

199900357A

難治癌に対する p53 遺伝子を用いた遺伝子 治療の基礎的・臨床的研究

研究課題番号 (H10-ゲノム-031)

平成9年度～平成11年度

厚生省科学研究費補助金 (ヒトゲノム・遺伝子治療研究事業)

研究報告書

平成12年3月

研究代表者 田中 紀章

(岡山大学医学部・外科学第一講座・教授)

難治癌に対する p53 遺伝子を用いた遺伝子治療の基礎的・臨床的研究

主任研究者 田中紀章 岡山大学医学部・外科学第一講座・教授

【研究要旨】 「非小細胞肺癌に対する正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」は、1998年10月に厚生省および文部省で科学のおよび倫理的妥当性が認められ、その実施を了承された。平成11年3月より外科的切除不能の進行非小細胞肺癌症例に対して、正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターの局所投与による遺伝子治療を開始した。平成12年3月現在5例の被験者に治療が行われており、最初の3例はベクター単独投与、続く2例はシスプラチンを併用する群に移行している。最も高頻度に見られる副作用は今のところ一過性の発熱であるが、いずれも重篤なものは観察されていない。臨床効果は一律ではないが、症例によっては腫瘍縮小がみられており、局所的には癌細胞のアポトーシスが誘導されている可能性が示唆される。臨床試験は順調に進行中であり、今後は多施設共同研究に移行することで、早期の第I相臨床試験の終了を目指す。

分担研究者：

藤原俊義

(岡山大学医学部附属病院・第一外科・助手)

片岡正文

(岡山大学医学部附属病院・第一外科・医員)

A. 研究目的

本研究の目的は、p53 遺伝子に突然変異や欠失などの異常を有する根治的切除不能な原発性あるいは再発性非小細胞肺癌症例において、正常な p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター Ad5CMVp53 の腫瘍内局所投与と DNA 障害性抗癌剤シスプラチンの全身投与による副作用および治療効果を検討することである。Ad5CMVp53 の質的・量的安全性およびその可逆性を観察するとともに、腫瘍退縮や転移抑制、生存期間の延長などの治療効果について検討する。また、あくまでも局所療法であるため、閉塞性肺炎の改善や疼痛の軽減などの QOL (quality of life) の向上も評価し有効性の指標とする。

B. 研究方法

正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター Ad5CMVp53 は、増殖性アデノウイルスの混入否定試験を初め各種安全性試験を経た後、治験材料として本研究に用いられる。Ad5CMVp53 単独投与を行う第1群と Ad5CMVp53 とシスプラチンを併用する第2群を設定する。対象となる被験者は、以下の条件を満たす原発性または再発性の非小細胞肺癌（扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌）患者とする。

1. 年齢15歳以上75歳未満であること。
2. 原則として臨床病期ⅢA・ⅢB期またはⅣ期で、外科的に治癒切除不能であり、かつ従来の治療法である化学療法や放射線療法が無効であること
3. 対象病変まで気管支鏡的あるいは胸腔鏡的に到達可能か、あるいは Computed Tomography (CT) ガイド

下に穿刺可能で Ad5CMV-p53 調製液の局所注入が可能であること。

4. 12週間以上の生存が期待できること。Performance Status が2以下であること。

5. 対象病変より得られた生検材料あるいは切除材料から p53 遺伝子の異常が証明されていること。

6. 正常な骨髄機能、肝機能及び腎機能が維持されていること。

被験者は、気管支内に突出する腫瘍を有する場合は気管支鏡下に、また末梢型の腫瘍を認める場合はコンピュータリッド・トモグラフィー(CT)ガイド下穿刺により、腫瘍部位に微細穿刺針を用いて Ad5CMVp53 液を注入される。Ad5CMVp53 投与量は 10^9 PFU より10倍ずつ増量し、 10^{11} PFU まで各レベルで第1群、第2群それぞれ3人ずつの被験者に試みられる。最大耐量の Ad5CMVp53 は第1群、第2群それぞれ6人ずつの被験者に投与される。第2群の被験者には 80 mg/m^2 のシスプラチンを第1日目に点滴にて静脈内投与し、Ad5CMVp53 は第4日目に腫瘍内に局注される。治療後の観察期間中に重篤な副作用が見られず安全性が確認されれば、この治療を1ヶ月に1度繰り返す。臨床効果の観察および生検材料を用いた組織学的解析（分子生物学的解析を含む）を行い、基礎研究での結果が臨床的に反映されているかどうかを検討する。

(倫理面への配慮)

被験者へのインフォームドコンセントのために作成した文書は、新 GCP に乗っ取って改訂し、p53 遺伝子やアデノウイルスベクターなどの語彙の説明から米国で進行中の臨床試験の結果まで、できるだけ平易な言葉で説明している。実施計画の「説明と同意書」は、1998年10月に厚生省先端医療技術評価部会および文部省遺伝子治療臨床研究専門委員会で、倫理的妥当性について了承されている。さらに、新しい情報が入ってくれば、その度に説明書の中に盛り込んでいる。

表 p53 遺伝子治療の臨床試験への参加症例 (3/28/00 現在)

症例	年/性	病理	部位	前治療	p53 遺伝子変異	投与経路	投与量	回数
01	58/男	扁平上皮癌	気管分岐部	化学療法 放射線療法	169 (エクソン5) 欠失 280 (エクソン8) (AGA>AAA)	気管支鏡	10 ⁹ PFU	14
02	58/男	扁平上皮癌	左肺下葉	化学療法 放射線療法	220 (エクソン6) (TAT>TGT)	気管支鏡 CT	10 ⁹ PFU	9
03	66/男	扁平上皮癌	右主気管支	手術 化学療法 レーザー療法	141, 142 (エクソン5) 欠失	気管支鏡	10 ⁹ PFU	4
04	46/女	腺癌	左肺上葉	化学療法	193 (エクソン6) (CAT>TAT)	CT	10 ⁹ PFU + CDDP	9
05	56/男	扁平上皮癌	右肺下葉	化学療法 放射線療法	検査結果未	気管支鏡 CT	10 ⁹ PFU + CDDP	3

C. 研究結果及び考察

「非小細胞肺癌に対する正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチン(CDDP)を用いた遺伝子治療臨床研究」は、1998年10月に厚生省および文部省より実施を了承された。その後、岡山大学医学部附属病院と治験依頼者となるアールピーアール ジェンセル社との間で治験契約が結ばれた。

1999年2月に第1例目の被験者が外来を受診し、気管支鏡下の生検で採取した癌組織から p53 遺伝子異常が検出された。免疫組織染色では核に異常蛋白質の発現がみられ、PCR-SSCP 解析ではエクソン5に変異が認められた。この異常は、さらにDNAシーケンスによりコドン 169 の欠失およびエクソン 8 コドン 280 の AGA から AAA への点突然変異であることが確認されている。十分なインフォームドコンセントの後、1999年3月に治療を開始した。病変は左右の気管分岐部の扁平上皮癌の再発で、気管支鏡を用いて 3 ml の Ad5CMVp53 液を 1 ml ずつ3箇所へ注入した。この治療を1ヶ月に1度繰り返したところ、副作用としてはベクター投与後24時間以内の一過性の発熱が高率にみられた。しかしいずれも自然と軽快しており、その他の重篤な副作用は観察されていない。臨床的には、気管分岐部を中心に左主気管支内に易出血性の不整な隆起が認められていたが、ベクター投与48時間後から形態の変化がみられ、2週間後には癌のかなりの部分がほれ込んで平坦化してきた。さらに長期的に経過をみると、4回治療後には気管分岐部の表面が全体的にスムーズになり、多くの部分の生検で扁平上皮化生との病理所見で、癌細胞が検出されなくなった。ベクターの投与部位の癌細胞にアポトーシスが誘導された可能性が示唆される。症状としても、治療前に激しくみられた血痰

が止まった。

第2例目の被験者は、左肺下葉原発の扁平上皮癌患者で、p53 のエクソン6 コドン 220 に TAT から TGT への点突然変異が検出されている。この症例にも、気管支鏡下に 3 ml の Ad5CMVp53 液を 1 ml ずつ3箇所へ注入した。副作用としてはやはり一過性の発熱が認められたが、重篤なものはなかった。2回投与後に閉塞していた気管支が一時的に開通し、咳が止まり、肺活量が約1リットル改善した。CT、MRIでも左肺下葉の無気肺が部分的に改善している様子が確認された。自覚的にも治療前に比べると呼吸が楽になり、日常生活が十分おくれるような時期がみられたことは、被験者の QOL の改善には役立ったと考えられる。

第4例目の被験者は、左肺上葉の腺癌患者であり、両側肺内に微小肺内転移があるため遺伝子治療を希望した。シスプラチン 80 mg/m² の全身投与後、CTガイド下に Ad5CMV-p53 の腫瘍内投与を施行されている。やはり一過性の発熱がみられるが、自然と軽快している。また、CTガイド下の穿刺の際に軽い気胸がみられたこともあるが、脱気にて軽快している。シスプラチンによる悪心、嘔気はみられるが重篤なものではない。臨床的には腫瘍縮小は明らかではないが、腫瘍サイズは stable であり、腫瘍マーカー CEA の値が低下してきている。

2000年3月現在、5例の被験者に治療を行っているが、いずれの被験者でも好ましい反応がみられたわけではなく、右主気管支を閉塞するように増殖する扁平上皮癌を有する3例目の被験者ではほとんど効果がみられず、4回の治療を行ったにもかかわらず腫瘍は増大し、1999年9月に死亡した。また、右肺下葉に巨大な腫瘍を有する5例目の被験者では、シスプラチンによる食欲

不振が激しく、本人の希望もあり3回治療後に臨床試験を中止している。

臨床研究の実施計画を作成し、厚生省・文部省での審査・了承の後、臨床試験の開始まで到達できたことは、本邦における遺伝子治療臨床研究、特に治験型のプロトタイプとして社会的にも評価できると考える。副作用および臨床効果に関する臨床的データも集積されつつある。まず、米国でみられたのと同様に一過性の発熱はほぼ必発であるが、重篤なものではなく、特に解熱処置なども必要ないことが多かった。また、CTガイド下投与の際の気胸も米国のデータより予測できたものであるが、いずれも軽度であり、臨床的に問題となるものはなかった。さらに、若干名の被験者で局所的な臨床効果がみられQOLの改善が認められた事実は、難治癌の代表である非小細胞肺癌の患者に多少なりとも貢献できたのではないかと思われる。ただ、症例によって効果に差があり、何が決定因子となっているのかを今後基礎研究にフィードバックすることで解析していく必要がある。

現在、多施設共同型の臨床試験に移行中であり、この形態は本邦の遺伝子治療臨床研究においてはじめてのものである。症例の選択からエントリー、実際の治療やその後の管理、またデータ回収から解析、多施設からの安全性・効果判定委員会の設置など、多施設が参加する遺伝子治療臨床研究のシステムを確立することで、今後考案されるであろう多施設共同のプロトコールの作成および申請において有用な前例となると推察される。研究期間中に予定していた24症例すべての治療を完遂することはできなかったが、すでに 10^9 PFUのAd5CMVp53単独投与を行う第1群の症例からCDDPを併用する第2群に移行しており、その症例数は着実に増えてきている。臨床研究で着実に症例数を重ねることで副作用および臨床効果に関する情報を蓄積し、米国でのデータと総合的に解析することでより確実な結果とすることが可能となる。さらに、治療前後の生検材料を用いた分子生物学的解析を行い、基礎研究での結果が臨床的に反映されているかどうかを検討する。

D. 結論

臨床的にもp53遺伝子発現アデノウイルスベクターは比較的安全に腫瘍内投与が可能であり、局所的にはアポトーシスの誘導が機序と考えられる抗腫瘍効果が観察された。

E. 研究発表

1) 論文発表

1. 藤原俊義、田中紀章：ヒト癌におけるp53の異常とその標的遺伝子。 *Surgery Frontier* 5:271-278, 1998.
2. 藤原俊義、片岡正文、田中紀章：肺癌の遺伝子治療。 *肺癌の臨床* 2: 249-258, 1999.
3. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、田中紀章：肺癌の遺伝

子治療。 *外科治療* 80: 1204-1212, 1999.

4. 藤原俊義、田中紀章：遺伝子治療の可能性。 *Pharma Medica* 17: 55-60, 1999.
 5. 藤原俊義、片岡正文、田中紀章：p53遺伝子を用いた癌の遺伝子治療：臨床試験の現況と展望。 *実験医学* 17:2247-2253, 1999.
 6. 藤原俊義、片岡正文、川真田修、田中紀章：肺癌に対する遺伝子治療の現況と問題点。 *日本外科学会雑誌* 100: 749-754, 1999.
 7. 藤原俊義、門脇嘉彦、田中紀章：がん関連遺伝子を標的とした遺伝子治療。 *最新医学* 55: 25-31, 2000.
- 2) 学会発表
1. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、Roth, J. A.、田中紀章：p53遺伝子導入による分子レベルでの癌治療の実際。 *第99回日本外科学会総会(ワークショップ)*、1999.
 2. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、Roth, J. A.、田中紀章：肺癌のp53遺伝子を用いた遺伝子治療。 *第1回外科遺伝子治療研究会(シンポジウム)*、1999.
 3. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、井上文之、中村篤、田中紀章：非小細胞肺癌に対するp53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。 *第58回日本癌学会総会(ワークショップ)*、1999.
 4. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、井上文之、中村篤、田中紀章：肺癌に対するp53遺伝子治療の可能性。 *第37回日本癌治療学会総会(キーシンポジウム)*、1999.
 5. 藤原俊義、片岡正文、中村篤、田中紀章：p53遺伝子を用いた肺癌の遺伝子治療：臨床試験の実際。 *第6回遺伝子治療研究会ワークショップ*、1999.
 6. 藤原俊義、田中紀章：p53遺伝子導入による血管新生の抑制：肺癌の遺伝子治療への応用。 *第12回日本臨床腫瘍研究会(シンポジウム)*、2000.
 7. 藤原俊義、田中紀章：癌関連遺伝子を用いた遺伝子治療：基礎研究から臨床試験の現況まで。 *第4回遺伝子医療研究会(パネルディスカッション)*、2000.
 8. 藤原俊義、田中紀章：肺癌の遺伝子治療-p53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の臨床試験。 *第40回日本呼吸器学会総会(ワークショップ)*、2000.
 9. 藤原俊義、片岡正文、中村篤、田中紀章：p53遺伝子を用いた癌の遺伝子治療：臨床試験の現況と展望。 *第73回日本薬理学会年会(シンポジウム)*、2000.

参考文献

1. 藤原俊義、片岡正文、田中紀章：p53 遺伝子を用いた癌の遺伝子治療：臨床試験の現況と展望. *実験医学* 17:2247-2253, 1999.
2. 藤原俊義、田中紀章：遺伝子治療の可能性. *Pharma Medica* 17: 55-60, 1999.
3. 藤原俊義、片岡正文、片岡和彦、田中紀章：肺癌の遺伝子治療. *外科治療* 80: 1204-1212, 1999.
4. 藤原俊義、片岡正文、川真田修、田中紀章：肺癌に対する遺伝子治療の現況と問題点. *日本外科学会雑誌* 100: 749-754, 1999.
5. Kagawa, S., Fujiwara, T., Hizuta, A., Yasuda, T., Zhang, W. -W., Roth, J. A., Tanaka, N. p53 expression overcomes p21^{WAF1/CIP1}-mediated G1 arrest and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*, 15: 1903-1909, 1997.
6. Fukazawa, T., Fujiwara, T., Morimoto, Y., Shao, J., Nishizaki, M., Kadowaki, Y., Hizuta, A., Owen-Schaub, L. B., Roth, J. A., Tanaka, N. Differential involvement of the CD95 (Fas/APO-1) receptor/ligand system on apoptosis induced by the wild-type p53 gene transfer in human cancer cells. *Oncogene*, 18: 2189-2199, 1999.
7. Nishizaki, M., Fujiwara, T., Tanida, T., Hizuta, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y., Bouvet, M., Roth, J. A., Tanaka, N. Recombinant adenovirus expressing wild-type p53 is antiangiogenic: a proposed mechanism for bystander effect. *Clin. Cancer Res.*, 5: 1015-1023, 1999.
8. Shao, J., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., Fukazawa, T., Waku, T., Itoshima, T., Yamatsuji, T., Nishozaki, M., Roth, J. A., Tanaka, N. Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF- κ B activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene*, 19:726-736, 2000.

199900357A

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
前頁の「参考文献」をご参照ください。