

20020843

厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

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14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 杉本 芳一

平成15(2003)年4月

厚生労働科学研究費補助金
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

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 14 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 杉本 芳一

平成 15 (2003) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告	
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
杉本 芳一	
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	_____ 10
高橋 俊二	
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	_____ 14
島 清彦	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	_____ 19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	_____ 24

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 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由来CD34陽性細胞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たのち、docetaxel治療を施行する。これまでに3症例が登録された。

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。移植後の患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は3%から5%であったが、その後減少して1%から2%程度に減少した。平成13年6月よりこの患者に10コースのdocetaxel治療を行った。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。大量化学療法後の症例1の末梢血の白血球数、好中球数は健常人の約50%程度であり、骨髓機能の再構成は不十分であったが、その後のdocetaxel治療によって骨髓抑制が漸増悪するという所見は認められず、MDR1遺伝子導入細胞の移植の効果が示唆された。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1に対しては平成14年度はほぼ1ヶ月に1度の割合で外来での経過観察を行っている。末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の陽性率はdocetaxel治療を終了して約1年後でも1%以上の水準を維持している。

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。移植後に末梢白血球の3%がP-糖蛋白陽性であった。この症例2では患者の意向で移植後docetaxel治療の開始まで約7ヶ月の間隔があった。その間、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は減少を続け、平成14年4月頃にはPCRを行ってもMDR1遺伝子陽性細胞が全く検出されない状態になった。その後、平成14年5月よりこの患者に5コースのdocetaxel治療を行った。このdocetaxel投与によりそれまで検出限界以下であった患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞、MDR1遺伝子陽性細胞が頻度は低いながら検出されるようになり、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示された。同時に、P-糖蛋白陽性細胞の増幅はdocetaxel投与によってのみ起こり、docetaxelを投与されない場合はP-糖蛋白陽性細胞の割合は次第に減少してなくなっていくということも示された。しかし症例2では症例1よりもdocetaxel投与による骨髓抑制は強かった。このことはP-糖蛋白陽性細胞の割合が低いことと骨髓抑制の強さとの相関を示唆する。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。また、MDR1遺伝子導入細胞の異常な増殖は観察されなかった。

新たに登録された症例3の予定患者に対して2コースの末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入を行い、移植に十分な末梢血幹細胞の採取と凍結を完了した。

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
島 清彦 財団法人癌研究会 癌化学療法センター
臨床部 部長

A. 研究目的

本研究の目的は、「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」の研究開発を行い、これを実際の癌治療に役立てることにある。本臨床研究では、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ることにより、大量化学療法後の患者への継続した化学療法を安全に施行することを目的とする。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。

また本研究では、実際に臨床研究を遂行するにあたり、遺伝子治療・再生医療などの臨床研究に必須な遺伝子導入細胞(ex vivo処理細胞)の安全性検査を国内で行う体制の整備を行う。このシステムが機能することを実際の臨床研究の中で検証する。

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apoptosisに与える影響について詳細に解析する。MDR1、MRP、BCRPなどの生理機能の解明、阻害剤の開発、SNPの同定、白血病細胞のapoptosisの研究などを推し進める。

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。患者の骨髄機能の再構築を確認した後、docetaxelによる化学療法を施行する。docetaxel投与前後の患者末梢血の好中球数の変化およびP-糖蛋白陽性細胞の割合の変化を中心にMDR1遺伝子導入細胞の消長を評価する。

抗癌剤耐性に関与するABC輸送体で、野生型より強い抗癌剤耐性を示す変異体を作成して遺伝子治療に用いる目的で、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)の種々の変異体を作成した。BCRPはN末にATP結合領域、C末に6回膜を貫通する領域が存在する。野生型BCRPを発現した細胞はMitoxantroneやSN-38、Topotecan等の抗癌剤に耐性を示すが、Doxorubicinには耐性を示さない。BCRPの膜貫通領域に存在する3つの荷電アミノ酸、E446、R482、H630に着目し、これらのアミノ酸を荷電の異なる種々のアミノ酸に置換した変異体を28個作成して、交差耐性パターンの変化について調べた。

(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、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

これまでに3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症例登録が了承された。このうち2症例について、平成13年度に遺伝子導入細胞の移植が行われた。第3症例については、平成14年度に症例登録を行い、末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入を行い、遺伝子導入細胞の移植の準備を完了した。

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、MDR1遺伝子導入細胞の移植の効果が示唆された。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1に対しては平成14年度はほぼ1ヶ月に1度の割合で外来での経過観察を行っている。末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel治療の後期に比べて若干減少したが、docetaxel治療を終了して約1年後の平成15年2月でも2%から3%程度の陽性率を維持している。

症例2に対しては平成13年10月にMDR1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。移植後5日目に末梢白血球の3%がP-糖蛋白陽性であった。この症例2では

患者の意向で移植後docetaxel治療の開始まで約7ヶ月の間隔があった。その間、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は減少を続け、平成14年4月頃にはPCRを行っても患者末梢血中のMDR1遺伝子陽性細胞が全く検出されない状態になった。

症例2に対し、平成14年5月より平成14年8月までに5コースのdocetaxel治療を行った。このdocetaxel投与によりそれまで検出限界以下であった患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞、MDR1遺伝子陽性細胞が頻度は低いながら検出されるようになり、症例2においても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示唆された。同時に、P-糖蛋白陽性細胞の増幅はdocetaxel投与によってのみ起こり、docetaxelを投与されない場合はP-糖蛋白陽性細胞の割合は次第に減少してなくなっていくということも示された。

症例1、症例2とも1コース目のdocetaxel治療は30 mg/m²と通常投与量の半量であり、末梢血の好中球減少は軽度であった。2コース目以降は45 mg/m²のdocetaxelの投与により末梢血の好中球減少がみられたため、投与4～7日後、好中球数が500/μl以下に低下した時点でG-CSFの投与を行った。症例1ではG-CSF投与後2日以内に好中球の速やかな回復がみられた。この傾向はdocetaxel治療の進んだ6～10コース目の投与でも同様であった。これに対して症例2では、G-CSFを投与しても好中球の回復に6～7日を要した。症例2ではすでにCRに達していたため、患者の安全を考慮してdocetaxel治療は5コースで中断した。患者末梢血中の好中球数は症例1のdocetaxel投与8日後が9回の平均で1884 ± 843個、症例2がdocetaxel投与10日後の4回の平均で631 ± 555個であった。この症例1と症例2の好中球の回復の差は危険率0.02で有意であった。よって、P-糖蛋白陽性細胞の割合の低い症例2の方がdocetaxel投与後の好中球の回復が遅いという結果になった。この結果は、MDR1導入細胞の移植がdocetaxel投与後の患者の好中球の回復に有利に働いた可能性を示す。

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。

症例3は、原発性乳癌のため乳房切除術を施行されLHRH agonist, tamoxifen, 5'-FUdRによる術後補助療法を行ったが、その後鎖上リンパ節腫脹、肝臓の多発性転移を認め、リンパ節細胞診により乳癌再発と診断された。癌研にてweekly adriamycin, docetaxelによる寛解導入化学療法を行い、24コース終了時にCT、

echoにより鎖上リンパ節、肝臓ともにnear CRと判定された。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。この第3症例目の予定患者に対して末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入の2コースを完了した。平成13年11月の第1コース目の末梢血幹細胞採取では、第1日目に 1.05×10^8 個、第2日目に 1.56×10^8 個、第3日目に 1.56×10^8 個のCD34陽性細胞が得られた。このうち第2日目に採取された細胞を用いてCD34陽性細胞の精製を行ったところ、 1.24×10^8 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8%にP-糖蛋白の高発現が認められた。 1.52×10^8 個の細胞が患者に戻す細胞として凍結保存された。平成15年1月に施行された第2コース目の末梢血幹細胞採取では、第1日目に 4.4×10^7 個、第2日目に 2.1×10^7 個のCD34陽性細胞が得られた。このうち第2日目に採取された細胞を用いてCD34陽性細胞の精製を行ったところ、 1.0×10^7 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10%にP-糖蛋白の高発現が認められた。 1.4×10^7 個の細胞が患者に戻す細胞として凍結保存された。これまで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。

抗癌剤耐性に関与するABC輸送体で、野生型より強い抗癌剤耐性を示す変異体を作成して耐性遺伝子治療に用いる目的で、Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)の種々の変異体を作成した。BCRPはN末にATP結合領域、C末に6回膜を貫通する領域が存在する。野生型BCRPを発現した細胞はmitoxantroneやSN-38、topotecan等の抗癌剤に耐性を示すが、doxorubicinには耐性を示さない。BCRPの膜貫通領域に存在する3つの荷電アミノ酸、E446、R482、H630に着目し、これらのアミノ酸を荷電の異なる種々のアミノ酸に置換した変異体を28個作成して、交差耐性パターンの変化について調べた。7個のE446変異BCRP cDNA (E→A、D、G、H、K、R、S)を導入したPA317細胞では、ほとんどの細胞でBCRPを発現していたがmitoxantroneとSN-38に耐性を示さなかった。15個のR482変異BCRP cDNAを導入した細胞のうち13個(R→N、C、M、S、T、V、A、G、E、W、D、Q、H)では野生型BCRP導入細胞に比べmitoxantroneとdoxorubicinの両薬剤に高い耐性を示した。R482Yでは野生型と類似した交差耐性パターンを示した。また、R482Kではmitoxantrone、SN-38に対する耐性は失われた。6個のH630変異BCRP cDNA導入細胞では、BCRPタンパク質の発現の減少がみられ、そのうち2

個(H→K、R)ではBCRPの発現がみられなかった。野生型BCRP導入細胞に比べ、H630E変異BCRP導入細胞ではmitoxantroneに対する耐性には変化はみられなかったが、SN-38に対する耐性は低下した。BCRP阻害効果を有すると報告されているestroneとfumitremorgin Cによる抗癌剤耐性の阻害を調べたところ、野生型BCRP導入細胞と同様にR482SとR482G変異BCRP導入細胞では抗癌剤耐性の阻害がみられた。また、これらの細胞では $[^3\text{H}]$ mitoxantroneの細胞内蓄積が減少していた。以上より、R482S変異BCRP、R482G変異BCRPなどは野生型に比べてmitoxantrone、doxorubicinに高い耐性を示すことから、正常造血幹細胞にこれらのR482変異BCRP遺伝子を導入することで、野生型BCRP遺伝子を導入した場合よりも強い骨髄保護効果が得られると期待される。

D. 考察

「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、症例1は移植後1年11ヶ月、症例2は移植後1年5ヶ月が経過している。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。移植後に末梢白血球の3%から5%がP-糖蛋白陽性であった。その後平成13年6月より平成14年2月までに10コースのdocetaxel治療を行ったところ、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ながら次第にその割合を増した。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%、抗癌剤投与後でほぼ10%に到達した。その後docetaxel治療なしで1ヶ月に1回の経過観察を1年間にわたって続けているが、この全期間にわたって、患者末梢血には1~3%のP-糖蛋白陽性細胞が検出されている。症例2において移植直後に3%あったP-糖蛋白陽性細胞が移植後6ヶ月でほぼ消失したことに比べれば、現在の症例1にみられる末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞は比較的安定である。これは、比較的未分化な造血幹細胞にMDR1遺伝子導入がなされ、この細胞が自己複製と分化増殖を繰り返しているためと考えられる。

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。移植後5日目に末梢白血球の3%がP-糖蛋白陽性であった。その後約1ヶ月で末

梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は1%以下になったが、この減少の様子は症例1とほぼ同様であった。症例1と症例2の最大の違いは、症例1では移植2ヶ月後に docetaxel 治療を開始したのに対し、症例2では患者の意向で移植後 docetaxel 治療の開始まで約7ヶ月の間隔があったことである。その間、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は減少を続け、平成14年4月頃にはPCRを行っても患者末梢血中のMDR1遺伝子陽性細胞が全く検出されない状態になった。このことは、P-糖蛋白陽性細胞の増幅は docetaxel 投与によってのみ起こり、docetaxel を投与されない場合はP-糖蛋白陽性細胞の割合は次第に減少してなくなっていくことを示している。

症例2に対し、平成14年5月より平成14年8月までに5コースの docetaxel 治療を行った。この docetaxel 投与によりそれまで検出限界以下であった患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞、MDR1 遺伝子陽性細胞が頻度は低いが検出されるようになり、症例2においても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示唆された。症例2では docetaxel 治療開始直前の末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合は0.01%以下であったと推定される。その後、docetaxel 投与に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、4回目、5回目の docetaxel 投与後には末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞は1%に達した。これは、数字上は100倍の増幅が起こったことになる。症例1では末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の増幅は最大10倍程度であったため、症例2の方が高い増幅効率を示した。これは症例2の末梢血中にP-糖蛋白陽性細胞が消えたときにも骨髓中にMDR1 遺伝子を導入された造血幹細胞があまり分裂しない状態で存在し、この細胞の増殖が docetaxel 刺激により活発化した可能性を示唆する。

本遺伝子治療研究では10名の患者に対して遺伝子導入細胞の移植を行う。しかしながらMDR1 遺伝子導入細胞の移植による白血病化などの重大な副作用の発生の危惧より、最初に3名の患者に対して遺伝子導入細胞の移植を行い、その後半年間の経過観察を行ってMDR1 遺伝子導入細胞の異常増殖などの有害反応が起きないことを確認した上で、残りの7名の患者に対して遺伝子導入細胞の移植を行うという計画とした。したがって臨床研究としては最初の3名での研究が早期第1相研究、その後の7名を含めた10名の患者での研究が第1相研究および早期第2相研究にあたる。

これまでに遺伝子導入細胞の移植を受けた患者は2名であり、本研究は未だ早期第1相研究の途上である。したがって現時点で本臨床研究の効果を議論す

るのは妥当ではないが、これまで述べた結果は少なくとも本臨床研究の遂行を支持していると考えられる。

次に、フランスで起こった遺伝子治療の有害事象について述べる。平成14年度に、X-SCID 遺伝子治療において、2名の患者が白血病様症状を発症した。X-SCID (X染色体性重症複合免疫不全症) は、共通 γ 鎖(γ c) 遺伝子の異常によっておこる先天性の疾患である。X-SCID の患者では、共通 γ 鎖の異常のためにインターロイキン-2 (IL-2)、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15の各受容体が全て機能不全になり、その結果として免疫担当細胞であるTリンパ球、NK (ナチュラルキラー) 細胞の欠失とBリンパ球の機能不全をおこす。すなわち、免疫を担うリンパ球がほとんど機能しない、という疾患である。この病気に対してはこれまでは骨髓移植以外に有効な治療法はなく、骨髓移植を施行しない患者は乳幼児期に死亡する。

フランスのネッカー小児病院のFischer博士らは、レトロウイルスベクターMFG/ γ cを用いてX-SCID患者の自家骨髓由来CD34陽性細胞へ正常な γ c遺伝子を導入して患者へ移植する遺伝子治療を平成11年3月より開始した。これまでに11例の患者に遺伝子治療を行ったところ、9例で免疫不全症が完全に修復され、致死的な感染症への罹患がなくなったと報告された。この結果は平成12年4月のScience誌に掲載され、遺伝子治療の最大の成功例として世界中の注目を集めた。

この遺伝子治療の第4例目の患者が、白血病を発症した。この患者は平成11年10月に生後1カ月で遺伝子治療を受けたところ、早期にTリンパ球が正常化し、平成11年末よりは普通の生活を送っていた。平成14年4月に $\gamma\delta$ T細胞増殖症(5,000/ μ l)が発見され、その直後に水痘に感染した。この水痘感染を契機にT細胞が50,000/ μ lに増加した。平成14年8月になってT細胞が急激に増えて300,000/ μ lに達し、脾腫と血小板減少が見られたため、化学療法を施行した。現在患者の状態は良好である。

患者で増殖したT細胞では、11番染色体のLMO-2遺伝子にレトロウイルスが1コピー挿入され、LMO-2が高発現していた。LMO-2高発現マウスの15%がT細胞腫をおこすことから、LMO-2は癌遺伝子と考えられている。また、白血病期では、t(6;13)の染色体転座も認められた。今回の事例には、レトロウイルスのLMO-2部位への挿入による活性化、水痘持続感染によるT細胞の増殖刺激、家系内に2症例の髄芽腫をもつ患者の遺伝的背景、などが相互に関与したと考えられる。

癌研では平成14年11月27日に、フランスでの第1例目の有害事象の発生を受けて、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審議を行い、その結果、癌研の審査委員会より、癌研の3例目以降の遺伝子治療について、慎重に進めてよいという承認を得た。また、この時にインフォームド・コンセントの改訂を行い、この改訂についても審査委員会の承認を得た。この改訂版のインフォームド・コンセントを用いて対象患者に説明を行った。

しかしながら、平成15年1月にフランスでの第2例目の有害事象が明らかとなった。米国FDAでは、レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞を対象とした遺伝子治療のすべてを一時凍結した。癌研の研究グループはこれを受けて、当面、遺伝子導入細胞の移植を差し控えることを決定した。

今後は、国内および諸外国における遺伝子治療の臨床研究の動向を見ながら、また監督官庁の意向を伺いながら、可能であれば本遺伝子治療臨床研究を慎重に再開したいと考えている。

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い、さらに遺伝子治療に基づいたdocetaxel治療を行った。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、1年半から2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。両症例とも、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

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Sato, S., Suzuki, M., Nunoi, H., Malech, H. L., Gottesman, M. M., and Tsuruo, T. Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 *in vivo* from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91. *J. Gene Med.* in press.
- Hong, Y., Yu, S. S., Kim, J. M., Lee, K., Na, Y. S., Whitley, C. B., Sugimoto, Y., Kim, S. Construction of a

high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome. *J. Gene Med.*, 5: 18-29, 2003.

- Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Imai, Y., Sugimoto, S., and Tsuruo, T. Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists. *Mol. Cancer Ther.*, 2: 105-112, 2003.
 - Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., and Baba, M. Breast cancer resistance protein (BCRP) induces resistance to HIV-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Mol. Pharmacol.*, 63: 65-72, 2003.
 - 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.*, 93: 231-235, 2002.
 - Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki, Y., and Sugimoto, Y. C421A polymorphism in the human breast cancer resistant protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance. *Mol. Cancer Ther.*, 1: 611-616, 2002.
 - Horie, K., Tomida, A., Sugimoto, Y., Yasugi, T., Yoshikawa, H., Taketani, Y., and Tsuruo, T. SUMO-1 conjugation to intact DNA topoisomerase I amplifies cleavable complex formation induced by camptothecin. *Oncogene*, 21: 7913-7922, 2002.
 - Che, X. F., Nakajima, Y., Sumizawa, T., Ikeda, R., Ren, X. Q., Zheng, C. L., Mukai, M., Furukawa, T., Haraguchi, M., Gao, H., Sugimoto, Y., Akiyama, S. Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a newly synthesized 1,4-benzothiazipine derivative, JTV-519. *Cancer Lett.*, 187: 111-119, 2002.
- ##### 2. 学会発表
- Sugimoto, Y., Takahashi, S., Nakane, M., Mitsuhashi, J., Tsukahara, S., Nagamine, T., Minowa, S., Shibata, H., Ito, Y., Hatake, K., Tsuruo, T., Horikoshi, N., and Aiba, K. A clinical study of MDR1 gene therapy. Proceedings of the 93rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 752, 2002.
 - Imai, Y., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. Estrone and 17 β -Estradiol reverse BCRP-

mediated drug resistance. Proceedings of the 93 rd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 952, 2002.

- ・ Sugimoto, Y., Takahashi, S., Nakane, M., Mitsuhashi, J., Tsukahara, S., Nagamine, T., Minowa, S., Shibata, H., Ito, Y., Hatake, K., Tsuruo, T., Horikoshi, N., and Aiba, K. Evidence for the expansion of the *MDR1*-transduced cells *in vitro* in a clinical study of *MDR1* gene therapy against breast cancer. Proceedings of the 8th Annual Meeting of the Japan Society of Gene Therapy, 27, 2002.
- ・ 今井康雄, 鶴尾隆, 杉本芳一. Estrone と Estradiol による BCRP の抗癌剤耐性の克服. 第 6 回がん分子標的治療研究会総会記事, 62 頁, 2002 年
- ・ 堀江弘二, 富田章弘, 杉本芳一, 鶴尾隆. Camptothecin (CPT) による DNA Topoisomerase 1/SUMO-1 結合の Cleavable Complex 形成及び細胞死誘導における意義. 第 6 回がん分子標的治療研究会総会記事, 64 頁, 2002 年
- ・ 三輪みゆ, 杉本芳一. BCRP の膜貫通領域の変異体の解析. 第 6 回がん分子標的治療研究会総会記事, 67 頁, 2002 年
- ・ 杉本芳一, 鶴尾隆, 畠清彦, 相羽恵介. *MDR1* 遺伝子治療の臨床研究. 第 6 回がん分子標的治療研究会総会記事, 82 頁, 2002 年
- ・ 杉本芳一, 高橋俊二, 伊藤良則, 塚原里美, 箕輪さゆり, 柴田はるみ, 鶴尾隆, 畠清彦, 相羽恵介. *MDR1* 遺伝子治療の臨床研究. 第 61 回日本癌学会総会記事, 39 頁, 2002 年
- ・ 馬島哲夫, 大原智子, 楊莉玲, 佐藤重男, 望月美妃子, 杉本芳一, 矢守隆夫, 鶴尾隆. ヒト固形癌におけるアポトーシス実行系の失活と腫瘍形成および薬剤耐性への関与. 第 61 回日本癌学会総会記事, 92 頁, 2002 年
- ・ 今井康雄, 塚原里美, 石川悦子, 浅田咲世, 鶴尾隆, 杉本芳一. Estrone, estradiol は BCRP による抗癌剤耐性を克服する. 第 61 回日本癌学会総会記事, 164 頁, 2002 年
- ・ 古川龍彦, 任曉琴, 杉本芳一, 秋山伸一. BCRP 発現細胞でのエイズ薬耐性. 第 61 回日本癌学会総会記事, 164 頁, 2002 年
- ・ 鹿毛久身江, 今井康雄, 塚原里美, 石川悦子, 鶴尾隆, 三木義男, 杉本芳一. BCRP の発現に影響を与える SNPs の同定. 第 61 回日本癌学会総会記事, 164 頁, 2002 年
- ・ 塚原里美, 杉本芳一, 鶴尾隆, 杉本芳一. 抗 estrogen 剤による BCRP の抗癌剤耐性の克服. 第 61 回日本癌学会総会記事, 434 頁, 2002 年
- ・ 三輪みゆ, 杉本芳一, 塚原里美. BCRP 膜貫通領域の荷電アミノ酸は抗癌剤認識に重要である. 第 61 回日本

癌学会総会記事, 434 頁, 2002 年

- ・ 石川悦子, 今井康雄, 鹿毛久身江, 塚原里美, 鶴尾隆, 三木義男, 杉本芳一. ヒト BCRP 遺伝子の遺伝子多型 (SNPs) の同定と頻度解析. 第 61 回日本癌学会総会記事, 434 頁, 2002 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- ・ 出願番号: 特願 2002-145926
名称: 細胞の抗癌剤感受性の判定法
出願日: 2002 年 5 月 21 日
発明者: 杉本芳一, 塚原里美, 今井康雄
特許出願人: 財団法人癌研究会
- ・ 出願番号: 特願 2002-286577
名称: 抗癌剤耐性克服剤
出願日: 2002 年 9 月 30 日
発明者: 杉本芳一, 塚原里美, 杉本芳一
特許出願人: 大鵬薬品工業株式会社, 財団法人癌研究会
- ・ 出願番号: 特願 2003-026856
名称: 乳癌耐性蛋白阻害剤
出願日: 2003 年 2 月 4 日
発明者: 山崎竜太, 西山由紀子, 古田富雄, 松崎健, 旗野博, 長岡正人, 相山律男, 杉本芳一
特許出願人: 株式会社ヤクルト本社
- ・ 出願番号: 特願 2003-026857
名称: 乳癌耐性蛋白阻害剤
出願日: 2003 年 2 月 4 日
発明者: 山崎竜太, 西山由紀子, 古田富雄, 松崎健, 旗野博, 長岡正人, 相山律男, 杉本芳一
特許出願人: 株式会社ヤクルト本社

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 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

「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。

平成 13 年度に、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。移植後 7 日目より末梢白血球の 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 月より平成 14 年 2 月までにこの患者に 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 1 に対しては平成 14 年度はほぼ 1 ヶ月に 1 度の割合で外来での経過観察を行っている。末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞の割合は docetaxel 治療の後期に比べて若干減少したが、docetaxel 治療を終了して約 1 年後の平成 15 年 2 月でも 2% から 3% 程度の陽性率を維持している。

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。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。移植後 5 日目より末梢白血球の 3% 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徐々に減少を続けた。この症例 2 では患者の意向で移植後 docetaxel 治療の開始まで約 7 ヶ月の間隔があった。その間、患者末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞の割合はさらに減少を続け、平成 14 年 4 月頃には PCR を行っても患者末梢血中の MDR1 遺伝子陽性細胞が全く検出されない状態になった。その後、平成 14 年 5 月より平成 14 年 8 月までにこの患者に 5 コースの docetaxel 治療を行った。この docetaxel 投与によりそれまで検出限界以下であった患者末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞、MDR1 遺伝子陽性細胞が頻度は低いながら検出されるようになり、4 回目、5 回目の docetaxel 投与後には末梢血中の P-糖蛋白陽性細胞は 1% に達した。このことは、症例 2 においても 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を示す。同時に、P-糖蛋白陽性細胞の増幅は docetaxel 投与によってのみ起こり、docetaxel を投与されない場合は P-糖蛋白陽性細胞の割合は次第に減少してなくなっていくということも示された。両症例とも、乳癌の転移病巣が化学療法により消失してから 1 年以上を経過しているが、再発の兆候は見られていない。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。また、MDR1 遺伝子導入細胞の異常な増殖は観察されなかった。

新たに登録された症例 3 の予定患者に対して 2 コースの末梢血幹細胞採取 + MDR1 遺伝子導入を行い、移植に十分な末梢血幹細胞の採取と凍結を完了した。

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。

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。平成13年度は2人の患者にMDR1遺伝子導入細胞の移植を行った。症例1については、docetaxel治療まで終了し、本年度はその後の経過観察を続けた。症例2については、本年度にdocetaxel治療を行い、遺伝子治療の効果を検証した。また、新たに登録された症例3の予定患者に対して2コースの末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入を行い、移植に十分な末梢血幹細胞の採取と凍結を完了した。

(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

これまでに3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了承の後、症例登録がなされた。これまでにそのうちの2症例に対して遺伝子治療が行われている。症例3についてはMDR1遺伝子導入細胞の移植のための準備が終了しているが、まだ移植はされていない。

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。移植後7日目より末梢白血球の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月より平成14年2月までにこの患者に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1に対しては平成14年度はほぼ1ヶ月に1度の割合で外来での経過観察を行っている。末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合はdocetaxel治療の後期に比べて若干減少したが、docetaxel治療を終了して約1年後の平成15年2月でも2%から3%程度の陽性率を維持している。症例1は、乳癌の肺転移病巣が化学療法により消失してから1年以上を経過しているが、再発の兆候は見られていない。

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。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。移植後5日目より末梢白血球の3%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徐々に減少を続けた。この症例2では患者の意向で移植後docetaxel治療の開始まで約7ヶ月の間隔があった。その間、患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞の割合はさらに減少を

続け、平成14年4月頃にはPCRを行っても患者末梢血中のMDR1遺伝子陽性細胞が全く検出されない状態になった。その後、平成14年5月より平成14年8月までにこの患者に5コースの docetaxel 治療を行った。この docetaxel 投与によりそれまで検出限界以下であった患者末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞、MDR1遺伝子陽性細胞が頻度は低いながら検出されるようになり、4回目、5回目の docetaxel 投与後には末梢血中のP-糖蛋白陽性細胞は1%に達した。このことは、症例2においても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を示す。同時に、P-糖蛋白陽性細胞の増幅は docetaxel 投与によってのみ起こり、docetaxel を投与されない場合はP-糖蛋白陽性細胞の割合は次第に減少してなくなっていくということも示された。症例2は、乳癌のリンパ節転移病巣が化学療法により消失してから1年以上を経過しているが、再発の兆候は見られていない。

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。また、MDR1遺伝子導入細胞の異常な増殖は観察されなかった。

平成14年10月には新たに第3症例目となる予定の患者よりインフォームド・コンセントが得られ、遺伝子治療の予定患者として登録された。この患者の登録は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の小委員会です承され、さらに11月27日の審査委員会でもこの第3症例の患者に対する遺伝子治療の実施が改めて承認された。

この第3症例目の予定患者に対して末梢血幹細胞採取+MDR1遺伝子導入の2コースを完了した。11月18日より20日までの第1コース目の末梢血幹細胞採取では、第1日目に 1.05×10^8 個、第2日目に 1.56×10^8 個、第3日目に 1.56×10^8 個のCD34陽性細胞が得られた。このうち第2日目に採取された細胞を用いてCD34陽性細胞の精製を行ったところ、 12.4×10^8 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8%にP-糖蛋白の高発現が認められた。 1.52×10^8 個の細胞が患者に戻す細胞として凍結保存された。平成15年1月23日と24日に施行された第2コース目の末梢血幹細胞採取では、第1日目に 4.4×10^7 個、第2日目に 2.1×10^7 個CD34陽性細胞が得られた。このうち第2日目に採取された細胞を用いてCD34陽性細胞の精製を行ったところ、 1.0×10^7 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10%にP-糖蛋白の高発現が認められた。 1.4×10^8 個の細胞が患者に戻す細胞として凍結保存された。これまで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。

D. 考察

現在迄に3症例が登録され、本研究が進行している。3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3例共に有用であり、また副作用は比較的軽微で、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1、第3症例目は有効に採取し得た。大量化学療法を施行した第1、2例では血液毒性以外は重篤な副作用はなく安全に施行され、2症例ともに病変の軽快傾向が認められた。

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。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ことを示唆するものである。Docetaxel 治療終了後はP-糖蛋白陽性細胞は減少したが維持されており、MDR1遺伝子導入細胞が長期に生着しうるということが明らかになった。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。

第2症例では平成13年10月にMDR1遺伝子導入細胞の移植が行われた。移植から後治療まで半年以上経過したため docetaxel 治療開始前には末梢白血球中のP-糖蛋白陽性細胞は検出できないレベルまで低下し、そのためか骨髄抑制が docetaxel 5サイクルの治療中にやや悪化する傾向が見られた。しかし docetaxel 治療に伴い、P-糖蛋白陽性細胞は検出可能となり、移植したMDR1遺伝子導入細胞の生着が確認されるとともに、docetaxelによるMDR1遺伝子導入細胞の *in vivo* での増幅を示唆する所見であった。

2症例を比較して、MDR1による骨髄保護作用については、docetaxel治療開始前からP-糖蛋白陽性細胞は検出可能であった第1症例の方が治療前に検出不能になっていた第2例より骨髄抑制が軽度であったことから、期待されはするがもちろん確実なものではない。今後さらに症例を積み重ね、あるいは全移植細胞にMDR1遺伝子導入を行うことにより、実際の効果が明らかになると期待される。

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。

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年度に登録された第2症例に対して、遺伝子治療に基づいた docetaxel 治療を行った。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、1年半から2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、患者の癌病巣がほぼ消失するという状態は大量化学療法終了1年9ヶ月、1年3ヶ月にわたって維持されている。両症例とも、一連の治療スケジュール実施に伴う副作用に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。また、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。第3症例も登録、末梢血幹細胞採取、遺伝子導入・凍結保存が行われ、遺伝子治療の準備が終了している。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Koizumi, M., Takahashi, S., Ogata, E. Bone metabolic markers in bisphosphonate therapy for skeletal metastases in patients with breast cancer. *Breast Cancer*, 10: 21-7, 2003.
- ・ Sugiyama, K., Omachi, K., Fujiwara, K., Saotome, T., Mizunuma, N., Takahashi, S., Ito, Y., Aiba, K. and Horikoshi, N. Irinotecan hydrochloride for recurrent and refractory non-hodgkin's lymphoma: Single institution experience. *Cancer*, 94 (3): 594-600, 2002.
- ・ 高橋俊二, PTHrP に対する抗体治療 . カレントテラピー, 20 (1): 51-57; 2002.
- ・ 高橋俊二, 癌と PTHrP. In 'PTH/PTHrP の基礎と臨床 - 発生, 進化から骨粗鬆症治療まで -'. 医薬ジャーナル社, 2002.
- ・ 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, 荒川哲也, 宮里昌代, 奥平多恵子, 堀越昇, 島清彦 . Herceptin (trastuzumab) が奏効した乳癌皮膚転移の一例 . *Biotherapy*, 16 (1): 87-90, 2002.

2. 学会発表

- ・ Takahashi, S., Koizumi, A. M., and Ogata, E. Prospective follow-up study of biochemical markers of bone metabolism for diagnosis of bone metastases of early breast cancer. 2002 Meeting of American Society of Bone and Mineral Research.
- ・ 高橋俊二, 伊藤良則, 入江哲也, 相羽恵介, 堀越昇, 澤木正孝, 島清彦, 多田敬一郎, 霞富士雄 . 再発進行乳癌における anastrozole の治療成績 . 第10回日本乳癌学会, 2002年
- ・ 高橋俊二, 尾形悦郎 . Bone morphogenetic protein (BMP) による乳癌細胞増殖抑制の機序 . 第61回日本癌学会総会, 2002年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし。

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 畠 清彦 財団法人癌研究会 癌化学療法センター 臨床部 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なぜか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は大量化学療法終了時点でCRに入っており、平成14年5月より docetaxel による後療法を5サイクル施行したが、遺伝子導入から半年以上経過し耐性遺伝子の発現が低かったためか第1例よりも骨髄抑制は強かった。治療終了後もCRを維持している。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。現在第3症例を登録、末梢血単核細胞の採取と一部CD34陽性細胞への耐性遺伝子導入を終了し、遺伝子治療の開始を待っている状況である。

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、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旺、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、遺伝子治療を受けた。続いて1例が平成14年10月に登録され、遺伝子治療の準備を行った。

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ールに従い、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。経過中血液毒性以外の副作用として、grade 1の末梢神経障害、筋肉痛が認められた。その後tamoxifenの投与を開始し、平成14年12月のCTにてCRが確認され、血液学的所見は正常化している。

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、tamoxifen、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いた。患者の意向のため、大量化学療法の約7ヶ月後から寛解地固め目的にてdocetaxelによる後療法を通常量の50% ($30\text{mg}/\text{m}^2$) から開始し

た。docetaxel 1 サイクル目開始時の好中球数 (ANC) 1680/ μ l、白血球数 (WBC) 4000/ μ l、最低値はANC 736、WBC 2300であった。2 サイクル目は docetaxel (TXT) を 75% (45mg/m²) に増量して投与したが、最低値はANC 240、WBC 2000 とグレード 4 の好中球減少が認められたため、G-CSF による支持療法を 4 日間施行した。3 サイクル目からは外来にて 75% 量で施行したが、ANC 475 と同様のグレード 4 の副作用が認められたため、G-CSF を 2 日間投与した。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 サイクル目の最低値はANC 195、WBC 1500、5 サイクル目はANC 276、WBC 1500 であった。docetaxel 治療は 5 サイクルで終了し、2002 年 8 月 27 日より tamoxifen による治療を開始した。docetaxel 治療の経過中、血液毒性以外の副作用として、grade 1 の嘔気、脱毛、口内炎が認められた。そして平成 15 年 1 月 24 日、胸部 CT にて CR を持続しており、血液学的所見では grade 1 の貧血、顆粒球減少のみが認められている。

症例 3 は、原発性乳癌のため乳房切除術を施行され LHRH agonist、tamoxifen、5' dFuR による術後補助療法を行ったが、その後鎖上リンパ節腫脹、肝臓の多発性転移を認め、リンパ節細胞診により乳癌再発と診断された。癌研にて weekly adriamycin、docetaxel による寛解導入化学療法を行い、24 コース終了時に CT、echo により鎖上リンパ節、肝臓ともに near CR と判定された。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 1.05×10^8 個採取した。第 2 日目は CD34 陽性細胞を 1.56×10^8 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 1.56×10^8 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 4.4×10^7 個採取、第 2 日目は CD34 陽性細胞を 2.1×10^7 個採取した。2 日目の細胞を MDR1 遺伝子導入に用いた。いずれも液体窒素下凍結保存とした。血液毒性以外の副作用として grade 2 の嘔気・嘔吐、grade 1 の不整脈が認められた。平成 15 年 1 月までに十分な末梢血幹細胞、遺伝子導入細胞が得られ、大量化学療法、遺伝子導入細胞の移植を待っている状況である。

D. 考察

現在迄に 3 症例が登録され、本研究が進行している。3 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、不整脈があったが、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 1、第 3 症例目は有効に採取し得た。大量化学療法を施行した 2 症例では安全かつ有効に施行されており、2 症例ともに病変の軽快傾向が認められた。その後の docetaxel による後療法が施行され、安全に施行可能であった。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 14 年 10 月迄に 3 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。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

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Teranishi, A., Akada, S., Saito, S., Hatake, K., Morikawa, H. Macrophage Colony-stimulating factor restored chemotherapy-induced granulocyte dysfunctions: role of IL-8 production by monocytes. *International Immunopharmacology*, 2: 83-94, 2002.
- Mishima, Y., Terui, Y., Mishima, Y., Katsuyama, M., Mori, M., Tomizuka, H., Takizawa, T., Miyazato, A., Ueda, M., Yamada, M., Hayasawa, H., Mizunuma, N., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Kato, T., Ozawa, K., Hatake, K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein

- kinase IV. *J. Cellular physiology*, 191: 183-190, 2002.
- ・ Mishima, Y., Matsumoto-Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., Hatake, K. Leukemic cell-surface CD13/aminopeptidase N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells. *JNCI*, 94 (13): 1020-1028, 2002.
 - ・ Watanabe, J., Hatake, K., Ogata, E. HTLV-I carrier status disclosed at diagnosis of cytomegalovirus gastric ulcer. *Leukemia & Lymphoma*, 43 (11): 2237-2239, 2002.
 - ・ Sanada, K., Igarashi, H., Shiraishi, H., Hatake, K., Momoi, M. Y. Increased serum granulocyte colony-stimulating factor correlates with coronary dilatation in Kawasaki disease. *Eur. J. Pediatr*, 161: 538-541, 2002.
 - ・ Ikeda, T., Saito, K., Kuwada, N., Matsumura, T., Yamashita, T., Kimura, F., Hatake, K., Ikeda, K., Motoyoshi, K. Interleukin-10 differently regulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression depending on the environment in a human monoblastic cell line, UG3. *Journal of Leukocyte Biology*, 72: 1198-1205, 2002.
 - ・ 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, 梶清彦. Herceptin (trastuzumab)が奏効した乳癌皮膚転移の1例. *Biotherapy*, 16 (1): 87-90, 2002.
 - ・ 梶清彦. 癌治療の最前線 - 新しい薬剤から -. *カレントセラピー*, 20 (1): 7, 2002.
 - ・ 梶清彦. これからの新薬開発と現状 (座談会). *カレントセラピー*, 20 (1): 72-79, 2002.
 - ・ 梶清彦. 血液幹細胞の臨床応用. *現代医療*, 34 (1): 205-209, 2002.
 - ・ 梶清彦. がんに伴う貧血. *緩和医療学講座*, 4 (1): 63-69, 2002.
 - ・ 梶清彦, 上田隆三, 薄井紀子, 堀田知光. 標準治療の推進と medical oncology 研修のあり方 (座談会). *カレントセラピー*, 20 (2): 80-90, 2002.
 - ・ 梶清彦. 癌治療の最前線 - 標準治療編 -. *カレントセラピー*, 20 (2): 7, 2002.
 - ・ 渡邊純一郎, 梶清彦. 悪性リンパ腫治療の進歩. *治療*, 84 (2): 119-124, 2002.
 - ・ 梶清彦. 抗癌剤投与における毒性発現の個人差とその対策. *Drug Delivery System*, 17 (2): 113-118, 2002.
 - ・ 梶清彦. 患者さんへの説明用資料として構成. *FRONT WAVE in HEMATOLOGY*, 6 : 9, 2002.
 - ・ 武藤徹一郎, 吉田節子, 山口俊晴, 梶清彦. リスクマネジメントをめぐって (座談会). *カレントセラピー*, 20 (6): 100-110, 2002.
 - ・ 梶清彦. 化学療法科. *カレントセラピー*, 20 (6): 42-44, 2002.

- ・ 梶清彦. 分子標的薬剤は緩和的化学療法に有用か. *がん看護*, 7 (3): 182-185, 2002.
- ・ 梶清彦. 悪性リンパ腫: 非ホジキンリンパ腫 (成人). *FRONT WAVE in HEMATOLOGY*, 6 (1): 12-15, 2002.
- ・ 梶清彦. *Molecular Target Therapy. Pharma Medica*, 20: 11-12, 2002.
- ・ 梶清彦. 抗腫瘍薬の耐性. *臨床医*, 28 (7): 1652-1654, 2002.
- ・ 梶清彦. 抗癌剤治療の進歩と現状. *月刊がん・もつといい日*, 37: 14-17, 2002.
- ・ 関ゆかり, 梶清彦. 悪性リンパ腫に対する抗体療法. *現代医療*, 34 (12): 121-139, 2002.
- ・ 梶清彦. 外来化学療法. *日経メディカル*, 12 (421): 25, 2002.
- ・ 梶清彦. 好中球減少を主徴とする骨異形成症候群のうちの原発性不応性貧血のクリニカルパス. *血液フロンティア*, 12 (12): 15-19, 2002.
- ・ 梶清彦. Rituximab 治療の問題点と今後. *血液フロンティア*, 12 (11): 65-71, 2002.
- ・ 多田敬一郎, 伊藤良則, 梶清彦. 《緩和ケアとケア (3): 緩和的化学療法の現在》乳がんにおける緩和的化学療法. *がん看護*, 7 (3): 204-207, 2002.

2. 学会発表

- ・ 澤木正孝, 伊藤良則, 相羽恵介, 荒川泰弘, 奥平多恵子, 入江哲也, 渡邊純一郎, 水沼信之, 高橋俊二, 堀越昇, 梶清彦, 多田敬一郎, 多田隆士, 霞富士雄, 秋山太, 坂本吾偉. Anthracycline を安全に使用しえた Marfan syndrome 合併異時性両側乳癌の一例. 第10回日本乳癌学会, 2002年
- ・ 梶清彦. がん分子標的治療薬の新しい展開. 座談会 (薬事日報), 2002年
- ・ 奥平多恵子, 渡邊純一郎, 三嶋祐子, 宮里昌代, 入江哲也, 相羽恵介, 梶清彦, 山本智理子. 好酸球増多および eotaxin の増加を認めた T cell lymphoma. 第44回日本臨床血液学会, 2002年
- ・ 荒川泰弘, 高橋俊二, 水沼信之, 入江哲也, 渡邊純一郎, 梶清彦, 尾形悦郎. 下垂体性下垂体前葉機能低下症を来した縦隔原発悪性リンパ腫. 第499回日本内科学会関東地方会, 2002年
- ・ 堀越昇, 佐々木康綱, 佐々木常雄, 相羽恵介, 南博信, 河田健司, 藤井博文, 五十嵐忠彦, 石澤賢一, 伊藤国明, 白淵紀子, 衣斐寛倫, 佐伯俊昭, 重岡靖, 前田義治, 小林建彦, 岡元るみ子, 小室泰司, 梶清彦, 入江哲也. HMR1275 (Flavopiridol) の第I相試験. 第61回日本癌学会総会, 2002年
- ・ 澤木正孝, 奥平多恵子, 荒川泰之, 水沼信之, 梶清彦, 上野雅資, 山口俊晴, 武藤徹一郎, 高橋豊, 磨伊正義.

- ・ 転移を有する大腸癌に対する CPT-11 の少量分割投与の試み. 第 57 回消化器外科学会, 2002 年
- ・ 三嶋祐子, 三嶋雄二, 山田宗夫, 早澤広紀, 島清彦. RAS inhibitor と ST1571 併用投与による K562 及び ST1571 耐性 K562 に対する細胞死誘導の検討. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 荒川泰之, 渡邊純一郎, 奥平多恵子, 三嶋雄二, 三嶋裕子, 水沼信之, 高橋俊二, 伊藤良則, 相羽恵介, 堀越昇, 島清彦, 山本智理子, 薄井紀子. rituximab を用いた低悪性度 B 細胞性リンパ腫の治療と副作用の解析. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 奥平多恵子, 三嶋雄二, 三嶋裕子, 荒川泰之, 渡邊純一郎, 水沼信之, 高橋俊二, 伊藤良則, 相羽恵介, 堀越昇, 島清彦, 薄井紀子, 増田昌人. T 細胞性悪性リンパ腫における好酸球増加の機序. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 島清彦, 入江哲也, 水沼信之, 高橋俊二, 伊藤良則, 相羽恵介, 堀越昇, 鎌田信悦. 進行嗅神経神経芽細胞腫に対する末梢血幹細胞移植を組み合わせた集学的治療の試み. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 三嶋雄二, 桜井琢磨, 鈴伸也, 三嶋祐子, 山田宗夫, 早澤宏紀, 島清彦. リンパ腫細胞に対するヒト化抗 CD20 モノクローナル抗体による CDC/ADCC の検討及び M-CSF 併用による影響. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 澤木正孝, 奥平多恵子, 荒川泰弘, 水沼信之, 高橋俊二, 伊藤良則, 島清彦, 上野雅資, 山口俊晴, 武藤徹一郎, 高橋豊, 磨伊正義. 転移を有する大腸癌に対する CPT-11 の少量分割投与の試み. 第 61 回日本癌学会総会, 2002 年
- ・ 三嶋祐子, 三嶋雄二, 山田宗夫, 早澤宏紀, 島清彦. TPA による K562 での autophagic cell death の誘導. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 2002 年
- ・ 三嶋雄二, 照井康仁, 三嶋祐子, 森政樹, 山田宗夫, 早澤宏紀, 島清彦. MDS RAEB 由来細胞株の樹立および G-CSF により誘導される遺伝子についての解析. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 2002 年
- ・ 三嶋雄二, 三嶋祐子, 島清彦. CD13/Aminopetidase-N (APN) による内皮細胞介在アポトーシス抵抗性の機序. 第 6 回がん分子標的治療研究会総会, 2002 年
- ・ 澤木正孝, 伊藤良則, 多田敬一郎, 永崎栄次郎, 渡邊純一郎, 入江哲也, 水沼信之, 高橋俊二, 堀越昇, 島清彦, 霞富士雄, 秋山太, 坂本吾偉. 転移性乳癌に対する Herceptin™ 単剤治療の経験. 第 61 回日本癌治療学会総会, 2002 年
- ・ 澤木正孝, 奥平多恵子, 荒川泰弘, 水沼信之, 島清彦,

- 上野雅資, 山口俊晴, 武藤徹一郎, 高橋豊, 磨伊正義. 転移を有する大腸癌に対する CPT-11 の少量分割投与の試み. 第 57 回日本消化器外科学会総会, 2002 年
- ・ 永崎栄次郎, 三嶋祐子, 渡邊純一郎, 高橋俊二, 島清彦. 胸水中に非ホジキンリンパ腫(NHL)細胞と乳癌細胞を同時に検出した 1 例. 第 64 回日本血液学会総会・第 44 回日本臨床血液学会総会, 2002 年

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌論文

著者氏名	論文タイトル名	出版社・発表雑誌名	巻・号、ページ 出版年
Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Sato, S., Suzuki, M., Nunoi, H., Malech, H. L., Gottesman, M. M., and Tsuruo, T.	Drug-selected co-expression of P-glycoprotein and gp91 <i>in vivo</i> from an MDR1-bicistronic retrovirus vector Ha-MDR-IRES-gp91.	J. Gene Med.	in press.
Sugimoto, Y., Tsukahara, S., Imai, Y., Sugimoto, S., and Tsuruo, T.	Reversal of breast cancer resistance protein-mediated drug resistance by estrogen antagonists and agonists.	Mol. Cancer Ther.	2: 105-112, 2003.
Hong, Y., Yu, S. S., Kim, J. M., Lee, K., Na, Y. S., Whitley, C. B., Sugimoto, Y., Kim, S.	Construction of a high efficiency retroviral vector for gene therapy of Hunter's syndrome.	J. Gene Med.	5: 18-29, 2003.
Koizumi, M., Takahashi, S., Ogata, E.	Bone metabolic markers in bisphosphonate therapy for skeletal metastases in patients with breast cancer.	Breast Cancer	10:21-27, 2003.
Wang, X., Furukawa, T., Nitanda, T., Okamoto, M., Sugimoto, Y., Akiyama, S., and Baba, M.	Breast cancer resistance protein (BCRP) induces resistance to HIV-nucleoside reverse transcriptase inhibitors.	Mol. Pharmacol.	63: 65-72, 2003.
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.	93: 231-235, 2002.
Imai, Y., Nakane, M., Kage, K., Tsukahara, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., Miki Y., and Sugimoto, Y.	C421A polymorphism in the human breast cancer resistant protein gene is associated with low expression of Q141K protein and low-level drug resistance.	Mol. Cancer Ther.	1: 611-616, 2002.