

201239019A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業(がん関係研究分野)

希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究

(H24-実用化(がん)-一般-007)

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 藤堂 具紀

平成25(2013)年 5月

## 目 次

### I. 総括研究報告

- 希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究 ----- 1  
藤堂 具紀

### II. 分担研究報告

1. 悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造 ----- 9  
稲生 靖
2. 前立腺癌に対するウイルス療法の開発 ----- 13  
福原 浩
3. 希少・難治がんに対するウイルス療法の開発 ----- 17  
中原 寛和
4. 希少・難治がんに対するウイルス療法の開発 ----- 23  
中森 幹人
5. 小児悪性固形腫瘍に対する腫瘍融解ウイルスを用いた新規治療開発に関する  
研究 ----- 25  
菱木 知郎
6. 希少・難治がんに対するウイルス療法の開発 ----- 29  
菅原 稔

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 32

### IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 35

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))  
総括 研究報告書

「希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究」

研究代表者 藤堂 具紀 (東京大学医科学研究所・教授)

研究要旨

がんの死亡率は増加の一途を辿っており、特に希少・難治性がんや、標準治療後に再発して有効治療の選択肢がなくなったがん難民に対する新しいがん治療法開発のニーズは高い。がん特異的に複製するウイルスをがん細胞に感染させ、ウイルス複製による直接的な殺細胞作用を利用する「ウイルス療法」は、放射線治療や化学療法が効かないがん幹細胞をも根絶し得る革新的な治療法として注目される。単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)はがん治療に有利な特長を多く有し、殊に第三世代HSV-1 (G47Δ) は、人為的三重変異によって高い安全性と強力な抗腫瘍作用を実現し、我が国で世界に先駆けた開発を進めている。GMPグレードで臨床用G47Δ製剤の製造を行い、厚生労働省の承認を得て、平成21年より脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫の再発患者を対象としたfirst-in-man臨床研究を開始した。これまでG47Δに起因する特記すべき有害事象はなく、標準治療では得られない効果を示唆する臨床所見も一部観察されている。本研究では、膠芽腫を対象とした臨床研究を進展させ、我が国初のウイルス療法の医師主導治験を開始し、最終的な薬事承認を目指す。また、遺伝子組換えHSV-1療法に精通した研究者でチームを組み、膠芽腫以外の難治性がんへの適応拡大の可能性を探究し、我が国におけるウイルス療法の普及と実用化を目指す。平成24年度には、医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を通して、膠芽腫に対する医師主導治験の準備と確認申請書類の作成、非臨床試験、臨床用ウイルス製剤のGMP製造と品質試験、他の難治性がんに対するウイルス療法の基礎開発を行った。今後、確認申請の承認を経て、医師主導治験を開始する。GCPに則った臨床データの蓄積を行って第II相治験へつなげ、可及的早期の製品化の道を探る。本研究の成果はがんの制圧に向けた医療に直接貢献するのみならず、医療費削減や新産業育成など経済・社会効果が期待できる。汎用性・応用性に優れた我が国発の革新的がん治療法を確立させる。

## A. 研究目的

がんの死亡率が増加の一途を辿る中、希少がんや標準治療後に再発して有効治療の選択肢がなくなったがんに対する新規治療法開発のニーズは高い。がん特異的に複製するウイルスをがん細胞に感染させ、ウイルス複製による直接的な殺細胞作用を利用してがんの治癒を図るウイルス療法は、全く新しい概念に基づく治療法であり、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)は早くから応用が試みられた[1]。本研究は、脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫を対象とした臨床試験を医師主導治験で実施し、最終的な薬事承認を目指す。本研究で活用するG47Δは、人為的三重変異により高い安全性を保ったまま強い抗がん作用を実現した世界唯一の第三世代がん治療用HSV-1であり、その治療域の広さは、他のがん治療用ウイルスの追随を許していない[2]。G47Δは第二世代HSV-1 (G207) [3]を更に改良して治療域を広め、安全性を向上させながらG207の約10倍の抗がん作用を示し、また10倍の濃度の製剤を生産することを可能にした。G47Δは特異的抗腫瘍免疫を強く惹起するため、一箇所のがん病変に対する局所治療が全身に転移したがんを制御する可能性がある[4]。G47Δはまた、がん幹細胞を効率よく殺すことが最近判明した[5]。これらは化学療法や放射線治療のいずれにも見られない新しい作用機序であり、実用化されれば、根治的治療としてがんの治療選択を大きく変えると期待される。平成21年より再発膠芽腫を対象としたfirst-in-man臨床研究を開始した。これまでG47Δに起因する特記すべき有害事象はなく、標準治療では得られない効果を示唆す

る臨床所見も一部観察されている。本研究では、研究期間内に膠芽腫を対象とした医師主導治験を実施してGCPで臨床データを蓄積し、更に第II相治験へつなげる。すでに、医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を通して準備と書類作成を行っており、平成25年度中の開始を目指している。本研究ではまた遺伝子組換えHSV-1療法に精通した研究者でチームを組み、膠芽腫以外の難治性がんへの適応拡大を探求する。本研究の最大の特徴は、がんの多様性に対応しうる応用範囲の広さと実用化への直結であり、世界をリードする開発実績を背景に我が国発のがん治療開発を実現して、研究成果の社会還元を目指す。

- 1) Martuza RL et al: Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252: 854-856, 1991.
- 2) Todo T et al. Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci US A* 98: 6396-6401, 2001.
- 3) Markert JM, Todo T 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.
- 4) Todo T, et al: Systemic antitumor immunity in experimental brain tumor therapy using a multi mutated, replication-competent herpes simplex virus. *Hum Gene Ther* 10: 2741-2755, 1999.
- 5) Takahashi M, Ino Y, Todo T: Efficient killing of cancer stem-like cells derived from human glioblast

oma using oncolytic HSV-1 (G47Δ). 第68回日本癌学会学術総会, 2009.

## B. 研究方法

ウイルス療法は、がん細胞に感染したがん治療用ウイルスが、がんの中で増えながら直接がん細胞を破壊する。HSV-1のウイルスゲノムを遺伝子工学的にデザインし意図的に治療域を広げることで、がん治療に最適なHSV-1が得られる。HSV-1療法は、特異的抗腫瘍免疫を誘導して局所治療で遠隔の転移巣にも治療効果を及ぼし、がん幹細胞をも効率良く殺すことから、新しい根治的治療法として高いポテンシャルを有する。G47Δは、研究代表者らが開発した世界初の第三世代の遺伝子組換えHSV-1であり、三重変異により高い安全性を保ったまま強い抗がん作用を実現した。その治療域の広さは、他のがん治療用ウイルスの追随を許さず、第二世代HSV-1 (G207) に比べると、約10倍の抗がん作用と、約10倍の濃度の製剤生産が得られる。First-in-man臨床研究は脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫の再発患者を対象とし、遺伝子治療指針に則って厚労省の承認を得、平成21年11月より被験者登録を開始した。使用する臨床用G47Δ製剤は学内のP2対応Cell Processing Center (CPC)においてGMPで製造した。第I-IIa相の試験デザインとし、主要エンドポイントを安全性の評価としたこの試験は、PMDAからの出向者をプロジェクトマネージャーとし、既にIIa相段階に進んでいる。これまでG47Δに起因する特記すべき有害事象はなく、標準治療では得られない効果を示唆する臨床所見も一部観察された。本研究では、進

行中の臨床研究から得られたデータと経験を基に、我が国初のウイルス療法の医師主導治験を開始し、GCPで臨床データを蓄積する。主体となる東大医科学研究所附属病院は先端医療開発をミッションとし、データセンターを始め探索的臨床試験病院やGMP準拠CPC施設など臨床研究実施のための充実した基盤を有する。

本研究で実施する臨床試験の概要は以下を想定している：

### (1) 対象疾患

- 初期治療後に残存もしくは再増大した膠芽腫

### (2) 試験のデザイン

- 第I-IIa相。単アーム。

- 定位脳手術により腫瘍内にG47Δを投与

- KPSが50%になるまで1ヶ月ごとに繰り返し投与

- 目標症例：20例

- 主要エンドポイント：全生存期間、無増悪生存期間、画像上の腫瘍変化

### (3) 主な選択基準

- 病理診断が確定している

- 初期放射線治療が終了している

- 18歳以上、造影MRIで1cm以上の病変が描出される

- KPS 60%以上 など

本臨床研究は悪性脳腫瘍を切り口としてG47Δの最終的な薬事承認を目指す。一方、前臨床ではあらゆる固形がんにも有効であることが示唆される。本研究の主体となる膠芽腫の臨床試験と並行して、遺伝子組換えHSV-1に精通した研究者でチームを組み、他の希少・難治性がんにも適応を広げて我が国におけるウイルス療法の実用化を目指す。特に

ホルモン療法抵抗性前立腺癌や悪性中皮腫については可及的早期の臨床開発を図る。3年間の具体的計画は以下の通り：

平成24年度

1. 膠芽腫を対象とした医師主導治験に向けた確認申請の準備（藤堂・稲生）
2. 治験のための臨床用G47Δ 製剤の製造（東大）
3. ホルモン療法抵抗性前立腺癌の臨床研究のための体制整備（福原）
4. 他の希少・難治性がんを対象とした非臨床試験（中森、中原、菱木、菅原）

平成25年度

1. 膠芽腫を対象とした臨床プロトコル作成、医師主導治験の申請と開始（藤堂・稲生）
2. 臨床用G47Δ製剤のGMP製造とGLP品質試験（藤堂・稲生）
3. ホルモン療法抵抗性前立腺癌の臨床研究の開始（福原）
4. 他の希少・難治性がんを対象とした非臨床試験（中森、中原、菱木、菅原）

平成26年度

1. 臨床試験のGLP実施とデータ蓄積・解析
2. 第II相治験の準備
3. 他の希少・難治性がんの臨床実施計画の策定

（倫理面への配慮）

本研究は、遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正、文部科学省・厚生労働省）、遺伝子組換え実験等の使用等の

規制による生物の多様性の確保に関する法律（カルタヘナ法）（平成15年法律第97号）、遺伝子組換え実験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施行規則（平成15年財務・文部科学・厚生労働・農林水産・経済産業環境省令第1号）、および研究開発等に係る遺伝子組換え実験等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年文部科学・環境省令第1号）を遵守して行われる。東京大学においては、東京大学研究用微生物管理規則、東京大学遺伝子組換え生物等の使用等実施規則、および東京大学研究用微生物安全管理マニュアルが制定されており、それらに則って保管管理および利用を行う。東京大学においては、東京大学医科学研究所遺伝子組み換え生物等委員会もしくは東京大学医学部組換えDNA安全委員会よりP2レベルの承認を受けた実験室にておいて実験は行われる。東京大学で行う遺伝子組み換え実験は、申請者の「組換えDNA実験計画書」（課題名「遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型を用いた腫瘍ウイルス療法」）に含まれ、平成15年4月30日に東京大学医学部の組替えDNA実験委員会に提出され、平成15年7月1日付で承認された。同実験計画書は、東京大学の組替えDNA実験委員会における平成15年8月8日の審議を経て、「組換えDNA実験指針」（平成14年1月31日文部科学省告示第5号）第1章第4の規定に基づき、文部科学省の科学技術・学術審議会生命倫理・安全部会組換えDNA技術等専門委員会にて検討され、平成15年10月1日付にて実験計画通り文部科学大臣より確認

を受けた。同計画書は遺伝子組換え生物等の使用等の規制に関する生物の多様性の確保に関する法律第13条第1項の規定と書式の改定に伴い文部科学省に再度申請され、平成16年8月9日第27回遺伝子組換え技術等専門委員会にて第二種使用等拡散防止措置確認を受けた。実験場所追加のため、全く同内容の計画書を再度新規申請として平成17年11月28日付で文部科学省に提出し、平成18年5月16日付で大臣確認を得た（17学文科振第627号）。更なる実験場所と遺伝子組換えウイルス追加のため、都度同課題を新規申請として文部科学省に提出し、平成19年6月13日付（18学文科振第776号）、平成20年2月21日付（19学文科振第408号）、平成21年6月1日付（21学文科振第6551号）にてそれぞれ大臣確認を得た。更に実験管理者の異動と実験場所の追加のため同内容で申請を行い平成24年6月6日付（24受文科振第417号）、使用場所の追加に伴い平成24年7月18日付（24受文科振第719号）、平成24年10月3日付（24受文科振第1765号）、平成25年3月25日付（24受文科振第2953号）で大臣確認を得た。これに従い本研究では適切な拡散防止措置がとられる。がん研究会、和歌山医大、千葉大、大阪大（近畿大中原の実験場所）、岩手医大、関西医大においても同様に第二種使用拡散防止措置の文部科学大臣確認を受けた。東京大学において動物を使用する実験については、東京大学動物実験実施規則に従って作成され、審査、承認を受けた動物実験計画に基づいて実施される。また、単純ヘルペスウイルス1型と2型、およびそれに由来する遺伝子

組換えウイルスについて、「レベル2微生物取扱等届出書」（利用責任者および保管責任者：藤堂具紀）が平成24年3月27日付で東京大学医科学研究所長に提出されている。

### C. 研究結果

研究代表者は、がん特異的に複製する第三世代単純ヘルペスウイルスI型（G47Δ）を開発し、脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫の再発患者を対象として、我が国で初めてのウイルス療法臨床試験となるfirst-in-man臨床研究を行ってきた。これまでG47Δに起因する特記すべき有害事象はなく、標準治療では得られない効果を示唆する臨床所見も一部観察されている。本研究では、進行中の臨床研究から得られたデータと経験を基に、我が国初のウイルス療法の医師主導治験を開始し、最終的な薬事承認を目指す。平成24年度は東大医科学研究所附属病院でG47Δの臨床研究を実施するために、臨床チームの準備と環境の整備、更に遺伝子治療臨床研究審査委員会の立ち上げと審査を行い、実施計画書と遺伝子組換え生物等第一種使用規程申請を厚労省に提出した。実施計画については、平成25年3月22日付で厚生労働大臣の承認を得た。また、医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を通して、膠芽腫を対象とした医師主導治験のプロトコルの作成と確認申請書類の準備、非臨床試験、臨床用ウイルス製剤のGMP製造と品質試験、他の難治性がんに対するウイルス療法の基礎開発を行った。特に、臨床用ウイルス製剤の製造については、第II相以降の治験に対応できるよう、東大医科学研究所内のP2対応CPCにおい

て研究チームによるGMP製造と平行して、異なる製造方法を用いた外部委託によるGMP製造を実施した。遺伝子組換えHSV-1療法に精通した研究者でチームを編成し、膠芽腫以外の難治性がんへの適応拡大の可能性を探究した。

#### D. 考察

希少がんや難治性がん、標準治療後に再発を来したがん難民に対する新しい治療選択肢のニーズは高く、実用性の高い革新的治療法の国内開発が待望される。遺伝子組換えHSV-1を用いたウイルス療法は、遺伝学的背景や分子機構に左右されずあらゆる固形がんに応用できるという汎用性があり、既存の治療法との併用による相乗効果や副作用の低さ、抗腫瘍免疫の誘導など、革新性と実用化ポテンシャルが高い。本研究では、世界最新型の遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)を悪性脳腫瘍に臨床応用し、医師主導治験を実施して最終的な薬事承認を目指している。更に国内の研究班を組織し、我が国におけるウイルス療法開発を国際レベルに上げて、他の希少・難治性がんに対しても適応拡大を探求する。手術、放射線治療、薬物療法に限られていたがん治療に、新しく標準となりうる治療ジャンルを導入し、治療の選択肢を増やすことの意義は大きく、がん治療成績の飛躍的向上につながり得る。医療行政上は、治療成績の改善や患者QOLの改善に伴って喪失国民所得を削減することができ、入院・介助患者数減少による医療費削減効果にもつながる。医療産業の面でも、G47Δを基に、遺伝子組換えによってさまざまな機能付加型のがん治療用HSV-1が開発可能で、創薬として発

展しうる。ウイルス製剤の開発、生産、品質テストなど我が国の新産業や周辺産業の育成にもつながり得る。

本研究は、真にアカデミア発の医師主導治験の実施である。我が国に前例のないウイルス療法の治験であることから、規制対応の予想が困難であるが、平成25年度中には、確認申請の承認を経て、医師主導治験を開始することを目指して開発研究を進めている。

#### E. 結論

世界最新型の遺伝子組換えHSV-1(G47Δ)を悪性脳腫瘍に臨床応用し、真にアカデミア主体の医師主導治験の実現に向けて着々と前進している。遺伝子組換えHSV-1療法に精通した研究者で、日本初の全国的研究班が組織され、希少がん・難治性がんに対するウイルス療法の非臨床データが蓄積しつつある。我が国におけるウイルス療法の可及的速やかな普及と実用化を目指す。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- ①Koga T, Maruyama K, Tanaka M, Ino Y, Saito N, Nakagawa K, Shibahara J, Todo T: Extended field stereotactic radiosurgery for recurrent glioblastoma. *Cancer* 118 (17): 4193-4200, 2012 (published online 16 DEC 2011 | DOI: 10.1002/cncr.27372).



- ②Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M, Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T, Yamaue H: An armed oncolytic herpes simplex virus expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo antitumor effect against human gastric cancer. *Int J Cancer* 132 (2): 485-494, 2013 (published online 2012 Jun 22. doi: 10.1002/ijc.27681).
- ③Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T, Akiyama T: The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* (published online 2012 Sep 10. doi: 10.1038/onc.2012.399).
- ④Tanaka M, Tsuno NH, Fujii T, Todo T, Saito N, Takahashi K: Human umbilical vein endothelial cell vaccine therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Cancer Sci* 104 (2): 200-205, 2013 (Epub 2012 Oct 27. doi: 10.1111/cas.12055).
- ⑤Shibui S, Narita Y, Mizusawa J, Beppu T, Ogasawara K, Sawamura Y, Kobayashi H, Nishikawa R, Mishima K, Muragaki Y, Maruyama T, Kuratsu J, Nakamura H, Kochi M, Minamida Y, Yamaki T, Kumabe T, Tominaga T, Kayama T, Sakurada K, Nagane M, Kobayashi K, Nakamura H, Ito T, Yazaki T, Sasaki H, Tanaka K, Takahashi H, Asai A, Todo T, Wakabayashi T, Takahashi J, Takano S, Fujimaki T, Sumi M, Miyakita Y, Nakazato Y, Sato A, Fukuda H, Nomura K: Randomized trial of chemoradiotherapy and adjuvant chemotherapy with nimustine (ACNU) versus nimustine plus procarbazine for newly diagnosed anaplastic astrocytoma and glioblastoma (JCOG0305). *Cancer Chemother Pharmacol* 71 (2): 511-512, 2013 (Epub 2012 Dec 11. doi: 10.1007/s00280-012-2041-5)
2. 学会発表
- ①藤堂具紀：ウイルス療法（プレナリーセッション「グリオーマ 新しい時代の到来」）。第32回日本脳神経外科コンgres総会（東京）、2012年5月13日。
- ② Todo T: Clinical development of oncolytic virus therapy. The 39<sup>th</sup> IMSUT Founding Commemorative Symposium（東京大学医科学研究所創立記念シンポジウム）（東大医科学研究所）、2012年6月1日。
- ③ Todo T, Ino Y: An ongoing clinical trial of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 in recurrent glioblastoma patients in Japan. The 19<sup>th</sup> International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, Niagara Falls, Ontario, Canada. June 21 – 24, 2012.
- ④ 藤堂具紀、田中実、稲生靖：An ongoing clinical trial of a third-generation recombinant oncolytic HSV-1 (G47Δ) in recurrent glioblastoma patients. 第18回日本

遺伝子治療学会（熊本）、2012年6月28-30

日。

⑤ 藤堂具紀：がんのウイルス療法の臨床開発。東京大学TRイニシアチブ第3回シンポジウム

（東京大学）、2012年11月23日。

⑥ Todo T: Oncolytic virus therapy using genetically engineered herpes simplex viruses. International Symposium on Development of Medical Technologies for Treating Intractable Cancers and Cardiovascular Diseases, Tokyo. March 1-2, 2013.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))  
分担研究報告書

希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究  
(悪性脳腫瘍に対するウイルス療法の開発と臨床製剤製造)

研究分担者 稲生 靖  
東京大学医科学研究所 先端がん治療分野 准教授

研究要旨

遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス I 型 (HSV-1) を用いたウイルス療法は、進行性膠芽腫を対象とする臨床研究として、東京大学医学部附属病院で開始されている。同研究の実施設として東京大学医科学研究所附属病院を実施計画書に追加記載して申請し、平成25年3月22日付けで厚生労働大臣の承認を得た。並行して治験実施のための準備を行い、医薬品医療機器総合機構での事前面談を経て、確認申請の資料を外部機関に委託して整えている。治験に使用するためのウイルス製剤として、医科学研究所治療ベクター開発室においてG47Δ製剤の追加調製を行った。一方、海外の外部委託機関を使用しての製剤の調製も進めており、製造方法についての技術移転を経て中規模での調製を実施した。

A. 研究目的

がん特異的に複製するウイルスをがん細胞に感染させ、ウイルス複製による直接的な殺細胞作用を利用してがんの治癒を図るウイルス療法は、全く新しい概念に基づく治療法であり、遺伝子組換え単純ヘルペスウイルスI型(HSV-1)は早くから応用が試みられている。本研究で使用するG47Δは、人為的三重変異により高い安全性を保ったまま強い抗がん作用を実現した第三世代がん治療用HSV-1である。G47Δは第二世代HSV-1 (G207) を更に改良して治療域を広め、安全性を向上させながらG207の約10倍の抗がん作用を示し、また10倍の濃度の

製剤の調製を可能にした。G47Δは特異的抗腫瘍免疫を強く惹起するため、がん病変に対する局所治療が全身に転移したがんを制御する可能性がある。G47Δはまた、がん幹細胞を効率よく殺すことが最近判明している。これらは化学療法や放射線治療のいずれにも見られない新しい作用機序であり、実用化されれば、根治的治療としてがんの治療選択を大きく変えると期待される。本研究は、脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫を対象とした治験の実施と、最終的な薬事承認を目的とする。

B. 研究方法

研究代表者および分担研究者らは学内のP2対応CPCにおいて臨床用G47Δ製剤をcGMPで2ロット製造し、各ロットのGLP品質試験を完了している。First-in-man臨床研究は脳腫瘍の中で最も悪性度が高い膠芽腫の再発患者を対象とし、遺伝子治療指針に則って厚生省の承認を得、平成21年11月より被験者登録を開始した。第I-IIa相の試験デザインとし、主要エンドポイントを安全性の評価としたこの試験は現在IIa相段階にある。本研究ではG47Δの臨床開発を第II相に発展させ、治験として実施し、GCPで臨床データを蓄積する。主体となる医科研病院は先端医療開発をミッションとし、臨床研究実施のための充実した基盤を有する。

(倫理面への配慮) 本研究は、遺伝子治療臨床研究に関する指針(平成14年3月27日、平成16年12月28日全部改正、平成20年12月1日一部改正、文部科学省・厚生労働省)、遺伝子組換え実験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(カルタヘナ法)(平成15年法律第97号)、および研究開発等に係る遺伝子組換え実験等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令(平成16年文部科学・環境省令第1号)を遵守して行われる。東京大学医学部組換えDNA安全委員会よりP2レベルの承認を受けた実験室にておいて実験は行われる。遺伝子組み換え実験は、使用場所の追加に伴う数回の申請と承認を経て、現在は「遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型を用いた腫瘍ウイルス療法 VI」として平成25年3月25日付にて(24受文科振第2953号)大臣確認を受けている。動物を使用する実験については、東京大学動物実験実施規則に従って作成

され、審査、承認を受けた動物実験計画(A12-11, PM24-26)に基づいて実施される。また、単純ヘルペスウイルス1型と2型、およびそれ由来する遺伝子組換えウイルスについて、「レベル2微生物取扱等届出書」が平成24年3月27日付で東京大学医科学研究所長に提出されている。医科学研究所におけるウイルス療法臨床研究の実施については、平成25年3月22日付にて厚生労働大臣の承認を得ており(厚生労働省発科0322第2号)、第一種使用規定についても申請を行っている。臨床研究に関する倫理指針には該当せず、ヒトES細胞を用いる研究にも該当しない。

#### C. 研究結果

治験を行うにあたり必要となるウイルスを十分に確保するため、医科学研究所治療ベクター開発室を使用して、第三ロットのG47Δの調製を実施した。第二ロットまでと同じ工程で調製を行ない、外部委託機関にてGMP規格での品質試験を完了している。並行して、中～大規模製造のための技術開発を進め、培養担体とバイオリクターを使用した細胞培養方法およびウイルス培養についての条件検討を行った。さらに、中規模培養における精製および濃縮の工程の改良を行い、大量の培養液の取扱いを可能とした。精製工程における回収率の向上と、工程のGMP化のための素材や手順の検討が必要であるものの、中～大規模製造のためのウイルス液調製、精製、濃縮の工程の準備は概ね完成している。

これらと並行して、外部機関(海外)に委託しての製造の技術移転および製造を実施した。G47Δ

と類似の遺伝子組換えHSV-1の製造の経験がある  
とされる機関を選定し、製造方法の技術移転の後  
に中規模での製造を行った。

治験実施のための臨床プロトコールについては、  
まず東京大学医学部附属病院で実施中の臨床研究  
に医科学研究所附属病院を追加するとの内容での  
変更申請を行うこととし、医科学研究所での遺伝  
子治療臨床研究審査委員会における審査を経て厚  
生労働省に申請し、平成25年3月22日付にて厚生  
労働大臣の承認を得ている。治験申請にむけての  
確認申請に必要な資料等に関して医薬品医療機器  
総合機構での事前面談を受け、それに基づいて確  
認申請のための書類整備を進めた。

#### D. 考察

学内施設での製剤調製においては、第二ロット  
までと同様の規模および濃度のG47Δウイルスが  
得られ、安定した調製方法であることが示唆され  
た。一方、中規模から大規模製造に向けての新た  
な製造工程の開発においては、参考となりうる文  
献から推定した収量の期待値に近い効率、規模、  
コストでの調製が可能であることが示された。外  
部委託機関における製造においても、当該方法を  
もとにした工程を採用されており、将来の製品化  
にむけても有望な方法と期待される。

#### E. まとめ（結論）

G47Δによるウイルス療法の治験の実施にむけ  
て、ウイルス製剤の追加調製と中～大規模製造の  
ための技術開発を行なった。現在進行中の、膠芽  
腫を対象とした臨床研究の実施施設として医科学

研究所附属病院を追加する手続きを行い、厚生労  
働大臣の承認を得た。治験実施のために必要な確  
認申請を行うための申請書類の整備を進めた。次  
年度の治験実施に向けての準備が進んでいる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y,  
Saito N, Aburatani H, Funato K, Echizen K, Sugano H,  
Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T,  
Akiyama T.: The critical role of cyclin D2 in cell cycle  
progression and tumorigenicity of glioblastoma stem  
cells. *Oncogene*. 2012 Sep 10. doi: 10.1038/  
onc.2012.399

Tsuji T, Nakamori M, Iwahashi M, Nakamura M,  
Ojima T, Iida T, Katsuda M, Hayata K, Ino Y, Todo T,  
Yamaue H.: An armed oncolytic herpes simplex virus  
expressing thrombospondin-1 has an enhanced in vivo  
antitumor effect against human gastric cancer. *Int J  
Cancer*. 132(2): 485-494, 2013

##### 2. 学会発表

2012年6月21-24日 (Niagara Falls, Canada) The  
19th International Conference on Brain Tumor Research  
and Therapy; Ino Y, Fukuhara H, Takahashi M,  
Nakatsubo T, Todo T Oncolytic HSV-1 virus therapy  
targeting glioblastoma-derived cancer stem cells

2012年6月28-30日 (熊本) 第18回日本遺伝子治  
療学会学術集会; Nakatsubo T, Fukuhara H, Takahashi

M, Ino Y, Todo T Oncolytic herpes simplex virus type  
1 virus therapy targeting cancer stem-like cells

2012年9月19-21日 (札幌) 第71回日本癌学会学  
術総会; 稲生靖、中坪拓也、高橋雅道、福原浩、藤  
堂具紀 脳腫瘍由来がん幹細胞を標的としたがん  
治療用HSV-1の開発

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))  
分担研究報告書

希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究  
(前立腺癌に対するウイルス療法の開発)

研究分担者 福原 浩  
東京大学医学系研究科 泌尿器科 講師

研究要旨

前立腺癌は、局所に限局している場合は手術療法や放射線療法が行われ、比較的予後が良い疾患であるが、ホルモン療法に抵抗性となった場合は有効な治療法がないのが現状である。ホルモン療法抵抗性となつてからの生存期間中央値は12-15ヶ月であり、新たな機序による治療法が期待されている。そのため、今回、ホルモン療法抵抗性前立腺癌に対する臨床研究を計画しており、これは国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応される、国内初の臨床研究となる。

A. 研究目的

ホルモン療法を施行したにもかかわらず再燃(再発)した前立腺癌に対して、治療手段は非常に限られており、ホルモン療法に抵抗性となつてからは、生存期間中央値(いわゆる平均余命)が12-15ヶ月とされている。抗癌剤治療が行われることがあるが、対象に高齢者が多いこともあり、そもそも選択されないことも多く。唯一効果があるとされるドセタキセルでも平均2-3ヶ月の延命効果しか認めていない。また、骨髄抑制などの副作用にて消耗して治療中止となる場合も多く見られるのが現状である。前立腺癌は多くの研究がなされている分野でありながら、再燃した際には有効な手だてがないことから、今回臨床研究を開始するウイルス療法のような、全く新しいアプローチによる

治療法開発が待ち望まれている。

G47Δをホルモン療法抵抗性前立腺癌患者に投与することが今回の臨床研究の目的である。

B. 研究方法

前立腺を摘出しておらず、ホルモン療法後に再燃した前立腺癌患者を対象疾患とする。遠隔転移がある場合も含み、抗癌剤ドセタキセル投与の既往は問わない。試験デザインは安全性確認の第I相とする。

経直腸超音波ガイド下に経会陰的(経皮的)に前立腺内に2カ所投与する方法で行い、3例ずつ3段階で増加(2回投与→3回投与→4回投与、合計9例)する用量増加方法で行う。主目的は安全性の評価で、観察期間を6ヶ月、生存

期間追跡は2年間行うこととする。

#### C. 研究結果

ウイルス療法は、厳密には遺伝子治療ではないが、今回の実施計画書は、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に則って審査を受けている。平成23年8月に東京大学医学部遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認を受けたのち、厚生労働省に申請され、平成24年8月7日付で厚生労働大臣の承認を受けた。また、増殖型遺伝子組換えウイルスを使用するため、「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」（カルタヘナ法）に則って、第一種使用規程が厚生労働省に同時申請され、厚生労働大臣と環境大臣の承認を受けている。国の承認を受けて行うウイルス療法として前立腺癌に適応されるのは、今回の臨床研究が国内で初めてとなる。

#### D. 考察

平成25年4月には、この臨床研究を東京大学医学部附属病院泌尿器科にて開始する予定である。

#### E. 結論

ホルモン療法抵抗性再燃前立腺癌に対して、増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス1型G47Δを用いたウイルス療法の臨床研究を東京大学医学部附属病院泌尿器科に開始する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miyazaki H, Kume H, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Homma Y. Leukopenia as a risk factor for osteonecrosis of the jaw in metastatic prostate cancer receiving zoledronic acid and docetaxel. BJU Int. 2012, in press.
2. Nakamura M, Fujimura T, Nagata M, Hosoda C, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Association between lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction assessed using the core lower urinary tract symptom score and International index of erectile function-5 questionnaires. Aging Male. 15, 111-114, 2012.
3. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Nishimatsu H, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Ohe K, Matsuda S, Homma Y. Management trends, angioembolization performance and multiorgan injury indicators of renal trauma from Japanese administrative claims database. Int J Urol. 19, 559-563, 2012.
4. Fujimura T, Kume H, Nishimatsu H, Sugihara T, Nomiya A, Tsurumaki Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Homma Y. Assessment of lower urinary tract symptoms in men by international prostate symptom score and core lower urinary tract symptom score. BJU Int. 109, 1512-1516, 2012.



5. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y.

Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer* 130, 1329-1337, 2012.

6. 福原 浩、本間之夫；海外学会における腫瘍トピックス・AUA2012— 前立腺全摘除術におけるリンパ節郭清. *泌尿器外科*, 25(10), 2023-2026, 2012.

7. 山本幸, 野宮明, 萩原奏, 鈴木基文, 藤村哲也, 福原浩, 榎本裕, 西松寛明, 石川晃, 久米春喜, 井川靖彦, 本間之夫；膀胱充滿時の膀胱痛を契機に発見された膀胱ヘルニアの1例. *泌尿器外科*, 25, 237-240, 2012.

8. 亀井潤, 久米春喜, 鈴木基文, 藤村哲也, 福原浩, 榎本裕, 西松寛明, 石川晃, 井川靖彦, 本間之夫；術後8年後に再発した左精索悪性線維性組織球腫の1例. *日本泌尿器科学会雑誌*, 103, 18-21, 2012.

本間之夫, 鈴木基文, 中山真理子, 藤村哲也, 福原浩, 榎本裕, 西松寛明, 石川晃, 久米春喜, 井川靖彦；泌尿器科に関する市民意識—インターネットによる調査. *泌尿器外科*, 25, 267-281, 2012.

## 2. 学会発表

- ① Hou J, Takeshima Y, Fukuhara H, Homma Y, Ino Y, Todo T. Oncolytic herpes simplex virus type 1 (HSV-1) armed with IL-12 for treating bladder cancer. 第6回 日中泌尿器科会議. 2012.4.23 横浜
- ② Sato YT, Fukuhara H, Hou J, Takeshima Y, Homma Y, Ino Y, Todo T. COMBINATION

THERAPY FOR RENAL CELL CANCER USING AN ONCOLYTIC HSV-1 ARMED WITH SOLUBLE B7-1 AND ANTI-CTLA4 ANTIBODY. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 2012.6.30 熊本

- ③ 竹島雄太、福原 浩、侯 劍剛、本間之夫、稲生 靖、藤堂具紀。前立腺癌の増殖速度に非依存的に高い抗腫瘍効果を発揮する新規遺伝子改変型 HSV-1。日本癌学会 2012.9.20 札幌
- ④ Fukuhara H, Takeshima Y, Hou J, Sato YT, Homma Y, Ino Y, Todo T. Development of novel oncolytic HSV-1 using tumor/tissue specific promoters. 第18回日本遺伝子治療学会学術集会 2012.6.30 熊本
- ⑤ 福原 浩。ヘルペスウイルスを用いた抗癌ウイルス療法。第100回日本泌尿器科学会 2012.4.23 横浜
- ⑥ Takeshima Y, Fukuhara H, Hou J, Homma Y, Ino Y, Todo T. NOVEL ONCOLYTIC HSV-1 FOR THE TREATMENT OF PROSTATE CARCINOMA WITH IMPROVED EFFICACY INDEPENDENT OF TUMOR GROWTH RATE. ASGCT 2012.5.18, Philadelphia

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金  
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業 (がん関係研究分野))  
分担研究報告書

希少がんに対するウイルス療法の実用化臨床研究  
(希少・難治がんに対するウイルス療法の開発)

研究分担者 中原 寛和  
近畿大学医学部附属病院 歯科口腔外科 准教授

研究要旨

口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されている。本研究では脳腫瘍において、難治性のがんに対して、安全でかつ強い抗腫瘍効果の確認できた単純ヘルペスウイルス1型を用い、口腔扁平上皮癌の治療に応用しうるかの検討を行い、さらに口腔扁平上皮癌特異的に効果を発揮し得る、がん治療用ウイルスの開発と作製を行う。

A. 研究目的

近年、ウイルスゲノムを遺伝子工学的に改変し、癌細胞で選択的に複製するウイルスを癌治療に応用する試みがなされ、特に単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-1) は癌治療に適した特徴を有することがわかってきた。治療用の増殖型変異HSV-1は、癌細胞に感染すると複製し、その過程で宿主の癌細胞を死滅させる。複製したウイルスは周囲に散らばって再び癌細胞に感染し、その後複製→細胞死→感染を繰り返して抗腫瘍効果を現す。一方、正常細胞に感染した治療用ウイルスは複製せず、正常組織には害が生じない。また腫瘍内でのウイルス増殖は、特異的抗腫瘍免疫を誘導する。従って、ウイルス複製による直接的殺細胞効果と、特

異的抗腫瘍免疫の惹起により、特定の治療遺伝子の発現なしに癌を治癒させることが可能で、新しい癌治療法として高いポテンシャルを有している。第二世代の増殖型HSV-1 (G207) は二重変異を有し、脳腫瘍に投与できるよう安全性を重視して世界で初めて臨床用に開発された。本研究代表研究者藤堂によって、治療原理、抗腫瘍効果の機序、他の治療法との併用効果、安全性などが解明された。藤堂らはその開発経験から、G207を改良し、世界で初めて三重変異を有する第三世代遺伝子組換えHSV-1 (G47Δ) を作製することに成功した。このG47Δは、癌細胞におけるウイルス複製能と惹起される抗腫瘍免疫が増強し、安全性を維持しながら抗腫瘍効果が格段に改善した。また高いウイルス濃

度が生産できることから実用性が高い。

一方、口腔癌は全癌の数%程度を占めており、手術を中心とした集学的治療が行われており治療の可能な癌の一つになってきた。しかしながら、口腔癌は呼吸、咀嚼・嚥下、発声、構音などの生活上で重要な機能が集中した部位で手術による機能障害は大きなQOLの低下をもたらす。そこで手術による機能障害を避け得る、新しい治療法の出現が待望されてきた。本研究では治療用ウイルスを口腔癌に適用し、その実用化に向けた、基礎実験および臨床実験を研究目的としている。

## B. 研究方法

### 1. 口腔癌に対するウイルス療法の基礎実験

#### 1) 培養細胞

アフリカミドリザル腎細胞株Vero、ヒト培養扁平上皮癌細胞としTSU、HOC313、OSC-19、SC-20、SAS、HSC-3、OSC-4、ヒト肺扁平上皮癌細胞EBC-1R CRF-LC-Sq 1、ヒト食道扁平上皮癌細胞KYSE220、ヒト子宮扁平上皮癌細胞HCS-2 (papilloma virus)、マウス扁平上皮癌細胞KLN205、KLN205-MUC1 (American Type Culture Collection (ATCC)より購入)を用いた。すべての細胞は添付文書により推奨された培地、凍結、継代、維持を行った。

#### 2) GFP導入培養細胞

ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19およびSAS細胞にRetro-XTMQベクターを用いて、GFP (Green fluorescent protein) を導入し、GFP発現ヒト培養扁平上皮癌細胞OSC-19-GFP、SAS-GFPを作製した。培養は親株と同様の培地、凍結、継代、維持を行った。

#### 2) ウイルス複製能

6ウエルプレートにVero細胞を $4.0 \times 10^5$ /2mlまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 0.02 ( $8.0 \times 10^3$  PFU/0.7ml) のウイルス希釈液を作成した。1%熱非働化FBS添加DPBS 1mlにてウエルを洗浄して除き、ウイルス希釈液を0.7ml/ウエルにて1株につき3ウエルずつ感染し、室温で5分間震盪し、37°Cで1時間培養した。ウイルス液を除き、1%熱非働化FBS添加DMEMを2ml/ウエル加え、34.5°Cで72時間培養した。ウエルごとに培地と細胞を回収し、ドライアイス・エタノールにて凍結、融解を3回繰り返し、2分間超音波による細胞破碎処理を行い、タイターを測定した。タイター測定は回収されたウエルごとに3枚のプレート、各2ウエルずつをカウントして行い各株の平均を出した。

#### 3) ウイルス感染能 (entry assay)

24ウエルプレートに細胞 $5.0 \times 10^4$ /500  $\mu$ l/ウエルでまき、37°Cで16時間培養した。1%熱非働化FBS添加DPBSにて作製したウイルスを希釈し、multiplicity of infection (MOI) 1.0 で感染させる。感染後6時間で感染をストップさせて、X-gal染色を行い、ウイルスの感染効率を測定した。

#### 4) In vitro におけるウイルスペクターの殺細胞効果

各ウイルスの殺細胞効果について、in vitroにおいては以下のように評価した。細胞間、ウイルス間で比較することができるよう、ウイルス量、感染時間、培養時間などは全て同一条件で行った。6ウエルプレートに細胞を $2.0 \times 10^5$ /2mlまき、37°C