

遺伝子治療臨床研究実施計画書

東京大学医学部附属病院 脳神経外科

作成日：2007年 10月 23日

修正日：2008年 5月 21日

2008年 7月 31日

目次

遺伝子治療臨床研究の名称	5
1. 総括責任者およびその他の研究者の氏名ならびに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	5
(1) 総括責任者の氏名	5
(2) 総括責任者以外の研究者の氏名ならびにその担当する役割	5
2. 実施施設の名称およびその所在地	5
3. 遺伝子治療臨床研究の目的	5
4. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由	6
(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	6
① 対象疾患に関する現時点での知見	6
② 当該遺伝子治療臨床研究の概要	7
③ 他の治療法との比較および遺伝子治療を選択した理由	8
5. 遺伝子の種類およびその導入法	8
(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質	8
① 人に導入する遺伝子の構造	8
② 人に導入する遺伝子の性質	8
③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性	8
(2) 本計画で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	9
(3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに標的細胞とした理由	9
(4) 遺伝子導入方法の概略および当導入法を選択した理由	9
(5) ウイルスを用いて遺伝子導入を行う場合	9
① G47Δの野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響	9
② G47Δの作製方法	10
③ G47Δの構造	10
④ G47Δの生物学的特徴	12
6. 安全性についての評価	15
(1) 遺伝子導入方法の安全性	15
① 遺伝子導入方法の安全性	15
② 遺伝子導入に用いる G47Δの純度	15
③ 被験者に投与する物質の純度およびその安全性	17
④ 増殖性ウイルスの出現の可能性	17
⑤ 遺伝子導入に用いる G47Δの細胞傷害性	17
⑥ 体内の標的細胞以外の細胞へ、また被験者以外の人への遺伝子導入の可能性	19
⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	19

⑧ がん原性の有無.....	19
(2) 遺伝子産物の安全性.....	20
(3) 細胞の安全性.....	20
① 培養細胞の純度.....	20
② 培養細胞の遺伝子型、表現型の安全性.....	20
③ 被験者に投与する細胞の安全性.....	20
7. 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.....	20
8. 遺伝子治療臨床研究の実施計画.....	22
(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画.....	22
① シェーマ.....	22
② 対象疾患と病期.....	23
③ 試験のデザイン.....	23
(2) 被験者の選択基準および除外基準.....	23
(3) 被験者の同意の取得方法.....	25
(4) 実施期間および目標症例数.....	27
(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法.....	27
1. 対照群の設定方法.....	27
2. 遺伝子導入方法（安全性および有効性に関する事項を除く）.....	27
3. 前処置および併用療法の有無.....	31
4. 臨床検査項目ならびに観察項目.....	31
5. 予想される有害事象およびその対処方法.....	38
1) 有害事象報告・対応手順.....	38
2) 有害事象の定義.....	38
3) 重篤な有害事象の定義.....	38
4) 有害事象の評価と報告.....	38
6) 予期される有害事象.....	39
7) 有害事象の緊急報告と対応.....	40
6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準.....	41
7. 被験者の安全性確保および健康被害補償.....	43
1) モニタリング.....	43
2) 遺伝子治療臨床研究審査委員会での審査.....	44
3) 遵守すべき諸規則.....	44
4) プロトコルの遵守.....	44
5) 臨床研究の費用負担.....	44
① 資金源および財政上の関係.....	44
② 臨床研究に関する費用.....	44

6) 健康被害に対する補償.....	44
7) プロトコルの改訂.....	45
① プロトコル改訂の報告.....	45
② 再審査が必要なプロトコル改訂.....	45
③ 同意説明文書の改訂.....	45
④ 記録用紙 (CRF) の変更.....	45
8. 試験の終了と早期中止.....	45
1) 試験の終了.....	45
2) 試験の早期中止.....	46
9. 研究組織.....	46
10. 被験者のプライバシー保護と秘密の保全.....	47
(1) 実施施設での安全管理措置.....	47
(2) 本研究における個人情報の保護.....	49
11. 成績の公表の方法.....	49

添付資料

資料 1 : 研究者の略歴および研究業績

資料 2 : 実施施設の施設設備の状況

資料 3 : 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果

資料 4 : 遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設以外の内外の研究状況

資料 5 (1) : 類似の遺伝子治療臨床研究の成果

資料 5 (2) 1 : 用量増加のフローチャート

資料 5 (2) 2 : KPS スコア

資料 5 (2) 3 : 臨床検査値施設基準域表

資料 5 (2) 4 : NCI-CTC AE Ver3.0 (抜粋)

資料 5 (2) 5 : 同意説明文書

資料 5 (2) 6 : 試験薬概要書

資料 5 (2) 7 : 製剤品質試験項目および結果

資料 5 (2) 8 : 製剤製造標準作業手順書(SOP)一覧 (抜粋)

資料 5 (2) 9 : 重篤な有害事象発生時の報告・対応手順書

資料 5 (2) 10 : 症例登録票、症例経過記録票

資料 5 (2) 11 : G47Δの構造および塩基配列解析

資料 5 (2) 12 : 安全性試験

資料 5 (2) 13 : 遺伝子治療臨床研究審査委員会規則

資料 5 (2) 14 : 個人情報の適切な管理のための措置に関する規程

遺伝子治療臨床研究の名称

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

1. 総括責任者およびその他の研究者の氏名なら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

藤堂 具紀 東京大学大学院医学系研究科・TRセンター（脳神経外科）・特任教授
遺伝子治療臨床研究の総括

(2) 総括責任者以外の研究者の氏名ならびにその担当する役割

稲生 靖 東京大学大学院医学系研究科・TRセンター（脳神経外科）・特任准教授
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。

山田 奈美恵 東京大学大学院医学系研究科・TRセンター（循環器内科）・特任助教
臨床研究実施の補佐。

大内 佑子 東京大学保健センター（精神神経科）・臨床心理士
臨床研究実施における臨床心理面の補佐。

2. 実施施設の名称およびその所在地

名称：東京大学医学部附属病院

所在地：〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1

電話（代表） 03-3815-5411

3. 遺伝子治療臨床研究の目的

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 G47Δ¹⁾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。

4. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由 (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

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²⁾、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³⁾。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。

神経膠腫は病理学的所見に基づき組織型が診断され、また悪性度分類がなされる。WHO の grading system が国際的に使用され、細胞の異形性、核分裂像、壊死、血管内皮増生などの所見の有無により Grade 1 から Grade 4 までに分類される。本臨床研究は、星細胞腫 Grade 4 (Grade IV astrocytoma) を対象とする。星細胞腫 Grade 4 は一般に膠芽腫 (glioblastoma) または多形性膠芽腫 (glioblastoma multiforme) と称される。星細胞腫 Grade 3 (Grade III astrocytoma; anaplastic astrocytoma) においては、組織学的に乏突起神経膠腫 (oligodendroglioma) の成分の混在が予後良好因子として知られており、これらを区別して扱う場合があるが、Grade 4 においては乏突起神経膠腫の成分の混在の考慮は通常行わない。神経膠腫において病期分類 (ステージ分類) は行われていない。

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⁴⁾。

星細胞腫 Grade 3・4 の予後を左右する因子として、組織型、年齢、手術摘出度、術前の performance status (PS) などが挙げられている。

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⁵⁾。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⁶⁾。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⁷⁾、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。

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⁸⁾。

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。

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。

② 当該遺伝子治療臨床研究の概要

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⁹⁾。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⁹⁾。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。

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されるのは、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低く、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¹⁰⁾。G207 および G47Δ についての詳細は「6 章 (5)③G47Δ の構造 および ④G47Δ の生物学的特徴」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および遺伝子治療を選択した理由

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。「7章 安全性についての評価 (1) ⑤ 遺伝子導入に用いる G47Δ 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。「6章 遺伝子の種類およびその導入法(5)⑨ G47Δ 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を示す。特に 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。

5. 遺伝子の種類およびその導入法

(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質

① 人に導入する遺伝子の構造

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る。

② 人に導入する遺伝子の性質

導入された腫瘍細胞内において大腸菌 LacZ 遺伝子 cDNA は G47Δ ウイルスゲノムの一部として存在し、細胞の染色体に組込まれることはない。導入された LacZ 遺伝子は G47Δ 自身の ICP6 プロモーターにより一過性に発現される。

③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性

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。「7章 安全性についての評価 (1)⑤ 遺伝子導入に用いる G47 Δ の細胞傷害性」に後述の如く、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 G 207 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。

(2) 本計画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。

(3) 標的細胞とした細胞の由来および生物学的特徴ならびに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、G47 Δ が感染した標的細胞で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。

(4) 遺伝子導入方法の概略および当導入法を選択した理由

G47 Δ 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。

(5) ウイルスを用いて遺伝子導入を行う場合

① G47 Δ の野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響

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¹¹⁾、欧米では年間20万人に1人^{12) 13)}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。潜伏感染の再燃などに際しまれに脳炎を発症する。そのウイルス侵入経路については三叉神経説と嗅神経説がある¹⁴⁾。

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。宿主から離れると環境中では2時間で死滅する¹⁵⁾。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。

HSV-1を速やかに不活化する消毒薬（chemical disinfectants）は以下のものを含む：70%イソプロパノール、70-90%エタノール、塩素系漂白剤（例えば0.2%次亜塩素酸ナトリウムなど）、10%ポビドンヨード、0.5~0.1%グルコン酸クロルヘキシジン、0.05~0.2%塩化ベンザルコニウム、など。物理的不活法（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¹⁶⁾。

② G47Δ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、東京大学大学院医学系研究科 TR センター（脳神経外科）・特任教授・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。

WHO Vero マスターセルバンク(詳細は7章(3) 細胞の純度 の項に記述)からワーキングセルバンクを構築し、ウイルス製造には継代数の低い細胞を使用する。正しい変異を有することが確認された G47Δから作製したマスターウイルスストックを Vero 細胞に感染させる。2日後、細胞を回収し、凍結融解操作で細胞内の G47Δを遊離させる。フィルターろ過により細胞成分を除去したのち、細胞由来の DNA および RNA を Benzonase にて酵素処理する。高速遠心にてウイルスを沈殿させ、混入する核酸および蛋白を除去する。これを 10% グリセリン加磷酸緩衝液(PBS)に再浮遊する(添付資料 5(2)11)。

使用する培地、血清、試薬等は全て cGMP 規格に準拠している。ウシ血清についてはオーストラリア産でウイルスなどの病原体の混入がなく、さらにガンマ線照射されたものを使用する。

③ G47Δの構造

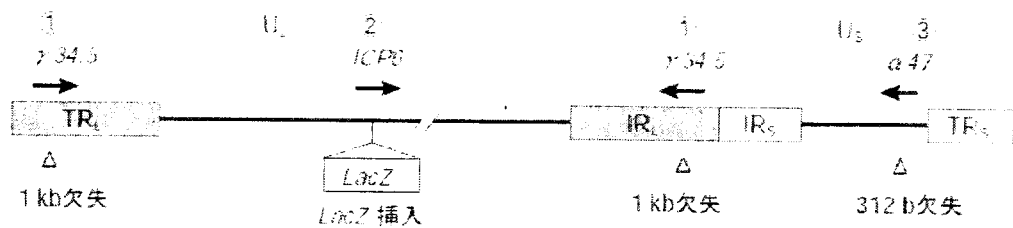


図 増殖性遺伝子組換え HSV-1 G47Δ の構造

HSV-1 のゲノムは 152 kb の大きさで、2 つの固有配列領域 (unique sequences: U_L と U_S) とその両端に位置する繰り返し配列 (terminal repeat: TR, inverted repeat: IR) からなる。①両コピーの $\gamma 34.5$ 領域の欠失により、病原性の消失と腫瘍選択的ウイルス複製が得られる。② ICP6 の不活化により、増殖が盛んで RR 活性が上昇している細胞において選択的にウイルスは複製する。③ $\alpha 47$ の欠失により、ウイルスに感染した細胞の MHC Class I の提示低下が防止される。また $\gamma 34.5$ 欠失ウイルスの複製能力が腫瘍細胞で改善するが、正常細胞への毒性に変化はない。

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。G47Δ 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、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¹⁾。すなわち、2 つコピーが存在する $\gamma 34.5$ 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 $\alpha 47$ 遺伝子の欠失という三重変異を有する (添付資料 5(2)11)。G47Δ は、 $\gamma 34.5$ 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、 $\alpha 47$ 遺伝子の欠失変異を加えることによって作製された。

$\gamma 34.5$ 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ことが判明している¹⁷⁾。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。 $\gamma 34.5$ 遺伝子産物はリン酸化 PKR に拮抗してウイルス蛋白の合成を可能にするが、 $\gamma 34.5$ 遺伝子欠失 HSV-1 は正常細胞では複製を行えない。しかし、正常細胞と異なり、腫瘍細胞では普遍的に PKR のリン酸化が低いいため、 $\gamma 34.5$ 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¹⁸⁾。

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。 $\alpha 47$ 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 $\alpha 47$ 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、 $\alpha 47$ 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 $\gamma 34.5$ 変異の second site suppressor として機能して $\gamma 34.5$ 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。

臨床製剤の製造に先立ち、使用する G47 Δ の全ゲノムの塩基配列の解析を行い、 $\gamma 34.5$ 、ICP6、 $\alpha 47$ の 3 つの遺伝子の改変箇所が設計どおりであることが確認された。遺伝子改変部付近の塩基配列解析結果を添付する (添付資料 5(2)11)。

④ G47 Δ 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 G207¹⁹⁾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¹⁾。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¹⁾。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²⁰⁾。

G47 Δ と野生型 HSV-1 との比較では、MOI=2 における産生ウイルスの回収量は、U87MG では感染 24 時間後において 9.5 倍、U138 では感染 22 時間後において 125 倍、野生型 HSV-1 のほうが G47 Δ より高く、野生型 HSV-1 に比べると G47 Δ の複製能は減弱している。

G47 Δ は細胞周期を停止させたヒト初代培養ケラチノサイト (HKC) において、MOI \leq 10 でウイルス複製による殺細胞効果を現さなかった²¹⁾。G207 は MOI=0.1 で正常星状細胞や正常神経細胞の培養細胞においてウイルス複製による殺細胞効果を現さなかった¹⁹⁾。

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 G47Δ 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 G47Δ (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¹⁾。ヒト前立腺癌細胞株 LNCap と DU145 において、MOI=0.1 で、G47Δ は G207 に比べ有意に速やかな殺細胞効果を呈した²⁰⁾。

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、G47Δ は MHC Class I の発現を 100% 維持した¹⁾。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、G47Δ 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、G47Δ 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¹⁾。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 G47Δ、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、G47Δ 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、G47Δ 治療群は 12 匹中 8 匹に治癒が見られた¹⁾。

アンドロゲ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²⁰⁾。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²⁰⁾。

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^{22, 23)}。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。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^{22, 23)}。

8) 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²⁴⁾。

9) 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 ($2\sim 5 \times 10^6$ pfu) を 1 回腫瘍内投与すると有意に生存期間が延長する²⁴⁾。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²⁵。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²⁶。

6. 安全性についての評価

(1) 遺伝子導入方法の安全性

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。

② 遺伝子導入に用いる G47Δ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。製造は、東京大学大学院医学系研究科・TR センター（脳神経外科）・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。正しい変異を有することが確認された G47Δを用い、WHO Vero 細胞のマスタースセルバンクを用いて臨床製剤は作製される。G47Δ製剤は 10%のグリセリンを含む燐酸緩衝液(Phosphate-buffered Saline: PBS) 内に浮遊している。これらの物質はいずれも純度および安全性に問題のないものを用いることとする。

これらは臨床製剤生産の 4 工程、すなわち、マスタースセルバンク、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。精製前のウイルス回収液（バルクハーベスト）において最も重点的な試験を行なう。ろ過と遠心による精製、およびチューブへの分注過程では細胞成分および動物由来の試薬を使用しておらず、各種ウイルスの混入の可能性は極めて少ないと考えられ、この 2 工程においては無菌試験およびエンドトキシン試験のみを行う。

品質試験項目を以下に記載する。その概要およびすでに得られている結果については添付資料 5 (2) 7 に記載する。

A. Vero 細胞のマスタースセルバンクの品質管理試験

無菌・真菌否定試験

マイコプラズマ否定試験

透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価
レトロウイルス否定試験 (FPERT: 逆転写酵素活性)
ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
ウイルス存在否定 *in vivo* 試験
SIV ウイルス 検出 PCR 試験
アイソザイムによる細胞確認試験
ウシ由来ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
ブタ由来ウイルス存在否定 *in vitro* 試験
サルD型レトロウイルス 検出 PCR 試験
STLV ウイルス 検出 PCR 試験
サル *Spuma* ウイルス 検出 PCR 試験
HIV-I・HIV-II 検出 PCR 試験
HTLV-I・HTLV-II 検出 PCR 試験

B. G47Δ精製前のウイルス回収液 (バルクハーベスト) の品質管理試験

無菌・真菌否定試験
マイコプラズマ否定試験
電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価
ヒトウイルス検出定量的 PCR 試験
SIV ウイルス 検出 PCR 試験
STLV ウイルス 検出 PCR 試験
サルD型レトロウイルス 検出 PCR 試験
サル *Spuma* ウイルス 検出 PCR 試験
レトロウイルス否定試験 (FPERT: 逆転写酵素活性)
ウシ由来ウイルス検出 PCR 試験
ブタ由来ウイルス検出 PCR 試験

C. 精製後の G47Δウイルス液の品質管理試験

無菌・真菌否定試験
エンドトキシン試験 (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 法)

D. G47Δ最終製品の品質管理試験

無菌・真菌否定試験
エンドトキシン試験 (Limulus Amebocyte Lysate (LAL) 法)

E. 東京大学脳神経外科で行なう品質管理試験

力価測定試験
野生型 HSV-1 ウイルス混入否定試験
Benzonase 定量

③ 被験者に投与する物質の純度およびその安全性

臨床研究用 G47Δ製剤は、cGMP 生産され、10% グリセリン/リン酸緩衝生理食塩水 (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°C以下で凍結保存される。使用する培地、血清、試薬等は全て cGMP 規格に準拠しており、医薬品、医薬品原料、またはそれに準じている。ウシ血清についてはオーストラリア産でウイルスなどの病原体の混入がなく、さらにガンマ線照射されたものを使用する。

④ 増殖性ウイルスの出現の可能性

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。

上記②および添付資料5(2)7に記載のように、G47Δ製剤中に増殖型・非増殖型の各種ウイルスの混入がないことの品質試験を英国 BioReliance 社に委託して行なう。また、最終製剤中の G47Δ以外の組換え HSV-1 の混入の有無については、LacZ 挿入部位の外側に設計したプライマーを用いた PCR を行い、野生型に由来する長さの DNA 断片が増幅されないことを検証する。

⑤ 遺伝子導入に用いる G47Δ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²⁷⁾。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 (2×10^6 pfu) の脳内単回投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F: 2×10^3 pfu) および G207 の可能最高投与量 (2×10^6 pfu) を対照として盲検法で比較した¹⁾。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、脳内単回投与において 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 (添付資料 5(2)12-1)。

更に A/J マウスを用い、G47Δの脳内単回投与、静脈内単回投与、腹腔内単回投与の安全性を、野生型 HSV-1 (strain F) を対照に、繰り返し徹底的に調査した。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単回投与で 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、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²⁸⁾。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, 29)}。ヨザルの脳に野生型 HSV-1 (strain F) を 10^3 pfu 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⁾ (添付資料 5(2)12-3)。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²⁹⁾。観察期間中、サルは全く無症状の上、1, 3, 7, 10, 14, 21, 31 日目に唾液、涙、膺分泌液を採取し、ウイルス排出の有無が検証されたが、いずれの検体からも感染性ウイルスおよび G207 の DNA は検出されなかった。G207 の脳内投与 1 ヶ月後 (3×10^7 pfu) もしくは 2 年後 (10^9 pfu) の解剖で採取した全身の組織検体からは、いずれも感染性ウイルスが検出されず、PCR により G207 の DNA が中枢神経系に限局して検出された。(添付資料 5(2)12-2)。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。

米国アラバマ大学バーミングハム校とジョージタウン大学医療センターにおいて、再発神経腫瘍を対象とし、腫瘍治療用に開発された第二世代遺伝子組換え HSV-1 の G207 を用いて再発悪性グリオーマ患者 21 例を対象に米国で第 I 相臨床試験が行われた (1998 年 - 2000 年)³⁰⁾。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、