

遺伝子治療臨床研究実施計画の申請及び遺伝子治療臨床研究に
係る生物多様性影響評価に関する申請について
(東京大学医学部附属病院)

(遺伝子治療臨床研究実施計画の申請)

- 諮問及び付議 P1
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書及び概要書 P3
- 同意説明文書 P24
- 厚生科学審議会科学技術部会
がん遺伝子治療臨床研究作業員会委員名簿 P42

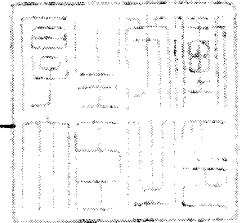
(遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する申請)

- 諮問及び付議 P43
- 第一種使用規程承認申請書 P45
- 生物多様性影響評価書 P48
- 厚生科学審議会科学技術部会遺伝子治療臨床研究作業員会遺伝子治療
臨床研究に係る生物多様性影響評価に関する作業委員会 P63

厚生労働省発科第 1116001 号
平成 19 年 11 月 16 日

厚生科学審議会会長
久 道 茂 殿

厚生労働大臣 舛 添 要



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成 11 年法律第 97 号）第 8 条第 1 項第 1 号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

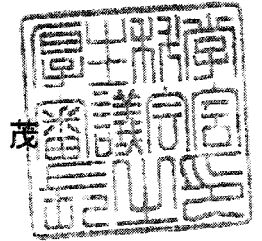
記

平成 19 年 10 月 23 日に東京大学医学部附属病院病院長から提出された「進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δ を用いた遺伝子治療（ウイルス療法）の臨床研究」計画

厚科審第11号
平成19年11月16日

科学技術部会部会長
垣添 忠生 殿

厚生科学審議会会長
久道 茂



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成19年11月16日付け厚生労働省発科第1116001号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規程第3条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

別紙様式第1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成19年10月23日

厚生労働大臣 舩添 要一 殿

実施施設	所在地	東京都文京区本郷 7-3-1 (郵便番号 113-8655)
	名称	東京大学医学部附属病院 03-3815-5411 (電話番号)
	代表者 役職名・氏名	東京大学医学部附属病院 病院長 武谷 雄二

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画書に対する意見を求めます。

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
進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δを用いた遺伝子治療 (ウイルス療法) の臨床研究	東京大学医学部附属病院・脳神経外科・講師 藤堂 具紀



遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 概 要 書

平成 19 年 10 月 23 日

〈申請年月日〉

研究の名称	進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δを用いた遺伝子治療（ウイルス療法）の臨床研究		
研究実施期間	平成	年	月 日（承認日）から 5 年間

総括責任者	所属部局の所在地	113-8655 東京都文京区本郷7-3-1	
	所属機関・部局・職	東京大学医学部附属病院・脳神経外科・講師	
	氏名	藤堂 具紀	
実施の場所	所在地	113-8655 東京都文京区本郷7-3-1	
	名称	東京大学医学部附属病院	
	連絡先	03-3815-5411	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	稲生 靖	東京大学・大学院医学系研究科・脳腫瘍分子治療研究ユニット・特任講師	総括責任者補佐。ウイルス管理と準備。患者の手術、術前術後管理。データ管理。標本の管理と処理。
	田中 実	東京大学・医学部附属病院・輸血部・助教	患者の手術と術前術後管理。ウイルス準備補佐。標本の管理補佐と処理。

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	<p>審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究実施計画は平成 14 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号「遺伝子治療臨床研究に関する指針」平成 14 年 3 月 27 日告示（平成 16 年 12 月 28 日全部改正）の必要条件を満たしていると認めた。</p> <p>さらに非臨床試験成績から、従来の治療法では対処困難である進行性膠芽腫に対し治療効果が期待できること、さらに本研究で使用される組換えウイルスの品質および安全性は十分に保証されるものと認められたため、所轄官庁に臨床研究実施計画を申請することを決定した。なお、患者に発生する費用の説明について議論があった。（承認：平成 19 年 1 月 31 日）</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
	東京大学医学部遺伝子治療臨床研究審査委員会 委員長 東京大学大学院医学系研究科医療倫理学分野 教授	赤林 朗

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究（ウイルス療法） 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>本研究は、初期放射線治療にもかかわらず再増大または進行する膠芽腫の患者に対して遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスI型である G47Δの定位的腫瘍内投与を行う。オープンラベル方式によりコホート単位で3段階に用量を増加し、安全性の評価すなわち有害事象の種類と発生頻度の調査を主目的とする。副次目的として、画像上の腫瘍縮小効果や全生存期間、無増悪生存期間により G47Δの効果の評価する。</p>
対象疾患及びその選定理由	<p>(1) 対象疾患に関する現時点での知見</p> <p>原発性脳腫瘍は人口 10 万人に年間 11~12 人発生するとされ、国内全体では年間 13,000~14,000 人程度となる。脳腫瘍全国統計によれば、原発性脳腫瘍の組織分類別の発生頻度は神経膠腫 26%、髄膜腫 27%、下垂体腺腫 18%、神経鞘腫 10%である。神経膠腫は神経細胞の支持組織であるグリア細胞から発生する原発性脳腫瘍であり、星細胞腫が神経膠腫の約 80%を占める。</p> <p>星細胞腫はその病理学的悪性度により Grade 1~Grade 4 に細分類される。本試験の対象となる Grade 4 は膠芽腫とも呼ばれ予後が不良である。膠芽腫は、神経膠腫の 32%を占め 5 年生存割合は 6%である。神経膠腫は脳実質内に発生し浸潤性に発育するが、その中でも膠芽腫は特にその傾向が強く、境界が不鮮明で増殖速度も速く、各種治療を行っても再発は必至である。</p> <p>膠芽腫の確定診断は組織学的診断によるため、画像診断にて膠芽腫が考えられる場合、手術による摘出術か生検が行われる。しかし、手術で腫瘍を全摘することは機能温存のため通常不可能であり、一般に術後には補助療法が行われる。術後補助療法は、現在はアルキル化剤である temozolomide と局所照射 60Gy を用いた放射線化学療法が欧米では標準治療として行われている。国内では、nitrosourea 系のアルキル化剤 ACNU と局所照射が従来最も一般的に行われてきたが、最近 ACNU に代わり temozolomide も使用されるようになった。他の化学療法薬が使用されたりインターフェロンβが併用されることもある。</p> <p>膠芽腫は一般的に放射線抵抗性であり、化学療法への反応も低く、補助療法中にも治療に反応せず腫瘍が増大する症例もしばしば見られる。手術や診断技術の目覚ましい進歩にもかかわらず、膠芽腫の治療成績はこの 40 年間ほとんど改善が見られておらず、その生存期間中央値は、診断後約 12-14 ヶ月とされる。東京大学医学部附属病院におけるテント上膠芽腫の治療成績は、生存期間中央値では 60Gy の照射で 12.4 ヶ月、80-90Gy の照射で 16.2 ヶ月、2 年生存率は 60Gy の照射で 11.4%、80-90Gy の照射で 38.4%である。</p> <p>現在再発時に有効な治療法として確立されたものはない。脳の耐容線量のため有効線量の追加照射は困難または無効な場合が多く、化学療法も種々の薬剤や投与方法が試みられてきた中で、再発に対して有効性が確立されたものはない。</p> <p>このように、初期放射線治療後に進行した膠芽腫には有効な治療法が存在せず、予後は不良であり、従来とは異なるアプローチによる新たな治療法の開発が不可欠と考えられる。</p> <p>(2) 当該臨床研究の概要</p> <p>ウイルス療法 (oncolytic virus therapy) は、腫瘍細胞内で選択的に複製する増殖型ウイルスを腫瘍細胞に感染させ、ウイルス複製に伴うウイルスそのものの直接的な殺細胞効果により腫瘍を治療する方法である。腫瘍内でのウイルスの複製能を最大限に保ちつつ、正常組織での病原性を最小限に押さえるため、ウイルスゲノムに人為的な遺伝子操作による改変を加えた遺伝子組換えウイルスを用いる。腫瘍細胞に感染した増殖型遺伝子組換えウイルスは腫瘍細胞内で複製し、その過程でウイルスに感染した細胞は死滅する。複製したウイルスはさらに周囲の腫瘍細胞に感染し、その後複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。ウイルス複製に伴い感染した腫瘍細胞は死滅するため、外来治療遺伝子を導入せずに腫瘍を治癒させることが可能であると期待される¹⁾。脳腫瘍、特に神経膠腫は、定位的脳手術等により比較的容易かつ確実にウイルスの腫瘍内直接投与が行えることや、神経組織という高度に分化した非増殖細胞からなる組織に囲まれていること、腫瘍の他臓器への転移が稀であること、著効を示す治療法が存在していないことなどから、ウイルス療法の臨床試験対象に適している。</p> <p>脳腫瘍の分野のウイルス療法では、単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) の開発が進んでいる。HSV-1 が脳腫瘍治療に適していると考えられるのは、次のような利点に基づいている。すなわち、HSV-1 は元来神経組織に親和性が高い上に、1) ヒトのほぼ全ての種類の細胞に感染可能である、2) 比較的低い multiplicity of infection (MOI; 細胞数に対する感染性ウイルス投与量の比) で全ての細胞の死滅が可能である、3) 脳における病原性を呈するのに必要なウイルス遺伝子が解明されており、遺伝子操作を加えることで病原性の除去が可能である、4) HSV-1 に感受</p>

性を示すマウスが存在するために、動物で安全性や効果の前臨床的評価を行える、5) 抗ウイルス薬が存在するために治療を中断することが可能である、6) ウイルス自体の免疫原性が比較的 low、血中抗 HSV-1 抗体が細胞間ウイルス伝搬に影響しない、7) ウイルス DNA が宿主細胞のゲノムに取り込まれない、という特徴を有する。

本臨床研究では、複製型遺伝子組換え HSV-1 である G47Δ を、初期放射線治療後の進行性膠芽腫の患者の腫瘍内に定位手術的に注入する。G47Δ は、米国で再発悪性グリオーマを対象として臨床試験（第 I 相）で用いられた第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 の G207 を改良した第三世代で、腫瘍細胞を破壊しつつ腫瘍内で複製するが、正常脳組織は傷害しないと考えられる²⁾。G207 および G47Δ についての詳細は「遺伝子の種類及びその導入方法(8)」の欄に記載する。治療効果と複数回投与の安全性確認のため、投与は 2 回行う。3 段階の用量増加にて安全性の評価すなわち有害事象の種類と発生頻度の調査を行うことを主目的とする。副次目的として、画像上の腫瘍縮小効果や全生存期間、無増悪生存期間により G47Δ の効果を評価する。

(3) 他の治療法との比較及び当該治療法を選択した理由

初期放射線治療にもかかわらず進行または再発した膠芽腫に対して有効性が確認されている治療法は現在なく、治療手段は非常に限られている。手術で再度の摘出を行える場合は摘出術を試みるが、症状を悪化させずに再摘出を行える例は少ない。初期放射線治療では、脳の耐容線量の限界まで照射を行うため、追加放射線照射には線量、照射部位ともに限りがあり、有効性は期待できない。化学療法は、薬剤を変更して行われることがあるが、副作用もあり、有効性の確立されたものはない。総じて、化学療法および放射線治療に対する膠芽腫の感受性は低く、初期治療期間中の腫瘍増大もしばしば認められる。40 年来治療成績の向上がほとんど見られていないことから、膠芽腫の治療には全く新しいアプローチが必要であることは明白であり、ウイルス療法は有効性が期待される。上述のごとく、ウイルス療法の中でも HSV-1 は脳腫瘍治療に適している。「安全性についての評価 (5) ウイルスの細胞傷害性」に記載のとおり G207 は第 I 相臨床試験において安全性が示され有効性を示唆する所見も得られている。「遺伝子の種類及びその導入方法 (9) G47Δ ウイルスの生物学的特徴」に記載のとおり動物実験において G47Δ は G207 に比し優れた腫瘍縮小効果と同等以上の安全性を示す。G47Δ は、安全性と効果を高めた最新世代の複製型遺伝子組換え HSV-1 で、進行が早く予後が極めて不良な進行性の膠芽腫の患者にも効果が期待できる。

(引用文献)

1. Todo T, Martuza, RL, Rabkin, SD, et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6396-6401. 2001.
2. Hunter WD, Martuza, RL, Feigenbaum, F, et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. J. Virol. 73: 6319-6326. 1999

<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質 本臨床研究では、複製型遺伝子組換え HSV-1 である G47Δ そのものが直接腫瘍細胞を破壊するものであり、治療目的で人に導入される外来治療遺伝子はない。なお、G47Δ にはウイルス複製を検出するために大腸菌 LacZ 遺伝子 cDNA が挿入されており、G47Δ が複製する腫瘍細胞に導入され一過性に発現される。</p> <p>(2) 導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性 LacZ 遺伝子からの生成物は β-ガラクトシダーゼである。β-ガラクトシダーゼは分子量 116 kDa で四量体として機能し、ラクトースを分解してグルコースとガラクトースを生成する。β-ガラクトシダーゼは人体に対し毒性や病原性を有しない。「安全性についての評価 (5) ウイルスの細胞傷害性」に記載の如く、LacZ 遺伝子を発現する第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 である G207 が第 I 相臨床試験において人の脳内（脳腫瘍内）に投与されており、LacZ 遺伝子生成物の安全性は示されている。</p> <p>(3) 本研究で使用するその他の組換え DNA の構造と性質 本計画では他の組換え DNA は使用しない。</p> <p>(4) 標的細胞とした細胞の由来及び当該細胞を標的細胞とした理由 本研究での標的細胞は膠芽腫の腫瘍細胞そのものであり、G47Δ が感染した標的細胞でウ</p>
-----------------------	---

ウイルス複製が行われる過程で腫瘍細胞が直接破壊される。

(5) 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

G47Δは定位的脳手術により腫瘍内へ直接投与する。定位的腫瘍内直接投与は、標的腫瘍細胞へ最も効率よく、また選択的にウイルスを感染させることができる方法の一つである。

(6) 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

HSV-1はエンベロープを持つ二重鎖DNAウイルスである。ゲノムの大きさが約152kbであり、約80のウイルス遺伝子を持つ。ゲノムは両端に特徴的な繰り返し配列がある。ヒトを宿主とし、「口唇ヘルペス」として知られ、野生型ウイルスの初期感染は一般に軽症あるいは無症状である。まれに、角膜炎や脳炎を起こす。ヘルペス脳炎の発生は日本の調査では年間100万人に2.9人¹⁾、欧米では年間20万人に1人である。発癌性はない。免疫不全や新生児など特殊な条件を除くと、HSV-1はウイルス血症を生じることがなく、初期感染後全身に分布しない。成人の60~70%は抗HSV-1抗体を保持している。抗ウイルス薬が存在し、重症の場合アシクロビル、バラシクロビルなどで治療される。

HSV-1は、ヒトの粘膜表面（通常は口腔咽頭）への直接の接触により感染する。接触感染以外の感染形式はない。感染した局所で複製した後、神経末端から感覚神経節（しばしば三叉神経節）にウイルスは移送され、潜伏感染(latency)を確立する。潜伏感染においてはウイルスの複製は行われず、別の宿主への感染性を有しない。潜伏感染から再活性化(reactivation)が起きると、ウイルスは皮膚粘膜（通常は口唇）で顕在化し、水疱を形成する。

HSV-1は、エンベロープが破壊・変性すると容易に感染性を失う。宿主から離れると常温では約7日で死滅する。Biosafety上、消毒薬(chemical disinfectants)に対する感受性の点でlipid virusesに分類され、微生物の中で消毒薬に対する感受性が最も高い。物理的不活化(physical inactivation)として、HSV-1は56°C(30分間)の加熱や紫外線照射(15分間)、pH4以下で速やかに感染性を失う。

(7) G47Δウイルスの作製方法

試験薬である複製型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型G47Δは、院内製剤としてcGMP準拠施設である東京大学医科学研究所治療ベクター開発室にて製造される。製造は、東京大学医学部脳神経外科・講師・藤堂具紀を責任者とし、東京大学医学部脳神経外科が行なう。マスターセルバンク、マスターウイルスストック制を採用し、使用する試薬もcGMP準拠のものまたは医薬品規格のものを使用する。製造の4工程、すなわち、マスターセルバンク、精製前のウイルス回収液(バルクハーベスト)、精製後のウイルス、およびチューブに分注後の製剤において、英国BioReliance社に委託して品質試験を施行する。

(8) G47Δウイルスの構造

エンベロープおよびその内側のキャプシドは野生型HSV-1と同じである。G207は二重の人為的変異を有し、二つの異なる機序で腫瘍特異的なウイルス複製を達成させ、臨床応用された第二世代複製型遺伝子組換えHSV-1である。G47ΔはG207の改良型で、第三世代複製型遺伝子組換えHSV-1に位置づけられる。正常組織では複製せず腫瘍細胞においてのみウイルス複製を可能にするため、ウイルスゲノムの遺伝子組換え操作により、3つの非必須遺伝子(合計4箇所)が人為的に除去或いは不活化されている。すなわち、2つコピーが存在する γ 34.5遺伝子の双方の欠失と、マーカーのLacZ遺伝子の挿入によるICP6遺伝子(ribonucleotide reductase(RR)の大サブユニットをコードする)の不活化、および α 47遺伝子の欠失という三重変異を有する。

G47Δは、 γ 34.5遺伝子欠失とICP6遺伝子不活化の二重変異を有する遺伝子組換えHSV-1 G207のウイルスゲノムに、 α 47遺伝子の欠失変異を加えることによって作製された。 γ 34.5はHSV-1の病原性に関連した遺伝子で、これを欠失させた変異株は正常細胞でのウイルス複製能が著しく減弱する。正常細胞ではウイルス感染が起こると二本鎖RNA依存性プロテインキナーゼ(double stranded RNA-activated protein kinase: PKR)がリン酸化され、それが翻訳開始因子eIF-2aをリン酸化し、その結果ウイルス蛋白を含む細胞内での蛋白合成が遮断される。 γ 34.5遺伝子産物はこのリン酸化PKR機能に拮抗してウイルス蛋白の合成を可能にするが、 γ 34.5遺伝子欠失HSV-1は正常細胞では複製できないことが判明している¹⁾。しかし、正常細胞と異なり、腫瘍細胞では普遍的に感染に伴うPKRのリン酸化が低いため、 γ 34.5遺伝子欠失のHSV-1でも複製可能となると考えられている²⁾。RRはウイルスDNA合成に必要な酵素であるが、この遺伝子を不活化すると、ウイルスは非分裂細胞では複製できず、分裂が盛んでRR活性の上昇した細胞でのみウイルスの欠落酵素が補われてウイルス複製が可能となる。

α 47 遺伝子のコードする蛋白質は、宿主細胞の抗原呈示関連トランスポーター(TAP)を阻害して細胞表面の MHC Class I の発現を抑えることによって、ウイルス蛋白の提示を抑制し、宿主の免疫サーベイランスから逃れる作用を有する。従って α 47 遺伝子欠失 HSV-1 では宿主細胞の MHC Class I 発現が維持され、抗腫瘍免疫細胞に対する刺激が強くなると期待される。また G47 Δ は、 α 47 遺伝子と重なる US11 遺伝子のプロモーターも欠失するため、US11 遺伝子の発現時期が早まり、これが γ 34.5 変異の second site suppressor として機能して γ 34.5 欠失 HSV-1 において減弱したウイルス複製能を腫瘍細胞に限って復元する。

これらの三重変異により、G47 Δ は、ウイルス複製に関して高い腫瘍特異性を示し、腫瘍細胞に限局した高い殺細胞効果を呈する一方、正常組織では毒性を呈さない。親ウイルス G207 に比較して、その安全性を維持しながら、抗腫瘍効果が格段に改善された。また G207 に比べ、高い力価のウイルス製剤が生産できることもあり、同じ容量でも高い治療効果が期待できる。G47 Δ は、ウイルスゲノム上、間隔の離れた 4 箇所的人為的変異を有することから、野生型 HSV-1 に戻る(revert)可能性がゼロに等しい点でも安全性の高いゲノム構造となっている。G47 Δ は HSV-1 strain F 由来であることから、37°C では複製するが 39.5°C では複製しないという温度感受性を有する。

(9) G47 Δ ウイルスの生物学的特徴

① 培養細胞におけるウイルス複製能力：

G47 Δ は、臨床応用された第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 の改良型であることから、G47 Δ の生物学的特徴については G207 との比較検討が主になされた。ヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH、ヒト膠芽腫細胞株 U87MG、ヒト膠芽腫細胞株 U373、ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞株 SQ20B、およびアフリカミドリザル腎細胞株 Vero において、G47 Δ は G207 に比し優れた複製能力を示し、multiplicity of infection (MOI) = 0.01 にて感染後 24 時間後の産生ウイルスの回収量は G207 に比し 4 倍から 1000 倍高かった³⁾。U87MG は MOI=2 でも検討を行い、感染後 24 時間後のウイルスの回収量は G207 に比し 12 倍高かった³⁾。ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP および Du145 においても、MOI=2 で感染させた 24 時間後の G47 Δ の産生ウイルス回収量は G207 に比し 22 倍高かった⁴⁾。

② 培養細胞における殺細胞効果：

ヒト膠芽腫細胞株 U87MG、U373、U138、ヒト悪性黒色腫細胞株 624 および 888 においては MOI = 0.01 にて、またマウス神経芽細胞腫株 Neuro2a においては MOI=0.1 にて、感染後 3-4 日で G47 Δ は G207 に比しより速やかに細胞を死滅させた。U87MG 細胞株において G47 Δ (MOI=0.01, day3)が 80%の細胞を死滅させたのに対し、G207 は 10%の細胞を死滅させたのみであった³⁾。ヒト前立腺細胞株 LNCaP と DU145 において、MOI=0.1 で、G47 Δ は G207 に比べ有意に速やかな殺細胞効果を呈した⁴⁾。

③ 感染宿主細胞の MHC Class I 発現に対する影響：

ヒト繊維芽細胞株 Detroit551 において、野生型 HSV-1 (strain F) または G207 は、感染 24 時間以内に宿主細胞の MHC Class I の発現を 40%程度にまで低下させたのに対し、G47 Δ は MHC Class I の発現を 100%維持した³⁾。ヒト悪性黒色腫細胞株を用いた検討では、MHC Class I の発現が元来比較的高い 938 株と 1102 株において、G47 Δ は G207 に比べ、感染後の MHC Class I の発現低下を有意に抑制した。MHC Class I の発現が元来低い 624 株、888 株、および 1383 株においては G207 との差は見られなかった。

④ 腫瘍反応性 T 細胞の活性化作用：

ヒト悪性黒色腫細胞株 938 および 1102 において、G47 Δ 感染腫瘍細胞は G207 感染腫瘍細胞に比べ、それぞれの細胞株に特異的に反応する腫瘍浸潤 T 細胞株の刺激によるインターフェロン γ の分泌を 25-40%増加させた³⁾。888 株においては、腫瘍浸潤 T 細胞刺激によるインターフェロン γ の分泌は G47 Δ 、G207 いずれの感染腫瘍細胞でもほとんど見られなかった。

⑤ マウス皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果

ヌードマウスの皮下に形成された U87MG ヒトグリオーマや A/J マウスの皮下に形成された Neuro2a マウス神経芽細胞腫に 1×10^6 plaque-forming units (pfu) を 2 回腫瘍内投与すると、G47 Δ は G207 に比し有意に優れた腫瘍増殖抑制効果を示した。U87MG 皮下腫瘍を有するマウスにおいて、G207 治療群では 12 匹中 3 匹に治癒が見られたのに対し、G47 Δ 治療群は 12 匹

中8匹に治癒が見られた。³⁾

アンドロジェン依存性前立腺癌細胞株であるヒト HONDA およびマウス TRAMP を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいて、G47Δを2回腫瘍内投与すると投与量依存性に腫瘍増殖が抑制された。また前モデルに対しては 2×10^5 pfu 2回、後モデルに対しては 5×10^6 pfu 2回の腫瘍内投与を行い、ホルモン療法を併用するとさらに治療効果の増強が得られた⁴⁾。またホルモン療法後にホルモン不応性となり再発したヒト前立腺癌 HONDA に対しても G47Δの腫瘍内投与は増殖抑制効果を示した⁴⁾。

⑥マウス脳腫瘍に対する抗腫瘍効果：

マウス脳内に形成された U87MG ヒトグリオーマや Neuro2a マウス神経芽細胞腫に対し、それぞれ 1×10^6 pfu 単回および 2×10^5 pfu 2回の腫瘍内投与を行うと、G47Δは G207 に比べ生存期間を延長した。U87MG 対照群の生存期間中央値が 27 日であったのに対し、G207 治療群は 36 日、G47Δ治療群は 42 日と有意に生存期間を延長した。Neuro2a においては対照群の生存期間中央値が 11 日であったのに対し、G207 治療群は 14 日、G47Δ治療群は 15 日と生存期間を延長する傾向が見られた。

⑦マウス皮下腫瘍におけるウイルス複製能：

ヌードマウス皮下に形成された U87MG ヒトグリオーマ腫瘍内に 1×10^6 pfu のウイルスを投与し、48 時間後に複製したウイルス量を測定すると G47Δは G207 に比べ 5 倍高かった。

⑧マウス乳癌モデルにおける抗腫瘍効果：

マウス乳癌細胞株 M6c の皮下腫瘍および脳内移植腫瘍のモデルにおいて、それぞれ 2×10^7 pfu の 4 回腫瘍内投与および 2×10^6 pfu の単回腫瘍内投与を施行したところ、G47Δは G207 に比し有意に優れた抗腫瘍効果を示した^{5,6)}。また、ヒト乳癌 MDA-MB-435 の脳内移植腫瘍に対して血液脳関門開放薬剤との併用で 1×10^7 pfu 単回の頸動脈内投与を行ったところ、対照群の生存期間中央値が 12.9 日であったのに対し、G47Δ治療群は 17.4 日と有意に生存期間を延長した^{5,6)}。乳癌を自然発生する C3(1)/T-Ag マウスモデルにおいて、 2×10^7 pfu の G47Δを毎週 1 回腫瘍内に投与したところ、対照群の生存期間中央値が 5.5 週であったのに対し、G47Δ治療群は 8.5 週と有意に優れた抗腫瘍効果を示した^{5,6)}。

⑨マウス神経線維腫モデルにおける抗腫瘍効果：

マウス神経線維腫症 2 型(NF2)の自然発生腫瘍モデル P0-SchΔ(39-121) line 27 において腫瘍の大きさを経時的に MRI にて観察したところ、 1×10^7 pfu の 6 日おき 2 回の G47Δ腫瘍内投与にて腫瘍増殖が抑制される傾向が見られた。またヌードマウス皮下で継代した NF2 患者由来のヒト神経鞘腫において、 1×10^7 pfu の 6 日おき 2 回の G47Δ腫瘍内投与を行なうと、腫瘍縮小効果が見られた⁷⁾。

⑩ G207 を用いた調査

G207 は、ヒトグリオーマ及び悪性髄膜腫細胞株に対し高い殺細胞効果を示し、*in vitro* では MOI 0.1 で 3-6 日以内に腫瘍細胞を全滅させる。一方、同じ投与量でラットの初代培養の神経細胞や星状細胞には影響を及ぼさない。この効果は *in vivo* にも反映され、ヌードマウスの頭蓋内に形成された U87MG グリオーマや F5 悪性髄膜腫に G207 ($2-5 \times 10^6$ pfu) を 1 回腫瘍内投与すると有意に生存期間が延長する。G207 は現在までに 60 種以上の細胞株で試され、脳腫瘍に限らず、多種のヒトの腫瘍に (血液腫瘍を除く) 有効であることが確かめられている。

正常免疫下における G207 の抗腫瘍効果は、A/J マウス及び同系の N18 (神経芽細胞腫) 細胞や Neuro2a (神経芽細胞腫) 細胞の脳腫瘍および皮下腫瘍モデル、および BALB/c マウスの CT26 (大腸癌) 皮下腫瘍モデルで調べられた。その結果、G207 は正常免疫下においても高い抗腫瘍効果を呈するのみならず、腫瘍内投与により特異的抗腫瘍免疫を惹起するため、抗腫瘍効果が増強されることが示された。この抗腫瘍免疫は腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞活性 (CTL) の上昇を伴い、脳内と皮下のいずれでも効果を示した。同じマウス腫瘍モデルでステロイド投与の影響を調べたところ、免疫抑制下においても腫瘍内のウイルス複製に変化はなく、基本的な抗腫瘍効果に影響は無かったが、ステロイド長期投与では CTL 活性の抑制に伴い、腫瘍の治癒率が減少した。また、成人の 60-70% は HSV-1 に対する抗体を保有するが、予め非致死量の HSV-1 を投与して抗体を形成させたマウスで調べた結果、G207 の抗腫瘍効果は血中の抗 HSV-1 抗体には全く影響されなかった。

	<p>(引用文献)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Chou J, Kem, ER, Whitley, RJ, et al. Mapping of herpes simplex virus-1 neurovirulence to gamma 134.5, a gene nonessential for growth in culture. <i>Science</i> 250: 1262-1266.1990. 2. Farassati F, Yang, AD, Lee, PW. Oncogenes in Ras signalling pathway dictate host-cell permissiveness to herpes simplex virus 1. <i>Nat Cell Biol</i> 3: 745-750.2001. 3. Todo T, Martuza, RL, Rabkin, SD, et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 98: 6396-6401.2001. 4. Fukuhara H, Martuza, RL, Rabkin, SD, et al. Oncolytic herpes simplex virus vector g47delta in combination with androgen ablation for the treatment of human prostate adenocarcinoma. <i>Clin Cancer Res</i> 11: 7886-7890.2005. 5. Liu R, Martuza, RL, Rabkin, SD. Intracarotid delivery of oncolytic HSV vector G47Delta to metastatic breast cancer in the brain. <i>Gene Ther</i> 12: 647-654.2005. 6. Liu R, Varghese, S, Rabkin, SD. Oncolytic herpes simplex virus vector therapy of breast cancer in C3(1)/SV40 T-antigen transgenic mice. <i>Cancer Res</i> 65: 1532-1540.2005. 7. Messerli SM, Prabhakar, S, Tang, Y, et al. Treatment of schwannomas with an oncolytic recombinant herpes simplex virus in murine models of neurofibromatosis type 2. <i>Hum Gene Ther</i> 17: 20-30.2006.
<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 G47Δの投与は脳腫瘍の生検などを目的に一般に用いられる、通常の定位脳手術の手法で行われる。遺伝子組換え HSV-1 の定位脳手術による脳腫瘍内投与法は、G207 の第 I 相臨床試験（米国）でも採用され、G207 に起因する grade 3 以上の有害事象は観察されず、安全性が確認されている。</p> <p>(2) 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度 臨床研究に使用される G47Δ製剤は、cGMP 準拠の管理施設である東京大学医科学研究所治療ベクター開発室において cGMP 生産される。サザンブロット法とゲノムシーケンシングにより正しい変異を有することが確認された G47Δを用い、WHO Vero 細胞のマスターセルバンクを用いて、ウイルスシードストックが作製される。臨床研究用製剤生産の 4 工程において、英国 BioReliance 社に委託して品質試験を施行する。</p> <p>(3) 患者に投与する物質の純度及びその安全性 臨床研究用 G47Δ製剤は、cGMP 生産され、10% グリセリン/磷酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline: PBS)の懸濁液として、滅菌状態で凍結用バイアルに分注され、-75℃以下で凍結保存される。患者に投与する製剤は、cGMP 生産の最終工程として英国 BioReliance 社に委託して品質試験を施行する。</p> <p>(4) 増殖性ウイルス出現の可能性 G47Δ自体が複製可能型であるが、前述の通り、複数の機序を介して、そのウイルス複製は、高い特異性をもって腫瘍細胞に限られる。G47Δは、ウイルスゲノム上、間隔の離れた 4 箇所の人為的変異を有することから、野生型 HSV-1 に戻る(revert)可能性はゼロに等しい。野生型 HSV-1 が既に脳に潜伏している状態で脳内に複製型遺伝子組換え HSV-1 を投与した場合の、潜伏野生型 HSV-1 の活動を誘発する可能性 (reactivation) については、二重変異複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 を用いてマウスで調査されており、潜伏野生型 HSV-1 の活動を誘発しないことが実証された。</p> <p>(5) ウイルスの細胞傷害性 A/Jマウスや BALB/c マウスは、HSV-1 に感受性の高いマウス系として知られる⁸⁾。三重変異を有する第三世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G47Δは、臨床応用を目的に安全性を主眼に開発された第二世代複製型遺伝子組換え HSV-1 G207 の二重変異ウイルスゲノムに更に遺伝子工学的に変異を加えて作製された、G207 の改良型である。A/J マウスを用いて、G47Δ (2 x 10⁶ pfu) の脳内単回投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F; 2 x 10³ pfu) および G207 の可能最高投与量 (2 x 10⁶ pfu) を対照として盲検法で比較した³⁾。野生型 HSV-1 は 10 匹全てで死亡したのに対し、G207 は 2/8 匹が一過性の軽度の外観異常、G47Δは 1/10 匹が一過性の軽度の外観異常を呈したに過ぎず、脳内投与において G47Δが G207 と同等以上の安全性を有していること、野生型 HSV-1 の少なくとも 1000 倍以上安全であることが示された (計画書添付</p>

資料 5(2)12-1)。

更に A/J マウスを用い、G47Δの脳内投与、静脈内投与、腹腔内投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F) を対照に、繰り返し徹底的に調査した(計画書添付資料 5(2)12-2)。脳内単回投与では、野生型 HSV-1 (2×10^3 pfu) で 29/30 匹が死亡したのに対し、G47Δではその 1000 倍量 (2×10^6 pfu) で 30 匹全て、2500 倍量 (5×10^6 pfu) で 29/30 匹が生存した。静脈内単回投与では、野生型 HSV-1 は 1×10^5 pfu で 11/15 匹、 1×10^6 pfu で 22/25 匹、 1×10^7 pfu で 6/10 匹が死亡したのに対し、G47Δは 1×10^7 pfu で 10 匹全て、 4×10^7 pfu で 15 匹全て、 2×10^8 pfu で 19/25 匹が生存した。腹腔内単回投与では、野生型 HSV-1 は、 2×10^4 pfu で 2/25 匹、 2×10^5 pfu で 2/25 匹、 2×10^6 pfu で 3/10 匹が死亡したのに対し、G47Δは試験に用いた 60 匹全てが生存した (1×10^7 pfu が 5 匹、 3×10^7 pfu が 25 匹、 1×10^8 pfu が 20 匹、 3×10^8 pfu が 10 匹)。以上より、脳内単回投与では、G47Δは野生型 HSV-1 に比べ 1000 倍以上の安全性を示すことが再確認された。また、静脈内単回投与や腹腔内単回投与では、野生型 HSV-1 でも全例死亡するほどの毒性を呈するに至らなかったが、死亡例が出始める最低投与量を比較すると、いずれの投与経路においても、G47Δは野生型 HSV-1 に比べ、少なくとも 1000 倍以上の安全性を呈することが示された。

G47Δは G207 の改良型ウイルスであり、G47Δは A/J マウスに対する脳内投与で G207 と同等以上の安全性を示すことが確認されている。G207 に関しても、動物を用いた徹底的な安全性評価が行われている。BALB/c マウスの脳内または脳室内単回投与では最高量 1×10^7 pfu で何の症状も認めず(計画書添付資料 5(2)12-3)、LD₅₀ 量の野生型 HSV-1 の脳内単回投与を生き延びた BALB/c マウスの脳に再度 G207 (1×10^7 pfu) を投与しても潜在 HSV-1 の再活動を誘発しなかった⁹⁾。また、ヨザル (*Aotus nancymae* (owl monkey)) は HSV-1 に感受性が高い霊長類として知られており、合計 22 匹が G207 の安全性評価に用いられた^{10, 11)}。ヨザルの脳に野生型 HSV-1 (strain F) を 10^3 pfu を単回投与すると脳炎を生じて 5 日以内に死亡するが、G207 では 10^9 pfu までの単回投与或いは 10^7 pfu の反復投与でも症状を呈さず、MRI や病理学上も異常を示さなかった¹⁰⁾ (計画書添付資料 5(2)12-4)。カラムで精製した臨床用 (clinical grade) の G207 の安全性は 4 匹のサルで詳細に検討され、 3×10^7 pfu が脳内に単回投与された¹¹⁾。そのうち 2 匹は投与 1 ヶ月後に、2 年前に laboratory grade G207 を 1×10^9 pfu 脳内投与された 1 匹とともに解剖され、全身組織の HSV-1 の分布を PCR 法とウイルス培養により検討し、また病理組織学的変化を検討した。観察期間中、サルは全く無症状の上、1 ヶ月間採取した涙、唾液、膈分泌液からは PCR 法、ウイルス培養いずれでも HSV-1 が検出されなかった。1 ヶ月後の剖検では G207 DNA が脳に限局し、感染性ウイルスは全く検出されず、病理学的には正常であった(計画書添付資料 5(2)12-5, 6)。また、全例で血清抗 HSV-1 抗体が G207 脳内投与約 3 週間後より上昇した。ヨザルを用いた安全性評価の結果は、マウスを用いた安全性評価の結果を再確認した。

G207 を用いた第 I 相臨床試験が、再発悪性グリオーマの患者 21 例を対象に、米国ジョージタウン大学とアラバマ大学バーミングハム校にて行われた。結果は論文で発表されている¹²⁾。一投与量ごとに 3 例ずつ、 1×10^6 pfu から 3 倍ずつ投与量を増やして 3×10^9 pfu まで、増強 CT の増強部位に定位脳手術により腫瘍内に単回投与された。その結果、G207 に起因する grade 3 以上の有害事象は認めず、軽度の adverse events として痙攣発作 2 例、脳浮腫 1 例を認めた。1 例 (3×10^8 pfu) が投与後 24 時間以内に見当識障害と構語障害を呈したが、投与 14 日後の定位的生検は腫瘍所見のみで炎症を認めず、HSV 免疫染色も陰性であった。投与 3 ヶ月以上後の、腫瘍増大では説明できない神経症状悪化が 2 例あったが、いずれも生検で HSV 免疫染色が陰性であった。生検或いは再摘出術で得られた腫瘍組織 7 例中 2 例で PCR にて G207 DNA が検出された(投与後 56 日と 157 日)。G207 投与後、Karnofsky スコアの改善が 6 例 (29%) に認められた。経時的 MRI 評価を行った 20 例中 8 例に腫瘍の縮小を認めたが、脳梗塞で死亡した 1 例を除いた全例にて再増大を認めた。ステロイド投与にも関わらず、術前抗 HSV-1 抗体が陰性であった 5 例中 1 例に陽転を認めた。剖検が 5 例で行われ、脳病理はいずれも脳炎や白質変性を認めず、HSV-1 免疫染色陰性であった。3 例にて腫瘍が脳の 1 領域に限局し、膠芽腫に通常見られるような腫瘍細胞の周囲脳組織への著明な浸潤を認めなかった。脳梗塞で死亡した 1 例では残存腫瘍を認めなかった。この臨床試験で、G207 の 3×10^9 pfu までの脳内投与の安全性が確認された。

(引用文献)

8. Lopez C. Genetics of natural resistance to herpesvirus infections in mice. Nature 258: 152-153. 1975.

9. Sundaresan P, Hunter, WD, Martuza, RL, et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation in mice. *J. Virol.* 74: 3832-3841.2000.
10. Hunter WD, Martuza, RL, Feigenbaum, F, et al. Attenuated, replication-competent herpes simplex virus type 1 mutant G207: safety evaluation of intracerebral injection in nonhuman primates. *J. Virol.* 73: 6319-6326.1999.
11. Todo T, Feigenbaum, F, Rabkin, SD, et al. Viral shedding and biodistribution of G207, a multimutated, conditionally-replicating herpes simplex virus type 1, after intracerebral inoculation in *Aotus*. *Mol. Ther.* 2: 588-595.2000
12. Markert JM, Medlock, MD, Rabkin, SD, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther.* 7: 867-874.2000.

(6) 体内の標的細胞以外の細胞へ、また患者以外の人への遺伝子導入の可能性

本臨床研究はウイルス (G47Δ) のみの腫瘍内投与を行い、治療遺伝子の導入はない。G47Δは、ウイルス複製に関して腫瘍細胞に高い特異性を有し、腫瘍細胞以外では複製不能である。また、そのため自然界で増殖拡散し得ない。G207の第I相臨床試験では、G207の脳内投与後、尿中へのウイルス排出を検出しなかった。またヨザルを用いた非臨床試験では、G207の脳内投与後、1ヶ月間採取した涙、唾液、膣分泌液からはPCR法、ウイルス培養いずれでもウイルス排出が検出されなかった。

(7) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

HSV-1のウイルスゲノムまたは遺伝子は宿主の染色体には組み込まれない。

(8) がん原性の有無

HSV-1のウイルスゲノムまたは遺伝子は宿主の染色体には組み込まれず、HSV-1にがん原性はない。遺伝子組換えHSV-1を原因とするがんの発生は、臨床試験、非臨床試験いずれでも報告されていない。

(9) 遺伝子産物の安全性

G47Δは直接的な殺細胞作用により腫瘍細胞を破壊する。大腸菌LacZ遺伝子がG47Δから腫瘍細胞に導入され一過性に発現されるが、その遺伝子産物β-ガラクトシダーゼは人体に対し毒性や病原性を有しない。「安全性についての評価(5)ウイルスの細胞傷害性」に記載の如く、LacZ遺伝子を発現する第二世代複製型遺伝子組換えHSV-1であるG207が第I相臨床試験において人の脳内(脳腫瘍内)に投与されており、LacZ遺伝子生成物の安全性は示されている。

(10) 細胞の安全性

G47ΔウイルスはマスターウイルスストックをVero細胞(アフリカミドリザル由来腎細胞株)に感染させて作製する。

① 培養細胞の純度

Vero細胞のマスターセルバンクは、ワクチン製造用にWHOで唯一認定されているVero細胞のSeed lot 10-87 (WHO Vero)をもとに構築され、英国BioReliance社において無菌性、病原性ウイルス混入の否定、他種細胞の混入の否定などに関して品質試験を行う。

② 細胞の遺伝子型、表現型の安定性

マスターセルバンクのVero細胞については英国BioReliance社において品質試験を行う。G47Δウイルス作製にはマスターセルバンクからの継代数が低いVero細胞を用い、表現型は安定している。

③ 被験者に投与する細胞の安全性

本臨床研究では被験者に細胞成分の投与を行わない。

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

初期放射線治療後に進行または再発した膠芽腫に対して、確立された有効な治療法はなく、新しい治療法が必要とされる。培養細胞およびマウスを用いた前臨床研究では、G47Δの抗腫瘍効果と、安全性が示されている。増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスであるG207を用いた膠芽腫を対象とした臨床試験が海外で行なわれており、その安全性が示されている。本臨床研究の遂行には、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスの取り扱いや、悪性脳腫瘍診療、定位脳手術に精通した者による実施が必要である。当施設はこの条件を満たす研究チームが存在し、かつ実施に必要な設備を有している。以上から本遺伝子治療臨床研究の実施は理論的にも、実質的にも可能であると判断される。