

8-1-2. 患者に投与する物質の純度および安全性

患者に投与する物質は、遺伝子が導入されたドナー末梢血リンパ球のみである。培養に用いられる血清はウシ血清が患者にとって異種タンパク質であり、時として患者にとって抗原となり得るため、末梢血T細胞培養に際してはドナーの自己血漿が用いられる。遺伝子導入の際に用いられる種々の試薬や抗体に関しては、遺伝子導入細胞を患者に投与する前に 5%ヒト血清アルブミンを含む生理食塩水で十分に洗浄されるが、遺伝子導入終了後、細胞の一部を MolMed 社に送付し、以下の検査を行うことで安全性を確かめる。安全性が確認されるまで遺伝子導入細胞は液体窒素内で保存され、安全性が確認された後に使用される。

1. 無菌性(細菌、真菌、マイコプラズマ)
2. 細胞の RCR テスト(*Mus dunni*細胞との共培養後の PG-4 S⁺L⁻テスト等)
3. 上清中の RCR テスト(*Mus dunni*細胞への感染後の PG-4 S⁺L⁻テスト等)
4. FACS によるドナー細胞のΔLNGFR 発現
5. エンドトキシン(LAL、gelation test)
6. 細胞状態
7. GCV の感受性

8-1-3. 増殖性ウイルス出現の可能性

本研究で使用するレトロウイルスベクターDNA SFCMM-3 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部、もしくは一部を欠除しており、また用いるパッケージング細胞株 GP+envAm12 においても gag, pol を発現する DNA 断片と env を発現する DNA 断片とが異なったベクターにより発現されることから RCR の出現は極めて少ないと考えられる。また、過去の症例においても細胞傷害性は報告されていない。実際の治療に使用される SFCMM-3 ウイルスベクター上清は使用前に MolMed 社により RCR が存在しないことが確認されたものを使用する。また、治療開始以後の患者体内での RCR の有無に関しても、患者の細胞や血清を SRL 社に輸送して、RCR の測定を依頼する。(別添16)

8-1-4. 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が細胞に遺伝子を導入する過程において、細胞に傷害を及ぼすことはないと考えられており、事実、現在までの遺伝子治療においても細胞傷害性は報告されていない。

8-1-5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本遺伝子治療臨床研究では、標的細胞としてのドナー末梢血単核球に

試験管内で HSV-TK 遺伝子およびΔLNGFR 遺伝子を導入し、導入細胞のみを患者に投与することから、標的細胞以外の細胞に遺伝子が導入される可能性は RCR が存在しない限りあり得ない。また、マウス細胞由来のパッケージング細胞株より産生されたレトロウイルスベクターの場合、ヒト血清(補体)により直ちに不活化されるため、たとえレトロウイルスベクター粒子が感染細胞の細胞膜表面に付着することで患者体内に混入されても、それが原因で新たな細胞に遺伝子導入が起こることは極めて少ない。

8-1-6. 患者以外の人への遺伝子導入の可能性

今回の遺伝子導入操作は試験管内で行われるため、患者以外の人に遺伝子が導入される可能性は否定できない。このため遺伝子導入に十分な知識と経験を有する研究者のみが、P2 レベルの遺伝子導入専用施設で、十分な注意をもってレトロウイルスベクターを含む上清を扱う。また、レトロウイルスベクターを含む廃液の全ては高圧滅菌後に廃棄される。しかし、レトロウイルスベクターは非常に不安定であり、レトロウイルスベクターを含む上清に直接触れた程度で遺伝子導入が成立するとは考えられない。また、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こり得る可能性は大量の RCR が患者体内に存在しない限りありえない。

8-1-7. 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が宿主染色体に組み込まれる部位は一定していない。問題はレトロウイルスベクターが組み込まれた部位の近傍に細胞にとって重要な遺伝子や癌原遺伝子が存在した場合である。レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖に関わる遺伝子の障害になった場合、ベクター導入細胞は死に至り、患者本人にとってなんら影響はない。一方、導入部位近傍に癌原遺伝子が存在し、その遺伝子の発現を誘導、もしくは増強した場合、レトロウイルスベクターの組み込みが細胞増殖にとって正に働き、細胞の癌化の可能性が出てくる(59, 60)。しかし、臨床実施例を含む数多くの動物実験から RCR が存在しない限り、その可能性は極めて低いものとされている。本遺伝子治療臨床研究においては患者投与前に、遺伝子導入ドナー T 細胞のウイルスベクターゲノムのコピー数、ならびに組み込まれたベクターゲノムの状態を Southern blot 法や PCR 法にて確認する。

8-1-8. 癌原性の有無

レトロウイルスベクターの組み込みが細胞の増殖にとって正に働く場合には癌原性の問題が出現する。例えば癌原遺伝子の近傍にウイルスベクターが組み込まれれば、強力なエンハンサー、プロモーター活性を有する LTR により癌原遺伝子が発現し、もしくはその発現が増強し、腫瘍化する可能性も否定できない。

組み込まれる部位が一定ではないため癌原遺伝子の近傍にウイルスベクターゲノムが組み込まれる可能性は RCR が存在しない限り極めて低い、輸注前に遺伝子導入ドナー細胞の形態、in vitro での増殖性 (rhIL-2 の反応性、非依存性) を検討する。

8-2. 遺伝子産物の安全性

レトロウイルスベクター-SFCMM-3 の遺伝子導入によって標的細胞は HSV-TK タンパク質と Δ LNGFR の遺伝子産物を獲得する。

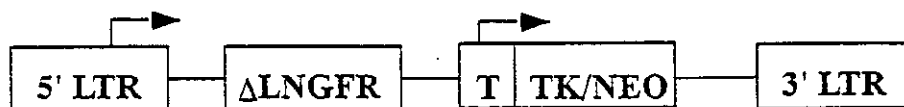
8-2-1. HSV-TK

HSV-TK は代謝系酵素であり、その作用が基質に依存していることから、遺伝子過剰発現による体細胞への影響は小さいものと思われる。ただし、HSV-TK がヒトにとって異種タンパク質であることから、HSV-TK 遺伝子発現細胞の投与を受けた患者において免疫原となり、患者体内で HSV-TK 発現細胞に対する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が誘導されることが過去の遺伝子治療臨床研究で示されている (47)。実際、同遺伝子治療を行ったイタリアの症例においても、遺伝子治療を受けた患者において CTL の誘導が報告されている (30)。このことは CTL による患者体内からの HSV-TK 遺伝子発現ドナー T 細胞の排除を意味しており、GVL 効果の長期継続に対して大きな障害となっている。過去の症例から遺伝子導入リンパ球の投与回数と CTL の出現頻度はある程度相関していることから、投与回数を減らすことで CTL の誘導を抑えられることができるかも知れない。また、イタリアの症例で観察された CTL は全て HSV-TK 発現細胞に対するものであり、この CTL が患者自身の細胞に影響を及ぼすことはないと思われるが、遺伝子治療後はこれら CTL の動態について注意深く観察する必要がある。

一方、イタリアの症例では Δ LNGFR を発現しているにも関わらず、GCV に反応しない細胞群が患者体内に存在することが示された。興味あることに同細胞を in vitro で培養し、GCV に対する感受性を検討したところ、これらの細胞は全て GCV に反応し死滅した。このことから、活発に細胞分裂する細胞により効果を示す HSV-TK/GCV システムでは、生体内で resting 状態にある T 細胞を完全に排除できないのか、あるいは生体内では in vitro とは違い、HSV-TK 遺伝子の発現が Δ LNGFR の発現と比較して低下している可能性が考えられる (54)。後者の可能性に対して、イタリアのグループは HSV-TK の発現を HSV-TK プロモーターから LTR に変更したベクター (今回使用するベクター) を使用し、全ての症例 (2 例中 2 例) で GCV の投与により遺伝子導入ドナー T 細胞の消失を認めていることから、生体内では LTR の方が HSV-TK のプロモーターより強いプロモーター/エンハンサー活性を有することを意味しているかもしれない。下記に以前用いられたレトロウイルスベクター-SFCMM-2 と今回使用するベクター-SFCMM-3 の構造の違いを示す。他方、HSV-TK の GCV 不反応性に関して、分子生物学的解析もなさ

れている。Garin らによると SFCMM-3 の 1991 番目からの CAGG/GTGA と 2218 番目からの CCAG/GCCG が cryptic splice donor site と acceptor site として機能し、splice された HSV-TK RNA が産生され、その結果短縮した HSV-TK を有するウイルス粒子が産生される可能性が示唆されている(61)。細胞株(CEM)を用いた彼等の解析結果によると、これら短縮した HSV-TK を有するウイルスの割合は全体の 10%程度と算定され、今回観察された GCV に対する不反応性になんらかの影響を与えている可能性は否定できない。

SFCMM-2



SFCMM-3



T: HSV-TK promoter、TK/N: HSV-TK と NEO のキメラタンパク、S: SV40 early promoter。矢印は転写開始点を示す。

HSV-TK はある種の細胞に発現した場合、周囲の HSV-TK 非発現細胞にも GCV の影響を及ぼすことが知られている (Bystander 効果) が、末梢血 T 細胞においては現在のところ Bystander 効果は観察されていない。

8-2-2. ΔLNGFR

ΔLNGFR は前述のようにヒト LNGFR のヒト由来のタンパク質であり、細胞内領域を欠除していることから LNGFR を介したシグナルが細胞内へとは伝わらず、過剰発現においても細胞への傷害はないものと思われる。また、過去の上記ベクター (SFCMM-2、SFCMM-3) を用いた遺伝子治療例においても細胞傷害性は報告されていない。

8-3. 細胞の安全性

8-3-1. 培養細胞の純度

培養細胞間の細胞汚染を防ぐために、各ドナー細胞への遺伝子導入は日時を変えて行う。また、各々の細胞は培養器の別個の棚を用いて培養される。また、微生物の汚染を防ぐために、全ての操作はP2レベルの実験室で行われる。細胞の取扱いはクラス II の安全キャビネット内で行われ、細胞自体や未知の感染性微生物の相互混入を防ぐ。無菌性の検査は遺伝子導入前、及び導入後の凍結貯蔵直前に行われる。検査項目として好気性、嫌気性細菌、真菌ならびにマイコプラズマ、RCR を含むウイルス汚染の検査である。これらの検査はイタリアの MolMed 社によって行われる。

8-3-2. 細胞の遺伝子型、表現型の安全性

遺伝子導入細胞の分離方法は、SFCMM-3 ベクター導入細胞を Δ LNGFR に対する抗体を用いて分離する。一回の免疫ビーズによる分離ではほぼ 90%以上の Δ LNGFR 陽性 CD3 陽性 T 細胞が得られることが知られている。前述のようにレトロウイルスベクターの染色体への組み込み部位は一定でないため、遺伝子導入により導入細胞の遺伝子型に変化が起きるとは思われない。また、過去の症例においても SFCMM-2、3 ベクター導入 T 細胞は非導入 T 細胞同様に GVL 効果を呈し、機能的な T 細胞と考えられる。このことから遺伝子導入による末梢血 T 細胞の表現型の変化はないものと思われるが、投与前に種々の T 細胞のみならず、他の表面マーカーに対する抗体を用いて投与細胞の特徴を同定する。

8-3-3. 被験者に投与する細胞の安全性

投与する細胞はレトロウイルスベクター SFCMM-3 を導入したドナー由来の末梢血 T 細胞である。現在、再発白血病に対する治療としてドナー由来の末梢血リンパ球を患者に投与する DLT は広く行われており、GVHD を除いてドナー T 細胞の投与自体では患者に重大な影響を及ぼさない。また、細胞培養の際に使用した OKT3、rhIL-2 の洗浄後の残存濃度は極めて微量で、これらサイトカインが生体に及ぼす影響は限りなく無に等しい。

細胞の安全性として、 Δ LNGFR 発現細胞の分離度 90%とすると 10%程度の細胞は非ウイルスベクター導入細胞であり、これらの細胞が導入細胞と一緒に患者に投与されることとなる。これら非導入細胞は GVHD 発症の際に GCV の投与によっても細胞死に至らず、GVHD が持続する可能性がある。しかし、投与量から換算するとこれら非導入細胞は多くても 10×10^6 cells/kg を超えず、この程度の量では重症 GVHD が起こりにくいことが報告されているので、GCV 投与に加え従来の免疫抑制療法を併用することで重篤な GVHD は沈静化するものと思われる。