

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

難治固形癌に対する局所的ベクター投与による
遺伝子治療の基礎的・臨床的研究
(H12-ゲノム-005)

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 田中 紀章

平成 13 (2001) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告 難治固形癌に対する局所的ベクター投与による 遺伝子治療の基礎的・臨床的研究	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	5
III. 研究成果の刊行物・別刷	6

難治性固形癌に対する局所的ベクター投与による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 Ad5CMVp53 の局所投与による遺伝子治療を開始した。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 群が設定されており、対象となる被験者は切除不能な p53 遺伝子に異常を持つ原発性または再発性の非小細胞肺癌患者である。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 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。平成 13 年 3 月の段階で、肺癌の遺伝子治療は 4 施設の共同研究の形で進めており、すでに 11 例の被験者への投与を行った。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、早期の第 I 相臨床試験の終了を目指す。「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」は、本邦で初めてのプロトコルであり、正常組織への影響を含めた安全性情報を収集すると同時に、前立腺癌の特異的な腫瘍マーカーである PSA を指標とする臨床効果の観察、さらに基礎的にも免疫学的関与についても検討する。平成 13 年 3 月 27 日に最初の患者に対する治療を開始し、現在のところ順調に経過している。

分担研究者：

衛藤義勝（慈恵会医科大学・DNA 医学研究所）
加藤治文（東京医科大学・外科学第一講座）
貫和敏博（東北大学・加齢医学研究所）
公文裕己（岡山大学医学部・泌尿器科学講座）
吉村邦彦（慈恵会医科大学・DNA 医学研究所）
中村治彦（東京医科大学・外科学第一講座）
西條康夫（東北大学医学部・附属病院）
那須保友（岡山大学医学部・附属病院）
藤原俊義（岡山大学医学部・附属病院）

A. 研究目的

本研究の目的は、切除不能な非小細胞肺癌症例における正常な p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター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、および切除不能な局所進行前立腺癌症例における HSV-tK 遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内局所投与とガンシクロビルの全身投与の安全性と治療効果を検討することである。臨床的には腫瘍縮小などの局所効果が期待され、閉塞性肺炎の改善や排尿困難の軽減、疼痛の緩解などの QOL (quality of life) の向上も認められる可能性がある。さらに、これらの臨床研究の効果を期待する上での根拠となる基礎研究を進めることで、難治固形癌の代表である非小細胞肺癌、前立腺癌の標準的治療の確立に寄与し、新しい治療戦略を開発する上での breakthrough となる可能性がある。

B. 研究方法

1) p53 により活性化されるアポトーシスのメカニズムを解析し、より効果的なアポトーシス誘導の可能性を検討する。また、ヌードマウスとヒト癌細胞を用いた動物モデルにおいて、p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターの腫瘍内投与により観察される炎症細胞浸潤のメカニズムを解析し、そのエフェクター細胞を同定する。さらに、p53 を安定化させる作用を有する p14/ARF 遺伝子発現アデノウイルスベクターやその ARF 発現を活性化する転写因子 E2F-1 遺伝子発現アデノウイルスベクターとの併用効果、あるいは CDDP、5-FU、ADM、TXT、CPT-11、VP-16 などの抗癌剤との併用効果を検討し、p53 の抗腫瘍効果を選択的に増強する strategy を確立する。2) 岡山大学単独で現在進行中の「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を用いた遺伝子治療臨床研究」を、岡山大学、慈恵会医科大学、東京医科大学、東北大学加齢医学研究所の 4 施設の共同研究へと移行し、被験者の選定から治療の実施、さらにデータの解析までをシステム化することにより臨床試験の早期完了を目指す。被験者は切除不能の非小細胞肺癌患者で、気管支鏡下に、あるいはコンピュータド・トモグラフィ(CT)ガイド下穿刺により腫瘍にベクター液を注入される。すでに岡山大学で 10^9 PFU レベルが終了しているため、 10^{10} PFU のベクター単独投与を行う第 1 群からベクターとシスプラチンを併用する第 2 群へ

と進め、 10^{11} PFU まで 18 症例に試みる。各レベル、各群で安全性および治療効果を観察し、生検材料を用いた組織学的、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。また、岡山大学で計画中の「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」では、 10^9 PFU のベクターを初期量とし、ベクター投与後 24 時間から 5 mg/kg のガンシクロビルを 2 回/日、14 日間全身投与する。ベクターは 10 倍ずつ増量して 10^{11} PFU まで検討し、目標症例数は 15 例とする。(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 に乗っ取って作成されており、治療遺伝子やベクターに関しても図を多用してできるだけ平易な言葉で説明している。また、米国で進行中の臨床試験の安全性や治療効果の情報も網羅されている。本研究の「実施計画書」および「説明と同意書」は、各施設の遺伝子治療臨床研究審査委員会で承認されており、また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。

C. 研究結果及び考察

p53 遺伝子導入がアポトーシス抑制性の転写因子である NF- κ B の核内移行を阻害することで、その活性を抑え、アポトーシスの感受性をあげていることを証明した。また、別のアポトーシス抑制分子である FLIP の発現を転写非依存性に抑制することで、やはりアポトーシスを促進していることを明らかにした。さらに、p53 による CD95 リガンドの発現増強は、腫瘍組織への好中球浸潤を誘導し、遺伝子導入されなかった腫瘍細胞へも好中球による抗腫瘍効果が観察された。これらの知見は、p53 によるアポトーシス誘導機構の多様性を示唆しており、p53 遺伝子治療の臨床効果を期待する上での重要な根拠となりうる。また、E2F-1 あるいは ARF/p14 遺伝子を発現するアデノウイルスベクターが、p53 蛋白質を安定化することで p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターの効果を増強することを明らかにし、さらにシスプラチン以外の各種抗癌剤との相乗効果も確認された。2) 「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、平成 12 年 4 月に多施設共同の臨床試験に移行しており、平成 13 年 3 月の時点で 11 例の症例に対して p53 遺伝子導入単独あるいはシスプラチン併用で治療が行われた(岡山大学 8 例、東北大学、慈恵会医大、東京医大、各 1 例)。岡山大学で行われた 10^9 PFU 濃度の Ad5CMVp53 ベクター単独投与 3 例およびシスプラチン併用 3 例、計 6 例の有害事象、臨床効果に関する情報は以下の通りである。6 例の患者に Ad5CMVp53 ベクターが計 42 回投与され、

37 回(88.1%)でグレード 1 あるいは 2 の発熱が認められた。その他、シスプラチンを併用した第 2 群では、嘔気、嘔吐、顆粒球減少、貧血などシスプラチン由来と思われる副作用がみられたが、いずれも軽度のものがほとんどであった。CT ガイド下投与の際に 3 回気胸が認められたが、いずれも保存的に軽快した。臨床的には第 1 例目の症例がもっともよく反応しており、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 週間後には腫瘍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。症状としても、治療前に激しくみられた血痰が止まった。治療開始から 1 年間、計 14 回治療を行ったが、最終的には局所の再発により治療を中止した。左肺下葉原発の扁平上皮癌を持つ第 2 例目の症例は、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、QOL の改善には役立ったと考えられる。しかし、最終的には局所効果は持続していたが、肋骨への転移が出現し、治療を終了した。第 4 例目の症例は、左肺上葉に腺癌を認め、両側肺内に微小肺内転移があるため、シスプラチンを併用した p53 遺伝子治療を行った。治療期間中腫瘍サイズは stable であり、腫瘍マーカー CEA の値が低下してきた。計 10 回治療を行ったが、最終的にはシスプラチンに由来すると思われる末梢神経炎のため治療を終了した。治療開始後、激しかった咳が改善し、日常生活が良好におくれるようになった。初期 6 例の臨床効果は、PR (partial response) 1 例、SD (stable disease) 4 例、PD (progressive disease) 1 例であり、1 例の PR 症例と 2 例の SD 症例、計 3 例では QOL の改善などの臨床的有用性が確認された。また、Ad5CMVp53 の生体内分布に関するデータも収集できており、喀痰内への排出および血漿中での検出なども明らかになったが、それに由来すると思われる有害事象はみられていない。さらに、初回投与後に血清中の抗アデノウイルス抗体価の上昇が認められたが、それによる臨床効果の減弱は観察されなかった。「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」は、平成 13 年 3 月にペイラー医科大学からの臨床用ベクターの輸入を行い、受け入れ試験の後に、3 月 27 日に第 1 例目の症例への投与が施行された。現在までのところ治療は順調に進んでおり、重篤な有害事象も認められていない。

表1 本邦における p53遺伝子治療第 相臨床試験での有害事象

有害事象	サイクル数	グレード 1	グレード 2	グレード 3	グレード 4	計
発熱	42	27 (64.3%)	10 (23.8%)	0	0	37 (88.1%)
嘔気	42	15 (35.7%)	0	0	0	15 (35.7%)
嘔吐	42	7 (16.7%)	0	0	0	7 (16.7%)
顆粒球減少	42	2 (4.8%)	1 (2.4%)	2 (4.8%)	1 (2.4%)	6 (14.3%)
血痰	42	4 (9.5%)	0	0	0	4 (9.5%)
気胸	42	3 (7.1%)	0	0	0	3 (7.1%)
食欲不振	42	3 (7.1%)	0	0	0	3 (7.1%)
胸痛	42	3 (7.1%)	0	0	0	3 (7.1%)
背部痛	42	2 (4.8%)	0	0	0	2 (4.8%)
穿刺部痛	42	1 (2.4%)	0	0	0	1 (2.4%)
食欲減退	42	1 (2.4%)	0	0	0	1 (2.4%)
肺炎	42	1 (2.4%)	0	0	0	1 (2.4%)
貧血	42	0	0	1 (2.4%)	0	1 (2.4%)

肺癌に対する p53 遺伝子治療は、多施設共同型の臨床試験として進行中であり、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できたことで、今後考案されるであろう多施設共同のプロトコ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。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。しかし、症例によって臨床効果に差があり、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。治療前後の生検材料を用いた分子生物学的解析を行い、そのメカニズムについて検討して行く予定である。また、前立腺癌に対する HSV-tK/ガンシクロビル遺伝子治療は、本邦ではじめての自殺遺伝子治療であり、今後症例を重ねその安全性および有効性を確かめた上で、他の固形腫瘍への応用も可能になると期待される。

D. 結論

アデノウイルスベクターを用いた局所的な遺伝子治療は比較的安全に施行可能であり、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. Shao, J., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., et al.: 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.

2. Itoshima, T., Fujiwara, T., Waku, T., et al.: Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 downregulation. *Clin. Cancer Res.*, 6, 2851-2859, 2000.
3. Waku, T., Fujiwara, T., Shao, J., et al.: Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer. *J. Immunol.*, 165: 5884-5890, 2000.
4. Fujiwara, T., Kataoka, M., Tanaka, N. Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer. *Mol. Urol.*, 4: 51-54, 2000.
6. Inoue, A., Narumi, K., Matsubara, N., et al.: Combined administration of wild-type p53 adenoviral vector and anti-cancer drugs enhances G1 arrest in human lung cancer cells irrespective of the status of p53 gene. *Cancer Letter* 157: 105-112, 2000.
7. Tanaka, M., Saijo, Y., Sato, G., et al: Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma. *Cancer Gene Ther.*, 7: 1481-1490, 2000.
8. 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.
9. 藤原俊義、田中紀章：癌の遺伝子治療. *Bioindustry* 17: 5-14、2000.
10. 藤原俊義、片岡正文、田中紀章：p53 遺伝子を用いた癌の分子療法の現況と展望. *Biotherapy* 14: 622-628、2000.
11. 藤原俊義、西崎正彦、田中紀章：p53 遺伝子導入による血管新生抑制：肺癌遺伝子治療への応用. *癌と化学療法* 27: 1217-1224、2000.
12. 藤原俊義、田中紀章：p53 遺伝子を用いた癌遺伝子治療の基礎. *G. I. Research* 8: 413-421、2000.
13. 藤原俊義、田中紀章：呼吸器疾患の遺伝子治療。「先端医療シリーズ10・呼吸器疾患-最新医療と21世紀への展望-」(末舛恵一、原澤道美、人見滋樹、監修) pp26-35、先端医療技術研究所、東京、2001.

2) 学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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[依頼]）、2000.
4. 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.
5. 藤原俊義、門脇嘉彦、香川俊輔、片岡正文、田中紀章：癌に対する遺伝子治療の現況と展望 -p53 遺伝子治療から新しい分化誘導療法まで-. 第 100 回日本外科学会総会（シンポジウム）、2000.
6. Fujiwara, T., Kataoka, M., Nakamura, A., Tanaka, N. Adenoviral p53 [RPR/INGN 201] gene therapy for non-small cell lung cancer: a preliminary report of phase I trial in Japan. 第 6 回日本遺伝子治療学会総会（プレナリーセッション）、2000.
7. 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：遺伝子製剤としての可能性. 第 59 回日本癌学会総会（パネルディスカッション・原点[依頼]）、2000.
8. 藤原俊義、片岡正文、田中紀章：癌関連遺伝子の発現制御による遺伝子療法の可能性. 第 13 回日本バイオセラピー学会学術集会総会（シンポジウム）、2000.
9. 藤原俊義、田中紀章：p53 遺伝子を用いた肺癌の遺伝子治療：癌特異的に作用する遺伝子製剤としての可能性. 第 41 回日本癌呼吸器学会総会（シンポジウム）、2001.

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤原俊義、 田中紀章	呼吸器疾患の 遺伝子治療.	末舩恵一、 原澤道美、 人見滋樹	先端医療シリーズ 10 呼吸器疾患：最新医療 と 21 世紀への展望	先端医療技 術研究所	東京	2001 年	pp26-35

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shao, J., Fujiwara, T., Kadowaki, Y., et al.	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
Itoshima, T., Fujiwara, T., Waku, T., et al.	Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 downregulation.	Clin. Cancer Res.	6	2851-2859	2000
Waku, T., Fujiwara, T., Shao, J., et al.	Contribution of CD95 ligand-induced neutrophil infiltration to the bystander effect in p53 gene therapy for human cancer.	J. Immunol.	165	5884-5890	2000
Fujiwara, T., Kataoka, M., Tanaka, N.	Adenovirus-mediated p53 gene therapy for human cancer.	Mol. Urol.	4	51-54	2000
Inoue, A., Narumi, K., Matsubara, N., et al.	Combined administration of wild-type p53 adenoviral vector and anti-cancer drugs enhances G1 arrest in human lung cancer cells irrespective of the status of p53 gene.	Cancer Letter	157	105-112	2000
Tanaka, M., Saijo, Y., Sato, G., et al.	Induction of antitumor immunity by combined immunogene therapy using IL-2 and IL-12 in low antigenic Lewis lung carcinoma.	Cancer Gene Ther.	7	5-14	2000
藤原俊義、片岡正文、 田中紀章	p53 遺伝子を用いた癌の分子療法の 現況と展望.	Biotherapy	14	622-628	2000
藤原俊義、西崎正彦、 田中紀章	p53 遺伝子導入による血管新生抑 制：肺癌遺伝子治療への応用.	癌と化学療法	27	1217-1224	2000
藤原俊義、田中紀章	p53 遺伝子を用いた癌遺伝子治療の 基礎.	G. I. Research	8	413-421	2000

20000386

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
前ページの「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

