

- 3) Tanemura A, Kiyohara E, Nishioka M, Yamada M, Tanaka A, Yokomi A, Katayama I, Saito A, Daimon T, Lee CM, Myoui A, Sakurai T, Kawakami Y.: A Clinical Study Using the Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope on Patients with Progressive Malignant Melanoma. 8th World Congress of Melanoma, Hamburg, Germany (2013. 7. 17-7. 20)
- 4) Sugiyama D¹⁾, Nishikawa H¹⁾, Maeda Y¹⁾, Nishioka M²⁾, Tanemura A²⁾, Katayama I²⁾, Ezo S³⁾, Sato E⁴⁾, Fukumori Y⁵⁾, Julia K⁶⁾, Elke J⁶⁾, Sakaguchi S¹⁾, Experimental Immunology, WPI Immunology Frontier Research Center¹⁾, Department of Dermatology, Graduate School of Medicine, Osaka University²⁾, Department of Hematology, Graduate School of Medicine, Osaka University³⁾, Department of Anatomic Pathology, Tokyo Medical University⁴⁾, Kinki Blood Center⁵⁾, Hamatologie-Onkologie Krankenhaus Nordwest⁶⁾: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3⁺CD4⁺regulatory T cells and augments anti-tumor immune responses in humans: Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology, 2013 Chiba (2013. 12. 11-13)
- 5) Tanemura A, Kiyohara E, Myoui A, Kawakami Y. A Clinical Study Using the

Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope on Patients with Progressive Malignant Melanoma. 第72回日本癌学会学術総会、横浜 (2013. 10. 3-5)

- 6) 種村篤、清原英司、西岡めぐみ、山田瑞穂、田中文、片山一朗、齋藤充弘、大門貴志、李千萬、名井陽：進行性悪性黒色腫患者に対するヒトセンダイウイルスベクター (HVJ-E) を用いた臨床研究 第29回日本皮膚悪性腫瘍学会、甲府 (2013. 8. 9-10)

I. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1) 登録特許

国内特許については、基本特許、用途特許、製造特許を国内および海外で登録している (表 1-1、表 1-2)。

現在までに、国内とつきよについては、基本特許、用途特許、製造特許について計 6 件を成立させ、それぞれ登録と維持管理を行っている (表 1-2)。

一方、国際特許については、欧米を中心に基本特許、用途特許、製造特許について計 6 件を海外で登録している (表 1-2)。

昨年度に時点では申請中であった欧州での製造特許については、欧州特許庁へ

適切な対応を進めた結果、本年度成立(特許番号:EP1950285)したため、英国、ドイツ、フランス、イタリア、スペイン・スイスの計6カ国に移行手続きを行い、移行した各国における登録を全て完了した(表1-2)。

同様に、昨年度の時点は審査中であった、米国での用途特許(US13/119148)については、請求項の変更など米国特許庁への対応を進めた結果、特許成立の見込みとなった。そのため、現在登録手続きを進めている状況である(表1-2)。

を進めている状況である。

2) 出願中の特許

現在出願中の国内特許は、全身投与のための高機能化、薬効向上のための修飾などの特許など計3件であり、それぞれ出願中、または審査中の状況である(表2-1)。これらの特許を成立させ、医薬品として実用化した後のライフサイクルマネジメント対策を進める必要がある。未成立の特許のうち、用途特許(特願2010-529778)については、審査請求を実施し、請求項の修正など、登録に向けて国内の特許庁への対応を進めている(表2-1)。

一方、現在国際特許で出願中の特許は1件である(表2-2)。出願中の特許についても、順次成立に向けた特許庁への対応(意見書の作成・提出、請求項の修正など)を進めており、医薬品として実用化した際に必要な知的財産の権利確保

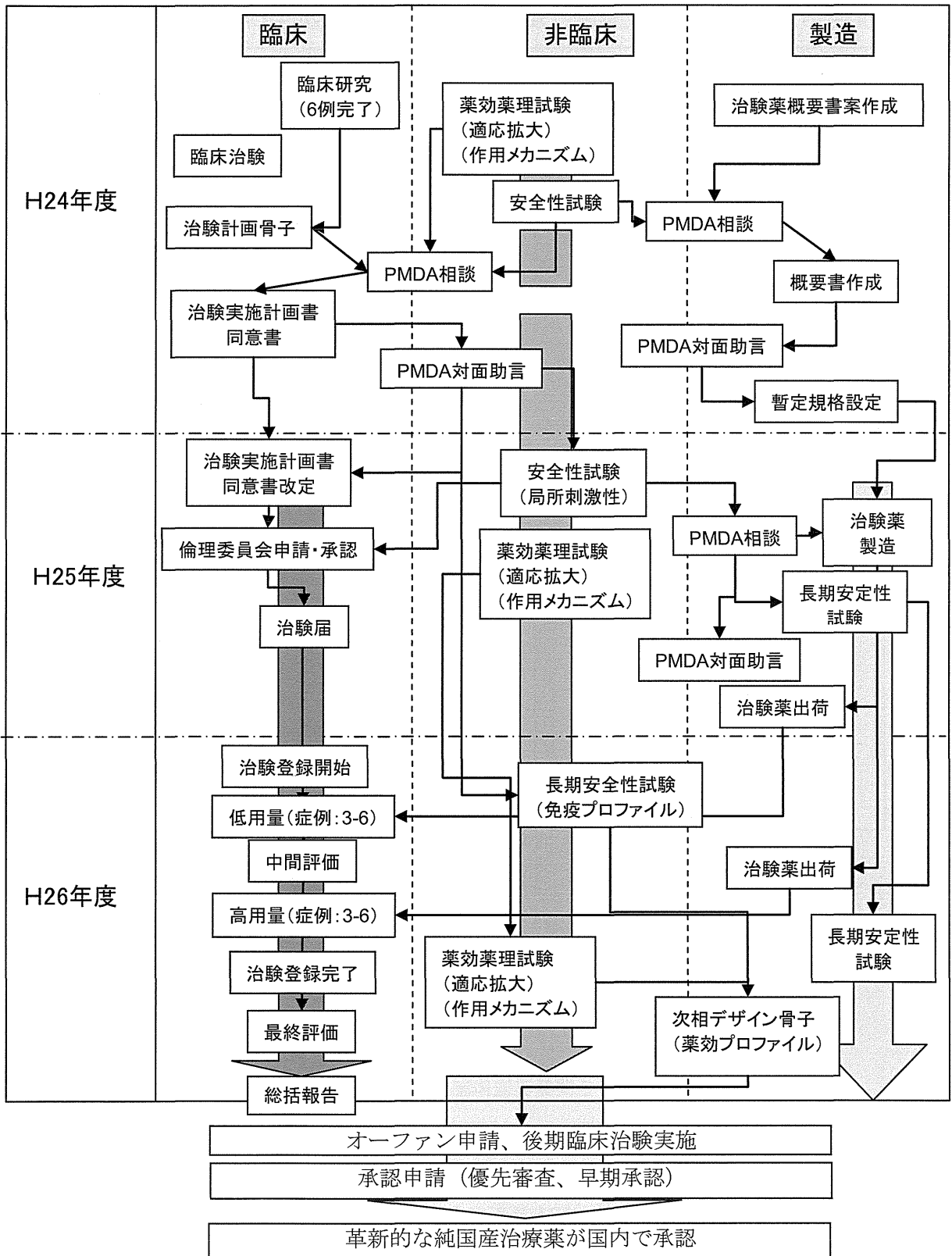


図1. 薬事法上の承認取得までの開発計画

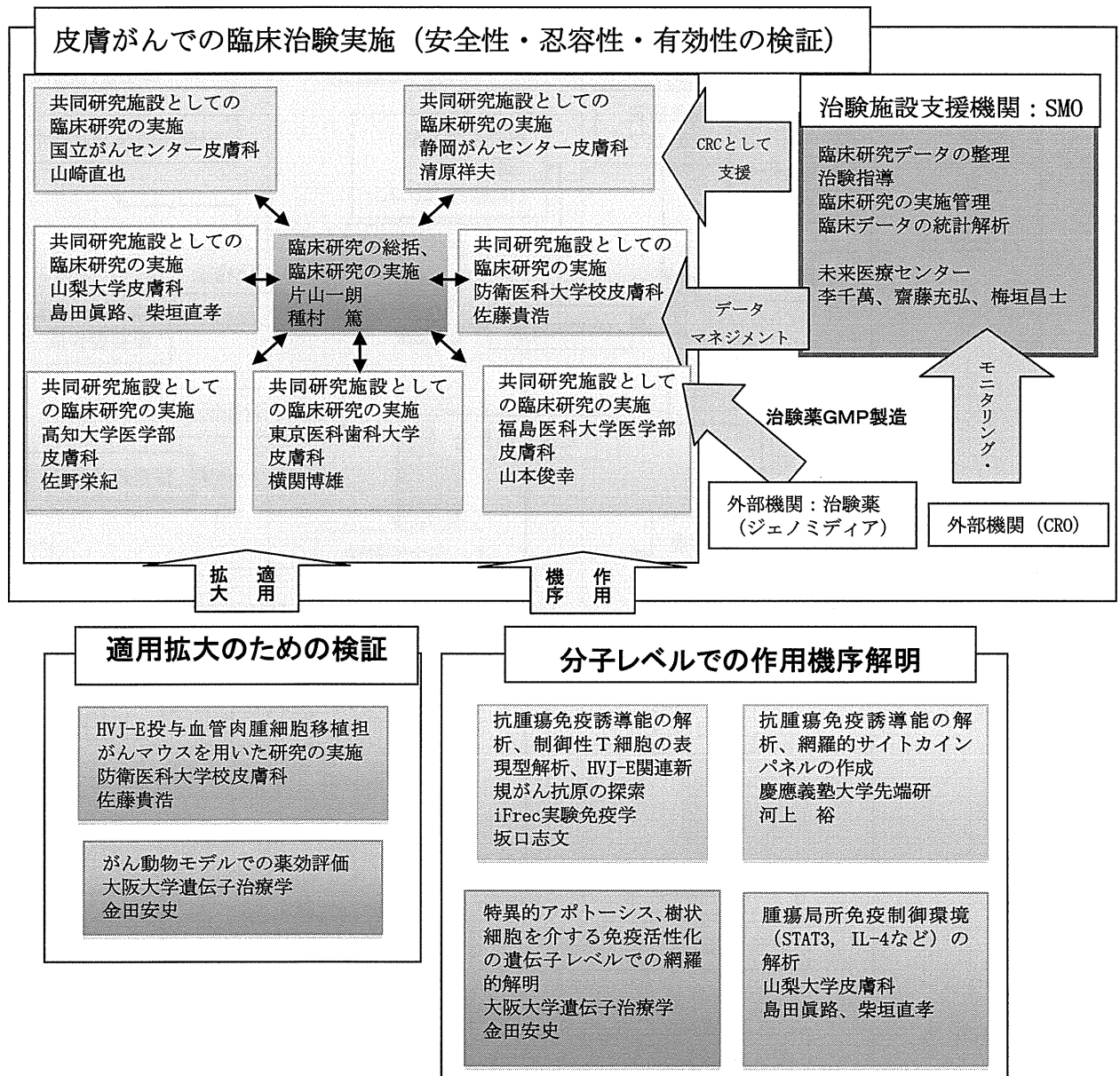
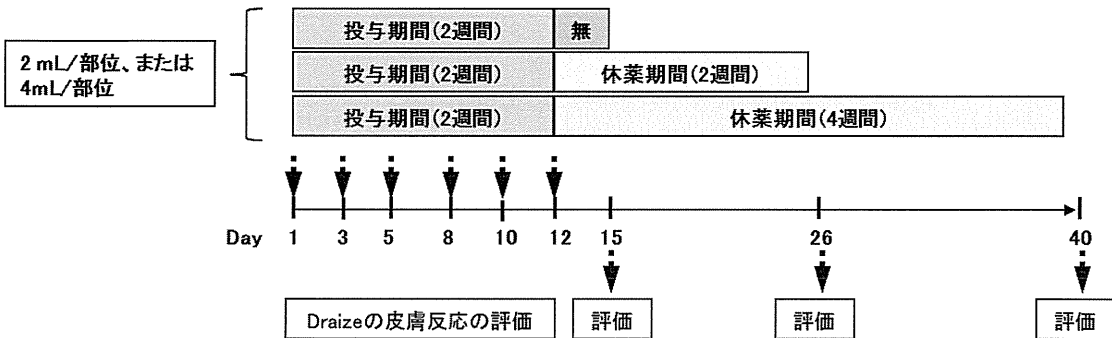


図2 本研究における開発実施体制 (治験実施機関の強化)

早期・探索的臨床試験拠点病院である大阪大学医学部附属病院、国立がん研究センターに加え、静岡県立静岡がんセンターを新たに治験実施施設として追加し、計3施設の実施体制でGCP準拠の医師主導治験を実施する。更に、Bench to Bedの体制により、アカデミアの基礎研究成果を基盤として、作用メカニズムに基づいて安全性を確保した開発を実現する。これにより、希少がんに対する純国産の革新的医薬品を国内先行で開発し、薬事上の申請を目指した国内開発を推進する。

1. 動物	: カニクイザル (3歳~4歳)、雌雄、各3例/用量
2. 投与用法	: 2週間間歇皮下投与 (2週間に4回、頸背部に皮下投与) (→2週間、4週間の休薬期間)
3. 被験物質	: HVJ-E/GEN0101、濃度は10,000mNAU/mL
4. 投与量	: 2mL (20,000mNAU) /部位又は4mL (40,000mNAU) /部位 (→医師主導治験で計画している最大量の2倍量まで投与)
5. 評価方法	: Draizeの皮膚反応の評価、剖検、病理組織学的検査



群		I (♂♀各3例)		II (♂♀各3例)	
投与量(mNAU/site)		0*	20000	0*	40000
投与液濃度(mNAU/mL)		0*	10000	0*	10000
投与容量(mL/site)		2	2	4	4
投与部位の観察 (Draizeの皮膚 反応の評価)	投与期間 中	-**	投与10日~: ごく 軽度な浮腫	-	投与10日~: ごく軽度な紅斑, ごく軽度又は軽度な浮腫
	3日後	-	ごく軽度な浮腫	-	ごく軽度又は軽度な浮腫
	2週後	-	-**	-	-**
	4週後	-	-**	-	-**

* : 溶媒 (5%トレハロース溶液)、 - : 変化無し

図3. カニクイザルによる局所刺激性試験の概要

PMDA 薬事戦略相談・対面助言で合意した内容に従って実施した、局所刺激性試験については、計画している最高量の2倍量まで投与しても、2週間の休薬期間後には回復が認められた。

表 1 - 1. 登録済み特許の一覧 (国内特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のためのウイルス エンベロープベクター	特許 3942362 特許 4219957	登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する組成物	特許 4855250	登録
3		化学療法剤を封入した医薬製 剤	特許 4746877	登録
4	製造特許 標的化	単離されたヒト細胞、その取 得方法及び用途	特許 5134964	登録
5		改変パラミクソウイルスおよ びその作製方法	特許 5102630	登録

表 1 - 2. 登録済み特許の一覧 (国際特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	基本特許	遺伝子導入のためのウイルス エンベロープベクター	EP1170363 DE60131498 US 6913923 US 7279333 US 7803621 CN01800567.5 CN200410100219.5 CA2369491 AU769385 I303663 KR 10-0776475 KR 10-0847385	登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録 登録
2	用途特許	抗腫瘍作用を有する組成物	US7871765	登録
3	用途特許	化学療法剤を封入した医薬製 剤	US7427395	登録
4	製造特許	ヒト細胞、その取得方法及び 用途	US8012749 EP1950285	登録 (米) 登録 (英国、ドイ ツ、フランス、イ タリア、スペイ ン・スイス の 6 カ国に移行)
5	用途特許	前立腺癌の治療・予防剤	US13/119148	登録手続き中
6	標的化	ターゲティングウイルス およびその作製方法	US7858356	登録

米国において用途特許 (特許 5、出願番号 : US13/119148) の登録手続き中である。

欧州において製造特許 (特許 4、特許番号 : EP1950285) が成立した。

表 2 - 1. 出願中特許の一覧 (国内特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	用途特許	前立腺癌の治療・予防剤	特願 2010-529778	審査中
2	高機能化+ 薬効向上	高機能化 HVJ-E	特願 2009-201114	出願中
3		IL-2 含有 HVJ-E ベクター及び それを含む脳腫瘍治療剤	特願 2010-024286	審査請求

表 2 - 2. 出願中特許の一覧 (国際特許)

番号	種類	名称	特許番号	状況
1	用途特許	前立腺癌の治療・予防剤	EP9814609.5	審査中

添付資料

治験実施計画書の概要

対象：

再発、標準治療抵抗性、標準治療が適用されない又は標準治療を拒否したStage IIIC又はStage IVの進行性悪性黒色腫患者。

悪性黒色腫の病期分類は、Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 325-44 (AJCC) による。

治験調整医師：

大阪大学医学部附属病院	皮膚科	片山 一朗
-------------	-----	-------

自ら治験を実施する者（治験責任医師）：

大阪大学医学部附属病院	皮膚科	種村 篤
-------------	-----	------

国立がん研究センター中央病院	皮膚腫瘍科	山崎 直也
----------------	-------	-------

静岡県立静岡がんセンター	皮膚科	清原 祥夫
--------------	-----	-------

治験実施医療機関：

大阪大学医学部附属病院

国立がん研究センター中央病院

静岡県立静岡がんセンター

治験期間： 2014年3月～2014年12月

臨床フェーズ： 第I相臨床試験

目的：

主目的：安全性/忍容性の検討

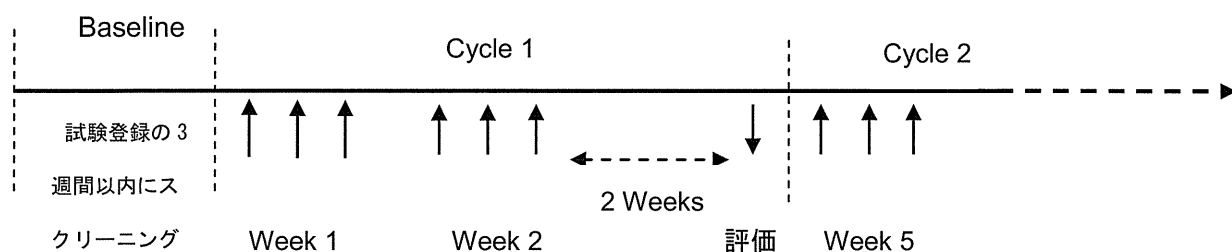
進行性悪性黒色腫患者を対象とした GEN0101 腫瘍内局所投与による安全性/忍容性の検討をすることにより、第II相臨床試験以降の推奨用量を決定し、DLT (Dose Limiting Toxicity) を検討する。

副次目的：予備的な有効性の検討

進行性悪性黒色腫患者を対象とした GEN0101 腫瘍内局所投与による予備的な有効性検討

試験方法:

- ・ 用量漸増、非ランダム化、オープンラベル多施設試験
- ・ GEN0101を隔日以上で週3回投与を2週間行い、2週間休薬する。この治療を1 Cycleとし、2 Cycle行う。各Cycleで安全性及び抗腫瘍効果の評価を行う。安全性は治験期間中を通じて評価を行い、抗腫瘍効果の評価については、各Cycle終了時及び治験終了時に実施する。
- ・ 各Cycleの投与期間については、原則として、入院対応とし、休薬期間は外来対応可能とする。
- ・ 投与継続が困難と考えられる有害事象が発現した場合などは、次投与を最大1週間延期できるが、中止または終了した被験者への再投与は行わない。なお、次投与を延期した場合は、延期した期間の日付をカウントせず投与再開時からカウントするものとする。



- ・ 投与量は2段階（30,000 mNAU、60,000 mNAU）を設定し、1コホート3例を基本とするコホート法による用量漸増を行う。同一患者における用量漸増は行わないものとする。

症例数（総数及び各投与群）:

予定症例総数: 3 ~ 15例とする

低用量群（1日投与量: 30,000 mNAU）: 3 ~ 6例

高用量群（1日投与量: 60,000 mNAU）: 3 ~ 9例

※各投与量群において安全性を確認した後、追加症例の可否を検討する。なお、症例の追加は3例毎とする。

適格性基準:

選択基準:

1. 治験参加に本人の自由意思による文書同意が得られた患者。

2. 年齢20歳以上86歳未満であること。
3. 組織診又は細胞診にて悪性黒色腫であることが確認されていること。
4. 再発、標準治療抵抗性、標準治療が適用されない又は標準治療を拒否したStage IIIC又はStage IVの進行性悪性黒色腫患者と診断されていること。
5. 3か所以上の測定可能な3 mm以上の表在性評価可能皮膚病変を有し、その総和が10 mm以上であること。
6. 治験薬投与開始予定日後8週間以上の生存が期待できること。
7. ECOGのPerformance Statusが0 ~ 2であること。
8. スクリーニング時に以下のとおり、骨髄機能、肝機能及び腎機能が保たれていること。
 - ・白血球： 2,000 / μ L以上
 - ・血小板： 75,000 / μ L以上
 - ・ヘモグロビン： 8.0 g/dL以上
 - ・AST： 施設基準値上限の2.5倍以下
 - ・ALT： 施設基準値上限の2.5倍以下
 - ・総ビリルビン： 施設基準値上限の2倍以下
 - ・血清クレアチニン： 施設基準値上限の2倍以下

除外基準：

1. 多発性脳転移を有する場合。
2. GEN0101によるプリックテスト陽性の場合。
3. コントロールされていない活動性感染症など、重篤な併発疾患がある場合。
4. 同意取得前4週間以内（ニトロソウレア又はマイトマイシンCを使用の場合は6週間以内）に全身性抗がん療法、放射線療法又はIFN- β 局所療法が行われている場合。
5. 同意取得前4週間以内に未承認薬の投与を行った場合。
6. 悪性黒色腫以外の悪性腫瘍歴。ただし、同意取得時に5年以上再発及び転移していない場合はこの限りでない。
7. 活動性の自己免疫疾患がある場合。

8. 副腎皮質ステロイドの全身投与又は免疫抑制剤の全身投与が行われている場合。ただし、低用量（経口プレドニゾンとして10 mg/day以下相当）を長期投与（6 か月超）している場合は、この限りでない。
9. 妊娠又は授乳中の女性。授乳を中止する場合はこの限りでない。なお、女性の場合、 β -HCG 検査を実施し、妊娠の有無を確認する。
10. 追跡上及び治験実施計画書遵守上、問題となる精神疾患を有する場合。
11. 自家又は同種臓器、組織移植歴がある場合（免疫抑制剤の投与を受けている場合）。
12. スクリーニング時のPT、APTTが施設基準値上限の1.5倍以上の場合。
13. スクリーニング時のHBe抗原、HCV抗体、HIV1, 2抗体検査のうちいずれかが陽性であった場合。
14. その他、治験責任（分担）医師が不適切と判断した場合。

用量及び投与方法：

- ・ GEN0101 は、1 バイアル中に 10,000 ミリノイラミニダーゼ活性単位 (mNAU) の HVJ-E を有効成分として含有し、トレハロース、塩化ナトリウム、無水一水素ナトリウム、リン酸二水素カリウムが添加された凍結乾燥塊又は粉末品である。GEN0101 は、1 バイアルあたり 1 mL の滅菌蒸留水で溶解され、腫瘍内及びその周辺部位に局所投与される。
- ・ 投与は予め標的病変として設定した3か所の皮膚の腫瘍病変及びその周辺部位へ行い、投与期間中、可能な限り投与病変及びその投与量の変更は行わない。なお、治験薬を投与した皮膚病変が局CRとなった場合、その他の皮膚病変への投与を行うことが出来るが、投与箇所は3か所とし、1か所あたりの投与量の変更は行わない。
- ・ 投与は、原則として27Gの注射針を用いて行い、投与する腫瘍を3次的にカバーするよう薬液を注入する。なお、投与前に必要なに応じて局所麻酔剤を腫瘍周辺に投与する。悪性黒色腫の場合、注射針を頻回抜き差しする反復注入は播種のリスクを増大させるため注意すること。また、腫瘍の辺縁を十分カバーし、外部から内部に進みながら薬液を分散投与するような投与方法が好ましい。

投与期間：

1被験者あたりの予定治験期間：8 週間（スクリーニング期間を除く）

評価基準及び評価項目：

安全性評価（主目的）：

下記項目に基づき、各用量群における有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間を集計し、GEN0101の安全性及び忍容性を検討する。

1. 臨床病期
2. 診察・問診
3. 理学的検査
4. バイタルサイン
5. Performance Status (PS)
6. 併用薬
7. 有害事象
8. 胸部 X 線検査
9. 心電図（12 誘導）※ベースライン時及びその後は医学的に必要と判断された場合のみに実施する。
10. 臨床検査
 - (1) 血液学的検査： 赤血球数，ヘモグロビン，ヘマトクリット，白血球数，白血球分類，血小板数，PT，APTT，フィブリノゲン，FDP
 - (2) 血液生化学的検査： 総たん白，アルブミン，グロブリン，TTT，ZTT，総ビリルビン，直接ビリルビン，AST，ALT， γ -GTP，Al-P，LAP，ChE，LDH，A/G比，BUN，クレアチニン，尿酸，総コレステロール，空腹時血糖，アミラーゼ，CRP，血清電解質(Na, K, Cl, Ca, Mg)，ハプトグロビン
 - (3) 尿検査： たん白，糖，ウロビリノーゲン，沈渣，pH，ヘモグロビン，尿中クレアチニン
 - (4) 腫瘍マーカー： (外注検査) 5-S-cysteinyldopa (5-S-CD)
 - (5) 血中抗 HVJ-E 抗体 (外注検査) パラインフルエンザ I 型抗体

有効性評価（副次目的）：

各用量群において腫瘍縮小効果、腫瘍免疫誘導能について集計し、予備的な有効性を検討する。

1. 腫瘍縮小効果の確認

- ・ 全体的な応答による腫瘍増殖抑制の評価

評価の基準としてRECIST version 1.1 (New response evaluation criteria in solid tumors : Revised RECIST guideline (version 1.1)、日本語訳JCOG版)を参考とし、本治験に則した全体的な応答による腫瘍増殖抑制を評価する。

各用量群において、CR (Complete Response)、PR (Partial Response)、SD (Stable Disease)、PD (Progressive Disease) に属する例数を集計し、必要に応じて奏効割合を推定する。

【評価方法】

- ・ 腫瘍最大径をキャリパス (ノギス)、MRI又はCTスキャンによる画像診断を用いてモニタリングする。測定は、治験薬投与前及び各投与CycleのCycle終了時に行う。
- ・ 腫瘍病変の測定は、最も正確で、再現性のある測定値が得られる方法を用い、測定方法は、原則として、キャリパス (ノギス) を用い、内臓病変及び新病変の測定が適している場合に限りMRI又はCTスキャンによる画像診断も行う。
- ・ また、治験薬投与後、最大径及びそれに直角に交わる最大径が測定不能 (3 mm未満) となった場合でも病変が残存していると判断されるならば、1.5 mmとみなす。
- ・ 完全奏効 (Complete Response; CR)、部分奏効 (Partial Response; PR)、安定 (Stable Disease; SD) 及び進行 (Progressive Disease; PD) の基準は、表1の全体的な応答による腫瘍増殖抑制の評価に基づき評価を行う。

表1 全体的な応答による腫瘍増殖抑制の評価

標的病変	非標的病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	Non-CR/Non-PD	なし	PR
CR	評価なし	なし	PR
PR	Non-PD又は 評価の欠損あり	なし	PR
SD	Non-PD又は 評価の欠損あり	なし	SD
評価の欠損あり	Non-PD	なし	NE

PD	問わない	あり又はなし	PD
問わない	PD	あり又はなし	PD
問わない	問わない	あり	PD

NE (Not Evaluable) : 評価不能

・病巣別腫瘍縮小効果の評価

治験薬を投与した病巣について、病巣別に局CR (Complete Response)、局PR (Partial Response)、局MR (Minor Response)、局NC (No Change)、局PD (Progressive Disease) を判定し、必要に応じて被験者毎及び各用量群の奏効割合を推定する。なお、縮小率は、投与した病巣の最大径及びそれに直角に交わる最大径の積を算出し評価する。

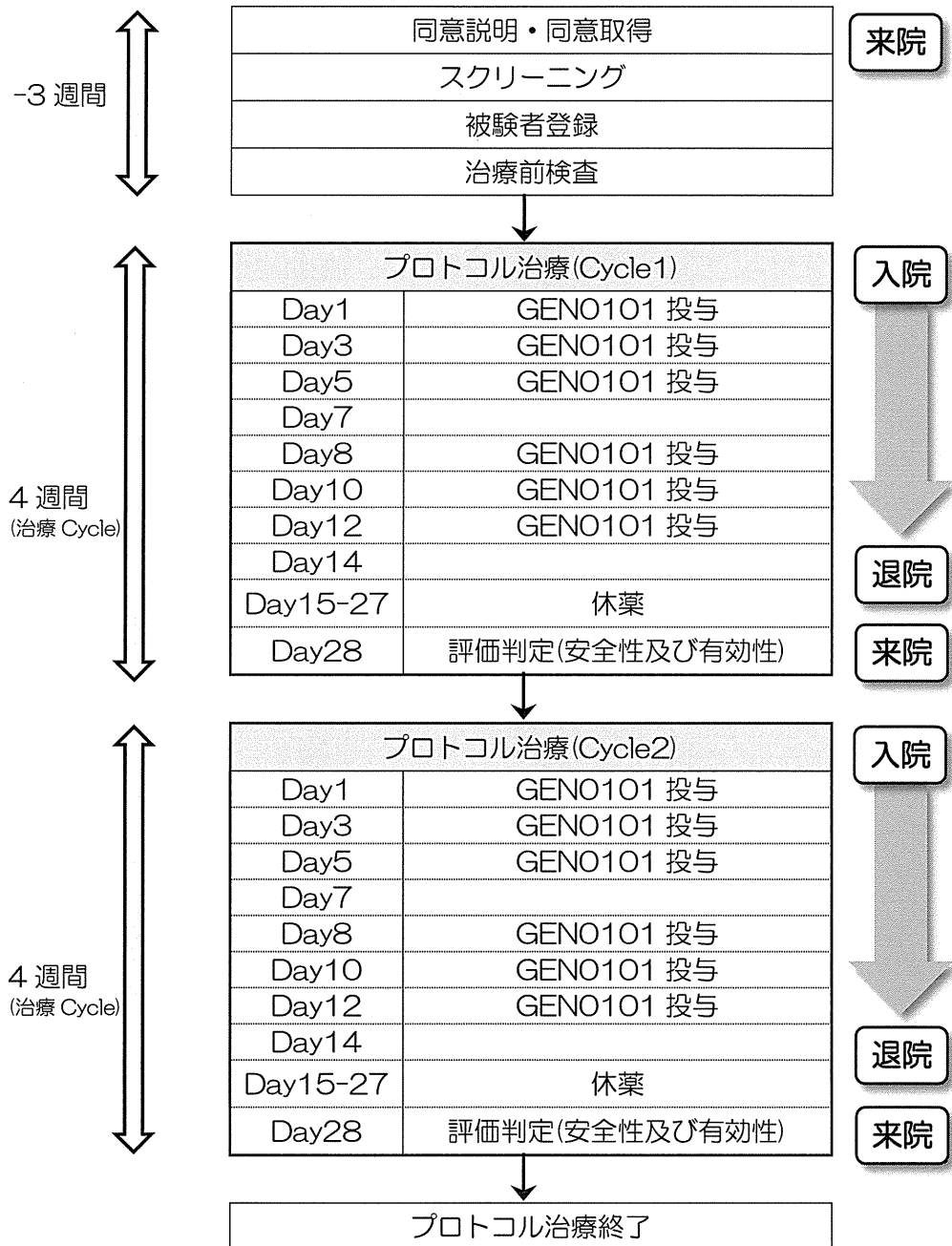
評価の基準は以下の通りとする。

- ・局CR (Complete Response) 投与した局所病変がすべて消失したもの
- ・局PR (Partial Response) 縮小率が50%以上のもの
- ・局MR (Minor Response) 縮小率が25%以上、50%未満のもの
- ・局NC (No Change) 縮小率が25%未満のもの
- ・局PD (Progressive Disease) 最大径及びそれに直角に交わる最大径の積が25%以上増大したもの

2. 腫瘍免疫誘導能の確認

以下の項目について、各用量群で記述統計量を算出する。

- (1) NK 細胞活性 (外注検査)
- (2) IL-6 (外注検査)
- (3) IFN- γ (外注検査)



Ⅲ.分担研究報告

悪性黒色腫細胞株を用いたHVJ-Eによるアポトーシス誘導のダイナミックイメージング

研究分担者：種村 篤（大阪大学大学院医学系研究科皮膚科学教室 助教）

研究要旨:不活性化したセンダイウイルス粒子(HVJ-E)を *in vitro* でマウスメラノーマ培養細胞株に添加したところ、腫瘍細胞の融合による細胞死をライブイメージングで確認した。HVJ-E を腫瘍内投与した野生型マウスメラノーマ担癌マウスでは、腫瘍の縮小がみられるとともに、皮下に再接種した腫瘍細胞株の増殖が有意に抑制された。一方、免疫不全マウスへの再接種では腫瘍の増大が顕著であった。

A. 研究目的

HVJ-E のメラノーマ動物モデルに於ける直接的及び間接的抗腫瘍効果についてこれまでの結果の検証を進め、医師主導治験を進める上で基礎的データを蓄積し、治験の基盤となる根拠の確立を目指す。

B. 研究方法

マウスメラノーマ細胞株 B16/F10 を用いて、細胞レベルおよびマウス生体レベルで HVJ-E の抗腫瘍効果、そして抗腫瘍メカニズムに関して研究を行った。

野生型 (C57/BL6) マウスの背中に、B16/F10 マウスメラノーマ細胞株を皮内注射にて接種、その 10 日後、腫瘍内に HVJ-E 懸濁液を注射した。さらに、HVJ-E 投与による抗腫瘍免疫効果の維持を検証するため、HVJ-E 連日投与 6 日間後、離れた背中に腫瘍細胞を再接種し、同様に免疫不全型 (C.B-17-SCID) マウスへ接種した腫瘍の増大を腫瘍径および組織像にて比較した。抗腫瘍メカニズムの生物学的解析として、腫瘍細胞のアポトーシスをウェスタンブロット法での Caspase-3 活性、及びアガロース電気泳動法での DNA の断片化にて評価した。さらに、ダイナミックな細胞死を直接

観察するため、GFP（緑蛍光タンパク）と RFP（赤蛍光タンパク）を安定発現する B16/F10 を共培養したディッシュに HVJ-E を添加し、経時的にライブイメージングで細胞の形態変化、融合を観察した。

（倫理面への配慮）動物実験はすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けて承認された実験計画書に従い、安全委員会の指針に従って施行された。

C. 研究結果

HVJ-E を投与したメラノーマ腫瘍の組織像で、投与 6 時間目より壊死組織が確認され、経時的に壊死範囲の拡大が確認された。これに伴い、腫瘍径の増大は非投与群に比べ有意に抑制された。同部位に TUNEL 陽性細胞が多数認められ、その組織より抽出したタンパクを用いたウェスタンブロットで、Caspase-3 の活性化および DNA の断片化が確認された。さらに、培養細胞を用いた *in vitro* の実験では、HVJ-E 添加約 2 時間後より腫瘍細胞が近接し、赤と緑で融合、多核化した細胞がやがて破裂する画像をライブイメージングで撮像出来た。

D. 考察

HVJ-E は直接的にメラノーマ細胞の融合

を惹起し、その結果、アポトーシスを生じさせ腫瘍細胞死を誘導することが明らかになった。これまでの臨床研究で観察されたHVJ-E投与病変の腫瘍消失や、色素関連抗原に対する免疫応答を表す残存病変での脱色素斑の出現を、忠実に反映した実験結果と考える。

E. 結論

メラノーマに対する抗腫瘍効果を基礎的に裏付けるデータを得ることが出来た。

F. 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. 論文発表

Tanemura A, Kiyohara E, Katayama I, Kaneda Y. Recent advances and developments in the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application. *Cancer Gene Ther.* 20, 599-605, 2013.

2. 学会発表

1) **Tanemura A**, Kiyohara E, Nishioka M, Yamada M, Tanaka A, Yokomi A, Katayama I, Saito A, Daimon T, Lee CM, Myoui A, Sakurai T, Kawakami Y. A Clinical Study Using the

Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope on Patients with Progressive Malignant Melanoma. 8th World Congress of Melanoma, Humburg, 2013.7.17-20.

2) **種村 篤**, 清原 英司, 西岡 めぐみ, 山田 瑞穂, 田中 文, 片山 一朗, 齋藤 充弘, 大門 貴志, 李 千萬, 名井 陽. 進行性悪性黒色腫患者に対するヒトセンダイウイルスベクター (HVJ-E) を用いた臨床研究. 甲府, 第29回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会, 2013年8月9日—10日

3) **種村 篤**. ヒトセンダイウイルスベクター (HVJ-E) の抗腫瘍効果および進行性悪性黒色腫症例への臨床応用. 大宮, 第77回日本皮膚科学会東部支部学術大会, 2013年9月21日—22日

4) **Tanemura A**, Kiyohara E, Myoui A, Kawakami Y. A Clinical Study Using the Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope on Patients with Progressive Malignant Melanoma. 横浜, 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日—5日

癌特異的アポトーシスを誘導する革新的分子標的薬による難治性皮膚癌に対する治療薬の
医師主導臨床試験による実用化開発

研究分担者：金田安史（大阪大学大学院医学系研究科 教授）

研究要旨：紫外線で不活性化したセンダイウイルス粒子(HVJ-E)はマクロファージからIL-18の産生を増強した。HVJ-EとTLR4 agonistのmonophosphoryl lipidA(MPL)との併用によりマウスに移植したメラノーマの腫瘍増殖が有意に抑制された。

A. 研究目的

HVJ-Eの抗腫瘍効果についてさらに解明を進め、医師主導試験における評価項目に科学的な根拠を与えること、併用療法の必要性和その根拠を探ることを目的とする。

B. 研究方法

マウス脾臓細胞にHVJ-Eを作用させTh1関連因子の解析を定量PCR法により行った。マウスメラノーマ細胞B16F10をC57BL/6マウス皮内に移植し、HVJ-EやMPLを投与し抗腫瘍効果を検討した。

（倫理面への配慮）動物実験はすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けて承認された実験計画書に従い、安全委員会の指針に従って施行された。

C. 研究結果

マウス脾臓細胞にHVJ-Eを作用させたところ、IL-18は特に発現が高くなり、IL12 receptor B1, T-betの発現もやや亢進した。しかしinterferon(IFN)- γ の産生は見られなかった。HVJ-EによるIL-18の産生細胞はCD11b陽性のマクロファージであることが分かった。Wild type 担癌マウスへのMPL投与とHVJ-E投与では、両群間で有意差がつかなかったが、併用群はいずれの単独投与群と比較しても有意な腫瘍増殖抑制効果を示した。

D. 考察

HVJ-EはIL-18の発現を亢進させるので、IL-12と併用すればIFN- γ の抗産生が予測される。HVJ-EとTLR4 agonistの併用での抗腫瘍作用の増強機構の解明により、強力な抗腫瘍剤の開発が可能になる。

E. 結論

HVJ-EとMPLの併用療法によりさらに強力な抗腫瘍療法の開発が期待できる。

F. 健康危険情報

特になし。

G 研究発表

1. 論文発表

Tanemura A, et al., Kaneda Y. Recent advances and developments in the antitumor effect of the HVJ envelope vector on malignant melanoma: from the bench to clinical application. Cancer Gene Ther. 20, 599-605, 2013.

2. 学会発表

日本薬理学会(予定) シンポジウム Yasufumi Kaneda “Development of virosome-mediated cancer therapy” 平成26年3月21日(仙台)

H 知的財産権の出願・登録状況
なし

血管肉腫に対するインターロイキン2遺伝子封入不活化センダイウイルス粒子の抗腫瘍効果

研究分担者 横関博雄 東京医科歯科大学大学院医歯学研究科皮膚学分野
研究分担者 佐藤貴浩 防衛医科大学校 皮膚科
研究協力者 竹原友貴 大阪大学大学院医学系研究科皮膚科

皮膚血管肉腫は治療抵抗性で予後不良な悪性腫瘍である。今回、我々は、インターロイキン2遺伝子（IL-2）を封入したセンダイウイルス粒子（hemagglutinating virus of Japan envelope: HVJ-E）の血管肉腫モデルマウスに対する治療効果を検討した。IL-2遺伝子封入HVJ-E（HVJ-E/IL-2）の腫瘍内投与はマウスに移植した血管肉腫細胞（ISOS-1）の増殖を効果的に抑制し、腫瘍消失率を改善した。HVJ-E/IL-2は腫瘍局所へのCD8(+)T細胞とNK細胞の集積を増加し、所属リンパ節の制御性T細胞（Tregs）を減少させた。HVJ-E/IL-2投与マウスではmyeloid-derived suppressor cells（MDSCs）が低値であり、CD8(+)T細胞からの腫瘍細胞に対するIFN- γ 産生を増加した。HVJ-E/IL-2にスニチニブ（チロシンキナーゼ阻害剤）を併用投与することで、腫瘍消失率が大きく改善した。

A. 研究目的

皮膚血管肉腫は高齢者の頭皮や顔面に好発する予後不良の疾患である。近年の化学療法の進歩により、治療の臨床成績は改善しつつあるが、根治的外科切除にもかかわらず局所再発は不可避で肺、胸膜、脳への遠隔転移も高率であり、致死率が高い。

不活化され複製能力をなくしたセンダイウイルス粒子（HVJ-E）は安全で効果的なドラッグデリバリーツールである。最近の研究でHVJ-Eは、CT26マウス大腸癌細胞、Renca腎細胞癌への腫瘍内投与で抗腫瘍効果が示されている。一方、IL-2は活性化T細胞やNK細胞に刺激効果を持ち、悪性黒色腫に対する免疫療法や皮膚血管肉腫への局所投与の有効性が証明されている。しかし、IL-2は、その半減期の短さや全身毒性などの臨床的な制限がある。そこで、我々はHVJ-Eによる局所的な持続性のIL-2供給がこれらの問題を克服し、血管肉腫に対する理想的な免疫治療になり得ると推測した。この研究の目標は皮膚血管肉腫に対する有効な治療法を確立するために、HVJ-E/IL-2の抗腫瘍効果と治療による免疫学的変化を確認するこ

とである。

B. 研究方法

マウスIL-2遺伝子は、pVAX1に挿入した（pVAX1-IL-2）。マウス血管肉腫細胞株ISOS-1をBALB/cマウス6週令メスの背部皮下に移植（day0）し、day12より4日毎に計3回、生理食塩水、HVJ-E、HVJ-E/pVAX1、HVJ-E/IL-2をマウス背部血管肉腫に局所投与し、腫瘍径、生存期間について検討した。Tumor-infiltrating lymphocytes（TILs）は腫瘍を細切、酵素処理し、パーコールによる密度勾配により分離した。CD8(+)T細胞、NK細胞、Tregs、MDSCs存在率はフローサイトメトリーで解析した。CD8(+)T細胞のIFN- γ 産生はELISA法で測定した。細胞障害活性はターゲット細胞をCFSE（5-（6）-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester）でラベルしエフェクター細胞と共培養後、7-AAD（7-amino-actinomycin D）で染色し、フローサイトメトリーで解析した。スニチニブはday12からday50まで連日、経口投与した。統計解析は生存期間については Kaplan-Meier法で算出し、ログランクテストで検定した。それ以外ではチューキーの多重比較