

**厚生労働科学研究委託費
革新的がん医療実用化研究事業**

**「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん
(悪性胸膜中皮腫)治療薬開発のための医師主導治験の実施」**

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 金田安史

平成 27(2015)年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業(革新的がん医療実用化研究事業)による委託業務として、国立大学法人大阪大学が実施した平成26年度「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん(悪性胸膜中皮腫)治療薬開発のための医師主導治験の実施」の成果を取りまとめたものです。

目次

・委託業務成果報告 総括報告書

- 「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん(悪性胸膜中皮腫)
治療薬開発のための医師主導治験の実施 金田安史
- 図 1)HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan;Sendai virus)
図 2)紫外線照射された HVJ (HVJ-E) は完全に不活性化されている
図 3)HVJ-E は作用の異なる複数の分子標的治療薬としての機能を有する
図 4)臨床用 HVJ-E の製造
表 1)動物での GLP 安全性試験に関する進捗
表 2)登録済み特許の一覧・国内特許
表 3)出願中特許の一覧・国内特許
表 4)登録済み特許の一覧・国際特許

・委託業務成果報告書(業務項目)

- 1 . 医師主導治験の準備と実施
- a.プロジェクトの総合推進 金田安史
- b.治験実施計画書、同意説明文、その他の治験関連の作成
c.PMDA 相談のための検討会の実施
(資料)臨床試験実施計画書
奥村明之進・新谷歩・中野孝司
安宅信二・門田嘉久・齋藤充弘
- 2.毒性、薬効検証のための非臨床試験
- a.薬効薬理試験 金田安史
- 図 1.)各種細胞株における HVJ 受容体の発現パターン
図 2.HVJ-E のヒト胸膜中皮との親和性
図 3.)HVJ-E の細胞増殖抑制効果
図 4.)HVJ-E1000Mol24 時間後における、EHMES と他の細胞群との発現比較
図 5.)HVJ-E によるアポトーシス関連遺伝子とインターフェロンの発現比較
図 6.)EHMES を RIGI、MAVS ノックダウン時の TRAIL,NOXA の発現解析

- 図 7.)HVJ-E によるマウスマクロファージの形質変化
- 図 8.)HVJ-E によるマクロファージの形質変化に及ぼす RIG-I の関与
- 図 9.)HVJ-E によるマクロファージの形質変化に及ぼす NF-kappa B(p65)の関与
- 図 10.)HVJ-E で刺激した M2 マクロファージの T 細胞機能に与える影響

b.安全性試験

金田安史・李千萬

3 . 治験薬 GMP 製造

. 学会など発表実績

. 研究成果の刊行物・別刷

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん（悪性胸膜中皮腫）治療薬開発のための医師主導治験の実施」

総括報告書

研究代表者 金田安史（大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学分野 教授）

研究要旨

医師主導治験の準備と実施

a．プロジェクトの総合推進

医師主導治験推進のために、キックオフミーティングを開催（H26年11月8日）、悪性胸膜中皮腫の病態と標準的治療等の現況、治験届までの業務分担ならびに工程を確認した。患者の選定のために、悪性胸膜中皮腫の悪性度と血中HMGB1濃度の相関を見出した。本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫であるため中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

b．治験届に必要な書類作成

医師主導治験に必要な実施計画書、同意説明文書、治験薬概要書を作成するため、H26年11月18日に面談を実施した。原案をH26年度内に作成、平成27年3月にPMDA事前面談、平成27年9月頃にIRB申請、平成27年12月までに治験届を提出する目標を確認した。

c．PMDA相談のための検討会の実施

平成27年3月に第2回事前面談を実施、投与用デバイスの仕様確認を中心とした投与方法の相談を行う事とした。治験実施計画書、同意説明文書、治験薬概要書の妥当性についても適宜事前面談と対面助言を実施し、平成27年12月までに治験届を提出する計画を確認した。

毒性、薬効検証のための非臨床研究

a．薬効薬理試験

様々なタイプ（上皮型、肉腫型、二相型）のヒト悪性胸膜中皮腫細胞 (malignant pleural mesothelioma; MPM) に対してもHVJ-Eは細胞死を誘導し、ヒト前立腺癌細胞株PC-3と同等の細胞増殖抑制効果を有していた。実際に、EHMES細胞にHVJ-Eを作用させるとNoxa, TRAILの遺伝子発現がそれぞれ8倍、2倍増強されることが明らかになった。PC3細胞で見られるようなInterferon-βに発現増強は起こらなかった。しかしRIG-I, MAVSのsiRNAによりそれぞれの遺伝子発現を抑制しても、Noxa, TRAILの発現は抑制されなかった。そこで、MPM細胞におけるHVJ-Eの感受性遺伝子を網羅的に調べるため、CRISPR/Cas9系を利用して網羅的に遺伝子をノックアウトしてHVJ-E耐性細胞を分離し、責任遺伝子を明らかにする研究を開始した。もう1つの抗腫瘍作用は抗腫瘍免疫の活性化であり、腫瘍に対するCTL (cytotoxic T cell) やNK (natural killer) cellの活性化と制御性T細胞の抑制であることを既に報告している。その分子機構は、前者のエフェクター細胞の活性化については、virus RNA断片が樹状細胞や腫瘍細胞に膜融合で導入され、RIG-I経路を活性化して、IFN-β、

IP-10, RANTES等の産生を増強することによっており、後者の制御性T細胞の抑制は、F蛋白質が直接樹状細胞を刺激してNF-κBの経路を活性化してIL-6産生を促進させることによることを明らかにしている。しかし腫瘍組織内のHVJ-Eの標的細胞は腫瘍細胞自体と樹状細胞であることは既に報告しているが、HVJ-Eを投与したメラノーマ患者の腫瘍組織ではマクロファージの浸潤が著明であることから、マクロファージも標的細胞になるのではないかと考えた。そこで骨髄や腫瘍組織からマクロファージを分離して、HVJ-Eを作用させた結果、HVJ-EはM2マクロファージをM1型にシフトさせることによりT細胞をTh1型にシフトさせ、CTL機能を増強させることが明らかになった。またその経路は、RIG-Iを経由したものであること、またRIG-I経路とは別にNF-κBの経路が関与していることが示唆された。

b. 安全性試験

医師主導治験で計画している胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するため、トキシコキネティクス試験(TK試験)として実施予定の試験法の妥当性についてバリデーション試験を行った。事前面談の結果、胸腔内投与後の全身暴露に関するモニタリングを実施する事とし、それに必要なヒト全血中HVJ-E測定系の確立とバリデーションを実施、H26年度内に完了見込みである。腫瘍組織内への安全な投与容量の検定のため、空気圧式製剤注入器を用い、Evans Blue色素を20~30%ポリアクリルアミド・ゲルへ注入し、約1mlの投与が可能であることが分かった。

治験薬GMP製造

医師主導治験に必要な治験薬確保と、第2相治験への迅速な移行のため、製造のスケールアップ(50Lスケール)を実施、H26年度内に基礎データの取得見込みである。

研究分担者：

奥村明之進 大阪大学大学院医学系研究科
呼吸器外科 教授

中野孝司 兵庫医科大学呼吸器内科 教授

李千萬 大阪大学医学部附属病院未来医療
開発部 特任准教授

齋藤充弘 大阪大学医学部附属病院未来医
療開発部)講師

新谷歩 大阪大学大学院医学系研究科臨床
統計疫学寄附講座教授

安宅信二 国立病院機構 近畿中央胸部疾
患センター 肺腫瘍内科 肺癌研究部長

門田嘉久 大阪府立呼吸器・アレルギーセ
ンター・呼吸器外科 呼吸器外科部長

化学療法抵抗性の癌に対する新規治療法を開発する。そのため、希少がん(悪性胸膜中皮腫、Malignant Pleural Mesothelioma: MPM)を対象に医師主導治験を実施する。

MPMは、胸膜表面を覆う中皮やその下部結合組織の間葉細胞に由来する癌であり、胸水貯留、呼吸困難、疼痛等の重篤な症状を伴う致死率の非常に高い難治性疾患であり、生存期間は12.1ヵ月、1年生存率は約50%である。国内死亡者数は、1995年の432名から2011年には1,258名に増加した。主な病因は、石綿吸引であり、石綿暴露から平均40年弱で発症する。過去の石綿輸入量と使用実態から、今後発生率増加が見込まれている。

MPMの治療は、病変が容易に胸腔内に播種することから手術療法や放射線療法は適応症例が限定されており、全身化学療法(ペ

A. 研究目的

本研究では、癌治療の重要な課題である、

メトレキセドとシスプラチンの併用)が第一選択となることが多い。しかしながら、その生存期間中央値は13.3ヵ月、1年生存率は56.5%と限定的であり、依然、新規治療法が切望されている。また、化学療法剤抵抗性の癌細胞では薬剤排出ポンプなどの高発現で多剤耐性になることも多く、化学療法の限界が予測される。実際、化学療法剤抵抗性症例に対する二次治療はエビデンスが確立しておらず、異なるメカニズムの治療法が必要である。

不活化センダイウイルス (Hemagglutinating Virus of Japan Envelope: HVJ-E) による治療は、癌細胞が自ら細胞死を誘導する作用と抗腫瘍免疫を利用しており、既存治療法とは全く異なるメカニズムとなる。難治性MPMの動物モデルでの検討では、生存期間の有意な延長を認め、有効性が高い治療法になると期待できる。

大阪大学医学部附属病院では、2009年より本剤のnon-GCP臨床試験(悪性黒色腫、前立腺癌)を実施し、臨床における安全性を確認した。また、非投与部位の癌消失や縮小、NK細胞活性化、CTL上昇等、臨床での作用も確認した。本剤の品質に関する対面助言などPMDA対応も完了し、今年度より世界初となるGCPレベルのfirst in man試験が悪性黒色腫に対して開始された。2015年4月には、去勢抵抗性再燃性前立腺癌患者に対しても医師主導試験が始まる予定である。

そこで、本研究で化学療法剤抵抗性になった癌に対する有効性を実証するため、化学療法剤抵抗性MPMに対する医師主導試験(第I相)を実施し、オーファン申請後に第II相試験で国内承認を取得する。

B. 研究方法

1. 医師主導試験の準備と実施

1) プロジェクトの総合推進

平成26年11月8日に全員が参加してキックオフ会議を開催した。

また患者の選定のために、中皮腫や肺癌を発症していない石綿暴露者ならびに肺癌、胸膜中皮腫患者で HMGB1 を測定した。6 ml の採血を行い 2400G、6 分間遠心処理を行い ELISA(HMGB1 ELISA Kit ®,シノテスト株式会社)にて血清中の HMGB1 を測定した。

石綿曝露症例はその画像所見を胸膜プラーク、胸膜肥厚、線状・網状影、粒状影、胸水、すりガラス影、牽引性気管支拡張、蜂巣肺に大別しその有無、血清 HMGB1 値との相関を検討した。なおこの研究は国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの臨床試験審査委員会にて承認を受けたのち開始されている。また、本研究について本人に十分な説明を行い同意文書への署名を確認後、採血を行った。

本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法剤抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペトレキセ併用療法(CDDP/PEM)であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する可能性がある。中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

2) 試験実施計画書、同意説明文書、その他の試験関連書類の作成

阪大病院で実施した進行性悪性黒色腫および去勢抵抗性再燃前立腺癌を対象とした医師主導臨床研究の解析結果や、現在実施中の悪性黒色腫患者を対象とした試験の試験

薬概要書等を基に、治験の用法・用量設定や、検査項目等を設定し、治験デザイン(治験実施計画書)を構築した。

作成した治験実施計画書を基に、開発を適切に実施するために医薬品医療機器総合機構(PMDA)の制度である薬事戦略相談(事前面談、対面助言)を利用し、医薬品の開発の方向性について合意を得ながら開発を進めることにした。

具体的には医師主導治験完了まで進めるため下記のようなスケジュールを立てた。

医師主導治験の準備及び実施を支援する体制の構築(平成26、27年度)

支援する体制として、一部の業務については開発業務受託機関(CRO)、治験薬については治験薬提供者と契約を締結する。

各種標準業務手順書(SOP)の整備(平成26、27年度)

医師主導治験の準備及び実施をする上で必要なSOPを作成する。

治験実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の案の作成(平成26年度)

医師主導治験を実施するために必要な治験実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の案を作成する。

PMDAとの薬事戦略相談(事前面談、対面助言)の実施(平成26、27年度)

治験デザインや投与方法、投与デバイスに関する事前面談および対面助言を実施する。開発の方向性や追加の非臨床試験の必要性等も確認しPMDAからの意見を踏まえ治験のデザインを修正する。

治験審査委員会(IRB)への治験実施申請および承認取得(平成27年8月)

PMDAとの事前面談、対面助言の結果を反映した各種書類をIRBに申請し、承認を得

る。IRBからのコメントを反映させて書類を最終化する。

治験計画届書(治験届)の提出(平成27年9月)

IRBから治験実施の承認を得て、治験届をPMDAへ提出する。30日調査期間中に照会事項があれば対応し、適宜資料を修正した後、再度IRBへ変更申請を実施する。

医師主導治験の実施(FPI)(平成27年10月)

医師主導治験が開始となり、被験者の組入れを開始する。

治験終了届書の提出(平成28年12月)
最後の被験者が治験を終了(LPO)した後、治験終了届書をPMDAへ提出する。

治験総括報告書の作成(平成29年3月)
固定された治験データを基に解析し、治験総括報告書を作成する。

3) PMDA 相談

速やかに治験届を提出して治験開始ができるように、薬事戦略相談を通じてPMDAとの事前相談の機会を折に触れて設けた。

2. 毒性、薬効検証のための非臨床研究

1) 薬効・薬理試験

HVJは図1のようにマウスパラインフルエンザウイルスで約15kbの一本鎖RNAをゲノムとして有し、膜融合能を持つ。その膜融合にはウイルス膜のF、HN蛋白質が関わり、HNが認識する受容体はGD1a, Sialylparagloboside(SPG)といった酸性糖グリコシドである(図1)。HVJはATCCより購入したSendai virusのZ株(VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52)を用い、有精鶏卵で増殖させ、遠心法により生成した(ちなみに臨床用HVJ-E製剤はヒト細胞で産生さ

せ、4種類のカラムで精製している)。LLCMK2細胞にHVJを感染させて24時間以降に培養液中に産生されるHVJは不活性型F蛋白質(F0)を有し融合能を持たない。このHVJを低濃度(0.0004%)のトリプシンで処理するとF1, F2に開裂し融合能を持つようになる。またLLCMK2細胞中にHVJのHN遺伝子に対するsiRNAを導入しておいて、24時間後にHVJを感染させると産生されるHVJはHN蛋白質をほとんど有しないため、HVJ受容体であるガングリオシドに結合できず融合能を欠失したウイルスとなる。また高濃度のトリプシンをHVJに処理し膜蛋白質のF, HNを分解した融合能のないHVJも作成した。いずれのHVJも紫外線(99 mJoule/cm²)で不活性化しHVJ-Eとした。完全に不活性化していることを感染させた細胞におけるウイルスRNA複製とウイルス由来蛋白質の産生のいずれも起こっていないことで確認した(図2)。HVJ-Eが癌細胞死誘導と抗腫瘍免疫活性化作用といった多彩な抗腫瘍作用を有することは前立腺がんやメラノーマなどの癌腫ですでに報告している(図3)。

ヒトMPM細胞としては、上皮型のMPM細胞株(ACC-MESO-4)、二相型(MSTO-H211, EHMES)、や肉腫型(ACC-MESO-1, H2052)の細胞株を用いた。正常のヒト胸膜細胞株としてMet-5Aを用いた。マウスMPM細胞として、AB22G2を用いた。EHMES細胞は愛媛大学より供与を受けた。その他はATCCより購入した。HVJ受容体の産生ガングリオシドの解析は、HPLC法により行った。HVJ-Eに対する感受性は、96well plateに1wellあたり5000個の細胞を播き込み、HVJ-Eを1000, 2000 moi (multiplicity of

infection)で培養液中に投与し、24時間後の細胞生存をMTT法で測定した。ポジティブコントロールとしては、すでに高感受性であることを報告しているヒト前立腺癌細胞PC3, DU145やヒトグリオブラストーマ細胞株U251を用いた。また癌細胞とHVJ-Eの親和性を観察するため、PKH26により標識したHVJ-Eを培養液中に投与し、蛍光顕微鏡で観察した。

RIG-I, MAVSのsiRNA(Sigma)については既に報告している配列(Clinical Cancer Res. 2012)をlipofectamine RNAimax (Invitrogen)で導入した。Noxa, TRAIL, RIG-I, MAVS, MDA5, IFN-βの発現についてはq-PCRで行った。

マウス骨髄由来の初代培養マクロファージの調整、及びM1, M2分極誘導は、以下のように行った。C57BL/6N(♀)由来骨髄細胞を10% L929条件培地含有RPMI完全培地に 4.5×10^5 cells/mLで懸濁し、10cm培養皿に10 mL (4.5×10^6 cells/dish)を播種・培養した。4日後、培養培地10%量(1 mL)のL929条件培地を加え、更に3日間培養した。培養皿に接着している細胞を不活性型マクロファージとして回収した。不活性型マクロファージをRPMI完全培地に 1×10^6 cells/mLで懸濁し、100 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich Co., ST. Louis, USA)あるいは10 ng/mL M-CSF (WAKO Junyaku Inc., Osaka, Japan)と20 ng/mL IL-4 (WAKO)を加えて6穴プレートに1 mL (1×10^6 個)播種して、24時間培養した。マウス骨髄由来M2マクロファージへのHVJ-E刺激実験においては、6穴プレートで培養したマウス骨髄由来M2マクロファージ(1×10^6 cells/well)の培地を除去し、700 μLの

HVJ-E 含有血清不含 RPMI 培地 (2,000 HAU/mL) 中で培養した。1 時間後、最終濃度が 10 ng/mL M-CSF と 20 ng/mL IL-4 なるように希釈した RPMI 完全培地を 300 μ L 加え、23 時間培養した。マクロファージ形質の変化は、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- β 、IFN- γ 、NOS2、Arg1、Fizz1、Ym1、T-bet、Eomes、STAT1、Granzyme A、Granzyme B、18S の発現量をリアルタイム RT-PCR によって測定することにより検討した。また抗 NOS2、抗 NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA)、抗 Arg1、抗 β -actin (Sigma)、抗 Ym1 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 RIG-I、抗 TBP (Cell Signaling., USA) 抗体を用いた Western blot によっても行った。さらにマクロファージ培養上清中の IL-6、TNF- α を ELISA 法で測定し、NO 濃度の測定を Griess Reagent System (Promega., Tokyo, Japan) を用いて行った。NF- κ B の阻害剤投与は、骨髄由来 M2 マクロファージを 700 μ L の 30 μ M NF- κ B p65 阻害剤 (JSH-23) (SYMANSIS., California, USA) 含有血清不含 RPMI 培地で 30 分間、37 で培養した。

マウス中皮腫モデル治療実験として、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 MSTO211H (2 x 10⁶ 個) を CB-17/SCID マウスの壁側胸膜内へ接種して作製したヒト悪性胸膜中皮腫担癌マウスに対し、接種後 9 日目に HVJ-E の腫瘍内投与ならびに抗癌剤シスプラチンの投与を行った。また、その 7 日後より HVJ-E の皮下投与を 2 週毎に行い、マウスの生存率を検討した。

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換

え DNA の実験については、組換え DNA 実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換え DNA 実験指針に従って行った。

2) 安全性試験

HVJ-E の一般的な毒性試験はすでに終了している (表 1)。今回は MPM の医師主導治験における胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するための試験として、トキシコキネティクス試験 (TK 試験) を実施するために必要な測定法のバリデーション試験を実施した。ガイドラインを参考にして、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目について予備検討試験を実施し、その結果から採用基準の範囲を設定した。各項目について、予備試験の結果から設定した内容に従ってバリデーション試験を実施し、設定した試験法が定量試験として妥当であることを確認した。

HVJ-E の MPM 腫瘍内への投与の安全性を検討するために、ポリアクリルアミド・ゲルへの Evans Blue 色素を注入し、腫瘍内注入擬似実験を行った。

がんの上皮間葉移行 Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) を調べるため、肺癌細胞株 A549 とヒト線維芽細胞株を用いて、培養下に各種の細胞表面分子とサイトカインの産生を測定し、細胞表面の E-cadherin、N-cadherin、Vimentin を用いて、EMT の有無を定量的に評価した。

3. 治験薬 GMP 製造

臨床用の HVJ-E 製剤は、ジェノミディア社において製法が確立され、GMP 製造が可能になっている。ジェノミディア社は HVJ のヒト培養細胞での大量生産に成功し、4 種類のカラムを用いた HVJ-E 精製法を確立した。さらにそれを凍結乾燥製剤として冷蔵であれば 29 カ月以上安定に性能を維持できることが保証されている (図 4)。今回の医師主導治験の実施に必要な治験薬を十分な本

数確保するために、治験薬の製造計画を策定した。先ず、策定中の治験実施計画書の内容を精査し、治験を速やかに進めるために必要な治験薬の必要量について算定を行った。その結果に基づいて、治験開始までに必要な最低の本数、症例数が最大となった際に必要となる本数を求め、治験薬の保存安定期間（21ヶ月～24ヶ月）を考慮して製造計画の策定を行った。平成26年度は、この計画に基づいて、最低限必要な治験薬の本数を製造するために必要な原料（原薬）を治験薬GMP体制化で製造した。第2相治験へ早期に進めために必要な治験薬GMP製造のスケールアップと、その後の医薬品GMP製造へのレベルアップについては、開発の進捗に応じて段階的に進める事が適切であると考えられた。そのため、スケールアップについては現行の5倍のスケールへの移行を、レベルアップについてはバイオ医薬で主流になることが見込まれるシングルユーステクノロジーを利用した製造技術確立を目標にして計画の策定を行った。現行の製造工程の内容を精査し、適切なスケールアップを可能とする仕様の検討を行い、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化（凍結乾燥）工程の仕様・スケールを決定し、計画の骨子を策定した。その内容に従って、平成26年度は攪拌工程と精製工程のスケールアップ検討を開始し、攪拌用のバックと精製用カラムについて、IQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）、及びOQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）までを実施した。

C. 研究成果

1. 医師主導治験の準備と実施

1) プロジェクトの総合推進

平成26年11月8日に全員が参加してキックオフ会議を開催し、医師主導治験を着実に推進するための業務分担と、スケジュールも含めた目標設定の共通認識を確立し、規制当局対応も含めて治験がスムーズに進むような強固な実施体制を構築した。本研究の目標は、現時点ではMTD（maximum tolerated dose）を決定することではなく、安

全性を主要評価項目とし、至適用量を選び、副次項目として有効性の評価を行う方法を選択することとした。

また患者の選定のために、2012年4月より2014年5月までに近畿中央病院胸部疾患センターにおいて定期外来検診を受けている石綿曝露者190例ならびに胸膜中皮腫12例（上皮型4例、肉腫型4例、その他組織型4例）、肺癌14例の血清HMGB1を測定した。胸膜中皮腫、肺癌症例は細胞診・組織診にて診断された症例とした。石綿曝露者での血清中HMGB1は中央値2.2ng/ml（95%CI: 2.2-2.8）であった。肺癌患者と中皮腫患者での血清中HMGB1は中央値6.0ng/ml（95%CI: 4.7-9.0）であり、悪性疾患を併発していない石綿曝露者よりも有意に高いHMGB1値を示した。良性石綿疾患において画像所見、喫煙歴、性別、年齢とHMGB1値との明らかな相関はなかった。

本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫であるため中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。 α_{1D} 受容体の選択的阻害薬であるNaftopidilは、 α_{1D} 受容体阻害作用とは無関係に、TNF-alpha, FasLの発現を増強し、caspase 8を介してcaspase 3を活性化させて中皮腫細胞にアポトーシスを起こすことが明らかになった。また、 A_3 アデノシン受容体を介する中皮腫細胞のアポトーシス誘導による抗中皮腫活性は、臨床応用に十分に期待が持たれる成績であったので、アデノシン・デアミナーゼ阻害剤EHNAによる効果を確認したところ、細胞内のアデノシンの増加等により、中皮腫細胞のアポトーシスの促進、増殖抑制が確認された。中皮腫に対する二次治療法に関しては、創薬研

究で既に合成した Naftopidil analogue が抗中皮腫活性を有することが明らかになった。

2) 治験実施計画書、同意説明文書、その他の治験関連書類の作成

支援する体制として、一部の業務については医師主導治験の支援経験のある国内の CRO を選定し、医師主導治験体制を構築した。また、現状で医師主導治験の準備に必要な SOP5 つを整備し、治験実施計画書案、治験薬概要書案を作成した。

3) PMDA 相談

速やかに治験届を提出して治験開始ができるように、薬事戦略相談を通じて PMDA との事前相談の機会を折に触れて設けた。具体的には、1 回目を平成 26 年 7 月 9 日に行い、用法用量設定、腫瘍内投与方法などについて相談し、呼吸器系への影響についてモニタリングを行うことを奨められた。次回は 2014 年 3 月中に行う予定である。

2. 毒性、薬効検証のための非臨床試験

1) 薬効・薬理試験

MPM 細胞の HVJ 受容体である酸性ガングリオシドを HPLC で解析した。HVJ 受容体である GD1a, SPG の総酸性ガングリオシドに占める割合は、METO-H211; 3.3%, EHMES; 15.5%, MESO-1; 10.7%, MESO-4; 6.7%, H2452; 40.9%, Met5A; 10.2% であった。他の腫瘍細胞と大きな違いはなかった。ちなみにマウス MPM 細胞の AB22G2 は 0% であった。PKH26 標識した HVJ-E を MPM 細胞の中で最も受容体の発現の低い METO-H211 に作用させると、前立腺癌細胞の DU145 と同様な染色パターンが得られ、同じような HVJ-E との親和性が示された。そこで HVJ-E を各 MPM 細胞に作用させ、生存率を MTS assay により測定した。どの

ヒト MPM 細胞もヒト前立腺癌細胞 PC3 と同じような細胞死が誘導され、生存率の低下がひきこされた。また正常の Met-5A は受容体があるにもかかわらず、細胞死誘導は起こらなかった。なお受容体のないマウス MPM 細胞の AB22G2 は全く影響を受けなかった。非臨床試験において悪性胸膜中皮腫 (MPM) は HVJ-E に対する高い感受性を有しており、MPM 担癌マウスへの治療実験において高い抗腫瘍効果が認められた (平均生存日数 39.5 日 vs コントロール群 27 日)。さらに、臨床で投与されている抗癌剤 シスプラチン (5 mg/kg) 単回投与に HVJ-E 治療を上乗せした治療群では、シスプラチン単回投与群よりも有意な生存期間の延長を認め、HVJ-E とシスプラチンとの併用による相乗効果を認めた (平均 57 日以上 vs 42.6 日)。

治療が難しい MPM の 1 つである二相型の EHMES に HVJ-E を作用させた時の、遺伝子発現パターンを定量 PCR によって解析した。すでに報告しているように HVJ-E による腫瘍細胞選択的なアポトーシスの経路は、RIG-I, MAVS によるシグナル伝達である (Clinical Cancer Res. 2012)。RIG-I は Type I, II の IFN による誘導が知られている。RIG-I は U251, PC3, DU145, PNT2 (正常前立腺上皮細胞株) で誘導されるが、EHMES ではほとんど誘導されなかった。MAVS の発現誘導はどの細胞においてもほとんど認められなかった。また HVJ ゲノムを認識しない RNA 受容体の MDA5 は、どの細胞においても HVJ-E の刺激でやや上昇した。細胞死に関連する TRAIL, Noxa および IFN- β の発現をみると、EHMES では他の腫瘍細胞と同じく HVJ-E による Noxa の発現誘導がお

こったが、TRAIL の発現は 2 倍程度しか誘導されなかった。また IFN- β は他の細胞とは異なり、全く誘導が見られなかった。そこで RIG-I, MAVS の siRNA を用いて TRAIL, Noxa の遺伝子発現を調べると、RIG-I (3 種類の siRNA はすべて抑制可能), MAVS (siMAVS-1 のみ抑制に成功) を抑制した状態であるにもかかわらず、TRAIL, Noxa とともに HVJ-E による発現誘導は抑制されなかった。そこでアポトーシスの阻害剤として Pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk を用いて、HVJ-E による細胞死への影響を見たところ、z-VAD-fmk では抑制が全く見られなかった。

HVJ-E の抗腫瘍免疫活性化作用におけるマクロファージの関与を検証した。骨髄由来 M2 マクロファージに HVJ-E を投与した時の遺伝子発現の変化を mRNA 及びタンパク質レベルで検討した。その結果、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による IL-6、NOS2、TNF- α の発現上昇と Arg1、Fizz1、Ym1 の発現低下がリアルタイム RT-PCR によって確認された。また HVJ-E 刺激による NOS2 発現増加と Ym1 発現減少がウエスタンブロットによって確認され、IL-6、TNF- α 、NO の分泌促進が ELISA 及び NO 測定によって確認された。さらに、データは示さないが、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激によって、NOS2+ 細胞が約 10 倍に増加することが FACS によって明らかになった。これらの結果から、HVJ-E 刺激によってマウス骨髄由来 M2 マクロファージが M2 表現型から M1 表現型にシフトしたことが明らかとなり、HVJ-E が M2 から M1 への再分極誘導能を有することが示唆された。HVJ-E 刺激による M2

マクロファージの M1 分極誘導において RIG-I が関与するか検討した。HVJ-E 刺激 M2 マクロファージにおける RIG-I 発現の変化をウエスタンブロットにより検討した結果、HVJ-E 刺激によって RIG-I 発現を増加させることが確認された。また、RIG-I をノックダウンすることで M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による NOS2 発現上昇と Ym1 発現低下が抑制された。

一般的に、マクロファージの活性化には NF- κ B が重要であり、M1 マクロファージへの分極には NF- κ B の p65/p50 複合体が核内へ移行するのに対して、M2 マクロファージへの分極には NF- κ B の p50/p50 複合体が核内へ移行することが知られている。そこで HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極化において、NF- κ B p65/p50 の活性化が関与しているのかを検討した。まず M2 マクロファージの HVJ-E 刺激により濃度依存的に NF- κ B p65 の核内移行が促進することが確認したので、次に、NF- κ B p65 阻害剤 (JSH-23) によって HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極が抑制されるかを検討したところ、M2 マーカー遺伝子 (Arg1、Fizz1、Ym1) 発現には変化がなかったが、NOS2、IL-6、TNF- α といった M1 マーカー遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極には NF- κ B p65 の活性化が関与することが考えられる。

次に HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージが T 細胞を活性化するかどうかを調べるために、HVJ-E 刺激マクロファージと脾臓 T 細胞を共培養した。共培養 48 時間後に浮遊している T 細胞を回収し、リアルタイム

△ RT-PCR で T 細胞活性化に関する遺伝子発現を調査した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージとの共培養群では活性化 Th1 マーカーである STAT1 と活性化 CD8⁺ T 細胞マーカーであるグランザイム A、B の発現上昇が確認された。また、同様に処理した T 細胞における初期活性化リンパ球マーカーである CD69 の発現を FACS により解析した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージにおいて CD69⁺ T 細胞集団が約 2 倍増加していることも明らかとなった。これらの結果は HVJ-E 刺激 M2 マクロファージが脾臓 T 細胞を活性化し、Th1 反応を増強することを示唆している。

2. 安全性試験

医師主導治験で計画している胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するため、トキシコキネティクス試験 (TK 試験) として実施予定の試験法の妥当性についてバリデーション試験を行った。バリデーション試験における規定値の範囲を設定するために予備試験を実施し、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目の、それぞれについて妥当性を確認するための範囲を規定した。その結果に基づいて、バリデーション試験を実施した結果、いずれの評価項目についても設定した規格値の範囲内となる事が明らかとなり、確立した試験法が、定量試験として妥当である事が確認された。

空気圧式製剤注入器を用い、Evans Blue 色素を 20~30%ポリアクリルアミド・ゲルへ注入すると、ゲルの硬度が触診上で硬い場合でも (硬度計表示上 4~5)、0.5~1 mL の色素を刺入部から逆流することなく、注入することが出来た。

HVJ-E は樹状細胞やマクロファージからサイトカインを分泌させるので、特に炎症性のサイトカイン IL-6 に注目して肺癌細胞株 A549 の上皮間葉移行 Epithelial Mesenchymal

Transition (EMT) を検証した。A549 細胞を TGFβ と IL-6 とともに培養すると、EMT の誘導が促進された。ヒト線維芽細胞も TGFβ と IL-6 により活性化され、EGF、TGFβ、IL-6、VEGF の産生が増加した。線維芽細胞の培養上清により A549 肺癌細胞の EMT が促進された。次に、抗線維化作用を有すると言われているピルフェニドン (ピレスパ) が CAF の機能を抑制するかどうかを検証したところ、ピルフェニドンにより線維芽細胞からの Type I コラーゲンと IL-6 の産生が抑制された。

3. 治験薬 GMP 製造

本研究で計画している胸膜悪性中皮腫を対象とする医師主導治験の実施に必要な治験薬の本数を算出した。策定中の実施計画書の内容から、症例あたりに必要な本数を算出し、症例数の最小 (各用量 3 例、計 6 例) と最大 (各用量 6 例、計 12 例) から、最小と最大の本数の見込みを求めた結果、最小で 222 本、最大で 444 本。現行の治験薬製造では、1 バッチあたりの最大製造本数は 222 本であるため、本治験の実施には最小と最大で、それぞれ治験薬を 1 バッチと 2 バッチ分製造する必要がある事が明らかとなった。現行で治験薬を製造するための原料 (原薬) は、治験薬 1 バッチあたり 4 バッチ~5 バッチ程度必要であるため、目的とする治験薬製造を達成するには、原薬製造を最小と最大で、それぞれ 5 バッチと 10 バッチ分の製造が必要である事が明らかとなった。

治験の開始を早期に実現するためには、最低限必要な本数である 222 本の治験薬を早期に製造できるよう、原料である原薬の製造を進めておく必要があるため、平成 26 年度は製剤 1 バッチ分の製造に必要な原薬について 5 バッチ分の製造を行った。治験薬 GMP 体制下で製造を完了した原薬について、規格値に適合するかどうかを確認するために品質管理試験を実施した結果、設定した規格の範囲内である事が明らかとなり、目

的とする治験薬の製造用原料までの製造を完了した。これまでに実施した長期安定性試験の結果から、治験薬の保存安定性が21ヶ月から24ヶ月であるため、今後治験準備の進捗状況を考慮して治験薬の製造と、追加5バッチ分の原薬製造を進める計画である。

次に第2相治験へ早期に進めために必要である、製造スケールの拡大と、医薬品GMP製造への移行に必要なレベルアップについて研究開発を実施した。現行では10Lスケールでの治験薬の製造を実施しているが、第2相では目標症例数が30例から50例程度になると予測されるため、計画している医師主導治験（目標症例数6例から12例）に対して4倍から5倍量の治験薬が必要になると予測された。そのため、現行の5倍スケール（50L）への拡大を目標としてスケールアップの検討を実施した。現行のスケールの製造工程との同等性の確保と、将来医薬品GMPへのレベルアップを想定して、スケールアップの方向性を検討した。医薬レベルのHVJ-Eの製造工程は、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化工程の4種類に分類される。培養工程と攪拌工程については、今後のバイオ医薬で主流になると考えられるシングルユーステクノロジーを採用し、スケールを5倍の範囲（10Lから50L）で適宜設定できる仕様で進める事とした。精製工程についてはカラム高を一定にしてカラム径の拡大で対応することとし、医薬品レベルへの移行を考慮して、カラムと樹脂の選択を行う事とした。製剤化工程については精製工程までの確立を達成した時点で件津を進める事とした。平成26年度は、攪拌工程と精製工程のスケールアップを実施した。攪拌工程については、樹脂性のバックに目的の溶液を充填して攪拌した際の温度分布と均一性を、精製工程については精製用樹脂を充填したカラムの理論段数を、それぞれ指標としてIQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）及びOQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）を実施した結果、いずれの指標についても目標とする規定値の範囲内である事が明らかとなり、スケールアップの妥当性が検証された。

D. 考察

PMDA との薬事戦略相談の内容により、スケジュールの変更がある可能性は否定できないが、現状スケジュールどおり準備が進んでいる。マウス中皮腫モデル治療実験において、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果を認めた。今後ペメトレキセドとシスプラチンを用いた抗癌剤治療にHVJ-E を併用した治療実験を行う予定である。

HMGB1 は敗血症性ショック、膠原病、DIC等の炎症性疾患で上昇する事が報告されている。また悪性黒色腫、結腸癌、乳癌といった悪性疾患での HMGB1 値の上昇も報告されており悪性疾患においてもバイオマーカーとしての役割が期待される。今回の検討でも石綿曝露者と比較して悪性疾患症例（肺癌・胸膜中皮腫）では血清 HMGB1 は有意に高い HMGB1 値を示しており、石綿曝露者において悪性疾患の早期発見に HMGB1 測定が有用である可能性が考えられた。今後 HMGB1 と悪性胸膜中皮腫の病勢との関連ならびに実施計画書への反映を検討する予定である。

本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン + ペメトレキセ併用療法（CDDP/PEM）であるが、Naftopidil や EHNA は二次療法になりうるため、患者の選定の際に注意が必要である。HVJ-E による MPM 細胞死誘導に関しては、従来の経路とは異なるメカニズムが示唆される。HVJ-E により MPM 細胞においても腫瘍細胞選択的な細胞死がおこり、Noxa の転写が増強された。しかし RIG-I, MAVS の siRNA では Noxa の転写活性化は抑制されなかった。pan-caspase inhibitor の z-VAD-fmk

でも抑制されずアポトーシスの可能性は低くなった。今後さらに詳細な検証を他の中皮腫細胞も含めて行うことが必要である。顕微鏡下では、EHMES は HVJ-E により細胞の断片化が明瞭には観察できておらず、融合したような大きな細胞がそのまま浮き上がって死滅するような像が観察されている。我々は既に、Caspase 8 欠損の神経芽腫細胞において HVJ-E による細胞死がおこるが、それはアポトーシスではなくプログラム化されたネクローシス(ネクロトーシス)であることを報告している (Cancer Res. 2014)。そのときには virus RNA や RIG-I, MAVS の関与はなく、膜融合刺激が細胞質の calcium 濃度を高めて CaM-kinase を活性化して RIP-1 の活性化と RIP-1,3 の複合体形成を起こす。同様なメカニズムが MPM 細胞でも機能している可能性がある。しかし Caspase-8 は発現しており、神経芽腫のような Caspase-8 欠損による Rip-1 の活性化ではなさそうである。プログラム化されたネクローシスの阻害剤である Necrostatin の影響、活性酸素の産生の確認などを計画している。

一方、もっと網羅的に細胞死に関与する遺伝子を探索するために、CRISPR/Cas9 系を利用することにした。すでに CRISPR の guide RNA を搭載したレンチウイルスのライブラリーを入手している。これは 1 遺伝子に 6 つの guide RNA sequence を含むもので、Cas9 の発現細胞に、このレンチウイルスを感染させ、HVJ-E による細胞死からまぬがれる細胞を集めて、その guide RNA の配列を高速シーケンサーで解読すれば、標的遺伝子候補が得られるものである。すでに Cas9 を安定に発現する EHMEs 細胞株を

分離した。コントロールとして HVJ-E 高感受性のヒトグリオブラストーマ U251 細胞においても Cas9 発現株を分離した。

HVJ-E の抗腫瘍免疫活性化におけるマクロファージの関与については、従来明らかではなかった。HVJ-E の標的細胞として従来明らかになっていた腫瘍細胞と樹状細胞以外にマクロファージに注目したのは、メラノーマ患者の組織で HVJ-E 投与後にマクロファージの集積が顕著であることが 1 つである。その他に、ラットの皮下に HVJ-E を投与後の virus RNA の局在を検証した結果にもよっている。その場合、virus RNA は投与部位では 24 時間で消失するが所属リンパ節で 1 週間は安定に存在していた。これはコロイド粒子の皮下投与後と同じタイムコースであり、貪食細胞にトラップされて移動したことを示唆している。予想通り、HVJ-E によりマクロファージは M2 から M1 に分極し、これが T cell の腫瘍細胞の攻撃力を高める結果となった。今回は正常マウスから採取したマクロファージであるので、次は腫瘍関連マクロファージにも HVJ-E が作用して M1 に分極できるかどうかを検証する必要がある。またクロドネート含有リボソームを投与して腫瘍内のマクロファージを除去した時に、HVJ-E の抗腫瘍効果がどのように影響を受けるかを調べることが重要である。従来の報告では、腫瘍関連マクロファージを除去すると抗腫瘍効果が増強され、腫瘍が抑制される。しかし HVJ-E を用いた時の抗腫瘍効果は、マクロファージ除去により元弱されるのではないかと予想される。いずれにしても極めて重要な実験であると認識している。

一般的に、M1 マクロファージへの分極には

NF- κ B p65/p50 がマスターレギュレーターとして機能していることが知られ、HVJ-E の M2 マクロファージ刺激による M1 分極誘導においても NF- κ B p65 の活性化が重要な役割を果たすことが確認された。しかし、NF- κ B p65 阻害剤投与によって、HVJ-E 刺激による M1 マーカー遺伝子 (IL-6、TNF- α 、NOS2) の発現亢進は抑制されたが、M2 マーカー遺伝子 (Arg1、Fizz1、Ym1) の発現抑制を解除することはなかった。この結果は、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50 活性化だけでなく別のシグナルも寄与していることを示唆している。HVJ-E は RIG-I の活性化によって M2 マクロファージの M1 分極を誘導することが示されたが、RIG-I 活性化のシグナルは TRAF6 を介した NF- κ B 経路と TRAF3 を介した 1 型インターフェロン経路を活性化することが報告されている。実際に、HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージ刺激では NF- κ B 経路非依存的な IFN- β 発現増加が確認された。1 型インターフェロン経路もまた M1 分極に関与するという報告があることから、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50 活性化だけでなく 1 型インターフェロン刺激も寄与している可能性がある。

我々はすでに HVJ-E の F 蛋白質がマクロファージの膜蛋白質に作用して NF- κ B のシグナルを活性化して IL-18 の転写を増強するという結果を得ている。このことからマクロファージの膜表面に F 受容体があることが示唆されるが、今まで報告がない。F 蛋白質とマウスマクロファージ細胞株である P388D1(この細胞においても HVJ-E により

IL-18 の転写が活性化される)の膜分画を作用させて、免疫沈降させた中から、複数の受容体候補が見つかり、今後さらに解析を進める予定である。このレセプターを介したマクロファージの形質転換の可能性も十分あると考えられ、それを解明することは、抗腫瘍免疫の活性化機構に全く新しい知見を提供できるであろう。

MPM 組織に類似したゲルへの注入実験で 1 ml は逆流なしで注入できることは、HVJ-E は少なくとも 10000 mNAU (臨床研究で用いられた最大量) は投与できる。

肺癌細胞を用いた実験で、IL-6 が EMT を誘導する可能性があることが示されている。しかし IL-6 は制御性 T 細胞の機能抑制にも必要であるので必須のサイトカインと考えている。臨床研究では、血中 IL-6 値は上昇せず、かつ、HVJ-E 投与部位のメラノーマ組織で腫瘍の消失はあったが、腫瘍細胞が拡散した形跡は認められなかった。MPM でも投与後の腫瘍の状態を画像検査で把握する必要がある。

E 結論

純国産の革新的な癌治療薬である HVJ-E の悪性胸膜中皮腫患者を対象とした医師主導治験のための支援業務ならびに非臨床試験を行い、順調に準備が進行している。

血清 HMGB1 値は石綿曝露者と比較して肺癌や胸膜中皮腫症例で高値を示しており悪性疾患発症のバイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。悪性胸膜中皮腫に対する現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペメトレキセ併用療法 (CDDP/PEM) であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する場合がある。

ヒト MPM 細胞は HVJ に親和性が高く、HVJ-E により細胞死が誘導される。しかしその経路は従来の RIG-I/MAVS 経路とは異なる可能性がある。一方、HVJ-E による抗腫瘍免疫の活性化、特に CTL 活性の増強にはマクロファージが大きく関与している可能性があり、そのシグナル伝達経路として、RIG-I を刺激する経路と、それとは別に NF- κ B の活性化を介する経路があることが示唆された。

F. 健康危険情報
特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a. Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. *Eur J Cardiothorac Surg.* 45(2):256-261, 2014.
2. Multimodality treatment for advanced thymic carcinoma: outcomes of induction therapy followed by surgical resection in 16 cases at a single institution. Shintani Y, Inoue M, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* in press.
3. Impact of cardiopulmonary complications of lung cancer surgery on long-term outcomes. Nojiri T, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Shintani Y, Sawabata N,

Hamasaki T, Okumura M. *Surg Today.* in press.

4. Surgery for pulmonary malignancies in patients with a previous history of head and neck squamous cell carcinoma. Kanzaki R, Inoue M, Minami M, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Kogo M, Yura Y, Inohara H, Sawabata N, Okumura M. *Surg Today.* 44:2243-2248, 2014.

2. 学会発表

- 1 Molecular Medicine Tri-Conference (Cancer Immuno -therapy 2015) Lee CM, Saito A, Tanemura A, Nonomura N, Kaneda Y. “Toward a clinical application of pseudovirion to cancer therapy. Novel therapy of hemagglutinating virus of Japan Envelope (HVJ-E) for intractable cancer” ポスター発表、サンフランシスコ, Feb.19-20th, 2015.
2. 第 11 回日本中性子捕捉療法学会 教育講演 Kaneda, Y. “ウイルスに学ぶ癌治療戦略”2014/7/6 大阪
3. 第 20 回日本遺伝子治療学会 理事長講演 Kaneda, Y. “Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients “ 2014/8/7 東京
4. 第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演 Kaneda, Y. “Virus-mediated cancer treatment ~from basic to clinic~” 2014/10/11 Osong (Korea)
5. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 Shinji Atagi, et al. “Gefitinib/chemotherapy vs chemotherapy in EGFR mutation-positive NSCLC after progression on first-line gefitinib : the

Phase , randomised IMPRESS study”

2014.11 (国内)

6. 第 55 回日本肺癌学会学術集会 安宅 信

二、他”EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の 1
次治療として erlotinib+bevacizumab を評価
するランダム化第 相試験 : JO25567”

2014.11 (国内)

H. 知的財産権の出願・登録状況

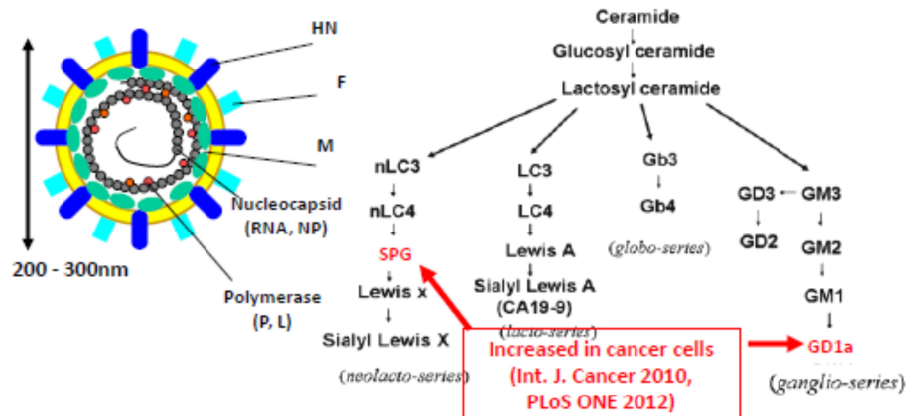
平成 26 年度に出願した新たな特許出願や
実用新案登録はなし。

関連特許としては、今年度は前立腺癌の予
防・治療剤の特許が欧州において登録され
た (EPU2345415)。

HVJ-E の基本特許、用途特許、製造特許は
表 2 ~ 4 のように存在する。基本特許と用
途特許はすべて研究代表者の金田が発明者
であり、製造特許はジェノメディア社が発
明者である。すべてジェノメディア社が出
願人となっており権利を有している。

総括報告書 図1

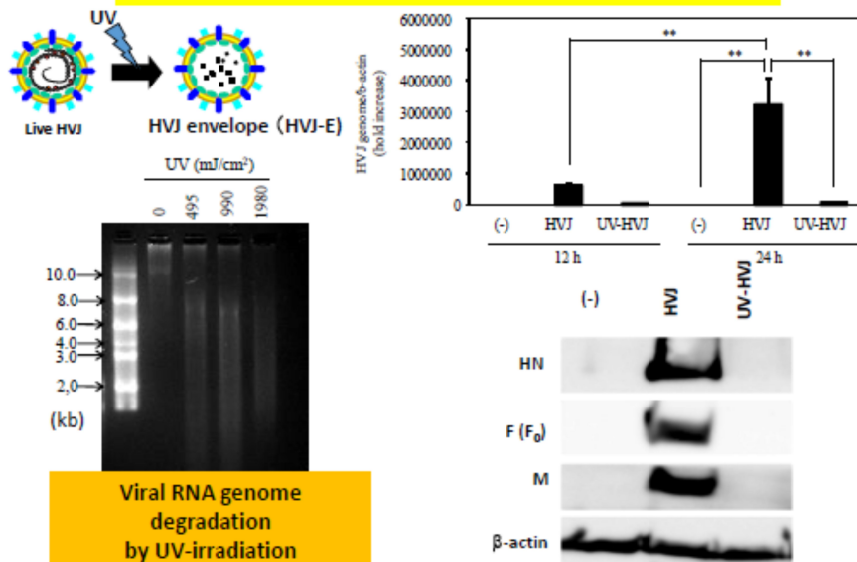
HVJ (Hemagglutinating Virus of Japan; Sendai virus)



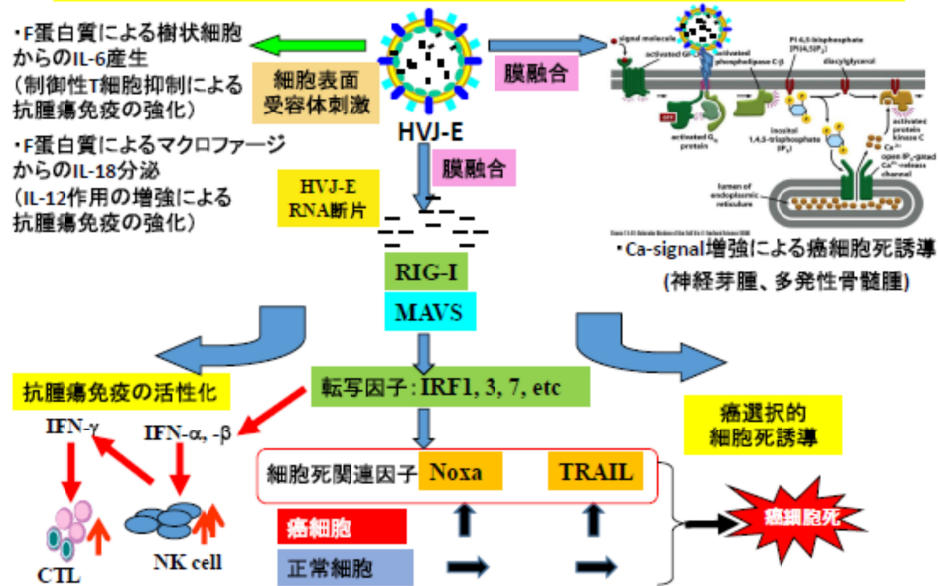
1. Isolation in Japan in 1950's
2. Mouse parainfluenza virus, not human pathogen
3. Binding to glycoproteins and glycolipids containing sialic acid
4. Membrane fusion activity
5. Production of abundant viral proteins from RNA genome

総括報告書 図2

紫外線照射されたHVJ(HVJ-E) は完全に不活性化されている



総括報告書 図3 HVJ-Eは作用の異なる複数の分子標的治療薬としての機能を有する



総括報告書 図4

臨床用HVJ-Eの製造

大阪大学C-1



- 従来、有精鶏卵で産生していたHVJを、無血清培地を用いてヒト培養細胞で産生できるシステムを開発した。
- HVJを不活性化し3段階のカラム精製を施行して直径220 nmの均一なHVJ-Eの産生に成功。
- 臨床用製剤として凍結乾燥製剤を作成した。工程はすべて無菌状態。
- 不純物含量はバイオ医薬のガイドラインに準拠して設定した規格値以下。
- 培養規格については、性状、定量試験、特有試験(生物活性)、エンドキシン等で設定。

治験薬GMP製造体制の状況

- 安定性試験
 - 苛酷試験 (1ヶ月、4度 +35 度)、加速試験 (6ヶ月、4度 +25 度)、長期安定性試験 (4度 +25 度)
 - 結果: 苛酷試験、加速試験では安定であった。長期安定性試験で25度で6ヶ月、4度で29ヶ月安定
 - 有効期限: 現時点で29ヶ月で設定、保存条件は冷蔵 (2度~8度) とした
- 製造設備・施設
 - 治験薬GMP製造体制に準拠した製造を実施、臨床試験用の製造原料として4バッチの出荷実績
 - 無菌注射剤の凍結乾燥製剤を治験薬GMP製造できる設備・施設を国内(大阪)に確保

総括報告書 表1

動物でのGLP安全性試験に関する進捗

試験項目	動物種	経路	投与期間	目的	試験グレード、備考
単回投与毒性	ラット	静脈内	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	ラット	皮下	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	ラット	皮下	単回	中用量	GLP、安全性基準(中枢神経系)前込
	カニクイザル	静脈内	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	カニクイザル	皮下	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	カニクイザル	皮下	単回	中用量	GLP
反復投与毒性	ラット	静脈内	7日間反復	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	ラット	皮下	2週間間歇	中用量	GLP、TK、抗体産生測定前込
	カニクイザル	皮下	2週間間歇	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	カニクイザル	皮下	2週間間歇	中用量	GLP
馬所創薬性試験	カニクイザル	皮下	2週間間歇	中用量	GLP
TK	ラット	皮下	2週間間歇	中用量	GLP(ラット反復皮下投与毒性試験前込)
遺伝毒性(小核試験)	ラット	皮下	単回	中用量	GLP試験
免疫毒性(抗体産生)	ラット	皮下	2週間間歇	中用量	GLP試験
免疫毒性(サイトカイン)	カニクイザル	皮下	2週間間歇	参考	GLP試験で調製した血清使用
免疫毒性(神経細胞活性)	マウス	皮下	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
安全性薬理試験(コアバッテリー)	ラット 中枢神経系	皮下	単回	中用量	GLP(ラット単回皮下投与毒性試験前込)
	ラット呼吸器系	皮下	単回	中用量	GLP
	サル 心血管系	皮下	単回	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	サル 心血管系	皮下	単回	中用量	GLP
生殖発生毒性予備試験	ラット(妊娠)	皮下	妊娠期間に間歇	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	ウサギ(妊娠)	皮下	間歇	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合
	ウサギ(妊娠)	皮下	妊娠期間に間歇	用量設定	GLP試験施設で実施、信頼性基準適合

総括報告書 表2. 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	登録	
			特許4219957	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			前立腺癌の治療・予防剤	特許5547640	登録
5	製造特許	単離されたヒト細胞、その取得方法及び用途	特許5134964	登録	
6			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
7	高機能化	高機能化HVJ-E	特許5666110	登録	

総括報告書表3. 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	高機能化+薬効向上	高機能化HVJ-E	特願2009-201114	出願中
2				IL-2含有HVJ-Eベクター及びそれを含む脳腫瘍治療剤

総括報告書 表4. 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	登録
			DE60131498	登録
			US 6913923	登録
			US 7279333	登録
			US 7803621	登録
			CN01800567.5	登録
			CN200410100219.5	登録
			CA2369491	登録
			AU769385	登録
			1303663	登録
			KR 10-0776475	登録
KR 10-0847385	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	用途特許	前立腺癌の治療・予防剤	US8691212	登録
			EPU2345415	登録
5	用途特許	改変パラミクソウイルスおよびその作製方法	US7858356	登録
6	製造特許	ヒト細胞、その取得方法及び用途	US8012749	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)
			EP1950285	

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業） 委託業務成果報告

医師主導治験の準備と実施 a. プロジェクトの総合推進

担当責任者：金田安史（大阪大学大学院医学系研究科 遺伝子治療学分野 教授）
奥村明之進（大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器外科 教授）
中野孝司（兵庫医科大学呼吸器内科 教授）
安宅信二（国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター 肺腫瘍内科 肺癌研究部長）

研究要旨

医師主導治験推進のために、キックオフミーティングを開催（H26年11月8日）、悪性胸膜中皮腫の病態と標準的治療等の現況、治験届までの業務分担ならびに工程を確認した。患者の選定のために、悪性胸膜中皮腫の悪性度と血中HMGB1濃度の相関を見出した。この悪性度には、腫瘍間質組織からのIL-6やTGF- β の関与が示唆された。本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫であるため中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

A. 研究目的

本研究で化学療法抵抗性になった癌に対する不活性化センダイウイルス粒子 HVJ envelope (HVJ-E)の有効性を実証するため、化学療法抵抗性 MPM に対する医師主導治験（第I相）を実施し、オーファン申請後に第II相治験で国内承認を取得する。そのために悪性胸膜中皮腫の病態把握、患者の選定、各種薬剤の効果について検討する。

B. 研究方法

平成26年11月8日に全員が参加してキックオフ会議を開催した。

患者の選定のために、中皮腫や肺癌を発症していない石綿暴露者ならびに肺癌、胸膜中皮腫患者で HMGB1 を測定した。6ml の採血を行い 2400G、6 分間遠心処理を行い

ELISA(HMGB1 ELISA Kit [®],シノテスト株式会社)にて血清中の HMGB1 を測定した。石綿曝露症例はその画像所見を胸膜プラーク、胸膜肥厚、線状・網状影、粒状影、胸水、すりガラス影、牽引性気管支拡張、蜂巣肺に大別しその有無、血清 HMGB1 値との相関を検討した。なおこの研究は国立病院機構近畿中央胸部疾患センターの臨床試験審査委員会にて承認を受けたのち開始されている。また、本研究について本人に十分な説明を行い同意文書への署名を確認後、採血を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は院内の臨床試験審査委員会にて承認を受けたのち開始となっている。また、本研究について本人に十分な説明を行い同意文書への署名を確認後、採血を行った。

本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペメトレキセ併用療法（CDDP/PEM）であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する場合がある。中皮腫細胞に対する各種薬剤の効果を検証した。

C. 研究成果

1. キックオフ会議

平成 26 年 11 月 8 日午後 1 時 30 分より大阪大学医学系研究科基礎研究棟 10 階セミナー室で全員が参加して約 3 時間、会議を行った。金田より HVJ-E の抗腫瘍効果と安全性試験の現況、中野より悪性胸膜中皮腫の病態と治療の現状、李より治験薬 GMP 製剤の製造状況について、説明があり質疑応答を行った。現在では治療法がないが、HVJ-E の抗腫瘍効果が期待できること、難治性があるために既存の化学療法後は、HVJ-E の選択が可能であること、参画機関からの適応患者の紹介を行うことを確認した。

2. 中皮腫化学療法の治療抵抗性獲得の解明と二次治療法の開発

^{1D} 受容体の選択的阻害薬である Naftopidil は、^{1D} 受容体阻害作用とは無関係に、TNF-alpha, FasL の発現を増強し、caspase 8 を介して caspase 3 を活性化させて中皮腫細胞にアポトーシスを起こすことが明らかになった。^{A3} アデノシン受容体を介する中皮腫細胞のアポトーシス誘導による抗中皮腫活性は、臨床応用に十分に期待が持たれる成績であったので、アデノシン・デアミナーゼ阻害剤 EHNA による効果

を確認したところ、細胞内のアデノシンの増加等により、中皮腫細胞のアポトーシスの促進、増殖抑制が確認された。誘導されるアポトーシスの経路は、アデノシンが細胞内に取り込まれる内在性経路と受容体を介する外在性経路に分類されるが、アデノシン受容体の中では特に ^{A3} 受容体が中皮腫細胞のアポトーシス誘導には重要であった。中皮腫に対する二次治療法に関しては、創薬研究で既に合成した Naftopidil analogue が抗中皮腫活性を有することを明らかにした。

3. 胸膜中皮腫における診断マーカーとしての血清 HMGB1 (high-mobility group box 1)

測定意義に関する研究

2012 年 4 月より 2014 年 5 月までに近畿中央胸部疾患センターにおいて定期外来検診を受けている石綿曝露者 190 例ならびに胸膜中皮腫 12 例(上皮型 4 例、肉腫型 4 例、その他組織型 4 例)、肺癌 14 例の血清 HMGB1 を測定した。胸膜中皮腫、肺癌症例は細胞診・組織診にて診断された症例とした。石綿曝露者での血清中 HMGB1 は中央値 2.2ng/ml(95%CI: 2.2-2.8)であった。肺癌患者と中皮腫患者での血清中 HMGB1 は中央値 6.0ng/ml (95%CI: 4.7-9.0)であり、悪性疾患を併発していない石綿曝露者よりも有意に高い HMGB1 値を示した。良性石綿疾患において画像所見、喫煙歴、性別、年齢と HMGB1 値との明らかな相関はなかった。

4. 胸膜中皮腫・肺癌などの胸部悪性腫瘍の悪性度上昇に関わる分子の検討

(1) 肺癌細胞における EMT と IL-6 の役割

肺癌細胞株 A549 は TGF β により EMT が誘導され、IL-6 を追加することにより N-cadherin と Vimentin の発現が増加した。すなわち、IL-6 は EMT 誘導を促進することが示された。(図 1)

(2) ヒト線維芽細胞の活性

ヒト線維芽細胞は TGF β により活性化され、EGF、TGF β 、VEGF、IL-6 を産生する。IL-6 の添加は、これらのサイトカインの産生をさらに増加させることが示された。(図 2)

(3) ヒト線維芽細胞の培養上清による EMT

ヒト線維芽細胞培養上清で A549 を培養すると、E-cadherin の減少、N-cadherin の増加、Vimentin の増加が著明であり、EMT が強く誘導された。さらに、ヒト線維芽細胞培養上清に IL-6 中和抗体を加えると、EMT 誘導は減弱された。(図 3)

(4) ピルフェニドンによるヒト線維芽細胞の抑制

ヒト線維芽細胞は TGF β で活性化され、ACTA2 と α 1 型コラーゲンの遺伝子発現が upregulate されるが、ピルフェニドンの投与によりこれらの発現が減弱した。すなわち、ピルフェニドンは線維芽細胞の活性化を抑制することが示唆された。(図 4)

D. 考察

1. キックオフ会議での議論から HVJ-E による悪性胸膜中皮腫の医師主導治験の意義が再確認され、患者のリクルートも十分可能であると考えられる。
2. 本研究の医師主導臨床研究の対象は、化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫である。現在の標準的化学療法はシスプラチン + ペメトレキセ併用療法 (CDDP/PEM) であるが、Naftopidil や EHNA は二次療法になりうる。
3. HMGB1 は敗血症性ショック、膠原病、DIC 等の炎症性疾患で上昇する事が報

告されている。また悪性黒色腫、結腸癌、乳癌といった悪性疾患での HMGB1 値の上昇も報告されており悪性疾患においてもバイオマーカーとしての役割が期待される。今回の検討でも石綿曝露者と比較して悪性疾患症例 (肺癌・胸膜中皮腫) では血清 HMGB1 は有意に高い HMGB1 値を示しており、石綿曝露者において悪性疾患の早期発見に HMGB1 測定が有用である可能性が考えられた。今後 HMGB1 と悪性胸膜中皮腫の病勢との関連ならびに実施計画書への反映を検討する予定である。

4. 今回の研究により、肺癌が EMT を獲得する際に TGF β と IL-6 が関与することが明らかにされた。今回さらに、これらのサイトカインが活性化された線維芽細胞によって供給されることも明らかになった。すなわち図 5 に示すように、癌細胞が産生する TGF β により肺癌組織間質の線維芽細胞が活性化され TGF β と IL-6 が分泌され、これらのサイトカインは肺癌細胞の EMT をさらに促進し、浸潤能と転移能を高度に獲得していくと考えられる。このような癌の悪性化のスパイラルを遮断することが癌の進展を止めるために必要であると考えられる。今回、ピルフェニドンが活性化された線維芽細胞からのサイトカインの産生を減弱することが明らかになった。このような作用を持つ薬剤を発見・開発することが肺癌治療成績の向上につながると期待される。悪性胸膜中皮腫は完全切除が不可能であり、放射線治療を行うには照射範囲が大きく根治的照射は難しく、有効な化学療法も確立されていない。これらの状況下では、悪性胸膜中皮腫の治療には新たな方法論が必要である。

今回の研究では腫瘍間質の繊維芽細胞の制御による EMT の抑制の可能性が示唆された。繊維芽細胞と癌細胞の相互作用には TGF と IL-6 などのサイトカインが関与している。これらのサイトカインの抑制は悪性胸膜中皮腫の治療抵抗性を減弱し、腫瘍の治療の効果を向上させると期待される。今後の研究では、腫瘍細胞への遺伝子導入により、腫瘍細胞と繊維芽細胞からのサイトカインによる相互作用作用を抑制することを明らかにする予定である。遺伝子導入には、当研究グループで既に確立されている HVJ ベクターを用いる。また、悪性胸膜中皮腫の病理組織的診断は通常の病理学的評価では困難なことが多く、特殊な免疫組織染色が必要である。現在、その染色方法の確立しつつある。

E. 結論

HVJ-E による悪性胸膜中皮腫の医師主導治験は十分期待できる。悪性胸膜中皮腫に対する現在の標準的化学療法はシスプラチン+ペメトレキセ併用療法 (CDDP/PEM) であるが、CDDP/PEM に不応であっても、他の化学療法剤が奏効する場合がある。血清 HMGB1 値は石綿曝露者と比較して肺癌や胸膜中皮腫症例で高値を示しており悪性疾患発症のバイオマーカーとして有効である可能性が示唆された。肺癌の EMT には癌細胞と繊維芽細胞の協調関係が関与しており、この関係を遮断する治療方法・薬剤の開発が今後の癌治療に必要である。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a. Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M. Eur J Cardiothorac Surg. 45(2):256-261, 2014.
- 2) Multimodality treatment for advanced thymic carcinoma: outcomes of induction therapy followed by surgical resection in 16 cases at a single institution. Shintani Y, Inoue M, Kawamura T, Funaki S, Minami M, Okumura M. Gen Thorac Cardiovasc Surg. in press.
- 3) Impact of cardiopulmonary complications of lung cancer surgery on long-term outcomes. Nojiri T, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Shintani Y, Sawabata N, Hamasaki T, Okumura M. In press.
- 4) Surgery for pulmonary malignancies in patients with a previous history of head and neck squamous cell carcinoma. Kanzaki R, Inoue M, Minami M, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Kogo M, Yura Y, Inohara H, Sawabata N, Okumura M. Surg Today 44:2243-2248, 2014.
- 5) 中野孝司 ” 転移性肺腫瘍 “ 今日の治療指針 2014 年度版 308-309、2014 .
- 6) 中野孝司、寺田貴晋 ” 中皮腫の治療 “ 縦隔腫瘍・胸膜腫瘍、腫瘍病理鑑別診断アトラス 277-281, 2014.
- 7) 中野孝司、栗林康造、大搦泰一郎 “ 胸膜中皮腫およびその他の胸膜疾患 ” 呼吸器疾患診療最新ガイドライン

271-277, 2014.

- 8) 中野孝司 “ じん肺症 ” 今日の治療指針
2015 年度版 331-332, 2015.

2 . 学会発表

- 1) 第 5 5 回日本肺癌学術集会(京都)

“ 纖維形成型悪性胸膜中皮腫の
FDG-PET 所見の検討 ” 寺田 貴普,
田端 千春, 堀尾 大介, 柴田 英輔,
金村 晋吾, 政近 江利子, 本田 実
紀, 神谷 瞳, 三上 浩司, 野木 佳
孝, 大搦 泰一郎, 栗林 康造, 家城
隆次, 中野 孝司, 近藤 展行, 長谷
川 誠紀, 鳥井 郁子, 辻村 亨, 塚
本 吉胤, 廣田 誠一 2014 年 11 月

- 2) 第 5 5 回日本肺癌学術集会(京都)

“ 悪性胸膜中皮腫における、胸膜切
除・肺剥皮術を施行した症例に対する
術後化学療法の見直し ” 大搦泰一郎, 家
城隆次, 堀尾大介, 金村晋吾, 柴田英
輔, 政近江利子, 神谷瞳, 本田実紀, 三
上浩司, 野木佳孝, 寺田貴普, 栗林康
造, 田端千春, 黒田鮎美, 橋本昌樹, 多
久和輝尚, 松本成司, 近藤展行, 長谷
川誠紀, 中野孝司 2014 年 11 月

- 3) IMIG2014 (Cape town)

“ Postoperative chemotherapy after
pleurectomy/decortication for
malignant pleural mesothelioma ”
Kozo Kuribayashi, Taiichiro Otsuki,
Ryuji Ieki, Koji Mikami, Yoshitaka
Nogi, Takayuki Terada, Chiharu
Tabata, Masaki Hashimoto, Teruhisa
Takuwa,

- 4) Gefitinib/chemotherapy vs
chemo -therapy in EGFR
mutation-positive NSCLC after
progression on first-line gefitinib :
the Phase III, randomised IMPRESS
study Shinji Atagi, Jean-Charles
Soria, Tony SK Mok, Yi-Long Wu,
Sang-We Kim, Jin-Ji Yang,
Myung-Ju Ahn, Jie Wang, Chih-Hsin
Yang, You Lu, Santiago Ponce,
Xiaojin Shi, Alan Webster, Haiyi
Jiang, Kazuhiko Nakagawa
Shinji Atagi, Jean-Charles Soria, Tony SK
Mok, Yi-Long Wu, Sang-We Kim,
Jin-Ji Yang, Myung-Ju Ahn, Jie
Wang, Chih-Hsin Yang, You Lu,
Santiago Ponce, Xiaojin Shi, Alan
Webster, Haiyi Jiang, Kazuhiko
Nakagawa 第 55 回日本肺癌学会学
術集会 2014.11 (国内)

- 5) EGFR 遺伝子変異陽性 NSCLC の 1 次
治療として erlotinib+bevacizumab を評価
するランダム化第 III 相試験 : JO25567
安宅 信二, 瀬戸 貴司, 加藤 晃史, 西
尾 誠人, 後藤 功一, 山本 昇,
岡本 勇, 山中 竹春, 原田 亮介, 福
岡 正博, 山本 信之 第 55 回日本肺癌学
会学術集会 2014.11 (国内)

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。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業） 委託業務成果報告

医師主導治験の準備と実施

- b. 治験実施計画書、同意説明文書、その他の治験関係書類の作成
- c. PMDA相談のための検討会の実施

担当責任者：奥村明之進（大阪大学大学院医学系研究科 呼吸器外科学教授）
新谷歩（大阪大学大学院医学系研究科 臨床統計疫学 寄附講座教授）
中野 孝司（兵庫医科大学呼吸器内科 教授）
安宅 信二（国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター 肺腫瘍内科 肺癌研究部長）
門田嘉久（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター 呼吸器外科部長）
齋藤 充弘（大阪大学大学院医学系研究科 未来細胞医療学講座 特任准教授）

研究要旨

本研究では純国産の革新的な癌治療薬である HVJ-E を用いて、化学療法抵抗性となった悪性胸膜中皮種患者を対象とする医師主導治験を実施し、難治性希少癌に対する革新的がん治療法を実用化することを目的としている。本年度は、医師主導治験の準備及び実施を支援する体制の構築、各種標準業務手順書（SOP）の整備、治験実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の案の作成、医薬品医療機器総合機構（PMDA）との薬事戦略相談（事前面談、対面助言）実施準備、治療の安全性及び有効性を正しく検証するために最良な統計手法及び研究デザインの検証、腫瘍内 HVJ-E 投与擬似実験を行い、医師主導治験実施のための準備を整えた。

A. 研究目的

がん対策推進基本計画（平成 24 年 6 月）では、日本発の革新的な医薬品を創出するため、がん免疫療法のがんワクチンや抗体薬の有用性を踏まえた創薬研究をはじめ、国際基準に準拠した上で、First-in-human 試験、未承認薬などを用いた研究者主導臨床試験を実施するための基盤整備と研究施設内の薬事支援部門の強化を推進するとあり、希少がんについても臨床研究体制の整備が言及されている。大阪大学医学部附属病院（阪大病院）は、日本発の革新的な医薬品、医療機器を更に創出する体制を構築するこ

とを目的とした文部科学省の「橋渡し研究加速ネットワークプログラム」にて橋渡し研究支援拠点、および厚生労働省の「早期・探索的臨床試験拠点整備事業」にて早期・探索的臨床試験拠点に採択されており、基礎研究から実用化まで一貫通の支援を行っている。

阪大病院にて支援している開発の一つ、純国産の革新的な癌治療薬である HVJ-E は、既に進行性悪性黒色腫並びに去勢抵抗性再燃前立腺癌を対象とする臨床研究にて投与された。その結果、HVJ-E の安全性が確認され、有効性を示唆するデータを取得

したことから、国内先行で臨床開発を進めることになり、現在進行性悪性黒色腫患者に対して HVJ-E 投与の医師主導治験を開始し、去勢抵抗性再燃前立腺癌患者においても 2015 年 3 月に治験届を提出する予定となっている。

本研究は化学療法抵抗性となった悪性胸膜中皮種の患者に対し、新規癌治療薬である HVJ-E を用いた医師主導治験実施の準備および支援を行うことで、難治性希少がんに対する革新的がん治療法の実用化を目指すものである。また、国際基準に準拠した上で、未承認薬を用いた医師主導治験を実施するための基盤整備と薬事支援部門の強化が推進され、がん対策推進基本計画への貢献が期待できると考える。

B. 研究方法

阪大病院で実施した進行性悪性黒色腫および去勢抵抗性再燃前立腺癌を対象とした医師主導臨床研究の解析結果や、現在実施中の悪性黒色腫患者を対象とした治験の治験薬概要書等を基に、治験の用法・用量設定や、検査項目等を設定し、治験デザイン（治験実施計画書）を構築する。

作成した治験実施計画書を基に、開発を適切に実施するために医薬品医療機器総合機構（PMDA）の制度である薬事戦略相談（事前面談、対面助言）を利用し、医薬品の開発の方向性について合意を得ながら開発を進める。

これにより、治験及び非臨床試験を適切に実施し、国内では困難とされている革新的な新薬の開発を着実に進め、最終目標である薬事上の承認取得を達成する。

具体的には下記のようなスケジュールで

医師主導治験完了まで進める計画である。

医師主導治験の準備及び実施を支援する体制の構築（平成 26、27 年度）

支援する体制として、一部の業務については開発業務受託機関（CRO）治験薬については治験薬提供者と契約を締結する。

各種標準業務手順書（SOP）の整備（平成 26、27 年度）

医師主導治験の準備及び実施をする上で必要な SOP を作成する。

治験実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の案の作成（平成 26 年度）
医師主導治験を実施するために必要な治験実施計画書、治験薬概要書および同意説明文書の案を作成する。

PMDA との薬事戦略相談（事前面談、対面助言）の実施（平成 26、27 年度）
治験デザインや投与方法、投与デバイスに関する事前面談および対面助言を実施する。

開発の方向性や追加の非臨床試験の必要性等も確認し PMDA からの意見を踏まえ治験のデザインを修正する。

治験審査委員会（IRB）への治験実施申請および承認取得（平成 27 年 8 月）

PMDA との事前面談、対面助言の結果を反映した各種書類を IRB に申請し、承認を得る。IRB からのコメントを反映させて書類を最終化する。

治験計画届書（治験届）の提出（平成 27 年 9 月）

IRB から治験実施の承認を得て、治験届を PMDA へ提出する。30 日調査期間中に照会事項があれば対応し、適宜資料を修正した後、再度 IRB へ変更申請を

実施する。

医師主導治験の実施 (FPI) (平成 27 年 10 月)

医師主導治験が開始となり、被験者の組入れを開始する。

治験終了届書の提出 (平成 28 年 12 月)
最後の被験者が治験を終了 (LPO) した後、治験終了届書を PMDA へ提出する。

治験総括報告書の作成 (平成 29 年 3 月)
固定された治験データを基に解析し、治験総括報告書を作成する。

また症例数の少ない Phase I の治験において、安全性及び有効性を確認するための統計手法を複数の試験デザインを科学性および実施可能性の両面から比較検討する。

腫瘍内 HVJ-E 投与擬似実験

HVJ-E の MPM 腫瘍内への投与の安全性を検討するために、ポリアクリルアミド・ゲルへの Evans Blue 色素を注入し、腫瘍内注入擬似実験を行った。

(倫理面への配慮)

医師主導治験については、GCP ガイドラインに則り計画を遂行する。
本治験は阪大病院の IRB において、本治験実施計画書及び説明文書、その他治験審査委員会が必要とする資料の内容を、倫理的、科学的及び医学的妥当性の観点から、また治験責任 (分担) 医師の適格性等について審査を行い、治験審査委員会が治験の実施を承認した後に実施することとなっている。なお、利益相反に関して、本治験は臨床研究利益相反審査委員会で審査され、利益相

反行為に該当しないとの判定を受けた後に実施される。統計解析用データに個人情報 は含まれない。

C. 研究結果

支援する体制として、一部の業務については医師主導治験の支援経験のある国内の CRO を選定し、医師主導治験体制を構築した。また、現状で医師主導治験の準備に必要な SOP5 つを整備し、治験実施計画書案、(表紙と目次を資料として添付する) および治験薬概要書案 (開示不可能につき添付せず) を作成した。上記資料を用い、平成 27 年 3 月下旬に PMDA と治験デザインや治験薬の投与方法について薬事戦略相談事前面談を実施する予定である。

現時点では MTD (maximum tolerated dose) を決定することを目的とせず安全性を主要評価項目とし、至適用量を選び、副次項目として有効性の評価を行う方法を選択している。

平成 27 年 3 月に第 2 回事前面談を実施、投与用デバイスの仕様確認を中心とした投与方法の相談を行う事とした。治験実施計画書、同意説明文書、治験薬概要書の妥当性についても適宜事前面談と対面助言を実施し、平成 27 年 12 月までに治験届を提出する計画を確認した。

空気圧式製剤注入器を用い、Evans Blue 色素を 20 ~ 30% ポリアクリルアミド・ゲルへ注入すると、ゲルの硬度が触診上で硬い場合でも (硬度計表示上 4 ~ 5) 0.5 ~ 1 mL の色素を刺入部から逆流することなく、注入することが出来た。



空気圧式製剤注入器を用い、0.2% Evans Blue 液を PEIT 針 22G により注入。

D. 考察

PMDAとの薬事戦略相談の内容により、スケジュールの変更がある可能性は否定できないが、現状スケジュールどおり準備が進んでいる。その他候補に挙げた解析手法には一長一短があり、適用には工夫が必要である。今後、シミュレーションの両面からの比較検討を行う。

E. 結論

純国産の革新的な癌治療薬であるHVJ-Eの悪性胸膜中皮腫患者を対象とした医師主導治験のための支援業務ならびに非臨床試験を行い、順調に準備が進行している。希少がんを対象とした医師主導治験において治療の効果を正しく検証するため最良な手法を検証するため適用可能な統計手法についての検討を行った。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

1 Toward a clinical application of pseudovirion to cancer therapy. Novel therapy

of hemagglutinating virus of Japan Envelope (HVJ-E) for intractable cancer. Lee CM, Saito A, Tanemura A, Nonomura N, Kaneda Y. Molecular Medicine Tri-Conference (Cancer Immuno -therapy 2015) ポスター発表、サンフランシスコ, Feb.19-20th, 2015. (国外)

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。

臨床試験実施計画書

化学療法抵抗性の悪性胸膜中皮腫を対象とした GEN0101 の腫瘍内投与
及び皮下投与の安全性及び予備的な有効性の評価のための
オープンラベル臨床試験（第 相臨床試験）

臨床試験被験薬: GEN0101

臨床試験責任者: 大阪大学医学部附属病院呼吸器外科
診療科長（教授） 奥村 明之進

2. 目次

臨床試験の要約

シェーマ

1. 臨床試験のスケジュール

2. 目次

3. 略語一覧

4. 緒言及び根拠

- 4.1 悪性胸膜中皮腫
- 4.2 悪性胸膜中皮腫の標準療法
- 4.3 GEN0101
- 4.4 前臨床試験
- 4.5 臨床試験
- 4.6 臨床試験の妥当性
- 4.7 GEN0101 の用量、用法の設定根拠

5 臨床試験の目的

- 5.1 主要目的
- 5.2 副次目的

6. 臨床試験デザイン

- 6.1 臨床試験デザインの妥当性
- 6.2 臨床試験実施計画の概要
- 6.3 目標登録症例数
- 6.4 適格基準
 - 6.4.1 選択基準
 - 6.4.2 選択基準の根拠
 - 6.4.3 除外基準
 - 6.4.4 除外基準の設定根拠
- 6.5 臨床試験の期間

7 臨床試験被験薬エラー! ブックマークが定義されていません。

- 7.1 臨床試験被験薬
 - 7.1.1. 臨床試験被験薬の名称、成分、保存
 - 7.1.2 容器

- 7.1.3 投与液の調製
- 7.2 治験薬の包装及び表示
- 7.3 臨床試験被験薬に関する責務

8 臨床試験の方法

- 8.1 治療方法
 - 8.1.1 GEN0101 の投与液量
 - 8.1.2 投与方法
 - 8.1.3 プレメディケーション
 - 8.1.4 臨床試験被験薬の管理及び投与状況の管理
- 8.2 治療方法の変更
- 8.3 増量の可否の判断及び症例追加の判断
- 8.4 併用薬 / 併用療法

9. 臨床試験の評価項目

- 9.1 主要評価項目 **エラー! ブックマークが定義されていません。**
 - 9.1.1 安全性/忍容性 **エラー! ブックマークが定義されていません。**
- 9.2 副次評価項目
 - 9.2.1 腫瘍免疫誘導能
 - 9.2.2 抗腫瘍効果 (overall response)
 - 9.2.3 鎮痛効果 (Evaluation Scale of Pain)

10 有害事象の評価・報告

- 10.1 有害事象の定義
 - 10.1.1 有害事象とは
- 10.2 有害事象への対処
- 10.3 有害事象の評価・報告
 - 10.3.1 有害事象の評価方法
 - 10.3.2 過量投与
- 10.4 臨床試験責任者の義務
- 10.5 効果安全性評価委員会の役割
- 10.6 重篤な有害事象の報告
- 10.7 予想される有害事象
 - 10.7.1 予想される有害事象
 - 10.7.2 予想される有害事象の対処方法

11. 被験者ごとの中止基準

- 11.1 被験者ごとの中止基準

11.2 被験者ごとの中止時の対応

12. 治験の終了、中止又は中断

12.1 治験の中止・中断

12.2 治験の終了

13 臨床試験の手順

13.1 スクリーニング

13.2 被験者の登録手順

13.3 臨床試験参加期間

13.3.1 治療前検査

13.3.2 Cycle 1

13.3.3 Cycle 2

13.4 中止時

13.5 腫瘍免疫誘導能の確認手順

14 原資料の定義

15 統計的事項

15.1 目標登録症例数とその設定根拠

15.2 解析対象集団の定義

15.3 対象症例の概要

15.4 主要評価変数の解析

15.4.1 投与制限毒性の発生状況

15.4.2 観測された全ての有害事象

15.4.3 バイタルサイン

15.4.4 臨床検査値

15.4.5 血中抗 HVJ-E 抗体

15.5 副次評価変数の解析

15.5.1 腫瘍免疫誘導能

15.5.2 抗腫瘍効果

15.5.3 PFS

15.5.4 疼痛評価

16 症例報告書

16.1 症例報告書の種類

16.2 症例報告書の作成

16.3 症例報告書の記載上の注意

- 16.4 症例報告書の変更又は修正
- 16.5 症例報告書の確認
- 16.6 症例報告書の提出

17 倫理及び GCP 遵守

- 17.1 倫理的原則
- 17.2 治験審査委員会

18. 治験実施計画書からの逸脱及び変更、改訂

- 18.1 治験実施計画書からの逸脱及び変更
- 18.2 治験実施計画書の改訂

19. 説明と同意

- 19.1 同意取得方法
- 19.2 説明文書・同意文書の内容
- 19.3 説明文書・同意文書の内容改訂

20. 治験の費用負担及び補償

- 20.1 治験の費用
- 20.2 健康被害補償等

21. 記録の保存

- 21.1 治験審査委員会
- 21.2 実施医療機関
- 21.3 自ら治験を実施する者

22. 原資料の特定

23. 原資料等の直接閲覧及びモニタリング

24. 治験の品質管理及び品質保証

25. 個人情報保護

- 25.1 被験者の個人情報の保護

26. 研究成果の公表、帰属

27 問い合わせ先

28 臨床試験の組織

29 参考文献等

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん(悪性胸膜中皮腫)
治療薬開発のための医師主導治験の実施」

悪性胸膜中皮腫に対する HVJ-E の薬効・薬理に関する研究

研究分担者 金田安史（大阪大学大学院医学系研究科・教授）

李千萬（大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 特任准教授）

研究要旨

HVJ-E は不活性化したセンダイウイルス粒子であるが、この粒子自体に多彩な抗腫瘍作用があることが明らかになり、メラノーマや前立腺癌に対する臨床試験が行われている。その作用の1つは、抗腫瘍免疫の活性化であり腫瘍細胞に対する CTL (cytotoxic T cell), NK (natural killer) cell の活性化や制御性 T 細胞の抑制を起こすことができる。一方、前立腺癌やグリオブラストーマなどの腫瘍細胞に対しては腫瘍細胞選択的なアポトーシスを誘導するが、それは HVJ-E に含有されるウイルス RNA 断片が RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) によって認識され、それが MAVS (mitochondria anti-viral signaling protein) に伝えられて、アポトーシス誘導因子の TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) や NOXA (ラテン語で damage の意味) を癌細胞選択的に活性化することが原因であることが分かっている。様々なタイプ (上皮型、肉腫型、二相型) のヒト悪性胸膜中皮腫細胞 (malignant pleural mesothelioma; MPM) に対しても HVJ-E は細胞死を誘導し、ヒト前立腺癌細胞株 PC-3 と同等の細胞増殖抑制効果を有していた。実際に、EHMES 細胞に HVJ-E を作用させると Noxa, TRAIL の遺伝子発現がそれぞれ 8 倍、2 倍増強されることが明らかになった。PC3 細胞でみられるような Interferon- β に発現増強は起こらなかった。しかし RIG-I, MAVS の siRNA によりそれぞれの遺伝子発現を抑制しても、Noxa, TRAIL の発現は抑制されなかった。そこで、MPM 細胞における HVJ-E の感受性遺伝子を網羅的に調べるため、CRISPR/Cas9 系を利用して網羅的に遺伝子をノックアウトして HVJ-E 耐性細胞を分離し、責任遺伝子を明らかにする研究を開始した。もう1つの抗腫瘍作用は抗腫瘍免疫の活性化であり、腫瘍に対する CTL (cytotoxic T cell) や NK (natural killer) cell の活性化と制御性 T 細胞の抑制であることを既に報告している。その分子機構は、前者のエフェクター細胞の活性化については、virus RNA 断片が樹状細胞や腫瘍細胞に膜融合で導入され、RIG-I 経路を活性化して、IFN- β , IP-10, RANTES 等の産生を増強することによっており、後者の制御性 T 細胞の抑制は、F 蛋白質が直接樹状細胞を刺激して NF- κ B の経路を活性化して IL-6 産生を促進させることによることを明らかにしている。しかし腫瘍組織内の HVJ-E の標的細胞は腫瘍細胞自体と樹状細胞であることは既に報告しているが、HVJ-E を投与したメラノーマ患者の腫瘍組織ではマクロファージの浸潤が著明であることから、マクロファージも標的細胞になるのではないかと考えた。そこで骨髄や腫瘍組織からマクロファージを分離して、HVJ-E を作用させた結果、HVJ-E は M2 マクロファージを M1 型にシフトさせることにより T 細胞を Th1 型にシフトさせ、CTL 機能を増強させることが明らかになった。またその経路は、RIG-I を経由したものであること、また RIG-I 経路とは別に NF- κ B の経路が関与していることが示唆された。

マウス中皮腫モデル治療実験で、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では

相乗効果を認めた。

A 研究目的

本事業全体の目的は、大学発の知財権を国内外で確保した純国産医薬 HVJ-E を、標準的化学療法が奏効しなくなった化学療法抵抗性悪性胸膜中皮腫症例に対し投与する医師主導治験を行い、化学療法抵抗性悪性胸膜中皮腫に対する革新的がん治療薬の実用化を目指すものである。その中で本研究の目的は、悪性胸膜中皮腫に対する HVJ-E の抗腫瘍作用をさらに解明することにより、有効性の高い投与方法、投与計画を打ち立てて医師主導治験に貢献するとともに、HVJ-E の機能をさらに高めて治療効果を増強できる新規治療剤の開発に資することにある。

B 研究方法

HVJ は ATCC より購入した Sendai virus の Z 株 (VR-105 parainfluenza 1 Sendai/52) を用い、有精鶏卵で増殖させ、遠心法により生成した。LLCMK2 細胞に HVJ を感染させて 24 時間以降に培養液中に産生される HVJ は不活性型 F 蛋白質 (F0) を有し融合能を持たない。この HVJ を低濃度 (0.0004 %) のトリプシンで処理すると F1, F2 に開裂し融合能を持つようになる。また LLCMK2 細胞中に HVJ の HN 遺伝子に対する siRNA を導入しておいて、24 時間後に HVJ を感染させると産生される HVJ は HN 蛋白質をほとんど有しないため、HVJ 受容体であるガングリオシドに結合できず融合能を欠失したウイルスとなる。また高濃度のトリプシンを HVJ に処理し膜蛋白質の F, HN を分解した融合能のない HVJ も作成した。いずれの HVJ も紫外線 (99 mJoule/cm²) で不活性化し HVJ-E とし

た。

ヒト MPM 細胞としては、上皮型の MPM 細胞株 (ACC-MESO-4)、二相型 (MSTO-H211, EHMES)、や肉腫型 (ACC-MESO-1, H2052) の細胞株を用いた。正常のヒト胸膜細胞株として Met-5A を用いた。マウス MPM 細胞として、AB22G2 を用いた。EHMES 細胞は愛媛大学より供与を受けた。その他は ATCC より購入した。HVJ 受容体の産生ガングリオシドの解析は、HPLC 法により行った。HVJ-E に対する感受性は、96well plate に 1 well あたり 5000 個の細胞を播き込み、HVJ-E を 1000, 2000 moi (multiplicity of infection) で培養液中に投与し、24 時間後の細胞生存を MTT 法で測定した。ポジティブコントロールとしては、すでに高感受性であることを報告しているヒト前立腺癌細胞 PC3, DU145 やヒトグリオブラストーマ細胞株 U251 を用いた。また癌細胞と HVJ-E の親和性を観察するため、PKH26 により標識した HVJ-E を培養液中に投与し、蛍光顕微鏡で観察した。

RIG-I, MAVS の siRNA (Sigma) については既に報告している配列 (Clinical Cancer Res. 2012) を lipofectamine RNAimax (Invitrogen) で導入した。Noxa, TRAIL, RIG-I, MAVS, MDA5, IFN- β の発現については q-PCR で行った。

マウス骨髄由来の初代培養マクロファージの調整、及び M1、M2 分極誘導は、以下のように行った。C57BL/6N () 由来骨髄細胞を 10% L929 条件培地含有 RPMI 完全培地に 4.5×10^5 cells/mL で懸濁し、10 cm 培養皿に 10 mL (4.5×10^6 cells/dish) を播種・培養した。4 日後、培養培地 10% 量 (1 mL) の L929 条件培地を加え、更に 3 日

間培養した。培養皿に接着している細胞を不活性型マクロファージとして回収した。不活性型マクロファージを RPMI 完全培地に 1×10^6 cells/mL で懸濁し、100 ng/mL LPS (Sigma-Aldrich Co., ST. Louis, USA) あるいは 10 ng/mL M-CSF (WAKO Junyaku Inc., Osaka, Japan) と 20 ng/mL IL-4 (WAKO) を加えて 6 穴プレートに 1 mL (1×10^6 個) 播種して、24 時間培養した。マウス骨髄由来 M2 マクロファージへの HVJ-E 刺激実験においては、6 穴プレートで培養したマウス骨髄由来 M2 マクロファージ (1×10^6 cells/well) の培地を除去し、700 μ L の HVJ-E 含有血清不含 RPMI 培地 (2,000 HAU/mL) 中で培養した。1 時間後、最終濃度が 10 ng/mL M-CSF と 20 ng/mL IL-4 なるように希釈した RPMI 完全培地を 300 μ L 加え、23 時間培養した。マクロファージ形質の変化は、IL-6、IL-12、TNF- α 、IFN- β 、IFN- γ 、NOS2、Arg1、Fizz1、Ym1、T-bet、Eomes、STAT1、Granzyme A、Granzyme B、18S の発現量をリアルタイム RT-PCR によって測定することにより検討した。また抗 NOS2、抗 NF- κ B p65 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA)、抗 Arg1、抗 β -actin (Sigma)、抗 Ym1 (Abcam, Cambridge, UK)、抗 RIG-I、抗 TBP (Cell Signaling., USA) 抗体を用いた Western blot によっても行った。さらにマクロファージ培養上清中の IL-6、TNF- α を ELISA 法で測定し、NO 濃度の測定を Griess Reagent System (Promega., Tokyo, Japan) を用いて行った。NF- κ B の阻害剤投与は、骨髄由来 M2 マクロファージを 700 μ L の 30 μ M NF- κ B p65 阻害剤 (JSH-23) (SYMANSIS., California,

USA) 含有血清不含 RPMI 培地で 30 分間、37 $^{\circ}$ C で培養した。

マウス中皮腫モデル治療実験として、ヒト悪性胸膜中皮腫細胞株 MSTO211H (2×10^6 個) を CB-17/SCID マウスの壁側胸膜内へ接種して作製したヒト悪性胸膜中皮腫担癌マウスに対し、接種後 9 日目に HVJ-E の腫瘍内投与ならびに抗癌剤シスプラチンの投与を行った。また、その 7 日後より HVJ-E の皮下投与を 2 週毎に行い、マウスの生存率を検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験についてはすでに大阪大学医学系研究科での審査を受けており、その安全委員会の指針に従って施行された。また組換え DNA の実験については、組換え DNA 実験計画の機関承認が得られており、大学等における組換え DNA 実験指針に従って行った。本計画においては、臨床研究データの使用や患者資料の使用、ヒト遺伝子解析などは含まれなかった。

C 研究結果

1. MPM 細胞の HVJ-E 感受性

MPM 細胞の HVJ 受容体である酸性ガングリオシドの HPLC での解析パターンを図 1 に示す。HVJ 受容体である GD1a, SPG の総酸性ガングリオシドに占める割合は、METO-H211; 3.3%, EHME5; 15.5%, MESO-1; 10.7%, MESO-4; 6.7%, H2452; 40.9%, Met5A; 10.2%であった。他の腫瘍細胞と大きな違いはなかった。ちなみにマウス MPM 細胞の AB22G2 は 0%であった。PKH26 標識した HVJ-E を MPM 細胞の中で最も受容体の発現の低い METO-H211 に

作用させると図 2 に示すように、前立腺癌細胞の DU145 と同様な染色パターンが得られ、同じような HVJ-E との親和性が示された。そこで HVJ-E を各 MPM 細胞に作用させ、生存率を MTS assay により測定した。図 3 のように、どのヒト MPM 細胞もヒト前立腺癌細胞 PC3 と同じような細胞死が誘導され、生存率の低下がひきこされた。また正常の Met-5A は受容体があるにもかかわらず、細胞死誘導は起こらなかった。なお受容体のないマウス MPM 細胞の AB22G2 は全く影響を受けなかった。

2 . EHMES 細胞の HVJ-E 感受性機構

治療が難しい MPM の 1 つである二相型の EHMES に HVJ-E を作用させた時の、遺伝子発現パターンを定量 PCR によって解析した。すでに報告しているように HVJ-E による腫瘍細胞選択的なアポトーシスの経路は、RIG-I, MAVS によるシグナル伝達である (Clinical Cancer Res. 2012)。RIG-I は Type I, II の IFN による誘導が知られている。図 4 に示すように RIG-I は U251, PC3, DU145, PNT2 (正常前立腺上皮細胞株) で誘導されるが、EHMES ではほとんど誘導されなかった。MAVS の発現誘導はどの細胞においてもほとんど認められなかった。また HVJ ゲノムを認識しない RNA 受容体の MDA5 は、どの細胞においても HVJ-E の刺激でやや上昇した。細胞死に関連する TRAIL, Noxa および IFN- β の発現をみると、EHMES では他の腫瘍細胞と同じく HVJ-E による Noxa の発現誘導がおこったが、TRAIL の発現は 2 倍程度しか誘導されなかった。また IFN- β は他の細胞とは異なり、全く誘導が見られなかった。そ

こで RIG-I, MAVS の siRNA を用いて TRAIL, Noxa の遺伝子発現を調べると、RIG-I (3 種類の siRNA はすべて抑制可能), MAVS (siMAVS-1 のみ抑制に成功) を抑制した状態であるにもかかわらず、TRAIL, Noxa とともに HVJ-E による発現誘導は抑制されなかった。そこでアポトーシスの阻害剤として Pan-caspase inhibitor である z-VAD-fmk を用いて、HVJ-E による細胞死への影響を見たところ、z-VAD-fmk では抑制が全く見られなかった。

3 . HVJ-E のマクロファージに与える影響

骨髄由来 M2 マクロファージに HVJ-E を投与した時の遺伝子発現の変化を mRNA 及びタンパク質レベルで検討した。その結果、図 7 のように、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による IL-6, NOS2, TNF- α の発現上昇と Arg1, Fizz1, Ym1 の発現低下がリアルタイム RT-PCR によって確認された。また HVJ-E 刺激による NOS2 発現増加と Ym1 発現減少がウエスタンブロットによって確認され、IL-6, TNF- α , NO の分泌促進が ELISA 及び NO 測定によって確認された。さらに、データは示さないが、M2 マクロファージの HVJ-E 刺激によって、NOS2+ 細胞が約 10 倍に増加することが FACS によって明らかになった。これらの結果から、HVJ-E 刺激によってマウス骨髄由来 M2 マクロファージが M2 表現型から M1 表現型にシフトしたことが明らかとなり、HVJ-E が M2 から M1 への再分極誘導能を有することが示唆された。HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導において RIG-I が関与するか検討した(図 8)。HVJ-E 刺激 M2 マクロ

フェージにおける RIG-I 発現の変化をウエスタンブロットにより検討した結果、HVJ-E 刺激によって RIG-I 発現を増加させることが確認された。また、RIG-I をノックダウンすることで M2 マクロファージの HVJ-E 刺激による NOS2 発現上昇と Ym1 発現低下が抑制された。

一般的に、マクロファージの活性化には NF-kB が重要であり、M1 マクロファージへの分極には NF-kB の p65/p50 複合体が核内へ移行するのに対して、M2 マクロファージへの分極には NF-kB の p50/p50 複合体が核内へ移行することが知られている。そこで HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極化において、NF-kB p65/p50 の活性化が関与しているのかを検討した。まず M2 マクロファージの HVJ-E 刺激により濃度依存的に NF-kB p65 の核内移行が促進することが確認したので、次に、NF-kB p65 阻害剤 (JSH-23) によって HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極が抑制されるかを検討したところ、M2 マーカー遺伝子 (Arg1、Fizz1、Ym1) 発現には変化が無かったが、NOS2、IL-6、TNF- α といった M1 マーカー遺伝子の発現が抑制されることが明らかとなった (図 9)。これらの結果から、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極には NF-kB p65 の活性化が関与することが考えられる。

次に HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージが T 細胞を活性化するかどうかを調べるために、HVJ-E 刺激マクロファージと脾臓 T 細胞を共培養した。共培養 48 時間後に浮遊している T 細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で T 細胞活性化に関する遺伝

子発現を調査した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージとの共培養群では活性化 Th1 マーカーである STAT1 と活性化 CD8⁺ T 細胞マーカーであるグランザイム A、B の発現上昇が確認された (図 10)。また、同様に処理した T 細胞における初期活性化リンパ球マーカーである CD69 の発現を FACS により解析した。その結果、HVJ-E 刺激 M2 マクロファージにおいて CD69⁺ T 細胞集団が約 2 倍増加していることも明らかとなった。これらの結果は HVJ-E 刺激 M2 マクロファージが脾臓 T 細胞を活性化し、Th1 反応を増強することを示唆している。

4. マウス中皮腫モデル治療実験

非臨床試験において悪性胸膜中皮腫 (MPM) は HVJ-E に対する高い感受性を有しており、MPM 担癌マウスへの治療実験において高い抗腫瘍効果が認められた (平均生存日数 39.5 日 vs コントロール群 27 日)。さらに、臨床で投与されている抗癌剤シスプラチン (5 mg/kg) 単回投与に HVJ-E 治療を上乗せした治療群では、シスプラチン単回投与群よりも有意な生存期間の延長を認め、HVJ-E とシスプラチンとの併用による相乗効果を認めた (平均 57 日以上 vs 42.6 日)。

D 考察

1. HVJ-E による MPM 細胞死誘導に関して

HVJ-E による腫瘍細胞死は、主として RIG-I によってウイルス RNA 断片が認識され MAVS を活性化して、IRF(interferon regulatory factor)1,3,7 等の転写因子の核内

移行を促進しアポトーシス関連遺伝子の TRAIL, Noxa 等の遺伝子発現を腫瘍細胞選択的に増強することによっている。その細胞死は、RIG-I, MAVS の siRNA で抑制される。MPM 細胞においても腫瘍細胞選択的な細胞死がおこり、Noxa の転写が増強された。しかし RIG-I, MAVS の siRNA では Noxa の転写活性化は抑制されなかった。pan-caspase inhibitor の z-VAD-fmk でも抑制されずアポトーシスの可能性は低くなった。今後さらに詳細な検証を他の中皮腫細胞も含めて行うことが必要である。顕微鏡下では、EHMES は HVJ-E により細胞の断片化が明瞭には観察できておらず、融合したような大きな細胞がそのまま浮き上がって死滅するような像が観察されている。我々は既に、Caspase 8 欠損の神経芽腫細胞において HVJ-E による細胞死がおこるが、それはアポトーシスではなくプログラム化されたネクローシス(ネクロトーシス)であることを報告している (Cancer Res. 2014)。そのときには virus RNA や RIG-I, MAVS の関与はなく、膜融合刺激が細胞質の calcium 濃度を高めて CaM-kinase を活性化して RIP-1 の活性化と RIP-1,-3 の複合体形成を起こす。同様なメカニズムが MPM 細胞でも機能している可能性がある。しかし Caspase-8 は発現しており、神経芽腫のような Caspase-8 欠損による Rip-1 の活性化ではなさそうである。プログラム化されたネクローシスの阻害剤である Necrostatin の影響、活性酸素の産生の確認などを計画している。

一方、もっと網羅的に細胞死に関与する遺伝子を探索するために、CRISPR/Cas9 系を利用することにした。すでに CRISPR の

guide RNA を搭載したレンチウイルスのライブラリーを入手している。これは 1 遺伝子に 6 つの guide RNA sequence を含むもので、Cas9 の発現細胞に、このレンチウイルスを感染させ、HVJ-E による細胞死からまぬがれる細胞を集めて、その guide RNA の配列を高速シーケンサーで解読すれば、標的遺伝子候補が得られるものである。すでに Cas9 を安定に発現する EHMES 細胞株を分離した。コントロールとして HVJ-E 高感受性のヒトグリオブラストーマ U251 細胞においても Cas9 発現株を分離した。

2 . HVJ-E の抗腫瘍免疫活性化におけるマクロファージの関与について

HVJ-E の標的細胞として従来明らかになっていた腫瘍細胞と樹状細胞以外にマクロファージに注目したのは、メラノーマ患者の組織で HVJ-E 投与後にマクロファージの集積が顕著であることが 1 つである。その他に、ラットの皮下に HVJ-E を投与後の virus RNA の局在を検証した結果にもよっている。その場合、virus RNA は投与部位では 24 時間で消失するが所属リンパ節で 1 週間以上安定に存在していた。これはコロイド粒子の皮下投与後と同じタイムコースであり、貪食細胞にトラップされて移動したことを示唆している。予想通り、HVJ-E によりマクロファージは M2 から M1 に分極し、これが T cell の腫瘍細胞の攻撃力を高める結果となった。今回は正常マウスから採取したマクロファージであるので、次は腫瘍関連マクロファージにも HVJ-E が作用して M1 に分極できるかどうかを検証する必要がある。またクロドロネート含有リボソームを投与して腫瘍内のマクロファージを除

去した時に、HVJ-E の抗腫瘍効果がどのように影響を受けるかを調べることが重要である。従来の報告では、腫瘍関連マクロファージを除去すると抗腫瘍効果が増強され、腫瘍が抑制される。しかし HVJ-E を用いた時の抗腫瘍効果は、マクロファージ除去により元弱されるのではないかと予想される。いずれにしても極めて重要な実験であると認識している。

一般的に、M1 マクロファージへの分極には NF- κ B p65/p50 がマスターレギュレーターとして機能していることが知られ、HVJ-E の M2 マクロファージ刺激による M1 分極誘導においても NF- κ B p65 の活性化が重要な役割を果たすことが確認された。しかし、NF- κ B p65 阻害剤投与によって、HVJ-E 刺激による M1 マーカー遺伝子 (IL-6、TNF- α 、NOS2) の発現亢進は抑制されたが、M2 マーカー遺伝子 (Arg1、Fizz1、Ym1) の発現抑制を解除することはなかった。この結果は、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50 活性化だけでなく別のシグナルも寄与していることを示唆している。HVJ-E は RIG-I の活性化によって M2 マクロファージの M1 分極を誘導することが示されたが、RIG-I 活性化のシグナルは TRAF6 を介した NF- κ B 経路と TRAF3 を介した 1 型インターフェロン経路を活性化することが報告されている。実際に、HVJ-E 刺激後の M2 マクロファージ刺激では NF- κ B 経路非依存的な IFN- γ 発現増加が確認された。1 型インターフェロン経路もまた M1 分極に関与するという報告があることから、HVJ-E 刺激による M2 マクロファージの M1 分極誘導には NF- κ B p65/p50

活性化だけでなく 1 型インターフェロン刺激も寄与している可能性がある。

我々はすでに HVJ-E の F 蛋白質がマクロファージの膜蛋白質に作用して NF- κ B のシグナルを活性化して IL-18 の転写を増強するという結果を得ている。このことからマクロファージの膜表面に F 受容体があることが示唆されるが、今まで報告がない。F 蛋白質とマウスマクロファージ細胞株である P388D1(この細胞においても HVJ-E により IL-18 の転写が活性化される)の膜分画を作用させて、免疫沈降させた中から、複数の受容体候補が見つかっており、今後さらに解析を進める予定である。このレセプターを介したマクロファージの形質転換の可能性も十分あると考えられ、それを解明することは、抗腫瘍免疫の活性化機構に全く新しい知見を提供できるであろう。

4 . マウス中皮腫治療実験

マウス中皮腫モデル治療実験において、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果を認めた。これは従来の抗がん剤とは異なるメカニズムで治療効果が得られることを示している。今後ペメトレキセドとシスプラチンを用いた抗癌剤治療に HVJ-E を併用した治療実験を行う予定である。

E 結論

ヒト MPM 細胞は HVJ に親和性が高く、HVJ-E により細胞死が誘導される。しかしその経路は従来の RIG-I/MAVS 経路とは異なる可能性がある。一方、HVJ-E による抗腫瘍免疫の活性化、特に CTL 活性の増強にはマクロファージが大きく関与している可能性があり、そのシグナル伝達経路として、

RIG-I を刺激する経路と、それとは別に NF- κ B の活性化を介する経路があることが示唆された。マウス中皮腫モデル治療実験において、HVJ-E の高い抗腫瘍効果を確認でき、抗癌剤との併用治療実験では相乗効果を認めた。

F 健康危険情報
異常なし

G 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

第 11 回日本中性子捕捉療法学会 教育講演
Kaneda, Y. “ウイルスに学ぶ癌治療戦略”
2014/7/6 大阪

第 20 回日本遺伝子治療学会 理事長講演
Kaneda, Y. “Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients”
“2014/8/7 東京

第 8 回韓国遺伝子細胞治療学会 招待講演
Kaneda, Y. “Virus-mediated cancer treatment ~from basic to clinic~” 2014/10/11
Osong (Korea)

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

図1: 各種細胞株におけるHVJ受容体の発現パターン

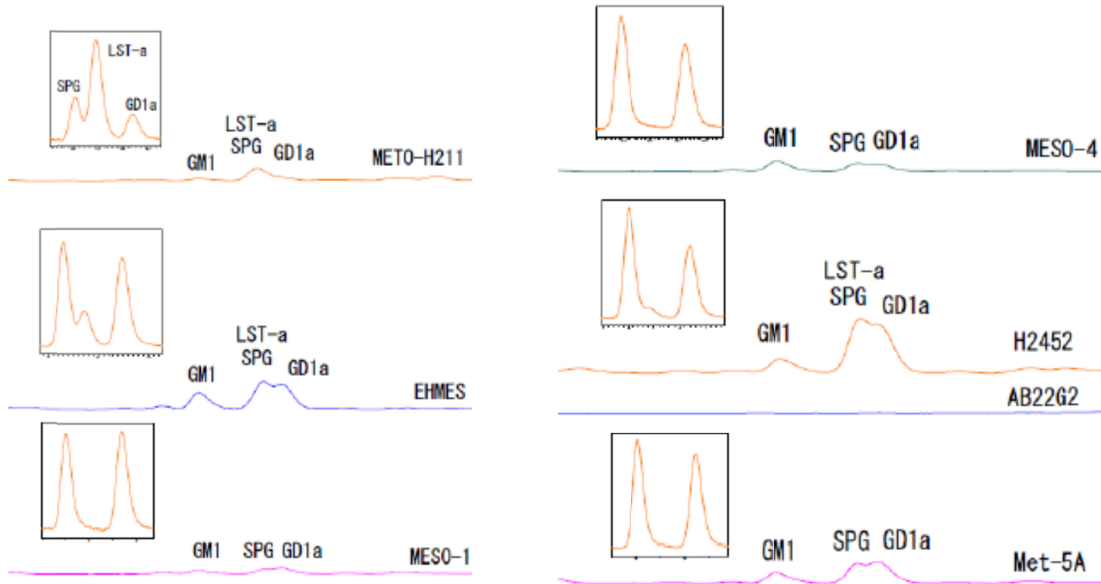


図2: HVJ-Eのヒト胸膜中皮腫との親和性

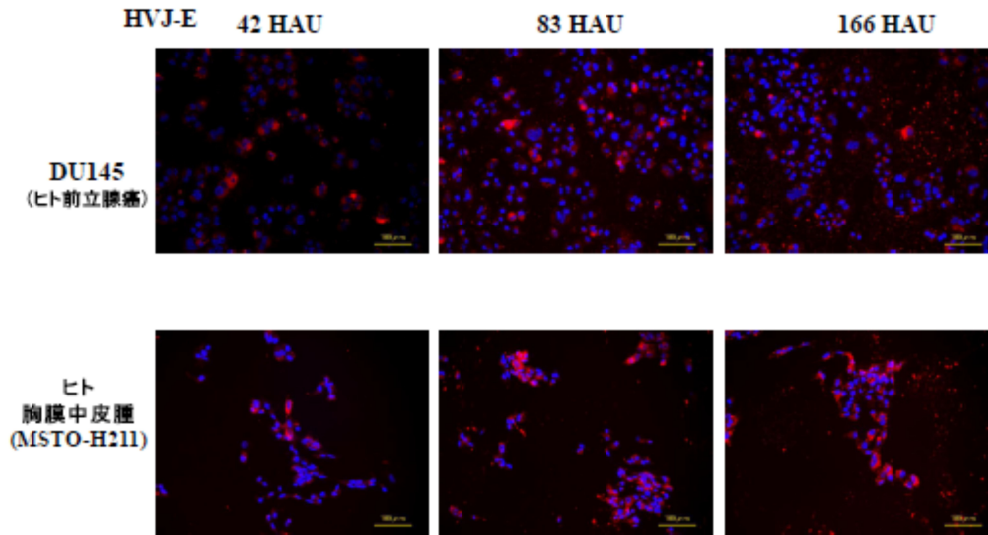
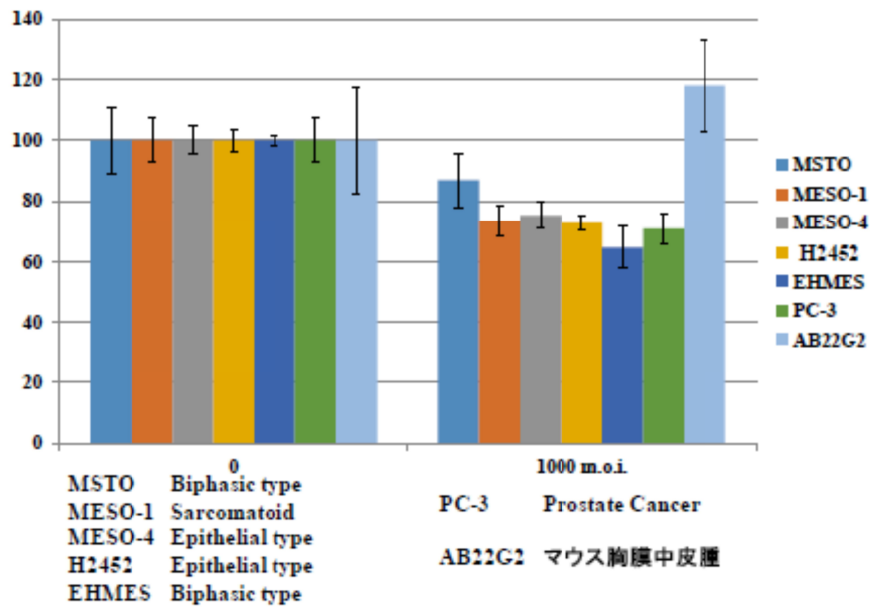


図3:HVJ-Eの細胞増殖抑制効果



HVJ-Eは、ヒト前立腺癌と同様に、ヒト胸膜中皮腫のどのタイプにも細胞増殖抑制効果を示すが、一方マウス胸膜中皮腫細胞への増殖抑制効果を示さなかった。

図4:HVJ-E 1000MOI 24時間後における、EHMESと他の細胞群との発現比較

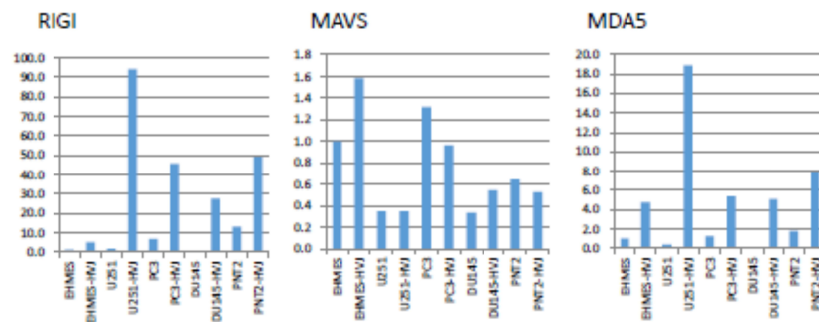


図5: HVJ-Eによるアポトーシス関連遺伝子とインターフェロンの発現比較

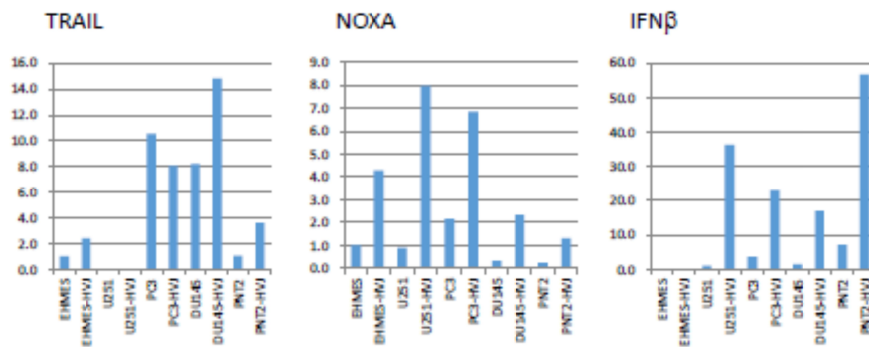


図6: EHMESをRIGI、MAVSノックダウン時のTRAIL、NOXAの発現解析
HVJ-E 1000MOI 24時間後

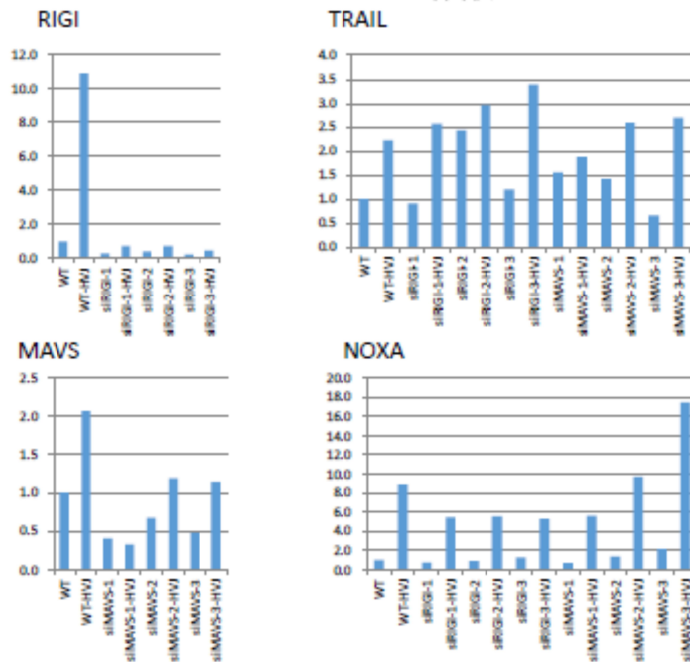


図7:HVJ-Eによるマウスマクロファージの形質変化

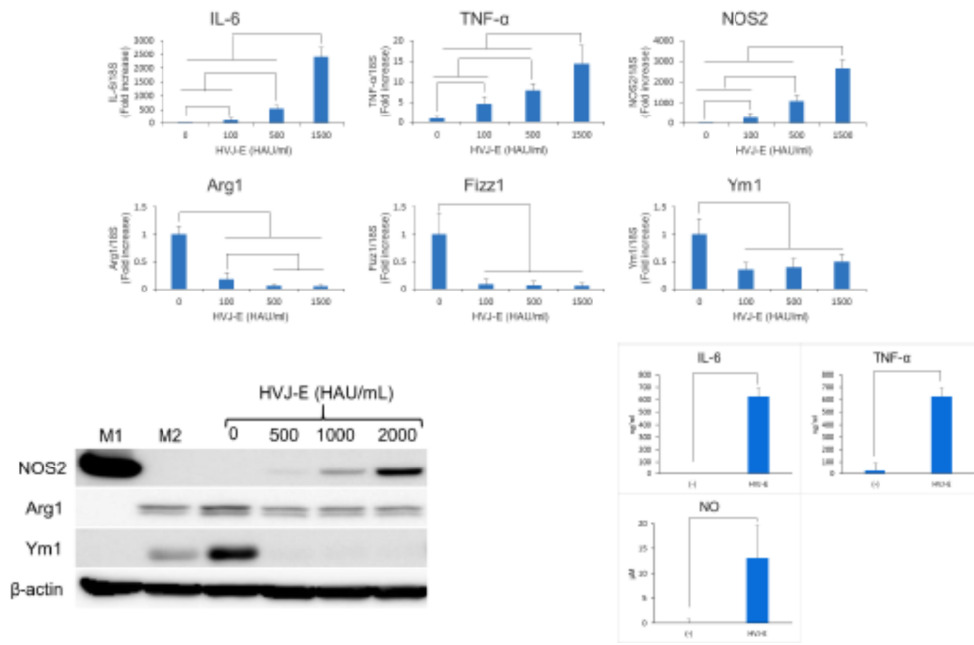


図8:HVJ-Eによるマクロファージの形質変化に及ぼすRIG-Iの関与

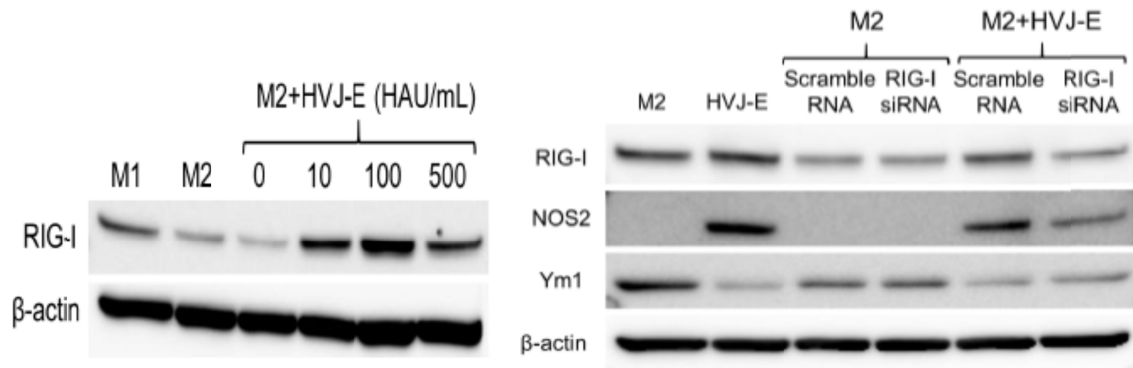


図9:HVJ-Eによるマクロファージの形質変化に及ぼすNF-kappa B (p65)の関与

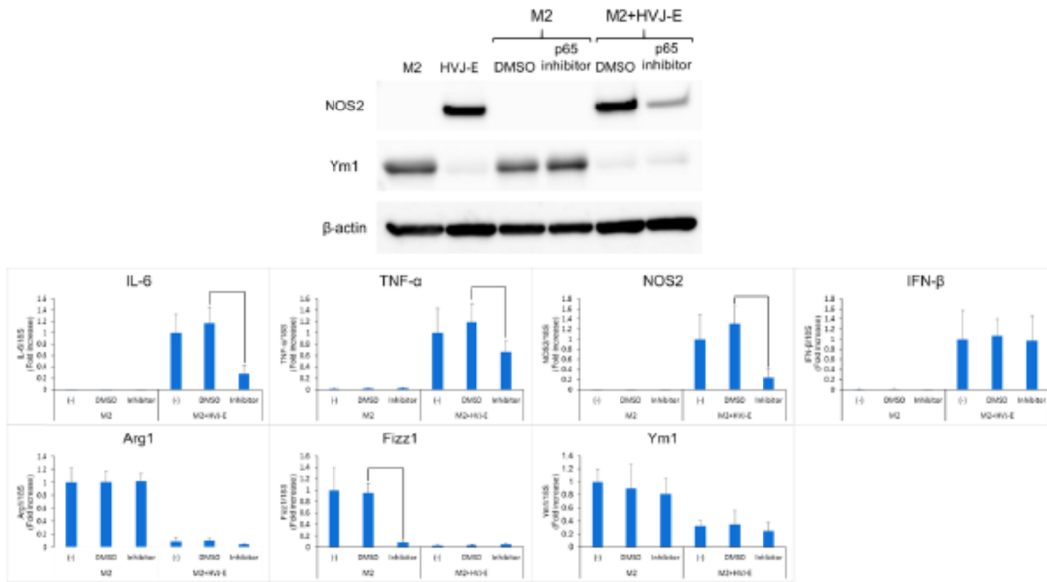
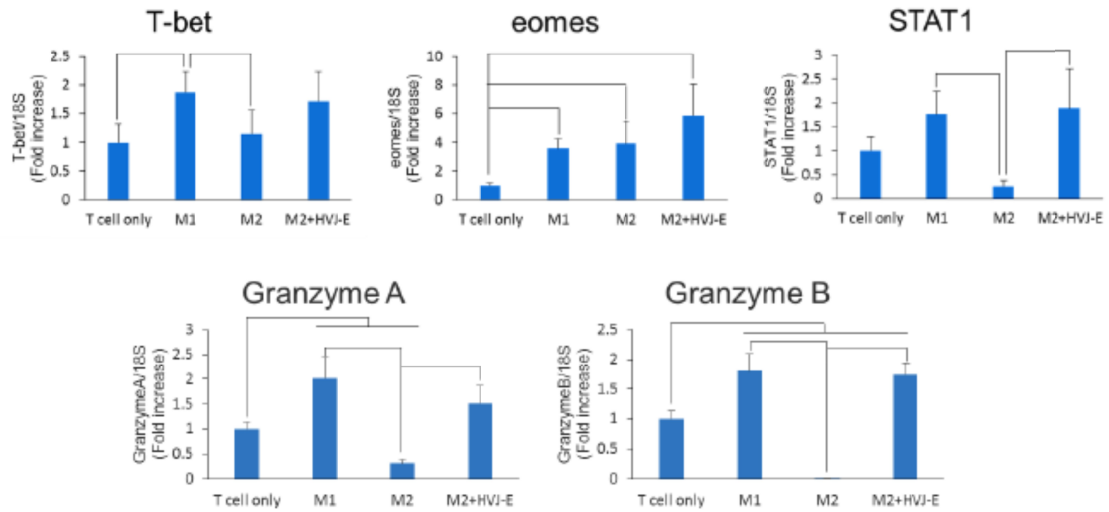


図10:HVJ-Eで刺激したM2マクロファージのT細胞機能に与える影響



厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業） 委託業務成果報告書

毒性、薬効検証のための非臨床試験

b. 安全性試験

治験薬 GMP 製造

担当責任者 金田安史（大阪大学大学院医学系研究科・教授）

李千萬（大阪大学医学部附属病院未来医療開発部 特任准教授）

研究要旨

本研究で開発しているHVJ-Eを早期に上市するために必要な安全性試験と治験薬製造準備をジェノメディア株式会社の協力を得て行った。策定中の治験実施計画書の内容から、今後必要となる安全性試験の項目と、治験薬の必要本数の予測値を求めて試験計画と製造計画を策定し、それに従って研究開発を実施した。安全性試験については、計画している胸膜腫瘍内投与における安全性を確保するための試験のバリデーション試験を実施した結果、目的とする試験で採用する測定方法の妥当性を確認出来た。一方、製造については治験薬製造に必要な原料（原薬）について、必要量の50%の製造を完了した。また、医薬品GMP製造も想定し、無菌注射剤製造のための技術確立と、スケールアップ技術の検討を行った。製造技術の開発の骨子について検討した結果、培養工程、精製工程、製剤化工程の3種類の工程毎に開発する事とした。平成26年度は、精製工程のスケールアップ検討を実施した結果、精製用カラムクロマトグラフィーの仕様検討からIQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）、及びOQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）までの作業を完了した。

A. 研究目的

本研究で計画している医師主導治験では、胸膜に発生する腫瘍内への投与を予定しているため、その安全性を確保する必要がある。当初の計画では安全性試験について以下のように記載したので、それを達成させることが今年度の目標である。

“安全性については、抗腫瘍効果の維持により再発や転移の拡大を抑制できるよう、長期的に反復投与を進める事を想定し、3ヶ月間から6ヶ月間の長期毒性を検証するための予備試験を行い、本試験の実施に必要な検証系（試験系のバリデーション等を含む）を確立する。”

また、医師主導治験を早期に完遂するに

は症例のエントリーを速やかに進める必要があり、特に本研究で計画している治験のように、対象疾患が胸膜悪性中皮腫のように症例数の少ない稀少疾患である場合には症例のエントリーを適切に進めるようにする事が重要である。そこで、治験に必要な被験物質（治験薬）を治験開始までに十分量確保する事が必要で、さらに開発を進めている治療薬に関して早期に承認申請を実施するには、次相の治験薬GMP製造と、上市後の医薬品GMP製造を適切に実施できるよう、製造技術のスケールアップとレベルアップが必要である。治験薬GMP製造については、当初の計画では、以下のように記載しているため、それを達成し開発の迅速化を図ることを目指して製造技術の開発を実

施した。

“ 医師主導治験の実施に必要な治験薬を十分量確保するために必要な治験薬製造計画を策定し、治験薬GMPレベルの製造のための準備を整える。また、第2相治験へ速やかに移行できるよう、医薬品GMP製造も想定した製造技術の確立、スケールアップを想定した製造技術の開発の骨子を策定し、開発の方向性を策定する。 ”

B . 研究方法

臨床治験における胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するための試験として、トキシコキネティクス試験 (TK試験) を実施するために必要な測定法のバリデーション試験を実施した。ガイドラインを参考にし、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目について予備検討試験を実施し、その結果から採用基準の範囲を設定した。各項目について、予備試験の結果から設定した内容に従ってバリデーション試験を実施し、設定した試験法が定量試験として妥当であることを確認した。

医師主導治験の実施に必要な治験薬を十分な本数確保するために、治験薬の製造計画を策定した。まず、策定中の治験実施計画書の内容を精査し、治験を速やかに進めるために必要な治験薬の必要量について算定を行った。その結果に基づいて、治験開始までに必要な最低の本数、症例数が最大となった際に必要となる本数を求め、治験薬の保存安定期間 (21ヶ月 ~ 24ヶ月) を考慮して製造計画の策定を行った。平成26年度は、この計画に基づいて、最低限必要な治験薬の本数を製造するために必要な原料 (原薬) を治験薬GMP体制化で製造した。

第2相治験へ早期に進めために必要な治験薬GMP製造のスケールアップと、その後の医薬品GMP製造へのレベルアップについては、開発の進捗に応じて段階的に進める事が適切であると考えられた。そのため、スケールアップについては現

行の5倍のスケールへの移行を、レベルアップについてはバイオ医薬で主流になることが見込まれるシングルユーステクノロジーを利用した製造技術確立を目標にして計画の策定を行った。現行の製造工程の内容を精査し、適切なスケールアップを可能とする仕様の検討を行い、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化 (凍結乾燥) 工程の仕様・スケールを決定し、計画の骨子を策定した。その内容に従って、平成26年度は攪拌工程と精製工程のスケールアップ検討を開始し、攪拌用のバックと精製用カラムについて、IQ : Installation Qualification (据付時適格性確認)、及びOQ : Operational Qualification (稼働性能適格性確認)までを実施した。

(倫理面への配慮)

治験薬GMP製造については、医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律 (医薬品医療機器等法、旧薬事法) と関連する法令、ガイドラインに従って実施すると共に、規制当局である医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との薬事戦略相談・事前面談と対面助言を適宜実施して適切に実施した。

C . 研究結果

医師主導治験で計画している胸膜腫瘍内投与の安全性を確保するため、トキシコキネティクス試験 (TK試験) として実施予定の試験法の妥当性についてバリデーション試験を行った。バリデーション試験における規定値の範囲を設定するために予備試験を実施し、検量線の妥当性、再現性、力価との相関性などの項目の、それぞれについて妥当性を確認するための範囲を規定した。その結果に基づいて、バリデーション試験を実施した結果、いずれの評価項目についても設定した規格値の範囲内となる事が明らかとなり、確立した試験法が、定量試験として妥当である事が確認された。

本研究で計画している胸膜悪性中皮腫を対象とする医師主導治験の実施に必要な

治験薬の本数を算出した(表1)。策定中の実施計画書の内容から、症例あたりに必要な本数を算出し、症例数の最小(各用量3例、計6例)と最大(各用量6例、計12例)から、最小と最大の本数の見込みを求めた結果、最小で222本、最大で444本。現行の治験薬製造では、1バッチあたりの最大製造本数は222本であるため、本治験の実施には最小と最大で、それぞれ治験薬を1バッチと2バッチ分製造する必要がある事が明らかとなった。現行で治験薬を製造するための原料(原薬)は、治験薬1バッチあたり4バッチ~5バッチ程度必要であるため、目的とする治験薬製造を達成するには、原薬製造を最小と最大で、それぞれ5バッチと10バッチ分の製造が必要である事が明らかとなった(表1)。

治験の開始を早期に実現するためには、最低限必要な本数である222本の治験薬を早期に製造できるよう、原料である原薬の製造を進めておく必要があるため、平成26年度は製剤1バッチ分の製造に必要な原薬について5バッチ分の製造を行った。治験薬GMP体制下で製造を完了した原薬について、規格値に適合するかどうかを確認するために品質管理試験を実施した結果、設定した規格の範囲内である事が明らかとなり、目的とする治験薬の製造用原料までの製造を完了した。これまでに実施した長期安定性試験の結果から、治験薬の保存安定性が21ヶ月から24ヶ月であるため、今後治験準備の進捗状況を考慮して治験薬の製造と、追加5バッチ分の原薬製造を進める計画である。

次に第2相治験へ早期に進めために必要である、製造スケールの拡大と、医薬品GMP製造への移行に必要なレベルアップについて研究開発を実施した。現行では10Lスケールでの治験薬の製造を実施しているが、第2相では目標症例数が30例から50例程度になると予測されるため、計画している医師主導治験(目標症例数6例から12例)に対して4倍から5倍量の治験薬が必要になると予測された。そのため、現行の5倍スケール(50L)への拡大を目標としてスケールアップの検討を実

施した。現行のスケールの製造工程との同等性の確保と、将来医薬品GMPへのレベルアップを想定して、スケールアップの方向性を検討した。医薬レベルのHVJ-Eの製造工程は、培養工程、攪拌工程、精製工程、製剤化工程の4種類に分類される。培養工程と攪拌工程については、今後のバイオ医薬で主流になると考えられるシングルユーステクノロジーを採用し、スケールを5倍の範囲(10Lから50L)で適宜設定できる仕様で進める事とした。精製工程についてはカラム高を一定にしてカラム径の拡大で対応することとし、医薬品レベルへの移行を考慮して、カラムと樹脂の選択を行う事とした。製剤化工程については精製工程までの確立を達成した時点で件津を進める事とした。平成26年度は、攪拌工程と精製工程のスケールアップを実施した。攪拌工程については、樹脂性のバックに目的の溶液を充填して攪拌した際の温度分布と均一性を、精製工程については精製用樹脂を充填したカラムの理論段数を、それぞれ指標としてIQ: Installation Qualification (据付時適格性確認)、及びOQ: Operational Qualification (稼働性能適格性確認)を実施した結果、いずれの指標についても目標とする規定値の範囲内である事が明らかとなり、スケールアップの妥当性が検証された。

D. 考察

本研究では、胸膜内に発生した悪性腫瘍内に被験物質であるHVJ-Eを投与する計画であるため、投与の安全性を確保する必要がある。実施計画では、血液中の酸素分圧を測定して機能的な異常の発生をリアルタイムでモニタリング予定である。更に、血中の被験物質の濃度をモニタリングする事で、より確実に投与の安全性を確保する計画である。平成26年度の試験により、試験法の妥当性が実証されたことから、臨床における安全性の確保するため、今後の実施計画書策定の際に、全血を採取するタイムポイントの設定を進める計画である。また、3ヶ月から6ヶ月の反復投与と安全性試験の実施も計画しており、評価項目としてトキシコキネテ

イクス試験（TK試験）の組み込みを計画している。本年度のバリデーション試験の結果から試験法の妥当性が確認されたことから、より長期間、高用量の投与を実施した場合の安全性についても検証を進めていく計画である。

現在までに策定している実施計画書の内容に従って、医師主導治験を早期に完遂するために必要な治験薬製造の準備を実施した。治験実施計画書では、目標症例数の範囲に幅が設定されており、最低で6症例、最大で12症例の登録が計画されている。そのため、治験開始までには少なくとも最少の症例数で実施した場合に必要な治験薬が必要であると考えられた。実施計画書の内容に従って本数の算出を行った結果222本以上のバイアル数が必要である事が明らかとなったため、今年度はその製造に必要な原料（原薬）を治験薬GMP製造レベルで実施し、治験薬製造に最低限必要な原料を確保した。治験薬の長期保存安定性試験の結果から、製剤化を行った治験薬については有効期間を21ヶ月から24ヶ月で設定するため、今後治験の準備状況を確認して治験薬としての製剤化（凍結乾燥）と、追加バッチの製造時期を調節しながら治験薬の製造を実施する予定である。

本研究で開発しているHVJ-Eを、医療用医薬品として上市するには、第2相治験と承認申請を実施する必要がある。対象疾患である悪性胸膜中皮腫は、現在のところ標準治療がペメトレキセド（アリムタ）とシスプラチンの併用療法のみであり、新規治療法の早期確立が切望されている。そのため、開発の迅速化を目的として治験薬GMP製造のスケールアップと、承認申請までに必要となる製造技術のレベルアップ（医薬品GMPレベル）を実施した。スケールアップについては、培養工程と攪拌工程でシングルユーステクノロジーを採用し、必要な製造スケールに適宜調

整できる製造技術の開発を実施した。精製工程については現行工程との連続性を重視し、カラム高を一定にしたスケールアップを実施した。今年度はそれぞれの工程についてガイドラインに従ってIQ：Installation Qualification（据付時適格性確認）と、OQ：Operational Qualification（稼働性能適格性確認）までの段階までの検証作業を完了した。そのため、今後は実際に製造用原料を使用して実施するPQ（Process Qualification）の段階を経て、治験薬GMP製造へと製造技術の確立を進める予定である。

E．結論

平成26年度は医師主導治験の実施に必要な安全性試験の実施に必要なバリデーション試験を実施し、設定した測定法が定量試験として妥当である事が実証された。この結果は、投与法の安全性確保に必要な上、長期間かつ高用量の投与を実施する場合の安全性を確認する試験の基盤となる成果である。

平成26年度は治験薬の製造も実施し、目標となる治験実施に最低限必要なバイアル数を確保できる原薬製造まで完了した。また、治験薬GMP製造のスケールアップと、医薬品GMP製造へのレベルアップのために新規製造技術の確立を実施し、目標とする計画策定とガイドラインに準拠したIQ/OQを完了した。このように、治験薬製造については目標としていた計画策定、製造準備を計画の通り達成した。

F.研究発表

特になし。

G．研究発表

特になし。

H．知的財産権の出願・登録状況 今年度の新たな出願はない。

表 1 . 医師主導治験の実施に必要な治験薬の必要本数の計算

用量	治験薬	予定症例数		治験薬の本数		治験薬（製剤） バッチ数		原料（原薬） バッチ数	
	（本/症例）	最低	最高	最低	最高	最低	最高	最低	最高
低用量	25	3	6	75	150				
高用量	49	3	6	147	294				
合計		6	12	222	444	1	2	5	10

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん(悪性胸膜中皮腫)治療薬開発のための医師主導治験の実施」

機関名 大阪大学大学院医学系研究科
大阪大学医学部付属病院

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果(発表題目、口頭・ポスター発表の別)	発表者氏名	発表した場所(学会等名)	発表した時期	国内・外の別
ウイルスに学ぶ癌治療戦略(口頭、教育講演)	金田安史	第11回日本中性子捕捉療法学会	2014/7/6	国内
Development of anti-cancer strategies using Sendai virus envelope (HVJ-E) and current status of clinical applications to treat cancer patients(口頭、理事長講演)	Kaneda, Y	第20回日本遺伝子治療学会	2014/8/7	国内
Virosome-mediated cancer treatment from basic to clinic(口頭、招待講演)	Kaneda, Y	第8回韓国遺伝子細胞治療学会	2014/10/11	国外
Toward a clinical application of pseudovirion to cancer therapy. Novel therapy of hemagglutinating virus of Japan Envelope (HVJ-E) for intractable cancer. (ポスター発表)	Lee CM, Saito A, Tanemura A, Nonomura N, Kaneda Y.	サンフランシスコ(Molecular Medicine Tri-Conference (Cancer Immunotherapy 2015))	2015/2/19-20	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文(発表題目)	発表者氏名	発表した場所(学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Clinical predictor of pre- or minimally invasive pulmonary adenocarcinoma: possibility of sub-classification of clinical T1a.	Sawabata N, Kanzaki R, Sakamoto T, Kusumoto H, Kimura T, Nojiri T, Kawamura T, Susaki Y, Funaki S, Nakagiri T, Shintani Y, Inoue M, Minami M, Okumura M.	Eur J Cardiothorac Surg	2014; 45(2):256-2	国外

Multimodality treatment for advanced thymic carcinoma: outcomes of induction therapy followed by surgical resection in 16 cases at a single institution.	Shintani Y, Inoue M, Kawamura T, Funaki S, Minami M, <u>Okumura M.</u>	Gen Thorac Cardiovasc Surg.	2014 in press.	国外
Impact of cardiopulmonary complications of lung cancer surgery on long-term outcomes.	Nojiri T, Inoue M, Takeuchi Y, Maeda H, Shintani Y, Sawabata N, Hamasaki T, <u>Okumura M.</u>	Surg Today	In press.	国外
Surgery for pulmonary malignancies in patients with a previous history of head and neck squamous cell carcinoma.	Kanzaki R, Inoue M, Minami M, Shintani Y, Nakagiri T, Funaki S, Kogo M, Yura Y, Inohara H, Sawabata N, <u>Okumura M.</u>	Surg Today	2014;44:2243-224	国外

(注1)発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

(注2)本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん（悪性胸腺上皮腫）治療薬開発のための医師主導治験の実施」

機関名 国立病院機構 近畿中央胸部疾患センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Gefitinib/chemotherapy vs chemotherapy in EGFR mutation-positive NSCLC after progression on first-line gefitinib : the Phase III, randomised IMPRESS study (口頭)	Shinji Atagi, Jean-Charles Soria, Tony SK Mok, Yi-Long Wu, Sang-We Kim, Jin-Ji Yang, Myung-Ju Ahn, Jie Wang, Chih-Hsin Yang, You Lu, Santiago Ponce, Xiaojin Shi, Alan Webster, Haiyi Jiang, Kazuhiko Nakagawa Shinji Atagi, Jean-Charles Soria, Tony SK Mok, Yi-Long Wu, Sang-We Kim, Jin-Ji Yang, Myung-Ju Ahn, Jie Wang, Chih-Hsin Yang, You Lu, Santiago Ponce, Xiaojin	第55回日本肺癌学会学術集会	2014. 11	国内
EGFR遺伝子変異陽性NSCLCの1次治療としてerlotinib+bevacizumabを評価するランダム化第Ⅱ相試験：J025567（口頭）	安宅 信二, 瀬戸 貴司, 加藤 晃史, 西尾 誠人, 後藤 功一, 山本 昇, 岡本 勇, 山中 竹春, 原田 亮介, 福岡 正博, 山本 信之	第55回日本肺癌学会学術集会	2014. 11	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
--------------	-------	------------------	--------	--------

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「化学療法に対する抵抗性を克服することを目的とした希少がん（悪性胸膜中皮腫）治療薬開発のための医師主導治験の実施」

機関名 兵庫医科大学 呼吸器内科

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
繊維形成型悪性胸膜中皮腫のFDG-PET所見の検討（ポスター）	寺田 貴普, 田端 千春, 堀尾 大介, 柴田 英輔, 金村 晋吾, 政近 江利 子, 本田 実 紀, 神谷 瞳, 三上 浩 司, 野木 佳 幸, 大橋 泰 一郎, 栗林 康造, 家城 隆次, 中野 季司, 近藤 展行, 長谷川 誠紀, 鳥井 郁子, 辻村 亨, 塚本 吉 胤, 廣田 誠 一	第55回日本肺癌学術 集会（京都）	2014年11月	国内
悪性胸膜中皮腫における、胸膜切除・肺剥皮術を施行した症例に対する術後化学療法の検討（口頭）	大橋泰一郎, 家城隆次, 堀 尾大介, 金村 晋吾, 柴田英 輔, 政近江利 子, 神谷瞳, 本田実紀, 三 上浩司, 野木 佳幸, 寺田貴 普, 栗林康 造, 田端千 春, 黒田鮎 美, 橋本昌 樹, 多久和輝 尚, 松本成 司, 近藤展 行, 長谷川誠 紀, 中野季司	第55回日本肺癌学術 集会（京都）	2014年11月	国内

Postoperative chemotherapy after pleurectomy/decortication for malignant pleural mesothelioma (口頭)	Kozo Kuribayashi, Taiichiro Otsuki, Ryuji Ieki, Koji Mikami, Yoshitaka Nogi, Takayuki Terada, Chiharu Tabata, Masaki Hashimoto, Teruhisa Takuwa, Seiji Matsumoto, Nobuyuki Kondo, Seiki Hasegawa, Takashi Nakano	IMIG2014 (Cape town)	2014年10月	国際
Newly synthesized anticancer agent HUHS1015(naftopidil analogue) is effective for malignant pleural mesothelioma(MPM).(口頭)	Ryuji Ieki, Takashi Nakano, Yoshiki Kaku, Taiichiro Otsuki, Kozo Kuribayashi, Akinobu Gotoh, Akito Tanaka, Tomoyuki Nishizaki	IMIG2014 (Cape town)	2014年10月	国際
Rare germline variants of transcription regulator genes in malignant mesothelioma (ポスター)	Yoshikawa Yoshie, Otsuki Taiichiro, Kubo Shuji, Sato Ayuko, Tsujimura Tohru, Emi Mitsuru, Nakano Takashi, Hashimoto-Tamaoki Tomoko	The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Yokohama)	2014年9月	国内
Malignant Pleural Mesothelioma—Diagnosis and Treatment(口頭)	Takashi Nakano	ACOH2014 (Fukuoka)	2014年9月	国際
Mesothelioma: diagnosis and management (口頭)	Takashi Nakano	19th Congress of Asian Pacific Society of Respiriology (Bali)	2014年11月	国際

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所 （学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
転移性肺腫瘍	中野孝司	今日の治療指針2014年 度版 308-309	2014	国内
中皮腫の治療	中野孝司、 寺田貴晋	縦隔腫瘍・胸膜腫瘍、 腫瘍病理鑑別診断アト ラス 277-281	2014	国内
胸膜中皮腫およびその他の胸 膜疾患	中野孝司、 栗林康造、 大橋泰一郎	呼吸器疾患診療最新ガ イドライン 271-277	2014	国内
じん肺症	中野孝司	今日の治療指針2015年 度版 331-332	2015	国内

（注1）発表者氏名は、連名による発表の場合には、筆頭者を先頭にして全員を記載すること。

（注2）本様式はexcel形式にて作成し、甲が求める場合は別途電子データを納入すること。