

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の名称

正電荷多重膜リボソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究

2. 研究者の氏名及びその担当する役割

(1) 総括責任者の氏名及びその担当する役割

氏名：齋田俊明

所属：信州大学医学部・皮膚科学講座

役職：教授

役割：本遺伝子治療臨床研究を総括する。審査委員会等へ必要な報告を行う。臨床研究実施中には実施計画書どおり適切に臨床研究が行われているか否かを確認し、信州大学医学部倫理委員会、信州大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会及び文部科学省・厚生労働省への必要な報告や説明をする。

(2) 分担研究者の氏名及びその担当する役割

氏名：松本和彦

所属：信州大学医学部・皮膚科学講座、名古屋大学大学院医学系研究科・細胞情報医学専攻脳神経病態制御学脳神経外科学分野

役職：講師（信州大学）・非常勤講師（名古屋大学大学院）

役割：名古屋大学医学部附属病院にて遺伝子製剤の調製を行うとともに、信州大学医学部附属病院にて実施計画書に従って、本遺伝子治療臨床研究を行う。

氏名：宇原 久

所属：信州大学医学部・皮膚科学講座

役職：講師

役割：臨床研究を実施する。患者及び家族への十分な説明と同意を得た後、実施計画書に従い、本遺伝子治療臨床研究を行う。臨床研究実施中は臨床経過を観察すると共に安全性及び効果を評価し、臨床研究の責任者に報告し説明する。

氏名：久保仁美

所属：信州大学医学部・皮膚科学講座

役職：助手

役割：臨床研究を実施する。患者及び家族への十分な説明と同意を得た後、実施計画書に従い、本遺伝子治療臨床研究を行う。臨床研究実施中は臨床経過を観察すると共に安全性及び効果を評価し、臨床研究の責任者に報告し説明する。

氏名：村田 浩

所属：信州大学医学部・皮膚科学講座

役職：助手

役割：臨床研究を実施する。患者及び家族への十分な説明と同意を得た後、実施計

画書に従い、本遺伝子治療臨床研究を行う。臨床研究実施中は臨床経過を観察すると共に安全性及び効果を評価し、臨床研究の責任者に報告し説明する。

氏名：吉田 純

所属：名古屋大学大学院医学系研究科・脳神経外学分野

役職：教授

役割：本遺伝子治療臨床研究につき基礎的、臨床的に総括的指導、助言を行う。遺伝子製剤の作製、調製とその輸送についても監督、指導を行う。

氏名：水野正明

所属：名古屋大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学分野

役職：助教授

役割：本遺伝子治療臨床研究に用いるヒトβ型インターフェロン遺伝子埋りリポソーム製剤を作製し、その品質管理並びに安全性を確認する。また正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究の経験に基づき、本臨床研究に対し助言を行う。

氏名：影下登志郎

所属：熊本大学医学部・皮膚科学講座

役職：助教授

役割：生検標本におけるアポトーシス等の免疫組織化学的検索などを実施する。

3. 遺伝子治療臨床研究の実施施設の名称及びその所在地

名称：信州大学医学部附属病院

所在地：長野県松本市旭 3-1-1 郵便番号 390-8621

電話番号 0263-35-4600

病院長 清澤研道

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

予後がきわめて不良な進行期悪性黒色腫に対する新しい治療法として、正電荷リポソームに包埋したヒトβ型インターフェロン遺伝子による遺伝子治療を新たな治療法として確立することが目的である。皮膚・皮下あるいはリンパ節などの転移巣へ遺伝子製剤を注入し、局所的、全身的効果をみるとともに、安全性についても検討する。名古屋大学脳神経外科の吉田らが開発し、現在、悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究に用いている遺伝子製剤の凍結乾燥製剤を信州大学へ輸送して本臨床研究に用いるものであり、今後、他施設でこの遺伝子製剤を治療に用いるためのモデルケースとしても大きな意義を有する研究である。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患を選んだ根拠

1) 治療を直接の目的とした遺伝子治療臨床研究を行う場合

(1) 対象疾患に関する現時点での知見

①悪性黒色腫の発生頻度

悪性黒色腫の発生頻度は人種によって大きく異なり、白人では人口10万当たり年間15～40人で、とくに近年急激な上昇傾向がみられている¹⁾。日本人での発生頻度は人口10万当たり年間2人前後と見積もられているが、患者実数は確実に増加しつつある²⁾³⁾。われわれが最近まとめた全国433施設のアンケート調査では、1990年代前半には年間新患が600人前後であったが、年とともに増加し、1998年には750人以上へと増加している²⁾。厚生労働省の人口動態統計によれば近年の本邦における悪性黒色腫による年間死亡者数は400人前後である。このような近年の発生頻度と患者数の増加には生活スタイルの変化(日光紫外線への曝露の増加など)や人口の高齢化などが関係しているものと推測される。本腫瘍は人種によって好発部位に差がみられ、日本人では足底や手足の指爪部に多くみられ、40%近くがここに生じる³⁾⁴⁾。近年、本邦でも白人と同様の体幹や非末端部四肢に生じるものが増加しつつあり、とくに若年者にこの傾向が目立つので注意を要する。

②悪性黒色腫の治療と予後

悪性黒色腫の治療の第一選択は外科的摘出術である。転移を生じていない段階ならば、手術療法でかなりよい治療成績が得られる¹⁾⁵⁾。ただし、所属リンパ節転移や遠隔転移を生じると予後は急速に悪くなる。悪性黒色腫はきわめて転移を生じやすい、悪性度の高い腫瘍として知られている。最近の日本における悪性黒色腫のUICC病期(1997年版)別の患者数と各病期の5年および10年生存率を表1に示した⁴⁾⁶⁾。病期ⅢB(所属リンパ節転移)と病期Ⅳ(遠隔転移)をあわせると30%を占めており、今なお進行期症例がかなり多いことがわかる。遠隔転移の部位は皮膚・皮下、所属リンパ節以遠のリンパ節、肺などに多く、肝、脳、骨転移などが続く⁴⁾。表1からも分かるように、病期Ⅳの5年生存率は12%、10年生存率は0%であり、きわめて予後不良である。

このような転移を生じた進行期悪性黒色腫は原則として外科手術の適応ではなくなる。進行期症例には化学療法が選択されるが、本腫瘍は化学療法や放射線療法に対してきわめて抵抗性であり、各種の併用化学療法によっても奏効率は低く(20-30%)、生存率の有意な延長は望めない⁷⁾⁸⁾。インターロイキン2やインターフェロン α を用いる生物療法も試みられたが、いずれも奏効率は10-15%に過ぎない⁸⁾。最近、化学療法にインターロイキン-2とインターフェロン α を併用する生物化学療法が注目され、50%前後の奏効率と10%程度の完全寛解率が得られると報告されている⁸⁾⁹⁾。しかし、このような治療によっても生存期間の有意な延長はみられないとする無作為化比較臨床試験も報告されており、その臨床的意義については結論は出ていない⁸⁾。なお、日本ではインターロイキン-2とインターフェロン α ともに悪性黒色腫に保険適用はなく、薬価も高いために、これらを治療に用いることは不可能な状態にある。悪性黒色腫では樹状細胞などを用いる免疫療法も注目されているが¹⁰⁾、なお実験的治療の域を出ないものである。われわれはEvidence-based Medicineの手法で解析した悪性黒色腫に関する従来の化学療法、生物化学療法の治療成績とその評価を最近、論文としてまとめた(文献8)。その別刷コピーを巻末の「その他の資料」に付録資料1として添付する。

(2) 当該遺伝子治療の臨床研究の経過と概要

遺伝子治療は外来遺伝子を体内に導入し、難病を治療しようとするものであるので、遺伝子を安全かつ効果的に導入・発現させることが必要である。遺伝子欠損症のような場合には欠損している遺伝子を外部より導入し、安全に発現し続けることが必要であるが、本研究の場合のごとく、癌細胞に導入してその増殖の阻止または細胞を死滅させることを目的とする場合には、その発現期間は細胞を死滅させうるに足る時間で十分である。応用生化学研究所所長の八木は 1985 年から厚生省新薬開発研究医薬品担体応用リポソーム開発研究班の班長として、抗癌剤や酵素蛋白質を標的細胞に導入する研究を行ってきたが、1990 年より本研究の分担研究者である吉田とともに遺伝子を細胞に導入発現する研究に着手した。以後、この研究を発展させ、正電荷リポソーム包埋による遺伝子の導入を癌の治療に応用することを目指し、まずグリオーマへの効果が期待されていたヒトβ型インターフェロンに注目し、その遺伝子をグリオーマ細胞に導入、発現させる研究に取り組んだ。動物実験を含む各種の基礎実験にて安全性と効果に関する十分な検討を行ったうえで¹¹⁾¹²⁾、学内、旧厚生省、旧文部省の許可をえて、吉田と水野らは名古屋大学医学部附属病院脳神経外科において 2000 年 4 月、正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いるグリオーマの遺伝子治療の第 1 例目の臨床研究を開始した。腫瘍は一時的にかなりの縮小を示したが、後に再発し、死の転帰をとった。この遺伝子治療によると考えられる重大な有害反応は何も認められなかった。この第 1 例目では遺伝子包埋リポソームの懸濁液製剤を用いたが、その後この製剤の凍結化、凍結乾燥化に成功し、液剤と同等の品質、効果を確認している。吉田らは第 2 例目以降のグリオーマ症例の遺伝子治療には、凍結剤を用いた臨床研究を行い、安全性及び有効性を評価している。本臨床研究では水野、松本らが、安定性と保存性に優れるこの凍結乾燥製剤を名古屋大学で作製、調製し、名古屋市から松本市の信州大学医学部附属病院へ輸送、保存し、使用に供する。

(3) 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

前述したように、進行期の悪性黒色腫に対しては現在のところ有効な治療法は確立されておらず、転移の進行に対してほとんどなす術のないのが現状である。インターフェロンは抗ウイルス作用のほか、抗腫瘍作用、免疫賦活作用、抗血管増生作用などの多面的生理活性を有し、メラノーマに対しても増殖抑制効果が確認されている¹³⁾¹⁴⁾。欧米では主としてα型インターフェロンが用いられているが¹⁵⁾、ヒト悪性黒色腫細胞に対してはβ型インターフェロンの方がα型インターフェロンよりも強い増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を有していることが複数の研究により示されている¹³⁾¹⁶⁾。Ishihara らによれば、インターフェロンα、β、γの天然型および遺伝子組換え型の製剤を悪性黒色腫の皮膚転移巣へ局注した際の効果（局注病巣への PR 以上の効果）は巻末の付録資料 2のごとくであり、天然型、遺伝子組換え型インターフェロンαおよび天然型インターフェロンβがいずれも 45%前後の奏効率を示したが、CR 率は天然型インターフェロンβがもっとも高かったとされている¹⁷⁾。ヒトβ型インターフェロンは現在、日本で悪性黒色腫に対して保険適用が認められている唯一のサイトカインである。しかしながら、これによって生存期間の延長がもたらされるというような優れた成績は得られていない。ヒト悪性黒色腫細胞では染色体 9p21 に高率に欠失がみられることが知られている¹⁸⁾。この座位には細胞周期にかかわる CDKN2(p16)遺伝子とともにα型、β型インターフェロン遺伝子が存在し

ている。これらの遺伝子欠失が悪性黒色腫細胞の悪性形質の進展に重要な役割を果たしている可能性が考えられている。興味深いことに、インターフェロン遺伝子の発現を欠如する悪性黒色腫細胞は同遺伝子を発現している細胞に比べ、インターフェロンに対する感受性が低いという報告がみられる¹⁹⁾。また、 β 型インターフェロン遺伝子が定常的に低発現していることが、ウイルス感染時などの際に多彩なサイトカインが一挙に高発現するための準備状態 (revving up) として重要な意義を有しているという研究結果も報告されている²⁰⁾。したがって、ヒト β 型インターフェロン遺伝子を高率に欠損する悪性黒色腫細胞へその遺伝子を導入することは、インターフェロンへの感受性の回復と各種のサイトカインの発現増強に大きく寄与するものと考えられる。また、同遺伝子の悪性黒色腫細胞への導入は、9p21 の欠損の有無に関わらず、インターフェロン β 蛋白の添加に比べて効率よく細胞死 (アポトーシス) を誘導し、ケモカインやサイトカインの産生・分泌もインターフェロン β 蛋白添加に比べ、高いことが明らかにされている。さらにまた、同遺伝子が導入され、発現された悪性黒色腫細胞からは、局所に一定期間持続的に高濃度のヒト β 型インターフェロンが産生されるので、周囲の非導入細胞にも直接的障害効果が及び、腫瘍抗原の発現上昇や NK 細胞活性の増強なども期待できる。こうして悪性黒色腫が壊死、アポトーシスに陥ると、特異的細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導など²¹⁾、全身的效果が惹起される可能性も考えられる。われわれの基礎実験でも、本遺伝子治療が細胞外からインターフェロン β 蛋白を作用させる場合に比べ、悪性黒色腫に対して有意に高い抗腫瘍効果を発揮しうることが明らかにされている²²⁾。巻末の付録資料 3 にも示すように、ヌードマウス移植ヒト悪性黒色腫へインターフェロン β 蛋白を 1 回 5×10^4 IU、隔日 6 回局注しても腫瘍結節増大の有意な抑制効果はえられなかった。なお、本臨床研究では遺伝子が導入・発現された悪性黒色腫細胞は自らが産生するインターフェロン β によって一定時間経過後に死滅することが確認されているので、遺伝子発現制御の必要性はない。本治療法は効果が十分に期待できる治療法であり、しかも危険が少ないので、倫理的にも問題はないと考えられる。以上が本治療法を選択した理由である。

6. 遺伝子及び遺伝子導入方法

本遺伝子治療臨床研究に用いる遺伝子とその導入方法に関しては、この遺伝子製剤を開発し、既に悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究での使用を開始している共同研究者の吉田が、その臨床研究開始にあたり文部科学省、厚生労働省へ提出した「遺伝子治療臨床研究実施計画申請書」に詳細に記載されている。ここでは、その概要を記すこととする。

(1) 遺伝子の構造と性質

本遺伝子治療臨床研究に用いる遺伝子 pDRSV-IFN β の全塩基配列を図 1 に、その遺伝子構成成分とマップを図 2 に示した。ヒト β 型インターフェロン cDNA はラウス肉腫ウイルス LTR のプロモーターの下流に配置されている。導入遺伝子の発現によって生成されるヒト β 型インターフェロンは図 3 に示すように 166 個のアミノ酸よりなる分子量 20,000 のタンパク質である。

(2) 本臨床研究で使用するその他の組み換え DNA の構造と性質