

本試験を実施するうえで塩酸フルダラビンの適応外使用が不可欠である。しかし、適応外使用薬剤を用いて試験を実施する場合、透明性を確保した入手経路が問題となる。また、試験結果が一般診療として患者に還元されず、真に重要なエビデンスを生み出すための大規模第 III 相試験の実施にもつながらない。また、健康被害発生時の補償の問題も重大である。そこで製薬企業による適応承認拡大のための治験化することを模索した。しかし、営利団体である製薬企業側にメリットがないため、実現不可能であった。そこで旧厚生省研究開発振興・違約安全局審査管理課長連名通知（平成 11 年 2 月 11 日）「適応外使用に係わる医療用医薬品の取り扱いについて」に基づいて、厳正な医師主導型臨床研究結果による適応承認取得可能な臨床試験とする事を目標とした。そのためには倫理性、科学性、信頼性が確認し得る臨床試験が必要である。これを満たす条件として、

- GCP に準拠した、科学的なよくデザインされた試験を実施すること
- GCP に則った試験が実施可能な、質の高い試験施設で実施すること
- すべての記録が適切に保管されていること
- 監査を実施し、記録に残すこと
- 適切なコントローラー、および統計アドバイザーを置くこと

が必要であるとの結論に至った。また、これを実現するためには、施設の臨床試験コーディネーター(CRC) を利用できること、公的なコントローラーや試験組織と独立した割り付けセンターなどが利用できるよう

にする事が望ましいと考えられた。後者に関しては非営利法人である臨床試験支援組織を利用することで対処可能であることがわかった。

プロトコール会議、及びその後に設置されたメーリングリストにおいては、ヘルシンキ宣言 B-27 項の精神に基づき、試験の透明性を確保するための工夫を行った。具体的には会議、及びメーリングリストは原則として公開とし、「公的試験結果を未来の患者に還元する」という共通の理念に基づいて医師、厚生労働省担当者、生物統計家などの学術専門家、製薬企業開発担当者、非営利法人などから広く参加を募り、立場を超えた議論を行うことを呼びかけた。メーリングリスト参加者は医師だけで 170 名以上、企業から 50 名以上の参加があり、既に 1000 通を越える電子メールによる議論が行われている。臨床試験に係わるあらゆる種類の専門家が参加しており、その叡知を結集する形でプロトコールの作成を迅速に行うことが可能であった。

#### D. 考察

今回の班研究において、迅速に質の高い研究計画が作成する上で、結果的に電子メールを用いた討論が極めて有用であった。電子メールを用いた議論では、過去の発言が参照可能なためリアルタイムで議事録が作成され、これを公開することも容易であるというメリットがある。また、発言者は自らの考えを十分に検討、整理した後に発信するために、内容の極めて濃い議論が実施

可能であった。また、場所、時間の制約がなく長期間にわたって議論が可能であることもその大きなメリットである。

#### E.結論

我が国における市販後の臨床試験基盤が極めて脆弱であることが指摘されているが、エビデンスを作り、それを患者の元に速やかに還元するためには医師主導型自主研究の質を向上させることが急務であると思われた。今後公的資金を用いた委託研究などの場において、問題意識の高い研究者の知恵を、電子メディアなどを適切に用いることにより結集し、臨床試験体制を整備することは、有効な手段であると思われた。

#### F.健康危険情報

なし

#### G.研究発表

##### (1)論文発表

森 慎一郎, 同種末梢血幹細胞移植と同種骨髄移植の比較 血液フロンティア 2001. 11 (10): p.47-57

##### (2)学会発表

森 慎一郎, 日本臨床血液学会第 43 回総会シンポジウム 2. 末梢血幹細胞移植; 臨床試験と免疫学的考察「同種 PBSCT の現況; 骨髄移植との比較も含めて」

#### H.知的財産権の出願・登録状況

特許取得: なし

実用新案登録: なし

その他: なし

分担研究者 小澤 敬也 自治医科大学 教授

### 研究要旨

移植後再発白血病に対するドナーリンパ球輸注療法（DLI）における移植片対宿主病（GVHD）対策として、新規自殺遺伝子（MfasER 遺伝子）を用いた細胞制御システムを開発している。今年度は、本システムによりマウス T 細胞株 CTLL-2 に速やかなアポトーシスを誘導し、細胞障害活性を効率よく抑制できることを *in vitro* の系で確認した。

#### A. 研究目的

同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対して DLI が注目されているが、合併症としての重症 GVHD は時に致命的で、そのコントロールが DLI 治療成績改善に不可欠である。そこで我々は GVHD 制御の試みとして、輸注するドナーリンパ球に安全装置として Fas-エストロゲン受容体（MfasER）融合蛋白質をコードする新規自殺遺伝子を予め導入しておき、GVHD 発症時にアポトーシスを誘導し、速やかに GVHD を消退させるシステムを開発している。今回、マウス細胞傷害性 T 細胞株 CTLL-2 に MfasER 遺伝子を導入し、必要時これを作働させて細胞障害を抑制する系を構築し、その有効性を検討した。

#### B. 研究方法

Fas のリガンド結合領域を除いた部分（Fas の細胞膜貫通部および細胞質部分；Mfas）とエストロゲン受容体のホルモン結合領域（ER）の融合蛋白質をコードする MfasER 遺伝子（京都大学・垣塚博士より供与）を構築し、これをレトロウイルスベクターに組み込んで CTLL-2 細胞株に導入した。樹立した遺伝子導入株（CTLL/MfasER）を *in vitro* でエストロゲンで刺激し、アポトーシス誘導能と細胞障害活性の経時変化を観察した。アポトーシス誘導はトリパンブルー染色による生細胞数の減少で評価し、細胞障害活性のアッセイは標的細胞として RL♂1 を用いて <sup>51</sup>Cr-release 法で測定した。また、キラー

活性低下の裏付けとして、細胞傷害関連蛋白質の発現について、ウエスタンブロット法で検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「自治医科大学動物実験指針」にのっとり、動物福祉の観点から適切な実験操作を施し、麻酔などの手段によって、動物に無用な苦痛を与えないように配慮した。

#### C. 研究結果

##### （1）アポトーシス誘導

親株の CTLL-2 は、エストロゲンのあるなしに関わらず対数増殖を示した。CTLL/MfasER（MfasER 遺伝子を導入した CTLL-2）は、エストロゲンを添加しなければ良好な *viability* を保って増殖したが、エストロゲン添加により急速にアポトーシスが誘導され、*viability* は 20%程度にまで低下した。

##### （2）細胞傷害活性

数種の細胞株を用いた予備的検討により、CTLL-2 が効率よくキラー活性を発揮するターゲットとしてマウス白血病細胞株 RLmale1 を選んだ。この標的細胞を <sup>51</sup>Cr で標識し、エフェクター細胞である CTLL-2 と混合培養し、一定時間後こわされた RLmale から遊離した <sup>51</sup>Cr をカウントして、細胞傷害活性とした。

CTLL-2 親株の RLmale1 に対する *cytotoxicity* は *effector/target ratio*、*E/T ratio* 依存的に高まり、効率的に *target* を殺傷排除した。この活性はエストロゲン投与では影響されなかった。

一方、CTLL/MfasER は、エストロゲンなしの状態では親株と同様、E/T ratio 依存的に高い細胞障害活性を示したが、エストロゲンを添加すると、アポトーシスに伴って細胞障害性は著明に抑制された。

### (3) 細胞傷害関連蛋白質

リンパ球がキラー活性を発揮する際には、主に Fas リガンドとパーフォリンの系を用いることが知られている。これら細胞傷害関連蛋白質は、エストロゲン添加による CTLL/MfasER のアポトーシス誘導に伴い、著明に減少していた。

## D. 考察

MfasER 遺伝子導入は CTLL-2 細胞の本来の形質を損うことなく、エストロゲン添加により細胞障害活性を有意に抑制できた。今回の検討はマウス細胞株におけるモデル系であるが、これをプライマリーの免疫担当細胞に応用出来れば、致死的 GVHD を回避することが可能になると考えられる。

## E. 結論

MfasER 自殺誘導遺伝子の導入による随意的アポトーシス誘導は、DLI 後の GVHD 制御システムとして有望である。

## F. 健康危険情報

本研究で、特に有害事象や不都合は観察されていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood*, (in press)
2. Kirito, K., Nagashima, T., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Constitutive activation of Stat1 and Stat3 in primary erythroleukemia cells. *Int. J. Hematol.*, (in press)
3. Kirito, K., Watanabe, T., Sawada, K., Endo, H., Ozawa, K., and Komatsu,

N.: TPO regulates Bcl-xL gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol-3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.* 2001 (in press)

4. Kishino, K., Muroi, K., Kawano, C., Obata, T., Sugano, N., Nakagi, Y., Nagashima, T., Watari, K., Iwamoto, S., and Ozawa, K.: Evaluation of engraftment by ABO genotypic analysis of erythroid burst-forming units after bone marrow transplantation. *Leuk. Res.* 26: 13-17, 2002.
5. Mori, M., Hatake, K., Tanaka, M., Takatoku, M., Matsumoto, Y., Uchida, M., Kametaka, M., Nagai, T., Terui, Y., Tomizuka, H., Muroi, K., and Ozawa, K.: CAM-cytarabine, aclarubicin plus macrophage colony-stimulating factor in the treatment of acute myelogenous leukemia with trilineage dysplasia: usefulness of in vitro apoptosis in leukemic cells. *Leuk. Lymphoma.* 42: 387-391, 2001.
6. Ohtsuki, T., Furukawa, Y., Ikeda, K., Endo, H., Yamashita, T., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Ozawa, K., and Liu, J.M.: Fanconi anemia protein, FANCA, associates with BRG1, a component of the human SWI/SNF complex. *Hum. Mol. Genet.* 10: 2651-2660, 2001.
7. Okada, T., Mizukami, H., Urabe, M., Nomoto, T., Matsushita, T., Hanazono, Y., Kume, A., Tobita, K., and Ozawa, K.: Development and characterization of an antisense-mediated regulation system for adeno-associated virus vector production with introduction of Cre recombinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 62-68, 2001.
8. Yamashita, Y., Kajigaya, S., Yoshida, K., Ueno, S., Ota, J., Ohmine, K.,

- Ueda, M., Miyazato, A., Ohya, K., Kitamura, T., Ozawa, K., and Mano, H.: Sak serine/threonine kinase acts as an effector of Tec tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* 276: 39012-39020, 2001.
9. Muramatsu, M., Hanazono, Y., Ogasawara, Y., Okada, T., Mizukami, H., Kume, A., Mizoguchi, H., and Ozawa, K.: Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27: 891-896, 2001.
  10. Miyazato, A., Ueno, S., Ohmine, K., Ueda, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Kaneko, T., Mori, M., Kirito, K., Toshima, M., Nakamura, Y., Saito, K., Kano, Y., Furusawa, S., Ozawa, K., and Mano, H.: Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood* 98: 422-427, 2001.
  11. Kogure, K., Urabe, M., Mizukami, H., Kume, A., Sato, Y., Monahan, J., and Ozawa, K.: Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int. J. Hematol.* 73: 469-475, 2001.
  12. Mori, M., Terui, Y., Tanaka, M., Tomizuka, H., Mishima, Y., Ikeda, M., Kasahara, T., Uwai, M., Ueda, M., Inoue, R., Itoh, T., Yamada, M., Hayasawa, H., Furukawa, Y., Ishizaka, Y., Ozawa, K., and Hatake, K.: Antitumor effect of beta2-microglobulin in leukemic cell-bearing mice via apoptosis-inducing activity: activation of caspase-3 and nuclear factor kappaB. *Cancer Res.* 61: 4414-4417, 2001.
  13. Tanaka, M., Kirito, K., Kashii, Y., Uchida, M., Watanabe, T., Endo, H., Endoh, T., Sawada, K., Ozawa, K., and Komatsu, N.: Forkhead family transcription factor FKHRL1 is expressed in human megakaryocytes and regulates cell cycling as a downstream molecule of TPO signaling. *J. Biol. Chem.* 276: 15082-15089, 2001.
  14. Hanazono, Y., Terao, K., and Ozawa, K.: Gene transfer into nonhuman primate hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells* 19: 12-23, 2001.
  15. Uchida, M., Kirito, K., Shimizu, R., Miura, Y., Ozawa, K., and Komatsu, N.: A functional role of mitogen-activated protein kinases, Erk1 and Erk2, in the differentiation of a human leukemia cell line, UT-7/GM: A possible key factor for cell fate determination toward erythroid and megakaryocytic lineages. *Int. J. Hematol.* 73: 78-83, 2001.
2. 学会発表
    1. Hanazono Y, Nagashima T, Asano T, Shibata H, Ageyama N, Ueda Y, Kume A, Terao K, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo selective expansion of gene-modified hematopoietic cells in a nonhuman primate model. 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2001.8.26, Tokyo (Exp Hematol 29(8) Suppl 1:8, 2001)
    2. Muramatsu m, Hanazono Y, Ogasawara Y, Okada T, Mizukami H, Kume A, Mizoguchi H, Ozawa K: Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology,

- 2001.8.26, Tokyo (Exp Hematol 29(8) Suppl 1:8, 2001)
3. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo expansion of gene-modified hematopoietic cells. 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2001.8.26, Tokyo (Exp Hematol 29(8) Suppl 1:8, 2001)
  4. Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Nagashima T, Muramatsu S, Nakano I, Kume A, Suzuki Y, kondo Y, Suemori H, Nakatsuji N, Hasegawa M, Ozawa K, Harii K: Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cell with a simian lentivirus vector. 30th Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology, 2001.8.27, Tokyo (On-site program p105)
  5. Ueda Y, Nagashima T, Hanazono Y, Shibata H, Kume A, Terao K, Komatsu N, Ozawa K, Hasegawa M: Efficient expansion of hematopoietic cells by a novel selective amplifier gene, EPOR MPL. American Society of Hematology 43rd Annual Meeting, 2001.12.8, Orlando, FL, USA. (Blood 88(11) Suppl 1:212a, 2001)
  6. Kume A, Koremoto M, Xu R, Okada T, Mizukami H, Hanazono Y, Hasegawa M, Ozawa K: In vivo expansion of gene-modified murine hematopoietic cells with selective amplifier genes. American Society of Hematology 43rd Annual Meeting, 2001.12.8, Orlando, FL, USA. (Blood 88(11) Suppl 1:212a, 2001)
  7. Hanazono Y, Asano T, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii K, Hasegawa M, Nakatsuji N, Ozawa K:

Highly efficient gene transfer into cynomolgus monkey embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. American Society of Hematology 43rd Annual Meeting, 2001.12.10, Orlando, FL, USA. (Blood 88(11) Suppl 1:746a, 2001)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）  
特になし。

<研究成果の刊行に関する一覧表>

1. Mineishi S, Takaue Y. *et al* : Delayed recovery of neutrophil counts after peripheral stem cell transplantation which improved with minimal dose of G-CSF administration. JJCO, 31 : 43-45, 2001.
2. Matsubara H, Takaue Y. *et al* : Suggested clinical benefits of the use of peripheral blood stem cells over bone marrow in allogeneic transplantation settings for the treatment of childhood leukemia. JJCO, 31 : 30-34, 2001.
3. Asada-Mikami R, Takaue Y. *et al* : Efficient gene transfection by RGD-fiber modified recombinant adenoviruse to dendritic cells. JJCR, 92 : 321-327, 2001.
4. Kanda Y, Takaue Y. *et al* : Pre-emptive therapy against cytomegalovirus (CMV) diseases guided by CMV antigenemia assay after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a single-center experience in Japan. Bone Marrow Transplant, 27 : 437-444, 2001.
5. Suenaga K, Takaue Y. *et al* : Successful application of non-myeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Exp Hematol, 29 : 639-642, 2001.
6. Kanda Y, Takaue Y. *et al* : Frequent detection of rising cytomegalovirus antigenemia after allogeneic stem cell transplantation following a regimen containing anti-thymocyte globulin. Blood, 97 : 3676-3677, 2001.
7. Saito T, Takaue Y. *et al* : Early onset *Pneumocystis carinii* pneumonia after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. Am J Hematol, 67 : 206-209, 2001.
8. Saito T, Takaue Y. *et al* : Possible place of non-myeloablative regimen in second transplantation with a mismatched related donor for relapsing and refractory leukemia

- after initial unrelated donor transplantation. *Haematologica*, 86 : 780–781, 2001.
9. Niiya H, Takaue Y. *et al* : Early full donor myeloid chimaerism after reduced-intensity stem cell transplantation using a combination of fludarabine and busulfan. *Haematologica*, 86 : 1071–1074, 2001.
  10. Kato K, Takaue Y. *et al* : T cell conditioned medium efficiently induces the maturation and function of human dendritic cells. *J Leukocyte Biol*, 70 : 941–949, 2001.
  11. Inoue Y, Takaue Y. *et al* : Induction of tumor-specific T lymphocytes in prostate cancer patients using prostatic acid phosphatase (PAP)-derived HLA-A2402-binding peptide. *J Urol*, 166 : 1508–1513, 2001.
  12. Watanabe T, Takaue Y. *et al* : Decrease in circulating hematopoietic progenitor cells by trapping in the pulmonary circulation. *Cytotherapy*, 3 : 461–466, 2001.
  13. Shimokawa T, Takaue Y. *et al* : Successful umbilical cord blood transplantation in an infant with ALL who failed initial autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Med Pediatr Oncol*, 38 : 60–61, 2002.
  14. Kondo Y, Nakao S. *et al* : Identification of T-cell clones showing expansion associated with graft-versus-leukemia effect on chronic myelogenous leukemia in vivo and in vitro. *Exp Hematol*, 29 : 471–476, 2001.
  15. Takami A, Nakao S. *et al* : Non-myeloablative stem cell transplantation for accelerated-phase chronic myeloid leukaemia: circumvention of graft rejection with donor leukocyte infusion early after transplantation. *Br J Haematol*, 115 : 483–484, 2001.
  16. Miura Y, Nakao S. *et al* : Characterization of the T-cell repertoire in autologous graft-versus-host disease (GVHD): evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in the development of autologous GVHD. *Blood*, 98 : 868–876, 2001.



17. Fumimoto H, Ohashi Y. *et al* : Cross-cultural Validation of an International Questionnaire, the General Measure of the Functional Assessment of Cancer Therapy Scale(FACT-G) For Japanese. *Quality of Life Research*, 10 : 701-709, 2001.
18. Hiraoka A, Ohashi Y. *et al* : Phase III Study Comparing Tacrolimus(FK506) with Cyclosporine for Graft-versus-host Disease Prophylaxis after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 28 : 181-185, 2001.
19. Takaue Y, Ohashi Y. *et al* : Guideline for Clinical Safety Data Management in Japan Clinical Oncology Group (JCOG) ) (Version 4). *Jpn Pharmacol Ther*, 29 : 937-951, 2001.
20. Yakushiji K, Gondo H. *et al* : Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation: comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant*, *in press*, 2002.
21. Harada M, Gondo H. *et al* : High-dose chemotherapy with autologous PBSCT as post-remission therapy for AML. *Bone Marrow Transplant*, 27 : 347, 2001.
22. Shiobara S, Gondo H. *et al* : Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: Indications and dose escalation. *Therapeutic Apheresis*, 5 : 40-45, 2001.
23. Muramatsu M, Ozawa K. *et al* : Reversible integration of the dominant negative retinoid receptor gene for ex vivo expansion of hematopoietic stem/progenitor cells. *BBRC*, 27 : 891-896, 2001.
24. Miyazato A, Ozawa K. *et al* : Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. *Blood*, 98 : 422-427, 2001.
25. Kogure K, Ozawa K. *et al* : Targeted integration of foreign DNA into a defined locus on

chromosome 19 in K562 cells using AAV-derived components. *Int J Hematol*, 73 : 469-475, 2001.

26. Okada T, Ozawa K. *et al* : Development and characterization of an antisense-mediated regulation system for adeno-associated virus vector production with introduction of Cre recombinase. *BBRC*, 288 : 62-68, 2001.

20010473

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので  
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。