

添付資料 1. 臨床研究の実施計画書の概要

臨床研究課題名	進行性悪性黒色腫患者を対象としたHVJ-E腫瘍内局所注入治療の安全性/忍容性及び腫瘍免疫誘導の評価のための臨床研究（第I/II相臨床研究）
臨床研究統括責任者/実施医療機関	大阪大学大学院医学系研究科情報統合医学皮膚科学講座 教授 片山 一朗 / 大阪大学医学部附属病院
臨床研究の目的	<p>主要目的</p> <ul style="list-style-type: none"> ・HVJ-E調製液の安全性及び忍容性の確認 <p>副次目的</p> <ul style="list-style-type: none"> ・腫瘍免疫誘導能の評価 ・抗腫瘍効果
臨床研究デザイン	標準的なコホート用量漸増デザイン
<p>対象集団</p> <p>主な選択・除外基準</p>	<p>進行性悪性黒色腫患者</p> <p>選択基準</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 患者本人が臨床研究に参加する旨を記載した同意文書に記名捺印又は署名し日付を記入していること。 2. 年齢20歳以上90歳以下であること。 3. 組織診又は細胞診で悪性腫瘍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ステージ IIIc又はステージ IVの進行性悪性黒色腫と診断されていること。 5. 1箇所以上の投与可能な25cm²以下（ノギス、CT又はMRIにて計測）の皮膚、皮下又はリンパ節病変を有すること。 6. 登録後、12週以上の生存が期待できること。 7. ECOGのPerformance Statusが0又は1であること。 8. 登録時に画像診断で計測できる腫瘍や直接計測できる表在性腫瘍等の評価可能病変を有すること。 9. 以下の骨髄機能、肝機能及び腎機能を保持していること。

- ・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
- ・GOT: 100 IU/L以下
- ・GPT: 100 IU/L以下
- ・総ビリルビン: 2.5 mg/dL以下
- ・血清クレアチニン: 2.3mg/dL以下

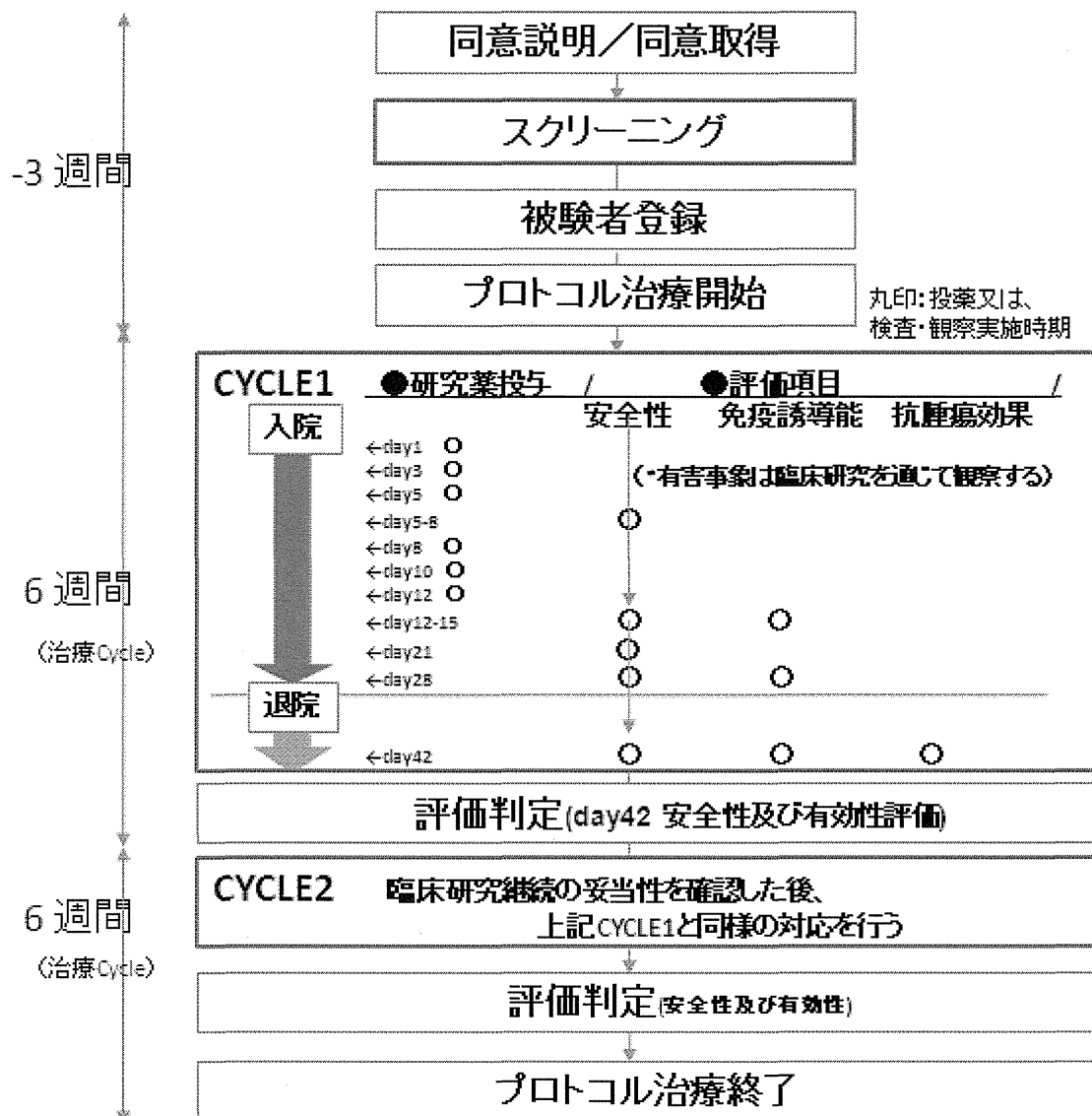
除外基準

1. 多発性脳転移を有する場合。
2. HVJ-E調製液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. 登録前4週間以内（ニトロソウレア系薬剤又はマイトマイシンCを使用の場合は6週間以内）の全身性抗がん療法、放射線療法又はIFN- β 局所療法が行われていた場合。
5. 登録前4週間以内に未承認薬の臨床試験に参加していた場合。
6. 悪性黒色腫以外の悪性腫瘍歴。ただし、略治しており、登録時に2年以上再発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箇月超）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。授乳中の場合は、授乳を中止する場合はこの限りではない。
10. 追跡上及び本臨床研究実施計画書遵守上問題となる精神疾患、家族、社会又は地理的状況。
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. 女性の場合、 β -HCG陽性の場合。
13. PT, APTTが施設基準値上限の1.5倍を超える場合。

<p>予定被験者数（合計）</p> <p>予定実施医療機関数</p>	<p>14.その他、担当医が不相当と認めた場合。</p> <p>最大 12 例</p> <p>1施設</p>
<p>臨床研究被験薬</p> <p>剤型</p> <p>投与経路</p> <p>投与方法</p>	<p>HVJ-E 調製液</p> <p>1 パイアル中に 10,000 mNAU の HVJ-E を含有し、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を投与前に臨床研究実施施設内において滅菌蒸留水で溶解し、フィルターろ過後、注射液剤とする。</p> <p>腫瘍内投与</p> <p>HVJ-E調製液の投与は、隔日以上あけて原則週3回投与を2週間行った後、4週間休薬し、安全性及び抗腫瘍効果を評価するまでを1サイクルとする。この治療を2サイクル行った後、臨床研究終了とする。投与は腫瘍病変部位 1 箇所あたり3000 mNAU以上で3箇所以下の投与箇所とする。投与箇所数については、標的病変部位の状態や数により判断する事とする。投与液量は低用量群及び高用量群ともに1箇所につき1mL以下を投与し、1 箇所の標的病変部位あたり1ml以下を投与し、1 箇所の標的病変部位のみへの投与であれば合計1mL、2 箇所の標的病変部位への投与であれば合計2mL、3箇所の標的病変部位への投与であれば合計3ml以下をそれぞれ投与することになる。用量は低用量群及び高用量群ともに投与期間を通じて変更しない。本臨床研究は、入院対応で行う。</p> <p>HVJ-E 調製液は、原則として 27G の注射針を用いて同一病変に投与する。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よう工夫する。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好ましくないため、反復投与は避け、少なくとも、腫瘍の辺縁をじゅうぶんカバーし、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。</p> <p>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</p>

	<p>に、HVJ-E調製液の再投与を最高1週間延期できる。再投与後は、可能な限り、投与間隔を隔日以上あけて1サイクルで合計6回投与を行い、4週間休薬することとする。ベースラインの徴候・症状の回復又はグレード1以下への回復がみられない場合、本臨床研究を中止する。</p>
<p>主要評価項目及び主な副次的評価項目</p>	<p>主要評価項目</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 安全性/忍容性 <p>副次的評価項目</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 腫瘍免疫誘導の評価 - 血中サイトカインの変動 - 血中及び腫瘍組織中の免疫担当細胞の動態 ・ 抗腫瘍効果 - 腫瘍縮小効果 (overall response)
<p>評価スケジュール</p>	<p>各サイクル終了後に安全性を評価する。同様に腫瘍免疫誘導及び抗腫瘍効果を評価する。</p>
<p>目標登録症例数の設定根拠</p>	<p>本邦における最近の悪性黒色腫の予後調査研究において、1997年～2001年の新規登録患者の数は821人と報告されている¹⁾。大阪大学医学部附属病院の2008年の新規悪性黒色腫患者数は25例であり、そのうちステージIVの進行期症例が約半数を占める。したがって、今回臨床研究の対象となる被験者数を約半数と見積ると、登録期間2年間で集積可能な被験者数は、おおよそ10例程度と予測される。</p> <p>本研究では、HVJ-E調製液の腫瘍内局所注入治療の安全性(有害事象の有無、種類、程度等)及び忍容性(HVJ-E調製液の用量と有害事象の発現との関係及びHVJ-E調製液の最大耐用量)を評価することを目的としており、標準的な抗悪性腫瘍薬の第I相臨床試験に倣って、汎用される古典的なコホート用量漸増デザインを採用し、本臨床研究で実施する治療の効果についての推定精度又は効果の有無の仮説に対する統計的検定に基づく定型的な例数設計の方法論で目標登録症例数を規定しないこととした。したがって、以上の理由より目標登</p>

	録症例数は最大 12 例とした。
統計解析	本臨床研究における解析対象集団は、登録例のうち、不適格例、HVJ-E 調製液未投与例、登録後逸脱例のうち評価可能なデータが全くない被験者を除いた集団とする。
解析対象集団	
解析項目・方法	登録例数、不適格例数、HVJ-E 調製液未投与例数、登録後逸脱例数、解析対象集団数、中止例数を集計する。HVJ-E 調製液未投与例、登録後逸脱例、中止例についてはその理由別に集計する。
解析対象集団	
被験者背景情報	被験者背景情報について記述統計量を算出する。
評価項目	以下の評価項目に対する解析を行うが、必要に応じて、諸種の統計的方法を適用し、探索的な解析も行う。
	1. 主要評価項目
	1) 安全性/忍容性
	低用量群及び高用量群ごとに有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度及び発現期間を集計する。
	2. 副次的評価項目
	1) 腫瘍免疫誘導
	低用量群及び高用量群ごとに記述統計量を算出する。
	2) 腫瘍縮小効果
	低用量群及び高用量群ごとに CR、PR、SD、PD、NE に属する例数を集計する。必要に応じて奏効割合を推定する。
症例毎の臨床研究参加期間	12 週



添付資料 2. 医師主導治験の実施計画書の概要

1. 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10月～2016年3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。なお、DLT とは Cycle1 の投与開始日から Cycle2 の投与開始直前までに発現した因果関係の否定できない Common Terminology Criteria for Adverse Events version4.0 (以下、CTCAE v4.0) Grade 3 以上の非血液毒性と Grade 4 以上の血

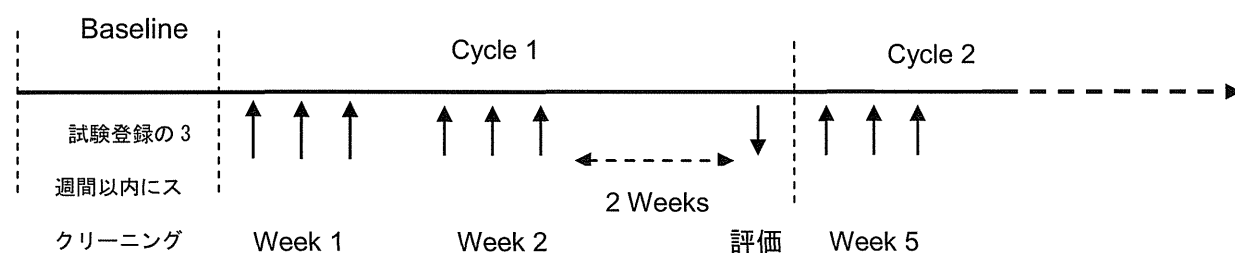
液毒性の発現を指す。ただし、Grade3 の発熱性好中球減少症が発現した場合には DLT とするか否かについて効果安全性評価委員会にて審議する。

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（経口プレドニゾロンとして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（同意取得日から治験薬投与終了日の30日後まで）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(%)が施設基準値下限を10%以上下まわった場合、または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HBs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次元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. バイタルサイン
4. Performance Status (PS)
5. 併用薬
6. 有害事象
7. 胸部 X 線検査
8. 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に実施する。
9. 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-cysteinyl dopa (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、スクリーニング時及び各投与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。

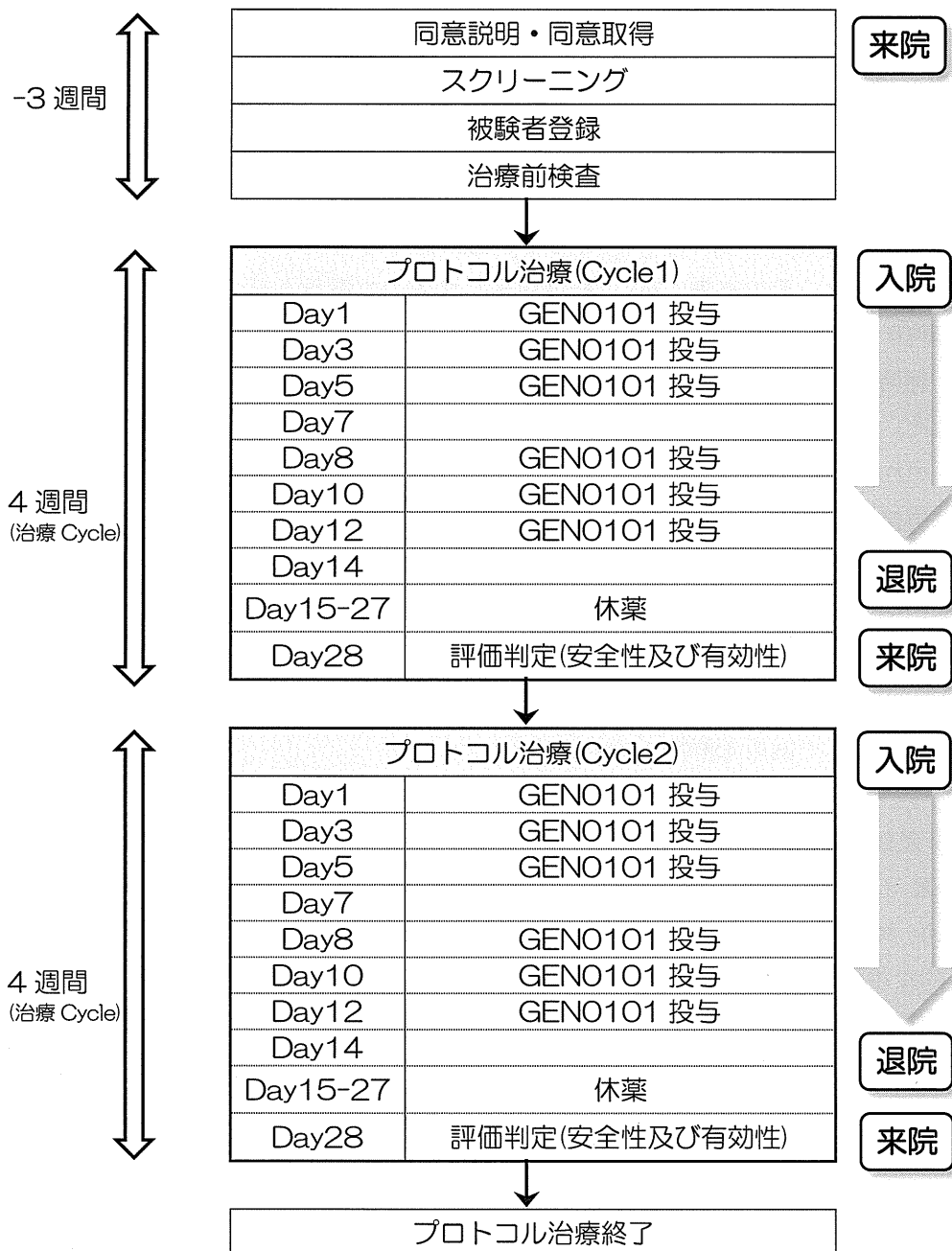
評価の基準は以下の通りとする。

- ・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)



厚生労働科学研究費補助金（革新的がん医療実用化研究事業）
総合研究報告書

悪性黒色腫に於けるHVJ-Eの抗腫瘍免疫活性の検証、新規バイオマーカーの開発及び医師主導治験の実践

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 講師）

研究要旨：・2009年～2012年実行したHVJ-Eを用いた悪性黒色腫症例に対する臨床研究にて得られた患者検体を用い、特異的な自己血清反応を新しいアレイシステムを用いて網羅的に探索した。その結果、HVJ-E投与後に共通して発現上昇する蛋白を同定した。

・B16F10マウスメラノーマ細胞を移植したマウスの樹立腫瘍内にHVJ-E注入を行ったところ、経時的に融合した多核細胞への変化を経た後、腫瘍細胞の壊死・アポトーシスが観察された。B16F10細胞をBL/6野生型マウスおよび免疫不全マウス（SCIDマウス）に移植し、それぞれの腫瘍内にHVJ-Eを投与し数日後細胞株を再接種したところ、野生型マウスでは再接種部位には腫瘍が樹立されなかった。つまり、HVJ-Eが抗腫瘍免疫を誘導し維持することで腫瘍の樹立を拒絶したことが示唆された。さらに、*in vitro*で培養メラノーマ細胞株にHVJ-Eを添加しても同様の多核細胞が出現しているのを、ライブイメージング撮影することが出来た。

・最終年度にはこれらの臨床研究及び前臨床研究を踏まえ、第1相医師主導治験を開始し、研究責任者として低用量群第1例目を完遂した。

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、医師主導治験における評価項目に科学的な根拠を与えることと同時に、開始した医師主導治験の現況を報告すること目的とする。

B. 研究方法

【H24年度】HVJ-Eによる臨床研究を実施したメラノーマ症例の血清を用いて、網羅的に自己抗体の出現を解析するSeromicsアレイを行った。共通する蛋白に対する自己抗体を同定後、独自に同蛋白を合成した。マウス・ヒトメラノーマ細胞株、他癌腫細胞株およびヒトメラノーマ組織での発現をqT-PCRで測定した。

【H25年度】

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。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、培養メラノーマ細胞株に

HVJ-E を添加し、ライブイメージングで細胞の経時的形態変化、細胞融合の様子を観察した。

(倫理面への配慮) 動物実験および組換え DNA 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

【H24 年度】 seromic アレイの結果、6 症例全てで特定のユビキチン関連タンパクに対する抗体が HVJ-E 投与後に上昇しているのが確認された。市販では存在しない ELISA プレートを作成後、改めて抗体の上昇を確認し、健常人では上昇しないことを確認した。メラノーマ細胞株・メラノーマ以外の細胞株・メラノーマ組織では発現しておらず、HVJ-E 投与後に発現上昇していることが分かった。

【H25 年度】

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

Seromics アレイで同定したたんぱく質は HVJ-E とは共通配列はみとめず、HVJ-E 投与後腫瘍細胞障害が起こる時に特異的に発現する分子である可能性がある。今後医師主導治験を進める中で、これまでにない HVJ-E 治療特異的なバイオマーカーになる可能性が示唆された。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を新しい手法を用いてダイナミックに再現、これまでの HVJ-E の抗腫瘍活性および維持に関する多くの解析結果をより強固にする情報が得られた。

E. 結論

メラノーマ患者およびメラノーマ細胞株担癌マウスでの HVJ-E 投与後の腫瘍・個体の変化を詳細に観察したことは、今後の最適な治験の推進に重要な情報となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). **Tanemura A**, Deguchi A, Tanaka A, Kiyohara E, Kishioka A, Katayama I: A Rare Case of Mucinous Carcinoma of the Skin with Multiple Organ Metastases. *European Journal of Dermatology*, in press. 2015
- 2). Hayashi M, **Tanemura A**, Matsuda K, Hosokawa K, Izumi M, Ohara K, Mihm MC, Katayama I: Pigmented epithelioid melanocytoma with lymph node metastasis in a patient with uncontrolled atopic dermatitis. *J Dermatol*, 41(11): 1023-5. 2014

- 3). Kotobuki Y, Yang L, Serada S, **Tanemura A**, Yang F, Nomura S, Kudo A, Izuhara K, Murota H, Fujimoto M, Katayama I, Naka T: Periostin accelerates human malignant melanoma progression by modifying the melanoma microenvironment. *Pigment Cell Melanoma Res*, 27(4): 630-9.2014
- 4). **Tanemura A**, Nagata Y, Ono E, Tanaka A, Kato K, Yamada M, Katayama I: Preliminary colorimetric assessment of progressive nonsegmental vitiligo under short-term intravenous methylprednisolone pulse therapy. *JCDSA*, 4; 135-40.2014
- 5). Oiso N, Nomi N, Fukai K, **Tanemura A**, Suzuki T, Katayama I, Wakamatsu K, Muto M, Kawada A: Nevus depigmentosus with pale skin, yellow-brown hair and a light brown iris. *Eur J Dermatol*. 24(3): 406-7.2014
- 6). Tanaka A, Hayaishi N, Kondo Y, Kurauchi K, **Tanemura A**, Katayama I: Severe gangrene accompanied by varicella zoster virus-related vasculitis mimicking rheumatoid vasculitis. *Case Rep Dermatol*. 6(1): 103-7.2014
- 7). Itoi S, **Tanemura A**, Tani M, Kitaba S, Terao M, Murota H, Oiso N, Katayama I: Immunohistochemical analysis of IL-17 producing T helper cells and regulatory T cells infiltration in an annular erythema associated with Sjogren's syndrome. *Ann Dermatol*, 26(2): 203-8.2014
- 8). Itoi S, **Tanemura A**, Tsuji C, Kitaba S, Yokomi A, Kira M, Katayama I, Tateishi C, Tsuruta D: A rare case of male bullous lupus erythematosus complicated with following annular hypopigmentation. *Case Rep in Dermatol*. 6(1): 103-7.2014
- 10). **Tanemura A**, Hashimoto N, Yamada M, Itoi S, Katayama I: Hepatitis C-related mixed type vitiligo in a patient with Ivemark syndrome. *J Dermatol*, 41(2): 185-6.2014
- 11). Yamaga K, Hanafusa T, Azukizawa H, **Tanemura A**, Nii T, Nishide M, Narazaki M, Katayama I: Immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient with adult-onset Still's disease: graft-versus-host-like skin reaction with possible asymptomatic human herpes virus reactivation during steroid tapering. *Eur J Dermatol*, 24(1): 101-3.2014
- 12). **Tanemura A**, Oiso N, Nakano M, Itoi S, Kawada A, Katayama I: Alopecia areata: infiltration of Th17 cells in the dermis, particularly around hair follicles. *Dermatology*. 226(4): 333-6.2013
- 13). Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, **Tanemura A**, Katayama I, Ezo S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jäger E, Sakaguchi S: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(44): 17945-50.2013
- 14). Tanaka A, **Tanemura A**, Tsuji C, Katayama I, Masuzawa M, Nakashima Y: Epithelioid angiosarcoma of the skin with

- th spontaneous regression. *J Dermatol*, 40(3): 215-7.2013
- 15). **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(11): 599-605. 2013
 - 16). **Tanemura A**, Nakano M, Iwasaki T, Yokomi A, Arase N, Wataya-Kaneda M, Miyazaki M, Yakushijin T, Takehara T, Katayama I: An extremely rare case of Merkel cell carcinoma metastasized to the duodenum. *Eur J Dermatol*. 22(4): 568-70. 2012
 - 17). **Tanemura A**, Yajima T, Nakano M, Nishioka M, Itoi S, Kotobuki Y, Higashiyama M, Katayama I: Seven cases of vitiligo complicated by atopic dermatitis: suggestive new spectrum of autoimmune vitiligo. *Eur J Dermatol*. 22(2): 279-80.2012
 - 18). Kotobuki Y, **Tanemura A**, Yang L, Itoi S, Wataya-Kaneda M, Murota H, Fujimoto M, Serada S, Naka T, Katayama I: Dysregulation of melanocyte function by Th17-related cytokines: significance of Th17 cell infiltration in autoimmune vitiligo vulgaris. *Pigment Cell Melanoma Res*. 25(2): 219-30.2012
2. 学会発表
- 1). **種村 篤**、他：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) を用いた医師主導治験
第30回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会、東京 (2014.7.5-6)
 - 2). **種村 篤**: HVJ-E を用いた皮膚悪性腫瘍の治療 第 78 回日本皮膚科学会東京支部学術大会、東京 (2015.2.21-22)
 - 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, (2013.7.17-20.)
 - 4). **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, (2013.8.9-10)
 - 5). **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, (2013.9.21-22)
 - 6). **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, (2013.10.3-5)

F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

HVJ-Eの抗腫瘍免疫活性を増強できる新規治療法の開発に関する研究

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)は多彩な抗腫瘍活性を有する。この抗腫瘍効果を増強して新たな癌治療法の開発を行うことは、今後、HVJ-Eを用いた治験を行う上で重要である。まず様々なサイトカインやケモカインの遺伝子を HVJ-E に封入して B16F10 マウスメラノーマ細胞を移植したマウスの腫瘍内に導入したところ、IL-12 遺伝子封入 HVJ-E が最も強い腫瘍抑制効果を示した。そのメカニズムとして、HVJ-E の F 蛋白質がマクロファージに作用して IL-18 の産生を促進し、IL-18 と IL-12 が共同して T cell を刺激して interferon (IFN)- γ の産生を高めることにより腫瘍に対する CTL (cytotoxic T cell) の活性を増強することが分かった。次に HVJ-E と TLR agonist の併用による抗腫瘍効果を検討した。既に臨床で用いられている TLR4 agonist の MPL (monophosphoryl lipid A), TLR3 agonist の poly I:C とも、HVJ-E 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、それぞれを単独で用いるよりも強い抗腫瘍効果が得られた。特に poly I:C との併用は安定した腫瘍抑制効果が得られた。そのメカニズムは、poly I:C によって腫瘍組織内に好中球の浸潤が促進され、集積した好中球に HVJ-E が作用して Th1 優位の免疫反応を誘導し CTL 活性を増強させることが分かった。

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、医師主導治験における評価項目に科学的な根拠を与えること、併用療法の必要性とその根拠を探ることを目的とする。

B. 研究方法

HVJ-E にマウス由来の IL-2, IL-12, IFN- β , GM-CSF, 及びコントロールとして luciferase 遺伝子をそれぞれ封入した。マウスメラノーマ細胞 B16F10 を C57BL/6 マウス皮内に移植した担癌マウスの腫瘍内に 1 週間で 3 回導入し、腫瘍増殖を調べた。また、様々な量の HVJ-E や polyI:C や MPL をそれぞれ単独で、或いは併用して同様の担癌マウスの腫瘍内に投与し抗

腫瘍効果を検討した。またそのときの腫瘍組織中のサイトカインやケモカインの産生をサイトカイン・ケモカインアレイを用いて網羅的に調べ、定量 PCR, ELISA 法で確認した。好中球に対する抗体を腫瘍内に投与し、HVJ-E と polyI:C の併用群での抗腫瘍効果に及ぼす影響を検討した。HVJ-E の好中球の形質転換に及ぼす影響を定量 PCR で調べた。CTL 活性は、B16F10 細胞で刺激したマウス脾臓細胞の IFN- γ の発現を測定する Elispot assay により行った。

（倫理面への配慮）動物実験および組換え DNA 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