

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の効果进行评估する。

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 Grade3・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、細胞の染色体に組み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 G207 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下を除くと、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℃(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% グリセリン加リン酸緩衝液(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