

別紙3：平成19年1月29日 審査委員会の審議結果通知

研究計画の変更について岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会
における審査結果

平成18年7月14日付けで岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査
委員会より研究計画の一部変更について適当と判定された「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」について、当該判定以
降における実施計画書等の変更点に関して、平成19年1月29日に審査委員会を開催し
た。

変更点として、免疫学的検査項目の追加、それに伴う研究者の追加ならびに関連した概
要書、計画書及び同意説明文書の改訂について諮り、検査項目の意義、妥当性、測定法、
研究者の業績等について審査の結果、変更内容は妥当であること、研究計画書等が適切に
変更されていることが確認され、研究計画遂行に支障がないものと判定した。

平成19年1月29日

岡山大学医学部・歯学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会委員長

伊 達



遺伝子治療臨床研究実施計画書

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

岡山大学医学部・歯学部附属病院

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

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

2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに本遺伝子治療臨床研究において担当する役割

2-1. 総括責任者の氏名及び担当する役割

公文裕巳 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻（泌尿器病態学分野）・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

2-2. 総括責任者以外の研究者氏名及び担当する役割

研究担当医師

那須保友 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻（泌尿器病態学分野）・准教授
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、
臨床観察、臨床効果判定

雑賀隆史 岡山大学医学部・歯学部附属病院・泌尿器科・講師
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ベクターの調製、
ベクターの投与、臨床観察、基礎的効果判定

賀来春紀 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・助教
患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、臨床観察

江原 伸 岡山大学医学部・歯学部附属病院・泌尿器科・助教
患者への説明及び同意の取得、ベクターの投与、臨床観察

小林知子 岡山大学医学部・歯学部附属病院・泌尿器科・医員
患者への説明及び同意の取得、分子生物学的解析

谷本竜太 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻（泌尿器病態学分野）・大学院生

患者への説明及び同意の取得、分子生物学的解析

研究協力者

- 清水憲二 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻（分子遺伝学分野）・教授
組織内における Interleukin-12 遺伝子の同定
- 山田雅夫 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
社会環境生命科学専攻（病原ウイルス学分野）・教授
ウイルスベクター力価の測定
- 中山睿一 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科
病態制御科学専攻（免疫学分野）・教授
免疫学的解析
- 七條茂樹 久留米大学医学部免疫学講座・准教授
CTL誘導ペプチドに対する特異的 IgG 抗体の測定
- 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全般的指導
- Brian J. Miles
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基礎的・臨床的解析の指導
- Malcolm K. Brenner
ベイラー医科大学・小児科・教授・遺伝子・細胞治療センター所長
ウイルスベクターの作製、安全性のチェック、品質管理
- 枝村康平 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. 遺伝子治療臨床研究の実施施設の名称及びその所在地

名称：岡山大学医学部・歯学部附属病院

所在地：〒700-8558 岡山市鹿田町 2-5-1

(TEL) 086-235-7507 (総務課) 086-235-7287 (泌尿器科)

(FAX) 086-232-1534 (総務課) 086-231-3986 (泌尿器科)

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

本臨床研究は、内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌に対し Interleukin-12 (以下：IL-12) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で投与した場合の a) 安全性の検討 (最大耐量の推定) を確認することを本試験の主な目的とする (主要エンドポイント)。また腫瘍免疫を中心とした b) 免疫学的反応の検討 (局所および全身反応の解析) ならびに c) 治療効果の観察 (評価可能症例) を行い、治療効果判定を総合的に解析する (副次エンドポイント)。

遠隔転移の有無にかかわらず内分泌療法中に再燃してきた前立腺癌症例に対して、IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを単独で前立腺腫瘍内もしくは局所ないし遠隔転移 (軟部組織を含む) 病巣内に直接投与する。その際の質的、量的安全性を確認し、腫瘍免疫を中心とした生体における免疫学的反応の検討を行うとともに治療効果の判定を行い、腫瘍退縮や腫瘍マーカーの低下を期待する際の根拠となる分子生物学的効果、免疫学的効果、ベクターの感染、mRNA レベル及びたんぱく質レベルでの IL-12 遺伝子の発現について総合的に解析することを目的とした第 I / II 相試験である。

本臨床研究は米国ベイラー医科大学の遺伝子治療臨床研究プロトコルを参考に、同医科大学の Timothy C. Thompson 博士等の研究協力者と岡山大学の研究者間で実施される共同研究であり、製造販売承認を目的とした治験ではない。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同じく研究協力者である Malcolm Brenner 教授が所長を務める同医科大学遺伝子・細胞治療センターで作製され、直接供給される。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

5-1. 研究区分 遺伝子治療臨床研究

5-2. 対象疾患に対する現時点での知見

5-2-1. 前立腺癌に対する現時点での一般的な知見

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、2003年度は200,900人が新たに前立腺癌と診断され、28,900人が同疾患で死亡すると推定されている¹⁾。

また前立腺特異抗原（PSA：Prostate specific antigen）のスクリーニングにより、前立腺に限局した早期癌の患者が増加してきており、本邦では診断時における限局性前立腺癌（病期 A, B）症例が全体の約40%となっている。限局性前立腺癌の場合、一般的に根治的前立腺全摘出術が適応となる事が多いが、外照射治療や2003年より本邦に導入された密封小線源治療といった組織内照射などの放射線治療の普及により、外科的切除以外での治療法も選択される。放射線治療に関しては初期治療として施行された場合の有効性は認められており、特に癌病巣が前立腺被膜内に限局した病期 B 症例に対する局所療法としての有効性は確立されている²⁾。これら外科的切除ならびに放射線治療によって多くの症例は根治可能であるものの、30-40%の症例において PSA 再発をきたしており、再発後の治療法選択等が今日的な臨床上的の問題点であるが³⁾、本邦では内分泌療法が主に選択される。

一方、診断時において全体の約30%を占める、被膜をこえて進展した症例（病期 C）の場合は、前立腺全摘出術単独では根治する可能性は低く、内分泌療法併用前立腺全摘出術または、初期治療としての内分泌療法と放射線治療の併用療法が行われる。病期 C のみに限られたものではないが、それを中心とした局所進行性前立腺癌に対する内分泌療法と放射線療法の併用療法のいくつかの大規模比較試験では、放射線療法単独より併用群のほうが無病生存率、癌特異的生存率は有意に勝つ

ているものの、併用群においても無病生存率は3年から5年で21%から74%であり、概して約半数例で再発を認める⁴⁾。内分泌療法単独での治療においても40-60%の症例において2-3年以内に局所再発もしくは遠隔転移を生じると報告されており⁴⁾、このような内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌に対する放射線治療の有効性に関しては、排尿障害などの症状の緩和に対しては約90%と良好な成績が報告されているものの、2年以内に約75%の症例においてPSAの再上昇を認め、予後の改善に関しては満足すべき成績は得られていない⁵⁾。しかも放射線治療については、種々の合併症が認められ、頻度は3-5%と低率とはいえ重篤な晩期合併症（消化管穿孔、潰瘍）の発生も報告されており、Quality of Life(QOL)の観点から問題があるといえる⁵⁾。

また診断時遠隔転移を有する症例（病期D）は全体の約30%を占めており、治療法としては内分泌療法が第一選択である。病期D症例に対する放射線治療の有効性は、骨転移やリンパ節転移に伴う疼痛緩和には有効性が示されるものの、放射線照射部以外の病巣に対する効果は期待できない。

このように内分泌療法は外科的切除後の再発症例のみならず放射線治療後の再発症例、局所進行例、転移症例に対し幅広く用いられるが、内分泌療法治療中にも関わらず再燃してきた内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌に対しては一般に抗癌化学療法が選択される。

内分泌抵抗性再燃前立腺癌に対する抗癌化学療法として、本邦では保険適応のある化学療法剤であるエストラサイト、イフォマイド、シスプラチン、ペプロマイシンおよびUFTが挙げられる。これら抗癌化学療法剤は、一過性のPSA減少、および症状の改善は期待できるものの、生存率の延長効果は認められていない⁶⁾。また対象症例の多くが高齢者であり患者の認容性に問題がある。2004年New England Journal of Medicineに発表された2編の大規模RCT(Randomized controlled study)に関する報告ではいずれもドセタキセルを用いた抗癌化学療法により内分泌療法抵抗性前立腺癌に対する生命予後延長効果が認められた。TAX327はドセタキセル+プレドニゾン、SWOG9916はドセタキセル+エストラムチンを用いた多施設共同ランダム化試験でありいずれも欧米での標準療法であるミトキサントロン+プレドニゾロンをコントロール群とした^{6) 7)}。

TAX327では、平均生存期間が3週ごとのドセタキセル群18.9ヶ月に対し、コントロール群16.5ヶ月であり、PSA効果もそれぞれ45.8%、32%であった。また、SWOG9916では、平均生存期間がド

セタキセル群が18ヶ月に対し、コントロール群15ヶ月であり、評価病変への効果はそれぞれ17%、10%であった。その結果を踏まえ、米国では2004年5月にドセタキセルの内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌への使用が承認された。しかし現時点では本邦において保険適応はなく、保険適応取得に向けた臨床試験が実施されている現状である。また海外において有効性の高いといわれている taxane-based chemotherapy は血液系を中心とした grade3/4 の副作用を 45-54%に認め、治療関連死を 0.3-2%に認めている⁶⁾⁷⁾。対象となる患者として高齢者が多い現実を考えるとより low risk and high benefit な治療法の開発が望まれている。

5-2-2. 前立腺癌に対する新しい治療法として注目されている IL-12 遺伝子治療

古くから免疫系を介した腫瘍特異的免疫療法は注目されてきたが、免疫抑制がかかった担癌状態のなかで腫瘍の退縮を導くメカニズムが今日の実験系で次第に明らかになってきた。腫瘍免疫のなかでも、腫瘍特異的免疫活性を賦活化させるサイトカインの1つとして Interleukin-12(IL-12)が注目されている。IL-12は、ナチュラルキラー(NK)細胞に直接作用し、その細胞傷害活性(CTL)を誘導ならびに増強することやNK細胞およびT細胞からのインターフェロンガンマ(IFN- γ)産生の誘導によって抗腫瘍効果を発揮することが広く知られている⁸⁾。しかし種々の癌を対象とした臨床試験において IL-12 タンパクの静脈内投与後、重篤な副作用が発生し死亡例が発生した⁹⁾。この臨床試験における IL-12 タンパク投与は、(用量設定試験においては実施された)2週間前に実施するテスト投与を省略し、500ng/kg の IL-12 タンパクを静脈内に連日5日間投与し、3週ごとに2回投与するスケジュールであった。重篤な副作用の原因が、テスト投与省略による血清中インターフェロン γ 濃度の著明上昇と相関していると判明した⁹⁾。引き続き IL-12 タンパクの皮下投与に投与方法を変更し、悪性腫瘍¹⁰⁾⁻¹³⁾、C型肝炎¹⁴⁾を対象に臨床試験が実施され、静脈内投与よりも低い投与量と長い投与間隔においての安全性と有効性が確認された(皮膚T細胞性リンパ腫10例を対象に50~300 ng/kg を週2回24週皮下投与するスケジュールで実施された。副作用は軽度の発熱、頭痛であり限られた症例においてのみ認められた。評価可能症例9例中5例において完全もしくは部分寛解が認められた¹²⁾)。これら結果を踏まえ、より確実な安全性の確保と高い臨床効果を目指し、

IL-12 遺伝子治療の研究が開始され、前立腺癌を含む様々な癌種において IL-12 遺伝子 *in vitro* および *in vivo* 実験が行われ、遺伝子治療の安全性と有用性が動物実験において確認された¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

研究担当医師である那須保友は、マウス前立腺癌同所移植モデルを用いた前臨床試験において、マウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与により、1) 局所前立腺腫瘍の発育抑制、2) 肺転移および骨転移の抑制という全身効果、3) 生存期間の延長効果、を確認し、転移病巣の治療を目的とした IL-12 遺伝子の局所投与の有用性を明らかにした¹⁷⁾。すなわち局所への遺伝子導入 (*in situ gene therapy*) による免疫の賦活化などを介した全身への治療効果を期待するという臨床研究立案のための科学的根拠を明らかにした。

上記のような知見から、本臨床研究の対象患者として、内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌患者ならびに内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌患者を選定し、アデノウイルスベクターにより IL-12 遺伝子を直接癌細胞に導入する遺伝子治療臨床研究を計画した。

5-3. 本遺伝子治療臨床研究の概要

5-3-1. IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの作製

本臨床研究に用いられる IL-12 ウイルスベクターは、現行の FDA ガイダンス、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原材料から製造工程、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おり、ベイラー医科大学より供与を受ける。(詳細は「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」参照)

5-3-2. 対象疾患の選定

本臨床研究では病理組織学的に前立腺癌と診断され、内分泌療法で治療された患者のうち、経過中に腫瘍マーカーである前立腺特異抗原 (PSA: Prostate Specific Antigen) を用いた生化学診断上、内分泌療法が無効と診断された症例を対象とし、以下の3カテゴリーに分類する。

①. 内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌：(非転移症例)

外科的切除により根治不能な局所的に進行した前立腺癌症例で、内分泌療法(放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む)の経過中に、PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性局所

再燃前立腺癌と診断され、かつ臨床的に遠隔転移を認めない患者。

②. 内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌：(有転移症例)

前立腺全摘出術の有無により、2 カテゴリーに分類する。

②-1 前立腺全摘出手術未施行例

前立腺癌診断時、既に臨床的に遠隔転移を有し、外科的切除により根治不能な進行前立腺癌症例で、内分泌療法（放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌と診断された患者。

②-2 前立腺全摘出手術施行例

根治的前立腺全摘出術後に局所ないし遠隔転移（軟部組織を含む）にて再発した前立腺癌症例で、内分泌療法（放射線療法、抗癌化学療法の併用を含む）の経過中に PSA を用いた生化学診断上、内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌と診断され、かつ再燃時に組織学的に転移が確認された患者。

5-3-3. 被験者の選択基準

症例の選択に際し、次の項目に該当する被験者を対象とする。

- 1) 被験者は 20 歳以上の成人としその年齢に上限を設けませんが、医学的に本臨床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。(注記 1)
- 2) 内分泌治療を施行中であること。(注記 2)
- 3) 血中テストステロンが 1 ng/ml 以下の症例。
- 4) 血清 PSA の有意な上昇（2 週間以上の間隔での 3 回の測定において連続的に上昇し、最終的に PSA 値が 4.0 ng/ml 以上）を認める生物学的に活動性の局所再燃癌。被験者登録時から 3 回前に測定した数値からの 3 回連続上昇となる。(注記 3)
- 5) 前治療の影響がないと考えられる症例。
- 6) 被験者は、効果判定のため少なくとも 12 週以上の生存が期待でき、performance status (PS) が 2 以下の者。

- 7) 被験者は正常な骨髄機能、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 $>2000/\text{mm}^3$ 、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 $<1.5\text{mg/dl}$ 。

(注記1) 前立腺癌における患者の年齢構成は75歳以上が32%と高い割合を示すこと、米国での臨床試験においても年齢の上限は無いことより年齢に上限は設定しない。

(注記2) 内分泌療法として LH-RH アゴニストが投与されている被験者の場合、LH-RH アゴニストの投与が中止されれば血中のテストステロン濃度は去勢術前のレベルに回復する。アンドロゲンが除去された環境下においても増殖可能となった前立腺癌細胞のうち、アンドロゲンの刺激によって増殖速度が増す細胞が存在することが報告されており、このことは臨床的には LH-RH アゴニストの中断によってアンドロゲン血中濃度が再上昇し、癌細胞の増殖が刺激され、病勢の悪化を生じる可能性があることを示唆している。Taylor¹⁸⁾らは内分泌療法無効例に対する次の治療を行う際に、それまでの内分泌療法を継続した場合と中止した場合の予後の差を解析した。それによると内分泌療法を継続し次の治療を施行した群と、内分泌療法を中止し次の治療を施行した群における50%生存期間はそれぞれ9.9ヶ月、3.6ヶ月と有意の差を認め、内分泌療法を継続することの有用性を報告している。以上の基礎的、臨床的な根拠により、内分泌療法再燃前立腺癌の治療に際し、前治療である内分泌療法を中止するか継続するかについては、前立腺癌の生物学的特性ならびに患者への不利益を最小限に抑える目的から、内分泌療法を継続することが妥当であると判断した。

(注記3) 抗アンドロゲン剤を併用している症例では、投薬を中止し抗アンドロゲン除去症候群でないことを確認する。

5-3-4. 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臨床研究の対象としない。

- 1) 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。
- 2) 本臨床研究参加6ヶ月以内に未承認薬の臨床試験(治験も含む)に参加している場合。
- 3) 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。
- 4) 当該臨床研究にいったん参加し何らかの理由で投与を終了した場合(重複登録の禁止)
- 5) その他、担当医が不適当と認める場合。

5-3-5. 遺伝子導入法

本遺伝子治療臨床研究の適応が予測される患者について、岡山大学医学部・歯学部附属病院にて患者ならびに家族(あるいは親族)もしくは立会人(患者に家族ならびに親族がいない場合、患者の親しい間柄の人を同席させたいという希望が患者からあった場合)に対し、文書によるインフォームド・コンセント(第1回目)を行い、同意が得られた場合に限り、本臨床研究へエンロール(患者登録)し、治療前検査を開始する。治療前検査にて上述した選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データを基に安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。安全・効果評価・適応判定部会で本臨床研究の適応と判断された場合、岡山大学医学部・歯学部附属病院にて患者ならびに家族(あるいは親族)に対し、文書によるインフォームド・コンセント(第2回目)を行う。

説明と同意書は、本計画書に添付資料12-1、12-2、12-3(前立腺がん遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書)として含まれている書式である。同意書は2部作成し記名捺印または署名されたの1部を被験者に手渡し、他の1部を診療記録とともに保存する。

同意が得られた場合に限り、以下の方法によって本臨床研究を実施する。

1. 術当日、岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟5階遺伝子細胞治療センターに -80°C 凍結保管してある IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を封入しているポリプロピレン製クリオチューブを投与量に合わせた必要なクリオチューブを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を融解する。

2. IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクター液を専用のキャリアバック内に厳重に封入して、保冷下で岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室もしくは中央放射線部 CT 室に搬入する。
3. 各症例に対し、以下の方法にてアデノウイルスベクターを注入する。

①内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌（非転移症例）

岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、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 IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 1 ないし 2 ヶ所（最大 2 ヶ所）に注入する。ウイルスベクター液は 1 ヶ所につき 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。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

②内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌（有転移症例）

②-1. 前立腺全摘出手術未施行例

岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、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 IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 1 ないし 2 ヶ所（最大 2 ヶ所）に注入する。ウイルスベクター液は 1 ヶ所につき 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。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

②-2. 前立腺全摘出手術施行例

局所再発腫瘍に対しては岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟 3 階手術場無菌室内にて、原則として腰椎麻酔を施行し、経直腸的超音波を用いて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 IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 1-2 ヶ所（最大 2 ヶ所）に注入する。ウイルスベクター液は 1 ヶ所につき 1 ml とする。尿道カテーテルを注入直後に留置し、翌日抜去する。治療後 3 日間の抗生剤投与を行う。

転移性腫瘍に対しては、超音波下で投与する場合は岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟3階手術場無菌室内にて原則として局所麻酔を施行し、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を注入する。CT ガイド下で注入する場合は岡山大学医学部・歯学部附属病院中央放射線部 CT 室にて局所麻酔を施行し、CT ガイド下にベクターを注入する。治療後3日間の抗生剤投与を行う。

注入後の岡山大学医学部・歯学部附属病院北病棟3階手術場無菌室ならびに岡山大学医学部・歯学部附属病院中央放射線部 CT 室内の消毒、清掃は専門業者に依頼する。その後、プロトコルを遵守して安全性ならびに治療効果の評価を行う。重篤な副作用を認めない場合は28日毎に3回の治療を実施する。3回目の治療を終了した28日後に、臨床症状、検査および病変部の総合評価を行う。

ベクター液はベクター力価漸増式に6段階設定し、ステージアップの適応評価については各ステージ終了後に安全・効果評価・適応判定部会を開催することとし、当該ステージの最終症例における3回目投与28日以降に開催し全ての症例について3回目投与28日後までのデータを基に総合評価する。安全であると判定された後、次のステージを開始する。「安全・効果評価・適応判定部会」での判定結果については、会議毎に結果報告書ならびに参加委員全員の署名または記名捺印を受けた出席リストを添付した議事録を作成し、その写しを遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見として報告する。規定にのっとり委員長は審査または調査を行い終了後速やかにその結果を岡山大学医学部・歯学部附属病院院長に報告する。岡山大学医学部・歯学部附属病院院長は委員長の報告を受けて通知書を作成し、委員会の記録の写しとともに総括責任者に提出する。通知の写しは必要に応じ適宜所轄官庁に提出する。(指針第四章第四の規定に基づき)

4. 添付資料 12-5. に掲げるタイムスケジュールで安全性の評価に関する検査(理学所見、血液一般検査、生化学一般検査、出血・凝固時間、尿検査、尿培養検査、尿中・血中ベクターゲノム数測定、尿中・血中のアデノウイルスに対する抗体及びアデノウイルス中和抗体の産生をチェック、血中サイトカイン濃度)を行う。

5. 治療前において同意の得られた患者から、経直腸的前立腺生検術ならびに超音波または CT による生検術にてアデノウイルスベクターを注入した組織中の癌細胞の有無、アポトーシスの有無と程度、浸潤細胞の種類と程度を解析する。実施時期は初回投与後 3 ヶ月目(継続投与を行う際には、3 ヶ月ごとに実施)、投与終了 1 年後より 1 年毎とする。また、アデノウイルスベクター投与後の導入遺伝子の発現解析を目的として被検者の同意が得られ、主治医が医学的に可能と判断した患者のみを対象とし 1 回目のベクター注入終了 48-72 時間後に生検術を実施する。
6. 添付資料 12-5. に掲げるタイムスケジュールで効果判定に関する検査(血中サイトカイン濃度などの免疫学的解析、血清 PSA の測定、CT、骨シンチなどの画像診断)を行い、臨床症状の経過を観察する。
7. 本臨床研究終了後、患者のフォローアップとして岡山大学医学部・歯学部附属病院において投与終了後 60 ヶ月まで追跡調査をする。

5-4. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

5-4-1. 従来行われてきた他の治療法との比較

前述のごとく、本臨床研究の対象疾患は内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌である。カテゴリー①である内分泌療法抵抗性局所再燃前立腺癌に対しては放射線治療の選択があるものの、予後の改善に関しては満足すべき成績は得られていない。カテゴリー②である内分泌療法抵抗性転移性再燃前立腺癌に対しては抗癌化学療法の選択があるが、再燃前立腺癌に対する抗癌化学療法については taxane-based chemotherapy の有効性が海外において報告されつつあるが血液系を中心とした grade3/4 の副作用を 45-54%に認め、治療関連死を 0.3-2%に認めている。⁶⁾⁷⁾ 対象となる患者として高齢者が多い現実を考えるとより low risk and high benefit な治療法の開発が望まれている。また分子標的薬の開発治験も実施されているがいずれも試験段階である。

5-4-2. 遺伝子治療を選択した理由

IL-12 タンパクを用いた in vitro、in vivo 実験において、前立腺癌細胞株を含む多くの癌細胞株にて有効性が示され、その抗腫瘍効果のメカニズムが次第に解明されてきた⁸⁾。それら結果を受

け、種々の癌を対象とした IL-12 タンパクを用いた臨床試験が行われたが、静脈内投与後に重篤な副作用が発生し、死亡例も発生したことは前述した⁹⁾。その原因として、IL-12 タンパクの投与の手法が副作用発現および重篤度に有意に関連していると解析され、体腔内もしくは局所投与(皮下、IL-12 産生細胞の腫瘍内投与)では毒性が低いと結論付けられた。これら結果を踏まえ、より確実な安全性の確保と高い臨床効果を目指し、IL-12 遺伝子治療の研究が開始された。研究担当医師である那須保友は、マウス前立腺癌同所移植モデルを用いた前臨床試験において、マウス IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与による局所前立腺腫瘍の発育抑制さらに肺転移、骨転移の抑制および生存期間の延長効果を確認し、転移病巣の治療を目的とした IL-12 遺伝子の局所投与の有用性を明らかにした¹⁷⁾。

また岡山大学泌尿器科では内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌に対する遺伝子治療臨床研究(研究課題名:前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 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(GCV)を用いた遺伝子治療臨床研究)を実施した。治療用アデノウイルスベクターを前立腺内へ局所投与する手法で実施されたが、重篤な副作用は認められなかった。

Patinets No	Increased CRP	hematuria	headache	Dermoreaction	others
Level 1 1x10 ⁹ PFU					
1		Grade 1			
2					Voiding disturbance pollakisuria increased LD
3			Grade 1		nausea
Level2 1x10 ¹⁰ PFU					
4	Grade 1	Grade 1		Grade 2 (eczema)	Fever leukocytopenia
5	Grade 1		Grade 1		Increased T.bil
6	Grade 1				Micturition pain
7		Grade 1			
8	Grade 1				
9					

上の表に副作用の内訳を示す。Level 1 および Level 2 のベクター投与量であったが、研究期間を通じて grade3 もしくは grade4 の重篤な副作用は認められなかった。いずれも grade1-2 であり特に治療を要せず自然軽快し、副作用により治療を中止した症例は認められなかった。血尿、頭痛、発熱、

嘔気などをアデノウイルスベクター注入当日から3日目までに認めたが、軽度であり自然軽快した。

CRP の軽度かつ一過性上昇を高用量投与群の6例中4例に認めた。

また前立腺癌を対象にアデノウイルスベクターを局所投与することの安全性ならびに低侵襲性については上記のごとき岡山大学における臨床研究（前立腺内投与）ならびに神戸大学における臨床研究（前立腺内投与、リンパ節および骨などの転移巣への投与）において確認されており、わが国独自の研究成果の蓄積が存在する。

以上のように、本臨床研究の対象疾患として、有効かつ安全で低侵襲な治療法が確立していない内分泌療法抵抗性再燃前立腺癌症例を選定し、アデノウイルスベクターにより IL-12 遺伝子を直接癌細胞に導入する遺伝子治療法を実施することは安全性、低侵襲性ならびに進行を抑制するという有効性が確保される点において、他の治療法と比較して優れていることが十分に予想されると判断し、本遺伝子治療臨床研究を計画した。

表に当該遺伝子治療臨床計画と岡山大学で実施・終了した HSV-tk 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との比較表を添付する。

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 Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) 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
承認日		平成 15 年 11 月 27 日 (学内承認)	平成 11 年 9 月 16 日 (国の承認)
実施症例		未実施	9 名 (8 名のべ 9 症例)
ベクターの種類		アデノウイルスベクター	アデノウイルスベクター
遺伝子		Interleukin-12	HSV-tk
対 象 と な る 患 者	年齢	上限なし	上限なし
	前治療	内分泌療法	内分泌療法
	病期	B,C,D	B,C
	転移症例	含まれる	含まれない

	術後の再発	含まれる	含まれない
	注入部位	前立腺、術後再発部位、転移部	前立腺
	治療としての位置付け	局所および全身治療	局所治療
	全身効果	マウスでは確認、 ヒトではこれから確認	マウスでは確認、ヒトでは一部確認された（米国）
	米国での状況	FDA の実施承認済み、 2004 年 5 月に実施	36 例終了(2000)、拡大研究実施中 (オランダ、メキシコ)、他の治療との併用
	安全性	確認中（米）	確認済み（日、米）
	治療効果（日米を含め）	観察中（米）	有意な効果を確認（日、米）

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

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た。その中でも、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。高力価で非増殖性細胞にも感染可能なアデノウイルスベクターにおいて、種々の組織での高い遺伝子導入効率が認められており、前立腺癌、肺癌などを対象にした遺伝子治療の基礎実験、臨床試験でもその有用性が確認されている^{19)、20)}。特に、安全性の面からも腫瘍組織内に直接注入する in situ (in vivo) 遺伝子治療に適している²¹⁾。このような背景により本臨床研究では、IL-12 遺伝子を組み込んだ IL-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いる。

6-1. IL-12 遺伝子の構造と性質

6-1-1. IL-12 遺伝子の構造

IL-12 遺伝子の構造およびアデノウイルスベクターの構造の詳細については添付資料 12-7. に記載する。

6-1-2. IL-12 遺伝子の性質

IL-12 は Natural killer (NK)、Cytotoxic T lymphocyte (CTL) 活性の誘導ならびに増強、さらには T 細胞および NK 細胞の分化刺激による NK、T 細胞からの Interferon- γ (IFN- γ) の産生誘導により抗腫瘍効果を発揮することが広く知られている。一連の研究において、様々な癌種に対し IL-12 の用量依存的な殺細胞効果や転移抑制効果、持続的免疫反応が示されている²²⁾。

6-1-2-1. IL-12 遺伝子の作用メカニズム (生物活性)

IL-12 は分子量約 70kDa (p70) の糖蛋白質で、1 個の分子内ジスルフィド結合により結ばれた分子量各 40kDa (p40) と 35kDa (p35) の互いに相同性のない 2 つのサブユニットより構成された異型二量体である。IL-12 は単球、マクロファージ、B 細胞および樹状細胞といった活性化された抗原提示細胞 (APCs) より産生され、その生物活性として以下のようなことが明らかとなっている。

- ① Natural killer (NK) 細胞、Lymphokine-activated killer (LAK) 細胞の誘導および細胞障害性の増強 (細胞障害性細胞への効果)。標的細胞としては腫瘍細胞、ウイルス感染細胞を含む。
- ② CD4+ および CD8+ T 細胞 (リンパ系細胞) の増殖促進。
- ③ マクロファージ、NK/LAK 細胞、T 細胞からのサイトカイン (IFN- γ 、TNF- α など) 産生の促進。
- ④ ナイーブ T 細胞 (Th0) から Th1 細胞への分化誘導

6-1-2-2. IL-12 遺伝子の作用メカニズム (抗腫瘍効果)

このような生物活性を持つ IL-12 の、様々な固形腫瘍に対する抗腫瘍効果が現在まで数多く報告されているが、そのメカニズムについては次のようなプロセスを通じて腫瘍退縮を達成できることが明らかとなっている⁸⁾²²⁾。

- ① 投与局所におけるマクロファージなどの APCs、NK 細胞の誘導および活性化
- ② APCs および NK 細胞からの TNF- α 、IFN- γ などのサイトカイン産生促進
- ③ TNF- α 、IFN- γ そのものによる直接的な腫瘍増殖抑制効果の誘導ならびに TNF- α 、IFN- γ によって活性化されるエフェクター細胞を介した抗腫瘍効果の誘導。

- 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^{17), 23)}。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える。

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¹⁷⁾。

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、 5×10^7 から 3×10^8 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、 1×10^8 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)

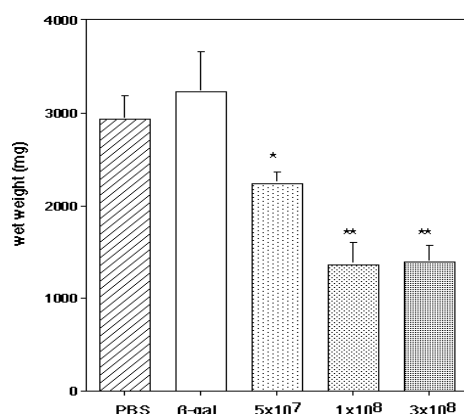


図-1

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

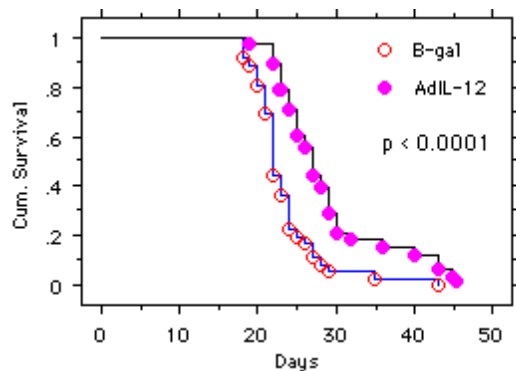


図-2 : Cumulative Kaplan-Meier survival plot for each of the groups of animals. There was a statistically significant ($p < 0.0001$) difference between the IL-12 treated group and the control group by Mantel-Cox log rank analysis.

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 ± 3 個 vs. IL-12: 24 ± 5 個; $p < 0.017$)。(図-3-B)

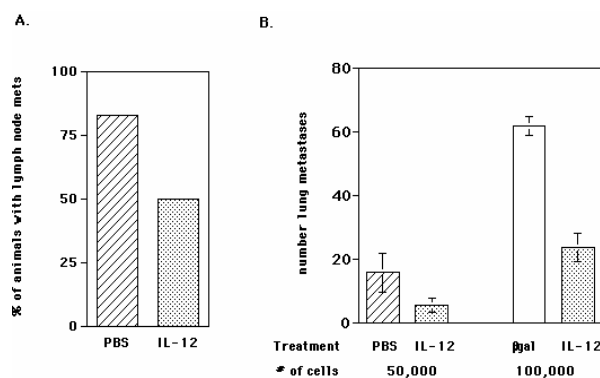


図-3 : A. Inhibition of spontaneous metastasis by AdmIL-12 treatment of orthotopic tumors was determined by histological evaluation of sections from pelvic lymph nodes collected from mice at day 14 after virus injection. The presence or absence of tumor cells was also confirmed by cytokeratin staining. 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 1×10^8 PFU) or PBS or ADV/CMV/βgal (5×10^8 PFU).