

遺伝子治療臨床研究実施計画書

(平成 19 年 3 月 12 日改訂)

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

北里大学病院

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

目 次

目次	1
1. 遺伝子治療臨床研究の名称	5
2. 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氏名およびその担当する役割	5
3. 実施施設の名称およびその所在地	7
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	7
5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患およびその選定理由	8
(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	8
① 対象疾患に関する現時点での知見	8
② 当該遺伝子治療臨床研究の概要	9
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	10
6. 遺伝子の種類およびその導入法	11
(1) 人に導入する遺伝子の構造と性質	12
① 人に導入する遺伝子の構造	12
② 人に導入する遺伝子の性質	12
③ 導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性	12
(2) 本計画で使用するその他の組換えDNAの構造と性質	12
(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当該細胞を標的細胞とした理由	12
(4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由	13
(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合	14
① 野生型ウイルスの生物学的特徴および人に対する影響	14
② ウイルスベクターの作製方法	14
③ ウイルスベクターの構造	15
④ ウイルスベクターの生物学的特徴	15
7. 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 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	15
② 患者に投与する物質の純度およびその安全性	17
③ 岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターで実施される試験	17
④ 増殖性ウイルス出現の可能性	19
⑤ 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性	20
⑥ 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	21
⑦ 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	24
⑧ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	24
⑨ がん原性の有無	25
(2) 遺伝子産物の安全性	25
8. 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	25
9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	27
(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	27
(2) 被験者の選択基準及び除外基準	27
① 選択基準	27
② 除外基準	28
(3) 被験者の同意の取得方法	29
(4) 実施期間および目標症例数	29
(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法	29
① 対照群の設定および治療スケジュール	29
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)	30
③ ガンシクロビル(GCV)の投与	30
④ 臨床検査項目および観察項目	32
⑤ 副作用の判定基準	35
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	36
⑦ 被験者の安全性確保および健康被害補償	36
⑧ 症例記録に関する記録用紙等の様式	37
10. 患者のプライバシー保護と秘密の安全	38
(1) 実施施設での安全管理措置	38
(2) 本研究における個人情報の保護	38
(3) 記録の保存	39
11. 同意の取得ならびに成績の公表の方法	39

12. 当該遺伝子治療臨床研究の実施設施設の施設設備の状況、およびベクターの移送	41
13. 当該遺伝子治療研究に関連する国内外の研究状況、 および当該研究における今後の研究への反映	42
(1) 当該遺伝子治療臨床研究に関する培養細胞、実験動物、および臨床研究成果	42

<実施計画書に添付すべき資料>

研究者の略歴および研究業績	49
---------------	----

<添付資料>

- 資料 1：HSV-tk遺伝子の塩基配列
- 資料 2：HSV-tk遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製法
- 資料 3：ペイラー医科大学との共同研究に関する公式書簡、IND6636、
 患者同意書（各、和訳含む）、およびベクターの品質証明書
- 資料 4：ガンシクロビル（デノシン）添付文書
- 資料 5：評価項目およびスケジュール
- 資料 6：Performance Statusの評価指標
- 資料 7：副作用の評価指標
- 資料 8：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 症例記録用紙
- 資料 9：遺伝子治療における重篤な有害事象などに関する報告書
- 資料10：前立腺がん遺伝子治療臨床研究の説明書
- 資料11：審査の過程及び結果を示す資料
- 資料12：個人情報保護に関する資料
- 資料13：免疫学的ならびに病理組織学的解析方法に関する資料
- 資料14：前立腺がん遺伝子治療臨床研究における前立腺針生検の説明書
- 資料15：前立腺がん術後病理組織における遺伝子治療との対照比較研究。
 術後病理組織の解析、および医学情報の研究利用の説明書

<参考文献>

- 文献 1：Jemal A, et al. CA Cancer J Clin 56: 106-130, 2006.
- 文献 2：Egawa S, et al. Int J Urol. 6: 295-300, 2001.

- 文献 3 : Donohue JF, et al. J Urol. 176: 991-995, 2006.
- 文献 4 : Shipley WU, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 54: 1302-1310, 2002.
- 文献 5 : Kadmon D. Rev Urol. 4: 87-89, 2002.
- 文献 6 : Eastham JA, et al. Hum Gene Ther 7: 515-523, 1996.
- 文献 7 : Hall SJ, et al. Int J Cancer 70: 183-187, 1997.
- 文献 8 : Hall SJ, et al. Cancer Res 58: 3221-3225, 1998.
- 文献 9 : Timme TL, et al. Cancer Gene Ther 5: 74-82, 1998.
- 文献10 : Herman JR, et al. Hum Gene Ther 10: 1239-1249, 1999.
- 文献11 : Ayala G, et al. Hum Pathol 31: 866-870, 2000.
- 文献12 : Shalev M, et al. J Urol 163: 1747-1750, 2000.
- 文献13 : Miles BJ, et al. Hum Gene Ther 12: 1955-1967, 2001.
- 文献14 : Teh BS, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 51: 605-613, 2001.
- 文献15 : Kattan MW, et al. J Natl Cancer Inst 90: 766-771, 1998.
- 文献16 : Soloway MS, et al. J Urol 167: 112-115, 2002.
- 文献17 : Satoh T, et al. Int J Radiat Oncol Biol Phys 59: 562-571, 2004.
- 文献18 : Satoh T, et al. Curr Gene Ther 5: 111-119, 2005.
- 文献19 : Ayala G, et al. Mol Ther 13: 716-728, 2006.

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

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

2. 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

馬場志郎 北里大学医学部・泌尿器科学・教授
遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の総括

(2) 総括責任者以外の研究者氏名およびその担当する役割

研究担当医師

佐藤威文 北里大学医学部・泌尿器科学・講師
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調整投与、臨床観察、臨床効果判定、基礎的効果判定

岩村正嗣 北里大学医学部・泌尿器科学・診療助教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、病理学的評価判定

宋 成浩 北里大学医学部・泌尿器科学・講師
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、病理学的評価判定

藤田哲夫 北里大学医学部・泌尿器科学・助手
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、基礎的効果判定、免疫学的評価、組織内における HSV-tk 遺伝子の同定

松本和将 北里大学医学部・泌尿器科学・助手
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、基礎的効果判定、免疫学的評

価

岡安 勲 北里大学医学部・病理学・教授
病理学的評価・解析、遺伝子治療臨床研究における指導

小幡文弥 北里大学医療衛生学部・免疫学・教授
免疫学的評価・解析、遺伝子治療臨床研究における指導

研究協力者

公文裕巳 岡山大学大学院医歯学総合研究科・病態制御科学専攻病態機構学（泌尿器
病態学分野）・教授

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・所長
遺伝子治療臨床研究における指導

那須保友 岡山大学大学院医歯学総合研究科・病態制御科学専攻腫瘍制御学（泌尿器
病態学分野）・助教授

遺伝子治療臨床研究における指導、評価判定

山田雅夫 岡山大学大学院医歯学総合研究科・社会環境生命科学専攻国際環境科学（ウ
イルス学講座）・教授

ウイルスベクター力価の測定、安全性の確認、遺伝子治療臨床研究におけ
る指導

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臨床的解析の指導

Dov Kadmon ベイラー医科大学・泌尿器科・教授
遺伝子治療研究における指導、評価判定

Thomas M. Wheeler ベイラー医科大学・病理学科・教授
病理学的評価・解析の指導

Malcolm K. Brenner ベイラー医科大学・小児科・教授、遺伝子・細胞治療センター・室長

	アデノウイルスベクターの作製、安全性の確認、品質管理
田畑健一	ベイラー医科大学・泌尿器科・研究員
	ウイルスベクターに関する情報の提供
山下英之	ベイラー医科大学・泌尿器科・研究員
	ウイルスベクターに関する情報の提供

3. 実施施設の名称およびその所在地

名称：北里大学病院

所在地：〒228-8555 神奈川県 相模原市 北里 1-15-1

電話（代表）042(778)8111

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

本研究は、単独治療では治療後に再発する可能性が高い（ハイリスク群）限局性前立腺癌に対し、Herpes Simplex Virus-thymidine kinase（以下：HSV-tk）遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に注入し、抗ウイルス剤であるガンシクロビル（Ganciclovir：GCV）を全身投与した後、根治的前立腺摘除術（以下鏡視下手術を含む）を施行した場合の安全性、および直接的な抗腫瘍効果と、間接的な免疫学的効果の解析・評価を目的とした第 I/II 相試験である。

臨床的に遠隔転移を認めず、かつ術後 5 年以内に再発する可能性の高い予後不良限局性前立腺癌に対し、まず HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に直接注入し、次いで GCV を全身投与する。その後同治療を反復加療した後、根治的前立腺摘除術を施行する。当該検討のプライマリーエンドポイントは、アデノウイルスを用いた HSV-tk 遺伝子発現ベクターの反復投与、ならびに外科手術を併用するネオアジュバント療法としての安全性の確認であり、セカンダリーエンドポイントは、当該遺伝子治療における有効性を来す可能性のある免疫学的な反応の解析と、同治療効果の病理学的な評価を目的とする。

5. 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

外科的切除は可能ではあるが、手術前における血清前立腺特異抗原値（PSA）、臨床病期、および前立腺生検の病理学的分化度を指標とした予測（ノモグラム評価）において、術後5年以内に35%以上の確率で再発するとされるハイリスク群症例（総得点115点以上）で、かつ臨床的に遠隔転移を認めない限局性前立腺癌患者を対象とする。

この背景として、近年、本邦における前立腺癌患者の発生は増加の一途を辿っている。前立腺癌による死亡者数は、1950年には83人であったが、1970年にはその約10倍の930人となり、1990年には約45倍の3,460人となった。さらに1999年には7,005人に達し、1990年から僅か10年足らずの間に2倍以上の増加となっている。またその罹患者数についても、1994年は10,940人であったが、2015年には30,285人へと著しい増加が予測されている。一方米国においては、2006年度は234,460人が新たに前立腺癌と診断され、27,350人が同疾患で死亡すると推定されている¹⁾。

前立腺に限局した癌の場合は一般に根治的前立腺摘除術が適応となる事が多く、近年PSAのスクリーニングにより、外科的切除可能と判断される早期癌の患者が増加してきている。しかしながら外科的切除後の全体での再発頻度は、20～57%^{2, 3)}とその高い再発率が問題となっている。悪性腫瘍の治療において、外科的切除後の再発に対する追加治療で完治することは困難なことが多く、前立腺癌においても同様であるとされる。このような高い再発率の一因として、腫瘍の被膜外浸潤、精嚢浸潤、リンパ節転移、あるいは外科切除縁陽性など様々な理由で外科的切除が不完全に終わることが約半数にも見られることがあげられる。この状況を改善するべく無作為抽出を含めた数々のトライアルがなされてきた。その多くは術前一定期間の内分泌療法後に根治的前立腺摘除術を適用し、より完全な切除を目指そうというものである。然るに、根治成績に関しては術前内分泌療法を併用しても術後PSA再発のリスクは軽減することはなく不満足な結果¹¹⁾となっている。同様のトライアルは放射線治療の分野でも行われているが、術前内分泌療法後のテス

トステロン分泌回復の遅れなどが影響するため、その優位性については未だ明らかな結論は得られておらず⁴⁾、当該疾患に対する治療戦略の一環として「新たな術前治療による根治的前立腺摘除術成績の向上を目指した検討」が必要とされている。このような背景に基づき、本研究の対象患者として術後再発する可能性の高い（ハイリスク群）限局性前立腺癌患者を選定し、アデノウイルスベクターにより HSV-tk 遺伝子を直接癌細胞に導入し、ガンシクロビルを投与する遺伝子治療と根治的前立腺摘除術を併用する臨床研究を計画した。

②当該遺伝子治療臨床研究の概要

毒性の低い薬剤（プロドラッグ）を代謝して、強い細胞障害性のある物質に変換させる働きを持つ酵素をコードする遺伝子は、別名「自殺遺伝子」と呼称され、外来性にこの遺伝子を導入された細胞はプロドラッグの投与により選択的に死に至る。一般に細菌やウイルスが保有し哺乳動物細胞には存在しない代謝系酵素をコードする遺伝子が自殺遺伝子として用いられる。我々が用いる自殺遺伝子である HSV-tk 遺伝子は、単純ヘルペスウイルスに存在するチミジンキナーゼをコードしており、この酵素は哺乳動物細胞の有するチミジンキナーゼとは異なる基質特異性を有している。この基質特異性の違いを利用して開発された抗ウイルス薬であるガンシクロビル（GCV : Ganciclovir）がプロドラッグとして用いられる。遺伝子導入された細胞内で発現した HSV-tk は GCV を特異的にリン酸化し、1 リン酸化 GCV がつくられる。その後細胞内のチミジンキナーゼ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 ポリメラーゼを阻害したり、DNA に取り込まれ DNA の伸長を阻害し、細胞をアポトーシスに導く。遺伝子非導入細胞では、このリン酸化反応の律速段階である最初のリン酸化反応が起こらないため、GCV は活性化されず細胞毒性を示すことはない。一方、本治療法において最も興味深い点は、薬剤代謝性遺伝子が導入されていない周りの腫瘍細胞も死滅現象（バイスタンダー効果）が認められることである。このバイスタンダー効果のメカニズムは不明な部分もあるが、遺伝子導入細胞で産生された細胞障害性物質が、gap junction を介して周囲の遺伝子非導入細胞に伝播されることにより、これらの細胞も死滅すると考えられている。さらに、腫瘍特異的免疫の活性も *in vivo* におけるバイスタン

ダー効果の発現に関与していると考えられている。

本研究においては、術後再発の可能性が高い局所限局性前立腺癌にこの自殺遺伝子治療を併用し、その安全性のみならず、殺細胞効果によってもたらされる臨床効果と根治的前立腺摘除術との併用効果も観察する。詳細については後述の「9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画」の項で述べる。

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

前立腺癌において、低分化癌の存在や前立腺被膜外浸潤、術前における PSA の高値等は予後不良因子とされ、このような症例における根治的前立腺摘除術後の再発が問題となっている。一般に再発症例に対しては、局所放射線照射や内分泌療法等が救済療法として選択されるが、根治を得る可能性は全体の 10～20%程度であり、概して低い⁵⁾とされている。術前に内分泌療法を施行するネオアジュバント療法も完全切除の可能性を高くする目的で行われているものの、多くの検討では術後の PSA 再発リスクは軽減することはなく不満足な結果¹¹⁾となっている。然るに治療戦略の一環として「何らかの術前治療による根治的前立腺全摘除術成績の向上を目指すこと」は検討の価値が十分あるものであり、「新たな術前治療法」の確立が切に望まれる。すなわち、術前内分泌療法に代わるより有効な治療法を確立できれば、外科切除による根治の可能性を高めることができる。

前立腺癌に対する遺伝子治療は、1995年に米国ヴァンダービルト大学のレトロウイルスベクターによるアンチセンス myc RNA 遺伝子を用いた治療が開始され、次いで米国ベイラー医科大学において、放射線治療後の局所再燃前立腺癌患者を対象として、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターによる第 I 相臨床研究が開始された。その後現在までに、前立腺癌を対象とした遺伝子・細胞治療は、NIH においてこれまでに 59 の臨床研究プロトコールが認可、開始されており、前立腺癌に対する「新たな治療法」としての地位を確立してきている。また HSV-tk 遺伝子を用いた遺伝子治療は、同じく米国ベイラー医科大学における上記第 I 相臨床研究患者に対する同アデノウイルスベクターの追加投与や、前立腺全摘出症例に対する術前遺伝子治療との組み合わせによる第 II 相臨床研究などの検討において、殺細胞効果のみならず免疫系の賦活効果を期待させる

結果も確認されてきており、有効性を来す可能性のある更なる免疫学的な反応の検証が必要とされている。また当該ベクターにおいては、すでに本邦における投与実績があり、早急なる「新たな術前治療法」の確立が望まれるハイリスク前立腺癌に対して、根治を目指したネオアジュバント遺伝子治療の検証として、当該遺伝子治療を選択し計画した。

6. 遺伝子の種類およびその導入法

遺伝子治療の臨床応用は、外来遺伝子を効率よく標的細胞に導入することのできるベクターの開発により、現実のものとなってきている。生細胞に外来遺伝子を導入する方法としては、非増殖性ウイルスベクターを用いる方法、リポソームを用いる方法、naked DNA を直接導入する方法などが実用されており、さらに新しい工夫もいろいろ試みられている。しかし、HSV-tk 遺伝子を直接癌組織に導入する本研究の場合、できるだけ多くの癌細胞に遺伝子導入することが局所効果を期待するためには重要であり、高い導入効率を有するベクターが適しているといえる。マウス白血病由来のレトロウイルスベクターが基礎実験や臨床応用の実績から、その遺伝子導入効率や安全性についてもよく研究されており、米国を初めとする各国の遺伝子治療のプロトコールに用いられている。しかし、このレトロウイルスベクターの短所としては、高力価のウイルスを得ることが困難なこと、活発に増殖している細胞にしか感染できないことなどがあげられる。一方、アデノウイルスベクターにおいては、高力価で非増殖性細胞にも感染可能な特徴を有し、その高い遺伝子導入効率から、前立腺癌に対する *in vivo* 遺伝子治療として、すでに本邦においても検討されるなどの実績を有している。アデノウイルスベクターの問題点としては、1) 細胞毒性の問題、2) 免疫反応の問題があげられる。細胞毒性については、細胞数に比して高い MOI (multiplicity of infection) のアデノウイルスベクターが作用した場合に問題となる。また免疫反応としては標的細胞からの IL-6 や IL-8 などのサイトカインの産生による非特異的炎症反応、中和抗体が産生される液性免疫反応等が考えられている。その他の導入効率の高い方法として、膜融合型リポソームもあるが、その調製が煩雑であるという問題がある。本研究では、複製能を失うよう遺伝子改変したヒトアデノウイルス 5 型に HSV-tk 遺伝子を組み込んだ HSV-tk 遺伝子発現組換えアデノウイルスベクター (Adv. RSV-TK) を

用いる。

(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

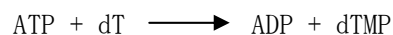
ラウスサルコーマウイルス (RSV) プロモーター (428 bp) と HSV-tk (SV40 ポリ A 付加シグナルを含む 2,801 bp、このうち HSV-tk の構造遺伝子は 1,131 bp) を順番につないだ DNA である。HSV-tk 遺伝子の塩基配列を資料 1 に示す。

②人に導入する遺伝子の性質

Adv. RSV-TK 粒子は細胞内に感染・侵入して、上記①に記載した遺伝子を含むゲノムをその核内に注入する。核内で RSV プロモーターは HSV-tk 遺伝子の cDNA のみを転写させることになり、HSV-tk が発現される。この転写は SV40 ポリ A 付加シグナルにより終了する。

③導入遺伝子からの生成物の構造およびその生物活性

HSV-tk は単純ヘルペスウイルスのもつチミジンキナーゼで、チミジン (正確にはデオキシチミジン ; dT) の代謝に関与した酵素であり、以下の反応を触媒する。



376 アミノ酸よりなる。

(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当該細胞を標的細胞とした理由

前立腺癌細胞を標的として HSV-tk 遺伝子導入を行う。遺伝子導入された細胞内で発現した HSV-tk は、別途投与された GCV を特異的にリン酸化し、1 リン酸化 GCV がつくられる。その後細胞内のチ

ミジンキナーゼ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 ポリメラーゼを阻害したり、DNA に取り込まれ DNA の伸長を阻害し、癌細胞をアポトーシスに導くことが期待される。

(4) 遺伝子導入方法の概略および当該導入法を選択した理由

ヒトアデノウイルス5型は、気道感染によるいわゆる「かぜ」を起こすウイルスの1つである。遺伝子導入の目的では、ヒトアデノウイルス5型から E1A、E1B、および E3 領域を欠損させた非増殖性アデノウイルスベクターが多く用いられている。今回使用する非増殖性の HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターでは、ヒトアデノウイルス5型から E1A・E1B 領域のみを欠損させてあり、代わりに HSV-tk の cDNA が RSV プロモーター及び SV40 ポリ A シグナルとともに組み込まれている。この組換えウイルスベクターは、E1A・E1B 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、発現すべき E1A 遺伝子が欠損しているため、このたん白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 RSV プロモーターから転写される HSV-tk 遺伝子が発現することになる。一方、RSV 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、RSV プロモーターが 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 RSV 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 付加シグナルの他に少なくとも4個のポリ A 付加シグナルが存在することから、RSV プロモーター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1つである。アデノウイルスに対しては生体内で抗アデノウイルス抗体が産生されることが知られており、繰り返し投与時には初回投与と同等の効果を出せない可能性が指摘されている。しかし、米国で進行中の臨床研究では、初回のベクター投与により血清抗アデノウイルス抗体が上昇するにもかかわらず、2回目以降の投与によってもその臨床効果が得られる症例が確認されている。

(5) ウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合

①野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている。これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで51の血清型に分けられており、Adv. RSV-TKはヒトアデノウイルス5型(Ad5)を宿主として作製された。Ad5は4歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される。Ad1、2、5、6に対する中和抗体保有率は1~2歳齢では46.7~93.3%で、20歳齢までに100%に達している。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コットンラット及びニュージールランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている。Ad5を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5に由来するウイルスベクターが遺伝子治療で汎用されている。

Ad5のウイルスキャプシドは直径80nmの正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約36kbの2本鎖DNAである。Ad5はヒトに感染し、増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。Ad5の感染は不顕性に終わることが多いが、4歳以下の乳幼児では急性熱性咽頭炎となる場合もある。いずれの場合も感染後に産生される中和抗体で再感染は阻止される。リンパ節に潜伏する例や小児の腸重積症に関わる可能性も指摘されている。

Ad5は56℃、30分の加熱で感染性を失う。

②ウイルスベクターの作製方法

本研究に用いられる HSV-tk 遺伝子発現ウイルスベクターは、現行の米国 cGMP (current Good Manufacturing Practices) 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。資料 2 に作製方法の詳細を示す。

③ウイルスベクターの構造

資料 1 に HSV-tk 遺伝子の塩基配列を示す。

④ウイルスベクターの生物学的特徴

Adv. RSV-TK は Ad5 の E1 領域の遺伝子を欠失しているため、これらの領域にコードされているウイルスタンパク質群を発現できない。E1A 及び E1B 遺伝子から作られるタンパク質はウイルス DNA の複製に必要なため、E1A 及び E1B 遺伝子を持続的に発現している細胞 (例えば 293 細胞) や Ad5 と共感染した細胞でなければ Adv. RSV-TK の増殖は起こらない。また、Adv. RSV-TK は感染した細胞内で外来 RSV プロモーターから転写される HSV-tk 遺伝子のみが発現することになる。

7. 安全性についての評価

(1) 遺伝子導入方法の安全性

①遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

本研究に用いられる HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター液は、ベイラー医科大学遺伝子ベクター室において生産され、北里大学病院で輸入して使用する。ベクターの受入れ試験は、岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターで実施する。ベイラー医科大学、ならびに岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターで実施される安全性試験について以下に述べる。

A. 293 細胞のマスターセルバンクの品質管理試験

ウイルス存在否定 *in vitro* 試験

ウイルス存在否定 *in vivo* 試験

透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価

HIV 否定試験 (バイオアッセイ・ELISA)

アインザイムによる細胞確認試験

ソフトアガロース培養試験

サイトメガロウイルス否定 *in vitro* 試験

B型肝炎ウイルス表面抗原 (HBsAg) 検出試験

EBウイルス DNA 検出 *in vitro* 試験

アデノ随伴ウイルス (AAV) DNA 検出 *in vitro* 試験

ヒトパルボウイルス B-19 DNA 検出試験

HTLV-I・HTLV-II 検出 PCR 試験

無菌・真菌否定試験

マイコプラズマ否定試験

レトロウイルス否定試験 (逆転写酵素活性)

C型肝炎ウイルス検出試験 (PCR)

腫瘍形成能確認試験 (ヌードマウス)

B. HSV-tk マスターウイルスバンクの品質管理試験

無菌試験

ウイルス存在否定 *in vitro* 試験

ウイルス存在否定 *in vivo* 試験

マイコプラズマ否定試験

HTLV-I・HTLV-II 検出 PCR 試験

HIV 検出 PCR 試験

EB ウイルス検出 PCR 試験

サイトメガロウイルス検出 PCR 試験

B 型肝炎ウイルス検出 PCR 試験

アデノ随伴ウイルス (AAV) DNA 検出 *in vitro* 試験

ヒトパルボウイルス B-19 DNA 検出試験

C. 最終製品の品質管理試験

純度：力価測定、OD 比、塩化セシウム残量、たん白質含量、ウイルス粒子/PFU 比、SDS-PAGE

確認試験：ウェスタンブロット解析、制限酵素マッピング

無菌試験：培養上清中の好気性・嫌気性細菌、真菌、マイコプラズマの混入をチェック

異常毒性試験：外来性の毒性物質の混入を検出するために、モルモットとマウスに検体を接種し体重の変化と予知できない生体反応について観察

エンドトキシン試験：Limulus Amebocyte Lysate (LAL) gel-clot 法を用いて、検体中のグラム陰性菌のエンドトキシン・レベルを定量的に検出

RCA 検出試験：最終バイアルより 10 バイアルをサンプリングして実施（試験方法については「④増殖性ウイルス出現の可能性」の項を参照）

②患者に投与する物質の純度およびその安全性

上記の HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター液は、北里大学病院において PBS (Phosphate-buffered Saline) で適切な濃度に希釈した後、被験者に投与する。この PBS は、米国で医薬品添加物として認可されたものであり、純度および安全性に問題ないものを用いる。

③岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターで実施される試験

A. 受入れ試験

HSV-tk 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、北里大学病院が受け入れる。国内での受入れ試験は、岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターにて行い、その品質を再確認する。同アデノウイルスベクターは、同一ロットの製品が概ね 1 回分の治療分に分注された状態で搬入されるため、凍結された 1 本を抽出、融解後に受入れ試験を実施する。受入れ試験項目を以下に記載する。

a. 変性の有無を確認する外観試験

融解後ベクター液の混濁の有無を肉眼で確認する。

b. ウイルス粒子数 (VP) の測定

試料を 10 倍希釈し分光光度計で吸光度 (OD_{260} 値：溶解液のみの吸光度で補正した値) を計測し、下記の数式より VP を求める。なお、吸光度は 6 回計測の平均値とする。

$$VP = \text{平均吸光度 (平均 } OD_{260} \text{ 値)} \times 10 \text{ (希釈率)} \times 1.1 \times 10^{12} \text{ viral particle/ml}$$

ベクターの破棄基準はバイラー医科大学における破棄基準に沿う。すなわち、製造直後に測定された VP の値から 25% 以内に維持されていない場合は、当該ロットは破棄する。

c. HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの生物学的活性を確かめるための殺細胞効果試験

ヒト前立腺癌細胞である PC-3 を用いた *in vitro* cytotoxicity assay を行う (詳細は参考文献 6 に記載)。50 MOI における殺細胞効果は平均して 50% であり、かつこの殺細胞効果のそれぞれが平均値の 25% 以内に維持されていることを適格基準とする。

なお、本受入れ試験項目 a~c は、空輸時における予期せぬ温度上昇に起因する力価低下の有無検定を目的とし、岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターに搬入された時点で施行する。

B. 年 2 回の力価測定

ベイラー医科大学ではすべての最終製品につき、資料 2 に示した方法によって年 2 回試験管内での効力（力価）を検査することになっている。当該臨床研究において使用されるベクターについてもベイラー医科大学において同様の検査が行われる（注記 1）。

C. 製品の保管について

品質管理用として、米国ベイラー医科大学において同じロットの製品が一部保管されることとなっているが、岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子・細胞治療センターにおいても同様にバイアルの一部を保管する。

注記 1：バクテリア、マイコプラズマ、増殖可能なウイルス等が検出された場合、および年 2 回の試験管内での効力（力価）検査において、製造直後に測定された力価（PFU）から 25%以内に維持されていなければ、当該ロットは破棄する。また破棄したベクターについては、臨床研究の終了日を基点として、少なくとも 3 年間は保管する。

④増殖性ウイルス出現の可能性

細胞内で増殖可能なアデノウイルス（replication competent adenovirus、RCA）の混入を調べるためには、現在、アデノウイルスに感受性をもつ細胞（ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞）を用いたバイオアッセイが一般的に行われており、FDA もこの検出方法を推奨している。研究室レベルでは精製された HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いて、HeLa 細胞アッセイが行われている。HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを HeLa 細胞に 100 MOI で感染させ、その細胞から頻回の凍結／融解の繰り返しにより得た抽出物を、再び HeLa 細胞と混合培養する。この HeLa 細胞から DNA を抽出し、PCR 解析を行って、アデノウイルス E1 領域プロモーターが検出されず、RCA が出現していないことを確認する。また、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター液に [³H]Thymidine を加え、ウイルス DNA がラベルされず、増殖可能な RCA が存在しないことを確認する。

HSV-tk 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、相同組換えが起きることがある。その結果、293 細胞を使用するアデノウイルスベクター生産では、極めてわずかではあるが、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。本 HSV-tk アデノウイルスベクターの規格では「 3×10^{10} VP 中の RCA が 1 以下」としていることから、 3×10^{10} VP を超える量の HSV-tk ウイルスベクターでは RCA 混入の可能性は否定できない。しかし、アデノウイルスベクターのゲノムのサイズは 34.7 kb、HSV-tk 発現カセットのサイズは 2.4 kb であり、増殖可能になるために必要な E1 領域がさらにベクターのゲノムに挿入されると、ウイルス粒子にパッケージ可能な限界サイズである 105% を超えるので、増殖可能な HSV-tk 遺伝子発現ウイルスが生じる可能性は理論的にはない。米国ペイラー医科大学における放射線治療後の局所再燃前立腺癌患者を対象とした第 I 相遺伝子治療臨床研究では、FDA の了承のもと、本研究と同一のアデノウイルスベクターを用いて、すでに 10^{11} PFU レベルの投与も行っている。当該臨床研究において 10^{11} PFU レベルのベクターを投与された被験者では、増殖性アデノウイルスに由来するとみられる副作用は起こっていない。

ヒトアデノウイルスは、遺伝的に安定な二重鎖 DNA ウイルスであり、レトロウイルスと比較して、生体内で突然変異が起きる可能性は低い。また、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作用するため、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを患者に投与後、被験者の体内で内在性ウイルスなどとの組換えにより RCA が出現する可能性は極めて低い。さらに、被験者の体内で、ヒト由来の転写因子を利用して、わずかながら HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターが再度パッケージされる可能性があるが、このウイルス粒子にも E1 領域が欠損しているため増殖性はないと考えられる。

⑤ 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞障害性

HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを細胞に作用させて遺伝子を導入しただけでは細胞の増殖抑制は起こらない。引き続いてガンシクロビルを作用させることにより障害性を発揮するが、このことは動物実験においても確認されている（参考文献 6、7）。

ヒトならびにマウス前立腺癌細胞 2.5×10^4 個に HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを 2

時間作用させ (MOI 5、10、25、50、100)、その後 PBS を 72 時間作用させた場合の生細胞数をカウントした。コントロール群とした β -gal 遺伝子発現アデノウイルスベクター感染群にも PBS を作用させた。その結果、生細胞数はコントロール群と有意な差を認めなかった。しかし PBS のかわりにガンシクロビルを作用させた場合は、コントロールに比し生細胞数は有意に減少し、殺細胞効果が発揮されることが確認された (参考文献 6 Fig. 3 参照)。

また、マウス同所移植モデルを用いた実験において、RM-1 細胞 (マウス前立腺癌細胞) を前立腺に移植し、移植 7 日目に再開腹し前立腺の腫瘍に対して HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター、またはコントロールベクターを注入した。翌日より 6 日間ガンシクロビルを腹腔内投与し、腫瘍移植後 14 日に屠殺して、その腫瘍増殖抑制効果を確認した。その結果、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを投与した群において、コントロール群と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を確認した (参考文献 7 Fig. 3 参照)。

⑥体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

A. 動物実験の結果

HSV-tk 遺伝子発現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およ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、ヒトの最高用量の 100 倍に相当する高用量を用いて動物実験が実施された。その結果、体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性は低いことが確認された。マウス前立腺にアデノウイルスベクターを注入し 1 週間後に PCR 法によるベクターシーケンスの発生数を解析した結果を以下に示す (参考文献 9)。

	2.5×10^6 PFU	2.5×10^7 PFU	2.5×10^8 PFU
前立腺 (注入側)	9/10	8/10	8/8
前立腺 (反対側)	3/10	1/10	5/8
精囊	3/10	0/10	5/8

精囊液	0/6	0/7	0/4
膀胱	0/10	0/9	0/8
尿	0/5	0/6	0/5
精巣	0/10	0/10	1/8
精巣上体	0/10	0/10	0/8
精子	0/3	0/3	0/3
血液	1/9	0/9	0/8
リンパ節	8/10	7/10	5/8
肝臓	2/8	1/7	7/8
腸管	2/7	1/7	3/5
肺	0/10	0/10	0/10

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、腸管への広がり認められた。尿、精囊液、精子、肺への広がりはいずれも全く認められなかった。精巣においては高濃度注入群の1匹に認められた。血液においては低濃度群の1匹に認められた。参考文献9の結論として、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解剖学的に隣接する臓器にのみ主に認められたが、全身的な広がり示唆する所見はなかった。

B. 当該ベクターを用いた臨床研究に基づく安全性の検討結果

実際に米国ベイラー医科大学における放射線治療後の局所再燃前立腺癌患者を対象とした第I相遺伝子治療臨床研究では、米国食品医薬品局（FDA）の了承のもと、本臨床研究で用いるものと同じベクターについて、 10^8 から 10^{11} PFU レベルまでの投与が行われている。

さらに、米国ベイラー医科大学での同第I相臨床研究患者に対する同アデノウイルスベクタ

一の追加投与検討（2回目：9名、3回目：2名）、および複数箇所注入の検討においても（計52名、のべ76回の遺伝子治療を実施）、重篤な副作用は認められず、その安全性が確認されている。

また、米国ベイラー医科大学にて現在継続中である同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療（注記1）についても、その安全性が報告され、計30名中、それぞれ1名の患者にRTOG（Radiation Therapy Oncology Group）スコアでGrade 3にあたるALTの上昇と頻尿の症状を認めたものの、薬物療法にて改善し、他の症例においてはGrade 3以上の重篤な副作用を認めなかった。

また本邦においても、内分泌療法再燃を呈した前立腺癌患者に対する同一ベクターの投与が、岡山大学において2001年3月より施行され、これまでの使用実績（ 1×10^9 PFUの投与3例、および 1×10^{10} PFUの投与6例）で重篤な副作用の出現を認めていない。

*注記1：次の3種の治療群にて施行中である。Arm A：HSV-tk 遺伝子治療（2回：Day 0, Day 14）とIMRT（強度変調放射線治療 76 Gy）の同時施行。Arm B：HSV-tk 遺伝子治療（1回：Day 0）と内分泌療法の同時施行、その後、遺伝子治療後（2回：Day 56, Day 70）とIMRT（強度変調放射線治療 76 Gy）の同時施行。Arm C：Arm Bに45 Gyの骨盤照射の併用。

C. 米国における死亡例（アデノウイルスベクター肝動注）と当該遺伝子導入法との関連性

1999年9月に米国ペンシルバニア大学における非増殖性遺伝子組換えアデノウイルスベクターを用いたOTC欠損症に対する遺伝子治療で患者が死亡した。アデノウイルスベクターには急性毒性があり、dose と adverse event の間に直線性がなく、ある種の閾値を越えると強いadverse eventが生じることが示されており、死亡例は肝動脈からベクターを 3×10^{13} viral particleを接種された患者であったが、 3×10^{12} viral particleの接種を受けた患者にも強いadverse eventが認められた。

北里大学病院で今回計画している当該研究に用いられるベクターのPFU/ウイルス粒子数の比は1：10から1：20であるので、この値を用いて換算すると、ペンシルバニア大学での上記

死亡例における投与量を PFU に換算すると 3×10^{12} から 1.5×10^{12} PFU に相当する。また、もう 1 例の強い adverse event が生じた症例での投与量は、 3×10^{11} から 1.5×10^{11} PFU に相当すると考えられる。

今回計画している当該研究における投与量は 1×10^{10} PFU であり、米国での死亡例における投与量の 150~300 分の 1 であり、また、誤って直接血管内に全量を投与すると副作用が発生する可能性は否定できないものの、投与経路の相違も考慮にいれると安全性は確保されていると推察される。一方、米国ペイラー医科大学で行われた試験においては 1×10^{11} PFU の投与量において 1 例ではあるが、肝機能障害を生じている。この症例に関してはベクターが誤って血管内に一部投与された可能性も示唆されている。ベクター投与に際して注射針の先端が確実に前立腺組織内に有る場合においては、このような副作用の生じる可能性は極めて低いと推測される。

⑦患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

HSV-tk 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、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。また、ベクター拡散の可能性を最小限にするために、本研究の対象患者はベクター投与後一定の方法で隔離する。また患者の血液および尿検体は、PCR 法でベクター DNA が陰性になるまで検査する。

⑧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、HSV-tk によるたん白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。

⑨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。または、ヒトにおいてもアデノウイルス5型の感染による悪性腫瘍発生の報告はない。さらに、哺乳類の細胞をトランスフォームさせる機能をもちかつげっ歯類における癌化に関与しているとされる E1領域は、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターでは欠損させてあり、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターにおいて癌原性はないと考えられる。

(2) 遺伝子産物の安全性

HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターによる HSV-tk たん白質の発現は一過性である上に、たん白質そのものの細胞毒性は認められておらず、安全性の点からも問題はないと思われる。

8. 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

培養前立腺癌細胞ならびに動物を用いた遺伝子治療基礎実験において、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターとガンシクロビルを用いた際の抗腫瘍効果および安全性は確認されており、臨床研究プロトコールは、1996年1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、1996年8月より米国ペイラー医科大学にて放射線治療後の局所再燃前立腺癌患者を対象とした第 I 相臨床研究が実施された (試験 1)。その後、同第 I 相臨床研究患者に対する同アデノウイルスベクターの追加投与 (試験 2)、および前立腺全摘出症例に対する術前遺伝子治療との組み合わせの第 II 相臨床研究 (試験 3) がそれぞれ終了し、1999年7月からは同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療が第 II 相臨床研究として現在継続中である (試験 4)。

同医科大学における、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターとガンシクロビル (またはバラシクロビル) を用いた遺伝子治療は、2002年10月の時点で計 124 名の前立腺癌患者が治療終了、継続中であり、アデノウイルスベクター投与による有害事象および、その第 I 相臨床研究効果の評

価については詳細な解析が行われ、安全性が確認されるとともに有効性が確認されたことが論文として公表された（1999年5月）。また第II相臨床研究の結果として、血清PSAの低下のみならず、細胞障害性Tリンパ球の活性化や、同Tリンパ球の腫瘍内浸潤度と腫瘍組織におけるアポトーシスの頻度とに優位な相関関係が認められたことも報告されている（2001年11月）。その後の同アデノウイルスベクターの反復追加投与に放射線治療を組み合わせた検討においては、2回目のベクター反復投与によりさらにそのCD8 Tリンパ球の活性化が増加することも認められている（2004年9月）。これらの結果より、当該遺伝子治療による殺細胞効果のみならず、抗腫瘍免疫の誘導・活性化の可能性も示唆されている。しかしながら米国ベイラー医科大学においても、術前補助療法として同アデノウイルスベクターを反復投与する検討は施行されておらず、ベイラー医科大学で対象とされていた、より大きな腫瘍体積を有するハイリスク群に対して、より効果的であると予測され、当該研究は現時点の見地より、術前補助療法としての遺伝子治療を確立する上で考える安全かつ先進的なプロトコールと思われる。また岡山大学における検討においても、術前補助療法としての検討は行われていない。

今回用いる予定であるHSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、米国ベイラー医科大学遺伝子ベクター室において作製され安全性試験を通過した製品として、ベイラー医科大学より供給を受ける。本ベクターは米国ベイラー医科大学での遺伝子治療、および本邦での岡山大学の臨床研究で用いられているものと同一である。

北里大学泌尿器科学教室では、従来より、国内および海外の研究施設で、前立腺癌をはじめとする尿路性器悪性腫瘍の治療に関する基礎的・臨床的研究を積極的に行っている。

研究総括責任者である馬場志郎は、西ドイツ・マインツ大学において前立腺癌患者におけるテストステロン代謝の基礎研究や、米国ミネソタ大学において腎細胞癌の免疫学的活性に関する基礎研究を行ってきた。また佐藤威文は、米国ベイラー医科大学泌尿器科にてHSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた基礎研究とともに臨床研究に直接関与している。岩村正嗣は米国ロチェスター大学で同じく前立腺癌の基礎研究を、宋成浩は同じく米国ベイラー医科大学で前立腺癌の病理学的研究に従事した経験を有している。現在も北里大学よりベイラー医科大学に山下英之研究員、

田畑健一研究員を派遣している。一方、共同研究者が所属している岡山大学ではすでに 2001 年 3 月から前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの臨床研究をすでに始めており、今回申請する臨床研究は、同一ベクターを用いた、ベイラー医科大学と北里大学、岡山大学との共同研究として実施するものである。

以上の背景より、今回申請する遺伝子治療臨床研究を北里大学で実施することは可能であると判断した。

9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

HSV-tk 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および根治的前立腺摘除術との併用効果を確認、検証するものである。その患者選択基準、除外基準ならびに治療スケジュールを後述する。また原則として、本プロトコル以外の治療の併用は行わないとするが、経過中に前立腺癌の進行、または被験者からの申し出、希望があった場合においては、他の治療を開始、併用するものとする。

(2) 被験者の選択基準及び除外基準

① 選択基準

- 1) 被験者は 35 歳以上から 75 歳以下の成人男性を原則とし、医学的に本研究を遂行するに足る十分な身体的機能を有すると判断された者。
- 2) 前立腺生検にて組織学的に前立腺癌と診断され、かつ臨床的に前立腺に局在すると判断された者。
- 3) ノモグラムにおいて、手術後再発する可能性が高いと判断されるハイリスク症例であること（注記 1）。
- 4) 画像診断上明らかな転移病巣を認めないこと（注記 2）。
- 5) 被験者は以下の骨髄機能、肝機能、腎機能を保っていること。その指標としては、末梢血顆

粒球数 $>2,000 /\text{mm}^3$ 、血小板数 $>100,000 /\text{mm}^3$ 、総ビリルビン $<1.5 \text{ mg/dl}$ 、クレアチニン $<1.5 \text{ mg/dl}$ 。

- 6) 出血傾向を認めない (PT・PTT の著明延長を認めない)。

注記1：手術前の血清前立腺特異抗原値 (PSA)、臨床病期、および前立腺生検での病理学的評価 (Gleason Sum) を加味したノモグラムにおいて (Kattan MW, et al. J Natl Cancer Inst 90: 766-71, 1998)、総得点 115 点以上を占めるもの。すなわち手術後 5 年以内に 35%以上の症例が、再発すると考えられる予後不良症例を示す (参考文献 10 Figure 2 参照)。

注記2：骨シンチグラフィにて骨転移の有無、CTにて腹部並びに骨盤部における転移の有無を検索し、骨シンチグラフィにて疑わしい病変を認めた場合は磁気共鳴装置 (MRI)にて確認する。

②除外基準

症例の選択に際し、次の項目に該当する被験者は本研究の対象としない。

- 1) ガンシクロビル、又は類似化合物 (アシクロビル等) に対する過敏症の既往歴を有する場合。
- 2) 本研究参加以前に放射線治療や内分泌療法を受けた治療歴を有する場合。
- 3) 前立腺に対し、経尿道的前立腺切除術や温熱療法等の外科的治療歴を有する場合。
- 4) 副腎皮質ホルモン製剤による加療を行っている場合。
- 5) コントロールされていない活動性感染症など、重篤な併発疾患がある場合。
- 6) 本研究参加前 6 ヶ月以内に未承認薬の治験/臨床研究に参加している場合。
- 7) 前立腺癌以外の悪性腫瘍歴がある場合。ただし根治しており、無病期間が 2 年以上に達している場合はこの限りではない。
- 8) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法歴がある場合。
- 9) その他、担当医が不相当と認める場合。

設定の根拠

- 1)、5)、7)は安全性配慮のため設定した。

2)、3)、4)、6) は安全性評価または有効性評価に影響すると考えられるため除外基準として設定した。

9) は一般的な除外基準。

(3) 被験者の同意の取得方法

- 1) 被験者は、本研究について文書により説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を理解した上で、同意書に署名した者とする（資料 10「前立腺がん遺伝子治療臨床研究の説明書」参照）。
- 2) 説明と同意書は、本計画書に資料 10 として含まれている書式である。

(4) 実施期間および目標症例数

本研究の研究実施期間は厚生労働省の承認が得られた時点から 5 年間とする。また遺伝子治療実施後の必須観察期間については、プライマリーエンドポイントである安全性の検討の目的から 2 年とする。それ以後の観察期間については、通常の術後症例と同じく可能な限り観察するものとし、その期間を問わない。

目標症例数はその安全性の検討として、当初対象症例数を 5 例ごとにその安全性を確認し、最大で 25 例までとする。

(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

①対照群の設定および治療スケジュール

前述の選択基準 (9 (2)①) を満たす局存性進行前立腺癌患者を対象とし、以下にアデノウイルスベクターの投与量設定の具体的な科学根拠を述べる。

当初米国において、FDA は 10^8 PFU を初回投与として推奨し、それに基づきベイラー医科大学では 10^8 PFU から 10^9 PFU、 10^{10} PFU、 10^{11} PFU までの 4 段階のベクター投与量の安全性を検討する臨床第 I 相研究を実施した。その結果、安全性について 10^{11} PFU の 1 例を除いて問題とな

る副作用を認めず、その臨床効果よりすでに 100 例以上の症例が 10^{10} PFU のベクター投与量を用いている。また同様のベクターを用いた岡山大学の臨床研究においても、 10^9 PFU および 10^{10} PFU の安全性が確認されている。以上より、本研究に用いる HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの投与量設定を 10^{10} PFU とした。

また治療スケジュールを以下に記載する。

経直腸的超音波を用いて、前立腺内にベクターを注入した日を治療開始日 (Day 0) とする。治療開始翌日 (Day 1: 遺伝子導入より 24 時間後) よりガンシクロビルの投与を開始し、計 14 日間の連日投与をする。初回ベクター投与より 2 週間後 (Day 14) に、2 回目となるベクターを前立腺内に注入し、この 2 回目ベクター投与の翌日 (Day 15: 2 回目遺伝子導入より 24 時間後) よりガンシクロビルの投与を同様に計 14 日間の連日投与をする。この最終ベクター投与日 (Day 14) を起算として、6 週間後 (Day 56) に根治的前立腺癌全摘除術を施行する。同術後加療スケジュールは、根治的前立腺癌全摘除術のクリティカルパスに準ずる。

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)

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 4 ヶ所に注入する。注入後、針を抜去する。注入する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター液の総量は 1 ml 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。

③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 1 kg あたり 5 mg とし、1 日 2 回 14 日間 (計 28 回) とする。薬剤は 500 mg が 1 バイアルに包装されており 10 ml の生理食塩水で溶解し 50 mg/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 100 ml 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以下の表に示すごとくに減量もしくは投与間隔を変更する。

クレアチンクリアランス値 (ml/min)	用量 (mg/kg)	投与間隔 (時間)
≥70	5.0	12
50～69	2.5	12
25～49*	2.5	24

* 血清クレアチニン値は 1.5mg/dl であること。

(資料 4 : 薬剤添付文書より抜粋)

<ガンシクロビルの体内分布について>

薬剤開発時点における薬剤の体内分布（マウスへの静脈内投与）の検討においては、前立腺への移行は検討されていない（ガンシクロビル販売元：田辺製薬 社内資料、製造元：米国ロッシュ社にて行われた体内分布の結果を訳したもの）。しかし薬剤は検討された臓器（肝臓、腎臓、肺、心臓、脳、脾臓、腸、胃、骨格筋、脂肪組織、眼球、精巣）に分布しており、24 時間以内に 79～93%が尿中に回収されていた。このことよりガンシクロビルの静脈内投与により、薬剤は血流により前立腺を含む全身臓器に分布し、腎より排泄されることが推察される。ベイラー医科大学における遺伝子治療臨床研究において、サイトメガロウイルス感染症における投与量と同一量のガンシクロビルが投与され臨床的有効症例が確認されたことから、ガンシクロビルの前立腺移行が推定される。

<ガンシクロビル投与量設定の具体的な科学的根拠>

当初行われた米国ベイラー医科大学の遺伝子治療臨床研究におけるガンシクロビルの投与量は、サイトメガロウイルス感染症治療での用法・用量に準じて設定された経緯がある。動物実

験においては、遺伝子の発現期間等により 6~7 日間の投与期間が設定された。ヒトにおいて 14 日間投与が他の投与期間と比較して妥当か否かは検討されていない。

最終的な投与期間は今後の臨床試験において明らかにされていくものと考えられるが、当面はサイトメガロウイルス感染症の治療において設定されている用法・用量に従うことに大きな問題は無いものと考えている。

④臨床検査項目および観察項目

A. 治療開始前評価

- 1) 初回の治療を開始する前に、被験者の病歴及び現症について記録する。この記録には PS (performance status)、体重、最近の体重減少、他の悪性あるいは良性疾患の有無およびその治療状況などについても記録する。
- 2) 臨床検査データとしては、定量的免疫グロブリン、白血球分画、血小板数を含む CBC、電解質、ビリルビン、クレアチニン、クレアチニンクリアランス、トランスアミナーゼなどを含む生化学検査一般、および尿検査、胸部 X 線写真、腫瘍マーカーなどを記録する。
- 3) 治療開始前の臨床病期を画像診断および触診所見により評価する。臨床病期は前立腺癌取扱規約に基づいて決定する。
- 4) 治療前に血液サンプルを採取する。白血球と血清を分離し、血清を用いてアデノウイルスに対する抗体価 (ELISA 法にて確認) を測定する。また、アデノウイルス 5 型に対し感受性の高い培養細胞を用いて感染効率に対する阻害作用を確認し、アデノウイルス中和抗体価を測定する。
- 5) フローサイトメトリー法にて CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、CD3/CD56+CD16 を検討すると共に血液中の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 を ELISA 法にて検査する。また CD4⁺CD25⁺を指標とした血液中の調節性 T 細胞の変化についてもフローサイトメトリー法にて検討する。

B. 治療中評価（資料 5：「評価項目およびスケジュール」参照）

以下の検査をガンシクロビル投与中の期間において実施する。

- 1) 理学所見：一般的な理学所見をチェックする。すなわち被験者の病状および PS（performance status）や体重を含む現症を記録する。
- 2) 排尿試験：アデノウイルスベクター注入直後に留置した尿道カテーテルを 24 時間後に抜去した際、その後の自然排尿の有無を確認する。自然排尿が不可能な場合は再度留置する。
- 3) 被験者の CBC、血小板数、出血・凝固時間、PT、PTT、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療中定期的に行い記録する。特に、CBC はガンシクロビルの用法・用量に関する使用上の注意に沿って、2 日毎に測定する（資料 4：薬剤添付文書）。
- 4) 血清中、尿中、鼻腔粘膜中におけるアデノウイルスの有無の検索。
- 5) 初回アデノウイルスベクター注入後 2 週間目、および 4 週間目に血清を採取し、アデノウイルスに対する抗体およびアデノウイルス中和抗体の評価。
- 6) 末梢血における各リンパ球の解析（フローサイトメトリー解析）
CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、
CD3/CD56+CD16、CD4/CD25。
- 7) 血清中における IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 の測定（ELISA 法）。
- 8) 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析、およびリンパ節由来リンパ球の機能解析（ELISPOT アッセイ）。
- 9) HSV-tk 発現アデノウイルスベクターからの HSV-tk 遺伝子の発現の程度に関する評価（RT-PCR）も含めた分子生物学的検討として、ベクター注入後、発熱など早期の副作用が認められず、患者本人の同意が得られ、かつ早期の再生検が治療の安全性を損なわないと担当医が判断した症例に対して、2 回目のベクター注入後 48 ないし 72 時間以内にベクター注入部の生検を施行して検査材料とする。

C. 治療後評価（資料 5「評価項目および評価スケジュール」参照）

- 1) 被験者の病状およびPS や体重を含む現症。
- 2) 尿沈渣および尿細菌培養ならびに感受性試験。
- 3) 血清中、尿中、鼻腔粘膜中におけるアデノウイルスの有無の検索ならびに血清中のアデノウイルス抗体価。
- 4) 血清 PSA の測定。
- 5) 末梢血における各リンパ球の解析（フローサイトメトリー解析）
CD45/CD14、CD3/CD19、CD3/CD8、CD3/CD4、CD8/HLA-DR、CD4/HLA-DR、CD3/HLA-DR、
CD3/CD56+CD16、CD4/CD25。
- 6) 手術摘出検体における病理学的評価（摘出リンパ節検体を含む）
全前立腺体積、全腫瘍体積、殺細胞効果の範囲（affected tumor volumes）、免疫染色項目（CD20、CD8、CD68、CD3、CD4）、アポトーシス（TUNEL 染色）、CAR 発現（Coxsackievirus and Adenovirus Receptor Expression）、Microvessel Density。
上記について、コンピューターイメージ解析（Optimas 6.1）を用いて定量的評価。
- 7) 血清中における IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 の測定（ELISA 法）。
- 8) 細胞障害性試験による NK 細胞の機能解析、およびリンパ節由来リンパ球の機能解析（ELISPOT アッセイ）。

上記検査の実施時期に関して、別紙添付書類（添付書類 5「評価項目スケジュール」）に記載する。また当該臨床研究に関する免疫学的、組織学的解析方法については、別紙添付資料（資料 13）に記載する。

なお、被験者が死亡した場合は剖検を依頼し、癌組織及び正常組織を採取し、生検時と同様の組織学的・分子生物学的検討を行う。

D, 臨床研究実施中の患者の管理

全ての被験者は個室管理とする。ベクター投与後の被験者は、尿中へのベクター排出の可能性があるため、排尿は専用の便器を使用する。被験者に接するすべての医療従事者は、被験者

の血中および尿中からのベクター排出の消失が確認されるまでは予防衣を着用する。また退院時には、必ず血中および尿中ベクター排出の消失が確認されているものとする。

⑤副作用の判定基準

1) 本 HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた米国ベイラー医科大学にて行われた臨床研究では、放射線治療後の局所再燃前立腺癌 18 例に対して、 10^8 から 10^{11} PFU レベルまでの投与による治療が施行された(参考文献 10)。17 例目までの症例においては発熱 3 例、肝機能異常 3 例、静脈注射部位の蜂窩織炎 1 例が認められた。いずれも grade 2 以下の軽度のものであり、経過観察を含めた保存的治療にて軽快した。しかし 18 例目の患者において 10^{11} PFU のウイルスベクター投与後に grade 2 の発熱、grade 4 の血小板減少と grade 3 の肝機能障害が出現したためその時点で試験は中止され、血小板減少に対して 5 単位の血小板輸血が施行された。なお、本患者の血小板減少、肝機能障害については、遺伝子治療開始 16 日目に臨床検査値が正常値に回復した(参考文献 10 表 2)。また、現在継続中である同遺伝子治療と放射線治療、内分泌療法との併用治療(23 ページ注記 1)についても、その安全性が報告され、計 30 名中、RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) スコアで Grade 3 にあたる ALT の上昇と頻尿の症状をそれぞれ 1 名に認めたものの、薬物療法にて改善し、他の症例においては Grade 3 以上の重篤な副作用を認めなかった(参考文献 14)。

その他考えられる有害事象としては、ウイルスベクターによる感染・炎症、局所投与に伴う尿閉、出血(直腸出血、血尿)、ガンシクロビル投与に関連した副作用(資料 4: 薬剤添付文書)などがあるので、治療期間中は厳重な症状観察を行い対処する。

2) 治療中及び治療後に見られるすべての有害事象のうち、治療に関する毒性・副作用は、資料 7「副作用の評価指標」に基づいて grade 0~4 で評価する(Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 日本語版)。副作用の認められた期間およびそれに対する治療についても記録する。重篤な副作用が生じた場合は、実施施設の長である北里大学病院長を通じて厚生労働大臣(および文部科学大臣)に報告する。

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

本検討のプライマリーエンドポイントは、予後不良局所限局性前立腺癌に対する HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療、ならびに根治的前立腺全摘除術を施行した場合の安全性の確認であり、その評価については、Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 日本語版を基準とした、副作用の発現頻度、程度、合併症を検討する。

またセカンダリーエンドポイントとして、当該遺伝子治療における有効性を来す可能性のある免疫学的な反応の解析と、同治療効果の病理学的な評価を目的としており、その治療効果の評価基準として、病理学的病期および Gleason score を一致させた遺伝子治療未施行のハイリスク前立腺癌をコントロール群として、各種評価項目における定量的評価の比較・検定を行うものとする。また対照比較研究となる症例に関しても、書面で同意を得る（添付資料 15）（評価パラメーター：9 (5)④C「治療後評価」参照）。

治療中止の判定基準につき、以下に記載する。

- 1) 治療開始後、血小板減少、および肝機能障害等の重篤な副作用が認められた場合。
- 2) 抗癌剤や HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクター以外の実験的薬物を投与した場合。
- 3) 本研究に登録された後で、治療開始前に被験者の都合で必要な検査、調査の実施が不可能であることが判明した場合。
- 4) 被験者が本研究の円滑な遂行に非協力的である場合。
- 5) 被験者が治療の中止を申し出た場合。
- 6) その他、担当医が中止の必要性を認めた場合。

⑦被験者の安全性確保および健康被害補償

- 1) 本実施計画書は、北里大学病院に設置された遺伝子治療審査小委員会で審議され承認を得た後、厚生労働省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委員会にて科学面、倫理面について審議される。