

	<p>PG13 に効率よく感染するエコトロピックレトロウイルスベクターMS-bPa が一過性に産生される。この培養上清を PG13 細胞に感染させ、限界希釈法により細胞をクローニングした。こうして得られたクローンから、高力価なアンフォトロピックウイルスを産生するクローン MS-bPa #20 を得た。これをマスターセルバンク (MCB) 用シードセルとして樹立し、これを培養して MCB を作製した。</p> <p>④レトロウイルスベクターMS-bPa の製造 本臨床研究において使用するレトロウイルスベクターMS-bPa は、ウイルス産生細胞株 MCB の培養上清を回収することにより製造する。製造は全て管理された製造エリアにて GMP 遵守下で行われる。</p> <p>5.3. ウイルスベクターの構造 レトロウイルスベクターMS-bPa 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。</p> <p>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マウス、ラット、サル、ヒト等を含む多くの種の哺乳類細胞に感染しうる。また、レトロウイルスベクターMS-bPa は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した末梢血 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはない。したがって、RCR が出現しない限り周囲の細胞に感染することはない。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>1. 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>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MS-bPa を安定かつ安全に供給するために、ウイルス産生細胞にはセルバンクシステムを使用する。MCB の作製・保存及びレトロウイルスベクターMS-bPa の製造は GMP 管理下で行う。組成と品質の確認された培地及び試薬を使用し、特にウシ胎児血清はウシ海綿状脳症非発生源産のものを使用する。</p> <p>①MCB の作製法 ウイルス産生細胞 MS-bPa #20 の初代細胞ストックより作製された Primary Seed Bank が拡大培養され、ウイルス産生細胞 MCB が GMP 遵守下で作製された。MCB の作製においては組成と品質が確認された培地及び試薬が使用された。作製された MCB に関しては、以下の品質試験が行われた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. マイコプラズマ否定試験 (培養法、DNA 染色法) 2. in vivo ウイルス試験 3. in vitro ウイルス試験 4. RCR 試験 (細胞) (293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ) 5. RCR 試験 (上清) (293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ) 6. XC ブラークアッセイ 7. マウス抗体産生試験 (MAP 試験) 8. 無菌試験 (日本薬局方) 9. ウシウイルス試験 10. ヒトウイルス試験 11. アイソザイム分析による細胞の由来動物種同定 12. 組み込まれたベクター遺伝子の組み込み数試験 13. 導入遺伝子配列解析 14. 細胞生存率試験 (トリパンプルー) 15. 産生ウイルスの力価試験 16. 導入遺伝子の機能確認 <p>②レトロウイルスベクターMS-bPa の製造方法 MCB の細胞を拡大培養した後、培地を交換し生産培養を経て培養上清液を回収する。回収した培養上清は、保管、精製することなく引き続きレトロウイルスベクタ</p>

一製造工程に用いる。回収した培養上清液を 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。

製造は、本遺伝子治療臨床研究の研究者が製造管理責任者となり、全てタカラバイオ社の管理された製造エリアにて 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。

レトロウイルスベクター MS-bPa に関しては、以下の品質試験を行う。

1. マイコプラズマ否定試験（培養法）
2. in vivo ウイルス試験
3. in vitro ウイルス試験
4. RCR 試験（293 細胞で増幅後、PG-4 S+L-アッセイ）
5. 無菌試験（日本薬局方）
6. エンドトキシン試験（日本薬局方）
7. 導入遺伝子配列解析
8. 産生ウイルスの力価試験
9. 導入遺伝子の機能確認

1.2. 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与されるのはレトロウイルスベクター MS-bPa により TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入した患者由来 T リンパ球である。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。

また、遺伝子導入細胞の投与後に、MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドが不完全フロイントアジュバントとの懸濁液として皮下投与される。このペプチドの純度は逆相 HPLC による解析により 98.3% であり、エンドトキシン試験や無菌試験などにより品質が確認されている。

1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性

①レトロウイルスベクターの安全性

本臨床研究で使用するレトロウイルスベクター MS-bPa のゲノムは MoMLV 由来の gag、pol、env をコードする遺伝子を完全に欠如している。また、パッケージング細胞株として PG13 を用いるので、RCR の出現する可能性は極めて低いと考えられる。レトロウイルスベクター MS-bPa の試験項目に RCR 試験が含まれており、RCR 陰性のレトロウイルスベクターを臨床使用する。また、治療後には患者末梢血中の RCR を測定する。

②パッケージング細胞の安全性

レトロウイルスベクター MS-bPa を作製する際に使用されるパッケージング細胞 PG13 は、第 3 世代のパッケージング細胞株であり、RCR を産生する可能性は極めて低い。すなわち、パッケージングに必要なウイルス遺伝子が pLGPS 及び pMOV-GaLV Seato env という 2 個の DNA 断片として別々に導入されていることに加え、どちらの DNA 断片も Ψ パッケージングシグナルと 3'-LTR を欠失しているため、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。

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。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が、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. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、患者 T リンパ球に *ex vivo* (生体外) で TCR α 鎖及び β 鎖遺伝子を導入し、拡大培養や細胞洗浄等の工程を経た後に患者に投与する。使用したレトロウイルスベクター MS-bPa はこの過程でほぼ完全に除去され、また、レトロウイルスは比較的不安定なウイルスなので、細胞培養中に大部分は不活化されると考えられる。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ため、たとえレトロウイルスベクター粒子が患者体内に侵入しても、それが原因で患者体内において遺伝子導入が起こる可能性は低いと考えられる。また、レトロウイルスベクター MS-bPa は増殖能を欠いているので、遺伝子導入した患者 T リンパ球内でウイルス粒子を形成することはなく、RCR が出現しない限り標的細胞以外の細胞に遺伝子導入が起きることはない。

1.6. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

本臨床研究の細胞調製は、当該操作に十分な知識と経験を有する研究者のみが行う。一連の細胞調製操作時には、マスク、手袋、実験用衣服を着用し、レトロウイルスベクターの皮膚等への付着を防止する。このような配慮により、細胞調製作業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 MS-bPa の環境中への拡散及び環境中における予期しない遺伝子導入を防止する。レトロウイルスベクター MS-bPa は増殖能欠損型なので、患者を介して患者以外の人に遺伝子導入が起こる可能性は、大量の RCR が患者体内に存在しない限り非常に低い。

1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

レトロウイルスベクターは細胞染色体上のランダムな位置に組み込まれるので、その挿入位置によっては細胞の生存や増殖等の機能に影響を及ぼすことがある。細胞の生存や増殖に必要な遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現が抑制された場合には細胞は死に至る可能性がある。ただし、このような細胞は遺伝子導入細胞のごく一部であると考えられるので、患者への影響は極めて小さい。一方、癌遺伝子の近傍に挿入され、レトロウイルスベクターの LTR が有するエンハンサー・プロモーター活性によりその遺伝子の発現量が増加した場合、及び、癌抑制遺伝子の近傍に挿入され、その遺伝子の発現量が減少した場合には、その細胞が異常増殖する可能性がある。

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) の遺伝子治療臨床研究において、フランスで 4 例及びイギリスで 1 例の合計 5 例の白血病発症が報告されている。本臨床研究における遺伝子導入標的細胞である成熟 T リンパ球の癌化のリスクは造血幹細胞に比べて低いとの見解が、ICH の遺伝子治療専門家グループから出されている。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、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が認められなかったとの報告がある。なお、本臨床研究では、遺伝子導入細胞の患者体内におけるク

ローン増殖を 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、標的細胞である T 細胞は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。したがって、導入遺伝子が発現することにより標的細胞が獲得する性質は、異なる抗原特異性だけであると考えられる。Ex vivo で培養、増殖させた T 細胞クローンを大量に投与する臨床試験において、重大な有害事象は併用した化学療法剤又は IL-2 によるものだけであったとの報告がある。このことから、特定の TCR 可変領域を持つ T 細胞の大量投与による安全上の問題は小さいと考えられる。

前述したとおり、本臨床研究における遺伝子導入の標的細胞の大半は内在性に TCR α 鎖及び β 鎖を発現している。ここに新たに MAGE-A4 に対する TCR 遺伝子を導入するので、遺伝子導入細胞において 2 種類の配列の α 鎖及び β 鎖が発現する。このため、(1) 予測不可能な抗原特異性を持つ混合 TCR 2 量体の形成、(2) 自己抗原特異的 TCR を有する無応答 T 細胞の、導入された TCR からの刺激による活性化及び (3) 腫瘍抗原ペプチドと HLA 分子との複合体が、自己抗原ペプチドと患者の HLA アレル (対立遺伝子) との複合体の立体構造に酷似していることによる、自己細胞の攻撃、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。

ただし、メラノーマ抗原に対する TCR 遺伝子を用いた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ていないことから、TCR 遺伝子を導入した T 細胞が自己免疫疾患を引き起こす可能性は否定できないものの、臨床における安全性は確保されていると考えられる。

3. 細胞の安全性

3.1. 遺伝子導入細胞の調製方法

以下に示す細胞培養にかかわる全ての操作は三重大学医学部内に設置された P2 レベルの細胞調製施設内で行う。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、清浄度クラス 100、クラス II 安全キャビネット内で、又は可能な工程については閉鎖系で細胞を取り扱うことにより、他の患者由来の細胞や外来微生物の混入を防止する。

遺伝子導入 T リンパ球調製工程の概略は以下に示すとおりである。すなわち、OKT3 及び組換えヒト IL-2 を含む培地で患者リンパ球の培養を開始し、レトロウイルスベクター MS-bPa を結合させたレトロネクチン CH-296 コートバッグに上記活性化 T リンパ球懸濁液を添加して遠心することにより遺伝子導入を合計 2 回行い、拡大培養後に細胞を洗浄・濃縮・回収するというものである。こうして得られた細胞懸濁液に凍害保護液を添加し、凍結保存バッグに移した後、ディープフリーザー (-80°C) にて凍結保存する。投与日には、凍結保存バッグをディープフリーザーより取り出し、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

健常人末梢血リンパ球を用いた細胞調製では、遺伝子導入後の細胞中の遺伝子導入細胞の比率は 20% 程度であり、T リンパ球が 95% 以上を占め、若干の B リンパ球が含まれていた。患者に投与される細胞中にも、遺伝子導入されていない T リンパ球やその他の細胞が混在すると予測されるが、もともと患者末梢血中にあった細胞であり問題はないと考えられる。また、仮に T リンパ球以外に遺伝子導入された場合には、発現した TCR 分子は受容体としての機能を発揮しないと考えられることから、生体への影響が発生する可能性は低いと考えられる。

遺伝子導入により、導入遺伝子の本来の機能とは関係なく移入細胞の腫瘍化を誘導する確率が一定程度に存在すると考えられる。ただし造血幹細胞以外の細胞に遺伝子導入された場合には、血液系細胞はいずれもその生理的寿命が限られていることから腫瘍が発生する確率は極めて低いと考えられる。なお、造血幹細胞の混入については、①培養開始時点の患者末梢血リンパ球中の造血幹細胞の比率は極めて低いこと (通常 0.1% 以下)、②T リンパ球を活性化させる今回の培養条件ではレトロウ

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。ただし、万が一、造血幹細胞に遺伝子導入された場合には腫瘍発生の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。

また、細胞培養の際に使用する原材料の残留は極めて微量であり、これらが生体に及ぼす影響は限りなく少ない。TCR遺伝子導入リンパ球は、「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。

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 鎖の遺伝子が導入されていること、及び、レトロウイルスベクターMS-bPaのプロウイルス配列が染色体内のランダムな位置に挿入されていることである。本臨床研究で遺伝子導入する細胞は成人PBLであり、挿入変異によって細胞の癌化が起きる可能性は大変低いと考えられるが完全には否定できないので、LAM-PCRによるモニタリングを行う予定である。OKT3で刺激することによってCD3陽性細胞が活発に増殖し、その結果としてCD3陽性細胞の割合が増加する。また、一般にリンパ球をex vivoで培養するとCD4陽性細胞の割合が減少し、CD8陽性細胞の割合が増加する。しかし、培養後の細胞集団を構成する個々の細胞のサブタイプは末梢血中に存在するものであり、これを患者に投与しても安全性に問題はないと考えられる。Sauceらは、PBMCをOKT3やIL-2を含む培地でex vivoにて培養すると、リンパ球の表現型が変化するが、レトロウイルスベクターの感染による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やTCR遺伝子を導入したリンパ球を用いたRosenberg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。また、レトロウイルスベクターによりTCR遺伝子を導入した臨床試験では、6日から9日という比較的短期間のex vivo培養Tリンパ球の群において移入Tリンパ球が患者生体内で長期間観察されたことが報告されている。本計画においても同様に短期間培養した遺伝子導入Tリンパ球を使用する予定である。

3.4. 被験者に投与する細胞の安全性

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遺伝子導入細胞の品質を担保する。全ての品質試験結果が得られて安全性が確認されるまで凍結保存され、安全性が確認された後に使用される。

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

被験者への投与の際は、凍結保存専用バッグ中に凍結された細胞懸濁液を投与直前に37℃温浴にて急速に解凍し、RPMI1640培地とHSA含CP-1とが1:1の割合で混合された細胞懸濁液として静脈内投与される。

なお、品質試験の検体を採取した後の工程としては、閉鎖系操作による凍結保存専用バッグへの充填、凍結、解凍、及び閉鎖系操作による輸注用バッグ又は注射器への移し替えであり、不純物混入のリスクは極めて低いと考えられる。また、凍結・解凍による細胞生存率の低下については、凍結保存専用バッグに充填する前の細胞懸濁液を別途バイアルに凍結保存し、投与日以前に細胞生存率を測定することにより確認する。

	<p>4. ペプチドの安全性</p> <p>本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドは米国 NeoMPS 社において GMP 準拠で製造された。その純度は逆相 HPLC による解析により 98.3%であった。またエンドトキシンは 0.100 EU/mg 未満であり、無菌試験により無菌性が確認されている。</p> <p>腫瘍ワクチンの臨床試験はこれまでに国内外ですでに主要なものだけでも 1,300 名以上の対象者につき報告されている。その中でも CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究は最も多数行われており、米国の Rosenberg らのグループだけでも 2004 年の時点で総数 381 名の患者に投与されている。しかしながらこれら CTL 認識腫瘍抗原ペプチドについて、現在までに重篤な副作用の報告はない。軽微な副作用として、皮膚反応、微熱、倦怠感等が報告されているのみである。本臨床研究に用いられる MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドはラットにおける単回皮下投与毒性試験を実施した。ヒトへの投与量として予定している 300 μg/body を投与した結果、一般状態の変化及びペプチド投与に関連する体重の変化は認められず、また病理学的検査においても異常は認められなかった。以上より MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの投与において重篤な副作用が出現する可能性は極めて小さいと考えられる。なお、有害事象が発現した場合には、「7.3 ペプチド投与に伴う副作用」に従い、適切な処置を施す。</p>
<p>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</p>	<p>以下の理由により本臨床研究は実施可能と判断される。</p> <p>①臨床ニーズ</p> <p>再発食道癌の患者の 50%生存期間は約 6 ヶ月である。さらに、化学療法等の治療に抵抗性となれば、もっぱら栄養管理等の緩和医療以外の手立てがないのが現状である。本臨床研究は、絶対予後不良かつ他に有効な治療法がない患者を対象としており、このような患者に対する有効な治療手段開発の臨床ニーズが存在する。</p> <p>②本臨床研究の品質・安全性</p> <p>本臨床研究は、腫瘍抗原 MAGE-A4 を認識する CTL クローン由来の TCR 遺伝子をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入した自己リンパ球を患者に投与する。この製造過程は十分に確立され、また、調製された輸注用の TCR 遺伝子導入リンパ球の品質は、調製時毎に確保される。</p> <p>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。</p> <p>免疫不全マウスに TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球を投与した安全性比較試験において、対照とした非遺伝子導入ヒトリンパ球と比較して、遺伝子導入に起因する毒性所見は観察されなかった。</p> <p>レトロウイルスベクターによる遺伝子導入で同様にして調製された、他の腫瘍抗原を認識する TCR 遺伝子導入リンパ球のヒトへの投与は、NIH の Rosenberg らのグループで既実績があり、調製された TCR 遺伝子導入リンパ球の品質に起因する有害事象の報告はない。</p> <p>③本臨床研究の期待される有効性</p> <p>当施設で調製された MAGE-A4 TCR 遺伝子導入リンパ球は、MAGE-A4 陽性・HLA-A2402 陽性の腫瘍細胞株に対して特異的な細胞傷害活性を示すことが in vitro において確認されている。また、免疫不全マウスにヒト腫瘍細胞株を接種したモデル実験において、TCR 遺伝子導入ヒトリンパ球投与に特異的な腫瘍径増大抑制効果が認められた。</p> <p>NIH の Rosenberg らは、転移性悪性黒色腫患者 17 例に腫瘍抗原 MART-1 の TCR 遺伝子導入リンパ球を投与する遺伝子治療臨床研究を行った結果、2 例 (12%) に PR (部分奏功) を認めており、本臨床研究においても同様の抗腫瘍効果が見込まれる可能性がある。</p> <p>④当施設・研究者の能力</p> <p>当施設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 遺伝子導入リンパ球は同基準に準拠して調製される。本臨床研究の研究者は、</p>

	<p>遺伝子ベクター調製、リンパ球アフエーシス、遺伝子導入、細胞培養、品質管理及び当施設における腫瘍抗原由来ペプチドワクチン臨床試験の経験者により構成される。</p>
<p>実施計画</p>	<p>1. 本臨床研究の実施に際し三重大学医学部附属病院内に設置される委員会 遺伝子治療臨床研究審査委員会に安全・効果評価・適応判定部会及び遺伝子製剤 検証部会を設置する。</p> <p>1.1. 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会 安全・効果評価・適応判定部会は、本臨床研究の安全性及び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遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。</p> <p>1.2. 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。</p> <p>2. 本臨床研究の実施手順 治療抵抗性食道癌患者より一次登録時の選択基準・除外基準に適合する患者を選 定し、本臨床研究への一次登録を行う。 アフエーシスにて採取した自己 PBL に MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ 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 リンパ球を ex vivo 培養し、一旦凍結保存する。 TCR 遺伝子導入リンパ球の調製を終了し、安全性を確認した時点で、二次登録時 の選択基準・除外基準に適合する患者を選定し、本臨床研究への二次登録を行う。 TCR 遺伝子導入リンパ球（単回投与）を経静脈的に投与する。 1日投与量 300 μg の MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドと不完全フロイントアジュバントとの 懸濁液を、TCR 遺伝子導入リンパ球投与日を 0 日として 14 日目及び 28 日目の 2 日 間の計 2 回、皮下投与する。 追跡調査を行った後、本遺伝子治療の安全性（有害事象、臨床検査、RCR、LAM-PCR）、 TCR 遺伝子導入リンパ球の血中動態及び腫瘍組織への浸潤、腫瘍特異的免疫反応及 び腫瘍縮小効果を評価する。 TCR 遺伝子導入リンパ球投与後 63 日目に本臨床研究を終了とする。</p> <p>TCR 遺伝子導入リンパ球数の設定： 投与する TCR 遺伝子導入リンパ球数は 1 回投与量 2×10^8 個、1×10^9 個、5×10^9 個の各コホート別とする。各コホートは 3 例とし、1 回投与量を 1×10^9 個、5×10^9 個へと増加させる。ただし、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従っ てそのコホートの症例数を増加し、安全性の評価を強化する。</p> <p>3. 被験者の選択基準及び除外基準 選択基準（一次登録）： 以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 組織診で確定診断の得られた食道癌の患者 2) 根治切除不能かつ標準的な治療法（化学療法、放射線療法等）抵抗性となった 臨床病期Ⅲ期あるいはⅣ期（TNM 分類）の食道癌患者、又は術後あるいは初回放 射線化学療法後に再発転移をきたし治療抵抗性となった食道癌患者 3) HLA-A2402 陽性の患者 4) PCR 法にて腫瘍組織に MAGE-A4 発現が確認*されている患者 5) 画像診断等による臨床効果判定に必要とされる測定可能な腫瘍病変を有する患 者 6) ECOG Performance Status 0~1 の患者 7) 本臨床研究参加時点の年齢が 20 歳以上 75 歳以下の患者 8) 細胞採取時に前治療（手術、化学療法、放射線療法）終了から 4 週間以上の経 過が見込める患者

- 9) 同意取得後4ヶ月以上の生命予後が見込める患者
- 10) 主要臓器（骨髄、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患者
- ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$
 - ・ヘモグロビン $\geq 8.0 \text{ g/dL}$
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) $\leq 150 \text{ IU/dL}$
 - ・クレアチニン (Cr) $\leq 2.0 \text{ mg/dL}$
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 11) 免疫組織染色法にて腫瘍組織に HLA クラス I 分子発現が確認されている患者
- 12) 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患者

*: MAGE-A4 発現陽性の判断基準は、定量的 RT-PCR 法により GAPDH 発現 10,000 コピー当たり MAGE-A4 発現が 50 コピー以上とする。

除外基準（一次登録）:

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・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
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 [プロトロンビン時間 (PT) < 50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 sec、フィブリノゲン (Fbg) < 100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) > 20 $\mu\text{g/mL}$]
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) HBs 抗原、HCV 抗体、HIV 抗体、HTLV-1 抗体のいずれかが陽性である患者
- 4) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 5) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 6) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 7) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 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患者
- 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患者。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)
- 10) 一次登録前4ヶ月以内に他の臨床試験 (臨床研究) に参加している患者
- 11) その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた患者

選択基準（二次登録）:

以下の全ての基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 本臨床研究における最小輸注量 (2×10^8 個) の TCR 遺伝子導入リンパ球が得られた患者
- 2) 画像診断等による臨床効果判定に必要なとされる測定可能な腫瘍病変を有する患者
- 3) ECOG Performance Status 0~1 の患者
- 4) 主要臓器（骨髄、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患者
 - ・白血球数 $\geq 3,000/\text{mm}^3$
 - ・好中球数 $\geq 1,500/\text{mm}^3$

- ・ヘモグロビン ≥ 8.0 g/dL
 - ・血小板数 $\geq 100,000/\text{mm}^3$
 - ・総ビリルビン (T-Bil) ≤ 2.0 mg/dL
 - ・AST (GOT)、ALT (GPT) ≤ 150 IU/dL
 - ・クレアチニン (Cr) ≤ 2.0 mg/dL
 - ・動脈血酸素分圧 70torr 以上、または動脈血酸素飽和度 94%以上
- 5) 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患者

除外基準 (二次登録) :

以下のいずれかの基準に抵触する患者は除外する。

- 1) 以下の重篤な合併症を有する患者
 - ・不安定狭心症、心筋梗塞又は心不全
 - ・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
 - ・胸部 X 線検査による明らかな間質性肺炎又は肺線維症
 - ・自己免疫疾患
 - ・出血傾向 [プロトロンビン時間 (PT) < 50%、活性化トロンボプラスチン時間 (APTT) > 60 sec、フィブリノゲン (Fbg) < 100 mg/dL、フィブリン分解産物 (FDP) > 20 μ g/mL]
 - ・血栓形成傾向
- 2) 重篤な過敏症の既往歴を有する患者
- 3) コントロール不能な胸水・腹水・心嚢水を有する患者
- 4) 制御困難な脳内転移を有する患者
- 5) 副腎皮質ステロイド剤又は免疫抑制剤を全身投与中の患者
- 6) MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチド投与に適さない患者 (例えば MAGE-A4₁₄₃₋₁₅₁ ペプチドの成分、アジュバントに対して過敏症の既往を有する患者)
- 7) 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患者
- 8) 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患者。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)
- 9) その他、総括責任者又は分担研究者が不相当と認めた患者

4. 被験者の同意の取得方法

本臨床研究の開始に先立ち、総括責任者又は分担研究者は被験者の同意を得るに際し、三重大学医学部附属病院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・説明文書を説明の前又は説明するときに渡し、内容を口頭で詳しく説明する。その後、自由意思による同意を文書にて取得する (文書による同意取得は一次登録時及び二次登録時の計 2 回行う)。なお、同意を取得する前には、質問する機会と本臨床研究に参加するか否かを判断するのに十分な時間を被験者本人に与え、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、二次登録時には治験コーディネーター等が説明補助を行うものとする。

5. 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 3 年間とする。症例毎の実施期間は TCR 遺伝子導入リンパ球輸注後 63 日であるが、本臨床研究終了後も当該被験者の生存期間にわたり、1 年に 1 回の頻度で遺伝子導入 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。

目標症例数は以下のとおり 9 例とするが、有害事象が発現した場合には、投与量増加基準に従ってそのコホートの症例数を最大 6 例まで増加し、安全性の評価を強化する。

1 回当たりの TCR 遺伝子導入リンパ球輸注量 :

コホート 1 2 \times 10⁸個 3 例

コホート 2	1×10 ⁹ 個	3 例
コホート 3	5×10 ⁹ 個	3 例

6. 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。

7. 予測される副作用及びその対処方法

7.1. アフェレーシスに伴う副作用

①血管ルート確保に関すること

まれに出血、感染、気胸の合併の危険がある。穿刺皮膚部位を十分に消毒し、手技に習熟した医師が行う。

②迷走神経反射

重篤な場合、意識障害、嘔吐、血圧低下、徐脈（グレード2）、さらに高度では痙攣、失禁（グレード3）がみられることもある。グレード2以上の副作用が出現した場合は、直ちに採取を中止し、補液、昇圧剤、硫酸アトロピン投与等、必要な処置を行う。

③クエン酸反応

抗凝固剤に含まれるクエン酸による低カルシウム血症をきたすことがある。軽症の場合、採取速度を低下させて観察するが、それでも改善しない場合、グルコン酸カルシウムを緩徐に静注する。

④血小板減少

アフェレーシス後に血小板減少が高頻度に見られ、高度の減少も5%前後みられる。アフェレーシス終了後1週間位は必ず血小板をチェックし、採取前値への回復を確認する。

7.2. TCR 遺伝子導入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

解凍に伴い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。対処法は、経過観察、あるいは解熱鎮痛剤や抗ヒスタミン剤等の適切な薬剤を投与する。また、グレード3以上の場合には副腎皮質ステロイド剤の投与を行う。

②肺障害

本臨床研究は自己血液細胞輸注によるものであり、輸血関連急性肺障害（TRALI: Transfusion-Related Acute Lung Injury）類似病態発症の可能性は考えにくいだが、TCR 遺伝子導入リンパ球投与後の肺障害に留意すべきと考えられる。対処法として、発症時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

MAGE-A4 は腫瘍特異性が極めて高いため正常組織への細胞傷害の可能性は極めて低い、自己免疫疾患様症状には常に留意する必要がある。対処法は、グレード2以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

④レトロウイルスベクターを用いる危険性

RCR が出現する可能性は極めて低いと考えられるが、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。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。

遺伝子導入した T リンパ球の癌化の危険性は極めて低いと考えられるが、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する。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。

7.3. ペプチド投与に伴う副作用

CTL 認識腫瘍抗原ペプチドを用いた臨床研究での軽微な副作用として、皮膚反応、

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。ペプチド反応性T細胞の活性化に伴う微熱、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。対処法は、グレード2以上では対症療法を行い、さらに重篤な場合には副腎皮質ステロイド剤を投与する。

8. 評価方法、評価基準及び中止判定基準

8.1. 主要評価項目

①安全性の評価

1) 有害事象

有害事象とは、本治療が実施された被験者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（臨床検査の異常も含む）又は病気のことであり、当該治療との因果関係の有無は問わない。有害事象のグレードは、2003年に米国 National Cancer Institute (NCI) が発表した「Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAEv3.0) 有害事象共通用語規準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版-2004年10月27日」に従い、判定を行う。

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（三重大学医学部附属病院の基準範囲を逸脱した場合、「異常」と判定する）、及び臨床検査値の異常変動の有無について判定する。

3) RCR

本臨床研究期間中のRCRの出現の有無をRT-PCRにより検討する。

4) LAM-PCR

TCR遺伝子導入リンパ球のクローナリティを検討する。

8.2 副次的評価項目

①TCR遺伝子導入リンパ球の血中動態

被験者から採取したPBMCについて、以下の試験を行う。

1) PBMCからDNAを分離し、定量的PCRによってTCR遺伝子及びベクター配列を定量する。

2) テトラマー解析により特異的TCR発現細胞の血中濃度を測定する。

②TCR遺伝子導入リンパ球の腫瘍組織への浸潤度

治療期間中、腫瘍組織又はリンパ節の生検の可能な病変を有し、侵襲的検査のリスクが少ないと判断される場合、生検を行い、以下の試験を行う。

1) 腫瘍からRNAを抽出・精製し、定量的RT-PCRによってMAGE-A4抗原の発現を評価する。

2) 生検組織内へのリンパ球浸潤度を抗ヒトCD3抗体及び抗ヒトCD8抗体を用いて評価する。また、定量的PCRによって生検組織内のリンパ球中の導入TCRの定量化を行う。

③腫瘍特異的免疫反応

被験者からPBLを採取し、以下の試験を行う。

1) ELISPOTアッセイによりMAGE-A4反応性Tリンパ球を定量する。

2) テトラマーによりMAGE-A4反応性Tリンパ球を定量する。

3) 細胞内サイトカイン染色によりMAGE-A4反応性Tリンパ球の反応特性を解析する。

④腫瘍縮小効果

「RECISTガイドライン (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)」にしたがって、腫瘍縮小効果を判定する。

8.3 中止基準

①被験者ごとの中止基準

本臨床研究期間中に以下のような事例が発生した場合、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、必要な検査・観察を行うとともに、必要に応じて三重大学医学部附属病院長に本臨床研究を中止した旨を連絡する。なお、有害事象の発現や対象疾患の悪化等、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) 本臨床研究継続困難な有害事象が発現した場合
- 4) 本臨床研究継続困難な対象疾患の悪化が生じた場合
- 5) 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

②研究全体の中止

総括責任者又は分担研究者は以下の情報が得られ、臨床研究全体の続行が困難であると考えられる場合、安全・効果評価・適応判定部会と本臨床研究全体の中止について協議のうえ決定する。また、必要な検査・観察を行うとともに三重大学医学部附属病院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
- 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

9. 有害事象が発現した場合の措置

9.1 有害事象が発現した場合

総括責任者又は分担研究者は、有害事象に対する医療が必要になったことを知った場合、被験者にその旨を伝える。また、総括責任者又は分担研究者は、有害事象の発現に際して適切な処置を施し、被験者の安全確保に留意し、その原因究明に努める。

9.2 重篤な有害事象が発現した場合

重篤な有害事象が発現した場合、総括責任者又は分担研究者は、「9.1 有害事象が発現した場合」の対応に加え、本臨床研究との因果関係の有無に係わらず、三重大学医学部附属病院の規定に従い、速やかに三重大学医学部附属病院長に報告する。報告を受けた三重大学医学部附属病院長は、文書をもって速やかに厚生労働大臣に報告する。

10. 記録の保存及び成績の公表の方法

記録の保存は三重大学医学部附属病院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、個人情報特定できないよう必要な措置を講じる。

11. 個人情報の保護の徹底

11.1. 個人情報保護に関する責務

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。

11.2. 個人情報の取得と利用に関する制限

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、本臨床研究の成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。

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。

11.4. 第三者提供の制限

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、あらかじめ被験者の同意を得ずに個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、タカラバイオ（株）が外部協力者として「ウイルスベクターに関する基礎的助言及び遺伝子導入Tリンパ球調製技術の提供と助言」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予定であるが、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。

11.5. 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は被験者から当該被験者が識別される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、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求めがあった場合は、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個人情報に関する問い合わせ・相談・苦情の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせ等に適切かつ迅速に対応できる体制を整えている。

備考

(別紙) 検査・観察スケジュール

臨床研究期間	スクリーニング期間		治療期間										追跡調査期間	
	日数	同意取得日	アフェレーシス実施日	day0*	day1	day2	day3	day7	day14 ±5	day16 ±3	day28 ±3	day30 ±3		day35 ±3
入院		○	○	→	→	→	→	→	○	→	○	→		
同意取得	○		○											
一次登録	○													
二次登録			○											
被験者背景	○													
アフェレーシス			○											
TCR 遺伝子導入 リンパ球投与			○											
MAGE-A4 ペプチド 投与								○			○			
バイタルサイン	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
一般状態 (PS)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
感染症検査	○													
血液学的検査	○	○	○ ²	○			○	○			○		○	○
血液生化学的検査	○	○	○ ²	○			○	○			○		○	○
血液凝固能検査	○		○ ²										○	○
免疫血清 (CRP)	○		○ ²	○			○	○			○		○	○
尿検査	○		○ ²	○			○	○			○		○	○
腫瘍マーカー	○		○ ^{2,4}										○ ⁴	○ ⁴
胸部 X 線検査	○		○ ²										○	○ ⁵
12 誘導心電図	○		○ ²										○	○ ⁵
頸部・胸部・ 腹部・骨盤 CT	○ ¹		○ ³										○	○ ⁵
PET-CT			○ ³										○	○ ⁵
上部消化管 内視鏡検査	○ ¹		○ ³										○	○ ⁵
腫瘍組織生検			○ ³										○	○ ⁵
TCR 遺伝子導入 リンパ球 血中動態用採血 ⁶			○ ²	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
免疫機能解析 用採血			○ ²					○			○		○	○
TCR 遺伝子導入 リンパ球の 腫瘍組織浸潤度、 MAGE-A4 発現検査			○ ³										○	○ ⁵
RCR ⁶				○ ⁷									○	○
LAM-PCR ⁶													○	○
採血量 (mL)	15	-	70	23	10	10	18	68	10	68	10	70	70	
有害事象	←													→

*アフェレーシス実施日より約 14~40 日後 (遺伝子導入細胞製剤の調製・QC に要する日数により異なる)。

1. スクリーニング期間開始前 12 週間以内の成績の利用を可とする。
2. 治療期間開始前 3 日以内の成績の利用を可とする。
3. 治療期間開始前 7 日以内の成績の利用を可とする。
4. スクリーニング期間の測定値が高値例のみ実施。
5. 必要に応じて実施。
6. 臨床研究終了後も 1 年に 1 回の頻度でサンプリングを実施。
7. 遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法として、個室管理を解除する前に実施。