

- ④ IL-12 タンパクによるナイーブ T 細胞(Th0)から Th1 細胞への分化誘導
- ⑤ APCs による腫瘍ペプチドの放出ならびに CTL 細胞 (CD8+ T 細胞) の活性化による全身的な抗腫瘍効果の誘導

このように IL-12 はそれが直接腫瘍細胞に作用して腫瘍細胞死を惹起するような物質ではなく、上記に述べた如く一般の免疫応答のなかで生体で産生されているサイトカインであり、悪性腫瘍に対しては宿主の NK 細胞、T 細胞を中心とする免疫系に作用し、その機能を高めることによって腫瘍退縮効果を誘導するのである。

## 6-2. 当該細胞を標的細胞とした理由

免疫抑制がかかった担癌状態の宿主で腫瘍退縮メカニズムを効率よく誘導する手法として、本遺伝子治療は、前立腺癌細胞を標的細胞とし、IL-12 遺伝子を導入する。癌細胞より分泌された IL-12 タンパクによって、感作された抗腫瘍 T 細胞、NK 細胞ならびに抗原提示細胞は活性化され、局所にて腫瘍抗原が高濃度に放出され、局所におけるさらなる抗腫瘍効果が発揮されるというワクチン効果が期待できる。またアデノウイルスベクターの前立腺癌細胞への遺伝子導入・発現効率ならびに抗腫瘍効果に関しては *in vitro* および *in vivo* 実験結果から良好な成績が得られている<sup>17), 23)</sup>。さらに本臨床研究における前立腺内へのアデノウイルスベクター液の注入は、一般診療にて行われている経直腸的前立腺針生検と手技的には同様であり、経直腸的超音波にて癌病変部を直視しながら注入可能である。また転移腫瘍に対するアデノウイルスベクター液の注入に関しても、CT ガイド下での転移病巣の針生検と手技的には同様であり、ベクター注入手技は容易であると考えられる。

## 6-3. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の概略及び当導入法を選択した理由

### 6-3-1. 遺伝子導入方法の理論的根拠

ヒトアデノウイルス 5 型は、幼児期に気道感染によるいわゆる「かぜ」を起こすウイルスの一つである。米国では 30 年以上の間、約 100 万人の兵士に対しワクチンとしてアデノウイルスが投与され、その後重篤な副作用の報告がなかったという実績を持つ。

本遺伝子治療臨床研究にて用いられるベクターは、E1A 欠損型の非増殖性アデノウイルスベクターが用いられる。E1A 欠損領域には IL-12 の cDNA が、サイトメガロウイルス (CMV) ・プロモーター及びシミアンウイルス 40 (SV40) ・ポリ A シグナルとともに組み込まれている。この組み換えウイルスベクターは、E1A 遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株 (293 細胞) 内で高力価になるまで増殖する。このウイルスベクター液を他の培養細胞や動物組織に感染させると、ウイルス粒子は細胞内に高率に侵入してウイルスゲノムは核内へと注入される。しかし、次に発現すべき E1A 遺伝子が欠損しているため、このタンパク質により転写活性化を受ける他のすべてのアデノウイルスプロモーターは駆動することができず、ウイルスの生活環はここで停止する。そして、外来 CMV プロモーターから転写される IL-12 遺伝子のみが発現することになる。CMV プロモーターの方向と E2 及び E4 遺伝子の向きは逆方向になるため、CMV プロモーター活性が E2 及び E4 遺伝子の転写を引き起こすことはない。また、他の正方向のアデノウイルス由来の遺伝子は CMV プロモーターの位置から遠く離れており、なおかつリニアなアデノウイルスゲノム上には SV40 ポリ A シグナルの他に少なくとも 4 個のポリ A シグナルが存在することから、CMV プロモーター活性がこれらの遺伝子を活性化する可能性は考えにくい。アデノウイルスベクターによる外来遺伝子発現の持続性は比較的長いものの一過性発現であり、染色体への積極的な組み込み機構は有していない。したがって、患者に直接ウイルスベクターを投与する *in vivo* 治療においても、移入遺伝子による副作用が永続することは考え難く、また宿主ゲノム内への組み込みに伴う insertional mutagenesis を考慮する必要もないと考えられる。さらに、極めて高力価の精製ウイルスが得られる点も、アデノウイルスベクターが *in vivo* 遺伝子治療に適している理由の一つである。

### 6-3-2. 遺伝子導入方法の概略

本項については「5-3-5. 遺伝子導入法」の項を参照されたい。

### 6-3-3. IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製方法と構造

本臨床研究に用いられる IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、現行の米国 GMP 基準に従

って、マスターセルバンク、マスターウイルスバンクなどの原材料から、その製造工程から最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとにベイラー医科大学遺伝子ベクター室において生産されている。

詳細は添付資料 12-7. に IL-12 遺伝子の構造ならびにアデノウイルスベクターの構造を記載し、添付資料 12-8. に IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製方法を記載する。

#### 6-3-4. 本遺伝子治療臨床研究に関する研究成果

本研究は研究分担者の那須保友を中心に実施されている<sup>17)</sup>。

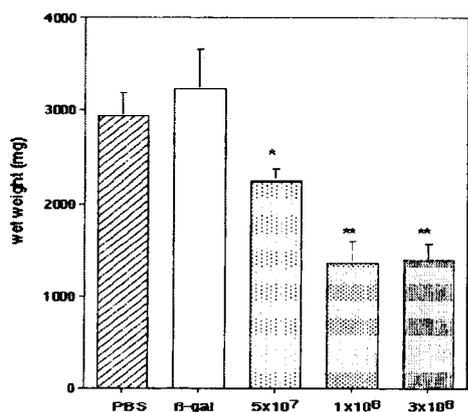
##### 6-3-4-1. 培養細胞を用いた研究成果

RM-9 マウス前立腺癌細胞株を用いた in vitro 実験において、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを細胞当たり 12.5~200 活性ウイルス粒子 (multiplicity of infections:MOI) 投与し、24 および 48 時間後の培養液中に分泌される IL-12 タンパク量を ELISA 法 (BioSource 社) にて検出した。その結果、ベクター投与量の増加に伴って、高いタンパク分泌量を認めた (最大 3-4ng/ml/200 MOI/48 時間)

##### 6-3-4-2. マウス動物実験系を用いた研究成果

###### 1) 局所腫瘍発育抑制効果

前臨床試験において IL-12 遺伝子治療の効果を検討するため、マウス前立腺癌同所移植モデルを用いた。5000 個の RM-9 マウス前立腺癌細胞株を C57B1/6 マウス (12 週齢、オス) の前立腺部に同所移植した。8-10 日後、腫瘍は 15-20mg のサイズとなり、 $5 \times 10^7$  から  $3 \times 10^8$  PFU のマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍内に注入した。ベクター投与 2 週間後にマウスは屠殺され、局所腫瘍サイズを評価した。マウス前立腺癌同所移植モデルにおける in vivo 実験結果であるが、 $1 \times 10^8$  PFU のベクター投与群において、ベクター投与 2 週間後の腫瘍サイズが有意に縮小していた (コントロール: 3226mg vs. IL-12: 1359mg;  $p < 0.001$ )。 (図-1)



20

P45

図-1

Tumor wet weight (average in mg, error of mean shown; 7 animals each group) was determined 14 days after virus injection. A dose of  $5 \times 10^7$  PFU of AdmIL-12 led to a significant growth suppression (\*  $p = 0.02$ ) compared to controls (PBS = phosphate buffer solution,  $\beta$ -gal = Adv/CMV/ $\beta$ -gal virus). Higher doses of AdmIL-12 ( $1 \times 10^8$  and  $3 \times 10^8$ ) led to enhanced growth suppression (\*\*  $p < 0.001$  compared to controls, and  $p = 0.05$  compared to the  $5 \times 10^7$  PFU group).

また骨盤内リンパ節への転移頻度も治療群において低下傾向をみとめた(コントロール: 83% vs. IL-12: 50%;  $p < 0.056$ )。(図-3-A)

## 2) 生存効果

上記と同じマウス前立腺癌同所移植モデルにて生存実験が行われた。生存実験では治療群において有意な生存期間の延長を認めた

(コントロール: 23.4日 vs. IL-12: 28.9日;  $p < 0.001$ )。(図-2)

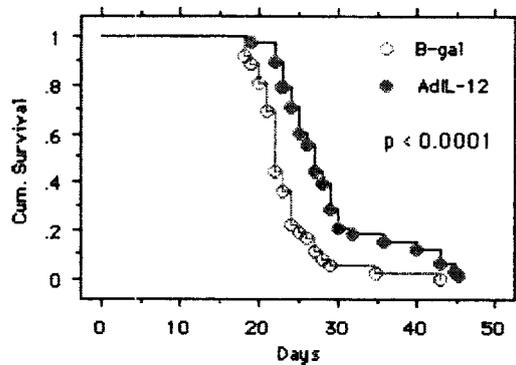


図-2 : Cumulative Kaplan-Meier survival plot for each of the groups of animals. There was a statistically significant ( $p < 0.0001$ ) difference between the IL-12 treated group and the control group by Mantel-Cox log rank analysis.

## 3) 転移抑制効果とその機構解析

肺転移モデルにおける転移抑制効果を検討するため、同所移植と同日にマウス尾静脈から RM-9 前立腺癌細胞株を注入し、6日後に前立腺局所腫瘍内にマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを投与し、ベクター投与8日後にマウスを屠殺、肺転移巣がカウントされた。

肺転移モデルでは IL-12 群において有意な肺転移の抑制を認めた(コントロール:  $62 \pm 3$ 個 vs. IL-12:  $24 \pm 5$ 個;  $p < 0.017$ )。(図-3-B)

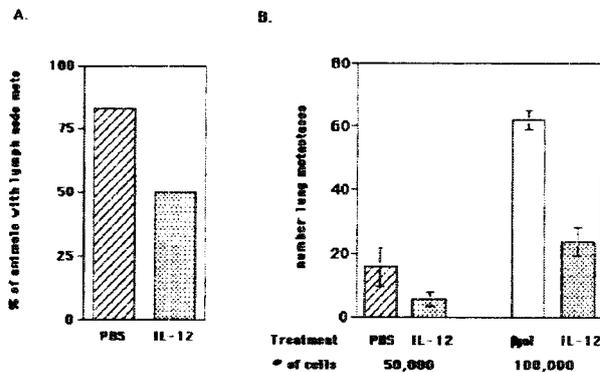


図-3 : A. Inhibition of spontaneous metastasis by AdmIL-12 treatment of orthotopic tumors was determined by histological evaluation of sections from pelvic lymph nodes collected from mice at day 14 after virus injection. The presence or absence of tumor cells was also confirmed by cytokeratin staining. Shown are the % of animals with lymph node metastatic deposits. B. Inhibition of lung metastases in the low metastasis protocol, 50,000 cells injected via tail vein at the time of orthotopic tumor initiation (left) and the high metastasis protocol at the time of orthotopic tumor initiation 100,000 cells injected via tail vein. The number of lung metastases was counted 8 days after intratumoral injection of AdmIL-12 (dose  $1 \times 10^8$  PFU) or PBS or ADV/CMV/ $\beta$ gal ( $5 \times 10^8$  PFU).

至適用量である  $1 \times 10^8$  PFU のマウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター投与後、脾臓腫大以外の副作用は認められなかった (図-4)。ベクター投与後の局所および全身的免疫反応の評価であるが、マウス血清中の IL-12 レベルは投与翌日にピークとなり、投与3日後にはベクター投与前のレベルに低下し、脾細胞中のNK細胞活性はベクター投与翌日にピークとなり投与5日間は活性の上昇が認められた。ベクター投与14日後における脾細胞を用いたCTL活性は有意な上昇を認めていない。

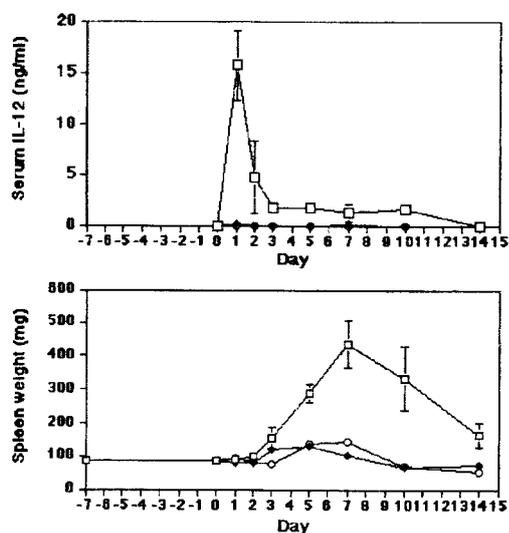


図-4 : Serum IL-12 concentration (in ng/ml, error of mean shown), and spleen size (in mg, error of mean shown) at various time points from orthotopic injection of RM-9 cells (day -7) through virus injection of the orthotopic tumor (day 0) with AdmIL-12 (□  $1 \times 10^8$  PFU, 3 animals), Adv/CMV/β-gal (◆  $1 \times 10^8$  PFU, 2 animals), or PBS (○ 1 animal).

#### マウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター

一投与群の腫瘍内において F4/80 を標識としたマクロファージの浸潤がベクター投与1-2日後にコントロール群に比べて有意に増加していたが、ベクター投与7日目までには速やかに低下していた。興味深いことに iNOS を標識したマクロファージの腫瘍内への浸潤がマウス IL-12 遺伝子発現アデノウィルスベクター投与7日目に有意に増加していた。iNOS を標識したマクロファージレベルは、数値的に F4/80 を標識としたマクロファージよりも少ないため、活性化されたマクロファージは F4/80 を標識としたマクロファージのごく少数であると考えられる。

腫瘍内における CD4+ T細胞および CD8+ T細胞の浸潤も、ベクター投与7日目に有意に増加していた。このような結果より我々は IL-12 局所遺伝子治療が NK細胞、マクロファージ、そして T細胞を介した抗腫瘍効果、転移抑制効果に関与すると結論した。

#### 4) マウス血清中の IL-12 濃度の変化と副作用

本研究は研究分担者の那須保友・江原 伸を中心に実施されている。

マウス血清中の IL-12 レベルは投与翌日にピークとなり (15000pg/ml)、投与 3 日後にはベクター投与前のレベルに低下した。IL-12 の上昇後に脾臓の重量は増加したが IL-12 レベルの低下に伴い脾臓の重量は正常に戻った。このことはヒトにおける rhIL12 (recombinant human IL-12 protein) の静脈内投与において血清中の IL-12 の上昇にともない発現した骨髄抑制、脾臓の腫大と類似した現象である。尚、一過性の IL-12 上昇に伴うと考えられる死亡例はマウスには認められず、また体重減少等も認められなかった。本実験において投与されたマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの量は  $1 \times 10^8$  PFU であり、virus particle(vp)換算で約  $2 \times 10^9$  vp となる PFU:vp 比 1:20 として計算)。本遺伝子治療臨床研究においては  $1 \times 10^{10}$  vp から投与が開始される。ヒトとマウスにおける体重差 ( $60\text{kg} : 30\text{g} = 2000:1$ ) を考慮するとマウスに投与された量はヒトでは  $4 \times 10^{12}$ vp に相当し、ほぼ計画における最大用量に匹敵する。(追記: 現在米国で使用中的のアデノウイルスベクターの PFU:vp 比は 1:72 との報告がある。それをもとに換算すると  $1.4 \times 10^{13}$ vp となり計画の最大用量の約 3 倍に匹敵する)

#### 5) 血液生化学データ (肝機能) の変化

さらにマウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター投与後の安全性に関する検討として肝機能の変化を検討した。治療効果実験と同様にマウス同所移植前立腺癌モデルを用いて、種々の濃度の ( $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$  PFU) マウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを腫瘍内投与した。尚、治療実験における至適用量は  $1 \times 10^8$  PFU である。ベクター投与 14 日後に屠殺し血液を採取し、種々の肝機能を測定した。その結果、代表的な肝機能の指標である ALT:Alanine aminotransferase AST:Aspartate aminotransferase は  $5 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  PFU 投与群においては肝機能は正常値内に保たれていた。 $3 \times 10^8$  PFU 投与群において上昇する傾向を認めたが統計学的有意差は認められなかった (表-1)。他のパラメーターである LDH, bilirubin, total protein, albumin における変化は認め

られなかった (表-2)。

表-1 (未発表データ)

	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
Normal range	84 - 143	260 - 383
$\beta$ -gal $1 \times 10^8$	$38.7 \pm 42$	$372.7 \pm 163$
IL-12 $5 \times 10^7$	$40.2 \pm 54$	$300.5 \pm 443$
IL-12 $1 \times 10^8$	$44.3 \pm 49$	$209.5 \pm 194$
IL-12 $3 \times 10^8$	$472.4 \pm 1010$	$593 \pm 1066$

表-2 : 各種パラメーターの実測値 (未発表データ)

Mouse No.	Vector	Tumor wt.(g)	T.Bil (mg/ml)	D.Bil (mg/ml)	T.Pro g/dl	ALT U/L	AST U/L	ALP U/L	LDH U/L	ALB g/dl	Comment
589	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	4.6052	0.6	0.9	4.9	33	418	16	4990	2.5	hemolyzed
591	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	2.8099	0.3	0.3	5.2	30	566	14	3730	3	
595	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	1.5109									hemolyzed
596	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	3.1287	0.4	0.4	6.3	14	260	9	3780	3.4	
598	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	3.2742	0.6	0.9	4.6	122	550	10	5280	2.4	hemolyzed
197	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	1.9453	0.4	0.6	6.5	19	181	12	928	3.4	hemolyzed
600	$\beta$ -gal ( $1 \times 10^8$ )	3.4051	0.2	0.2	6	14	261	10	2250	3.3	
Average		2.95	0.42	0.55	5.58	38.67	372.67	11.83	3493.00	3.00	
STDEV		1.02	0.16	0.30	0.79	41.61	162.96	2.71	1655.12	0.45	
101	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	1.286	1	1.6	6.7	17	175	18	1216	3.4	hemolyzed
102	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	1.7764	0.3	0.3	6.1	19	164	12	924	2.9	
103	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	1.2887	1	1.4	5.8	149	1200	2	3560	3.1	hemolyzed
104	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	1.8754	0.2	0.3	5.4	9	90	12	397	2.8	
105	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	0.3206	0.4	0.5	6.5	20	45	63	220	3.6	
106	IL-12 ( $5 \times 10^7$ )	0.8937	0.3	0.3	6.1	27	129	23	505	3.2	
Average		1.24	0.53	0.73	6.10	40.17	300.50	21.67	1137.00	3.17	
STDEV		0.58	0.37	0.60	0.47	53.63	443.28	21.44	1241.81	0.30	
107	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	0.634	0.5	0.3	5.6	14	82	6	1910	2.2	
108	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	0.7376	0.2	0.2	6.2	23	110	27	419	2.6	
109	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	1.1288	0.5	0.4	6.5	62	361	14	3120	3	
110	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	1.4241	0.3	0.5	5.3	11	88	5	311	2.4	
111	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	0.4722	0.5	0.6	7	136	537	8	2380	2.7	
112	IL-12 ( $1 \times 10^8$ )	0.2451	0.2	0.3	7.2	20	79	52	374	2.9	
Average		0.77	0.37	0.38	6.30	44.33	209.50	18.67	1419.00	2.63	
STDEV		0.43	0.15	0.15	0.75	48.57	193.99	18.24	1214.72	0.30	
113	IL-12	0.6121	0.2	0.2	5.8	22	89	30	287	2.9	

114	(3x10 <sup>8</sup> ) IL-12	0.6775	0.2	0.2	6.7	16	150	11	655	2.9	
115	(3x10 <sup>8</sup> ) IL-12	0.9136	0.3	0.2	6.5	22	128	24	459	3.4	
116	(3x10 <sup>8</sup> ) IL-12	0.8873	0.6	0.8	7	2280	2500	19	9230	3.7	hemolyzed
118	(3x10 <sup>8</sup> ) IL-12	0.9191	0.2	0.1	5.8	22	98	2	294	2.2	
Average		0.80	0.30	0.30	6.36	472.40	593.00	17.20	2185.00	3.02	
STDEV		0.15	0.17	0.28	0.54	1010.48	1066.32	10.99	3941.14	0.57	

### 6-3-4-3. 前立腺癌に対する IL-12 遺伝子治療臨床研究

上記の基礎研究結果を踏まえ、IL-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プロトコールは、2001年8月に米国国立衛生研究所(NIH)のOffice of Recombinant DNA Activities (ORDA:旧 RAC)及び米国食品医薬品庁(FDA)の認可を受けた。2004年5月18日ベイラー医科大学において第1例目の前立腺癌に対する IL-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が施行された。本臨床研究とベイラー医科大学で行われている IL-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とのプロトコール比較表を以下に提示する

研究名	前立腺癌に対する 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	前立腺癌に対する 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
実施施設	岡山大学	米国ベイラー医科大学
承認日/実施日	平成 15 年 11 月 27 日 (学内承認)	平成 13 年 8 月 (FDA の承認) / 平成 16 年 5 月 18 日 (実施)
実施症例	未実施	4 名(平成 19 年 6 月現在)
ベクターの種類	アデノウイルスベクター	
ベクターの生産	ベイラー医科大学遺伝子ベクター室 (同一の構造、方法にて製造)	
遺伝子	Interleukin-12	
ベクター投与量	レベル1	1x10 <sup>10</sup> vp
	レベル2	5x10 <sup>10</sup> vp
	レベル3	1x10 <sup>11</sup> vp
	レベル4	5x10 <sup>11</sup> vp
	レベル5	1x10 <sup>12</sup> vp
	レベル6	5x10 <sup>12</sup> vp

対象となる患者	年齢	上限なし	
	前治療	内分泌療法を必ず含む	内分泌療法、放射線療法、凍結療法
	病期	B,C,D	B,C,D
	転移症例	含まれる	
	術後の再発	含まれる	含まれない
	症例数	各レベル標準3人(最大6名) 標準21人(最大36名)	各レベル標準3人(最大5名) 標準21人(最大35名)
注入部位	前立腺、術後再発部位、 転移部位	前立腺	
治療としての位置付け	局所および全身治療		

ベイラー医科大学では2007年6月現在までに4例に対して実施されており重篤な副作用は発生していないとの情報を得ている。(注記1,2) 本臨床研究において用いるIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターはベイラー医科大学の臨床研究と同じく、同医科大学遺伝子ベクター室において作製されたものを用いる。

尚、ベイラー医科大学以外でも米国 Mount Sinai School of Medicine で前立腺癌に対するIL-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“Gene Therapy for Prostate Cancer That Returns After Radiation Therapy”が計画・承認されているが、いまだ症例の登録は行われていない。

(注記1) : 3年間で登録症例数が4例と少数である理由等について

ベイラー医科大学において先行して実施されたHSV-tk遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた臨床研究では放射線治療後の転移を有しない再発症例を対象とし約1年間(1996年8月28日から1997年8月14日)で18例登録され実施された。当初同様にIL-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もベイラー医科大学においては放射線治療後の転移を有しない再発症例を対象とし前立腺局所投与の手法を採用し、研究を迅速に終了し、転移巣を有する症例を対象とした研究を別途計画する予定であった。しかし同時期に転移巣を有しない症例を対象とした凍結療法の研究が開始され、そちらに多くの患者がリクルートされたため、症例の登録が当初の予定通り進まなかったとの情報をトンプソン教授より得ている。

その後、臨床研究推進の対応として2006年6月22日ベイラー医科大学での前立腺癌遺伝子治療会議において表のごとく適応の拡大が認められ、有転移症例も対象となるとともに内分泌療法なら

びに凍結療法後の再発も対象となった。会議の資料を資料として添付する。(添付資料 12-9)

(注記 2) : 日米における注入部位の差について (ペイラー医科大学では前立腺局所投与のみとし  
転移巣、術後局所再発巣への注入が計画されていない理由)

ペイラー医科大学では 1996 年に遺伝子治療を実施して以来、放射線科との協力により放射線治療後の再発、放射線治療との併用における前立腺へのベクター投与を中心に研究を進めてきた経緯があり、内分泌療法後の再発、原発巣である前立腺が摘除された後の再発については当初より研究対象として想定していない。われわれは当初より有効な治療法が確立されていない内分泌療法再燃前立腺癌を遺伝子治療の対象として臨床研究ならびに基礎研究を推進しており、今回もそのような観点から当該臨床研究を立案した。

## 7. 安全性についての評価

### 7-1. 遺伝子導入方法の安全性

#### 7-1-1. 遺伝子導入に用いるアデノウイルスベクターの純度

本遺伝子治療臨床研究に用いるベクターの生産には、以下のマスターセルバンク、マスターウイルスバンクを用いた。以下のバンクはFDAのガイダンスに沿った管理試験項目の条件を満たしている。

詳細は以下に記載する。

#### 1) 293 Master Cell Bank

TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
In vitro assay for the presence of viral Contaminants	Magenta Corp	None detected	None detected
In vivo test for the presence of inapparent viruses	Magenta Corp	None detected	None detected
Transmission electron microscopic evaluation of cultured cells	Magenta Corp	Report result	No identifiable Virus-like Particles
Detection of human immunodeficiency virus (HIV) retrovirus by inoculation of human peripheral blood lymphocytes with the test article and detection of the presence of virus by an antigen capture ELISA technique	Magenta Corp	None detected	None detected
Cell culture identification and Characterization	Magenta Corp	Human	Human
Growth of mammalian cells in soft Agarose	Magenta Corp	Report result	No growth
In vitro assay for the	Magenta Corp	None detected	None detected

detection of cytomegalovirus contamination			
Detection of hepatitis B surface antigen (HbsAg) in cell culture	Magenta Corp	None detected	None detected
In vitro assay for the detection of EBV DNA in cells	Magenta Corp	None detected	None detected
Southern blot hybridization assay for the detection of adeno associated virus (AAV) DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Southern blot hybridization assay for the detection of human parvovirus B19 DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Polymerase chain reaction assay for the detection of human parvovirus B19 DNA in the test article	Magenta Corp	None detected	None detected
Polymerase chain reaction assay for the detection of human T-Cell lymphotropic virus in biological samples	Magenta Corp	None detected	None detected
Test for the presence of bacterial and fungal contaminants; sterility test using a direct inoculation method	Magenta Corp	Pass	Pass
Test for the presence of agar-cultivable and non-cultivable mycoplasmas	Magenta Corp	Pass	Pass
Human Herpes Virus 6 Variant A by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/04/00)
Human Herpes Virus 6 Variant B by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/03/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-1 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
HTLV 1 and 2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Hepatitis C RNA by RT-PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)

2) Working Cell Bank

Working Cell Bank Lot 00400C293AMWCB (P5)			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
In vivo assay for viral contaminants- hen's eggs portion	ViroMed	Negative	Negative (09/08/00)
In vivo assay for viral contaminants- murine portion	ViroMed	Negative	Negative (09/07/00)
Adventitious virus in vitro	Texas Children's Hospital Pathology	Negative	Negative (04/12/00)

	Dept		
Hepatitis C RNA by RT-PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Herpes virus 6 Variant A DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/04/00)
Human Herpes virus 6 Variant B DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (08/03/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-1 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/25/00)
Human Immunodeficiency Virus HIV-2 DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
HTLV I and II DNA by PCR	ViroMed	Negative	Negative (07/21/00)
Sterility-bacterial	Texas Children's Hospital Pathology Dept	Negative	Negative (03/21/00)
Sterility-fungal	Texas Children's Hospital Pathology Dept	Negative	Negative (04/07/00)
Mycoplasma by PCR	CAGT QA/QC	Negative	Negative (05/03/00)
Mouse antibody production(MAP)	ViroMed	Negative	Negative (09/27/00)

3) Seed Vector

Seed Vector Lot B1870101			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Sterility testing(Vector)	The Methodist Hospital	(Bactec)	
Bacterial	Laboratory Services	Negative	Negative (10/22/01)
Fungal		Negative	Negative (11/09/01)
Mycoplasma polymerase chain reaction test(cells)	CAGT QA/QC	PCR negative	PCR negative (09/12/01)
Mycoplasma Culture Assay(cells)	The Methodist Hospital Laboratory Services	Negative	Negative (09/13/01)
Replication-competent Adenovirus	CAGT QA/QC	<1RCA/3 × 10 <sup>10</sup> vp	<1RCA/3 × 10 <sup>10</sup> vp (10/26/01)
Endotoxin(LAL)	CAGT QA/QC	<5.0EU/ml	<2.0 EU/ml (10/10/01)
Identity by PCR	CAGT QA/QC	590 base pairs	600 base pairs
Adenoviral	CAGT QA/QC	Report result	3.33 × 10 <sup>11</sup> iu/ml

titer(infectious units)			(10/15/01)
Virus concentration(viral particles by OD)	CAGT QA/QC	Report result	$2.00 \times 10^{12}$ vp/ml (10/03/01)
Particle to IU ratio	Calculated	<30	6.06

4) Master Virus Bank

Master Virus Bank 02980101 Sublot # 5			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Human Adeno-associated Virus 2 DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (10/14/02)
Human Immunodeficiency Virus-1 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
Human Immunodeficiency Virus-2 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (07/28/02)
Master Virus Bank 02980101 Sublot#5 Continued			
TEST	LABORATORY	SPECIFICATION	RESULT
Hepatitis-C RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (07/29/02)
Hepatitis B DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/05/02)
HTLV-1 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
HTLV-2 RNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/07/02)
Adventitious Virus in vivo Murine portion Embryonated egg portion	AppTec	Negative	Negative (02/13/03)
		Negative	Negative (02/13/03)
Adventitious Virus in vitro	Baylor/TCH Virology	Negative	Negative (07/29/02)
Cytomegalovirus by PCR	AppTec	Negative	Negative (11/14/02)
Parvovirus B19 by PCR	AppTec	Negative	Negative (08/01/02)
Epstein-Barr Virus DNA by PCR	AppTec	Negative	Negative (10/04/02)
Sterility Bacterial Fungal	The Methodist Hospital Laboratory Services	Negative@14 days	Negative (07/15/02)
		Negative@28 days	Negative (07/29/02)
Mycoplasma (Points to Consider)	BioReliance	Negative	Negative (08/26/02)
Endotoxin	CAGT QA/QC	<5.0EU/ml	<2.0EU/ml

(LAL)			(07/03/02)
Residual Cesium Chloride	West Coast Analytical Service	<5.0mg/ml	1.100 $\mu$ g/ml (05/02/03)
Titer(Infectious units)	CAGT QA/QC	Report result	$1.33 \times 10^{10}$ iu/ml (07/11/02)
Titer(Viral particles OD)	CAGT QA/QC	Report result	$9.68 \times 10^{11}$ vp/ml (07/31/02)
Particle to IU ratio	CAGT QA/QC	$\leq 80$	72.8
Replication competent adenovirus	CAGT QA/QC	$<1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10}$ vp	$<1 \text{ RCA}/3 \times 10^{10}$ vp (04/17/01)
Identity by sequence	Larke Technologies	Identity Confirmed	Identity Confirmed (08/08/02)
Functionality	BCM Dept. of Urology	Expression of IL-12 by transfected cells	IL-12 secretion by transfected cells detected by ELISA (05/07/03)

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの最終製品は凍結した状態で日本へ輸送され、受け入れ機関である岡山大学遺伝子・細胞治療センターにおいて受け入れ試験を行う。具体的には、変性の有無を確認する外観試験、ウイルスの力価の測定、さらに IL-12 の生物学的活性を確かめるため培養細胞への遺伝子導入時における IL-12 の産生能を検定する。

#### 7-1-2. 増殖性ウイルス出現の可能性

非増殖性アデノウイルスベクターや腫瘍溶解性アデノウイルスベクターの臨床使用経験の蓄積やベクター製造・分析技術の進歩等に伴ってRCAに関する見解も変化している。RCAに関しては日米EU医薬品規制調和国際会議(The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH) Gene Therapy Discussion Group (ICH-GTDG)において情報交換、意見交換が行われ見解・声明および活動状況がcommunication paperとして公開されている。日本の当局代表としては国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部が参加している。

アデノウイルスベクターの大量製造過程でベクターのゲノムが293細胞に組み込まれているE1遺伝子領域に近接し、相同組み換えが起きることがあり、その結果、現在のアデノウイルスベクター生産の技術では、ある程度の確率でRCAが生じてしまうことは避けられないと考えられている。現在、FDAではRCA量の許容限度は「 $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子あたり1個未満」であることを推奨している。日本では、FDAの推奨値を参考としながら、RCAが混入している場合に想定されるリスクをケースバイケースの原則で評価した上で、個別に許容限度を設定している。(ICH-GTDC会議におけるRCAに関する見解：2004年6月10日)

当該遺伝子治療臨床研究で使用されるアデノウイルスベクターは現在ベイラー医科大学で作製されており、「 $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子あたり1個未満」であるという条件を満たしたものが使用される。尚、現在ベイラー医科大学で進行中のIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターを使用した前立腺癌に対する臨床研究(平成13年8月FDA承認、平成16年5月治療開始)に使用されているアデノウイルスベクターはtiterは $9.68 \times 10^{11}$ vp/mlであり、おもに1バイアルあたり $1 \times 10^{11}$ vpに調製して保管されており「 $3 \times 10^{10}$  ウイルス粒子あたり1個未満」であるという条件を満たしている(平成15年9月最終製品リリース)。

また2004年6月10日のICH-GTDG会議では多量のRCAを含有する非増殖性アデノウイルスベクターを高用量投与された症例に関するデータが米国研究製薬工業協会(PhRMA)によりとりまとめられ、がん患者において、RCAに起因する重篤な副作用はみられず、RCAの対外への排出も認められなかった

ということが報告されている。さらにアデノウイルスベクター製品の各ロットに RCA が高レベルで混入することは認めないという点について、ICH 各極は合意に至っている。

(ICH-GTDG 会議の見解 日本語訳より抜粋：国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子細胞医薬部 仮訳)

### 7-1-3. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

#### 1) 動物実験の結果

アデノウイルスベクターを腫瘍内投与した場合の腫瘍周囲及び全身の他臓器への偶発的遺伝子導入の可能性を調べるために、ヒト前立腺への至適投与量 ( $1.0 \times 10^{10}$  PFU: ベイラー医科大学での HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター臨床研究より) の 0.5 倍から 50 倍 (体重換算) に相当するベクター量をマウス前立腺に投与し、その広がりを解析する動物実験がベイラー医科大学で実施された<sup>24)</sup>。その結果、前立腺部においては容易にベクター DNA が検出され、解剖学的に隣接する臓器である精囊、リンパ節 (骨盤部)、肝臓、腸管への広がりが認められた。尿、精囊液、精子、肺への広がりは全く認められなかった。精巣においては高濃度注入群において 1 匹に認められた。血液においては低濃度において 1 匹にのみ認められた。マウスにおいては、アデノウイルスベクターの注入側からの広がりは解剖学的に隣接する臓器にのみ主に認められ、全身的な広がりを示唆する所見はなかった。またアデノウイルスベクターの投与によるマウスの死亡は認めなかった。この動物実験は条件上、マウス前立腺体積の約 3 分の 1 に相当する容積のベクター液を注入する実験であり一部は周囲に漏出したと考えられるが、ヒトの場合は 30 分の 1 又は 15 分の 1 に相当する容積を注入するため (ヒト前立腺 30ml、注入ベクター量 1ml 又は 2ml) 漏出の可能性は極めて低いと考えられる。本遺伝子治療臨床研究は IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターではなく Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた実験結果であるが、ウイルス学的に同一構造を有するアデノウイルスベクターであり、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターについても同様の結果であることが予想される。岡山大学泌尿器科において実施された臨床研究 (研究課題名: 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)において治療直後から7日間において尿中ならびに血液中のアデノウイルス量をPCR法にて確認したが、血液中へのアデノウイルスベクターの存在は9例中8例においては認めておらず、投与後90分まで存在し翌日には消失した症例を1例認めた。本臨床研究においても、治療直後からの尿中ならびに血液中のアデノウイルスベクターの存在をモニタリングし、安全性の確認を行う。

#### 7-1-4. 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療後、尿中ならびに血液中のアデノウイルスベクターの存在がないことを確認するまで個室管理とし、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。

#### 7-1-5. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

アデノウイルス DNA は宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく複製するため、積極的に染色体内に組み込まれる機構を持っていない。アデノウイルス DNA が染色体に取り込まれた場合でも、組み込まれた DNA が活性化されウイルス粒子として染色体上から複製を認めた報告はない。また、IL-12 によるタンパク質の発現は一過性であり、この点は安全性の観点から長所と考えられる。

#### 7-1-6. がん原性の有無

ヒト・アデノウイルスには41種の亜型が存在し、6群に分類されているが、げっ歯類におけるその腫瘍形成能は群によって異なり、2型、5型を含む群では発癌性は示されていない。アデノウイルス5型は幼児期の「かぜ」の原因ウイルスの一つであり、ヒトにおいても感染による悪性腫瘍の発生は報告がない。さらに、哺乳類の細胞をトランスフォームさせる機能を持ち、げっ歯類における癌化に関与しているとされるE1領域をIL-12遺伝子発現アデノウイルスベクターにおいては欠損させてあり、癌原性はないと考えられる。最近、アデノウイルス9型のE4領域にコードされている蛋