



遺伝子治療臨床研究実施計画概要書（最終）

遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成14年8月30日

研究の名称	正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究
研究実施期間	厚生労働大臣による了承の日より3年間

総括責任者	所属部局の所在地	長野県松本市旭3-1-1 (郵便番号 390-8621)	
	所属機関・部局・職	信州大学医学部・皮膚科学講座・教授	
	氏名	斎田俊明 	
実施の場所	所在地	長野県松本市旭3-1-1 (郵便番号 390-8621)	
	名称	信州大学医学部附属病院	
	連絡先	長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部皮膚科学講座 (電話番号 0263-37-2643)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	松本和彦	信州大学医学部・皮膚科学講座・講師 名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻脳神経病態制御学脳神経外科学分野・非常勤講師	遺伝子製剤の調製・薬剤投与・臨床観察・効果判定
	宇原久	信州大学医学部・皮膚科学講座・講師	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	久保仁美	信州大学医学部・皮膚科学講座・助手	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	村田浩	信州大学医学部・皮膚科学講座・助手	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	吉田純	名古屋大学大学院医学系研究科・脳神経外科学分野・教授	本臨床研究に対する基礎的、臨床的指導, 助言
水野正明	名古屋大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学分野・助教授	遺伝子製剤の調製とその品質管理と安全性の確認	
影下登志郎	熊本大学医学部・皮膚科学講座・助教授	アポトーシス等の免疫組織化学的検索	

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	別紙(1)のとおり	
	審査委員会の長の職名	氏名
	信州大学大学院医学研究科臓器移植細胞工医学系専攻移植免疫感染症学・教授	福嶋義光 

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>転移を生じた進行期の悪性黒色腫は化学療法、放射線療法などに抵抗性で、予後はきわめて不良である。本研究の目的は、この難治な進行期悪性黒色腫に対する新しい治療法として、正電荷リポソームに包埋したヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる遺伝子治療の安全性と効果を検討することであり、第 I/II 相試験として実施する。悪性黒色腫の皮膚などへの転移巣を対象とし、病巣内へ遺伝子製剤を注入し、局所的、全身的効果と有害反応の有無・程度を検討する。遺伝子製剤は 2000 年 4 月に名古屋大学医学部附属病院脳神経外科で共同研究者の吉田らが悪性グリオーマに対して開始した臨床研究で用いているものと同じ製剤を用いる。名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室では、安定性と保存性に優れ、液剤と同等の品質、効果を確認済みの凍結剤と凍結乾燥製剤の作製に成功しているため、本臨床研究では凍結乾燥製剤を名古屋大学から信州大学へ輸送して使用する。本研究は、本遺伝子製剤を今後、他施設で臨床使用する際のモデルケースとしても大きな意味を有する。</p>
対象疾患及びその選定理由	<p>悪性黒色腫は日本では人口 10 万人に対して年間約 2 人に発生する腫瘍である。進行期の悪性黒色腫に対しては現在のところ有効な治療方法は確立されていない。ヒトβ型インターフェロンは抗ウイルス作用の他、抗腫瘍作用、免疫賦活作用、抗血管増生作用などの多面的な生理活性を有し、悪性黒色腫細胞に対しても増殖抑制効果が確認されており、現在、本腫瘍に保険適用が認められている唯一のサイトカインである。これまでのわれわれの基礎研究により、リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子をヒト悪性黒色腫細胞に作用させると、遺伝子が発現し、β型インターフェロンが産生され、<i>in vitro</i> で腫瘍細胞の増殖が強く抑制されることを見出している。またヌードマウスを用いた <i>in vivo</i> 実験でも本製剤の局注によりヒト悪性黒色腫の移植結節が消失することを確認している。マウスの自家移植系悪性黒色腫を用いた実験で、その奏効機序に NK 活性の増強が関与していることを見出している。今回の遺伝子治療では、細胞外からインターフェロン蛋白を作用させるこれまでの治療法に比べ、有意に高い抗腫瘍効果が得られるものと予想される。</p>
遺伝子の種類及びその導入方法	<p>本遺伝子治療臨床研究で導入されるヒトβ型インターフェロン遺伝子は東京大学医学部谷口維紹教授によりクローニングされた HuIFN-β cDNA である。吉田らはこの cDNA を Invitrogen 社の pRc/RSV に連結し HuIFN-β の発現ベクター(pDRSV-IFNβ)を構築した。これを包埋する正電荷多重膜リポソーム剤は、八木國夫博士らが開発したもので、粒子径は 0.5-2 μm である。製剤は、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室にて水野、松本らが作製し、その凍結乾燥製剤を信州大学附属病院へ運搬、保存し、使用に供する。このリポソーム製剤は主としてエンドサイトーシスの機序で細胞内へ取り込まれ、遺伝子発現効率は約 10%と見積られる。ただし、導入細胞から局所に分泌される高濃度の HuIFN-β による直接的増殖抑制効果や免疫賦活作用などを介した間接的抗腫瘍効果が非導入細胞に対しても作用し、腫瘍巣全体に効果が及ぶ。NK 細胞活性の増強などを介した全身的効果も期待</p>

	<p>しうる。なお、本遺伝子治療で遺伝子が導入、発現された腫瘍細胞は、その後死滅することが確認されているので、発現制御の必要はない。</p>
安全性についての評価	<p>本臨床試験に用いる遺伝子製剤 IAB-1 は名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室において水野、松本らが作製し、その凍結乾燥製剤をドライアイス入り発泡スチロール箱に入れて当施設へ運搬し、専用の4℃冷蔵庫に保管、管理し、生物活性を確認後に臨床研究に供する。本剤のプラスミド DNA とリボソームの純度及び臨床研究に必要なとされる安全性については、GLP 試験を保証しうるものであることが吉田らによって既に確認されている。本製剤の抗腫瘍効果を始めとする薬理作用や生体内での薬物動態についてもラット及びカニクイザルを用いた静脈内及び脳内投与試験で確認されている。これらの毒性試験の結果から1回投与量については本研究での投与量の4倍までの安全性が確認されている。また、全3コース施行した場合の最大総投与量は、本製剤の動物実験での結果から判断し、男性では安全量の8%、女性では5%以下であると計算される。共同研究者の吉田らは、国の許可をえて、2000年4月からこのIAB-1を用いたグリオーマ患者に対する臨床研究を名古屋大学医学部附属病院にて開始し、既に5例に投与しているが、とくに問題になる有害事象は認められていない。</p>
遺伝子治療臨床研究の実施が可能と判断する理由	<p>総括責任者の斎田及び信州大学医学部皮膚科学教室の共同研究者(松本、宇原、久保、村田)は同学部附属病院皮膚科を中心にこれまでに200例以上の悪性黒色腫の治療に携わっており、十分な臨床経験を有する。当教室はこれまでに悪性黒色腫の新しい治療法の開発につき、臨床的成果(固層化CD3活性化T細胞を用いる養子免疫療法や抗原ペプチド刺激樹状細胞療法、新たな併用化学療法DTIC-ACNU-CDDP-Tamoxifen療法の開発など)を上げるとともに、基礎的(SEREX法による新規悪性黒色腫抗原の同定、腫瘍巣内血管の脆弱性に関する研究、抗イデオタイプ抗体によるワクチン療法の研究など)にも研究成果を上げている。斎田は厚生労働省がん研究助成金による悪性黒色腫研究班の班員・班長や日本皮膚悪性腫瘍学会理事長などを務めている。このように、信州大学医学部附属病院皮膚科は日本における悪性黒色腫の診断、治療の中心的施設として高く評価されている。また、共同研究者の吉田と水野は本遺伝子治療につき基礎的研究から臨床応用に至るまでこれまでに多くの研究成果を上げ、旧文部省、旧厚生省の許可をえた上で、2000年4月から名古屋大学医学部附属病院にて本製剤を用いるグリオーマの臨床研究を開始している。本臨床研究については、信州大学皮膚科と名古屋大学脳神経外科は1996年から共同研究を開始し、in vitro、in vivoにおいて本製剤が悪性黒色腫に対し、グリオーマに勝るとも劣らない効果を発揮しうることを見出している。本臨床研究チームは、信州大学医学部附属病院遺伝子診療部などの協力もえて、本遺伝子治療臨床研究の遂行に必要な万全の体制を整えているといえる。</p>
実施計画	<p>1. 本臨床研究の対象者の選択基準及び除外項目</p> <p>① 組織学的に悪性黒色腫の診断が確定されている第Ⅳ期の患者、または他の治療法が不可能と判定された他の病期の患者で、皮膚、皮下あるいはリンパ節に転移がある症例から選択する。ただし、脳転移のある患者、及び生命予後が6カ月以内と予想される患者は除外する。</p>

② 治療前に肉眼的にあるいは超音波、CT、MRI などの画像検査にて腫瘍径などの評価が可能な病変を有する症例から選択する。

③ 手術療法あるいはこれまで有効性が確認されている化学療法などの療法を施行したにもかかわらず無効な症例、あるいはこれらの治療法の適応がないと判定された症例から選択する。ただし、前治療が行われた患者については、治療終了から4週間以上経過し、その影響が認められない症例から選択する。

④ 対象病変は注射針にて刺入可能な病変で、腫瘍の直径が2 cm 程度までのものを選択する。

⑤ 尿・血液検査などの結果、重篤な合併症が無く、原則として血液データが下記を満足する症例を選択する。

白血球数 $>3000/\text{mm}^3$

血小板数 $>100000/\text{mm}^3$

ヘモグロビン $>8.5 \text{ g/dl}$

出血・凝固時間：正常

血清ビリルビン $<2.5 \text{ mg/dl}$

sGOT・sGPT $<50 \text{ U/l}$

血清クレアチニン $<1.5 \text{ mg/dl}$

⑥ 18歳以上の男女を対象とする。ただし、妊娠している可能性のある場合や母乳育児中の者、75歳以上の患者、及び担当医が本臨床研究の対象として不適切であると判断した症例は除外する。

2. 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は厚生労働省の了解が得られてからすべての患者の臨床研究が終了するまで約2年間を予定し、さらに約1年間の経過観察期間を設ける。本治療法の臨床研究は5症例を予定する。

3. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

① 遺伝子導入方法

本臨床研究では名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室にて作製、調製された pDRSV-IFN β 包埋リポソーム IAB-1 の凍結乾燥製剤を用いる。

転移腫瘍巣部に注射針を刺入し、リン酸緩衝液 1ml 中に 30 μg DNA を含有する製剤を転移巣内とその周囲に注入する。1転移巣への1回当たりの注入 DNA 量は、直径 1cm 程度までの病巣には 10 μg 、それ以上で直径 2cm 程度までの病巣には 30 μg とする。注入頻度と回数は週3回、合計6回を予定する。第1例目では1回投与量を 30 μg DNA までとして安全性を確認する。転移巣が多発している場合には、第2例目以降は dose escalation し、2個以上の転移巣にそれぞれ 30 μg DNA 量までの同製剤を注入する。ただし、1回当たりの DNA 注入総量は 150 μg までとする。各症例について投与終了から4週後に安全性と有効性を評価する。その結果、安全性が確認され、かつ注入転移巣の一つ以上で PR (有効) 以上の反応が認められ、病理組織学的にも抗腫瘍効果が確認され、かつ患者が追加治療を希望した場合は、上述と同様の遺伝子治療をさらに2コース追加できるものとする。

② 臨床検査項目および観察項目

(1) 臨床症状を十分に観察する。

(2) 肉眼的に計測可能な皮膚、皮下、リンパ節病変については原則と

して週3回、腫瘍径を計測する。画像診断が必要な病変については適時に超音波、CTあるいはMRIなどにより腫瘍径を計測する。

(3)必要があれば病巣の細胞診あるいは摘出を行い、顕微鏡的および電顕的観察を施行し、腫瘍細胞の変性やアポトーシス、炎症反応などにつき解析する。また、ヒトβ型インターフェロン遺伝子発現(蛋白量、mRNA)の有無と程度についても検討する。

(4)入院中は週1~3回、尿および末梢血を採取し、各種血液・生化学検査を施行する。血中5-S-cysteinyl-dopa値も経時的に測定する。

(5)免疫学的検討事項

免疫学的検討項目を以下に示す。

(1) 摘出組織

- 1.HE、免疫染色 (CD3, 4, 8, macrophage, NK, apoptosis)
- 2.遺伝子発現 (RT-PCR, in situ hybridization: IFN-β, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6)
- 3.HSP(heat shock protein)

(2) 血液

- 1.PCR (plasmid DNA), RT-PCR
- 2.CD4/8
- 3.抗プラスミド抗体
- 4.EIA (サイトカインアッセイ: IFN-β, TNF-α, IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6)

(3) 尿

- 1.PCR (plasmid DNA)
- 2.細胞診

この中でも特に、①ヒトβ型インターフェロン遺伝子の腫瘍内での発現の有無、②ヒトβ型インターフェロン遺伝子の導入により腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されているか否か、③腫瘍局所へ細胞障害性Tリンパ球やNK細胞が誘導されるか否かに注目して検討する。

4. 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

(1)安全性の評価

理学的所見、血液・尿の検査所見、免疫学的検査、遺伝子発現などの検索により行う。

(2)治療効果の評価

有効性は治療終了から4週後の時点における腫瘍の縮小効果にて判定する。局注病巣の病巣別評価とともに非局注病巣への効果も含めた個体別評価についても検討する。追加投与が行われた症例については、各コース毎に同様の評価を行う。全コース終了後も原則として月1回の経過観察を行い、少なくとも1年間は安全性と効果の評価を継続する。

可能であれば評価可能病変を治療終了後に生検して検索する。

(3)中止判定基準

(1)重篤な副作用とは以下に示すような生命に直接危機を及ぼす可能性のあるものと定義し、これが発生し、かつ今後治療の継続が困難と判断された場合、中止する。

- 1.外科的治療が必要とされる出血

	<p>2.アナフィラキシーショック 3.その他、重篤な臓器障害</p> <p>なお副作用が発生した場合、臨床研究担当者はそれを詳細にカルテに記載すると同時に本院に設置されている遺伝子治療臨床研究審査委員会に報告し、その重篤さの程度を検討してもらい、中止すべきか否かの判断を下してもらおう。</p> <p>(2)患者が拒否した場合、または主治医が無効例と認めた場合には臨床研究を中止する。</p> <p>5. 遺伝子治療臨床研究の責任の所在 本遺伝子治療臨床研究において、万一事故が発生した場合、その最終的責任は総括責任者が負うものとする。</p>
備考	<p>本遺伝子治療臨床研究は平成14年3月4日に信州大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会並びに信州大学医学部倫理委員会に申請され、慎重な審議が行われ、承認されるに至った。</p>

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この申請書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙()のとおりに」と記載し、別紙を添付すること。
5. 備考欄には、「第4その他」に掲げる各種指針への適合状況等、特記すべき事項について記載すること。
6. 大学等にあっては、この申請書の写しを文部科学大臣にも送付すること。