

遺伝子治療臨床研究実施計画書

目次

	ページ
1. 遺伝子治療臨床研究の名称	4
2. 統括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	4
(1) 総括責任者の氏名	4
(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割	4
(3) 実施施設の長	6
3. 実施施設の名称及びその所在地	6
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	6
5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	7
(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	7
① 対象疾患に関する現時点での知見	7
② 当該遺伝子治療臨床研究の概要	8
③ 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	9
(2) 治療法の開発を目的とした遺伝子標識臨床研究を行う場合	11
6. 遺伝子の種類及びその導入方法	11
(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質	11
(2) 本計画で使用するその他の組み換え DNA の構造と性質	11
(3) 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由	11
(4) 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由	11
(5) 遺伝子導入に用いるプラスミドの調製	11
(6) IAB-1(ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤)	12
7. これまでの研究成果と文献的考察	13
(1) ヒト β 型インターフェロンとその腎細胞癌への効果	13
(2) 遺伝子導入に必要なリポソームの開発とその特性	14
(3) 遺伝子導入によるヒト β 型インターフェロンの発現	14
(4) 遺伝子導入により産出されるヒト β 型インターフェロンの抗腫瘍効果	15
8. 安全性についての評価	16
(1) 遺伝子導入方法の安全性	16

(2) 遺伝子産物の安全性	19
9. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	20
10. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	20
(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	21
(2) 被験者の選択基準及び除外基準	21
(3) 被験者の同意の取得方法	22
(4) 遺伝子治療臨床研究審査委員会および安全・効果評価・適応判定部会	22
(5) 実施期間及び目標症例数	23
(6) 遺伝子治療臨床研究の実施方法	23
① 対照群の設定方法	23
② 遺伝子導入方法	23
③ 前処置及び併用療法の有無	24
④ 臨床検査項目及び観察項目	24
⑤ 予想される副作用及びその対処方法	27
⑥ 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	27
⑦ 症例記録に関する記録用紙等の様式	29
⑧ 記録の保存及び成績の公表の方法	29
(7) 本臨床研究における個人情報保護	29
(8) インフォームド・コンセントと患者及びその家族からの同意	32
<説明と同意書の書式は資料9～11に記載>	
(9) 本遺伝子治療臨床研究の責任の所在	32
11. 腎細胞癌の遺伝子治療に関する国内外の研究状況	33
(1) 腎細胞癌に対する各種遺伝子治療の現状	33
(2) リポソームを用いた遺伝子治療の開発	34
(3) ヒトインターフェロンを発現するベクターを用いた遺伝子治療の現状	36
12. 実施施設の施設設備の状況	37
13. 研究者の略歴・研究業績	38
(1) 研究者の略歴	38
(2) 研究者の研究業績	43
14. その他必要な事項	69
(1) 文献	69
(2) 表	72
(3) 図	77

添付資料

資料 1:IAB-1 による細胞毒性の評価

資料 2:IAB-1 のマウスへの投与後の臓器移行

資料 2-1:IAB-1 のマウス脳内投与後の臓器移行

資料 2-2:IAB-1 のマウス静脈内投与後の臓器移行

資料 3:腎癌 Stage-病期分類(腎癌取扱い規約、第3版、1999年)

資料 4:Performance Status (ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group)

資料 5: 京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会

資料 5-1: 京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規程

資料 5-2: 京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員名簿

資料 5-3: 京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会

安全・効果評価・適応判定部会要綱

資料 5-4: 京都府立医科大学附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会 安全・効果評価・
適応判定部会 委員

資料 6:RECIST guideline

資料 7:腎癌 治療効果判定基準(腎癌取扱い規約、第3版、1999年)

資料 8:Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE) 日本語訳 JCOG 版

資料 9:ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤を用いる進行期腎細胞癌の遺伝子治療臨床研究のための説明書・同意書

資料 10:ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤を用いる進行期腎細胞癌の遺伝子治療臨床研究における遺伝子解析に関する研究の説明書・同意書

資料 11:ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤を用いる進行期腎細胞癌の遺伝子治療臨床研究の追加継続についての説明書・同意書

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤を用いる進行期腎細胞癌の遺伝子治療臨床研究

2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

(1) 総括責任者の氏名

氏名: 三木恒治

所属: 京都府立医科大学大学院医学研究科・泌尿器外科学

役職: 教授

(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及びその担当する役割

氏名: 高羽 夏樹

所属: 京都府立医科大学医学部医学科・腫瘍薬剤制御学講座

役職: 准教授

役割: 名古屋大学附属病院において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発現プラスミド包埋正電荷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。さらに、京都府立医科大学附属病院において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、総括責任者に報告し説明する。さらに、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。

氏名: 河内明宏

所属: 京都府立医科大学大学院医学研究科・泌尿器外科学

役職: 准教授

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、総括責任者に報告し説明する。

氏名: 沖原宏治

所属: 京都府立医科大学大学院医学研究科・泌尿器外科学

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、総括責任者に報告し説明する。

氏名:三神一哉

所属:京都府立医科大学大学院医学研究科・泌尿器外科学

役職:助教

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、総括責任者に報告し説明する。

氏名:中村晃和

所属:京都府立医科大学大学院医学研究科・泌尿器外科学

役職:助教

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、総括責任者に報告し説明する。

氏名:山上卓士

所属:京都府立医科大学大学院医学研究科・放射線診断治療学

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、総括責任者に報告し説明する。

氏名:若林俊彦

所属:名古屋大学大学院医学系研究科・脳神経外科学分野

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:吉田 純

所属:独立行政法人国立病院機構 東名古屋病院

役職:院長

役割:本遺伝子治療臨床研究につき基礎的、臨床的に助言を行う。

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:准教授

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発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤を名古屋大学附属病院において作製し、その品質管理並びに安全性を確認する。またヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤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。

(3) 実施施設の長

氏名:木下茂

所属:京都府立医科大学附属病院

役職:病院長

役割:総括責任者から遺伝子治療臨床研究の実施もしくは重大な変更についての了承を求められた際に、審査委員会および厚生労働大臣に意見を求めるとともに、当該意見に基づき必要な指示を与え、実施もしくは変更を了承する。遺伝子治療臨床研究の進行状況および結果について、総括責任者又は審査委員会から報告又は意見を受け、必要に応じ、総括責任者に対しその留意事項、改善事項等に関して指示を与えると同時に厚生労働大臣に対し報告を行う。総括責任者から受理した総括報告書の写しを速やかに厚生労働大臣に提出する。被験者の死亡その他遺伝子治療臨床研究の実施に際して生じた重大な事態および遺伝子治療臨床研究の実施に影響を及ぼすおそれがある情報について、速やかに厚生労働大臣に報告する。本臨床研究あるいは類似したプロトコールにおいて、重大な副作用が発生した場合、これを速やかに統括官庁へ報告する。

3. 実施施設の名称及びその所在地

名称:京都府立医科大学附属病院

所在地:京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 465 郵便番号 602-8566

電話番号:075-251-5111

病院長:木下茂

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

原発腫瘍病巣を手術で摘除した後、転移巣に対して行ったインターフェロン、インターロイキン 2 を含む免疫療法およびソラフェニブ、スニチニブを含む分子標的治療が無効であった予後がきわめて不良な進行期腎細胞癌患者に対する新しい治療法として、ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤による遺伝子治療を実施する。本臨床研究は第 I / II 相試験で、その主要な目的は本治療法の安全性の評価である。また、副次的

な目的は本治療法の有効性の評価である。具体的には原発腫瘍病巣を手術で摘除し、病理組織学的に腎細胞癌の診断が確定している転移を有する腎細胞癌患者の肺・リンパ節などの転移腫瘍病巣内に遺伝子製剤を注入し、その安全性について検討するとともに、局所のおよび全身的効果を判定する。本臨床研究にて安全性及び有効性が確認されれば、第Ⅲ相試験を実施し、最終的に本治療法を新たな進行期腎細胞癌に対する治療法として確立することが目的である。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

(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

A. 腎細胞癌の発生頻度

わが国の腎細胞癌による死亡率は年々増加する傾向にある。1960年に10万人当たり0.5であった死亡率が、1980年1.2、1990年2.1、1994年2.5と約35年間で5倍近くに増加している。現在の罹患率は10万人当たり8～10人である¹⁾。米国でも腎細胞癌は増加傾向にあり、2005年には36,160人の新たな腎細胞癌患者が発生し、12,660人が死亡していると推測されている²⁾。

B. 腎細胞癌の治療と予後

転移のない腎細胞癌の治療の第一選択は外科的摘除術である。その予後は良好で、5年生存率は約80～90%である^{1) 2)}。しかし、他の悪性腫瘍と同様にリンパ節転移や遠隔転移を生じると予後は急速に悪化する。他臓器転移を有する腎細胞癌患者の5年生存率は約10～30%程度である^{1) 2)}。また、転移のある腎細胞癌に対しても後述する免疫療法の効果増強のため、可能な限り腎摘除が行なわれる。

腎細胞癌は化学療法に抵抗性の癌であり、同癌患者における化学療法の奏効率は10%以下である。またホルモン療法も過去に有効性が報告されたが、その後の検討では奏効率は3%以下であると判明している¹⁾。さらに、放射線療法に関しても転移性腎細胞癌患者の生存期間の延長を明らかに認めたという報告はない¹⁾。

以前より腎細胞癌は自然治癒の割合が高い点、免疫力の低下する50歳代以降の腎細胞癌に転移が多い点、長期経過後の晩発性再発を示す点などから、癌の中でも比較的宿主の免疫力に左右されやすい傾向が高いと考えられている。実際に他臓器転移を含む進行期腎細胞癌に対しては、インターフェロンに代表されるいわゆる免疫療法が有効とされている^{3) 4)}。本邦で腎細胞癌に保険適用がある主なサイトカイン製剤は、 α 型インターフェロン・ γ 型インターフェロン・インターロイキン2の3剤である。また、 β 型インターフェロンの単独療法も過去に検討されており、ほぼ α 型インターフェロンの単独療法と同等の治療成績が報告されている^{5) 6)}。 α 型と β 型インターフェロンはレセプターを共有し、その生物学的活性は類似している。

違いとしては、 β 型インターフェロンは、筋肉内投与を行った場合、組織親和性が高く、血中濃度の上昇をほとんど認めないため、進行性腎細胞癌の患者に対しては経静脈的な投与が行われることが上げられる。腎細胞癌患者に対して用いられる場合、全身投与が基本となるため、筋肉内投与で治療効果のあるレベルまで血中に拡散する α 型インターフェロンの方が、臨床使用での簡便性が高く、本邦では β 型インターフェロンは腎細胞癌に対し、現在では保険適用とはなっていない。しかし、進行性腎細胞癌に対し最も一般的に使用されている α 型インターフェロンでも、単独療法での奏効率は約15~20%と満足のものではない^{1, 3, 4, 7)}。さらに近年、転移性腎細胞癌に対する免疫療法の奏効率向上のため、欧米でよく用いられているインターロイキン2に代表される他のサイトカインや各種抗癌剤との併用療法なども試されている。これまで報告されたインターロイキン2単独療法の奏効率は10~20%であり、明らかにこれまでの α 型インターフェロンの単独療法の奏効率を上回る治療法は認められていない^{3, 7-9)}。また、その副作用も強い。我々は最近エビデンスに基づいた腎細胞癌に対する免疫療法の治療成績及びその評価を論評としてまとめた⁷⁾。

一方、スニチニブやソラフェニブなどの複数のキナーゼを阻害する経口薬が近年、開発された。これらは、その作用により腫瘍細胞の増殖と血管新生を阻害する分子標的治療薬である。海外では、これらの分子標的治療薬を用いて転移を有する腎癌症例を対象にした第III相の臨床試験が行われた¹⁰⁻¹¹⁾。スニチニブと α 型インターフェロンの比較では、スニチニブが奏効率および無増悪生存率において α 型インターフェロンよりも良好な成績が報告されている。スニチニブおよびソラフェニブの奏効率はそれぞれ37%、11%であるが、両者のCR率はともに1%未満であり、1年無増悪生存率は10-20%程度である。日本国内でも、両薬剤の第II相臨床試験がすでに行われ、ほぼ同様の奏効率が確認されている。また、2008年より日本国内では、両薬剤の保険適応が承認された。従来の抗癌剤や免疫療法ではみられなかった高血圧、手足症候群、甲状腺機能低下症などの副作用が出現することも明らかになり、厳重な経過観察のもとに投与すべき治療薬であると認識されている。

近年、骨髄非破壊的同種造血幹細胞移植、いわゆるミニ移植が転移性腎細胞癌に対して有効であるという報告がなされ、第一報では奏効率が53%と報告されたことから、注目を浴びている¹²⁾。しかし、機序については不明な点が多く、その後の追試では奏効率は他の免疫療法とほぼ同等の10~20%と報告しているものもある。また、技術的に複雑であり高額の治療費を必要とするなどの問題点も指摘されている。一方、樹状細胞や癌特異的ペプチドなどを用いた新規免疫療法も注目されており、国内でも数施設にて実施されてきているが、現段階では実験的治療の域を出ていないのが現状である¹³⁾。

このように、進行期腎細胞癌に対しては、インターフェロン・インターロイキンなどを使用した免疫療法およびスニチニブ、ソラフェニブなどによる分子標的治療を超える治療法は、現時点では認められず、その奏効率自体も低い。よって、新たな治療法の開発が急務とされている。

② 当該遺伝子治療臨床研究の概要

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ため、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らとともに遺伝子を細胞に導入発現する研究に着手した¹⁴⁾。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¹⁴⁻¹⁸⁾、学内、旧厚生省、旧文部省の許可をえて、研究分担者である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、ヒトβ型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤(IAB-1)を用いるグリオーマの遺伝子治療の臨床研究を開始した。この遺伝子治療によると考えられる重大な有害事象は何も認められていない。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、より長期の安定性および保存性を確保すると同時に液剤と同等の品質・効果を確認している。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。そこで、本臨床研究では、安全性と保存性に優れる凍結乾燥剤を我々が共同研究者と共に名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センターにおいて作製、調製し、名古屋市の名古屋大学医学部附属病院から京都市の京都府立医科大学附属病院へ輸送後、使用に供する。なお、この輸送および使用法は既に厚生労働省の認可の上、信州大学において悪性黒色腫に対して実施されたものと同一方式である。本遺伝子治療臨床研究では、原発腫瘍病巣を手術で摘除した後、転移巣に対して行ったインターフェロン、インターロイキンを含む免疫療法やスニチニブ、ソラフェニブなどの分子標的治療薬が無効であった腎細胞癌患者の転移巣にIAB-1を局所投与し、その安全性と有効性を判定する。

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、進行期腎細胞癌に対してはα型インターフェロン、インターロイキン2に代表される天然型あるいは遺伝子組換え蛋白を用いた免疫療法およびスニチニブ、ソラフェニブなどの分子標的治療薬以外、現在のところ有効な治療法は確立されていない。しかし、このような免疫療法の奏効率は15%程度と低く、長期予後の改善はほとんどもたらされていないのが現状である。また、全身投与が基本となっており、発熱、全身倦怠感、肝機能障害、鬱状態などの副作用も比較的高頻度に認められている^{3, 4, 7-9)}。また、分子標的治療薬の奏効率は10-40%あるもののCR率は1%未満と低く、長期予後についてはまだ不明な点が多い。経口投与されるが、高血圧、手足症候群、甲状腺機能低下症などの副作用が比較的高頻度に認められている。

我々はすでにヒト腎細胞癌細胞株(NC65)を用いた実験で、内部に pSV2IFN β を包埋した IAB-1[以下、IAB-1(pSV2IFN β)と略す]で処理した場合に、ヒト β 型インターフェロン蛋白で処理した場合に比べてもはるかに高い細胞障害活性がみられ、ヒト β 型インターフェロン蛋白処理では誘導できないアポトーシスが IAB-1(pSV2IFN β)処理によって効率よく誘導できることを報告している¹⁹⁾。さらに同遺伝子が導入され、発現された腎細胞癌細胞からは、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蛋白が産生されるので、遺伝子が導入されなかった周囲の癌細胞にも直接障害効果がおよぶことが考えられる。さらに、マウスの皮下にヒト腎細胞癌細胞株を用いて形成した腫瘍に IAB-1(pSV2IFN β)を局所注入したところ、重篤な毒性を認めることなく4週間以上にわたり腫瘍増大が抑制されることが確認された¹⁹⁾。なお、使用した細胞株がインターフェロン(IFN)に抵抗性であることより、ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤の局所投与がインターフェロン抵抗性の腎細胞癌患者の転移巣に対する有効な治療法となりうることが示唆された。一方、正常組織に対する影響に関しては、ヒト腎近位尿細管細胞株(RPTEC5899)に対し IAB-1(pSV2IFN β)処理を行い検討したが、有意なヒト β 型インターフェロンの分泌は認められず、また有意な細胞障害活性も認められなかった¹⁹⁾。なお、これらの培養細胞および動物を用いた実験に使用した IAB-1(pSV2IFN β)は、ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤であり、使用したプラスミド(pSV2IFN β)では、SV40 early プロモーターの下流にヒト β 型インターフェロン cDNA が配置されている。一方、上述のグリオーマの遺伝子治療および本遺伝子治療で使用するヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤[以下、IAB-1(pDRSV-IFN β)と略す]に含まれるプラスミド(pDRSV-IFN β)では、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が、両者ともに、遺伝子導入された細胞内でヒト β 型インターフェロンを発現する。これらの実験結果より、IAB-1(pDRSV-IFN β)を腎細胞癌患者の転移巣に直接局所投与すれば、腫瘍細胞特異的に遺伝子発現を調節しなくとも、細胞障害活性は腫瘍細胞に対して選択的に起こり、正常細胞に導入されても重篤な障害は生じないと考えられる。また、上述のごとく、名古屋大学医学部附属病院脳神経外科において、グリオーマに対して行われた IAB-1(pDRSV-IFN β)による遺伝子治療でも、IAB-1(pDRSV-IFN β)は癌病巣に直接注入されたのみで、特に腫瘍細胞特異的な遺伝子の発現調節を行っていないが、重大な有害事象は報告されていない。

原発腫瘍病巣を手術で摘除した後、転移巣に対して行ったインターフェロンもしくはインターロイキンによる免疫療法およびソラフェニブ、スニチニブを含む分子標的治療が無効であった患者または適応でない患者に対する有効な治療法が確立されていないのが現状である。従って、その予後が極めて不良であることを考慮に入れると、これらの患者に対して、上述の如く治療効果と安全性が期待しうる本遺伝子治療を選択することは妥当であると考えられる。

インターフェロンは筋肉注射または皮下注射で投与され、インターロイキンは点滴で経静脈的に投与されるのに対して、本遺伝子治療において、IAB-1(pDRSV-IFN β)は超音波ガイド下または CT ガイド下に穿刺針を用いて転移病巣に直接注入される。

(2) 治療法の開発を目的とした遺伝子標識臨床研究を行う場合

本研究は該当せず。

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

(1) 人に導入する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) 本計画で使用するその他の組み換え DNA の構造と性質

本研究では pDRSV-IFN β 以外の DNA 及びパッケージング細胞は使用しない。

(3) 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的細胞とした理由

本研究は正電荷リボソームに包埋した遺伝子を腎細胞癌の病巣内へ直接注入して遺伝子導入するものであり、特に取り出した細胞を標的とするものではない。

(4) 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

腎細胞癌細胞への遺伝子導入はヒト β 型インターフェロンの cDNA を組み込んだ遺伝子発現プラスミドを正電荷多重膜リボソームに包埋して行う。これらは本臨床研究の研究分担者である吉田らが開発、製造したもので、主としてエンドサイトーシスの機序で内容物(プラスミド DNA)が細胞内へ取り込まれる。本リボソームによる遺伝子導入効率は細胞の種類にもよるが、10-20%程度であり、それほど高いものではない。しかし、細胞毒性は低い。さらに、この方法では主として分裂中の細胞に遺伝子発現が認められることが示されており、分裂細胞が多数含まれている癌病巣への局注は、腫瘍細胞への選択的発現という点からも利点を有する。

(5) 遺伝子導入に用いるプラスミドの調製

ヒト β 型インターフェロン cDNA は Taniguchi ら²⁰⁾がクローニングしたものを正式な患与を受けて使用した。患与されたプラスミドを制限酵素 *EcoR* I で消化してえられたヒト β 型インターフェロン構造遺伝子を含む断片をさらに制限酵素 *Hinc* II 及び *Bgl* II で消化した後に、pUC19 に挿入した。このように調製した pUC19 を制限酵素 *Sma* I 及び *Hind* III で消化し

てえられたヒト β 型インターフェロン構造遺伝子を含む断片を動物細胞発現ベクター pRc/RSV (Invitrogen 社)の制限酵素 *Xba* I 及び *Hind* III 部位に挿入することによりヒト β 型インターフェロン発現ベクター pRSV-IFN β を構築した(図 4)。さらに、制限酵素 *Bam* HI で消化して約 2kb の不要な断片(大腸菌でのプラスミドの生産のための塩基配列や治療目的以外の塩基配列である F1 ori, PSV40, Neomycin, SV40pA)を欠失させ、ライゲーションにより遺伝子治療臨床研究用プラスミド pDRSV-IFN β (3,674bp)を得た(図 4)。

Transformant の調製と導入プラスミドの大量調製および純度検定については、臨床応用に十分に耐える純度の導入プラスミドであることが確認されている。なお、純度検定については、以下の規格で行っている。エンドトキシン ≤ 10 EU/mg、DNA 均一性 $>90\%$ 、RNA: 検出されず、大腸菌染色体 DNA ≤ 10 μ g/mg、タンパク質 ≤ 10 μ g/mg、A260/280:1.75 - 2.00。

(6) IAB-1 (ヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤)

癌細胞株に対する抗腫瘍効果は、pSV2IFN β を内部に包埋した IAB-1(pSV2IFN β) を用いて、培養細胞や動物を用いた実験で確認された。その後、pDRSV-IFN β の発現効率及び抗腫瘍効果が pSV2IFN β と比較し、同等か高いことが確認できたことからグリオーマの遺伝子治療には後者を内部に包埋した IAB-1(pDRSV-IFN β) が用いられた。なお、ヒトグリオーマ細胞株に対する IAB-1(pDRSV-IFN β) の抗腫瘍効果も、IAB-1(pSV2IFN β) と同様に培養細胞および動物を用いた実験で確認されている。また、遺伝子治療に用いる IAB-1(pDRSV-IFN β) の安全性については、種々の動物を用いて行われており、「8. 安全性についての評価」で、後述する。本遺伝子治療でも、グリオーマの遺伝子治療と同様に pDRSV-IFN β を内部に包埋した IAB-1(pDRSV-IFN β) を用いる。

正電荷リポソームは、規格設定され、品質試験を経た 3 成分 N-(α -トリメチルアンモニオアセチル)-ジドデシル-D- グルタメイト クロライド (TMAG)、ジラウロイル-ホスファチジルコリン (DLPC)、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (DOPE) から作製され、これに 1mg/ml の濃度の pDRSV-IFN β を含む等張リン酸緩衝液を加えてホモジナイズし、得られた懸濁液を孔径 2 μ m のメンブランフィルターを装着したリポナイザーを用いて加圧濾過する。その濾液の遠沈沈殿画分に等張リン酸緩衝液を加えて再分散させ、容器に充填し、密封することにより 40ml の IAB-1(pDRSV-IFN β) が調製される。このようにしてヒト β 型インターフェロン発現プラスミド包埋正電荷リポソーム製剤が得られる。リポソームの粒子径は 0.5-2.0 μ m である。現在、この製剤は凍結乾燥製剤化されており、1 年以上にわたり保存可能であり、随時、使用に供することができる。

以上のようにして調製された IAB-1 (以下製剤という)の規格を表 1 に示す。製剤の均一性、安定性及び品質の維持保証のため、名古屋大学医学部附属病院では製剤調製に関するガイドラインと諸規約が作成され、遵守されている。製剤の調製は名古屋大学医学部附属病院遺伝子・再生医療センターにおいて、同センター管理内規で定められた製剤

調製作業員が行う。「浸透圧比、pH、純度試験、ヒト β 型インターフェロン産生量、細胞増殖抑制率、DNA 含量」を対象項目として保存されている凍結乾燥製剤の品質規格試験を行い(表2)、製剤の適合承認はこの品質規格試験の結果に基づいて製剤検証部会が行っている。なお、製剤検証部会は、非臨床試験に使用した IAB-1(pDRSV-IFN β)と名古屋大学医学部附属病院において製造された製剤が同等であることの検証ならびにその品質の評価及び判定を行うために、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会内に設けられた部会である。プラスミドの規格については米国の遺伝子治療臨床研究に用いられている2社(VICAL社、QIAGEN社)の基準を参考に作成された規格基準によっている。リボソーム製剤の規格は米国などのリポフェクション型リボソームの規格を参考にし、薬発第1062号「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針」(平成7年11月15日付)に則して規定した。凍結乾燥製剤の有効期間については、局方基準に従い、3ロットで検討を加え、製造後2年と定めている。本製剤は非ウイルス性遺伝子導入ベクターであり、増殖性ウイルス出現の可能性はない。遺伝子は染色体には組み込まれず、エピゾーマル(核内染色体外)に発現し、細胞の分裂回数に伴って細胞当たりのプラスミド数は減少するので、遺伝子の発現は一過性である。遺伝子発現は導入後4日ないし6日でピークに達し、その後減弱して、2~3週間後には検出限界以下となる。変異原性試験は陰性で、がん原性、免疫原性も認められていない。後述するように、本製剤の安全性はマウス、ラット、ウサギ、カニクイザルなどにおいて十分に検討され、確認されている。

7. これまでの研究成果と文献的考察

(1) ヒト β 型インターフェロンとその腎細胞癌への効果

ヒト β 型インターフェロンは主として線維芽細胞より産生されるサイトカインであり、分子量20,000、166個のアミノ酸からなるタンパク質である。本インターフェロンは抗ウイルス作用のほか、抗腫瘍細胞増殖抑制作用、免疫賦活作用、抗血管増生作用など多彩な生物学的活性を有する^{5,6)}。しかし、今回の対象疾患である腎細胞癌に対しては、本邦では α 型および γ 型インターフェロンが保険適用となっており、 β 型インターフェロンは適用となっていない。この理由としては1982年以降 α 型インターフェロンの腎細胞癌に対する有効性が先に報告され^{3,4)}、ほぼ同様の生物学的活性を持つと考えられた β 型インターフェロンの検討が十分になされなかったこと。さらに、 α 型インターフェロンが筋肉内投与にて有効な血中濃度を維持するのに対して、 β 型インターフェロンは組織親和性が高く静脈内投与によってしか、同様の血中濃度を維持できない点などが影響していると考えられる。 β 型インターフェロンの腎細胞癌患者に対する奏効率は1990年前後に報告されているが、約20%前後であり、 α 型インターフェロンとほぼ同等であった^{5,6)}。

本邦では、 β 型インターフェロンは固形癌としては脳腫瘍に対する髄腔内投与と、悪性黒色腫に対する局所注入にのみ保険適用がある。このことは、前述の組織親和性が高く血中へ

の拡散が少ないという β 型インターフェロンの特性によるところが大きい。以上のことを踏まえ、今回我々は進行期腎細胞癌病巣に対する局所注入での遺伝子治療を実施するわけであるから、 β 型インターフェロン遺伝子を治療遺伝子として選択することは妥当であると考えられる。

(2) 遺伝子導入に必要なリポソームの開発とその特性

本リポソームは、膜表面が正に荷電している多重膜構造のリポソームであることが最大の特徴であり¹⁴⁻¹⁷⁾、この点で従来のリポフェクチン法などに用いられるものとは異なる。これによって表面が負に荷電している遺伝子及び細胞との親和性が増し、導入効率の向上と毒性の低下が達成された。なお、本リポソームが細胞表面に接触するとエンドサイトーシスの機序で細胞内へ取り込まれること、リソソームによる破壊は受けにくいこと、遺伝子は主として増殖期の細胞において核内へ移行し、エピゾーマルに発現すること、などが明らかにされている²¹⁾。また、今回用いる多重膜リポソームは一枚膜リポソームに比べ細胞毒性が低く、血清添加下での導入効率の低下も少ないことが示されている¹⁴⁾。本臨床研究は、上述のように本邦の研究者によって開発、改良されたオリジナルなリポソーム製剤を用いるものであり、その点からも価値ある研究とみなされる。

(3) 遺伝子導入によるヒト β 型インターフェロンの発現

ヒト腎癌細胞に対する *in vitro* 遺伝子導入実験において、 5.0×10^4 個のヒト腎細胞癌株 NC65 細胞を 2ml の培養液で 24 時間培養後、 $0.2 \mu\text{g}$ DNA ($0.1 \mu\text{g}$ DNA/ml) を含む IAB-1(pSV2IFN β) で処理し、一定時間後の培養上清中のヒト β 型インターフェロン量を ELISA 法にて測定した。処理 24 時間後には上清中に有意なヒト β 型インターフェロンの分泌が認められた。その値は 48 時間後に最大値 ($34.0 \pm 6.8 \text{IU/ml}$) となり、少なくとも 4 日目まで有意な分泌の持続が確認された。等張リン酸緩衝液 (PBS)、プラスミド DNA を含まない空のリポソーム (empty liposome) で処理した場合には、上清中にヒト β 型インターフェロンの分泌はまったく認められなかった。さらに同じくヒト腎細胞癌株である ACHN 及び本学で樹立した 3 種類の初期腎癌培養細胞 KC1, KC2, KC3 を IAB-1 で処理したところ、全ての細胞株で上清中に有意なヒト β 型インターフェロンの分泌が認められた¹⁹⁾。

この遺伝子発現が一過性であることはヒトグリオーマ培養細胞の系で確認されている。ヌードマウスの脳内移植ヒトグリオーマの系を用いた実験では、IAB-1(pDRSV-IFN β) 注入 3 日後、腫瘍組織内にはヒト β 型インターフェロン mRNA の明らかな発現増強が認められたが、正常組織内への注入では無処理対照組織と同程度の発現しか認められなかった。正常組織に対する影響に関しては、ヒト腎近位尿細管細胞 (RPTEC5899) に対し IAB-1(pSV2IFN β) 処理を行い検討してみたが、有意なヒト β 型インターフェロンの分泌は認められなかった¹⁹⁾。

なお、本臨床研究では遺伝子製剤を複数回癌病巣内に注入する計画である。我々はグリオーマの系で複数回投与により遺伝子発現効率が高まることを確認しており、悪性黒色腫

細胞においても繰り返し投与による発現効率の向上を確認している²²⁾。また、腎細胞癌株に対する *in vivo* 動物実験でも、IAB-1(pSV2IFN β)の単回投与では十分な治療効果は得られず、週3回、2週投与(計6回投与)により、同様の投与スケジュールのヒト β 型インターフェロン蛋白投与に比し、有意な抗腫瘍効果を認めている¹⁹⁾。さらに IAB-1(pSV2IFN β)の週3回、2週投与(計6回投与)と週2回、3週投与(計6回投与)では、その抗腫瘍効果に有意差のないことも確認済みである。

(4) 遺伝子導入により産生されるヒト β 型インターフェロンの抗腫瘍効果

① 培養細胞による検討

ヒト腎細胞癌細胞株である NC65、ACHN および京都府立医科大学泌尿器科学教室にて樹立した腎癌の初期培養細胞 KC1、KC2、KC3 につき、それぞれ 5.0×10^4 個の細胞を各ウェルに入れ、24時間培養後、IAB-1(pSV2IFN β)を添加し、4日後の細胞障害活性を計測した。細胞障害活性は NC65: $94.7 \pm 1.9\%$ 、ACHN: $92.3 \pm 6.9\%$ 、KC1: $89.6 \pm 3.3\%$ 、KC2: $98.7 \pm 0.23\%$ 、KC3: $90.3 \pm 2.1\%$ と非常に強く、この値はヒト β 型インターフェロン蛋白 1,000IU/ml 処理に比し、有意に高値であった。一方、代表的な前立腺癌細胞株 LNCaP・PC-3、膀胱癌細胞株 T24・J82 に対する IAB-1(pSV2IFN β)の細胞障害活性は腎癌と比較して低値であり、LNCaP: $39.2 \pm 9.5\%$ 、PC-3: $49.1 \pm 11.5\%$ 、J82: $64.6 \pm 7.8\%$ 、T24: $19.0 \pm 2.0\%$ であった。さらに、ヒト腎近位尿管細胞(RPTEC5899)に対し IAB-1(pSV2IFN β)処理を行い検討してみたが、明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、NC65細胞においてヒト β 型インターフェロン蛋白 1,000IU/ml 処理では誘導できないアポトーシスが、IAB-1添加により高率に誘導された¹⁹⁾。

ヒト β 型インターフェロン蛋白処理は増殖期の腫瘍細胞の増殖を抑制するとともに、静止期の細胞が増殖期へ入るのを抑制しているものと考えられる。腫瘍内の増殖期細胞のポピュレーションは腫瘍毎にかなり異なるが、たとえばグリオーマでは増殖期細胞が約30%、静止期細胞が約70%と見積もられており、個体差はあるものの腎細胞癌においては、通常この値よりは低値であると考えられる²³⁾。したがって、直接的な抗腫瘍効果に関しては cytostatic な効果が主体であるヒト β 型インターフェロン蛋白のみの投与による治療の効果には限界があるといえる。既述したように、ヒト腎癌細胞株の系においては IAB-1(pSV2IFN β)によるヒト β 型インターフェロン遺伝子の導入により高率に腫瘍細胞にアポトーシスが認められ、殺細胞効果があることを我々は確認している。これらのことから、本遺伝子治療が静細胞的のみではなく殺細胞的にも作用し、少なくとも今回検討した範囲では、癌細胞の中でも腎細胞癌にかなり選択的に作用する可能性が示唆された¹⁹⁾。

また、本遺伝子治療によってヒト β 型インターフェロンが一定期間持続的かつ高濃度に腫瘍結節局所で産生されるので、これが病巣内の遺伝子導入されなかった腫瘍細胞にも作用し、増殖抑制効果を示すと考えられる。以上のような理由により、本遺伝子治療はヒト β 型インターフェロン蛋白投与と比べても、抗腫瘍効果が期待できるので、臨床効果が望めるものと予測