

「遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書」変更理由

我々の研究グループでは 2003 年 12 月より「同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対する自殺遺伝子導入ドナーリンパ球輸注療法の臨床研究」を開始し、現在までに 5 症例に対して自殺遺伝子導入ドナーリンパ球輸注 (TK-DLI) を行った (表 1、2)。

投与時から TK リンパ球が末梢血中から検出されなくなるまでの期間 (中央値 28 日、図 1) に予想外の有害事象は観察されていないことや、体外で調製した TK リンパ球ならびに投与後の患者検体に増殖性レトロウイルスを含む微生物汚染が検出されていないことから、治療そのものは安全に行われており、第一相試験としての成果は得られつつある。また一例ではあるがガンシクロビル (GCV) 使用例において、使用直後から HSV-TK 遺伝子コピー数と TK リンパ球クローンの減少を認め、TK リンパ球がヒト体内においてもガンシクロビル感受性を保持していることが確認された。これらの中間結果に更に 5 例の症例を追加することでより確実性の高い情報が得られると考えられる。

一方 TK-DLI の治療効果については、骨髓異形成症候群 (MDS) 患者 1 例が TK-DLI 後も約 4 年間に亘り完全寛解を維持しているが、その他の急性白血病 4 症例ではいずれも 60 日以内に原病の増悪を確認し、5 例終了時点での長期奏功率は 20% と満足できる結果ではなかった。自験例の臨床経過と T リンパ球輸注療法に関する基礎研究・臨床研究の報告 (後述) を検討し、再発早期の TK-DLI と TK リンパ球のクオリティ向上が治療効果の改善に寄与すると考え、後半 5 症例を対象に今回の変更申請に至った。以下にまずその概要に触れ、詳細は個々の変更内容として列記する。

- 1、再発早期の TK-DLI : 一般に T リンパ球数とターゲット細胞数の比 (E:T ratio) が高いほど T リンパ球のターゲット細胞障害効果が高くなることが知られる。したがって TK 遺伝子の有無に関わらず DLI 時の腫瘍量は少ないほど治療効果が期待される (Kolb et al, *Blood*, 2008)。腫瘍量が少ない段階での治療は、再発検出後に TK リンパ球を速やかに調製し、安全性検査を迅速に終えて TK-DLI を行うことで達成されうる。前回の変更申請では、投与前検体の検査は *env* 遺伝子 PCR 増幅および逆転写酵素活性検査によって代替し、同じ検体を用いた S+L-テストは投与前検体の安全性確認を補足する検査として位置付け直した。これにより従来は 40 日以上かかっていた安全性検査を 1 週間程度に短縮できる。また、今回の変更申請における後述の遺伝子導入プロトコール変更により、安全性を損なうことなく TK リンパ球の体外培養期間を 14 日から 10 日に短縮できる。つまり現行法に比べて合計で約 1 ヶ月の短縮が可能であり、症例の治療成績向上に寄与すると考え、変更申請した。
- 2、TK リンパ球のクオリティ : 現行プロトコールを用いて遺伝子導入と 14 日間の体外培養を行った場合、十分な細胞数は得られるものの、培養開始前のドナー T リンパ球に比してドナーリンパ球の抗原反応性や生体内での生存能が著しく減少する

ことが、初回申請後の 2002 年からの数年間のうちに前臨床試験ならびに臨床試験の双方において広く知られるようになった (Sauce D. *Blood*. 2002、 Merktel S. *Blood*. 2002、 Bondanza A. *Blood*. 2006、 Kaneko S. *Blood*. 2009)。また、機能低下のメカニズムがフェノタイプの変化を伴う“細胞疲労”であることについても多くの知見が得られるようになった (June CH. *JCI*. 2007)。実際、我々の 5 症例においても、投与時点で TK リンパ球は活性化マーカー CD25 の発現を既に減じており、移植後に検出可能であった期間も PCR レベルで中央値 28 日と効果を発揮するには不十分であった (表 3)。近年、欧米において自家移植あるいは同種移植後の双方で CD3/CD28 共刺激を用いた T リンパ球養子免疫療法の臨床試験が報告され、急性白血病 (Porter DL et al. *Blood*. 2006) 悪性リンパ腫 (Laport GG, *Blood*. 2003)、骨髄腫に伴う免疫不全 (Rapoport AP et al. *Nat Med*. 2005) においても治療成績向上が認められている。そこで我々は抗 CD3/CD28 抗体による CD3/CD28 共刺激を採用したプロトコールによって産生した TK-T リンパ球と現行プロトコールによって産生した TK-T リンパ球との相違点を、*in vitro* ならびにヒト化マウス *in vivo* モデルを用いて詳細に検討した (Bondanza A. Kaneko S)。その結果、CD3/CD28 共刺激による TK リンパ球は、従来の TK リンパ球に比して同種抗原反応性が有意に高く、生体内での生存も長期であり、通常の DLI に比した場合でも非劣勢であることが明らかになった。その一方で GCV 感受性に変化は無く、*in vitro*、*in vivo* とも GCV 投与で従来の TK リンパ球同様の細胞死を誘導可能であり、安全性に変化をもたらさないことを確認した。 更には CD3/CD28 共刺激が細胞周期回転と活性化を促進し、細胞死を抑制することから、遺伝子導入率と体外培養中の増殖率が向上し計 10 日間で目的の細胞数が得られるようになった。細胞調製ならびに同種抗原反応性、輸注リンパ球の生存可能性が有意に向上していること、GCV 感受性に変化がなく安全性が担保されていること、欧米では Phase I/II 試験が展開され一定の成績を収めていることなどから、本研究における細胞調製にも CD3/CD28 共刺激を取り入れることが、治療成績の向上、対象症例の利益につながると考え、変更申請を行った。

以下は変更報告書の各項目に対応する。

1. 総括責任者、総括責任者以外の研究者の異動があったため。
2. 一部の研究施設(東京大学・医科学研究所)で改組があったため。
3. 研究者の異動に伴い、担当できる役割分担に制限が生じたため。
4. S⁺L⁻テストは検査結果が確定するまでに 40 日を要する。S⁺L⁻テストの結果を待つと適切な治療時期を逃す可能性が高いため、投与前検体の検査は *env* 遺伝子 PCR 増幅および逆転写酵素活性検査によって代替し、同じ検体を用いた S⁺L⁻テストは投与前検体の安全性確認を補足する検査として位置付け直した。具体的には、3 種の検査を投与前に提出後、*env* 遺伝子 PCR 増幅および逆転写酵素活性検査の結果をもって投与を開始し、検査提出 40 日後に S⁺L⁻テストの結果が陽性であった場合は、速やかに投与後の患者末梢血ならびに血漿を用いて *env* 遺伝子 PCR および逆転写酵素活性検査を行い、いずれの一つでも陽性と判明したときは RCR 陽性と判断し、ガンシクロビル投与を行う。いずれも陰性の場合は S⁺L⁻テストを再度行い、陽性の場合にはガンシクロビル投与を行う。S⁺L⁻テスト陰性であれば次回の定期検査までの経過観察とする。遺伝子導入ドナーリンパ球輸注後の定期検査中に、上記 2 検査により再び RCR 陽性が疑われた場合には、S⁺L⁻テストによる確認検査を提出し、その結果を待たずに速やかにガンシクロビル投与を開始する。
5. SRL 社へコンサルトの結果、筑波大学附属病院検査部において施行可能な検査項目(無菌性試験、*env* 遺伝子 PCR 増幅、*Mus dunni* 細胞との共培養後の PG-1 S⁺L⁻テスト)が増えたため。
6. 抗 CD3 抗体 (OKT3) に替えて抗 CD3/CD28 抗体結合ビーズ (ClinExVivo) を用いる予定のため。
7. 初回申請後に一部の研究者が、本研究の遂行に直接的に有用な知見を得る機会を持ったため。
- 8① 一般に末梢血 T リンパ球はナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞への終末分化に伴い細胞障害性は増強するものの、リンパ節へのホーミング機能や抗原反応性を減じ、細胞死感受性が高くなることが知られている (Sallusto F. *Nature*. 1999. 図 2)。特に抗 CD3 抗体と高濃度 IL-2 を用いた末梢血 T リンパ球の長期体外培養は上述の終末分化を促進する。同条件によって 10 日間を超える拡大培養を行った結果、大部分の T リンパ球がエフェクターメモリー T リンパ球 (EM) あるいはエフェクター T リンパ球 (TE) となり、免疫記憶と抗原反応性の維持に関わるナイーブ T リンパ球ならびにセントラルメモリー (CM) T リンパ球を豊富に含む新鮮末梢血リンパ球と比較して、大きくその分布を変えることが知られる (Bondanza A *et al. Blood*. 2006. 図 3)。さらには、T リンパ球レパトワの偏移現象が起きることも知られており (Coito S *et al. Stem Cells Dev*. 2004)、結果的に抗原反応性が低く、細胞死感受性の高い短命なリンパ球集団、すなわち治療効果を期待し難い T リンパ球集団が長期拡大培養により産生されている。CD28 分子は T リン

バ球表面分子の一つで、抗原提示細胞上にある B7 分子からの刺激を細胞内に伝えて IL-2 の産生を促進して T リンパ球の活性化を推進する機能や、TCR を中心とした免疫シナプスを形成することでより強い TCR シグナルを細胞に伝える機能があり、CD3/CD28 分子の共刺激は遺伝子導入 T リンパ球の効果的な活性化に広く用いられる。欧米では GMP 基準に適合した臨床用の抗 CD3/CD28 抗体結合磁気ビーズが販売されており、それを用いたいくつかの臨床研究が報告されている (Laport GG et al. *Blood* 2003. Porter DL et al. *Blood*. 2006. Rapoport AP et al. *Nat. Med.* 2005)。我々の臨床研究では初期 5 例において体外遺伝子導入に伴う T リンパ球の終末分化が顕著であったため、臨床グレードの抗 CD3/CD28 抗体結合磁気ビーズを採用した HSV-TK 遺伝子導入プロトコルを開発し、同プロトコルで樹立された T リンパ球が抗原反応性を充分保っている長命な CM-T リンパ球であり、安全性確保に十分な GCV 感受性を備えていることを *in vitro* と *in vivo* (ヒト化動物モデル) で示した。具体的には、また抗 CD3/CD28 抗体刺激の採用により、T リンパ球の活性化に必要な時間が短縮され、刺激 48 時間後の活性化分子マーカーの発現が従来 72 時間以降の同マーカー発現と同等以上であることを確認した (Kaneko S et al. *Blood*. 2008. 図 4.5)。以上の研究結果ならびに欧米におけるフェイズ I 試験で CD3/CD28 刺激同種リンパ球の安全性が確認されたことから (Porter DL et al. *Blood*. 2006)、本遺伝子治療臨床研究における遺伝子導入プロトコルとして抗 CD3/CD28 抗体による刺激を採用した。(別添 17、18、19) なお ClinExVivo は米国 FDA により承認された Clinical grade の製品であり、本邦では Invitrogen 社の正規代理店であるベリタス社が、臨床研究用試薬として輸入・販売している。また、遺伝子導入プロトコル変更が治療成績へ影響を与える可能性があるため、改定プロトコルにより治療される症例(5名を予定)は治療の終了した 5 名とは別群として各種解析と評価を行う予定である。

②現在、本邦においてはセロイク (武田薬品)、イムネース (塩野義製薬) に加えてプロロイキン (カイロン/ニプロ) が GMP グレードの rhIL-2 として入手可能であるため、追記した。

③副総括責任者職を廃止したため、同職に関する記述を削除した。

④動物モデルによる基礎実験、ならびにイタリアにおける本遺伝子治療症例において、GVHD のコントロールのために 7 日間以上の GCV 投与が有効な例があったため、総括責任者の判断において GCV 投与を延長することができることとした。

9. 本プロトコルを遵守した場合、特に外来での経過観察症例において、医療上・研究上にも必要と思われる以上に頻回の検体採取がなされる例があったため、

10. 本臨床研究に深く関連する最新の論文を追加した。

11. 2007 年 12 月に英国において遺伝子治療に関連する白血病の発症例があったため

12. 筑波大学附属病院内に新たに、従来の施設に比して清浄度とセキュリティレベルの高い P2 レベル CPF が設置されたため、体外無菌操作を同所にて行う。

13. SFCMM-3 ベクターを用いた末梢血 T リンパ球への HSV-TK 遺伝子導入法について、最新のものに改訂した。また、実行委員会委員名簿を添付した。

14. 症例登録再開にあたり、現在までの 5 例の治療成績と今回の計画変更点についての情報提供が必要と考えたため。

表1 Characteristics of patients treated by TK-DLI

Case No.	Age	Disease	Donor	CR	Relapse	Notes
3	60/M	2ndary AML (M7)	MR NST	9	16	HR, Blast 75% in BM, CTx refractory
7	14/M	ALL (Precursor B)	MMR	30	12	HR, Blast 93% in BM
9	50/M	ALLL (Precursor T)	MR	7	26	HR, LN infiltration

MR: matched related donor, MMR: mismatched related donor, NST: non-myeloablative stem cell transplantation, HR: hematological relapse, BM: bone marrow, CTx: chemotherapy, IS: immunosuppressant, LN: Lymph node

表2 Clinical outcome of patients treated by TK-DLI

Case No.	Disease	BM	CR	LN	Day 7	Day 28
3	2ndary AML (M7)	75% in BM	7.7	-	1.0% Day 7	1.97
7	ALL (Precursor B)	9% in BM	6.7	17.0	NA	0.61
9	ALLL (Precursor T)	LN infiltration	8.6	4.1	3.4% Day 7	0.96

Case No.	Disease	PD	Notes	Day 7	Day 28	
3	2ndary AML (M7)	PD	acute (grade II from day 18)*	mixed ***	18	38 [†]
7	ALL (Precursor B)	PD	-	-	14	954 [†]
9	ALLL (Precursor T)	PD	-	-	58	291 [†]

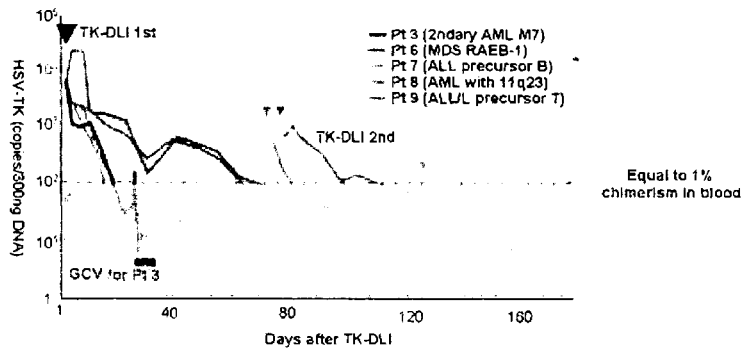
CR: complete remission, BM: bone marrow, PD: Progressive disease, *: with stage I skin lesion and stage I liver injury, †: set on day 24 as stage I skin lesion then progressed and extended with lip injury, ***: complete remission in skin injury with drastic elimination of TK-T lymphocytes, but liver injury progressed due to an infiltration of leukemia cells, LN: Lymph node, †: dead patient, †: additional SCT from a matched unrelated donor have been performed on Dec/2006.

表3 Preparation and immuno-phenotypic characterization of genetically modified donor lymphocytes

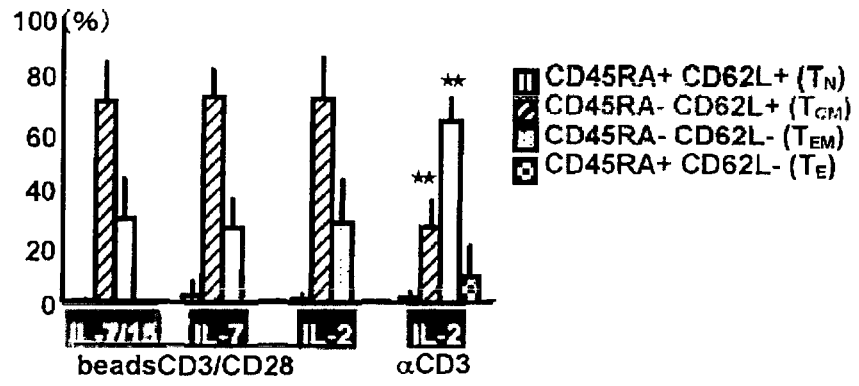
3	18.7	68.8	97.2	10.0 (23)	1.72					
7	10.0	83.0	64.9	7.1 (20)	4.94					
9*	16.6	94.2	91.7	7.2 (18)	2.92					
3	96.6	10.7	85.9	3.4	<1.0	<1.0	<1.0	15.6	NA	NA
7	96.9	52.1	42.7	7.4	<1.0	NA	NA	11.1	98.7	34.4
9*	97.3	28.8	64.9	7.1	<1.0	NA	NA	40.3	98.5	63.3

*: Ex vivo TK-T cell manipulation was finished on day 11, then TK-T lymphocytes were harvested and stored.

图1 Progressive elimination of TK-T lymphocytes in patients



☒ 4



☒ 5

