

スル病ウイルス (Newcastle Disease Virus; NDV)、水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV)、レオウイルス (Reovirus)、自己複製型パルボウイルス (B19, H1) 等について臨床研究、前臨床研究が行われている。

### (1) ニューカッスル病ウイルス (Newcastle Disease Virus; NDV)

パラミクソウイルス科に属する一本鎖 (-鎖) RNA ウイルスで、エンベロープを有する。鳥類のウイルスであり、通常ヒトには感染しないが、まれに感染するとインフルエンザ様症状を引き起こす。インターフェロン (IFN) に対抗するウイルス側の防御機構が備わっていないため IFN 高感受性であり、正常細胞では IFN により増殖が阻害されるが、癌細胞では IFN 応答が欠損している場合が多く、このような IFN 応答が欠損した癌細胞でのみ増殖して細胞を破壊する。

### (2) 水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus; VSV)

ラブドウイルス科に属する一本鎖 (-鎖) RNA ウイルスでエンベロープを有する。家畜の水疱性口内炎ウイルスで、通常はヒトには感染しないが、まれに感染するとインフルエンザ様症状を引き起こす。NDV と同様、IFN に高感受性であり、IFN 応答が欠損している癌細胞でのみ特異的に増殖可能である。

### (3) レオウイルス (Reovirus)

レオウイルス科の 2 本鎖 RNA ウイルスで、エンベロープはない。レオウイルスは呼吸器や消化管に感染するが、ほとんどは不顕性感染であり、12 歳で半数が、成人までにほとんどの人が感染して抗体を保有している。Ras が活性化した細胞でのみ増殖性を示すが、そのメカニズムは以下のとおりである。宿主の正常細胞で

は、ウイルスの感染、初期転写の結果生じる 2 本鎖 RNA (dsRNA) によって細胞内の double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) がリン酸化・活性化され、その結果として、蛋白合成開始因子 (eIF-2) の  $\alpha$  サブユニットがリン酸化・不活化されてウイルスの増殖を抑制するという抗ウイルス機構が備わっている。多くのウイルスは、PKR に対抗する防御のメカニズムをウイルス自身が持っているため、正常細胞でも増殖可能である。しかし、レオウイルスは抗 PKR メカニズムを持たないため、正常細胞では増殖できない。一方、癌細胞の多くで Ras の活性化が認められるが、Ras が活性化すると脱リン酸化酵素が活性化されて PKR が不活化される。従って、レオウイルスのように抗 PKR メカニズムを持たないウイルスでも Ras 活性化細胞では増殖可能となる。Ras の変異は全腫瘍の約 30% で認められ、Ras の上流の EGF 受容体や PDGF 受容体の変異を含めると全腫瘍の約 80% で Ras が活性化していると考えられることから、Ras の変異は癌特異的治療法の大きな標的となる(4)。なお、Ras の変異を標的とする制限増殖型ウイルスはレオウイルスに限るものではなく、ウイルスが抗 PKR 活性を持っている場合でも 2) の deletion targeting により抗 PKR 活性を失わせることで、Ras 依存的増殖型ウイルスが作成されている。

## 2.2 ウイルス遺伝子の欠失による癌細胞標的化 (Deletion targeting)

正常細胞におけるウイルスの増殖・複製には必須の遺伝子であるが、癌細胞ではその遺伝子の機能が補完されているために癌細胞でのウイルス増殖には不必要なウイルス遺伝子の除去・変異によりウイルスを弱毒化し、ウイルスの増殖を特定の癌細胞に限定する方法。ウイルスが増殖するためには細胞周期を静止期から DNA 合成期に動かす必要がある。癌細胞では

細胞周期を静止期に止めるためのチェックポイントとなる蛋白質の変異などにより増殖性が活性化されているため、ウイルスの増殖にも好都合であり、欠失変異ウイルスでも増殖可能である。一般的には遺伝子組換えにより作製されるが、自然変異株としても得られる可能性がある。1つのウイルスでも変異導入部位は数箇所検討されており、複数の変異を入れることによって特異的増殖の厳密性をより高めることも可能である。外来遺伝子を導入する必要はない。一方、この方法では野生型ウイルスに復帰する危険性がある。

アデノウイルス (Adenovirus)、単純ヘルペスウイルス(Herpes Simplex Virus; HSV)、ワクシニアウイルス (Vaccinia virus)、ポリオウイルス(Poliiovirus)、麻疹ウイルス (Measles virus)、センダイウイルス (Sendai virus) 等について研究が行われている。代表的なウイルスにおける変異の導入部位と制限増殖性のメカニズムを以下に示す。

#### (1)アデノウイルス (Adenovirus)

アデノウイルス科の2本鎖DNAウイルスでエンベロープを持たない。呼吸器感染症、咽頭結膜熱等を引き起こす風邪のウイルスである。多くの血清型があるが、ヒトアデノウイルス5型が遺伝子治療用ベクターとしてよく研究されている。ゲノムサイズは約36kbで、遺伝子治療にはアデノウイルスの増殖に必須の初期遺伝子 E1領域を欠損した非増殖性ウイルスが用いられる。

制限増殖型アデノウイルスの場合もE1領域 (E1A、E1Bをコード) に変異を入れたものが多い。E1蛋白質の細胞周期、増殖・停止シグナルにおける機能を図1に示す。E1Aは静止期の細胞をS期に誘導する因子で、細胞のRb蛋白質 (pRb) に結合する。pRbは、転写因子のE2Fと結合してその活性化を抑えているが、E1Aとの結合によりpRbは不活化され

てE2Fが遊離する。E2Fは細胞増殖に関する遺伝子上流に結合し、細胞周期をG1からS期に移行させる。一方、過剰に遊離したE2Fにより癌抑制遺伝子産物のp53の高発現が誘導され、そのままではウイルスの増殖前に細胞の増殖停止やapoptosisが誘導され、ウイルスの複製は阻害される。これに対して、アデノウイルスのもう一つの初期遺伝子E1Bから発現されるE1B55Kは、p53と結合することでその機能を抑え、細胞内でのウイルスの増殖を可能にする。またE1B19Kはp53の下流のBaxの作用を阻害する。制限増殖型アデノウイルスとしてE1A、E1Bの変異ウイルスが作製されている。

#### ①E1B55K

E1B55Kはp53と結合してその機能を抑制する分子であり、E1B55K欠損アデノウイルスはp53経路に変異がある細胞でのみ複製可能である。P53は癌の50%以上において変異が認められ、p53経路全体を含めるとさらに多くの癌が標的となりうる。

#### ②E1A conserved region 2

E1AはpRbと結合することでE2Fを遊離させるが、pRbとの結合領域であるE1Aのconserved region 2を除去した欠損ウイルスが作成されている (E1AΔCR2)。このウイルスはpRb経路に変異がある細胞でのみ増殖可能である。

#### ③VAI

アデノウイルスが細胞に感染すると、2本鎖DNAゲノムの両方向への転写によりdsRNAが産生される。一方で、アデノウイルスはPKRのアンタゴニストとなるvirus-associated (VA) RNAsを産生し、PKRの活性化を阻害する機構を有する。アデノウイルス5型ではVAIとVAIIの2種類のvirus-associated RNAが産生されるが、VAIのほうがPKR阻害活性が高く、蓄積量も多い。Ras活性化細胞でのみ腫瘍溶解性を示すVAI欠損アデノウイルスが作

成されている(5)。

## (2) 単純ヘルペスウイルス (Herpes Simplex Virus: HSV)

ヘルペスウイルス科に属する直鎖状 2 本鎖 DNA ウイルスで、正 20 面体のカプシドがエンベロープに覆われている。ゲノムサイズが約 150kbp と巨大であり、80 以上のウイルス蛋白質がコードされている。単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) は脳炎、口唇ヘルペス、角膜ヘルペス等を引き起こす。

チミジンキナーゼ、リボヌクレオチド還元酵素、 $\gamma$ 134.5 (ICP34.5; infected protein 34.5) などの変異により deletion targeting ウイルスが作成されている。野生型ウイルスへの復帰を抑え、癌細胞での特異性、安全性を高めるためにゲノム中に複数の変異を入れたものも作成されている。

### ①チミジンキナーゼ (TK)

DNA 合成に必須の酵素で、静止細胞では発現されていないが G1→S 期で発現が亢進される。野生型 HSV は中枢神経系で活発に増殖し、マウス脳内接種では数個の感染性ウイルスにより脳炎となるが、TK 欠損 HSV は神経細胞内では増殖できず、癌細胞など増殖性の高い細胞でのみ増殖可能である。

### ②リボヌクレオチド還元酵素 (ribonucleotide reductase、ICP6 遺伝子)

DNA 合成に必要な酵素で、静止細胞では発現されていないが G1→S 期で発現が亢進される。ICP6 遺伝子 (リボヌクレオチド還元酵素の large subunit) を欠損した HSV 癌細胞など増殖性の高い細胞でのみ複製可能である。

### ③ $\gamma$ 134.5 (ICP34.5; infected protein 34.5)

$\gamma$ 134.5 は HSV の神経病原性に大きく関与している因子で、PKR 脱リン酸化酵素を活性化し、PKR の阻害剤として働く。HSV 感染後の蛋白質合成系に対する PKR 依存的停止に対抗するウイルスの防御機構である。HSV には

2 つの  $\gamma$ 134.5 遺伝子がある。Ras が活性化した癌細胞では Ras により直接 PKR の作用が阻害するため  $\gamma$ 134.5 は不必要である。 $\gamma$ 134.5 欠損 HSV は Ras が活性化した細胞でのみ増殖性を示す。

## (3) ワクシニアウイルス (Vaccinia virus)

ポックスウイルス科の 2 本鎖 DNA ウイルスでエンベロープを有する。種痘ウイルスであり、高い免疫原性を有する。ゲノムサイズが 200kb と非常に大きいため、感染性を失わせることなく大きな遺伝子を挿入可能である。また、感染細胞内で核に移行せず細胞質内で転写、複製するため染色体への挿入変異の危険性がないことから遺伝子導入用ベクター、遺伝子ワクチンとしての研究が行われている。ワクシニアウイルスそのものは癌細胞選択性を持たないため、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子の除去、あるいは SPI-1、SPI-2 遺伝子の変異により制限増殖型ウイルスが作成されている。

## 2.3 転写レベルでの癌細胞標的化 (Transcriptional targeting)

癌細胞特異的、あるいは組織特異的なプロモーター、エンハンサーをウイルスに導入し、ウイルスの増殖に必須の蛋白質の発現を制御することで癌細胞選択的な増殖性を持たせる方法。表 1 に用いられているプロモーター・エンハンサーと標的となる癌の種類を示した。これらのプロモーター、エンハンサーは従来の遺伝子治療でも用いられており、方法論はよく研究されているが、外来遺伝子をウイルスに挿入する必要があること、プロモーターのシャットオフにより癌細胞内での増殖が停止する可能性があることが欠点となる。組織特異的プロモーターとしては、PSA プロモーター、AFP プロモーター、mucin-1 プロモーターなどが、また、広範な癌細胞で作動するプロモーターとしてテロメラゼプロモーターなどが用いられて

いる。転写レベルでのターゲティングはアデノウイルス、ヘルペスウイルスで多くの研究が行われている。

アデノウイルスの場合、ウイルスの増殖に必須の E1A をプロモーターで制御し、特定の癌細胞で選択的に発現させる方法や、E1A と E1B の発現を別々の癌特異的プロモーターで制御する方法などが用いられている。E1A に欠失変異を入れた E1A $\Delta$ CR2 を組織特異的プロモーターで制御することにより、pRb null/mutant でかつ特異的プロモーターが作動する癌細胞でのみ増殖性を持たせるなどの選択性を高める方法も研究されている。

ヘルペスウイルスの場合、初期遺伝子である ICP4 遺伝子の発現をアルブミンエンハンサー/プロモーターで制御し、肝臓及び肝細胞癌特異的に HSV が増殖をするものや、カルボニンプロモーターで制御するものなどが報告されている(6)。

## 2.4 細胞レベルでの癌細胞標的化 (Cellular targeting)

ウイルスのコート蛋白質を改変することにより癌細胞特異的な感染指向性を持たせる方法。この方法ではウイルスは理論的には癌細胞以外には感染しないため安全性が高く、より強力なウイルスを用いたり、投与量を増やすことも可能と考えられるが、ウイルスの指向性の改変は技術的に困難な場合もある。細胞レベルでのターゲティングは制限増殖型ウイルスに限らず、遺伝子治療に用いられる非増殖型ウイルスベクターを含めて多数の研究が行われている(7)。

細胞レベルでのターゲティングはアデノウイルスで良く研究されている。アデノウイルスは、まずウイルスのファイバー蛋白質が細胞表面のアデノウイルス受容体である CAR (coxsackievirus-adenovirus receptor) に結合し、その後、ペントンベースの RGD

(Arg-Gly-Asp) モチーフと細胞表面上のインテグリンとの相互作用により細胞内に侵入する。アデノウイルスのファイバー蛋白質の改変により、ウイルスのトロピズムの改変が可能である。

また、ヘルペスウイルスでは、ウイルスの glycoprotein B, C の硫酸化プロテオグリカン結合部位を除去し、IL-13 の遺伝子を挿入することにより、IL-13 receptor  $\alpha$ 2 を発現している脳腫瘍細胞にのみ選択的に感染させる方法が報告されている(8)。

最近、麻疹ウイルス(Measles virus)のワクチン弱毒株の H タンパク質に CD38、EGF-R、EGF-Rmutant vIII に対する 1 本鎖抗体フラグメントを発現させることにより、ウイルスの指向性の改変に成功し、特異的受容体を発現した癌細胞での選択的な感染・抗腫瘍効果が動物実験レベルで得られることが報告された(9)。1 本鎖抗体フラグメントをウイルスに発現させる方法は、他のウイルスの指向性改変にも応用可能なものと考えられ、抗体工学の最近の進歩を受けて、今後様々な応用が期待される方法である。

## 2.5 免疫系の回避による癌特異的集積・増殖

最近、ワクシニアウイルスや細菌類 (Vibrio cholerae, Salmonella typhimurim, Listeria monocytogenes) を静脈内投与すると固形癌や転移部位に集積して増殖することが報告された(10)。癌組織では免疫系が抑制されているために、leaky な血管から癌細胞内に侵入した微生物は免疫監視機構から逃れて増殖可能であるが、血中の微生物は免疫系により迅速に排除されるために癌への集積性、選択増殖性が見られるようである。この現象を利用して、血液によって運ばれるウイルスや微生物を用いた癌や転移部位の発見及び治療法が開発される可能性がある。

### 3. 腫瘍溶解性ウイルスの開発状況と臨床試験成績

ヒトのウイルスは通常ヒトの細胞でのみ感染・増幅するため、動物実験から腫瘍特異性やウイルスの増幅能、体内分布を正確に評価することは困難である。そのため、前臨床試験から迅速に臨床試験に移行する例もあり、すでに相当数の臨床研究が実施されている。前臨床の動物実験段階のものを含めると多様なウイルスを用いて多くの研究が実施されているが、ここでは臨床試験成績を中心に、開発されている腫瘍溶解性ウイルスの具体例をいくつか紹介する(表2参照)。

#### 3.1 アデノウイルス

##### ①ONYX-015 (dl1520) (11)

ONYX-015はONYX社により臨床開発が進められ、初めて臨床研究が実施された腫瘍溶解性ウイルスである。p53を抑制するE1B-55K遺伝子を欠損している弱毒化アデノウイルスで、正常細胞に感染するとp53の作用によりウイルスの複製は阻害されるが、癌細胞ではp53経路が高頻度に抑制されているため、ウイルスの自己複製により感染細胞の破壊が期待される。

ONYX-015はこれまでに頭頸部癌、膵臓癌、卵巣癌、転移性肺癌等、種々の癌を対象として15強の臨床試験(Phase I・III)が実施され、250人以上の癌患者にウイルスが投与された(12)。投与方法も、腫瘍内投与の他、管腔内投与、動脈内投与(肝動脈などへの注入)、静脈からの全身性投与も検討された。これまでの結果をまとめると、このウイルス療法では重篤な副作用は認められず安全性は確認された。しかし、有効性の点では、従来の化学療法剤との併用では高い治療効果も報告されている(頭頸部癌のPhase II試験において、シスプラチン、5-フルオロウラシルとの併用により腫瘍の消失:27%、腫瘍の縮小:36%(13))ものの、単

独療法では、残念ながら動物実験での有効性とヒトでの治療効果には大きな隔たりがあり、期待されたほどの治療効果は得られず、限定された効果にとどまっていた。また、作用機序に関してもP53のジェノタイプと有効性の相関が認められず、E1B55Kとp53の相互作用は実際はもっと複雑であると思われる(14)。

このような状況で、有望な治療法と期待され最も臨床研究が進んでいたが、ONYX社は2003年にONYX-015の臨床研究を中断した。腫瘍溶解性ウイルスを一般の治療法として広く臨床に用いるには、より強力で有効性と選択増殖性の厳密性を高めるようなウイルスの改良・開発が必要である。ONYX社では第2世代の増殖型アデノウイルスや、治療用遺伝子を搭載した制限増殖型ウイルスの前臨床開発は継続している。

##### ②CV706

PSAプロモーターによりE1Aの発現を制御する制限増殖型アデノウイルスで、PSAを発現した前立腺癌を標的とする。局所再発前立腺癌患者を対象にPhase I試験が実施され、放射線投与後の前立腺内へのウイルス投与により、65%で血中のPSAレベルが30%以上、最高投与量( $1 \times 10^{13}$  particles)では50%以上低下し、有効性が報告されている(15)。

##### ③CG7870 (CV787)

Cell Genesys社(16)が臨床開発を行っているもので、CV706を改良し、E1Aをprobastatin prostate-specific promoterで、E1BをPSE(prostate specific antigen)前立腺特異的転写制御エレメントで制御して特異性を高めている(17)。初期前立腺癌患者を対象としたPhase I/II試験が腫瘍内投与および静脈内投与で実施され、ある程度PSAの低下、安定化が認められたというが論文発表はされていない。化学療法剤との併用に関するPhase

I/II 試験が 2004 年より実施されている。

なお、Cell Genesys 社ではサイトカイン遺伝子やテロメラーゼプロモーターを搭載した多種の癌を対象とする CG0070、CG4030、CG5757 及び膀胱癌を対象として膀胱癌マーカー uroplakin II を利用した CG8840 という制限増殖型アデノウイルスの前臨床開発も行っている(16)。

#### ④Ad5-CD/TKrep

アデノウイルスの E1B55K の 78 番目以降のアミノ酸残基を除去し、そこに治療用遺伝子として自殺遺伝子であるシトシンデアミナーゼ (CD) と HSV-1 TK の融合蛋白質の発現カセットを挿入した 'armed oncolytic adenovirus' である。ウイルスの選択的増殖による癌細胞の破壊効果とウイルスの拡散感染効果に加えて、CD とプロドラッグの 5-フルオロシトシン、HSV-TK とガンシクロビル の 2 重の自殺遺伝子治療を組合わせたものであり、強力な抗癌効果が期待される。局所再発前立腺癌に対して Phase I 試験が単独前立腺内投与(18)あるいは放射線療法との併用(19)で実施された。単独療法でも一定の効果が得られたが、放射線を併用すると全ての患者で PSA の顕著な低下が認められ、50%の患者では血中の PSA レベルが 0.5ng/ml 以下まで低下するなど、極めて効果が高いことが報告されている。

#### ⑤ONYX-411、ONYX-443

ONYX-411 は ONYX 社が開発している第 2 世代の制限増殖型アデノウイルスで、E1A の保存領域を除去 (E1A ΔCR2) し、ウイルスの E1, E4 遺伝子を E2F1 プロモーターで制御したもの。pRB 経路に異常がある広範ながん細胞で選択的にウイルスが増幅するが、正常細胞では複製できない。ONYX-443 は自殺遺伝子の CD を ONYX-411 に搭載したもので、CD 遺伝子を E3B 領域に挿入することによりアデ

ノウイルスライフサイクルの late phase に遺伝子発現するため、ウイルス DNA が複製した後に発現することで安全性を高めている。動物実験結果が報告されている(20)。

### 3.2 単純ヘルペスウイルス

#### ①HSV1716

HSV の神経毒性に関与すると考えられる 2 つの  $\gamma_{134.5}$  遺伝子 (ICP34.5; PKR inhibitor) の一方の遺伝子領域の 759bp を野生型ウイルスから除去した弱毒ウイルスで、Ras 経路の変異した癌細胞が標的となる。悪性グリオーマに対する Phase I 試験が 12 名に対して実施され、 $10^5$  pfu までの腫瘍内投与を行ったところ、野生型の HSV-1 は神経系の疾患を引き起こすウイルスであるが HSV1716 では脳炎などの副作用は認められず、潜伏感染している HSV の再活性化も認められず安全性が確認された。またウイルスが腫瘍内で増殖していること、3 例で治療後 1 年以上安定であり HSV1716 を用いない場合と比べて生存期間の延長が認められたことも報告されている(21,22)。また、転移性メラノーマに対するパイロット試験も 5 名の患者を対象として実施され、腫瘍内投与により腫瘍内でのウイルスの増殖と癌組織の壊死が認められたことが報告されている(23)。

#### ②G207

$\gamma_{134.5}$  遺伝子領域の 2 つともに 1kb の欠失があり、さらに非増殖性細胞でのウイルスの複製に必須の ICP6 遺伝子にマーカー遺伝子の LacZ を挿入してその機能を失わせた第 2 世代の制限増殖型ヘルペスウイルスで、Ras 経路の変異した増殖性の高い癌細胞が標的となる。Phase I 試験が再発悪性グリオーマ患者を対象に米国で実施された(24)。21 名の患者に  $1 \times 10^6$ - $3 \times 10^9$  pfu のウイルスを腫瘍内に投与したところ、重篤な毒性、脳炎などの副作用は認められず、数名の患者ではある程度の抗腫瘍効

果が認められたことが報告されている。MediGene AG社で臨床開発が行われていたが、G207の研究は2003年に中断された。

### ③NV1020

MediGene AG社で臨床開発が行われている制限増殖型ヘルペスウイルスで、G207よりも弱毒化が低く、本来はワクチン用に開発されたものである。野生型ウイルスより約15kbを除去しており、その中に $\gamma$ 134.5遺伝子1コピー(UL56)、ICP0、ICP4遺伝子が含まれる。かわりにICP4( $\alpha$ 4)プロモーターで制御されるHSV-1 TK 遺伝子が挿入されている。またHSV-2糖蛋白質遺伝子も挿入されている。自己のTKは除去されている。大腸癌の肝転移患者を対象としたPhase I試験が終了し、Phase I/II試験が2004年9月より米国で開始されている。臨床試験の結果は報告されていないが、動物実験ではG207よりも治療効果が高いことが報告されている(25)。

### ④OncoVEX<sup>GM-CSF</sup>

BioVex社(26)が臨床開発を行っている制限増殖型ヘルペスウイルスで、 $\gamma$ 134.5遺伝子2つ及びICP47遺伝子を欠失し、治療用遺伝子としてGM-CSF遺伝子を挿入することにより宿主の免疫賦活化活性を期待した組換えヘルペスウイルス。ICP47遺伝子はウイルス感染細胞におけるMHC Class Iの発現に関与し、抗原提示能の阻害に働くため、この遺伝子を除去することによりさらなる免疫増強活性の促進が期待される。固形癌の皮膚、皮下転移の30名の患者に対して最近Phase I試験が終了した。皮膚の転移部位への投与により、腫瘍の壊死、免疫細胞の遊走が全例で観察され、投与部位から離れた部位の癌に対しても効果が認められる例があったとされているが、論文発表はまだ前臨床試験成績のみである(27)。BioVex社ではPhase I試験の結果を受けて、2005年

より米国でメラノーマを対象にPhase II試験を開始する予定であり、他の固形癌に対しても2005-6年に計画されている。

### ⑤G47Delta

G207の $\alpha$ 47遺伝子(ICP47遺伝子)に変異を加え、G207の安全性を保ちながらウイルスの腫瘍内複製能を増強した第3世代のHSVが開発され、前臨床研究が行われている。

## 3.3 ニューカッスル病ウイルス(NDV)

### ①MTH-68/H (28)

NDVの自然弱毒株で遺伝的改変はされていない。悪性グリオーマ患者4名を対象としたパイロット試験が米国癌研究所で実施された。MTH-68/Hをiv投与した結果、2例ではグリオーマがほぼ完全に消失し、残りの2例では病態の安定化が認められた。悪性グリオーマ患者の平均生存期間は半年から1年であるが、MTH-68/Hの継続的投与により、治療開始から5~9年経た現在も患者は全例生存しているという。

### ②PV701 (29,30)

Wellstat Biologics社が臨床開発を行っているNDVの自然弱毒株で、遺伝的改変はされていない。3件のPhase I試験が合計113名の進行性固形癌の患者を対象として米国で実施された。ウイルスのiv投与により流感様症状や発熱等は認められたが重篤な副作用は認められなかった。また、ほとんどの患者で中和抗体の産生が認められた。臨床効果が評価可能な95例中、有効6例、やや有効が4例であり、Phase IIが計画されている。

## 3.4 レオウイルス

### ①Reolysin (31)

Oncolytics Biotech社が臨床開発を行っている野生型レオウイルスで、Rasが活性化した

癌細胞で選択的に増殖する。臨床試験は進行性固形癌の皮下転移患者 18 名への腫瘍内投与による Phase I 試験、前立腺癌患者 6 名を対象とした腫瘍内投与による Phase I 試験がいずれもカナダにおいて終了し、それぞれ 18 例中 11 例(61%)の有効、及び 6 例中 4 例の有効が得られたというが、論文発表はされていない。また再発悪性グリオーマ患者に対する腫瘍内投与 Phase I/II 試験が 2002 年よりカナダで開始され、米国でも試験の実施が承認された。さらに、進行性固形癌患者に対する iv 投与による Phase I 試験が 2004 年より英国で開始されており、進行性癌患者を対象としたウイルスの腫瘍内投与と放射線療法との併用療法に関する Phase I 試験も 2005 年 2 月に英国で試験の実施が承認されたところである。

### 3.5 水疱性口内炎ウイルス (VSV)

VSV は遺伝的改変を行わなくても制限増殖型ウイルスとして使用可能なウイルスであるが、病原性がなく、ゲノム構造が単純であり、RNA ウイルスで染色体挿入変異の危険性がないため、遺伝子治療用ベクターとしての利用が検討されている。増殖性を有したまま、治療用遺伝子として自殺遺伝子や免疫賦活化因子の遺伝子を搭載した遺伝子組換え VSV が作製されており、まだ臨床研究は実施されていないが、動物実験レベルでは有望な結果が報告されている(32-34)。

## 4. 日本における研究開発の現状

我が国における腫瘍溶解性ウイルスの研究開発の現状について表 3 にまとめた。名古屋大学医学部(中尾昭公教授ら)は変異弱毒単純ヘルペスウイルスの HF10(35-40)を用いて皮膚、皮下再発乳癌患者 6 名を対象とする臨床研究を既に実施している。安全性が確認された他、80%以上の腫瘍細胞が死滅するという結果が得られたという。HF10 は名古屋大学(西山幸

廣教授ら)で 1990 年に天然より分離した遺伝子組換えを行っていない自然変異株である。自然変異株を用いた臨床研究は遺伝子治療臨床研究には該当せず、厚生労働省には遺伝子治療以外の実験的先端医療の臨床研究を審査する制度はないため、学内倫理委員会の承認だけで臨床研究が実施されている。

一方、動物実験レベルではヘルペスウイルス、アデノウイルス、センダイウイルス、シンドビスウイルス、レオウイルス等を用いてマウスを使った *in vivo* での抗腫瘍効果が検討されている。大阪府立成人病センター(高橋克仁博士ら)は臨床応用を目指して遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスの d12.CALP 及び次世代 HSV-1 複製・発現ベクターを開発中という(6, 41)。d12.CALP は HSV-1 の複製開始に必須な転写因子をコードする ICP4 遺伝子を平滑筋分化マーカーであるカルボニンプロモーターで制御し、本来の ICP4 と TK 遺伝子を欠失したもので、平滑筋肉腫が対象となる。一方、バイオベンチャー企業での研究開発も進められており、Oncolys BioPharma 社では岡山大(藤原俊義助教授)が開発したテロメライシン(Telomelysin)の臨床開発が行われている(47)。Telomelysin はテロメラーゼプロモーター(hTERT)により E1A、E1B の発現を制御することにより、テロメラーゼ活性の亢進した癌細胞で選択的に増殖する組換えアデノウイルスであり、テロメラーゼ活性が亢進したがん細胞を標的とする。ファイバーに RGD を発現することにより、感染域を広げた Telomelysin-RGD も作製されている。また、DNAVEC 社では日本独自のセンダイウイルスを用いた腫瘍溶解性ウイルスの研究開発が行われている(56)。

これらの遺伝子組換えウイルスを用いる腫瘍溶解性ウイルスの臨床研究は遺伝子治療に該当するため、臨床研究の実施にあたっては実施計画書等を厚生労働大臣に提出し、厚生科学



審議会（治験の場合は薬事・食品衛生審議会）の審査を受け承認を得る必要がある。また、遺伝子組換えウイルスの臨床使用は、組換え生物の使用による生物多様性への悪影響を防止するための「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」および関連政省令により、組換え生物の第1種使用（環境中への拡散を防止しないで行う使用等）に該当する。この場合、事前に厚生労働大臣及び環境大臣に対して生物多様性影響評価書を添付して第1種使用規定承認申請を行い、承認を得る必要がある。

## 5. 腫瘍溶解性ウイルスの問題点と今後の展望

### 5.1 安全性上の課題

遺伝子治療の研究はその多くが癌の治療目的で実施されてきたが、これまであまり期待された効果が得られていない。腫瘍溶解性ウイルス療法は、増殖型ウイルスを用いることにより、最初にウイルスが感染した癌細胞に対して破壊、死滅させるだけでなく、癌組織全体に感染が広がることで治療効果が高まることが期待されるものである。一方で、従来の遺伝子治療では増殖型ウイルスの混入はベクターの品質、安全性確保上重要な問題とされてきた。腫瘍溶解性ウイルス療法では癌細胞でのみ増殖する制限増殖型ウイルスを治療に用いるが、増殖型であることから格段の安全性確保が必要になると思われる。これまでに実施された臨床研究ではいずれのウイルスの場合も重篤な副作用は認められず、安全性が確認されたとしている。しかし、広く一般的な治療法として用いるには、より安全性を高めることが望ましい。

ウイルスの設計上の問題として、欠失による標的化を行った場合には、遺伝子治療用ウイルスベクターの場合と同様、組換えによる野生型ウイルスの出現が起こる可能性がある。そのため、変異を1箇所のみでなく、複数の箇所に入れることで野生型ウイルスへの復帰変異の起

りにくい安全性を高めたウイルスが開発されてきている。

変異を入れる遺伝子の選択も重要である。ヘルペスウイルスの場合、TK、リボヌクレオチド還元酵素、 $\gamma$ 134.5などを欠失させることにより制限増殖型ウイルスが作製されているが、神経病原性を低下させるという点ではリボヌクレオチド還元酵素の除去が適しているという。また、 $\gamma$ 134.5も神経病原性に大きく関与している。一方で、遺伝子の欠損によりウイルスの増殖能、効力が低下してしまう場合もある。

また、ウイルスにより問題が生じた場合や治療終了後にウイルスを死滅させることができるような工夫も必要と思われる。ヘルペスウイルスの場合、TK遺伝子を保持しているものでは、抗ヘルペスウイルス薬のガンシクロビルやアシクロビルの投与によりウイルスの複製を停止させ、ウイルス感染細胞を除去可能である。他のウイルスの場合も、TK遺伝子を導入することにより同様の効果が得られ、安全性を高めることが可能である。またTK遺伝子の導入は自殺遺伝子療法としても用いられ、バイスタンダー (by-stander)効果によりTK遺伝子を発現した細胞とともに隣接する非発現細胞も死滅させ、抗腫瘍効果を増強することも期待される。

アデノウイルスベクターによる遺伝子治療での死亡事故に見られるように、強い抗原性を持つウイルスを高用量投与すると、強い免疫反応が惹起され、重篤な副作用を引き起こす可能性がある。増殖型ウイルスを投与する場合は、その投与量や投与方法およびウイルスの品質には十分な注意が必要となる。

また、腫瘍溶解性ウイルス療法では、腫瘍内で増殖したウイルスが患者の血中、尿中等に放出(shedding)されることになる。従ってウイルスが患者の家族や医療従事者に感染しないような特別な配慮が必要である。さらに遺伝子組換えウイルスを用いる場合には、生物多様性へ

の悪影響を防止するため、環境中に組換えウイルスの放出が起こらないよう十分な配慮が求められる。

## 5.2 有効性上の課題

### ① ウイルスの感染と拡散

腫瘍溶解性ウイルス療法の抗腫瘍効果は、癌細胞内でのウイルス増殖による破壊と増殖したウイルスの周囲の細胞への拡散により得られるが、臨床応用では十分な効果が得られない場合もある。ウイルスが感染した癌の壊死領域や正常なストローマ細胞、細胞外マトリックス、あるいは基底膜などが物理的な障壁となり、ウイルスの拡散と感染が制限される。癌の増殖を抑制し、癌細胞内でウイルスを永続的に複製させるには腫瘍全体にウイルスを拡散させることが重要であり、投与方法にも工夫が必要である。

### ② 宿主の免疫応答

宿主の免疫応答は腫瘍溶解性ウイルスの効力に大きな影響を及ぼす。宿主の免疫応答によって腫瘍内でのウイルスの増殖が制限され、抗体価の上昇により投与したウイルスが中和されてしまう可能性がある。HSV や麻疹ウイルスのように細胞から細胞に直接拡散するタイプの腫瘍溶解性ウイルスの場合、腫瘍内投与であれば中和抗体の出現はあまり問題にならないが、iv 投与では重大な問題となりうる。補体系も iv 投与する場合には障害となる。

アデノウイルス (ONYX-015) の臨床研究の場合、ウイルスの抗原性が強いため、全ての投与症例で中和抗体価の上昇が直ちに認められたという。しかし、腫瘍内投与では治療前後の中和抗体価と治療成績との相関は認められず、中和抗体は腫瘍内でのウイルス増殖には影響しないと思われる。一方、血中投与では中和抗体価が高いとウイルスの増殖が認められない傾向があり、血中のウイルスには中和抗体が影響する (59)。

また、HSV の場合、免疫不全マウスではウイルスの腫瘍内での持続的増殖が認められても、免疫応答を示すマウスではウイルスの急速なクリアランスが起こる。臨床応用する場合、ほとんどの成人が抗 HSV 抗体を持っていることが有効性に影響する可能性がある(39)。一方で、ウイルスの体外放出が起こっても、患者周囲の人に感染する危険性は少ないとも考えられる。

腫瘍溶解性ウイルスの感染による宿主の免疫系の賦活化は、一方では腫瘍細胞に特異的な抗腫瘍免疫を誘導し、抗腫瘍効果を増強する働きも期待される。免疫賦活化因子遺伝子を搭載し、腫瘍溶解性ウイルスの効力を高める研究も多く行われている。抗腫瘍効果の発現には癌細胞に対する細胞傷害性 T 細胞の出現が重要である。従って、望まない免疫応答は回避し、有益な免疫応答はそのまま残す方法も考案されている。例えば、中和抗体の産生は治療開始前に抗 CD20 抗体を投与し、B リンパ球を叩くことにより一時的に消失する。また、血漿交換により抗ウイルス抗体を血中から除去可能である。投与したウイルスの補体による不活化を防ぐために、補体をコブラ毒因子やサイクロホスファミドで一時的に中和することも可能である。補体耐性因子をウイルス外膜に発現させ、補体系への耐性を獲得する方法もある。

### ③ ウイルス受容体

癌細胞表面にウイルス受容体が十分量発現していることが治療の有効性に極めて重要である。特に、腫瘍溶解性アデノウイルスの場合、このことが有効性の限界に関係していることが考えられる。アデノウイルスの受容体である CAR の発現は、癌の進行に伴い、おそらく発癌シグナル伝達系が活性化されることで低下が認められるため、悪性度の高い細胞ほど腫瘍溶解性アデノウイルスに低感受性となってしまふ。そこで、Ras シグナル伝達系の阻害剤

(MEK 阻害剤など) を用いて細胞の CAR の発現を増加させ、ウイルスの感染を可能にする方法や、ウイルスの指向性の改変により CAR に依存しない感染を可能にする方法が検討されている。

正常細胞に発現されている受容体へのウイルスの結合もウイルスの物理的な投与量とウイルスの癌細胞への到達量との関係から効力及び安全性に影響する。癌細胞特異的な受容体を介してウイルスを感染させることができれば、より安全性、有効性を高めることが可能であり、また転移性の癌に対する効果も期待される。

#### ④併用療法

腫瘍溶解性ウイルスの抗腫瘍効果は既存の化学療法や放射線療法とは全く作用機構が異なる。従ってこれら既存の癌治療法との併用により相乗効果が期待され、臨床試験でも有効性が報告されている。また、化学療法剤の使用量を減らせる可能性もある。

一方、腫瘍溶解性ウイルスに抗腫瘍効果を持つ治療用遺伝子を搭載したものも作製されているが、これらは遺伝子治療との併用療法とも考えられる。治療用遺伝子としては自殺遺伝子、免疫賦活化因子遺伝子、血管新生に関与する因子などが検討されている。

#### D. 結論

腫瘍溶解性ウイルスを用いた癌治療に関する欧米および日本の最新の動向について検討した。腫瘍溶解性ウイルス療法は、正常細胞では増殖できないが、癌細胞で特異的に増殖する性質を有する制限増殖型ウイルスを用いる新しい有望な癌の治療法のひとつとして開発が進められ、臨床試験の初期段階にある。ウイルスの分子生物学の進歩により、ウイルスゲノムを改変し、増殖の特異性、安全性の改良、指向性の改変も可能になってきている。また腫瘍溶解

性ウイルスを遺伝子治療ベクターとして用い、治療用遺伝子の搭載により治療効果を高める研究も進められている。将来的には免疫クリアランスを回避し、全身投与が可能なウイルスの開発も期待される。これまでの臨床試験成績は必ずしも *in vitro* の有効性を反映したものではないが、ウイルスのデザインや宿主の免疫応答などの安全性、有効性上の課題が認識され、より有効性、安全性の高いウイルスの開発が進められており、開発レベルでの実用性は確実に進歩している。既存の化学療法や放射線療法とは作用機構が異なるため併用療法も相乗効果が期待される。今後、腫瘍溶解性ウイルスが実用化されるには、より安全性、有効性の高いウイルスの開発と臨床における安全性、有効性の確立が重要であり、慎重な検討を重ね、有効な癌治療法として確立されることが望まれる。

#### 参考文献

- (1) S.J.Ries and C.H.Brandts: Oncolytic viruses for the treatment of cancer: current strategies and clinical trials, *DDT*, 9, 759-568 (2004)
- (2) E.Kin and J.Nemunaitis: Oncolytic viral therapies, *Cancer Gene Ther.* 11, 643-664 (2004)
- (3) D.W.Post et al: Replicative oncolytic adenoviruses in multimodal cancer regimens, *Hum. Gene Ther.*, 14, 933-946 (2003)
- (4) 濱田博文: 遺伝子治療用ウイルスベクターの開発、*実験医学*, 22, 139-146 (2004)
- (5) Cascallo M et al: Ras-dependent oncolysis with an adenovirus VAI mutant, *Cancer Res.*, 63, 5544-5550 (2003)
- (6) Yamamura H et al.: Identification of the transcriptional regulatory sequences of human calponin promoter and their use in targeting a conditionally replicating herpes vector to malignant human soft tissue and bone tumors, *Cancer Res.* , 61, 3969-3977 (2001)
- (7) Wickham TJ: Ligand-directed targeting of genes to the site of disease, *Nature Med*, 9, 135-139 (2003)

- (8) Zhou G et al: Engineered herpes simplex virus 1 is dependent on IL13Ralpha 2 receptor for cell entry and independent of glycoprotein D receptor interaction, *PNAS*, 99, 15124-15129 (2002)
- (9) Nakamura T et al: Rescue and propagation of fully retargeted oncolytic measles viruses, *Nature Biotech.* 23, 209 (2005)
- (10) Yu YA et al: Visualization of tumors and metastasis in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins, *Nature Biotechnol*, 22, 70-77 (2004)
- (11) Ries S and Korn WM: ONIX-015: mechanism of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus, *Br.J.Cancer*, 86, 5-11 (2002)
- (12) Wilder O: The sensitizing side of Onyx-015, *Gene Therapy* 12, 386-387 (2005)
- (13) Khuri FR et al: A controlled trial of intratumoral ONIX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5 fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer, *Nature Med*, 6, 879-885 (2000)
- (14) Dix BR et al: Does the antitumor adenovirus ONYX-015/d11520 selectively target cells defective in the p53 pathway?, *J.Virol.*, 75, 5443-5447 (2001)
- (15) DeWeese TL et al: A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy, *Cancer Res*, 61, 7464-7472 (2001)
- (16) <http://www.cellgenesys.com>
- (17) Yu DC et al: The addition of adenovirus type 5 region E3 enables calydon virus 787 to eliminate distant prostate tumor xenografts, *Cancer Res.*, 59, 4200-4203 (1999)
- (18) Freytag SO et al: Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double suicide gene therapy for the treatment of locally recurrent prostate cancer, *Cancer Res*, 62, 4968-4976 (2002)
- (19) Freytag SO et al: Phase I study of replication-competent adenovirus-mediated double-suicide gene therapy in combination with conventional-dose three-dimensional conformal radiation therapy for the treatment of newly-diagnosed, intermediate- to high-risk prostate cancer, *Cancer Res*, 6, 7497-7506 (2003)
- (20) Tumor-specific ontravenous gene delivery using oncolytic adenoviruses, *Cancer Gene Ther*, 12, 19-25 (2005)
- (21) Rampling R et al: Toxicity evaluation of replication-competent herpes simplex virus (ICP34.5 null mutant 1716) in patients with recurrent malignant glioma, *Gene Ther*, 7, 859-866 (2000)
- (22) Harrow S et al: HSV1716 injection into the brain adjacent to tumour following surgical resection of high-grade glioma: safety data and long-term survival, *Gene Ther*, 11, 1648-1658 (2004)
- (23) MacKie RM et al: Intralesional injection of herpes simplex virus 1716 in metastatic melanoma, *Lancet.*, 357, 525-526 (2001)
- (24) Markert JM et al: Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial, *Gene Ther*, 7, 867-874 (2000)
- (25) Bennett JJ et al: Comparison of safety, delivery, and efficacy of two oncolytic herpes viruses (G207 and NV1020) for peritoneal cancer, *Cancer Gene Ther*, 9, 935-945 (2002)
- (26) <http://www.biovex.com/index.html>
- (27) Liu BL et al: ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties, *Gene Ther*, 10, 292-303 (2003)
- (28) Csatory LK et al: MTH-68/H oncolytic viral treatment in human high-grade gliomas, *J Neurooncol.*, 67, 83-93 (2004)
- (29) Pecora AL et al: Phase I trial of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, in patients with advanced solid cancers, *Clin Oncol.*, 20, 2251-2266 (2002)
- (30) Lorence RM et al: Overview of phase I studies of intravenous administration of PV701, an oncolytic virus, *Curr Opin Mol Ther.*, 5, 618-624 (2003)
- (31) <http://www.oncolyticsbiotech.com/tech.html>
- (32) Barber GN: Vesicular stomatitis virus as an oncolytic vector, *Viral Immunol.*, 17, 516-527 (2004)

- (33) Porosnicu M et al: The oncolytic effect of recombinant vesicular stomatitis virus is enhanced by expression of the fusion cytosine deaminase/uracil phosphoribosyltransferase suicide gene, *Cancer Res.*, 63, 8366-8376 (2003);
- (34) Fernandez M et al: Genetically engineered vesicular stomatitis virus in gene therapy: application for treatment of malignant disease, *Virology*, 76, 895-904 (2002)
- (35) Nakao A et al., Intratumoral injection of herpes simplex virus HF10 in recurrent breast cancer, *Ann Oncol.*, 15, 988-989 (2004)
- (36) Kimata H et al.: Effective treatment of disseminated peritoneal colon cancer with new replication-competent herpes simplex viruses, *Hepatogastroenterology.*, 50, 961-966 (2003)
- (37) Takakuwa H et al.: Oncolytic viral therapy using a spontaneously generated herpes simplex virus type 1 variant for disseminated peritoneal tumor in immunocompetent mice, *Arch Virol.*, 148, 813-825 (2003)
- (38) Teshigahara O et al.: Oncolytic viral therapy for breast cancer with herpes simplex virus type 1 mutant HF10, *J. Surg. Oncol.*, 85, 42-47 (2004)
- (39) 西山幸広、川口寧：ヘルペスウイルスの医学的利用－遺伝子治療と癌治療への応用－、*ウイルス*, 53, 155-162 (2003)
- (40) [http://chubu.yomiuri.co.jp/tkp/chubu\\_iry041007.html](http://chubu.yomiuri.co.jp/tkp/chubu_iry041007.html)
- (41) 山村倫子ら：腫瘍選択的増殖型・弱毒化単純ヘルペスウイルスd12.CALPΔRRによる平滑筋肉腫遺伝子治療の前臨床試験、第63回日本癌学会総会(2004)
- (42) Nawa A et al.: Oncolytic viral therapy for human ovarian cancer using a novel replication-competent herpes simplex virus type I mutant in a mouse model, *Gynecol Oncol.*, 91, 81-88 (2003)
- (43) Todo T. et al: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing., *Proc Natl Acad Sci USA*, 98 :6396-6401 (2001);藤堂具紀ら：脳腫瘍のウイルス療法、第63回日本癌学会総会(2004)；福原浩ら：第6回泌尿器遺伝子・細胞治療研究会(2004)
- (44) Oyama.M et al: Intravesical and intravenous therapy of human bladder cancer by the herpes vector G207, *Hum Gene Ther.* 11,1683-1693 (2000);Oyama M et al: Oncolytic viral therapy for human prostate cancer by conditionally replicating herpes simplex virus 1 vector G207, *Jpn J Cancer Res.*, 91,1339-1344 (2000) ; Oyama.M et al: Treatment of human renal cell carcinoma by a conditionally replicating herpes vector G207, *Urol.*, 165,1274-1278 (2001); Oyama.M et al: Application of conditionally replicating herpes vector for gene therapy treatment of urologic neoplasms, *Mol Urol.*, 4,83-87 (2000) ; 矢崎貴仁ら：第61回日本脳神経外科学会総会(2002)
- (45) Nakano K et al: Therapeutic efficacy of G207, a conditionally replicating herpes simplex virus type 1 mutant, for gallbladder carcinoma in immunocompetent hamsters, *Mol Ther.*, 3, 431-437 (2001)
- (46) Nakamori M et al: Effective therapy of metastatic ovarian cancer with an oncolytic herpes simplex virus incorporating two membrane fusion mechanisms, *Clin Cancer Res.*, 9, 2727-2733 (2003) ; Nakamori M et al: Destruction of nonimmunogenic mammary tumor cells by a fusogenic oncolytic herpes simplex virus induces potent antitumor immunity, *Mol Ther.*, 9, 658-665 (2004) ; Nakamori M et al: Potent antitumor activity after systemic delivery of a doubly fusogenic oncolytic herpes simplex virus against metastatic prostate cancer, *Prostate.*,60, 53-60 (2004) ; 中森幹人ら：第6回泌尿器遺伝子・細胞治療研究会(2004)
- (47) Umeoka T et al: Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene, *Cancer Res.*, 64, 6259-6265 (2004) ; Taki M et al: Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-405 ('Telomelysin-RGD'), *Oncogene.*, [Epub ahead of print] (2005)
- (48) Sunamura M et al: Oncolytic virotherapy as a novel strategy for

- pancreatic cancer, *Pancreas*, 28, 326-329 (2004) ; Sunamura M et al: Gene therapy for pancreatic cancer targeting the genomic alterations of tumor suppressor genes using replication-selective oncolytic adenovirus, *Hum Cell*, 15, 138-150 (2002) ; Oonuma M et al: Gene therapy for intraperitoneally disseminated pancreatic cancers by *Escherichia coli* uracil phosphoribosyltransferase (UPRT) gene mediated by restricted replication-competent adenoviral vectors, *Int J Cancer*, 102, 51-59 (2002)
- (49) Maemondo M et al: Gene therapy with secretory leukoprotease inhibitor promoter-controlled replication-competent adenovirus for non-small cell lung cancer, *Cancer Res*, 64, 4611-4620 (2004)
- (50) Fukuda K et al: E1A, E1B double-restricted adenovirus for oncolytic gene therapy of gallbladder cancer, *Cancer Res*, 63, 4434-4434 (2003) ; Seo E et al: Effective gene therapy of biliary tract cancers by a conditionally replicative adenovirus expressing uracil phosphoribosyltransferase: significance of timing of 5-fluorouracil administration, *Cancer Res*, 65, 546-552 (2005)
- (51) Hamada K et al: Identification of the human IAL3B promoter element and its use in the construction of a replication-selective adenovirus for ovarian cancer therapy, *Cancer Res*, 63, 2506-2512 (2003)
- (52) Kohno S et al: Midkine promoter-based conditionally replicative adenovirus for malignant glioma therapy, *Oncol Rep*, 12, 73-78 (2004)
- (53) Yu L et al: Midkine promoter-driven suicide gene expression and -mediated adenovirus replication produced cytotoxic effects to immortalised and tumour cells, *Eur J Cancer*, 40, 1787-1794 (2004) ; Yu L et al: Insertion of an exogenous promoter in the E1A regulatory region of adenovirus does not disturb viral replication despite reduced E1A transcription, *Cancer Lett*, 203, 51-57 (2004)
- (54) Sagawa T et al: Prolonged survival of mice with multiple liver metastases of human colon cancer by intravenous administration of replicable E1B-55K-deleted adenovirus with E1A expressed by CEA promoter, *Mol Ther*, 10, 1043-1050 (2004) ; Takahashi M et al: E1B-55K-deleted adenovirus expressing E1A-13S by AFP-enhancer/promoter is capable of highly specific replication in AFP-producing hepatocellular carcinoma and eradication of established tumor, *Mol Ther*, 5, 627-634 (2002)
- (55) 内野順二ら: hTERT プロモーターを用いた制限増殖型アデノウイルスによる肺癌治療の試み、第 63 回日本癌学会総会 (2004)
- (56) Kinoh H et al: Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases, *Gene Ther*, 11, 1137-1145 (2004) ; 喜納宏昭ら: マトリックスメタロプロテアーゼ発現癌細胞を標的にした選択的腫瘍崩壊性を持つ M 遺伝子欠失型センダイウイルスベクターの改良、第 63 回日本癌学会総会 (2004)
- (57) 王剛ら: 食道癌に対するシンドビスウイルス療法、第 63 回日本癌学会学術総会 (2004) ; 海野洋一ら: シンドビスウイルスの抗腫瘍選択的ウイルス増殖と細胞障害効果、第 63 回日本癌学会学術総会 (2004)
- (58) Etoh T et al: Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus, *Clin Cancer Res*, 9 1218-1223 (2003)
- (59) 永瀬浩喜: 選択的アデノウイルス自己複製による癌細胞破壊 ONYX-015(dl1520), *Molecular Medicine*, 38, 1176-1182 (2001)

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Eriko Uchida, Koei Sato, Akiko Iwata, Akiko Ishii-Watabe, Hiroyuki Mizuguchi, Mikio Hikata, Mitsuhiro Murata, Teruhide Yamaguchi, and Takao Hayakawa: An improved method for detection of replication competent retrovirus in retrovirus vector products,

*Biologicals*, 32, 139-146 (2004)

- 2) 宮田直樹、中野達也、川崎ナナ、内田恵理子、瀧明子、長谷川式子、山本美智子：平成 15 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」研究報告－日本薬局方収載医薬品などの名称、構造式、化学名の国際調和に関する研究（第 3 報）－、医薬品研究、35 (12) 627-637 (2004)

## 2. 学会発表

- 1) 小木美恵子、押澤正、内田恵理子、永田龍二、早川堯夫、村田充弘、日方幹男、佐藤功栄、岩田明子、山口照英：医薬品の安全性確保のための高感度ウイルス検出法の開発－ポリエチレンイミン結合磁気ビーズを用いたウイルス濃縮機構の検討－；日本薬学会第 125 年会 2005 年 3 月
- 2) 古田美玲、内田恵理子、押澤正、山口照英：造血支持能を持つフィーダー細胞の解析について；日本薬学会第 125 年会；2005 年 3 月

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

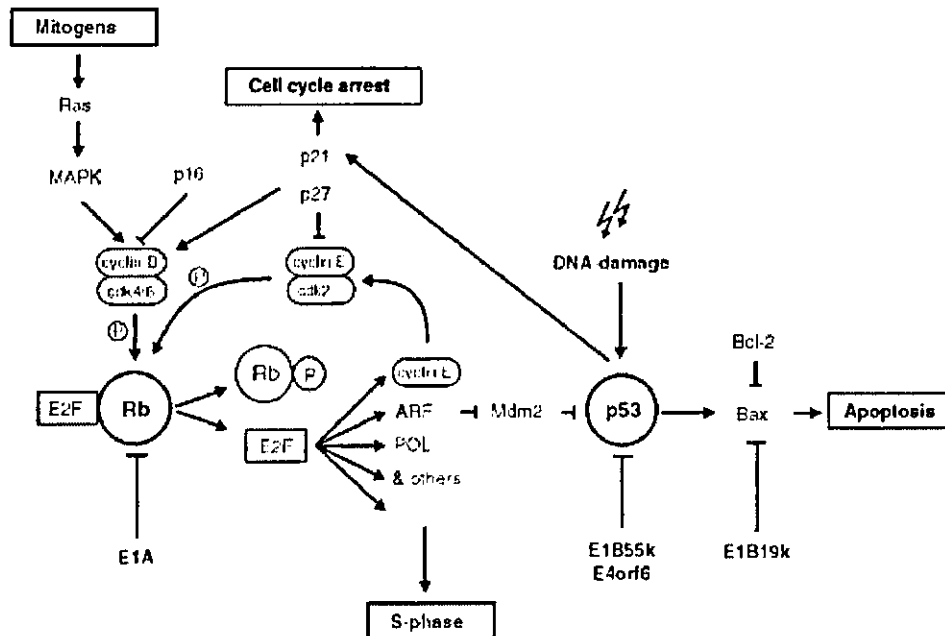


図1 アデノウイルス初期蛋白質とRb, p53との相互作用 (参考文献11より引用)

表1 腫瘍溶解性ウイルスに使用されているプロモーター/エンハンサーと標的癌 (参考文献2より改変)

promoter/enhancer	標的となる癌の種類
PSA promoter	前立腺癌
Prabastatin promoter	前立腺癌
Kallikrein promoter	前立腺癌
MMTV promoter	乳癌
mucin-1 promoter	乳癌
pS2 promoter	乳癌
Estrogen-receptor promoter	乳癌
HPV16、HPV18	頭頸部癌
Rouse sarcoma virus promoter	頭頸部癌
Keratin gene promoter	頭頸部癌
CEA promoter	大腸癌
$\alpha$ -fetoprotein promoter	肝細胞癌
Albumin enhancer/promoter	肝臓、肝細胞癌
Neuronal specific promoter	脳腫瘍
tyrosinase enhancer/promoter	メラノーマ
P5 promoter	固形癌
EF1 $\alpha$ promoter	固形癌
FLK1 promoter	内皮細胞/固形癌
hTERT (telomerase promoter)	固形癌/テロメラーゼ活性亢進



表2 腫瘍溶解性ウイルスの臨床試験実施状況 (参考文献1より改変)

ウイルス	名称	特徴・変異部位	投与方法	対象疾患	臨床開発段階	参考文献等
AdV	ONYX-015	$\Delta$ E1B-55K	腫瘍内投与	頭頸部癌	Phase II 終了	(11-14)
			腫瘍内投与	膵癌	Phase II 終了	
			口内投与	口腔癌	Phase I 終了	
			腹腔内投与	卵巣癌	Phase I 終了	
			冠動脈内投与	大腸癌肝転移	Phase I / II 終了	
			静脈内投与	転移性大腸癌	Phase II 終了	
	CV706	PSA promoter-E1A	前立腺内投与	前立腺癌	Phase I 終了	(15)
	CG7870	Prabastatin-E1A PSE-E1B	前立腺内投与	前立腺癌	Phase I / II 実施中	Cell Genesys (16,17)
	Ad5-CD/TKrep	$\Delta$ E1B-55K CD/HSV-TK 挿入	前立腺内投与	前立腺癌	Phase I 終了	(18,19)
HSV	HSV1716	$\Delta$ $\gamma$ 134.5	腫瘍内投与	悪性グリオーマ	Phase I 終了	(21,22)
			腫瘍内投与	転移性黒色腫	パイロット試験 終了	(23)
	G207	$\Delta$ ICP6、 $\Delta$ $\gamma$ 134.5 LacZ 挿入	腫瘍内投与	悪性グリオーマ	Phase I	(24)
	NV1020	$\Delta$ $\gamma$ 134.5、 $\Delta$ TK ICP4-HSV-1 挿入	肝動脈内投与	大腸癌肝転移	Phase I / II 実施中	MediGene AG (25)
	OncovEX <sup>GM-CSF</sup>	$\Delta$ $\gamma$ 134.5、 $\Delta$ ICP47、 GM-CSF 挿入	皮下転移部位投与	固形癌皮下転移	Phase I 実施中	BioVEX (26,27)
NDV	MTH-68/H	自然弱毒株	静脈内投与	悪性グリオーマ	パイロット試験 終了	(28)
	PV701	自然弱毒株	静脈内投与	進行性固形癌	Phase I 終了	(29,30)
Reovirus	Reolysin	野生型	腫瘍内投与	固形癌皮下転移	Phase I 終了	Oncolytics Biotech (31)
			腫瘍内投与	前立腺癌	Phase I 終了	
			腫瘍内投与	悪性グリオーマ	Phase I / II 実施中	
			静脈内投与	進行性固形癌	Phase I 実施中	

表3 日本におけるOncolytic Virusの研究開発の実施状況

<臨床研究まで進んでいるもの>

実施状況	ウイルス	名称	特徴	実施施設	対象疾患/症例数	文献
2003年臨床研究終了	変異単純ヘルペスウイルス	HF10	自然変異株	名古屋大学医学部附属病院	皮膚又は皮下再発乳癌/6例	(35-40)
2004年から臨床研究実施					頭頸部癌/5例	
臨床研究開始準備中					進行性膀胱癌/6例(予定)	
動物実験					大腸癌、乳癌	

<動物実験レベル>

実施状況	ウイルス	名称	特徴	実施施設	対象疾患	文献
	遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス	d12.CALP d12.CALP delta RR	calponin promoter、 $\Delta$ TK calponin promoter、 $\Delta$ ICP6	大阪府立成人病センター	平滑筋肉腫	(6, 41)
		hrR3, HR522	$\Delta$ ICP6	愛知県がんセンター	卵巣癌	(42)
		G47delta	$\Delta$ $\gamma$ 134.5, $\Delta$ ICP6, $\Delta$ $\alpha$ 47	東京大学医学部	グリオーマ、前立腺癌	(43)
		G207	$\Delta$ $\gamma$ 134.5, $\Delta$ ICP6	慶應義塾大学医学部	脳腫瘍、前立腺癌、膀胱癌	(44)
				九州大学医学部	胆嚢癌、胆道癌	(45)
		Synco-2D	syncytial phenotype, GALV.fus導入	和歌山県立医科大学	前立腺癌、腎癌、卵巣癌、乳癌	(46)
	遺伝子組換えアデノウイルス	Telomelysin (OBP-301) Telomelysin-RGD (OBP-405)	hTERT promoter hTERT promoter+RGD	岡山大学医学部 (Oncolys BioPharma)	大腸癌、非小細胞肺癌	(47)
		AxE1AdB AxdAdB-3 AxE1AdB-UPRT	$\Delta$ E1B55K $\Delta$ E1B55K, $\Delta$ E1A $\Delta$ E1B55K, $\Delta$ E1A+UPRT	東北大学医学部	膵臓癌、膀胱癌	(48)
		AdSLPI.E1AdB	SLPI promoter	東北大学医学部	非小細胞肺癌	(49)
		AxdAdB-3 AxE1CAUP	$\Delta$ E1B55K, $\Delta$ E1A $\Delta$ E1B55K, $\Delta$ E1A+UPRT	筑波大学	胆嚢癌、胆道癌	(50)
		AdE3-IAI.3B	IAI3B promoter	愛媛大学医学部	卵巣癌	(51)
		Ad-MK	midkine promoter		グリオーマ	(52)
		AdMK	midkine promoter	千葉県立がんセンター	肝癌、肝細胞癌	(53)
		AdCEAp/Rep AdAFPep/Rep	$\Delta$ E1B55K, CEA promoter $\Delta$ E1B55K, AFP promoter	札幌医科大学	大腸癌、肝癌	(54)
		hTERT-CRAAd	hTERT promoter	九州大学医学部	肺癌	(55)
遺伝子組換えセンダイウイルス	MMP-sub II SeV/delta M CD-MMP-sub II-SeV/delta M	MMP発現細胞に融合	DNAVEC	大腸癌、線維肉腫	(56)	
シンドビスウイルス	-	野生型	千葉大学医学部	食道癌、子宮頸癌	(57)	
レオウイルス3型	-	野生型	大分大学医学部	膵癌、同腹膜転移	(58)	

GALV.fus: fusogenic membrane protein  
 ICP6: ribonucleotide reductase large subunit  
 UPRT: uracyl phosphoribosyl transferase  
 SLPI: secretory leukoprotease inhibitor  
 hTERT: human telomerase reverse transcriptase

ICH 品質リスク管理 (Q9) ガイドラインは2005年3月に専門家会議における合意 (STEP 2) が達成され、各局政府による、一般からの意見収集の段階となった。“Q9 そのものは新しい薬事規制を作るものでないと同時に規制緩和を約束するものでもない。医薬品品質分野においてリスク管理の導入の土台作りである。”との合意を貫いている。この方針は、以下に示す、製薬企業および規制側の目論見の相違に起因している。

企業側 欧米に存在する製造法に係わる変更手続きの煩雑さは必要以上の資源を官民ともに浪費させており、リスク管理の採用により煩雑な手続きは排除することを合意したい。一方、リスク管理の要件化のみであれば、規制強化だけでなんの進歩ももたらさない。

規制側 リスク管理の適用は官民ともに行なうべきである。企業の自主的な採用は望ましい姿はある。しかし、一部ではかならず、悪用が出てくるため、安易に手続きの簡素化は約束できない。相互認証のため、行政内におけるリスク管理採用は必須になる。

多数提案されていた原則は①The evaluation of the risk to quality should ultimately link back to the protection of the patient ②The level of effort, formality and documentation of the quality risk management process should be commensurate with the level of risk and be based on scientific knowledge.の二つに絞り込まれ、今後の Quality System(Q10)など新規トピックにおいてリスク管理の具体的な適用がガイドライン化されるものと思われる。

製品開発及び製造工程の近代化をめざす Process Analytical Technology (PAT) について、米国食品医薬品局 (FDA) から最終ガイダンスが発行された。注意を促しているのは、PAT は単なる分析手法ではないということである。すなわち、工程を理解することの必要性、革新ならびに業界と当局の科学に係る高度の情報交換により製造効率を向上させることに着目し、品質を製品に作りこむ・設計することを強調している (Quality by Design)。

欧米企業では PAT の技術導入を積極的に捉えている一方、日本企業からは、PAT 導入へのためらいが感じられる。これは “規格に合えば十分である” との意識が強く残っているためと思われる。FDA、EU とも行政内に審査・監視合同の PAT チームを結成しているが日本にはそれらに相当するチームは存在しない。しかし日本へも遠くない将来 PAT をベースにした医薬品承認申請が行なわれるのは間違いないだろう。PAT ベースの申請においては① “製造工程パラメーターの管理ではなく、工程管理に品質に直接関係する特質の採用”、② “3ロットの実製造の確認が行なわれない：必要とされない”、③ “品質規格・試験は設定されているが、試験の実行はスキップする” などの提案が想定される。このような申請を科学的にかつリスクベースで審査・調査にあたり、妥当な判断を行なうことが強く求められる。

これらの動向を鑑みると、行政官へ対し一層の技術教育を行なう必要がある一方、行政がどの程度、企業活動の詳細に立ち入るべきかの基本的方針を設定すべきである。医薬品の品質保証体制は PAT に代表される技術革新を取り込みつつ Quality System など国際専門家会議の議論を通じ大きく変化を遂げようとしている。我が国においては改正薬事法施行を好機と捉え、企業・行政とも競争力をつけることが必須であることには変わりはない。

## A. はじめに

本分担研究では昨年に引き続き医薬品規制国際調和会議 (ICH) の品質リスク管理(Q9)の議論の進捗および Process Analytical Technology (PAT) の進展について報告する。

2003年7月のブラッセルの ICH 専門家会議以来、品質保証体制全体を見直そうとの国際的な動きとなり、製剤開発 (Q8)、リスク管理 (Q9) の2課題が採択された。課題は

- ① 品質を製品に織り込むための科学的な製剤開発および製造プロセス管理法
- ② ①のゴールになる有効性・安全性をベースにした公的品質規格の考え方とそれをもとにした品質管理の考え方
- ③ ①のゴールを達成するための技術的な道具 (例えば分光法ベースの化学イメージング) の開発。

であると昨年度の本分担研究で報告した。又、この3つのそれぞれが医薬品の製造にとっては不足しているが、基本となる手法は他の分野でほとんど適用されている。したがって、これらを解決するには意欲があれば時間の問題と考察した。

ICH Q9 ガイドラインは2005年3月に専門家会議における合意 (STEP 2) が達成され、各局政府による、一般からの意見収集の段階となった。製品開発及び製造工程の近代化をめざす PAT については米国食品医薬品局 (FDA) から最終ガイダンスが発行された。最終ガイダンスの概観および国内外における議論の概要を記述し、将来の課題を考察する。

## B 国際調和専門家会議における“品質におけるリスク管理ガイドライン Q9”の議論

2004年3月のロンドン会議で Q9 ガイドラインの構成および用語定義案がまとめられた。この段階で、これらの案を専門家会議メンバー以外に公表し、意見募集を行なうことが決定された。意見・質問の主なものは

- ① 適用範囲が多岐にわたるため、ガイドライン

目的がはっきりしない。

- ② ①の状態であると、実効の伴わないガイドラインになるのではないか。
- ③ リスクの定義を狭くした理由は何ゆえか？  
つまり ISO/IEC Guide 51 の定義 (Combination of the probability of occurrence of harm and the severity of that harm (“危害が発生する可能性およびその危害が生じた場合の重篤度の組み合わせ”) を採用し、“経営者によるリスクマネジメント ISO/IEC 73: 対象を harm ではなく event とする“より広い定義を採用をしなかったのはなぜか？

③の質問に対する専門家会議の立場は：広い定義にすると Q9 で想定する“品質に関するリスク” (ほとんどがネガティブの event) の視野が不必要に広がるおそれがあるため Guide 51 の定義を採用する。

Q9 の専門家会議における“Q9 では新規の規制を導入しない”との暗黙の方針を貫き、要件となる部分は全く無いため①、②の懸念は当然のものである。この方針は、以下に示す、製薬企業および規制側の目論見の相違に起因している。

企業側 欧米に存在する製造法に係わる変更手続きの煩雑さは必要以上の資源を官民ともに浪費させており、リスク管理の採用により煩雑な手続きは排除することを合意したい。一方、リスク管理の要件化のみであれば、規制強化だけでなんの進歩ももたらさない。

規制側 リスク管理の適用は官民ともに行なうべきである。企業の自主的な採用は望ましい姿である。しかし、一部ではかならず、悪用が出てくるため、安易に手続きの簡素化は約束できない。相互認証のため、行政内におけるリスク管理採用は必須になるのではないか。

ロンドンの会議後、各項目に対応するテキストを持ち寄り、5月27日には version 1 を作成した。Version 1 に対する意見を6月のワシントン会議までに提出することとなった。Version 1 は