることを調べる必要があります。しかし、^{ダブリュティーワン}WT1^{ダブリュティーワン}の量を直接調べる方法がないため、^{ダブリュティーワン}WT1^{アールエヌエイ}のもととなるRNAとよばれる物質の量を測定することで^{ダブリュティーワン}WT1^{ダブリュティーワン}の量を推定しています。

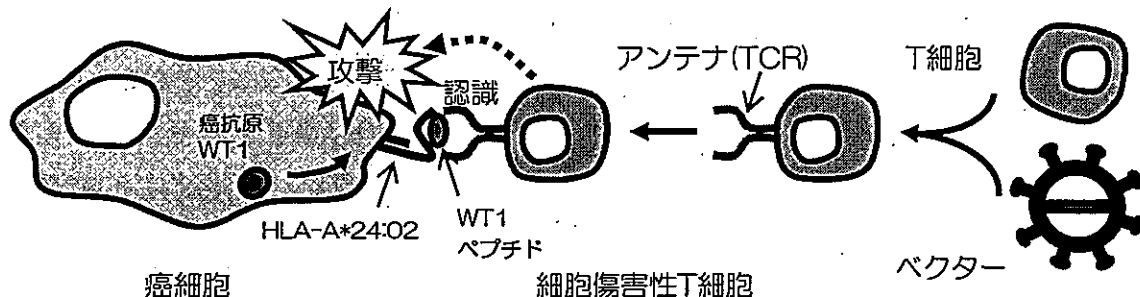


図2 細胞傷害性T細胞による癌抗原の認識

21. ^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子治療臨床研究の海外での状況について

アメリカの国立衛生研究所において、進行性の転移性悪性黒色腫（メラノーマと呼ばれる皮膚癌の一種です）の17例に対して臨床試験が行われ、2006年にその結果が報告されました。悪性黒色腫に特有な「^{マート}MART-1」と呼ばれる癌抗原を認識する^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて^{ディー}Tリンパ球に遺伝子導入後、被験者へ投与したものです。この臨床試験において、^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子導入^{ディー}Tリンパ球を投与したことによる大きな副作用は認められませんでした。また、2例では、投与後1年を超えても^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子導入^{ディー}Tリンパ球が血液中に非常に高い水準で維持され、癌の明らかな縮小が観察されました。なお、この臨床試験の後に行われた、^{マート}MART-1抗原や^{ジーピー}gp100抗原との反応性をより強くした^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子を用いた臨床試験では、目および耳に一時的な副作用が発生したと2009年に報告されています。

ただし、体外にて^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子を被験者本人の細胞に導入してから患者さまの体内へ戻す臨床試験は、悪性黒色腫を対象とした上に述べる試験以外には報告がなく、悪性黒色腫以外の癌にどの程度効果があるかは未知数です。また、これまでに行われてきた臨床試験と今回の試験は条件（標的となるがん抗原、導入された^{ティーシーアール}TCR^{ディー}遺伝子、^{ティーシーアール}TCR^{ディー}に対して抗原ペプチドを提示する^{エイチエルエー}HLA分子の種類、投与されたペプチドの種類など）が異なるために、安全性や効果

の程度が異なる可能性があります。

また、今回使用するレトロウイルスベクターを用いて^{ティーツー}TCR^{ティーツー}遺伝子を導入した細胞を人に投与することは、今回の試験が初めてです。

22. 予想される危険性および副作用

1) レトロウイルスベクターを用いることによる危険性

レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、現在までアメリカを中心とした全世界で280件以上実施されています。しかしながら、レトロウイルスベクターによって導入された遺伝子が、^{ティーツー}Tリンパ球の染色体に組み込まれたときに悪影響を及ぼす可能性は皆無とは言えません。そのため、あらかじめ定められた遺伝子治療についての規則やガイドラインに従い、レトロウイルスベクターの安全性と品質の管理が行われています。ただし、現在の科学技術では、レトロウイルスベクターを用いることにより発生する副作用および危険性を完全に排除することはできませんので、考えられる副作用および危険性について、詳しく説明します。

第1点目は、レトロウイルスベクターの無秩序な増殖という問題です。今回の遺伝子治療に使用するレトロウイルスベクターは、一度細胞に感染すると他の細胞には感染しないように、安全性を高める工夫が施されています。しかし、何らかの理由によってレトロウイルスベクター自身が増殖を始め、身体に悪影響を引き起こす可能性は皆無とはいえません。この危険性を可能な限り取り除くために、あらかじめ定められた品質規格に合格した^{ティーツー}TCR^{ティーツー}遺伝子導入^{ティーツー}Tリンパ球のみが投与されます。また、投与後も体内で増殖性ウイルスが発生していないことを確認するため、定期的に検査を行います。

第2点目は、「挿入変異」といわれる、導入する遺伝子が細胞の染色体に組み込まれる際に起こる可能性のある問題です。染色体には、多数の遺伝子が並んでいます。レトロウイルスベクターは導入する遺伝子を染色体のいずれかの場所に組み込みます。ただし、組み込む場所をあらかじめ指定することができません。そのため、組み込まれる場所によっては、大切な遺伝子を壊したり、他の遺伝子に悪い影響を与えたりして、遺伝子導入した細胞を癌細胞に変えてしまう危険性があります。通常、染色体には、癌細胞となる遺伝子や癌の発生を抑える働きをする遺伝子が含まれていますが、遺伝子導入によってこれらの遺伝子の働きに何らかの影響が起きて、正常な細胞が癌化へと進む可能性があります。一般的には、1つの遺伝子に対して影響が生じただけでは、癌化する

可能性は極めて低いと考えられていますが、その危険性は完全には否定できません。特に「挿入変異」による癌化の可能性については、極めて大切なことで、すのでさらに詳しく説明します。

Ⅹ^{エックス}連鎖重症複合性免疫不全症（遺伝的に身体の抵抗力が弱く、細菌やウイルスにより重症の感染症を起こしやすい病気）という先天性の病気の乳幼児 11 例に対して、遺伝子治療の臨床研究が行われました。この遺伝子治療では 11 例中 9 例で治療が成功し、当初は遺伝子治療の最大の成功例として注目を集めました。しかし、その後 2 例が白血病を発症（治療後 30 又は 34 ヶ月後）したという報告がされ、解析の結果、遺伝子治療による「挿入変異」が白血病の原因と考えられました。この白血病発症の原因として、特定の癌遺伝子の近くにレトロウイルスベクターの遺伝子が挿入され、その結果、この癌遺伝子が活性化され、細胞が腫瘍性に増殖した可能性が考えられています。さらに、レトロウイルスベクターで導入した遺伝子の性質が、細胞の増殖を調節する遺伝子であったため、白血病発症の危険性をさらに高くしたと考えられています。この報告により、同様の遺伝子治療臨床研究を行っていたアメリカでは一時中断し、専門家等による公聴会で議論され、この症例に関する内容を臨床研究に参加している方やそのご家族に正しく伝えたいと再開することとなりました。しかし、上記の臨床研究で 3 例目の白血病発症（治療後 33 ヶ月後）の報告とともに、白血病発症 1 例目の方が白血病によって亡くなられたという報告がありました。その後、4 例目の白血病発症の報告がされました。なお、別のグループもⅩ^{エックス}連鎖重症複合性免疫不全症に対して、同様の遺伝子治療臨床研究を行っていましたが、治療を受けた 10 例中 1 例で白血病を発症したことが報告されました。

また、慢性肉芽腫症（好中球が正しく機能しないため重症な細菌・真菌性感染症を反復して発症する先天性免疫不全症）に対して、レトロウイルスベクターを用いて、遺伝子治療が行われました。この遺伝子治療では、2 例で、骨髓異形成症候群という前白血病状態の発症が報告されています。一方、アデノシンデアミナーゼ欠損症（アデノシンデアミナーゼという酵素が先天的に欠けているため血液中の正常に働くリンパ球が減少し、感染症が発症しやすくなる病気）に対して、レトロウイルスベクターを用いて欠けている遺伝子を導入する遺伝子治療では、10 例中 8 例で遺伝子治療の有効性が確認されるとともに、癌化は見られなかったと報告されています。このように、レトロウイルスベク

ターによる癌化の可能性は、対象となる病気、遺伝子を挿入する細胞、ベクターの種類等によって大きく異なっています。ちなみに、本研究で行うような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癌化の報告はありません。

上記の先天性免疫不全症以外のレトロウイルスベクターを使用する遺伝子治療では、白血病発症の頻度は比較的低いと考えられ、その危険性について患者さまに十分に説明したうえで実施してもよいとの決定が各実施国の所轄官庁からなされています。日本においても同様の状況で、実施が承認されているレトロウイルスを使用する遺伝子治療臨床研究のうち、 $X^{エックス}$ 連鎖重症複合性免疫不全症に対する遺伝子治療については実施施設が開始を保留していますが、それ以外の遺伝子治療臨床研究については、長期間にわたって被験者の追跡調査を行うとともに、それぞれの遺伝子治療臨床研究に参加することにより得られる利益と不利益を最新の知見に基づき定期的に評価することを条件に継続が認められています。

今回の臨床研究では、遺伝子を導入する細胞は $T^{ハイ}$ リンパ球であり、先に述べた先天性免疫不全症に対する遺伝子治療のような造血幹細胞に遺伝子を導入するものではありません。造血幹細胞は赤血球や白血球、血小板に分化することが可能な細胞であるため、癌化がおりやすい細胞ですが、 $T^{ハイ}$ リンパ球は他の細胞へ分化する能力を失った細胞であるため、造血幹細胞に比べ癌化しにくい細胞と考えられています。このことから、導入した遺伝子が染色体に組み込まれることによる挿入変異の可能性は $T^{ハイ}$ リンパ球と造血幹細胞の間で同程度ではあるものの、今回の治療法で細胞が癌化する危険性は、先天性免疫不全症に対する遺伝子治療と比較して低いものと考えています。過去に日本や海外で実施された、 $T^{ハイ}$ リンパ球にレトロウイルスベクターで遺伝子を導入する臨床研究において、遺伝子治療による癌化は1件も報告されていません。また、イタリアでは、レトロウイルスベクターで遺伝子導入した $T^{ハイ}$ リンパ球を投与した46例を対象に、最長9年間の追跡調査をした結果、遺伝子導入した細胞の異常な増殖は認められなかったと報告しています。

以上より、今回の遺伝子治療に起因する細胞の癌化の危険性は極めて低いと考えられます。ただし、万が一、癌化が認められた場合には、抗癌剤の投与等の最善と考えられる治療を行います。

2) 本遺伝子治療による危険性

①採血に伴う副作用

採血した約 1%の方で、気分が悪くなったり、吐き気や冷や汗、めまい、失神、皮下出血することがあります。そのため、針を刺した箇所の痛みが続いたり、強い痛みが起こる場合には我慢せず、すぐに医師又は看護師にお知らせください。お薬を投与したり適切な処置を行います。

②^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球輸注に伴う副作用

- ・発熱、発疹、アレルギー類似反応等

調製した^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球は、投与するまで凍結保存されます。投与の際には解凍しますが、解凍の際に崩壊した細胞の一部からサイトカイン（細胞から分泌される蛋白）等が放出され発熱、悪寒、皮疹、関節痛、嘔気等をきたす可能性があります。その際には、症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

- ・肺障害

一般的な輸血でまれに見られる重篤な副作用として「輸血関連急性肺障害（症状として、寒気、発熱、呼吸困難、喀痰を伴わない咳、低血圧、低酸素血症などがあげられます。）」が知られています。輸血関連急性肺障害の発症の原因は不明ですが、抗白血球抗体（抗^{エイチエルエイ}HLA^{エイチエルエイ} 抗体、抗顆粒球抗体）による抗原・抗体反応が原因と推測されています。本臨床研究では患者さまご本人から採血した血液を輸血しますので、「輸血関連急性肺障害」に類似の病態が発症する可能性は低いと考えられますが、^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球投与後の肺障害に注意すべきと考えられます。発症時には、副腎皮質ステロイド剤の大量投与等の適切な処置を行います。

- ・免疫反応に伴う事象

本臨床研究の標的抗原である^{ダブリュウティワン}WT-1^{ダブリュウティワン}は、正常細胞における発現量は限られています。これまでの^{ダブリュウティワン}WT-1^{ダブリュウティワン}を標的とした免疫治療においては明らかな正常組織への傷害は報告されていません。したがって、^{ティーシーアール}TCR^{ティー} 遺伝子導入^{ティー}Tリンパ球による正常組織への傷害の可能性は限られていると考えられます。しかしながら、腎臓の糸球体や漿膜等にはある程度の^{ダブリュウティワン}WT-1^{ダブリュウティワン}が発現することから、

腎臓、腹膜、胸膜、心外膜等の傷害の可能性は否定できません。また、自己免疫疾患様症状（発熱、皮疹、関節痛、筋肉痛等）には常に注意する必要があります。症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

・その他の事象

TCR^{ティ-シー-アール} 遺伝子導入 T^{ティ-}リンパ球は理論的にWT1^{ダブリュウティワン} を有する細胞のみを攻撃すると考えられています。しかし、予想しない効果により、TCR^{ティ-シー-アール} 遺伝子導入 T^{ティ-}リンパ球がWT1^{ダブリュウティワン} を有していない正常な細胞にも攻撃し、体に悪い影響を及ぼす可能性は否定できません。もし、その場合には症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

WT1 ペプチドワクチンの臨床試験で、骨髓異形成症候群の患者さまにおいて白血球や血小板の減少などの副作用が報告されています。これはペプチドワクチンの効果で白血球や血小板を産生していた病気の細胞（造血幹細胞）が減少したため副作用が出たと説明されています。この TCR 遺伝子導入リンパ球輸注でも同じような副作用が起きる可能性が十分にあります。そのため、正常な白血球や血小板の減少が確認された場合には、感染症や出血のリスクが高まりますので、大事に至らないように白血球や血小板が回復するまでは、感染予防処置や輸血などの必要な対応を行います。

__また、本臨床研究で用いられているRNAi^{アールエヌイーアイ}技術はこれまでの検討では細胞に問題を起こすことは確認されていませんが、予想しない効果により、患者様の細胞や身体に悪い影響を及ぼす可能性は否定できません。

③ペプチド投与に伴う副作用

②TCR^{ティ-シー-アール} 遺伝子導入 T^{ティ-}リンパ球輸注に伴う副作用の「その他の事象」で説明したことで同じリスクが生じます。改変型WT1^{ダブリュウティワン} ペプチドはアジュバントとよばれる物質と混合し皮下へ2回投与が予定されています。骨髓異形成症候群（骨髓の異常により機能しない血液が大量に産生され、正常な血液が減少する病気）の患者さまに対して改変型WT1^{ダブリュウティワン} ペプチド投与した臨床研究において、汎血球（血液中の白血球・赤血球・血小板）が減少したとの報告がされて

います。しかし、その他の重大な有害事象についての報告は限られています。

また、ペプチド投与部位に皮膚反応（注射部位の発赤、腫脹）が現れる例が報告されています。反応が強い場合には皮膚の硬結、壊死、潰瘍形成等をきたす可能性も否定できません。全身的には微熱、倦怠感等の症状が現れる例も報告されています。注意深く観察を行い、症状に応じて解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の薬剤を投与する等の適切な処置を行います。また、高度な副作用の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行います。

3) 本臨床研究にて使用する原材料の危険性

本臨床研究では、レトロウイルスベクター製造時や患者さまご本人から採取した^{リンパ}球を培養する際に、ウシ血清や他の方から献血等の方法により提供されたヒト血清アルブミン等の生物由来成分を使用しています。そのため、安全性を確保する目的で加熱処理やウイルス検査等が行われた原材料を使用していますが、感染症にかかる可能性を完全には排除できません。万が一、それらによると考えられる副作用が発生又は海外より報告があった場合には、速やかに患者さまご本人へお伝えするとともに、適切な治療を行います。

4) その他予測できない副作用

上記以外にも予測できない副作用が発現する可能性は否定できません。その場合も、適切な処置を行います。

23. 緊急連絡先およびお問い合わせ先について

緊急時、またこの臨床研究について何かご心配やご質問がありましたら、下記にご連絡ください。

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

TEL：059-231-5187

休日・夜間の緊急連絡先 TEL：059-231-5187 又は 059-231-5103

（三重大学医学部附属病院 11 階病棟）

24. 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制

1) 研究の正式名称：

エムエス ^{ダブリュウティワン} MS3-WT1 ^{エスアイティシーアール} -sITCR ^{ダブリュウティワン} ベクターを用いた WT1 ^{ダブリュウティワン} 抗原特異的

ティンダー
T⁺CR⁺ 遺伝子導入 T⁺リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び
骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究

2) 実施施設:

三重大学医学部附属病院

3) 総括責任者:

しんく びろし
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
大学教員

4) 分担研究者:

かげやま しんいち
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

いけだ ひろあき
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

みやはら よしひろ
宮原 慶裕 : 三重大学大学院医学系研究科 がんワクチン講座
講師

いまい なおこ
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

さいとう かなこ
齋藤 佳菜子 : 三重大学医学部附属病院 腫瘍内科 助教

臨床研究参加同意書

三重大学医学部附属病院 病院長 殿

私は、本臨床研究（研究課題名：MS3-W T 1^{エムエス ダブリュウティワン} -s i T C R^{エスアイティーシーアール}）ベクターを用いたW T 1^{ダブリュウティワン} 抗原特異的T C R^{ティーシーアール} 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究）の以下の事項について、文書と口頭にて説明を受け、十分理解しましたので、本臨床研究へ参加することに以下の通り意思を表示します。

了解した事項は□内にしを付けて示します。

- | | |
|--|--|
| ☐ 臨床研究とは | ☐ 個人情報の開示、訂正、利用停止及び相談窓口について |
| ☐ 臨床研究への参加の自由と、参加の取りやめについて | ☐ あなたの病気について |
| ☐ 本臨床研究の方法と目的 | ☐ 他の治療法について |
| ☐ 本臨床研究の対象疾患と参加予定人数、参加予定期間 | ☐ 本臨床研究に参加できる方、参加できない方 |
| ☐ 本臨床研究の資金源と起こり得る利害の衝突及び他の組織との関わり | ☐ 本臨床研究の概要(スケジュール)について |
| ☐ あなたの費用負担について | ☐ 本臨床研究の中止について |
| ☐ 健康被害の補償について | ☐ 期待される効果と原理について |
| ☐ 新たな情報のお知らせについて | ☐ TCR 遺伝子治療臨床研究の海外での状況について |
| ☐ あなたに守っていただきたいこと | ☐ 予想される危険性および副作用 |
| ☐ 保存サンプル及び検体提供に関するお願い | ☐ 緊急連絡先およびお問い合わせ先について |
| ☐ 個人情報の保護について | ☐ 遺伝子治療臨床研究の名称と実施組織体制 |
| ☐ 個人情報の第三者への提供制限について | |
| ☐ 知的財産権の帰属について | |

どちらかにし又は○で囲む。

私は本臨床研究の参加に

☐ 同意します

☐ 同意しません

遺伝子治療臨床研究の概要(スケジュール)について

☐ 同意します

☐ 同意しません

同意年月日：平成 年 月 日

患者さま

ご署名：_____

説明年月日：平成 年 月 日

総括責任者（又は分担研究者）所属・氏名：_____

説明年月日：平成 年 月 日

その他説明補助者

所属・氏名：_____

同意撤回書

三重大学医学部附属病院 病院長 殿

私は、「MS3-WT1-siTCR ベクターを用いた WT1 抗原特異的
TCR 遺伝子導入 T リンパ球輸注による急性骨髄性白血病及び
骨髄異形成症候群に対する遺伝子治療臨床研究」への
参加に関して同意撤回いたします。

同意撤回日：平成 年 月 日

患者さま ご署名：_____

同意撤回確認日：平成 年 月 日

総括責任者（又は分担研究者）所属・氏名：_____