

200/0435

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

乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための
耐性遺伝子治療の臨床研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

財団法人癌研究会 癌化学療法センター
主任研究者 相羽 恵介

平成14(2002)年4月

目 次

I. 総括研究報告書	
乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高める ための耐性遺伝子治療の臨床研究	3
相羽 恵介	
II 分担研究報告	
1. 乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高める ための耐性遺伝子治療の臨床研究	11
杉本 芳一	
2. 乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高める ための耐性遺伝子治療の臨床研究	17
堀越 昇	
3. 非ホジキンリンパ腫（NHL）における MDR 遺伝子 治療についての基礎的研究	20
高橋 俊二	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	23
IV. 研究成果の刊行物・別刷	27

乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究

主任研究者 相羽 恵介 財団法人癌研究会癌化学療法センター臨床部 副部長

本研究の目的は、抗癌剤多剤耐性遺伝子を乳癌患者の造血幹細胞に導入して抗癌剤耐性とし、抗癌剤による骨髄抑制を軽減させる骨髄保護効果を目指した耐性遺伝子治療の研究開発を行うことである。平成12年度から本臨床研究を開始し、現在再発進行乳癌患者2症例において本臨床研究計画が実施、継続研究されている。2症例ともに末梢血単核細胞の採取と一部CD34陽性細胞への濃縮分離を行い、この細胞群に対して耐性遺伝子が導入された。そして大量化学療法施行後に耐性遺伝子導入細胞を末梢血単核細胞とともに移植した。症例1に対しては平成13年4月に遺伝子導入細胞の移植が行われた。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は2200万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の7%に相当した。移植後7日目より患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞が検出されるようになり、移植したMDR1遺伝子導入細胞の生着が確認された。移植後7日目から15日目にかけて、末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。その後は患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は1%から2%程度になり、この割合は患者の造血機能が正常に回復するまでの約2ヶ月間にわたって維持されていた。平成13年6月よりこの患者にdocetaxel治療を開始した。患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞はdocetaxel投与により一過性の上昇を繰り返し、P-糖蛋白陽性細胞が患者体内で抗癌剤耐性細胞として機能していることが推察された。また、P-糖蛋白陽性細胞の割合も徐々に増加し、平成13年末にはほぼ10%に到達した。5コース終了時には大量化学療法後にわずかに認められていた肺の遺残病変は消失したため、CR（著効）と判断した。現在10コースにて後療法を完了しているが、この間docetaxelによる骨髄抑制が漸増悪するという所見は認められず、一定の効果が示唆された。症例2に対しても平成13年10月にMDR1遺伝子導入細胞の移植が行われた。症例2でも患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞が検出され、移植したMDR1遺伝子導入細胞の生着が確認された。症例2は今後docetaxelによる後療法を開始する予定である。2症例ともに現在迄の臨床研究経過中に重篤な副作用は認められず、安全に施行し得た。以上より、本研究は安全かつ着実に遂行されている。本研究はMDR1遺伝子治療を受けた患者の末梢白血球におけるP-糖蛋白の発現をFACSにより直接検出した世界で最初の研究であり、遺伝子導入細胞の消長について、詳細な解析が続けられている。

また、非ホジキンリンパ腫（NHL）に対するMDR1遺伝子治療の適応の有無についての基礎的検討として、1) NHL患者の末梢血からのCD34陽性細胞純化、2) 純化CD34陽性細胞における微小残存病変（Minimal residual disease, MRD）、3) 純化CD34陽性細胞へのMDR1遺伝子導入についての検討を行った。まず末梢血幹細胞採取、MRD測定の基礎的検討を行った。IVAC+G-CSFによる採取については1回で $2.63 \pm 0.77 \times 10^8$ cellsと十分量が採取できることが明らかになり、副作用も問題なかった。MRDの測定については、リンパ腫細胞の検体を用いて1) follicular lymphomaにおけるJH/bcl-2 rearrangement、2) mantle cell lymphomaにおけるJH/bcl-1 rearrangementのnested PCRによるMRD検出についてはほぼ確立した。さらに臨床研究を開始し、第1例目の末梢血幹細胞採取—CD34陽性細胞精製—MRD測定を行った。

杉本芳一 (財) 癌研究会癌化学療法センター
分子生物治療研究部 部長
堀越 昇 (財) 癌研究会癌化学療法センター
所長室 医員
高橋俊二 (財) 癌研究会癌化学療法センター
臨床部 研究員

A. 研究目的

本研究の目的は、抗癌剤耐性遺伝子を癌患者の正常血液細胞に導入して抗癌剤耐性とし、抗癌剤による骨髄抑制を軽減させる耐性遺伝子治療法の研究開発を行うことである。本研究では、「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を行い、その安全性と有効性を検証する。本遺伝子治療では、進行再発乳癌患者より採取した末梢血細胞より CD34 陽性細胞を分離し、これにヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を HaMDR レトロウイルスを用いて導入する。この遺伝子導入細胞を患者に戻し移植し、患者体内に抗癌剤に耐性な血液細胞を生着させる。抗癌剤に耐性な血液細胞が正常に機能すれば、その患者では、その後の化学療法施行に付随する骨髄抑制が軽減されると期待される。すなわち、本治療により副作用軽減に基づく患者の QOL の向上と抗癌剤投与可能量の増大による治療効果の改善が期待される。

本研究では、この臨床研究を推進すると共に、次世代のベクターとして、MDR1 遺伝子と第 2 の遺伝子を共発現させる bicistronic vector の研究開発を行う。さらにこれをヒト造血幹細胞に導入して遺伝子導入効率の向上、遺伝子導入細胞の選択的増幅を図る。

抗癌剤の耐性に関与する種々の ABC 輸送体の機能解析を行う。MDR1、MRP、BCRP などの ABC 輸送体遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて種々の培養細胞およびヒト造血幹細胞に導入して、細胞の抗癌剤耐性化および遺伝子発現が細胞の正常機能に与える影響について解析する。特に、導入遺伝子の発現が正常血球細胞の分化増殖とアポトーシスに与える影響について詳細に解析する。

MDR1 遺伝子治療は非ホジキンリンパ腫 (NHL) に対しても適用されうると考えるが、その為の基礎研究を行う。

MDR1 遺伝子治療を NHL の治療に応用する場合の第 1 の問題は、悪性リンパ腫細胞が乳癌細胞よりも高頻度に骨髄および末梢血中に混入しうること、これに MDR1 遺伝子を導入することによって治療耐性リンパ腫の再発が危惧される。一般の悪性リンパ腫に対する自己造血幹細胞移植においても悪性細胞の幹細胞への混入が問題になり、それを克服する手段として、CD34 陽性細胞の精製が試みられている。海外での pilot study としては、Devereux らが再発 NHL 患者からの末梢血幹細胞から CD34 陽性細胞を精製後 MDR1 遺伝子を導入して大量化学療法後末梢血幹細胞移植を行っているが、移植後 MDR1 発現細胞を

検出することが出来なかった。しかし彼らの遺伝子導入方法は全くサイトカイン等による幹細胞刺激を行っておらず、導入効率は劣悪と考えられ、我々の方法ではこれを overcome する事は可能と考えられる。

そこで我々は、NHL に対する MDR1 遺伝子治療の feasibility の検討のため、リンパ腫患者末梢血細胞からの CD34 陽性細胞の精製を行い、微小残存病変 (minimal residual diseases, MRD) の除去の効率、さらに MDR1 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞に MRD が残存するか否かについて検討することを目的として、当研究を行う。

B. 研究方法

寛解導入化学療法が有効であった再発あるいは進行乳癌症例の内、インフォームド・コンセントが得られた症例に対し、本研究参加可否の適格性を審査する。適格の場合は本研究の対象症例として登録する。cyclophosphamide に G-CSF を併用することにより造血幹細胞の動員をはかり、対象症例より末梢血単核細胞を連日 3 日間にわたり採取する。この操作を 2 コースから 3 コース施行し、採取した末梢血単核球の約 1/3 量から CD34 抗原陽性細胞を分離濃縮する。この細胞群を標的として、HaMDR レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行う。残りの約 2/3 量とともに遺伝子導入細胞は使用時まで凍結保存しておく。その後患者に cyclophosphamide, thiotepa, carboplatin より成る大量化学療法を施行する。引き続き凍結保存しておいた MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を未処理の末梢血単核細胞とともに患者に移植する。その後、骨髄が再構築されて末梢血所見が正常化し、患者の一般状態が完全に回復した後、6 コースの docetaxel の投与を行う。docetaxel の投与量は通常量の 50% から開始し、順次増量して 100% 量まで増加させる。この治療中、経時的に患者の末梢血を採取し、血液細胞での MDR1 遺伝子の組み込みと発現を PCR および FACS を用いて検討する。

MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を ex vivo で分化増殖させる目的で、ヒト骨髄細胞由来の stroma cell にテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつ stroma cell の mixed population を作成した。この hTERT 陽性 stroma cell を plate 上に培養した後に X 線照射を行って feeder cell とし、この上でヒト CD34 抗原陽性細胞の培養を行った。さらに、この hTERT 遺伝子導入 stroma cell のクローニングを行い、安定な細胞株の樹立を行った。

NHLに対するMDR1遺伝子治療のfeasibilityの検討のため、リンパ腫患者末梢血細胞からのCD34陽性細胞の精製を行い、微小残存病変(minimal residual diseases, MRD)の除去の効率、さらにMDR1遺伝子を導入したCD34陽性細胞にMRDが残存するか否かについて検討する。組織学的に確認されたNHL stage II, III, IVで、大量化学療法+末梢血幹細胞移植の対象になる病態の症例を対象とする。患者にIVAC (Ifomide 1500 mg/m² days 1-3, AraC 1000 mg/m² × 2 days 1-2, Etoposide 60 mg/m² days 1-3)あるいはCHOP/high CHOP、その他の治療(DHAP、ICE等)を施行後、G-CSF 200 µg/m² × 2 s.c. またはG-CSF 400 µg/m² × 1 s.c.を投与し、末梢血幹細胞を採取する。採取した幹細胞のCD34陽性細胞数をFACSにて測定し、1日目あるいは2日目までに十分なCD34陽性細胞(2.0 × 10⁶/kg)が採取できたかを確認する。十分なCD34陽性細胞が採取できたことを確認後、2日目あるいは3日目に採取した末梢血をCD34陽性細胞純化に使用する。精製した細胞を患者に戻すことはしない。磁気細胞分離システム(Isoplex; Baxter)を用い、末梢血単核細胞と抗CD34モノクローナル抗体を反応させ、CD34陽性細胞を回収する。CD34精製の効率(陽性率、回収率)をFACS、コロニーアッセイで解析するとともに、このCD34陽性細胞画分へのlymphoma cellへの混入、遺伝子導入の効率について検討する。

精製前の患者末梢血単核細胞及び精製後のCD34陽性細胞を用い、MRDの検討を行う。あらかじめ保存してあるリンパ腫細胞(リンパ節、骨髄、血液等)を用いFISH、surface marker、rearrangement等の検討を行っておく。実際のMRDの検討はPCRで行い、FISH、surface markerを補助的に用いる。i) follicular lymphoma: t(14;18) rearrangementが明らかな症例では、JH/bcl-2 nested PCRにてMRDを検出する。ii) mantle cell lymphoma: t(11;14) rearrangementが明らかな症例では、bcl-1 (cyclin D1)/JH nested PCRにてMRDを検出する。iii) diffuse large B cell lymphoma and other B cell lymphoma: Bリンパ腫で、特定のrearrangementが明かでない症例では、VDJ rearrangementをPCRにてcloningし、clone-specific primerを作成してPCRにてMRDを検出する。iv) T cell lymphoma: Tリンパ腫では、TCR rearrangementをPCRにてcloningし、clone-specific primerを作成してPCRにてMRDを検出する。

現在癌研で施行中の「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺

伝子治療の臨床研究」のプロトコールに従い、CD34陽性細胞へのMDR1遺伝子導入を行い、その効率、効果を評価する。更に遺伝子導入された細胞におけるMRDの有無、増殖可能性を検討する。

(倫理面への配慮)

本臨床研究の対象患者へのインフォームド・コンセントの取得に際しては、国の審査委員会で承認された説明文を用いる。この説明文には、患者の自発的意思による研究への参加および中止・中断、遺伝子治療のメリットとデメリット、予想される副作用とその対策、代替療法と予測される効果、秘密保持、などについても詳細に記載されている。

また、遺伝子治療以外の、乳癌患者あるいは悪性リンパ腫患者の末梢血幹細胞および骨髄細胞の研究用使用についても、あらかじめインフォームド・コンセントをとる。

実験に使用するマウスなどに対しては、癌化学療法センター実験動物使用規定に従い、必要最小限の動物を用いることとし、研究においては動物に苦痛を与えないように配慮する。

C. 研究結果

厚生省(現厚生労働省)、文部省(現文部科学省)による実施計画の承認を受けて、平成12年度より本研究を開始した。平成13年3月迄に2症例が登録され、研究が現在進行している。

症例1は、右乳癌と診断され、右乳房切除術の既往歴を有していたが、最近になって両肺に多発腫瘍を認め、気管支鏡下経気管支吸引針生検にて乳癌由来の転移性肺癌と診断された。癌研にてmodified FAC療法を3コース施行したところ、腫瘍マーカーが正常化し、肺CT検査にて両肺転移巣はPRと評価された。さらに寛解導入化学療法を継続し、7コース終了後、病変は80%縮小しPRと評価され、インフォームド・コンセントを得て適合性の検査を行い、本研究に登録された。審査委員会の承認後、cyclophosphamideとG-CSFの併用にて末梢血幹細胞動員し、第1コース目の末梢血幹細胞採取を施行した。第1日目はCD34陽性細胞13.6 × 10⁷個を採取した。第2日目はCD34陽性細胞13.2 × 10⁷個を採取し、この細胞を標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。第3日目はCD34陽性細胞4.3 × 10⁷個を採取した。次いで、第2コース目の末梢血幹細胞採取のためcyclophosphamideとG-CSFを投与し、末梢血幹細胞動員と採取を行った。第1日目はCD34陽性細胞6.6 × 10⁷個を採取し、この細胞群を標的とし

て第2回目のMDR1遺伝子導入を施行した。第2日目はCD34陽性細胞 7.7×10^7 個を採取した。第3日目はCD34陽性細胞 4.6×10^7 個を採取した。その後骨髓単核細胞 1×10^{10} 個を採取の後、cyclophosphamide、thiotepa、carboplatinの3剤併用による大量化学療法を施行した。

大量化学療法の3日後に、MDR1遺伝子導入細胞の移植を施行した。移植は平成13年4月4日に行われた。患者に移植された有核細胞数は520億個で、このうちCD34陽性細胞は3億3000万個であった。移植された3億3000万個のCD34陽性細胞のうち、未処理で患者に戻された細胞が2億1000万個、遺伝子導入のために培養された細胞が1億2000万個であった。本プロトコールでは患者に移植するCD34陽性細胞数を体重1kgあたりCD34陽性細胞200万個と規定しているが、この患者の場合は未処理CD34陽性細胞だけでこの基準をはるかに上回っていた。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は2200万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の7%に相当した。

患者の末梢白血球数はCD34陽性細胞移植後7日後に増加を始め、12日目に1万を越えた。また血小板数もCD34陽性細胞移植後9日後に増加を始め、15日目に10万を越えた。これにより移植した細胞の生着と増殖が確認された。移植後7日目より患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞がFACSで検出されるようになり、PCRの結果と合わせて、移植したMDR1遺伝子導入細胞が患者末梢血中存在することが確認された。移植後7日目から15日目にかけて、末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。移植後12日目には末梢白血球数が $14700/\mu\text{l}$ に達したが、この時のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3.9%であり、これはP-糖蛋白陽性細胞数にして $573/\mu\text{l}$ になる。この時の患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の総数は20億個以上と計算され、移植したP-糖蛋白陽性細胞は100倍以上に増えていることが推察された。その後の2ヶ月間で患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は約1%に低下した。

大量化学療法によって肺病変は更に軽快(near CR)するも依然わずかながら残存病変が認められた。このため骨髓機能の回復を待ち、末梢好中球数が $1925/\mu\text{l}$ と回復・安定化が認められたため、docetaxelによる後療法を通常量の50% ($30\text{mg}/\text{m}^2$) から慎重に開始した。docetaxel 1コース目開始時の好中球数(ANC) $1925/\mu\text{l}$ 、白血球数(WBC) $2500/\mu\text{l}$ 、最低値はANC 850、WBC 1700であった。P-

糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel投与前は1.4%であったがdocetaxel投与8日後に2.2%とわずかな増加を示した。しかしdocetaxel投与後13日目にはP-糖蛋白陽性細胞の割合は0.9%に低下し、この上昇は一過性のものであった。2コース目はdocetaxel (TXT) を75% ($45\text{mg}/\text{m}^2$) に増量して投与したが、最低値はANC 335、WBC 930とグレード4の好中球減少、白血球減少が認められたため、G-CSFによる支持療法を3日間施行した。患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel投与前の1%から増加を続け、docetaxel投与11日後に3.2%になった。これは、docetaxel投与により患者生体内でP-糖蛋白陽性細胞が選択的に増幅されたことを示している。3コース目も75%量で施行したが、ANC 239、WBC 570と同様のグレード4の副作用が認められたため、G-CSFを投与した。その後も同様の経過であり、プロトコールの規定に従い原則として3週毎に同療法を反復継続した。4コース目の最低値はANC 477、WBC 900、5コース目はANC 252、WBC 600であった。そして平成13年10月1日、5コース後には胸部CTにて肺病変が不明瞭化したため、臨床的にCRと判断した。その後は寛解地固め目的にてプロトコールに従い、2コース目と同様の投与量にてdocetaxel療法を継続施行した。6コース目の最低値は、ANC 272、WBC 680、7コース目ANC 285、WBC 920、8コース目ANC 353、WBC 820、9コース目ANC 492、WBC 1200、10コース目ANC 407、WBC 1100であった。経過中その他の副作用として、グレード1の末梢神経障害、筋肉痛が認められた。今後は病変及び造血機能の再評価を予定している。

現在迄にこの患者に10コースのdocetaxel治療を行ったが、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞はdocetaxel投与により一過性の上昇を繰り返した。Docetaxel投与2週間後には患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合はまた低下するが、4コース目のdocetaxel投与からはP-糖蛋白陽性細胞の割合が最低でも3%を下回ることがなくなり、P-糖蛋白陽性細胞の造血細胞レベルでの増幅が推察された。また、7コース目のdocetaxel投与後と8コース目のdocetaxel投与後には、患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合は一時的ではあるが10%を越えた。本研究は、MDR1遺伝子治療を受けた患者の末梢白血球におけるP-糖蛋白の発現をFACSにより直接検出した世界で最初の研究である。本研究で、docetaxel投与後にP-糖蛋白陽性細胞が一過性に増幅されるという現象が初めて示された。

症例2は、原発性乳癌のため乳房切除術を施行されUFTによる後療法の既往を有するが、その後鎖上リンパ節、内胸リンパ節の腫脹を認め、生検により乳癌再発と診断された。癌研にて5-fluorouracil、adriamycin、cyclophosphamideによる寛解導入化学療法を行い、6コース終了時にCTにより鎖上リンパ節はCR、内胸リンパ節はPRと判定された。その後、docetaxel、tomoxifen、放射線治療を順次施行し、本研究の登録時には、鎖上リンパ節CR、内胸リンパ節near CRと評価された。その後本研究のインフォームド・コンセントを取得し、施設内審査委員会の承認を経て対象患者として登録された。最初にcyclophosphamideとG-CSFの併用により末梢血幹細胞を動員し、第1コース目の末梢血幹細胞採取を3日間施行した。採取第1日目はCD34陽性細胞 2.2×10^7 個採取した。第2日目はCD34陽性細胞を 1.9×10^7 個採取、これを標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。第3日目はCD34陽性細胞 2.1×10^7 個を採取した。いずれも液体窒素下凍結保存とした。その後、骨髓機能の回復を待ち、cyclophosphamideとG-CSFの併用により第2コース目の末梢血幹細胞採取を3日間施行した。第1日目はCD34陽性細胞を 4.2×10^7 個採取、第2日目はCD34陽性細胞を 2.5×10^7 個採取、第3日目はCD34陽性細胞を 0.7×10^7 個採取した。1日目の細胞をMDR1遺伝子導入に用いた。第3コース目もcyclophosphamideとG-CSFの併用により末梢血幹細胞採取を3日間施行した。第1日目はCD34陽性細胞を 7.3×10^7 個採取、第2日目はCD34陽性細胞を 1.0×10^7 個採取、第3日目はCD34陽性細胞を 0.8×10^7 個採取した。第1日目の細胞を標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。その後骨髓単核細胞 3×10^9 個を採取の後、cyclophosphamide、thiotepa、carboplatinの3剤併用による大量化学療法を施行した。

大量化学療法3日後にMDR1遺伝子導入細胞の移植を施行した。患者に移植された有核細胞数は900億個で、このうちCD34陽性細胞は1億5000万個であった。このCD34陽性細胞数は体重1kgあたり約300万個であり、体重1kgあたりCD34陽性細胞200万個という移植の基準を満たしていた。移植された1億5000万個のCD34陽性細胞のうち、未処理で患者に戻された細胞が1億1000万個、遺伝子導入のために培養された細胞が3700万個であった。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は540万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の3.6%に相当した。

患者の末梢白血球数はCD34陽性細胞移植

後9日後に増加を始め、12日目に3700となった。その後19日目に1万を越えた。また血小板数もCD34陽性細胞移植後9日後に増加を始め、19日目に10万を越えた。これにより移植した細胞の生着と増殖が確認された。移植後に患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞がFACSで検出されるようになり、PCRの結果と合わせて、移植したMDR1遺伝子導入細胞が患者末梢血に存在することが確認された。移植後5日目から14日目にかけて、末梢白血球の約3%の細胞がP-糖蛋白陽性を示した。この患者では、病変はnear CR以上の軽快状態を維持しており、今後docetaxelによる後療法を開始する予定である。

これまでのところ、遺伝子治療を受けた2例の患者で遺伝子導入細胞の移植によると考えられる有害反応はない。患者の病状は安定しており、腫瘍の増悪も見られていない。以上より、本遺伝子治療臨床研究は、安全に遂行されている。

MDR1遺伝子導入CD34抗原陽性細胞をex vivoで分化増殖させる目的で、ヒト骨髓細胞由来のstroma cellにテロメラーゼ遺伝子(hTERT)をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつstroma cellのmixed populationを作成した。このhTERT陽性stroma cellをplate上に培養した後にX線照射を行ってfeeder cellとし、この上でヒトCD34抗原陽性細胞の培養を行った。Feeder cellのない条件下ではCD34抗原陽性細胞はGM系の細胞への分化をするため、CD34抗原陽性細胞の数としては3倍程度にしか増えないが、hTERT遺伝子導入feeder cellの存在下ではCD34抗原陽性細胞は3週間の培養で約50倍に増幅された。次に、このhTERT遺伝子導入stroma cellのクローニングを行い、これまでに約50個のクローンを得た。現在はこれらクローンの増殖を待っている段階であるが、十分な細胞が得られた後に、CD34陽性細胞の増幅に最も有効なクローンを検索する予定である。

悪性リンパ腫患者の末梢血幹細胞採取については、IVAC療法等の化学療法およびG-CSFを用いたClinical Practiceあるいは別の臨床研究としてデータが蓄積されており、IVAC+G-CSFによる採取については1回で $2.63 \pm 0.77 \times 10^8$ cellsと十分量が採取できることが明らかになった。

MRDの測定については、リンパ腫細胞の検体を用いて1) follicular lymphomaにおけるJH/bcl-2 rearrangement、2) mantle cell lymphomaにおけるJH/bcl-1 rearrangementのnested PCRによるMRD検出についてはほぼ

確立した。現在、B cell lymphoma のVDJ rearrangement の cloning-PCR による検出について検討中である。

平成13年に本研究のプロトコールが財団法人癌研究会附属病院倫理審査委員会において承認され、平成13年12月から臨床研究が開始された。現在1例が末梢血幹細胞採取—CD34陽性細胞精製—MRDの検討まで完了している。第1例はmantle cell lymphomaの再発患者(全身リンパ節、口蓋、胃、骨髄)で、IVAC療法を2コース施行し、CRに入った。IVAC第1コース目にG-CSFとの併用にてDay15から幹細胞採取を開始し、第1日目にて十分量(4.4×10^8 cells, 8.8×10^6 cells/kg)が得られ、第2日目の採取幹細胞をCD34精製に用いた。total cell 3.82×10^{10} cells (CD34陽性細胞 9.86×10^8 cells) からCD34カラムを用いた精製によって採取した細胞は 3.43×10^8 cells、CD34陽性率は93.9%であった。MRDはFISHによっては検出できず、PCRで検討中である。

D. 考察

現在迄に2症例が登録され、本研究が進行している。2症例ともに高度進行例ではあるが、先行する化学療法が奏効し、good PR～near CRの病態であるため腫瘍量も少なく本研究に至適な症例と考えられる。末梢血幹細胞の動員のための大量cyclophosphamideとG-CSFの併用は極めて有用であり、また副作用としては嘔気、嘔吐、脱毛、食思不振があったが、安全に施行可能であった。

採取し得たCD34抗原陽性細胞数も良好であり、特に第2症例目は有効に採取し得た。大量化学療法は安全かつ有効に施行して得ており、2症例ともに病変の軽快傾向が認められた。2番目の症例は、その後docetaxelによる後療法が施行され、肺病変は更に軽快しCRとなった。その後は計10サイクルまでdocetaxelの治療を施行したが、この間末梢白血球中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3%以上であり、docetaxelによる骨髄抑制が漸増悪するという所見は認められなかったことから、当該遺伝子治療の一定の効果が示唆された。本研究施行中の種々の臨床検査等のモニタリングは適切に施行されたため、2症例ともに現在迄経過中は安全かつ有効に研究計画を推進可能であった。

症例1に対しては平成13年4月に遺伝子導入細胞の移植が行われた。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は2200万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の7%に相当した。移植後7日目より患者末梢血中にP-糖蛋白陽

性細胞が検出されるようになり、移植したMDR1遺伝子導入細胞の生着が確認された。移植後7日目から15日目にかけて、末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。この割合は患者に移植した細胞中のP-糖蛋白陽性細胞の割合(7%)に比べると少し低い値である。遺伝子導入した細胞は3日間ex vivoで培養されており、遺伝子導入しないCD34陽性細胞よりも分化の進んだ細胞が多く含まれていると考えられるが、この時点でもかなり高率にP-糖蛋白陽性細胞がみられるということは、遺伝子導入細胞にまだ増殖能を持つ細胞が多く(50%以上)含まれていたことを示している。移植後12日目には末梢白血球数が14700/ μ lに達したが、この時のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3.9%であり、これはP-糖蛋白陽性細胞数にして573/ μ lになる。この時の患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の総数は20億個以上と計算され、移植したP-糖蛋白陽性細胞は100倍以上に増えていることが推察された。よって、MDR1遺伝子導入CD34陽性細胞は患者体内で爆発的な増殖をしたといえる。

その後は患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は1%から2%程度になり、この割合は患者の造血機能が正常に回復するまでの約2ヶ月間にわたって維持されていた。これは、移植後2週間で爆発的に増殖したP-糖蛋白陽性細胞の多くは既に分化段階の進んだ細胞であり、多くは末梢血の好中球への分化により消失したためと考えられる。このことは、言い換えれば、患者に移植したP-糖蛋白陽性細胞(移植したCD34陽性細胞の7%)のうちの10～20%程度の細胞は比較的未分化な細胞で、長期に白血球を作る造血細胞として機能しうる細胞であったと考えられる。

平成13年6月より現在までにこの患者に10コースのdocetaxel治療を行った。患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞はdocetaxel投与により一過性の上昇を繰り返した。これは、抗癌剤投与によりP-糖蛋白陽性細胞がP-糖蛋白陰性細胞よりも増殖に優位性を持っていたことを示している。この一過性の上昇を詳細に解析すると、P-糖蛋白陽性細胞の上昇はdocetaxel投与直後ではなく、投与して4～9日目くらいの、次第に好中球数が減少して、また回復していく時期に起こっている。このことは、docetaxel投与時に血中に存在したP-糖蛋白陽性好中球の寿命が通常的好中球と同じ1日程度であるという仮定のもとでは、docetaxel投与後の一過性の上昇は、その時に血中にあった細胞が耐性を示したというよりはむしろ、骨髄中の造血細胞の造血

能力において、P-糖蛋白陽性細胞の方がP-糖蛋白陰性細胞よりも優位性を示したということを表す。いずれにしても、P-糖蛋白陽性細胞が患者体内で抗癌剤耐性細胞として機能していることが推察された。

患者に docetaxel 投与を繰り返すことにより、P-糖蛋白陽性細胞の割合は徐々に増加し、平成13年末には抗癌剤投与前の値で3～6%、抗癌剤投与後ではほぼ10%に到達した。このことは、造血細胞レベルでもP-糖蛋白陽性細胞が増えているということを示唆するものである。

また、docetaxel 治療により大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られ、大量化学療法後の継続した化学療法の有効性が示された。この docetaxel 治療中の患者末梢血の好中球数は2000程度であり、患者の造血機能は必ずしも十分とはいえない。こうした条件下において、docetaxel 投与後の血液機能、特に免疫機能の保持および速やかな回復にMDR1 遺伝子導入細胞が寄与した可能性は高いと考えられる。

症例2に対しても平成13年10月にMDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。症例2でも患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞が検出され、移植したMDR1 遺伝子導入細胞の生着が確認された。以上より、本研究の安全性と臨床的有用性を示す結果が得られつつあると考えている。

MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を *ex vivo* で分化増殖させる目的で、ヒト骨髓細胞由来の stroma cell にテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつ stroma cell の mixed population を作成した。さらにこの hTERT 遺伝子導入 stroma cell のクローニングを行い、これまでに約50個のクローンを得た。現在はこれらクローンの増殖を待っている段階であるが、十分な細胞が得られた後に、CD34 陽性細胞の増幅に最も有効なクローンを検索する予定である。本研究で得られた hTERT 遺伝子導入 stroma cell line は正常細胞でありながら長期間分裂増殖が可能であり、CD34 陽性細胞の増殖と分化を支持する条件の解析に有用であると考えている。

E. 結論

平成12年度から「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を開始し、平成13年3月迄に2症例が登録され現在研究が進行している。本年度は、平成12年度に登録された2症

例に対して、大量化学療法を施行後にMDR1 遺伝子導入細胞の移植を行った。慎重なる症例選別、選定により現在迄のところ安全かつ有効に研究を推進しつつある。

CD34 陽性細胞採取については、cyclophosphamide 及び G-CSF の投与量、投与スケジュールに工夫をすることにより効率良く採取可能となっている。2症例に対し大量化学療法と遺伝子導入細胞の移植が施行された。内1例は docetaxel による後療法が施行され、CR が得られたことより、当該プロトコールの有用性が示された。また一連の治療スケジュール実施に伴う副作用等でも重篤なものは認められず、血液毒性以外では消化器毒性及び脱毛などの軽度な副作用にとどまり、安全に施行し得た。

患者に移植されたMDR1 遺伝子導入細胞は患者骨髓に生着し、約1年間にわたって遺伝子導入細胞が検出された。患者に docetaxel 治療を行うことにより、P-糖蛋白陽性細胞の割合は有意に増加した。この docetaxel 治療は安全に進められ、その結果、大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られた。遺伝子導入細胞の移植に起因すると推定される副作用はみられなかった。以上より、本研究は安全かつ着実に遂行されている。

悪性リンパ腫を対象とした研究も、本年度から臨床研究（遺伝子導入細胞を患者に戻さない）を開始し、平成14年2月までに1症例が登録され現在研究が進行中である。CD34 陽性細胞はIVACおよびG-CSF投与によりきわめて効率よく採取可能となり、また副作用も血液毒性の他は脱毛、倦怠感などの軽度で安全に施行し得た。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ito, Y., Aiba, K., Horikoshi, N., Saotome, T., Irie, T., Sugiyama, K., Nakane, M., Hashimoto, D., Yoshida, N., Mizunuma, N., Takahashi, S., Tanigawara, Y. Dose-finding phase I study of simultaneous weekly infusion with doxorubicin and docetaxel in patients with advanced breast cancer. *Int. J. Clin. Oncol.*, 6: 242-247, 2001.
- Aiba, K. Upper gastrointestinal tumors. *Cancer Chemotherapy and Biological Response Modifiers*, Annual 19. Giaccone, G., Schilsky, R. and Sondel, P. (eds.) Elsevier Science, Amsterdam, pp535-545, 2001.

- ・入江哲也, 伊藤良則, 相羽恵介, 高橋俊二, 渡邊純一郎, 多田敬一郎, 荒川泰弘, 宮里昌代, 奥平多恵子, 堀越昇, 畠清彦. Herceptin (trastuzumab) が奏効した乳癌皮膚転移の1例. 癌と化学療法, 16 (1): 87-90 頁, 2001年
- ・相羽恵介. 5-Fluorouracil (5-FU). 抗癌剤の至適投与方法を検証する. 癌と化学療法, 28 (10): 1368-1379 頁, 2001年
- ・荒川泰弘, 相羽恵介. 末期悪性腫瘍. 臨床栄養, 99 (5): 663-667 頁, 2001年
- ・赤座英之, 西條長宏, 相羽恵介, 磯西成治, 大橋靖雄, 河合弘二, 小西俊郎, 佐伯俊昭, 曾根三郎, 塚越茂, 鶴尾隆, 野口眞三郎, 三木恒治, 三上修, Mark Smith, Guido Hocion-Boes, Don Stribling. 癌治療における白金製剤 - 過去、現在、未来. 癌と化学療法, 28 (5): 625-635 頁, 2001年
- ・赤座英之, 佐伯俊昭, 河合弘二, 相羽恵介, 磯西成治, 大橋靖雄, 曾根三郎, 田村友秀, 塚越茂, 鶴尾隆, 野口眞三郎, 三木恒治, 加藤益弘, 三上修, Alan Barge, George Blackledge. 各癌腫における進行癌の治療方針の比較と新薬開発の必要性. 癌と化学療法, 28 (12): 1845-1855 頁, 2001年
- ・堀越昇, 相羽恵介, 高橋俊二, 畠清彦. 薬剤耐性 - 癌の分子標的治療 - Practical. Oncology, 14 (3): 14-17 頁, 2001年
- ・堀越昇, 橋本大吾, 相羽恵介. 第1回がんの化学療法とは. がん化学療法の基礎知識. 総合消化器ケア, 6 (1): 117-121 頁, 2001年
- ・堀越昇, 水沼信之, 相羽恵介. 第4回消化器がん. がん化学療法の基礎知識. 総合消化器ケア, 6 (4): 137-143 頁, 2001年
- ・山崎博之, 相羽恵介. 急性骨髄性白血病患者へのインフォームド・コンセントの進め方. インフォームド・コンセントガイド - 血液疾患診療編 - 月本一郎編 先端医学社, 199-212 頁, 2001年
- ・堀越昇, 相羽恵介. フッ化ピリミジン類. 治療ガイド. 和田功, 大久保昭行, 永田直一, 矢崎義雄編. 文光堂, 915-923 頁, 2001年
- ・相羽恵介. 2. フッ化ピリミジン系薬剤およびプリン代謝拮抗剤. V. 各薬剤に特異的な耐性機構とその克服. 癌の薬剤耐性とその克服 - 基礎と臨床 - 大沼尚夫, 竹村譲編. 宇宙堂八木書店, 211-221 頁, 2001年
- ・堀越昇, 相羽恵介. 抗癌剤の使い方, 今日の治療指針, 2001, 多賀須幸男, 尾形悦郎, 山口徹, 北原光夫編, 医学書院, 1039-1057 頁, 2001年
- ・相羽恵介. 巻頭言. Review of Cancer Treatment, 2 (1): 2 頁, 2001年

- ・相羽恵介. 巻頭言. Review of Cancer Treatment, 2 (2): 2 頁, 2001年
- ・相羽恵介. 巻頭言. Review of Cancer Treatment, 2 (3): 2 頁, 2001年
- ・相羽恵介. Leucovorin・5-Fluorouracil 療法の変遷. セプリ総研, 1-86 頁, 2001年

2. 学会発表

- ・相羽恵介, 水沼信之, 堀越昇. 乳癌術前化学療法症例における CD-DST 法による臨床効果予測. 第48回日本化学療法学会東日本支部総会. 2001年
- ・柴田はるみ, 水沼信之, 高橋俊二, 伊藤良則, 畠清彦, 堀越昇, 相羽恵介, 平野明夫. 固形癌における制癌剤感受性と生化学的・分子薬理学的アプローチ. 第34回制癌剤適応研究会. 2001年
- ・中根実, 伊藤良則, 高橋俊二, 相羽恵介, 堀越昇, 畠清彦, 霞富士雄, 服部幸夫. β サラセミア合併の乳癌症例に対する化学療法の経験. 日本内科学会関東地方会. 2001年
- ・中根実, 高橋俊二, 伊藤良則, 相羽恵介, 堀越昇, 畠清彦, 高野浩一, 尾形悦郎, 石川雄一. 原発性アルドステロ症で発症し、Cushing 症候群で再発した副腎皮質癌の1例. 第439回日本内科学会関東地方会. 2001年
- ・入江哲也, 橋本大吾, 杉山勝紀, 中根実, 渡邊純一郎, 霞富士雄, 吉本賢隆, 猪狩功遺, 高野浩一, 水沼信之, 伊藤良則, 高橋俊二, 畠清彦, 相羽恵介, 堀越昇. 乳癌肝転移例に対する全身化学療法、肝動注療法、または外科的肝切除との比較. 第9回日本乳癌学会総会. 2001年
- ・高橋俊二, 伊藤良則, 入江哲也, 中根実, 杉山勝紀, 水沼信之, 相羽恵介, 堀越昇, 山下孝, 霞富士雄, 橋本大吾. 乳腺原発悪性リンパ腫の治療方針. 第9回日本乳癌学会総会. 2001年
- ・橋本大吾, 伊藤良則, 杉山勝紀, 渡邊純一郎, 中根実, 水沼信之, 高橋俊二, 相羽恵介, 堀越昇. Docetaxel 耐性乳癌患者に対する Weekly Paclitaxel の効果. 第9回乳癌学会. 2001年
- ・相羽恵介, 高橋俊二, 伊藤良則, 堀越昇, 畠清彦, 鶴尾隆, 杉本芳一. 乳癌に対する MDR1 遺伝子治療の臨床研究. 第39回日本癌治療学会総会. ワークショップ. 遺伝子治療の現況と将来. 2001年
- ・相羽恵介. 外来治療における経口投与抗癌剤の意義. 第39回日本癌治療学会総会. サイエンティフィックシンポジウム. Tumor Dormancy Therapy をめぐって. 2001年

乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究

分担研究者 杉本 芳一 財団法人癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部 部長

「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を進めた。本遺伝子治療では、進行再発乳癌患者より採取した末梢血細胞より CD34 陽性細胞を分離し、これにヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を HaMDR レトロウイルスを用いて導入する。この遺伝子導入細胞を患者に戻し移植し、患者の血液細胞を抗癌剤耐性とする。本年度は、インフォームド・コンセントの得られた 2 名の症例に対して、MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行った。

症例 1 に対しては平成 13 年 4 月に遺伝子導入細胞の移植が行われた。患者に移植された P-糖蛋白陽性細胞は 2200 万個で、これは患者に戻した CD34 陽性細胞の 7% に相当した。移植後 7 日目より患者末梢血中に P-糖蛋白陽性細胞が検出されるようになり、移植した MDR1 遺伝子導入細胞の生着が確認された。移植後 7 日目から 15 日目にかけて、末梢白血球の 3% から 5% が P-糖蛋白陽性であった。その後は患者末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞の割合は 1% から 2% 程度になり、この割合は患者の造血機能が正常に回復するまでの約 2 ヶ月間にわたって維持されていた。平成 13 年 6 月より現在までにこの患者に 10 コースの docetaxel 治療を行った。患者末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞は docetaxel 投与により一過性の上昇を繰り返し、P-糖蛋白陽性細胞が患者体内で抗癌剤耐性細胞として機能していることが推察された。また、P-糖蛋白陽性細胞の割合も徐々に増加し、平成 13 年末にはほぼ 10% に到達した。この docetaxel 治療により大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られ、大量化学療法後の継続した化学療法の有効性が示された。

症例 2 に対しても平成 13 年 10 月に MDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。症例 2 でも患者末梢血中に P-糖蛋白陽性細胞が検出され、移植した MDR1 遺伝子導入細胞の生着が確認された。両症例とも、MDR1 遺伝子導入細胞の移植に起因する副作用は認められなかった。以上より、本研究は安全かつ着実に遂行されている。本研究は MDR1 遺伝子治療を受けた患者の末梢白血球における P-糖蛋白の発現を FACS により直接検出した世界で最初の研究であり、遺伝子導入細胞の消長について、詳細な解析が続けられている。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗癌剤耐性遺伝子を癌患者の正常血液細胞に導入して抗癌剤耐性とし、抗癌剤による骨髄抑制を軽減させる耐性遺伝子治療法の研究開発を行うことである。本研究では、「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を行い、その安全性と有効性を検証する。本遺伝子治療では、進行再発乳癌患者より採取した末梢血細胞より CD34 陽性細胞を分離し、これにヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を HaMDR レトロウイルスを用いて導入する。この遺伝子導入細胞を患者に戻し移植し、患者体内に抗癌剤に耐性な血液細胞を生着させる。抗癌剤に耐性な血液細胞が正常に機能すれば、その患者では、その後の化学療法施行に付随する骨髄抑制が軽減されると

期待される。すなわち、本治療により副作用軽減にもとづく患者の QOL の向上と抗癌剤投与可能量の増大による治療効果の改善が期待される。

本研究では、この臨床研究を推進すると共に、次世代のベクターとして、MDR1 遺伝子と第 2 の遺伝子を共発現させる bicistronic vector の研究開発を行う。さらにこれをヒト造血幹細胞に導入して遺伝子導入効率の向上、遺伝子導入細胞の選択的増幅を図る。

抗癌剤の耐性に関与する種々の ABC 輸送体の機能解析を行う。MDR1、MRP、BCRP などの ABC 輸送体遺伝子をレトロウイルスベクターを用いて種々の培養細胞およびヒト造血幹細胞に導入して、細胞の抗癌剤耐性化および遺伝子発現が細胞の正常機能に

与える影響について解析する。特に、導入遺伝子の発現が正常血球細胞の分化増殖とアポトーシスに与える影響について詳細に解析する。

B. 研究方法

「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を進める。本臨床研究は、これまで行われてきた自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法に造血幹細胞への多剤耐性遺伝子の導入を組み合わせ、化学療法の有効性と安全性を高めようとするものである。本臨床研究の実施計画については、平成12年2月24日に当時の文部大臣、厚生大臣より臨床研究を実施して差し支えないとの意見書を得ている。この実施計画書に従って、臨床研究が行われた。本臨床研究の対象は、先行する化学療法によりPR以上の効果が得られ、かつ本研究に参加することにインフォームド・コンセントの得られた進行再発乳癌症例である。最初に患者に末梢血幹細胞採取を3日間連続施行し、その1日分の細胞を遺伝子治療専用のクリーンルーム設備を備えた研究室に運んで Isolex 50 を用いて CD34 陽性細胞の分離精製を行う。この細胞をサイトカイン存在下 36 時間培養後、HaMDR レトロウイルスを用いて MDR1 遺伝子導入を行う。遺伝子導入は3回に分けて行い、合わせて30時間を要する。遺伝子導入細胞は液体窒素下で凍結保存する。遺伝子導入細胞の一部を用いて遺伝子導入効率の評価と遺伝子導入細胞の安全性の確認を行う。この MDR1 遺伝子導入を患者あたり2コースから3コース施行し、移植に十分な自己末梢血造血幹細胞を得た後、患者に大量化学療法を施行し、次いで MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行う。本年度は2人の患者に MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行った。第1症例については、その後の docetaxel 治療を行い、遺伝子治療の効果を検証した。

MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を *ex vivo* で分化増殖させる目的で、ヒト骨髓細胞由来の stroma cell にテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつ stroma cell の mixed population を作成した。この hTERT 陽性 stroma cell を plate 上に培養した後 X 線照射を行って feeder cell とし、この上でヒト CD34 抗原陽性細胞の培養を行った。さらに、この hTERT 遺伝子導入 stroma cell のクローニングを行い、安定な細胞株の樹立を行った。

(倫理面への配慮)

本臨床研究の対象患者へのインフォームド・コンセントの取得に際しては、国の審査委員会で承認された説明文を用いる。この説明文には、患者の自発的意思による研究への参加および中止・中断、遺伝子治療のメリットとデメリット、予想される副作用とその対策、代替療法と予測される効果、秘密保持、などについても詳細に記載されている。

また、遺伝子治療以外の、乳癌患者あるいは悪性リンパ腫患者の末梢血幹細胞および骨髓細胞の研究用使用についても、あらかじめインフォームド・コンセントをとる。

実験に使用するマウスなどに対しては、癌化学療法センター実験動物使用規定に従い、必要最小限の動物を用いることとし、研究においては動物に苦痛を与えないように配慮する。

C. 研究結果

これまでに2例の乳癌患者よりインフォームド・コンセントが得られ、財団法人癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会での症例登録の了承の後、遺伝子治療が行われている。

第1症例の患者では、1コース目の末梢血幹細胞採取+MDR1 遺伝子導入では7200万個の CD34 陽性細胞が精製され、MDR1 遺伝子導入後の CD34 陽性細胞の14%に P-糖蛋白の高発現が認められた。また、2コース目の末梢血幹細胞採取+MDR1 遺伝子導入では、4300万個の CD34 陽性細胞に遺伝子導入を行い、15%の細胞に P-糖蛋白の高発現が見られた。これらの遺伝子導入において、遺伝子導入細胞における P-糖蛋白の発現量はほぼ同程度であった。また、P-糖蛋白の発現量は、ヒト CD34 陽性細胞が本来発現している P-糖蛋白の発現量よりも明らかに高かった。遺伝子導入細胞の安全性試験の結果では、遺伝子導入後の CD34 陽性細胞への乳癌細胞の混入は認められず、無菌試験、マイコプラズマ試験、増殖性レトロウイルス試験などでも問題は認められなかった。この遺伝子導入は平成12年度末に完了している。

この第1症例の患者は、平成12年度末より3日間連続で大量化学療法を受け、さらに3日経過して抗癌剤の影響がなくなった後に、MDR1 遺伝子導入細胞の移植を受けた。移植は平成13年4月4日に行われた。患者に移植された有核細胞数は520億個で、このうち CD34 陽性細胞は3億3000万個であった。移植された3億3000万個の CD34 陽性細胞のうち、未処理で患者に戻された細胞が2

億1000万個、遺伝子導入のために培養された細胞が1億2000万個であった。本プロトコールでは患者に移植するCD34陽性細胞数を体重1kgあたりCD34陽性細胞200万個と規定しているが、この患者の場合は未処理CD34陽性細胞だけでこの基準をはるかに上回っていた。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は2200万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の7%に相当した。

患者の末梢白血球数はCD34陽性細胞移植後7日後に増加を始め、12日目に1万を越えた。また血小板数もCD34陽性細胞移植後9日後に増加を始め、15日目に10万を越えた。これにより移植した細胞の生着と増殖が確認された。移植後7日目より患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞がFACSで検出されるようになり、PCRの結果と合わせて、移植したMDR1遺伝子導入細胞が患者末梢血中存在することが確認された。移植後7日目から15日目にかけて、末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。移植後12日目には末梢白血球数が14700/ μ lに達したが、この時のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3.9%であり、これはP-糖蛋白陽性細胞数にして573/ μ lになる。この時の患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の総数は20億個以上と計算され、移植したP-糖蛋白陽性細胞は100倍以上に増えていることが推察された。

その後の2ヶ月間で患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は約1%に低下した。患者の全身状態の回復を確認の後、平成13年6月より本遺伝子治療のプロトコールに従ってdocetaxelの投与を開始した。第1回目のdocetaxel治療では通常投与量の50%量である30 mg/m²のdocetaxelが投与された。Docetaxel投与後4日目から6日目にかけて患者末梢血の好中球は約800/ μ lに減少したが、やがて回復した。P-糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel投与前は1.4%であったがdocetaxel投与8日後に2.2%とわずかな増加を示した。しかしdocetaxel投与後13日目にはP-糖蛋白陽性細胞の割合は0.9%に低下し、この上昇は一過性のものであった。

第2回目のdocetaxel治療では通常投与量の75%量である45 mg/m²のdocetaxelが投与された。投与6日後に患者末梢血の好中球が330/ μ lに減少したため、G-CSFの投与を行った。患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel投与前の1%から増加を続け、docetaxel投与11日後に3.2%になった。これは、docetaxel投与により患者生体内でP-糖蛋白陽性細胞が選択的に増幅されたことを示している。現在までにこの患者に10コース

のdocetaxel治療を行ったが、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞はdocetaxel投与により一過性の上昇を繰り返した。Docetaxel投与2週間後には患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合はまた低下するが、4コース目のdocetaxel投与からはP-糖蛋白陽性細胞の割合が最低でも3%を下回ることがなくなり、P-糖蛋白陽性細胞の造血細胞レベルでの増幅が推察された。また、7コース目のdocetaxel投与後と8コース目のdocetaxel投与後には、患者末梢血のP-糖蛋白陽性細胞の割合は一時的ではあるが10%を越えた。このdocetaxel治療により大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られ、大量化学療法後の継続した化学療法の有効性が示された。本研究は、MDR1遺伝子治療を受けた患者の末梢白血球におけるP-糖蛋白の発現をFACSにより直接検出した世界で最初の研究である。本研究で、docetaxel投与後にP-糖蛋白陽性細胞が一過性に増幅されるという現象が初めて示された。

第2症例の患者も、平成13年度に遺伝子導入細胞の移植を受けた。第2症例の患者では、1コース目の末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入では、CD34陽性細胞の精製後の細胞数は1400万、純度は93%であり、FACS解析でMDR1遺伝子導入後のCD34陽性細胞の17%にP-糖蛋白の高発現が認められた。同様に、この患者の2コース目では2200万個のCD34陽性細胞に対して遺伝子導入を行い、導入後のP-糖蛋白陽性率は13%であった。この患者では採取されたCD34抗原陽性細胞数が少なかつたため、3コース目の末梢血幹細胞採取が行われた。

この第2症例の患者は、平成13年10月に3日間連続で大量化学療法を受け、さらに3日経過して抗癌剤の影響がなくなった後、MDR1遺伝子導入細胞の移植を受けた。患者に移植された有核細胞数は900億個で、このうちCD34陽性細胞は1億5000万個であった。このCD34陽性細胞数は体重1kgあたり約300万個であり、体重1kgあたりCD34陽性細胞200万個という移植の基準を満たしていた。移植された1億5000万個のCD34陽性細胞のうち、未処理で患者に戻された細胞が1億1000万個、遺伝子導入のために培養された細胞が3700万個であった。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は540万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の3.6%に相当した。

患者の末梢白血球数はCD34陽性細胞移

植後9日後に増加を始め、12日目に3700となった。その後19日目に1万を越えた。また血小板数もCD34陽性細胞移植後9日後に増加を始め、19日目に10万を越えた。これにより移植した細胞の生着と増殖が確認された。移植後に患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞がFACSで検出されるようになり、PCRの結果と合わせて、移植したMDR1遺伝子導入細胞が患者末梢血に存在することが確認された。移植後5日目から14日目にかけて、末梢白血球の約3%の細胞がP-糖蛋白陽性を示した。この患者では、移植後2~3カ月で全身状態は回復したが、患者の意向により、docetaxel治療は開始されていない。近くdocetaxel治療を開始する予定である。

これまでのところ、遺伝子治療を受けた2例の患者で遺伝子導入細胞の移植によると考えられる有害反応はない。患者の病状は安定しており、腫瘍の増悪も見られていない。以上より、本遺伝子治療臨床研究は、安全に遂行されている。

MDR1遺伝子導入CD34抗原陽性細胞をex vivoで分化増殖させる目的で、ヒト骨髄細胞由来のstroma cellにテロメラーゼ遺伝子(hTERT)をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつstroma cellのmixed populationを作成した。このhTERT陽性stroma cellをplate上に培養した後X線照射を行ってfeeder cellとし、この上でヒトCD34抗原陽性細胞の培養を行った。Feeder cellのない条件下ではCD34抗原陽性細胞はGM系の細胞への分化をするため、CD34抗原陽性細胞の数としては3倍程度にしか増えないが、hTERT遺伝子導入feeder cellの存在下ではCD34抗原陽性細胞は3週間の培養で約50倍に増幅された。次に、このhTERT遺伝子導入stroma cellのクローニングを行い、これまでに約50個のクローンを得た。現在はこれらクローンの増殖を待っている段階であるが、十分な細胞が得られた後に、CD34陽性細胞の増幅に最も有効なクローンを検索する予定である。

D. 考察

本年度より「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」において2例の患者に対して遺伝子導入細胞の移植が行われた。これまでに遺伝子導入細胞の移植に起因すると推定される副作用は見つかっておらず、遺伝子治療は安全に遂行されている。

症例1に対しては平成13年4月に遺伝子導入細胞の移植が行われた。患者に移植されたP-糖蛋白陽性細胞は2200万個で、これは患者に戻したCD34陽性細胞の7%に相当した。移植後7日目より患者末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞が検出されるようになり、移植したMDR1遺伝子導入細胞の生着が確認された。移植後7日目から15日目にかけて、末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。この割合は患者に移植した細胞中のP-糖蛋白陽性細胞の割合(7%)に比べると少し低い値である。遺伝子導入した細胞は3日間ex vivoで培養されており、遺伝子導入しないCD34陽性細胞よりも分化の進んだ細胞が多く含まれていると考えられるが、この時点でかなり高率にP-糖蛋白陽性細胞がみられるということは、遺伝子導入細胞にまだ増殖能を持つ細胞が多く(50%以上)含まれていたということを示している。移植後12日目には末梢白血球数が14700/ μ lに達したが、この時のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3.9%であり、これはP-糖蛋白陽性細胞数にして573/ μ lになる。この時の患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の総数は20億個以上と計算され、移植したP-糖蛋白陽性細胞は100倍以上に増えていることが推察された。よって、MDR1遺伝子導入CD34陽性細胞は患者体内で爆発的な増殖をしたといえる。

その後は患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は1%から2%程度になり、この割合は患者の造血機能が正常に回復するまでの約2ヶ月間にわたって維持されていた。これは、移植後2週間で爆発的に増殖したP-糖蛋白陽性細胞の多くは既に分化段階の進んだ細胞であり、多くは末梢血の好中球への分化により消失したためと考えられる。このことは、言い換えれば、患者に移植したP-糖蛋白陽性細胞(移植したCD34陽性細胞の7%)のうちの10~20%程度の細胞は比較的未分化な細胞で、長期に白血球を作る造血細胞として機能しうる細胞であったと考えられる。

平成13年6月より現在までにこの患者に10コースのdocetaxel治療を行った。患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞はdocetaxel投与により一過性の上昇を繰り返した。これは、抗癌剤投与によりP-糖蛋白陽性細胞がP-糖蛋白陰性細胞よりも増殖に優位性を持っていたということを示している。この一過性の上昇を詳細に解析すると、P-糖蛋白陽性細胞の上昇はdocetaxel投与直後ではなく、投与して4~9日目くらいの、次第に好中球数が減少して、また回復していく時期に起こっている。このことは、docetaxel投与時に血中に

存在した P-糖蛋白陽性好中球の寿命が通常の好中球と同じ 1 日程度であるという仮定のもとでは、docetaxel 投与後の一過性の上昇は、その時に血中にあった細胞が耐性を示したというよりはむしろ、骨髄中の造血細胞の造血能力において、P-糖蛋白陽性細胞の方が P-糖蛋白陰性細胞よりも優位性を示したということを表す。いずれにしても、P-糖蛋白陽性細胞が患者体内で抗癌剤耐性細胞として機能していることが推察された。

患者に docetaxel 投与を繰り返すことにより、P-糖蛋白陽性細胞の割合は徐々に増加し、平成 13 年末には抗癌剤投与前の値で 3 ~ 6%、抗癌剤投与後ではほぼ 10% に到達した。このことは、造血細胞レベルでも P-糖蛋白陽性細胞が増えているということを示唆するものである。

また、docetaxel 治療により大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られ、大量化学療法後の継続した化学療法の有効性が示された。この docetaxel 治療中の患者末梢血の好中球数は 2000 程度であり、患者の造血機能は必ずしも十分とはいえない。こうした条件下において、docetaxel 投与後の血液機能、特に免疫機能の保持および速やかな回復に MDR1 遺伝子導入細胞が寄与した可能性は高いと考えられる。

症例 2 に対しても平成 13 年 10 月に MDR1 遺伝子導入細胞の移植が行われた。症例 2 でも患者末梢血中に P-糖蛋白陽性細胞が検出され、移植した MDR1 遺伝子導入細胞の生着が確認された。以上より、本研究の安全性と臨床的有用性を示す結果が得られつつあると考えている。

MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を ex vivo で分化増殖させる目的で、ヒト骨髄細胞由来の stroma cell にテロメラーゼ遺伝子 (hTERT) をレトロウイルスを用いて導入し、テロメラーゼ活性をもつ stroma cell の mixed population を作成した。さらにこの hTERT 遺伝子導入 stroma cell のクローニングを行い、これまでに約 50 個のクローンを得た。現在はこれらクローンの増殖を待っている段階であるが、十分な細胞が得られた後に、CD34 陽性細胞の増幅に最も有効なクローンを検索する予定である。本研究で得られた hTERT 遺伝子導入 stroma cell line は正常細胞でありながら長期間分裂増殖が可能であり、CD34 陽性細胞の増殖と分化を支持する条件の解析に有用であると考えている。

E. 結論

「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を進めた。本年度は、平成 12 年度に登録された 2 症例に対して、大量化学療法を施行後に MDR1 遺伝子導入細胞の移植を行った。患者に移植された MDR1 遺伝子導入細胞は患者骨髄に生着し、約 1 年間にわたって遺伝子導入細胞が検出された。患者に docetaxel 治療を行うことにより、P-糖蛋白陽性細胞の割合は有意に増加した。この docetaxel 治療は安全に進められ、その結果、大量化学療法後にはまだ認められた患者の癌病巣がほぼ消失するという成果が得られた。遺伝子導入細胞の移植に起因すると推定される副作用はみられなかった。以上より、本研究は安全かつ着実に遂行されている。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. and Sugimoto, Y. Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer*, 97: 626-630, 2002.
- Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T. and Sugimoto, Y. Estrone and 17 β -estradiol reverse breast cancer resistance protein-mediated multidrug resistance. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press.
- Sugimoto, Y., Tsuruo, T., Pastan, I. and Gottesman, M. M. Bicistronic retrovirus vectors encoding drug-resistant genes. In: R. A. Aubin (ed.), *Transgene Delivery and Expression in Mammalian Cells (a volume of Methods in Molecular Biology)* Humana Press, in press.

2. 学会発表

- Sugimoto, Y., Takahashi, S., Nakane, M., Mitsuhashi, J., Tsukahara, S., Nagamine, T., Minowa, S., Shibata, H., Ito, Y., Hatake, H., Tsuruo, T., Horikoshi N. and Aiba, K. A clinical study of MDR1 gene therapy against breast cancer. *Proceeding of the 7th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy*, 32, (2001).
- 堀江弘二, 富田章弘, 八杉利治, 古川裕之, 武谷雄二, 杉本芳一, 鶴尾隆. DNA Topoisomerase I の SUMO-1 修飾と Cleavable

Complex 形成における意義, 第 60 回日本癌学会総会記事, 228 頁, 2001 年

- ・ 杉本芳一, 高橋俊二, 塚原里美, 箕輪さゆり, 柴田はるみ, 伊藤良則, 畠清彦, 鶴尾隆, 堀越昇, 相羽恵介. 乳癌に対する MDR1 遺伝子治療の臨床研究. 第 60 回日本癌学会総会記事, 251 頁, 2001 年
- ・ 塚原里美, 石川悦子, 鶴尾隆, 杉本芳一. BCRP の抗癌剤認識部位の同定. 第 60 回日本癌学会総会記事, 565 頁, 2001 年
- ・ 石川悦子, 佐藤重男, 塚原里美, 鶴尾隆, 杉本芳一. BCRP を発現する in vivo の抗癌剤耐性実験腫瘍モデルの作成. 第 60 回日本癌学会総会記事, 565 頁, 2001 年
- ・ 浅田咲世, 塚原里美, 石川悦子, 鶴尾隆, 杉本芳一. 精製 BCRP の ATPase 活性. 第 60 回日本癌学会総会記事, 565 頁, 2001 年
- ・ 鹿毛久身江, 塚原里美, 杉山朋美, 浅田咲世, 石川悦子, 鶴尾隆, 杉本芳一. BCRP は 140-kDa の homodimer を形成する. 第 60 回日本癌学会総会記事, 568 頁, 2001 年
- ・ 柳瀬香恵, 杉本芳一, 鶴尾隆, 安藤俊夫. カンプトテシン耐性ヒト急性白血病細胞由来の変異型 DNA topoisomerase I cDNA 導入による細胞の薬剤耐性化. 第 60 回日本癌学会総会記事, 568 頁, 2001 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

特にありません。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究

分担研究者 堀越 昇 財団法人癌研究会癌化学療法センター 所長室 医員

本研究の目的は、抗癌剤多剤耐性遺伝子を乳癌患者の造血幹細胞に導入して抗癌剤耐性とし、抗癌剤による骨髄抑制を軽減させる骨髄保護効果を目指した耐性遺伝子治療の研究開発を行うことである。平成12年度から本臨床研究を開始し、現在再発進行乳癌患者2症例において本臨床研究計画が実施、継続研究されている。2症例ともに末梢血単核細胞の採取と一部CD34陽性細胞への濃縮分離を行い、この細胞群に対して耐性遺伝子が導入された。そして大量化学療法施行後に耐性遺伝子導入細胞を末梢血単核細胞とともに移植した。症例1はその後、平成13年6月より docetaxel による後治療を開始し、5サイクル終了時には大量化学療法後にわずかに認められていた肺の遺残病変は消失したため、CR（著効）と判断した。現在10サイクルにて後療法を完了しているが、この間 docetaxel による骨髄抑制が漸時増悪するという所見は認められず、一定の効果が示唆された。症例2は今後 docetaxel による後療法を開始する予定である。2症例ともに現在迄の臨床研究経過中に重篤な副作用は認められず、安全に施行し得た。

A. 研究目的

本研究の目的は、抗癌剤多剤耐性遺伝子を乳癌患者の正常造血幹細胞に導入することにより血液細胞に抗癌剤耐性の性格を賦与し、骨髄保護を目指す耐性遺伝子治療法の研究開発を行うことである。この研究では、進行乳癌患者より採取した末梢血造血幹細胞に *ex vivo* でヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入し、この遺伝子導入細胞を再び患者に戻すことにより患者の骨髄細胞を抗癌剤耐性とすることを目指す。

B. 研究方法

寛解導入化学療法が有効であった再発あるいは進行乳癌症例の内、インフォームド・コンセントが得られた症例に対し、本研究参加可否の適格性を審査する。適格の場合は本研究の対象症例として登録する。cyclophosphamide に G-CSF を併用することにより造血幹細胞の動員をはかり、対象症例より末梢血単核細胞を連日3日間にわたり採取する。この操作を2サイクルから3サイクル施行し、採取した末梢血単核球の約1/3量からCD34抗原陽性細胞を分離濃縮する。この細胞群を標的として、HaMDRレトロウイルスを用いて遺伝子導入を行う。残りの約2/3量とともに遺伝子導入細胞は使用時まで凍結保存しておく。その後患者に cyclophosphamide、thiotepa、carboplatin より成る大量化学療法を施行する。引き続いて凍結保存しておいた

MDR1 遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を未処理の末梢血単核細胞とともに患者に移植する。その後、骨髄が再構築されて末梢血所見が正常化し、患者の一般状態が完全に回復した後、6サイクルの docetaxel の投与を行う。docetaxel の投与量は通常量の50%から開始し、順次増量して100%量まで増加させる。この治療中、経時的に患者の末梢血を採取し、血液細胞でのMDR1遺伝子の組み込みと発現をPCRおよびFACSを用いて検討する。

(倫理面への配慮)

本臨床研究の対象患者へのインフォームド・コンセントの取得に際しては、国の審査委員会で承認された説明文を用いる。この説明文には、患者の自発的意思による研究への参加および中止・中断、遺伝子治療のメリットとデメリット、予想される副作用とその対策、代替療法と予測される効果、秘密保持、などについても詳細に記載されている。

また、遺伝子治療以外の、乳癌患者あるいは悪性リンパ腫患者の末梢血幹細胞および骨髄細胞の研究用使用についても、あらかじめインフォームド・コンセントを取得する。

C. 研究結果

厚生省（現厚生労働省）、文部省（現文部科学省）による実施計画の承認を受けて、

平成12年度より本研究を開始した。平成13年3月迄に2症例が登録され、研究が現在進行している。

症例1は、右乳癌と診断され、右乳房切除術の既往歴を有していたが、最近になって両肺に多発腫瘍を認め、気管支鏡下経気管支吸引針生検にて乳癌由来の転移性肺癌と診断された。癌研にてmodified FAC療法を3コース施行したところ、腫瘍マーカーが正常化し、肺CT検査にて両肺転移巣はPRと評価された。さらに寛解導入化学療法を継続し、7コース終了後、病変は80%縮小しPRと評価され、インフォームド・コンセントを得て適合性の検査を行い、本研究に登録された。審査委員会の承認後、cyclophosphamideとG-CSFの併用にて末梢血幹細胞動員し、第1コース目の末梢血幹細胞採取を施行した。第1日目はCD34陽性細胞 13.6×10^7 個を採取した。第2日目はCD34陽性細胞 13.2×10^7 個を採取し、この細胞を標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。第3日目はCD34陽性細胞 4.3×10^7 個を採取した。次いで、第2コース目の末梢血幹細胞採取のためcyclophosphamideとG-CSFを投与し、末梢血幹細胞動員と採取を行った。第1日目はCD34陽性細胞 6.6×10^7 個を採取し、この細胞群を標的として第2回目のMDR1遺伝子導入を施行した。第2日目はCD34陽性細胞 7.7×10^7 個を採取した。第3日目はCD34陽性細胞 4.6×10^7 個を採取した。その後骨髄単核細胞 1×10^{10} 個を採取の後、cyclophosphamide、thiotepa、carboplatinの3剤併用による大量化学療法を施行した。肺病変は更に軽快(near CR)するも依然わずかながら残存病変が認められた。このため骨髄機能の回復を待ち、末梢好中球数が $1925/\mu\text{l}$ と回復・安定化が認められたため、docetaxelによる後療法を通常量の50% ($30\text{mg}/\text{m}^2$)から慎重に開始した。docetaxel 1サイクル目開始時の好中球数(ANC) $1925/\mu\text{l}$ 、白血球数(WBC) $2500/\mu\text{l}$ 、最低値はANC 850、WBC 1700であった。2サイクル目はdocetaxel (TXT)を75% ($45\text{mg}/\text{m}^2$)に増量して投与したが、最低値はANC 335、WBC 930とグレード4の好中球減少、白血球減少が認められたため、G-CSFによる支持療法を3日間施行した。3サイクル目も75%量で施行したが、ANC 239、WBC 570と同様のグレード4の副作用が認められたため、G-CSFを投与した。その後も同様の経過であり、プロトコルの規定に従い原則として3週毎に同療法を反復継続した。4サイクル目の最低値はANC 477、WBC 900、5サイクル目

はANC 252、WBC 600であった。そして平成13年10月1日、5サイクル後には胸部CTにて肺病変が不明瞭化したため、臨床的にCRと判断した。その後は寛解地固め目的にてプロトコルに従い、2サイクル目と同様の投与量にてdocetaxel療法を継続施行した。6サイクル目の最低値は、ANC 272、WBC 680、7サイクル目ANC 285、WBC 920、8サイクル目ANC 353、WBC 820、9サイクル目ANC 492、WBC 1200、10サイクル目ANC 407、WBC 1100であった。経過中その他の副作用として、グレード1の末梢神経障害、筋肉痛が認められた。今後は病変及び造血機能の再評価を予定している。

症例2は、原発性乳癌のため乳房切除術を施行されUFTによる後療法の既往を有するが、その後鎖上リンパ節、内胸リンパ節の腫脹を認め、生検により乳癌再発と診断された。癌研にて5-fluorouracil、adriamycin、cyclophosphamideによる寛解導入化学療法を行い、6コース終了時にCTにより鎖上リンパ節はCR、内胸リンパ節はPRと判定された。その後、docetaxel、tomoxifen、放射線治療を順次施行し、本研究の登録時には、鎖上リンパ節CR、内胸リンパ節near CRと評価された。その後本研究のインフォームド・コンセントを取得し、施設内審査委員会の承認を経て対象患者として登録された。最初にcyclophosphamideとG-CSFの併用により末梢血幹細胞を動員し、第1コース目の末梢血幹細胞採取を3日間施行した。採取第1日目はCD34陽性細胞 2.2×10^7 個採取した。第2日目はCD34陽性細胞を 1.9×10^7 個採取、これを標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。第3日目はCD34陽性細胞 2.1×10^7 個を採取した。いずれも液体窒素下凍結保存とした。その後、骨髄機能の回復を待ち、cyclophosphamideとG-CSFの併用により第2コース目の末梢血幹細胞採取を3日間施行した。第1日目はCD34陽性細胞を 4.2×10^7 個採取、第2日目はCD34陽性細胞を 2.5×10^7 個採取、第3日目はCD34陽性細胞を 0.7×10^7 個採取した。1日目の細胞をMDR1遺伝子導入に用いた。第3コース目もcyclophosphamideとG-CSFの併用により末梢血幹細胞採取を3日間施行した。第1日目はCD34陽性細胞を 7.3×10^7 個採取、第2日目はCD34陽性細胞を 1.0×10^7 個採取、第3日目はCD34陽性細胞を 0.8×10^7 個採取した。第1日目の細胞を標的としてMDR1遺伝子導入を施行した。その後骨髄単核細胞 3×10^9 個を採取の後、cyclophosphamide、thiotepa、carboplatinの3

剤併用による大量化学療法を施行した。病変はnear CR以上の軽快状態を維持しており、今後docetaxelによる後療法を開始する予定である。

D. 考察

現在迄に2症例が登録され、本研究が進行している。2症例ともに高度進行例ではあるが、先行する化学療法が奏効し、good PR～near CRの病態であるため腫瘍量も少なく本研究に至適な症例と考えられる。末梢血幹細胞の動員のための大量cyclophosphamideとG-CSFの併用は極めて有用であり、また副作用としては嘔気、嘔吐、脱毛、食思不振があったが、安全に施行可能であった。

採取し得たCD34抗原陽性細胞数も良好であり、特に第2症例目は有効に採取し得た。大量化学療法は安全かつ有効に施行して得ており、2症例ともに病変の軽快傾向が認められた。2番目の症例は、その後docetaxelによる後療法が施行され、肺病変は更に軽快しCRとなった。その後は計10サイクルまでdocetaxelの治療を施行したが、この間末梢白血球中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3%以上であり、docetaxelによる骨髄抑制が漸増増悪するという所見は認められなかったことから、当該遺伝子治療の一定の効果が示唆された。本研究施行中の種々の臨床検査等のモニタリングは適切に施行されたため、2症例ともに現在迄経過中は安全かつ有効に研究計画を推進可能であった。

E. 結論

平成12年度から臨床研究を開始し、平成13年3月迄に2症例が登録され現在研究が進行している。慎重なる症例選別、選定により現在迄のところ安全かつ有効に研究を推進しつつある。

CD34陽性細胞採取については、cyclophosphamide及びG-CSFの投与量、投与スケジュールに工夫をすることにより効率良く採取可能となっている。2症例に対し大量化学療法と遺伝子導入細胞の移植が施行された。内1例はdocetaxelによる後療法が施行され、CRが得られたことより、当該プロトコールの有用性が示された。また一連の治療スケジュール実施に伴う副作用等でも重篤なものは認められず、血液毒性以外では消化器毒性及び脱毛などの軽度な副作用にとどまり、安全に施行し得た。

F. 健康危険情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・小林国彦, 工藤翔二, 栗原稔, 長谷川浩一, 堀越昇, 中井祐之, 安藤真弘, 樋口昭子, 平方眞, 亀岡祐一, 片倉恒徳, 小林信之, 松川正明, 三浦建, 西田二郎, 小野充一, 佐藤俊哉, 渋谷昌彦, 篠崎俊秀, 滝口裕一, 武内浩一郎, 横山晶, 吉森浩三, 仁井谷久暢, 長尾啓一, 塚越茂. 癌性疼痛患者に対するTNK951の有効性および安全性の検討-硫黄モルヒネ徐放錠からの切り替え試験. 医学と薬学, 46 (5): 715-726頁, 2001年
- ・堀越昇, 橋本大吾, 相羽恵介. がん化学療法の基礎知識-第1回 がんの化学療法とは. 総合消化器ケア, 6 (1): 117-121頁, 2001年
- ・堀越昇, 渡邊純一郎, 畠清彦. がん化学療法の基礎知識-第2回 血液のがん. 総合消化器ケア, 6 (2): 122-126頁, 2001年
- ・堀越昇, 入江哲也, 伊藤良則. がん化学療法の基礎知識-第3回 乳がん. 総合消化器ケア, 6 (3): 122-127頁, 2001年
- ・堀越昇, 水沼信之, 相羽恵介. がん化学療法の基礎知識-第4回 消化器がん. 総合消化器ケア, 6 (4): 137-143頁, 2001年
- ・堀越昇, 高橋俊二, 荒川泰弘. がん化学療法の基礎知識-第5回 泌尿生殖器がんの化学療法. 総合消化器ケア, 6 (5): 121-126頁, 2001年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特にありません。

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

非ホジキンリンパ腫（NHL）における MDR 遺伝子治療についての基礎的研究

分担研究者 高橋 俊二 財団法人癌研究会癌化学療法センター臨床部 研究員

本研究の目的は、非ホジキンリンパ腫（NHL）に対する MDR1 遺伝子治療の適応の有無についての基礎的検討として、1) NHL 患者の末梢血からの CD34 陽性細胞純化、2) 純化 CD34 陽性細胞における微小残存病変（Minimal residual disease、MRD）、3) 純化 CD34 陽性細胞への MDR1 遺伝子導入についての検討を行うことである。まず末梢血幹細胞採取、MRD 測定の基礎的検討を行った。IVAC+G-CSF による採取については 1 回で $2.63 \pm 0.77 \times 10^8$ cells と十分量が採取できることが明らかになり、副作用も問題なかった。MRD の測定については、リンパ腫細胞の検体を用いて 1) follicular lymphoma における JH/bcl-2 rearrangement、2) mantle cell lymphoma における JH/bcl-1 rearrangement の nested PCR による MRD 検出についてはほぼ確立した。さらに臨床研究を開始し、第 1 例目の末梢血幹細胞採取 — CD34 陽性細胞精製 — MRD 測定を行った。

A. 研究目的

我々は「乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究」を計画立案し、開始している。これは、通常の寛解導入化学療法にて PR 以上の効果が得られた進行・再発乳癌症例において、自己末梢血細胞から CD34 陽性細胞を精製して多剤耐性遺伝子（MDR1）をレトロウイルスベクターにより導入し、大量化学療法施行後 MDR1 遺伝子を発現した幹細胞を移植して MDR1 遺伝子の血液細胞における発現と安全性、さらに MDR1 による血液幹細胞の抗癌剤毒性に対する保護作用を検討するものである（相羽、杉本）。この MDR1 遺伝子治療は非ホジキンリンパ腫（NHL）に対しても適用されうると考えるが、その為の基礎研究として本研究を行う。

MDR1 遺伝子治療を NHL の治療に応用する場合の第 1 の問題は、悪性リンパ腫細胞が乳癌細胞よりも高頻度に骨髓および末梢血中に混入しうること、これに MDR1 遺伝子を導入することによって治療耐性リンパ腫の再発が危惧される。一般の悪性リンパ腫に対する自己造血幹細胞移植においても悪性細胞の幹細胞への混入が問題になり、それを克服する手段として、CD34 陽性細胞の精製が試みられている。海外での pilot study としては、Devereux らが再発 NHL 患者からの末梢血幹細胞から CD34 陽性細胞を精製後 MDR1 遺伝子を導入して大量化学療法後末梢血幹細胞移

植を行っているが、移植後 MDR1 発現細胞を検出することが出来なかった。しかし彼らの遺伝子導入方法は全くサイトカイン等による幹細胞刺激を行っておらず、導入効率は劣悪と考えられ、我々の方法ではこれを overcome する事は可能と考えられる。

そこで我々は、NHL に対する MDR1 遺伝子治療の feasibility の検討のため、リンパ腫患者末梢血細胞からの CD34 陽性細胞の精製を行い、微小残存病変（minimal residual diseases、MRD）の除去の効率、さらに MDR1 遺伝子を導入した CD34 陽性細胞に MRD が残存するか否かについて検討することを目的として、当研究を行う。

B. 研究方法

（対象症例）

組織学的に確認された NHL stage II、III、IV で、大量化学療法+末梢血幹細胞移植の対象になる病態の症例とする。

1. (a) 組織学的に intermediate grade (WHO Working Formulation; WF) で初発、high risk (international prognostic index: high / high intermediate) で 1st CR/PR、(b) 組織学的に high grade (WF) で初発、1st CR/PR、(c) Relapse / Refractory で通常化学療法に反応した症例 (CR/PR)。

2. Age ≤ 70 。3. PS 0-3。4. 充分な臓器機能が保持されている症例。5. MRD 検討のため前もって lymphoma cell の性状