

研究結果の概要および考察

課題名：

非小細胞肺癌に対する正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究

総括責任者：

加藤治文（東京医科大学病院・外科学第一講座・教授）

主な分担研究者：

中村 治彦	東京医科大学病院・第一外科・講師
平野 隆	東京医科大学病院・第一外科・講師
大平 達夫	東京医科大学病院・第一外科・助手
海老原 善郎	東京医科大学・病理学第二講座・教授
水口 純一郎	東京医科大学・免疫学・教授
水野 文雄	東京医科大学・微生物学・教授
向井 清	東京医科大学・病理学第一講座・教授
植田 信太郎	東京大学大学院・理学系研究科生物科学専攻・助教授
西條 長宏	国立がんセンター中央病院・内科部長
横田 淳	国立がんセンター研究所・生物部・部長
Shawn Gallagher	Introgen Therapeutics 社・製品開発担当副社長

【要旨】

「非小細胞肺癌に対する正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について臨床応用を推進した。対象となる被験者は切除不能な p53 遺伝子に異常を持つ非小細胞肺癌患者であり、気管支内に突出する腫瘍を有する場合は気管支鏡下に、また末梢型の腫瘍を認める場合はコンピュータド・トモグラフィー(CT)ガイド下穿刺により腫瘍部位に微細穿刺針を用いて正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター Ad5CMV-p53 液を注入した。本研究は岡山大学で平成 11 年 3 月より第 1 例目の被験者の治療を開始し、phase I 臨床試験がアール ピー アール ジェンセル社と共同で岡山大学第一外科によって開始された。その後、このプロジェクトに東北大学加齢医学研究所、東京慈恵会医科大学、東京医科大学第一外科が加わり、それぞれ倫理的妥当性に関する国の確認も得た上で、多施設共同研究としての治験が開始された（平成 13 年から臨床研究）。平成 15 年 4 月に目標症例数である 15 例目の被験者の登録を終え、平成 17 年 5 月にすべての被験者の死亡が確認されたため第 1 相臨床試験を終了した。15 例中 6 例ではシスプラチン (CDDP) の全身投与が併用された。最も多くみられた副作用は一過性の発熱のみであり、その他に明らかな因果関係が証明された重篤な有害事象は認められなかった。臨床効果としては、咳や血痰の消失、呼吸機能の改善、腫瘍マーカーの低下などがみられた。また、症例によっては腫瘍縮小がみられ、局所的には癌細胞のアポトーシス誘導が組織学的に確認された。Ad5CMV-p53 投与後に血中抗アデノウイルス中和抗体価は全例で上昇したが、治療後の生検サンプルを用いた RT-PCR 解析では、p53 mRNA 発現は経過中維持される症例がほとんどであった。Ad5CMV-p53 の生体内分布の解析も行ったが、遷延するベクターの排泄などは認められなかった。ただ、腫瘍内投与にもかかわらず Ad5CMV-p53 は血漿中に検出され、全身循環に入ることが確認された。本研究により、Ad5CMV-p53 の腫瘍内投与は安全に施行可能であることが明らかとなった。

【研究結果】

平成 11 年 3 月に岡山大学医学部・歯学部附属病院で開始した本研究は、平成 12 年 4 月に多施設共同臨床研究に移行しており、以後、岡山大学医学部・歯学部附属病院、東京医科大学、東北大学病院、慈恵会医科大学の 4 施設の共同研究として進められた。平成 15 年 4 月に 15 例目の被験者の登録が行われ、平成 17 年 5 月にすべての被験者の死亡が確認され第 1 相臨床試験を終了した。9 例の p53 遺伝子導入単独投与あるいは 6 例のシスプラチン併用の治療が行われた（岡山大学 9 例、東京医大 3 例、東北大学 2 例、慈恵会医大 1 例）（表 1）。

1) 安全性：現在までのところ、高い確率をもって発症する重篤な副作用は認められておらず（表 2）、

ベクター投与の当日あるいは翌日に一過性の38℃台の発熱はみられているが、いずれも自然と軽快している。ベクター投与後に閉塞性肺炎を発生した症例も認められたが、ベクターそのものとの明らかな因果関係はないと考えられた。CTガイド下投与の際の気胸やシスプラチン由来と思われる嘔気、食欲不振はみられているが、いずれも米国の臨床試験の結果から予測される範囲内であり、本治療は安全に施行可能であると考えられる。

2) **生体内分布**: 喀痰から抽出したDNAをテンプレートとしてベクター特異的なプライマーを用いて行ったPCR解析では、多くの症例で投与翌日にベクター断片が検出され、ほとんどの症例で2週間以内に陰性となっていた。一方、尿中にはほとんどベクターは検出されておらず、2症例で一時的に認められたのみであった。また、腫瘍内局所投与にもかかわらず、投与後30分をピークに血漿中にベクターが検出された。これはバイオアッセイでの結果であるため、感染性のベクターが検出されていると考えられる。しかし、ベクターの全身循環に由来すると思われる反復する重篤な有害事象は認められていない。10⁹および10¹⁰ PFUのAd5CMV-p53が投与された12症例の投与前後の生検サンプルの解析では、48時間後に採取した組織のDNA-PCRにより42回の投与のうち37回でベクターが確認されており、ほとんどのケースで確実にベクターが標的部位にdeliverされていることが証明された。症例3と症例7では、それぞれ最終投与後25日目、151日目に剖検が可能であった。いずれも腫瘍組織からはDNA-PCRにてベクター断片が検出され、近位リンパ節でも確認された。また、同サンプルのRT-PCRにより42回中34回でp53 mRNA発現が認められ、高率にp53遺伝子発現が誘導されていることが明らかになった。さらに、血中抗アデノウイルス中和抗体価は、ほぼ全例で初回投与後に上昇していた。すなわち、抗体価の上昇にもかかわらずp53遺伝子発現は持続的に保たれており、局所投与の場合には全身循環する血中中和抗体は導入遺伝子発現に顕著な影響をおよぼさないと推測された。また、血中抗p53抗体価は3例で比較的継続的に上昇がみられたが、2例は治療前から上昇しており、その他の症例では有意な変化は認められなかった。

3) **臨床効果**: Ad5CMV-p53を投与した15例中評価可能であった13例の臨床効果は、PR (partial response) 1例、SD (stable disease) 10例、PD (progressive disease) 2例であり、1例のPR症例と3例のSD症例、計4例では、呼吸機能の改善、血痰の消失、肺活量の増加と咳症状の軽快などのQOL (quality of life)の改善や腫瘍マーカーの低下などの臨床的有用性が確認された。

【考察】

非小細胞肺癌に対するp53遺伝子治療は、安全に施行可能であることが明らかとなった。生体内分布に関しても詳細な解析が行われ、抗アデノウイルス抗体価の上昇にもかかわらず、導入されたp53遺伝子発現が長期に得られることがわかった。また、症例によっては腫瘍縮小効果や増殖抑制が認められ、簡便な局所療法としての有用性が確認された。臨床効果で興味深い点は、p53遺伝子治療後に放射線療法を行った症例で比較的長期の生存が得られたことである。p53遺伝子導入により放射線感受性が増強した可能性があり、今後のメカニズムの解析や臨床応用への反映が望まれる。欧米では、Ad5CMV-p53はADVEXIN[®]として開発が進んでおり、2003年9月、米国食品医薬品庁(FDA)から頭頸部扁平上皮癌に対するオーファンドラッグとして迅速審査対象医薬品に認定された。近い将来、ADVEXIN[®]は遺伝子治療製剤として市場に出ると思われる。それに続き、非小細胞肺癌に対しても世界的に臨床開発が進行する予定である。一方、中国では、1998年より臨床試験が開始され、Gendicine[®]として2003年10月に頭頸部癌に対する医薬品として承認され、臨床で使用されている。

本臨床研究への参加希望が4施設で計450人以上に達しており、残念ながら適応患者はかなりしぼられたものの、社会的ニーズは極めて高いと思われる。今後、第II相臨床試験に進み、その有効性を明らかにすることは、一般医療として本治療法が確立されることにつながり、社会的にも重要であると考えられる。現在は極めて進行した患者が対象であるが、ベクターの安全性が確認されれば積極的に他の治療法との併用を検討することができる。例えば、外科的切除可能な症例に術前投与することで腫瘍サイズの縮小を期待したり、また術中の腫瘍細胞散布による転移を抑制することもできる。根治切除不能な症例の切除断端に投与することで、局所再発や遺残腫瘍組織の再増殖を予防することができる。すなわち、より早期の患者に使用することが可能となり、集学的治療法の一つの選択肢として考えられるようになると期待される。

【結論】

p53遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は安全に施行可能であり、遺伝子導入およびその発現が確認された。

表1 p53 遺伝子治療を施行された症例一覧

症 例	年/性	病 理	部 位	病 期	前 治 療	投与経路	投 与 量	回数
(岡山大学) 01	58/男	扁平上皮癌	気管分岐部	cT4N0M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ⁹ PFU	14
(岡山大学) 02	58/男	扁平上皮癌	左肺下葉	cT4N2M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡 CT	10 ⁹ PFU	9
(岡山大学) 03	66/男	扁平上皮癌	右主気管支	cT2N0M0 St IB (術前)	手術 化学療法 レーザー療法	気管支鏡	10 ⁷ PFU	4
(岡山大学) 04	46/女	腺癌	左肺上葉	cT2N3M1 St IV	化学療法	CT	10 ⁹ PFU +CDDP	10
(岡山大学) 05	55/男	扁平上皮癌	右肺下葉	cT4N1M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡 CT	10 ⁹ PFU +CDDP	3
(岡山大学) 06	54/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT3N2M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	CT	10 ⁹ PFU +CDDP	2
(東北大学) 07	71/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N1M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹⁰ PFU	2
(岡山大学) 08	52/男	扁平上皮癌	右肺下葉	cT2N2M0 St IIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹⁰ PFU	1
(岡山大学) 09	66/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT2N0M0 St IB (術前)	手術 化学療法 放射線療法	CT	10 ¹⁰ PFU	4
(慈恵医大) 10	51/男	腺癌	右肺下葉	cT2N2M1 St IV	化学療法	CT	10 ¹⁰ PFU +CDDP	1
(東京医大) 11	51/男	腺癌	右肺上葉	cT4N3M0 St IIIB	化学療法	CT	10 ¹⁰ PFU +CDDP	2
(東京医大) 12	61/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N2M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹⁰ PFU +CDDP	3
(岡山大学) 13	62/男	扁平上皮癌	左肺下葉	cT4N3M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹¹ PFU	1
(東北大学) 14	70/男	扁平上皮癌	左肺上葉	cT2N2M0 St IIIA	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹¹ PFU	4
(東京医大) 15	62/男	扁平上皮癌	右肺上葉	cT4N2M0 St IIIB	化学療法 放射線療法	気管支鏡	10 ¹¹ PFU	4

表 2 p53 遺伝子治療における有害事象

有害事象	重症度			計 (%) N=15
	軽度	中等度	重度	
発熱	1	11	2	14 (93.3%)
血痰	8	1	0	9 (60%)
悪心	2	3	0	5 (33.3%)
嘔吐	3	2	0	5 (33.3%)
咳	4	0	0	4 (26.7%)
下痢	4	0	0	4 (26.7%)
閉塞性肺炎	0	3	1	4 (26.7%)
便秘	3	0	0	3 (20%)
背部痛	2	1	0	3 (20%)
胸痛	3	0	0	3 (20%)
貧血	0	1	2	3 (20%)
口内炎	2	0	0	2 (13.3%)
左肩疼痛	2	0	0	2 (13.3%)
感染症	1	1	0	2 (13.3%)
全身倦怠感	2	0	0	2 (13.3%)
腰痛	2	0	0	2 (13.3%)
神経系 - 聴覚	0	2	0	2 (13.3%)
呼吸困難	0	0	1	1 (6.7%)
肺炎	0	1	0	1 (6.7%)
無気肺	0	0	1	1 (6.7%)
腹部膨満感	1	0	0	1 (6.7%)
感覚神経異常	1	0	0	1 (6.7%)
気胸	1	0	0	1 (6.7%)
血腫 (前胸部)	1	0	0	1 (6.7%)
鼻汁	1	0	0	1 (6.7%)
胸水	1	0	0	1 (6.7%)
下血	1	0	0	1 (6.7%)
歯痛	1	0	0	1 (6.7%)
急性上気道炎	0	1	0	1 (6.7%)
神経系 - 気分	1	0	0	1 (6.7%)
生検部疼痛	1	0	0	1 (6.7%)
白血球減少	1	0	0	1 (6.7%)
食欲不振	0	1	0	1 (6.7%)
体重減少	0	0	1	1 (6.7%)
左手第 2 指化膿	1	0	0	1 (6.7%)
上腕疼痛 (右)	0	1	0	1 (6.7%)

別紙2

遺伝子治療臨床研究審査委員会

1. 平成13年12月4日(火)午後6時
 - ・ 遺伝子治療臨床研究実施計画書
「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 本治療について経過報告があり、合わせて当院が実施した2症例についても経過報告があった。
 - ・ 本臨床研究の「治験」から「臨床研究」への切り替えが審査委員会で承認され、厚生労働省並びに文部科学省へ遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書を提出する事になった。
2. 平成18年6月1日(木)午後3時
 - ・ 遺伝子治療臨床研究終了報告書
「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 本治療について経過報告があり、本院が実施した3例目について報告があった。
 - ・ 遺伝子治療臨床研究終了報告書の提出が承認された。

遺伝子治療臨床研究適応・安全評価部会

1. 平成13年1月10日(水)午後5時
 - ・ 「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 第1例目について、臨床研究の適応安全性及び医学的な妥当性について具体的に評価を行い、遺伝子治療が承認された。
2. 平成13年5月18日(金)午後6時
 - ・ 「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 第1例目について、経過報告があった。
 - ・ 第2例目について、臨床研究の適応安全性及び医学的な妥当性について具体的に評価を行い、遺伝子治療が承認された。
3. 平成13年11月12日(月)午後6時
 - ・ 「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 第2例目について、経過報告があった。

4. 平成15年4月8日（火）午後6時
 - ・ 「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン（CDDP）を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 第3例目について、臨床研究の適応安全性及び医学的な妥当性について具体的に評価を行い、遺伝子治療が承認された。

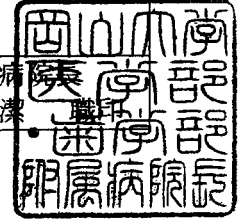
5. 平成15年7月30日（水）午後6時
 - ・ 「非小細胞肺癌に対する正常型p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン（CDDP）を用いた遺伝子治療臨床研究」について
 - ・ 第3例目について、経過報告があった。
 - ・ 「遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書」の提出について、報告に基づき審議され、遺伝子治療との直接の因果関係は明らかでないと判断された。

遺伝子治療臨床研究終了報告書

平成 18 年 6 月 30 日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	岡山県岡山市鹿田町 2 丁目 5 番 1 号 (〒700-8558)
	名称	岡山大学医学部・歯学部附属病院 電話 086-235-7287 FAX 086-231-3986
	代表者 役職名・氏名	岡山大学医学部・歯学部附属病院 森田 潔



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の終了報告書を提出します。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・泌尿器病態学・教授 公文裕巳


遺伝子治療臨床研究終了報告書

平成11年9月16日

研究の名称	前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現 アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	平成12年6月29日から平成18年1月12日まで

総括責任者	所属部局の所在地	岡山市鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	所属機関・部局・職	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・泌尿器病態学・教授 (岡山大学医学部・歯学部附属病院 泌尿器科 科長)	
	氏名	公文 裕巳	
実施施設	所在地	岡山市鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	名称	岡山大学医学部・歯学部附属病院	
	連絡先	岡山市鹿田町 2-5-1 (電話番号 086-235-7287) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・泌尿器病態学	
	氏名	所属機関・部局・職	役割
総括責任者以外の研究者	那須保友	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・泌尿器病態学・助教授	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、臨床観察、臨床効果判定
	雑賀隆史	岡山大学医学部・歯学部附属病院・泌尿器科・講師	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調整、ベクターの投与、臨床観察、基礎的効果判定
	江原 伸	岡山大学医学部・歯学部附属病院・泌尿器科・助手	患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、臨床観察
	賀来春紀	岡山大学医学部・歯学部附属病院・遺伝子・細胞治療センター・助手	患者への説明及び同意の取得
	清水憲二	岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設・病態遺伝子解析部門・教授	組織内における HSV-tk 遺伝子の同定
	山田雅夫	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・ウイルス学・教授	ウイルスベクター力価の測定

Timothy C. Thompson	ベイラー医科大学・泌尿器科・教授	遺伝子治療臨床研究における全般的指導
Dov Kadmon	ベイラー医科大学・泌尿器科・助教授	遺伝子治療研究における基礎的・臨床的解析の指導
Estuardo Aguilar-Cordova	ベイラー医科大学・小児科・講師、同大学・遺伝子ベクター室長、米国 NIH・Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)・委員	ウイルスベクターの作製、安全性のチェック、品質管理

審査委員会の開催状況	平成 18 年 6 月 22 日、本研究の概要、経過、および成果について審査委員会各委員に報告し、全委員の承諾を得て、本研究の終了が了承された。 なお、研究期間中においては適宜安全・効果判定・適応判定部会を開始したが、重篤な副作用が発生した事例は無く、審査委員会は開催していない。	
	審査委員会の長の職名	氏 名
	岡山大学医学部・歯学部附属病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会副委員長 (委員長が病気休暇のため副委員長の決裁とする。)	二宮善文 

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究	遺伝子治療標識研究
研究の目的	<p>本研究は、内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌に対し Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で局所内投与し、その後ガンシクロビル (Ganciclovir:GCV) を全身投与した場合の</p> <p>a) 安全性の検討 (最大耐量の推定)</p> <p>b) 治療効果の観察 (評価可能症例)</p> <p>を目的とする。</p> <p>内分泌療法中に再燃してきた前立腺癌症例で、臨床的に遠隔転移を認めない局所再燃前立腺癌に対し、まず HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で腫瘍内に直接投与し、その後 GCV を全身投与する。その際の質的、量的安全性を確認することを本試験の主な目的とする。また、治療効果の判定を行い、腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる分子生物学的効果、ベクターの感染、HSV-tk 遺伝子の発現、アポトーシスの誘導について解析する。</p>	
対象疾患	<p>外科的切除により根治不能な局所的に進行した前立腺癌症例で、内分泌療法（放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に、腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (PSA: Prostate Specific Antigen) を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌と診断され、かつ臨床的に遠隔転移を認めない患者を対象とした。</p>	
実施方法	<p><u>前立腺への遺伝子導入：</u></p> <p>HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを直接前立腺癌患者の組織内に注射することにより HSV-tk 遺伝子を導入する。経直腸的超音波を用い病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を1ないし2カ所（最大2カ所）に注入する。注入後、針を抜去する。ウイルスベクター液は原則1mlとした。HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの注入量は当初レベル1：10^9PFU、レベル2：10^{10}PFU、レベル3：10^{11}PFUと設定したが、本臨床研究の共同研究者である米国ベイラー医科大学で実施された遺伝子治療臨床研究の結果で同じ HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの至適投与量は低い副作用発現率と同等の臨床効果という観点から 1×10^{10}PFU と判明したので、当初予定していた高用量（レベル3：1×10^{11}PFU）の投与は施行せず、低用量（レベル1）と中用量（レベル2）を投与した。</p> <p><u>ガンシクロビル (GCV) の投与：</u></p> <p>本来活性を持たない薬剤（プロドラッグ）であるガンシクロビルの投与は遺伝子導入24時間後から開始する。1回投与量は体重1kgあたり5mgとし、1日2回14日間（計28回）とした。体重あたりの投与量より換算された量の溶解液を100mlの点滴用生理食塩水に注入し1時間かけて静脈内投与した。</p> <p>被験者の病歴・現症や赤血球・白血球数、血小板数、出血・凝固時間、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療前後に行った。治療開始前後の血液を採取し、アデノウイルスに対する抗体の産生をチェックした。治療前及び治療中の臨床効果は PSA 値および画像診断より評価した。</p> <p>可能な症例については HSV-tk アデノウイルスベクター投与後に再度経直腸的前立腺針生検により癌組織を採取し、DNA 及び mRNA を抽出した。癌組織の DNA サンプルより特異的なプライマーを用いて PCR を行い HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの感染を確認した。治療中及び治療後に見られるすべての毒性・副作用は、各治療前後に0-4度で評価された。</p> <p>治療効果は以下の評価指標に基づいて判定された。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Complete Response (CR)：血清 PSA の値が4ng/ml以下に下降し、前立腺生検にて癌病巣が検出されず、癌に関連した症状を認めない場合。 2) Partial Response (PR)：血清 PSA の値が50%以上下降したものの4ng/ml以下には下降しなかった場合。もしくは血清 PSA の値が4ng/ml以下に下降したものの生検で癌細胞を認める場合。 3) No Change (NC)：血清 PSA の値が50%未満の改善か25%未満の増悪を呈した場合。 4) Progressive Disease (PD)：血清 PSA の値が25%以上の増悪を来した場合。も 	

	<p>しくは推定腫瘍体積の 25%あるいはそれ以上の増加が見られた場合。または同等の新しい病変が生じた場合。</p> <p>効果持続期間は効果判定の条件とはせずに、効果発現時期、PR 到達時期、CR 到達時期、病変の増悪時期および患者生存期間を観察し別に明記する（前立腺癌取り扱い規約：前立腺癌の非観血的治療効果判定基準に準拠）。</p>
研究結果の概要及び考察	別紙 1 のとおり
研究成果の公表状況	別紙 2 のとおり

課題名：前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現
アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究

総括責任者：

公文裕巳 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 泌尿器病態学 教授

主な分担研究者：

那須保友 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・泌尿器病態学・助教授

雑賀隆史 岡山大学医学部附属病院・泌尿器科・講師

江原 伸 岡山大学医学部附属病院・泌尿器科・助手

賀来春紀 岡山大学医学部・歯学部附属病院・遺伝子・細胞治療センター・助手

研究協力者

清水憲二 岡山大学医学部附属分子細胞医学研究施設・病態遺伝子解析部門・教授

山田雅夫 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・ウイルス学・教授

Timothy C. Thompson ベイラー医科大学・泌尿器科・教授

Dov Kadmon ベイラー医科大学・泌尿器科・助教授

Estuardo Aguilar-Cordova ベイラー医科大学・小児科・講師

同大学・遺伝子ベクター研究室・室長

米国 NIH・Recombinant DNA Advisory Committee (RAC)・委員

【要旨】

「前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究」を実施した。対象となる被験者は内分泌療法中に再燃してきた臨床的に遠隔転移を認めない局所再燃前立腺癌とした。まず Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で腫瘍内に直接投与し、その後ガンシクロビル (GCV) を全身投与した。本研究は 2001 年 3 月より第 1 例目の被験者の治療を開始し、平成 17 年 7 月に最終登録例である 9 例目の被験者の治療を実施し、6 ヶ月以上観察したので、臨床試験を終了とした (8 名のべ 9 症例)。

9 症例すべてにおいて重篤な副作用は認めなかった。アデノウイルスベクターの前立腺への注入は簡便かつ低侵襲に実施可能であった。ウイルスベクター投与後の抗アデノウイルス中和抗体価の上昇は軽度でかつ一過性であった。ウイルスベクター投与後、48 時間において採取した組織において mRNA レベルでの HSV-tk 遺伝子の発現が確認された。治療効果の指標として腫瘍マーカーである PSA は 9 例中 6 例 (66.7%) において低下した。

結論として局所再燃前立腺癌に対し、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で局所内投与し、その後 GCV を全身投与することの安全性および治療効果が確認された。

【研究目的】

HSV-tk 遺伝子を用いた遺伝子治療は別名「自殺遺伝子治療」と呼ばれ、遺伝子導入を受けた細胞を死に至らしめる治療法である。HSV-tk 遺伝子が導入された細胞に、本来活性を持たない薬剤 (プロドラッグ) であるガンシクロビル (GCV:Ganciclovir) を作用させた場合、GCV は細胞内で発現した thymidine kinase により段階的にリン酸化され、最終的には 3 リン酸化 GCV となり DNA の合成を阻害し、細胞をアポトーシスに導く。本治療法を用いた臨床研究は米国において脳腫瘍、悪性中皮腫、卵巣癌、肺癌、悪性黒色腫、頭頸部癌、前立腺癌に対して施行されており、特に前立腺癌に関する研究はすべてベイラー医科大学ならびにその関連施設からのものである。本研究においては、臨床的に有効な治療法が確立されていない内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌にこの自殺遺伝子治療を適用し、安全性を検討するとともに殺細胞効果によってもたらされる臨床効果を観察する。

本研究は、内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌に対し、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で局所内投与し、その後 GCV を全身投与した場合の

1) 安全性の検討 (最大耐量の推定)

2) 治療効果の観察 (評価可能症例)

を目的とする。

内分泌療法中に再燃してきた前立腺癌症例で、臨床的に遠隔転移を認めない局所再燃前立腺癌に対し、まず HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で腫瘍内に直接投与し、その後 GCV を全身投与する。その際の質的、量的安全性を確認することを本試験の主な目的とする。また、治療効果の判定を行い、腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる分子生物学的効果、ベクターの感染、HSV-tk 遺伝子の発現、アポトーシスの誘導について解析する。

【実施方法】

遺伝子導入方法：

経直腸的超音波を用い病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い HSV-tk アデノウイルスベクターの溶液を1ないし2ヵ所（最大2ヵ所）に注入する。穿刺に関しては一般臨床に用いている装置を用いたが、注入に関しては岡山大学で作成したベクター注入装置を用いて行った（特許申請中）。注入後、針を抜去する。ウイルスベクター液は原則1ml とする。注入そのものにより前立腺部の一過性の腫大を来し、尿閉を生じることがまれにあるため、尿道カテーテルを注入直後に留置し、翌日抜去する。

HSV-tk アデノウイルスベクターの注入量は当初レベル1： 10^9 PFU、レベル2： 10^{10} PFU、レベル3： 10^{11} PFU と設定したが、本臨床研究の共同研究者である米国ベイラー医科大学で実施された遺伝子治療臨床研究の結果では同じ HSV-tk アデノウイルスベクターの至適投与量が低い副作用発現率と同等の臨床効果という観点から 1×10^{10} PFU と判明したので、当初予定していた高用量（レベル3： 1×10^{11} PFU）の投与は施行せず、低用量（レベル1）と中用量（レベル2）を投与した。

ガンシクロビル (GCV) の投与：

ガンシクロビルの投与は遺伝子導入 24 時間後から開始する。腎機能正常例での1回投与量は体重1kgあたり5mgとし、1日2回14日間（計28回）とする。薬剤は500mgが1バイアルに包装されており10mlの生理食塩水で溶解し50mg/mlに調整する。体重あたりの投与量より換算された量の溶解液を100mlの点滴用生理食塩水に注入し1時間かけて静脈内投与する。腎機能障害例ではその障害の程度に応じて減量もしくは投与間隔を変更する。

被験者の病歴・現症や赤血球・白血球数、血小板数、出血・凝固時間、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療前後に行った。治療開始前後の血液を採取し、アデノウイルスに対する抗体の産生をチェックした。治療前及び治療中の臨床効果はPSA値および画像診断より評価した。

可能な症例についてはHSV-tkアデノウイルスベクター投与後に再度経直腸的前立腺針生検により癌組織を採取し、DNA及びmRNAを抽出した。癌組織のDNAサンプルより特異的なプライマーを用いてPCRを行いHSV-tkウイルスベクターの感染を確認した。治療中及び治療後に見られるすべての毒性・副作用は、各治療前後に0-4度で評価された。

治療効果はPSAが最大下降を示した時点で以下の評価指標に基づいて判定された。

- 1) Complete Response (CR)：血清PSAの値が4ng/ml以下に下降し、前立腺生検にて癌病巣が検出されず、癌に関連した症状を認めない場合。
- 2) Partial Response (PR)：血清PSAの値が50%以上下降したものの4ng/ml以下には下降しなかった場合。もしくは血清PSAの値が4ng/ml以下に下降したものの生検で癌細胞を認める場合。
- 3) No Change (NC)：血清PSAの値が50%未満の改善か25%未満の増悪を呈した場合。
- 4) Progressive Disease (PD)：血清PSAの値が25%以上の増悪を来した場合。もしくは推定腫瘍体積の25%あるいはそれ以上の増加が見られた場合。または同等の新しい病変が生じた場合。

効果持続期間は効果判定の条件とはせずに、効果発現時期、PR到達時期、CR到達時期、病変の増悪時期および患者生存期間を観察し別に明記する（前立腺癌取り扱い規約：前立腺癌の非観血的治療効果判定基準に準拠）。

（倫理面への配慮）

被験者へのインフォームドコンセントのために作成した文書は新GCPに乗っ取って作成されており、治療遺伝子やベクターに関しても図を多用してできるだけ平易な言葉で説明している。また、米国で進行中の臨床試験の安全性や治療効果の情報も網羅されている。本研究の「実施計画書」および「説明と同意書」は、遺伝子治療臨床研究審査委員会承認されており、また厚生省先端医療技術評価部会および文部省遺伝子治療臨床研究専門委員会が倫理的妥当性について了承されている。

【研究結果】

2001年3月第1例目を施行し、現在までに8名のべ9症例に対して実施しており、臨床研究を終了し

た(表1)。HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの低用量(レベル1: 1×10^9 PFU)の投与は3例、中用量(レベル2: 1×10^{10} PFU)は6例の投与を行った。この内、中用量を投与した1例(症例7)は低用量投与後(症例3に該当、2002年3月26日投与)にPSAが低下したため経過観察を行っていたが再度上昇したため、初回投与後より2年後(2004年4月7日)に2回目の遺伝子治療を行った症例である。(症例3,7は同一患者である。)

本臨床研究の共同研究施設である米国ベイラー医科大学で実施された遺伝子治療臨床研究の結果でHSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの至適投与量は低い副作用発現率と同等の臨床効果という観点から 1×10^{10} PFU と判明したので、当初予定していた高用量(レベル3: 1×10^{11} PFU)の投与は施行せず、中用量は予定より3例を追加した。以下にベイラー医科大学での経過の概略を記載する。まず初期

の18例においては 1×10^{10} PFU 投与の4例中2例に grade1 の発熱、 1×10^{11} PFU 投与の5例中2例に grade2 の発熱が出現し、 1×10^{11} PFU 投与の5例目に血小板減少症(grade4)、肝機能障害(grade3)が出現し試験は中止となった(当該症例については、審査段階で確認・討議されておりベクターが誤って静脈内に投与されたことが原因と考えられている)。治療効果的にはPSAが50%以上下降した症例を 1×10^{10} PFU、 1×10^{11} PFU 投与各群に一例ずつ認めた。(Herman. Human Gene Therapy 10 :1239, 1999.)その後、試験を継続拡大し18例の追加投与が行われ、その際には 1×10^{10} PFU を中心に 1×10^{10} PFU 11例、 2.5×10^{10} PFU 3例、 3.0×10^{10} PFU 4例実施されている。(Miles. Human Gene Therapy 12:1955, 2001)

表1 Patients Characteristics

Patients no.	Age	Stage	Gleason Score	Prior-treatment	Pre-treatment PSA(ng/ml)
Level 1					
1	65	C	5+5	Castration	23.2
2	61	C	5+4	LH-RH+XRT	4.1
3*	78	B	3+3	LH-RH	4.0
Level-2					
4	64	C	4+5	LH-RH	26.0
5	69	C	5+4	LH-RH	21.8
6	70	C	4+5	LH-RH	29.9
7*	80	B	3+3	LH-RH	7.0
8	80	C	5+4	LH-RH	8.8
9	66	C	5+3	LH-RH +XRT	14.6

*: same patients

1) 安全性:

研究期間を通じて grade3 もしくは grade4 の重篤な副作用は認められなかった。副作用についてその詳細を表2に示すがいずれも grade1-2 であり特に治療を要せず自然軽快した。副作用により治療を中止した症例は認められなかった。

血尿、頭痛、発熱、嘔気などをアデノウイルスベクター注入当日から三日目までに認めたが軽度であり自然軽快した。CRPの軽度かつ一過性上昇を高用量投与群の6例中4例に認めた。

表2 Adverse Events

Patients no.	Increased CRP	Hematuria	headache	Dermoreaction	Others
Level 1					
1		Grade 1			Voiding disturbance, Pollakisuria, Increased LD, Nausea
2					
3			Grade 1		
Level 2					
4	Grade 1	Grade 1		Grade 2 (eczema)	Fever, Lükocytopenia
5	Grade 1		Grade 1		Increased T bil.
6	Grade 1				Micturition pain
7		Grade 1			
8	Grade 1				
9					

2) 手技の簡便性、低侵襲性

前立腺へのベクター注入は経直腸的超音波を用い超音波に装着された穿刺利用ガイド装置を用いて実施されたが、手技的には一般臨床にてルーチンに実施されている前立腺生検術(通常:無麻酔下、外来処置もしくは短期入院)と同様である。ベクターの注入に関してもわれわれが考案した注入装置により術者が足元のスイッチを用いて正確かつ迅速に注入することが可能となった。そのため超音波装置を挿入し、注入を終え超音波装置を抜去するまでの所要時間は10-20分である。現時点では腰椎麻酔下にて実施しているが、将来は米国同様無麻酔にて実施可能と考える。

3) 生体内分布:

血液中へのアデノウイルスベクターの移行は低用量群においては認められず、中用量群において投与30分をピークに認められたが翌日には消失した。尿中への移行は投与直後において認めたが多くの場合は2日目に消失した(別表)。ウイルスベクター投与後の抗アデノウイルス中和抗体価の上昇は軽度で

かつ一過性であった（別表）。ウイルスベクター投与後、48 時間において採取した組織において mRNA レベルでの HSV-tk 遺伝子の発現が確認された（検討可能であった症例 1, 2, 4, 6）。

4) 臨床効果：（別表）

治療効果の指標として腫瘍マーカーである PSA は 9 例中 6 例（66.7%）において低下した。PSA の低下した 6 例の PSA 減少率（PSA reduction）は 6.7-43.9%（平均 24.1%）であった。PSA が低下した症例においてはベクター投与後 3-4 週間の時点において PSA は最大下降を示した。2 回投与を行った 1 名（のべ 2 症例）では、低用量である 1×10^9 PFU 投与後（症例 3 に該当、2002 年 3 月 26 日投与）に PSA が低下したため経過観察を行っていたが投与再度上昇したため、初回投与後より 2 年後（2004 年 4 月 7 日）に中用量である 1×10^{10} にて 2 回目の遺伝子治療を行った（症例 7 に該当）。

PSA 下降例 6 例についてはその後 PSA は徐々に上昇をきたし、5 例は PSA 最大下降時から中央値 3 ヶ月（2-7 ヶ月）で治療前値にまで戻った（PSA が治療前値にまで戻る期間：TR-PSA the time of return to initial PSA として別表に記載）。1 例（症例 7）は 13 ヶ月の時点で治療前値には戻っておらず LH-RH 投与のみ経過観察中である。

転帰であるが、PSA の下降を示さなかった 3 例中 2 例（症例 1,2）は死亡した（症例 1 は前立癌による死亡、症例 2 については経過中に大腸がんを発症、両者とも進行し死亡）。経過の追跡が可能であった他の 5 症例（症例 3,4,7,8,9）については現在生存中である。症例 7（3 と同一症例）については LH-RH 投与のみにて経過観察中であり、症例 4,8,9 については LH-RH の継続投与と抗がん剤もしくは抗アンドロゲン剤による治療を実施中である。

【考察】

前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療は、安全かつ簡便に施行可能であることが明らかとなった。

生体内分布の解析により、血液中にはほとんど移行せず、尿中へのベクターは翌日にはほとんどの例で消失しており最大でも 2 日目には全例消失しており、将来的には原則投与後 24 時間の個室隔離期間を含めた短期間の入院にて治療可能となることが示唆された。このことは前立腺組織に治療用アデノウイルスベクターを注入することの安全性を確認したこととなり、今後類似の遺伝子治療臨床研究を実施する上において有益な情報となる。

治療が行われた 9 例中 6 例（66.7%）に PSA の低下が認められ、2 回投与を行った 1 名（のべ 2 症例）では、用量を 10 倍上げた 2 回目にも PSA の低下が認められ、複数回の投与の安全性も示唆された。

本治療は簡便かつ低侵襲にかつ複数回実施可能であり、QOL を低下することなく治療可能であり高齢者や合併症を有する患者にも恩恵があると思われる。

今回の一連の結果は、先行する米国ベイラー医科大学で前立腺癌放射線治療後の再発症例に対して同じく HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて実施された研究結果（Miles et al: Human Gene Therapy 12: 1955-67, 2001: 36 例中 27 例 78%の症例に PSA の低下をみとめ、複数回投与での有効性を確認）とほぼ同様の結果を得ることが出来たことになる。内分泌療法後の再燃症例に対する当該遺伝子治療の有効性をヒトにおいて確認したという点においては世界で最初である。

現在は倫理的観点から有効な治療法が確立されていない内分泌療法再燃患者が対象であるが、今回当該治療法の安全性が確認され、有効性も示唆されたことにより積極的に他の治療法との併用を検討することが可能となる。例えば、外科的切除可能な症例に術前投与することで腫瘍サイズの縮小を期待したり、またネオアジュバント効果としての再発ならびに転移を抑制することも期待できる（米国ベイラー医科大学で実施中、北里大学申請中）。放射線療法、内分泌療法との併用も可能と考えられる（米国ベイラー医科大学で実施中）。すなわち、より早期の患者に使用することが可能となり、集学的治療法の 1 つの選択肢として考えられるようになると期待される。また岡山大学では次のステップとして Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究を前立腺癌を対象として実施計画中であるが、その安全性と有効性が確認されれば、両者の併用による臨床研究も実施可能となる。分担研究者である那須は研究協力者のベイラー医科大学 Thompson 博士らとともにすでに両者の併用効果を動物実験にて確認しており、ヒトでの効果発現を期待したい。

【結論】

前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療は安全、簡便かつ低侵襲に施行可能であった。さらに投与部位における導入遺伝子の発現が確認され、治療効果も認められた。