

難治性固形癌に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた 放射線併用ウイルス療法の臨床研究

研究代表者 藤原 俊義

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学・教授

【研究要旨】

進行食道癌および頭頸部癌に対する標準治療は未だ確立されておらず、嚥下機能や呼吸機能への影響や合併症を有する高齢患者が多いことから、現行の広域リンパ節郭清を伴う外科切除や放射線化学療法が困難な症例が増えてきている。多くの場合、経口摂取が不能となり生活の質（QOL）の低下は極めて重篤であるが、副作用の少ない分子標的薬剤や抗体医薬品などの新規抗がん医薬品の適応も得られていないため、何らかの新しい有効な治療法の開発が望まれているのが現状である。

Telomelysin（OBP-301）は岡山大学で開発された国産の抗がんアデノウイルス製剤であり、がん細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す。また、Telomelysinのアデノウイルス由来のE1B55kDa蛋白質が、放射線によるがん細胞の二重鎖DNA障害により誘導されるMre11/Rad50/NBS1（MRN）蛋白質複合体を分解することでDNA修復を阻害し、放射線感受性を飛躍的に増強することが証明されている。

平成26年度は、平成25年11月29日より開始したレベル1（ 10^{10} virus particle; vp）のTelomelysinと放射線治療併用の臨床研究への食道癌患者の症例登録を積極的に推進した。3例目でGrade 4のリンパ球減少を認めため、実施計画書に基づきレベル1でさらに3症例を追加することとした。5例目は治療中に腫瘍進行がみられたので脱落症例とし、平成27年3月までに7症例に治療を行った。主要評価項目である安全性および副次評価項目である臨床的治療効果を評価し、さらに生検組織を病理学的に解析した。

研究分担者：

白川 靖博

（岡山大学病院・消化管外科・講師）

香川 俊輔

（岡山大学病院・低侵襲治療センター・准教授）

田澤 大

（岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教）

A．研究目的

Telomelysin（OBP-301）は、腫瘍特異的なhTERTプロモーターを用いた遺伝子改変アデノウイルス製剤であり、がん細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す。Telomelysinはウイルスの生活環に由来する巧妙な分子機構を基盤とする遺伝子改変生物製剤であり、従来抗がん治療とは全く異なる作用機序を有することから独創性の高いシーズである。薬理動態に関しては、腫瘍内に投与されたTelomelysinはリンパ流に乗って所属リンパ節領域に拡散し、微小転移で選択的に増殖することが検証された（Kishimoto *et al*, Nature Med., 2006）。集学的治療への応用では、Telomelysinはがん細胞の放射線によるDNA傷害の修復を阻害す

ることで放射線感受性を増強し、また放射線照射はTelomelysinのがん細胞への感染効率を亢進させる（Kuroda *et al*, Cancer Res., 2010）。すなわち、双方向性の相乗効果が期待でき、ウイルスの拡散領域は放射線治療の照射野とほぼ一致することから、放射線併用Telomelysinウイルス療法は基礎的にも臨床的にも合理的な集学的治療である。

Telomelysinの第1相臨床試験は、2006年10月よりテキサス州ダラスのMary Crowley Medical Research Centerなどにて実施され、単回投与16例、複数回投与6例、計22例においてその臨床的な安全性および6.6～34%の腫瘍縮小などの臨床効果が確認されている（Nemunaitis *et al*, Mol. Ther., 2010）。また、定量的DNA-PCRによる血中ウイルス濃度は、投与直後と7～14日目に2峰性ピークを呈しており、生体内でのウイルス増殖が実証された。

本研究では、難治性固形癌である進行食道癌および頭頸部癌患者を対象に、臨床研究として3回のTelomelysinの内視鏡的腫瘍内投与と6週間の放射線治療の併用の安全性および臨床効果を検討することを目的とする。平成26年度の研究計画では、食道癌患者の症例集積を推進し、レベル1（ 10^{10} virus particle; vp）の登録終了と安全性、臨床効果の評価

を達成目標とした。

B．研究方法

1) 臨床研究のためのTelomelysin

米国の第I相臨床試験のためオンコリスバイオファーマ（株）が製造し、生物製剤の大量製造・精製を専門とするグローバル企業Lonza Houston Inc.が定期的品質チェックしてきたGood Manufacturing Practice（GMP）規格のTelomelysinの臨床ロットは、バイアル100本が岡山大学病院新医療研究開発センター探索的医薬品開発室に輸入・保管されている。

2) 放射線併用Telomelysinの臨床研究

臨床研究プロトコル「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」に基づいて、適応患者を選定して臨床研究に登録する。具体的には、原発巣あるいは転移巣が組織学的又は細胞診により食道癌であると確認され、外科的切除や根治的な化学放射線療法が何らかの理由（高齢、低肺機能、腎機能障害など）で受けることが困難な患者が対象となる。

岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定部会にて審査・承認の後に治療を実施する。

3) 薬理動態・病理学的解析のための検体収集

Telomelysinの体内動態および体外排泄を検討するために、薬剤投与前、および投与後30、60、90分、24時間後、退院時、退院1ヶ月後の血液と薬剤投与前、24時間後、退院時の唾液、喀痰、尿を採取する。また、薬剤投与前と退院3ヶ月後の生検組織を採取する。

（倫理面への配慮）

本研究の実施計画書は「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に基づいて作成され、またインフォームドコンセントの説明と同意文書は新GCPに乗っ取って作成されている。学内の遺伝子治療臨床研究審査委員会での審議の後、厚生労働省科学技術部に提出し、平成24年8月23日、「厚生労働省発科0823第3号」にて厚生労働大臣よりその実施が承認されている。また、「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に基づく第一種使用規程」についても、同日「厚生労働省発科0823第4号」、「環自野発第120823002号」にて厚生労働大臣および環境大臣より承認されている。

C．研究結果

平成25年11月29日より、標準治療の対象とならない高齢や併存症を有する食道癌患者へのレベル1（ 10^{10} vp）のTelomelysin投与を開始し、平成27年3月までに53～92歳の7症例に治療が実施された。3

例目でGrade 4のリンパ球減少を認めたため、実施計画書に基づきレベル1で3症例を追加することとした。また、5例目は治療中に腫瘍進行がみられたので脱落症例とし、さらに1例追加して計7症例となった。

有害事象としては、一過性発熱（57.1%）、食道炎（42.9%）、放射線肺臓炎（42.9%）、白血球減少（71.4%）などが40%以上で観察された。Grade 2以上のリンパ球減少は全例に認められ、うち2例はGrade 4となったが、放射線治療の中断などで回復がみられた。

臨床効果としては、内視鏡的には7例中5例で腫瘍縮小が認められ、3例では退院後1ヶ月から3ヶ月の生検組織にて悪性細胞の存在が認められなかった（完全奏功、complete response; CR）。他の2例は、1例は肉眼的には腫瘍は消失し、病理結果を待っている段階であり、1例は部分奏功（partial response; PR）であった。本治療前に抗癌剤が使用され不応であった2例では、1例が不変（stable disease; SD）であり、1例は進行（progression disease; PD）で治療を完遂できずに脱落症例となった。

D．考察

がんは1981年以来、日本人の死亡原因の第1位を占めており、がん対策推進基本計画に掲げる「がんによる死亡者の減少」を達成し国民の健康と安全・安心な社会を確保するためには、既存の治療コンセプトとは異なる革新的な治療技術シーズの育成が不可欠である。Telomelysinはテロメラーゼ活性を標的とするがん治療を目的とした生物製剤であり、生体内で自立性を持って増殖することによる従来の抗がん剤にない抗腫瘍効果の作用機序を有している。

Telomelysinの非臨床的なPOC（proof of concept）としては、Telomelysinによる細胞死にはmicroRNA-7（miR-7）を介したオートファジーが関与しており（Tazawa *et al*, *Int. J. Cancer*, 2012）、低酸素環境でもhTERTプロモーターの活性化で効率的に細胞障害を起こすことを明らかにしている（Hashimoto *et al*, *PLoS One*, 2012）。また、テロメラーゼ活性が低いalternative lengthening of telomere（ALT）機構をもつ肉腫細胞でも、アデノウイルスのE1A蛋白質がhTERTプロモーターを活性化し、活発なウイルス増殖により細胞死が誘導される（Sasaki *et al*, *Clin. Cancer Res.*, 2011）。

これらの非臨床POCおよび単独投与の第I相臨床試験結果に基づき、本研究では難治性固形癌である進行食道癌および頭頸部癌患者を対象に、臨床研究として3回のTelomelysinの内視鏡的腫瘍内投与と6週間の放射線治療の併用の安全性の検討（最大耐量の推定）（主要エンドポイント）および評価可能症例における治療効果（副次エンドポイント）を検討することを目的としている。

平成26年度の総括として、レベル1 (10¹⁰ vp) の症例登録を終了することができ、安全性と有効性を示唆する臨床効果が検証できたことで、計画は順調に進んでいると言える。ただ、レベル1の症例が当初の予定の3例から7例に増えたことで、採取した生体サンプルのTelomelysinの体内動態や体外排泄の解析が翌年度に持ち越しとなったため、達成度は約90%と考える。

平成27年度は、引き続き適応患者のリクルートと登録を積極的に行い、岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究審査委員会での審査・承認の後、10倍量のレベル2 (10¹¹ vp) のTelomelysin投与群 (3例)、さらに最も臨床効果が期待される6例の最高用量レベル3 (10¹² vp) への段階的増量を目指す。また、採取した喀痰、唾液、尿、血液検体を用いて、ウイルスの薬理動態に関する解析を実施する。

国内外の複数の大手製薬企業が本研究に興味を示しており、平成26年度には秘密保持契約を結んだ上で情報交換を実施した。今後は、企業とのアライアンスによる多施設共同研究やランダム化第IIb / III相臨床試験などの次なる臨床開発の可能性を模索していく。また、本研究を薬事承認に活用できる医師主導治験に移行することも視野に入れて検討を進める。

Telomelysinは高齢患者に安全に投与できる画期的な医薬品として、国民の健康増進に役立つと期待される。

E . 結論

放射線併用Telomelysinウイルス療法の臨床研究を実施し、安全性と臨床的有効性を示唆するデータを集積することが可能であった。

F . 研究発表

1. 論文発表

【英文】

1. Yano, S., Miwa, S., Kishimoto, H., Tonei, M., Hiroshima, Y., Yamamoto, M., Bouvet, M., Urata, Y., Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. Experimental curative fluorescence-guided surgery of highly invasive glioblastoma multiforme selectively labeled with killer-reporter adenovirus. *Mol. Ther.*, (in press), 2015.
2. Shigeyasu, K., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Mori, Y., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Nagasaka, T., Kuroda, S., Urata, Y., Goel, A., Kagawa, S., Fujiwara, T. Fluorescence virus-guided capturing system of human colorectal circulating tumour cells for non-invasive companion diagnostics. *Gut*, 64: 627-635, 2015.
3. Kikuchi, S., Kishimoto, H., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Kagawa, S., Urata, Y., Hoffman, R.M., Fujiwara, T. Biological ablation of sentinel lymph node metastasis in submucosally invaded early gastrointestinal cancer. *Mol. Ther.*, 23: 501-509, 2015.
4. Shimoyama, K., Kagawa, S., Ishida, M., Watanabe, S., Noma, K., Takehara, K., Tazawa, H., Hahimoto, Y., Tanabe, S., Matsuoka, J., Kobayashi, H., Fujiwara, T. Viral transduction of the HER2-extracellular domain expands trastuzumab-based photoimmunotherapy for HER2 negative breast cancer cells.

- Breast Cancer Res. Tr.*, 149: 597-605, 2015.
5. Kuroda, S., Kubota, T., Aoyama, K., Kikuchi, S., Tazawa, H., Nishizaki, M., Kagawa, S., Fujiwara, T. Establishment of a Non-Invasive Semi-Quantitative Bioluminescent Imaging Method for Monitoring of an Orthotopic Esophageal Cancer Mouse Model. *PLoS One*, 9: e114562, 2014.
 6. Yano, S., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman RM. Selective methioninase-induced trap of cancer cells in S/G2 phase visualized by FUCCI imaging confers chemosensitivity. *Oncotarget* 5: 8729-8736, 2014.
 7. Yano, S., Miwa, S., Mii, S., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Kishimoto, H., Tazawa, H., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, RM. Invading cancer cells are predominantly in G 0/G 1 resulting in chemoresistance demonstrated by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle*, 13: 953-960, 2014.
 8. Itoh, M., Iwamoto, T., Matsuoka, J., Nogami, T., Motoki, T., Shien, T., Taira, N., Niikura, N., Hayashi, N., Ohtani, S., Higaki, K., Fujiwara, T., Doihara, H., Symmans, W. F., Pusztai, L. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res. Treat.*, 143: 403-409, 2014.
 9. Shirakawa, Y., Noma, K., Maeda, N., Katsube, R., Tanabe, S., Ohara, T., Sakurama, K., Fujiwara, T. Assistant-based standardization of prone position thoracoscopic esophagectomy. *Acta Med. Okayama*, 68: 111-117, 2014.
 10. Yano, S., Zhang, Y., Miwa, S., Tome, Y., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Suetsugu, A., Kishimoto, H., Tazawa, H., Zhao, M., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle*, 13: 2110-2119, 2014.
 11. Utsumi, M., Takaki, A., Umeda, Y., Koike, K., Napier, S.C., Watanabe, N., Sadamori, H., Shinoura, S., Yoshida, R., Nobuoka, D., Yasunaka, T., Nakayama, E., Yamamoto, K., Fujiwara, T., Yagi, T. Frequency of regulatory T-cell and hepatitis C viral antigen-specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transpl. Immunol.*, 31: 33-41, 2014.
 12. Eto, K., Nishimura, W., Oishi, H., Udagawa, H., Kawaguchi, M., Hiramoto, M., Fujiwara, T., Takahashi, S., Yasuda, K. MafA Is Required for Postnatal Proliferation of Pancreatic β -Cells. *PLoS One*, 9: e104184, 2014.
 13. Kagawa, S., Shigeyasu, K., Ishida, M., Watanabe, M., Tazawa, H., Nagasaka, T., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Molecular diagnosis and therapy for occult peritoneal metastasis in gastric cancer patients. *World J. Gastroentero.*, 20: 17796-17803, 2014.

【邦文】

1. 藤原俊義：消化器癌の Molecular Theranostics：分子イメージングと治療の融合. *G. I. Research* 22: 24-30, 2014.
2. 藤原俊義：ウイルスを用いた DDS：悪性腫瘍のウイルス療法. *医薬ジャーナル* 50: 117-122, 2014.
3. 田澤大、矢野修也、香川俊輔、白川靖博、藤原俊義：テロメラーゼ活性依存的腫瘍融解ウイルスによるがん治療. *腫瘍内科* 13: 817-823, 2014.
4. 長谷井 謙、尾崎修平、山川泰明、田澤大、香川俊輔、尾崎敏文、藤原俊義：骨軟部肉腫に対するテロメラーゼ依存性増殖型腫瘍融解ウイルスを用いた治療戦略. 「*分子細胞治療フロンティア2015*」(外科分子細胞治療研究会、編集) pp128-135、株式会社パピルス、2014.

2. 学会発表

【国内学会】

1. 菊地覚次、岸本浩行、田澤大、黒田新士、西崎正彦、香

川俊輔、浦田泰生、Robert Hoffman、藤原俊義：消化器がんにおける遺伝子改変ウイルスを用いたセンチネルリンパ節転移アブレーション。第16回SNNS研究会学術集会（シンポジウム）、鹿児島、2014年9月。

2. 香川俊輔、渡邊めぐみ、石田道拓、黒田新士、菊地覚次、田澤大、岸本浩行、栞田和也、久保田哲史、堀直人、田辺俊介、西崎正彦、浦田泰生、藤原俊義：Novel cytological diagnosis of peritoneal wash for gastric cancer by fluorescence-emitting virus TelomeScan。第115回日本外科学会定期学術集会（Interntional Session）、名古屋、2015年4月。