

平成 24 年 7 月 13 日

岡山大学病院から申請のあった
遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について

遺伝子治療臨床研究作業委員会
委員長 島田 隆

岡山大学病院から申請のあった下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙のとおりとりまとめたので報告いたします。

記

1. 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
申請者：岡山大学病院 病院長 榎野 博史
申請日：平成 23 年 11 月 14 日

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名： 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

(2) 申請年月日： 平成 23 年 11 月 14 日

(3) 実施施設： 岡山大学病院
代表者： 病院長 槇野 博史

(4) 総括責任者： 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
消化器外科学 教授 藤原 俊義

(5) 対象疾患： 頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）
導入遺伝子・

ベクターの種類： ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格としてテロメラゼ活性依
存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス（Telomelysin）

用法・用量： 1) Telomelysin の投与方法

投与量は、低用量（ 1×10^{10} vp）、中用量（ 1×10^{11} vp）、
高用量（ 1×10^{12} vp）の 3 群で、投与ウイルス液量は 1 ml
（0.2ml 程度ずつ腫瘍内 5 カ所に注入）とする。麻酔下に、
細い注射針を装着した注射器、穿刺針等を用いて、腫瘍内 5
カ所に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。
重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ
病変に投与を行う（計 3 回）。

2) 放射線治療の併用

有害事象がみられなければ、第 4 日目から 2Gy/日、5 回
/週で、総線量 60Gy の放射線治療を施行する。リンパ節領
域を含む広範な照射野に 5 週間で 50Gy 照射し、さらに照射
野を絞って 1 週間 10Gy を追加する。

研究実施期間： 厚生労働大臣より了承された日から 3 年間

目標症例数： 12 例（低用量 3 例、中用量 3 例、高用量 3 例とし、最大耐量
ではさらに 3 例追加。また、副作用の出現状況により最大 24
例。）

(6) 研究の概略：

本研究は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後
に再発し追加切除が困難な頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）の症例

を対象として、腫瘍選択的融解ウイルスである Telomelysin を腫瘍内局所投与し、同時に局所放射線治療を行った場合の安全性と治療効果の検討を目的とする。

(7) その他（外国での状況等）：

2006 年 10 月より、米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、投与部位の局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象は認められなかった。

2. 遺伝子治療臨床研究作業委員会における審議概要

1) 事前の意見・照会事項及びその回答

作業委員会会合の開催に先立ち、各委員より申請者に対して、平成 24 年 2 月 14 日に遺伝子治療臨床研究実施計画申請書等に係る意見・照会事項を送付し、同 3 月 9 日に申請者よりそれに対する回答を得た。主な意見・照会事項及び回答の概要は以下の通りである。

（作業委員会委員からの主な意見・照会事項及びそれに対する回答）

ア. 今回の対象疾患（頭頸部、胸部悪性腫瘍等）に対する米国での第 I 相試験における Telomelysin の治療効果をどのように捉えているか。

【回答】米国での臨床試験は、安全性の確認のための第 I 相試験であり、登録患者は進行症例がほとんどであった。したがって、臨床効果として顕著なものは認められなかったが、症例によっては腫瘍縮小効果もみられており、さらに各種治療を行う前の患者を対象として治療効果を検証すべきと考える。

イ. 本製剤の有効期限はあるか。その場合の保存性に関する根拠データを示すこと。

【回答】本製剤の有効期限は、現段階では不明である。ただし、製造後から 72 ヶ月経過時までの定期的な品質試験の結果、本剤は 72 ヶ月まで保存性を有すると判断されており、現時点での安定性には問題ないと考える。今後、12 ヶ月毎に品質試験を実施し、安定性を確認する。

ウ. 患者に投与される Telomelysin の最終産物について、純度等を含む安全性の検証をしているか。

【回答】米国の臨床試験で投与された Telomelysin は、投与前に純度等を含む安全性の検証を行っており、実際に患者に投与した際の安全性も確認されている。これと同一ロットの Telomelysin を本臨床研究にも使用する予定である。また、臨床研究の開始前に Telomelysin を輸入し、純度等を含む受け入れ試験を行った上で患者に投与する予定である。

エ. 日本での投与計画は、米国での臨床試験と異なり、放射線治療を併用し、また複

数回投与である。この場合、ウイルスの排出に変化が生じるかを考察すること。

【回答】単回投与と複数回投与でウイルス排出に大きな変化はないと思われる。また、放射線治療を併用した場合、腫瘍細胞の細胞死が増強し、腫瘍細胞内に存在する Telomelysin が血液中により多く漏出する可能性があるが、血液中の抗アデノウイルス抗体によって中和されるため、他の正常組織への蓄積はほとんど見られないと思われる。放射線との併用がウイルスの体内動態を変化させて重篤な副作用を引き起こす可能性は少ないと考える。

オ. 対象疾患を頭頸部・胸部悪性腫瘍とした理由を説明すること。

【回答】本臨床研究は放射線治療との併用でウイルスの局所投与を行うものであるため、放射線治療が単独で施行される可能性のある疾患として、食道癌、肺癌、咽頭、喉頭癌が主な対象疾患となることを想定し、頭頸部・胸部悪性腫瘍とした。

カ. 非小細胞肺癌の場合、肺局所への放射線照射は放射線肺臓炎などを起こしやすくなると考えられるが、多発性の肺癌も対象とするのか。

【回答】本治療により何らかの臨床的効果を期待する病巣とは、局所での腫瘍制御が緩和的意味のある状態の癌と考えられるため、多発肺癌は本臨床研究の対象にはならないと考える。

キ. 学内の審査委員会の質疑において対象外とされた放射線治療の既往について、除外基準に明記すること。

【回答】除外基準に明記した。(実施計画書 45 ページ (本資料 73 ページ))

ク. Telomelysin の追加投与について、追加投与が可能かどうかの判断基準を示すこと。

【回答】実施計画書に、Telomelysin の追加投与に関する判断基準を以追加記載した。(実施計画書 47,48 ページ (本資料 75~76 ページ))

ケ. 治療終了後のフォローアップ期間 (12 カ月) が十分であることを説明すること。

【回答】Telomelysin の治療効果は投与後次第に減弱するため、治療終了後 1 年以上の長期にわたり治療効果が持続する可能性は低いと考えられる。米国の臨床試験においても治療終了後 2 カ月のフォローアップを行っており、本臨床試験でのフォローアップ期間は十分な観察期間であると思われる。

コ. アデノウイルスの細胞内での複製に対する放射線の影響をどのように考えるか。

【回答】放射線照射が細胞内での Telomelysin の複製増殖に影響しないことを実際に確認している。また、Telomelysin は細胞に感染後 24 時間で急速に増殖するが、本研究では Telomelysin 投与から 3 日後または 1 日後に放射線照射を行うため、放射線照射前に十分ウイルスが増殖していることが推測される。

サ. 放射線治療との併用により副作用が増大する可能性も否定できないことから、放射線治療併用下で反復投与することの妥当性を説明すること。

【回答】非増殖型 5 型アデノウイルスベクターと放射線治療を併用する米国での第 II 相臨床試験の結果や、別の第 I 相試験におけるウイルスの体内動態の結果から、本臨床研究においても安全に施行可能と思われるが、それを検証するために Telomelysin の投与量を段階的に増量することとしている。

シ. 利益相反に関する事項を、実施計画書及び説明同意文書に記載すること。

【回答】実施計画書及び説明同意文書に追記した。

ス. 説明同意文書において、米国での臨床試験で 1 回投与を受けた場合の副作用について記載されているが、2008 年より 5 回投与が開始されているため、この場合の副作用に関する説明を記載すること。

【回答】説明同意文書に追記した。

2) 作業委員会における審議

① 開催日時： 平成 24 年 3 月 27 日(火) 13:00～15:00

② 議事概要：

平成 23 年 11 月 14 日付けで岡山大学病院より申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：頭頸部・胸部悪性腫瘍）についての審議を行った。

まず、研究実施計画について総括責任者から説明を受けた後、当該説明内容及び提出資料を基に、委員間で実施計画の科学的妥当性等について審議を行った。

その結果、本計画は概ね了承されたが、ウイルス検出法のバリデーション、放射線治療との組み合わせとしての評価等について確認した後、科学技術部会に報告することとされた。

なお、指摘事項は平成 24 年 4 月 18 日に発出され、同 5 月 9 日に申請者より回答が提出された。これらを踏まえた実施計画書等の整備については、同 6 月 4 日に委員長により了承された。指摘事項の内容及び回答の概要は以下の通りである。

(本作業委員会の指摘事項及びそれに対する回答)

ア. 米国での Telomelysin 単独投与の第 I 相臨床試験において、投与前サンプルにおいて尿中にウイルス DNA が検出されたことについて、検査方法の妥当性を報告すること。

【回答】検体取り違えの可能性は否定できないものの、現時点で Telomelysin 投与前の検体からウイルス DNA が検出されたことについては、原因不明としか回答できない。本臨床研究における体液中 Telomelysin DNA の検出に関しては検査会社への委託を考えており、開始前に同様のバリデーションを実施する予定である。

イ. 放射線照射量が 60Gy に達しなかった症例の評価上の取扱いなど、放射線治療と

の併用についてコンビネーションセラピーとしての評価を行うことを検討すること。

【回答】本臨床研究では Telomelysin と放射線治療の併用における安全性・有効性を検討するが、その作用機序から Telomelysin は放射線増感剤としての薬効の検証とも言える。安全性に関しては、それぞれの副作用プロファイルが想定できることから、あくまでも 60Gy の放射線治療が完遂できた症例における Telomelysin の副作用、有効性について解析を行いたい。放射線治療由来と考えられる副作用により 60Gy に達しなかった症例は、評価不能症例として本臨床研究の解析対象からは除外する。

ウ．複数の癌種を対象としていることから、被験者の選定に当たっては、それぞれの癌種について個別の判断を行う必要があると考えられる。そのため、被験者の選定に当たっては慎重に検討を行うこと。

【回答】本臨床研究では食道癌、頭頸部癌、肺癌が対象となり、それらの患者の適応を検討する必要がある。研究体制では、それぞれの癌種を扱う診療科の医師が臨床研究分担医師となっており、症例の登録前には担当となる診療科で十分な検討がなされ、その適応について慎重に検討した上で患者への説明を行う。

3. 遺伝子治療臨床研究作業委員会の検討結果

岡山大学病院から申請のあった遺伝子治療臨床研究実施計画（対象疾患：頭頸部・胸部悪性腫瘍）に関して、遺伝子治療臨床研究作業委員会は、主として科学的観点から以上のとおり論点整理を進め、それらの結果を実施計画及び患者への同意説明文書に適切に反映させた。その上で、本作業委員会は本実施計画の内容が科学的に妥当であると判断した。

厚生科学審議会科学技術部会 遺伝子治療臨床研究作業委員会 委員名簿

【 岡山大学病院 】

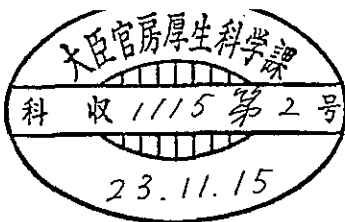
「頭頸部・胸部悪性腫瘍に対する腫瘍選択的融解ウイルスTelomelysinを用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究」

氏 名	所 属
あうと てるよ 荒戸 照世	(独)医薬品医療機器総合機構 レギュラトリーサイエンス推進部 研修課長
おおはし とうや 大橋 十也	東京慈恵会医科大学 DNA医学研究所教授
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
おのであ まさみ 小野寺 雅史	(独)国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
たに けんざぶろう 谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

疾患専門

あんどう のぶとし 安藤 暢敏	東京歯科大学市川総合病院 病院長
かとう たかくに 加藤 孝邦	東京慈恵会医科大学 耳鼻科学教室教授

○：委員長（五十音順 敬称略）



別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 23 年 11 月 14 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	岡山県岡山市北区鹿田町 2 丁目 5 番 1 号 (郵便番号 700-8558)
	名称	岡山大学病院 (電話番号 086-223-7151) (Fax 番号 086-223-7636)
	代表者 役職名・氏名	岡山大学病院長 榎野 博史 (印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添のとおり実施計画に対する意見を求めます。

記

遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
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	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授・藤原 俊義



遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 概 要 書

平成23年 11月 14日

研 究 の 名 称	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
研 究 実 施 期 間	厚生労働大臣による了承の日より3年間

総括責任者	所属部局の所在地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	所属機関・部局・職	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学・教授	
	氏 名	藤原 俊義  印	
実施施設	所 在 地	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (郵便番号 700-8558)	
	名 称	岡山大学病院	
	連 絡 先	岡山市北区鹿田町 2-5-1 (電話番号 086-235-7257) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・消化器外科学	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	那須 保友	岡山大学病院・新医療研究開発センター・教授	遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の監督
	金澤 右	岡山大学病院・放射線科・科長	放射線治療の施行、画像診断、臨床観察、効果判定
	佐々木 朗	岡山大学病院・口腔外科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	山本 和秀	岡山大学病院・消化器内科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	谷本 光音	岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・科長	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	白川 靖博	岡山大学病院・消化管外科・講師	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定
	香川 俊輔	岡山大学病院・消化管外科・講師	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定
	宇野 太	岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教	ウイルスの投与、臨床観察、効果判定
	田澤 大	岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教	ウイルスの管理・調製、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本の管理・処理、分子生物学的解析

	野間 和広	岡山大学・医療教育統合開発センター・助教	ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本の管理・処理
	浦田 泰生	オンコリスバイオフーマ（株） 代表取締役社長	ウイルスの提供、輸入手続、受け入れ試験の実施
審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由		別紙のとおり（添付資料 7.1 参照）	
		審査委員会の長の職名	氏 名
		岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長	伊達 勲 

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究	遺伝子治療標識研究
研究の目的	Telomelysin (OBP-301)は、ヒトアデノウイルス5型を基本骨格とし、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス (Oncolytic Virus)である。80-85%以上のヒト悪性腫瘍でテロメラーゼ活性の上昇が認められるため、Telomelysin は多くの癌細胞で増殖し、極めて広範な抗腫瘍活性を有する。一方、一般的にテロメラーゼ活性の低い正常組織ではその増殖が抑えられ、細胞死は誘導されず、安全性が確保される。また、前臨床研究により、Telomelysin の腫瘍内投与と局所放射線治療の明らかな併用効果が確認されている。 本研究では、頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）を対象に、Telomelysin を腫瘍内局所投与し、同時に局所放射線治療を行った場合の安全性の検討（最大耐量の推定）（主要エンドポイント）と評価可能症例における治療効果の観察（副次エンドポイント）を目的とする。まず、放射線照射量を一定としてTelomelysin 投与量の段階的増量を行い、併用治療の質的・量的安全性を確認する。また、局所の治療効果の判定を行うとともに、奏効の持続期間、腫瘍進行までの期間、生存期間、癌に伴う病的状態の改善効果（quality of life ; QOL、嚥下機能、呼吸機能、疼痛軽減、Performance Status、など）について評価する。さらに、腫瘍退縮や転移抑制、生存期間の延長などを期待する際の根拠となる分子生物学的効果や病理組織学的変化について解析する。 Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ（株）によって臨床開発が進められている。本臨床研究では、米国で行われた各種進行固形癌を対象としたTelomelysin の第I相臨床試験のために、オンコリスバイオファーマ（株）がIntrogen Therapeutics 社にて製造したTelomelysin の臨床ロットを輸入して使用する。本臨床研究は、岡山大学病院とオンコリスバイオファーマ（株）の共同研究であり、現時点では製造販売承認を目的とした治験ではない。	
対象患者及びその選定理由	1) 対象疾患 本研究は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した頭頸部・胸部悪性腫瘍症例、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる症例を対象とする。具体的には、遠隔転移を認めないが周辺リンパ節転移や隣接臓器への直接浸潤により治癒切除が不可能な症例、また遠隔転移が認められても転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により生命予後が期待できない、あるいは著しく生活の質（QOL）を損なうような症例から選別される。疾患としては、頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌を対象とする。 2) 対象疾患の選定理由 頭頸部癌、食道癌、肺癌が局所性に存在する場合は外科的切除が最も確実な治療法であるが、診断時に周辺リンパ節や隣接臓器への浸潤のため根治切除不能となる進行癌も多く、また初期治療後の再発症例では高率に外科的切除不可能である。腫瘍が小さくても、機能温存のために外科的切除ができない症例も多く、その場合は放射線治療や化学療法、あるいはその併用が試みられる。放射線化学療法の進歩により徐々に進行症例の予後も改善されつつあるが、化学療法の副作用により治療が完遂できない場合も多くみられ、特に高齢者などではその傾向が顕著に認められる。したがって、安全性の高い、より優れた集学的治療法の開発が望まれている。 a) 頭頸部癌 頭頸部癌とは、口唇・口腔、咽頭、喉頭、上顎洞、唾液腺、甲状腺から発生する悪性腫瘍の総称であり、組織型は多彩であるが、扁平上皮癌が圧倒的に多い。男性では喉頭癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌と続くが、女性では甲状腺癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌、喉頭癌の順である。頭頸部領域は発声、呼吸、嚥下などの機能に重要であり、また視覚、嗅覚、味覚、聴覚、平衡覚といった感覚器が存在するため、その部位や亜部位により診断や治療方針、治療成績などが異なってくる。上顎洞癌、口腔癌、喉頭癌の領域では、手術、放射線治療、化学療法を組み	

入れた集学的治療が主体となった治療法の進歩により生存率は向上してきたが、現行の治療法ではさらなる生存率の改善は難しく、術後の機能障害が問題となる患者も多く存在する。咽頭のうち中ならびに下咽頭に発生する癌は、初期には症状の自覚が乏しいため進行癌が多く、標準的に外科的切除と放射線・化学療法が行われているが、生存率が低いこと、手術による機能障害がみられること、死因として局所再発と遠隔転移いずれもが認められることなどが問題であり、治療成績の向上には、やはり新たな有効な治療薬剤の開発が必要である。

b) 食道癌

本邦では毎年 10,000 人以上が食道癌に罹患する。その頻度は加齢とともに急激に増加し、高齢者が多いのが特徴である。切除不能例に関してはその予後は極めて不良であり、全身状態が良好であれば放射線、抗癌剤を併用したものが行われるが、高齢や心・肺・肝機能異常などの理由により至適量の抗がん剤投与や放射線照射が困難な患者も多くみられる。さらに、副作用による QOL の低下などの点からも標準的治療と呼べるものはまだ確立されていない。最近、抗体医薬品や分子標的薬剤など、従来の抗癌剤とは作用機序の異なる新規抗癌医薬品がすでに市場に出ているが、食道癌に対しては未だ開発が進んでいないのが現状である。したがって、局所進行食道癌に対する安全性と有効性を兼ね備えた新たな治療戦略の確立が望まれている。

c) 肺癌（非小細胞肺癌）

近年、本邦における肺癌患者の発生率は全年齢層において増加を続けており、肺癌は胃癌を抜いて本邦における男性癌死亡の第 1 位を占めるに至っている。原発性肺癌はその病理組織型により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌を一括した非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分類される。小細胞肺癌は一般に化学療法に対して高感受性の癌であり、生存期間の延長が認められるため化学療法が第一選択の治療となっているが、原発性肺癌の 80% 以上を占めている非小細胞肺癌は多くが診断時に切除不能の進行癌であり、治療成績は極めて不良である。外科療法、化学療法、放射線療法などを併用する集学的治療により、奏効率の向上や一定の腫瘍縮小効果は得られるようになってきたが、依然として発見時切除不能例が多く、副作用による QOL の低下や延命効果などの点でまだまだ満足すべき成績を達成できていないのが現状である。最近、特定のシグナル伝達経路を阻害する分子標的薬剤の感受性が特異的な遺伝子変異の有無に大きく関わっており、喫煙歴のない日本人女性の腺癌患者で有効であることが明らかになってきた。しかし、喫煙歴のある男性の扁平上皮癌患者ではその効果は期待できず、やはり新たな治療法の開発が必要と考えられる。

3) 当該臨床研究の概要

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。このウイルスの増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることができる。本研究では、頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）患者に、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を投与し、同時に局所放射線治療を行い、その治療効果と生物学的反応、及び安全性を検討する。Telomelysin は癌細胞に感染して細胞内で複製・増殖し、細胞破壊を引き起こすことで放出され、さらに周辺の癌細胞へと感染を広げて行く。ウイルスが癌組織内に拡散して行くとともに、連鎖的に細胞死を誘導し、広い範囲の癌組織が崩壊していくと期待される。放射線治療を併用することで Telomelysin の感染効率が増強し、Telomelysin は放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射感受性を増強する。また、放射線による細胞破壊はウイルス拡散を促進すると考えられる。しかし、正常組織に到達した時点で、テロメラーゼ活性がないためにウイルス増殖は止まり、正常細胞への影響は最小限に抑えられる。すなわち、頭頸部癌、食道癌、肺癌などのテロメラーゼ活性を有するヒト固形癌ではウイルスが増殖し、効率良く細胞死を誘導することが可能である。さらに、局所放射線療法を併用することで、より強力な抗腫瘍活性が発揮されると期待される。

遺伝子の種類及びその導入方法	本研究では、テロメラーゼ活性依存性に hTERT (human telomerase reverse transcriptase) プロモーターにより増殖し、癌細胞を選択的に破壊する腫瘍融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を用いる。hTERT はテロメラーゼの構成成分の一つであり、テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。 Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。hTERT プロモーターでは、転写開始部位より上流 181-bp が hTERT 活性化に必要なプロモーターのコア領域であり、本研究ではこの領域を含む 378-bp 断片を hTERT プロモーターとして用いた。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群の転写を活性化し、E1B タンパク質は、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。また、E1B の 55kDa タンパク質は、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することが明らかになっている。 本研究に用いられる Telomelysin は、米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において the current Good Manufacturing Practice (cGMP) に従った製造工程で製造された。Master Cell Bank (MCB) 由来の HeLa 細胞を Wave 200 バイオリアクターにて大量培養し、Master Virus Bank (MVB) 由来の Telomelysin ウイルスを感染させた後、カラムにて精製、各種品質試験を終えた後にバイアルに分注し保管されている。
これまでの研究成果	1) Telomelysin の前臨床研究 Telomelysin を癌細胞に感染させると、E1A、E1B mRNA、および E1A タンパク質の発現がみられたが、正常細胞ではそれらの発現は抑制されていた。また、Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5-10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3-10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、など様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の用量依存性の抗腫瘍活性を測定し、ID50 (50%の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin は広範な抗腫瘍活性を有していた。 2) Telomelysin と放射線治療の併用に関する研究成果 次に、ヒト肺癌細胞、食道癌細胞で Telomelysin と放射線治療の併用効果を検証したところ、明らかな相乗効果が確認された。これは、放射線照射が標的細胞のコクサッキー・アデノウイルス受容体の発現を増強することで Telomelysin の感染効率が上がったこと、および Telomelysin の感染が放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射線感受性を増強したことによると考えられる。 ヌードマウスの背部皮下にヒト肺癌細胞、食道癌細胞を移植し、腫瘍部位に放射線照射を行い、直後に Telomelysin を腫瘍内に注入した。この治療を 3 回繰り返したところ、放射線単独群、Telomelysin 単独群でも無治療群に比べて有意な抗腫瘍活性が認められたが、併用群では腫瘍の部分的な退縮がみられ、他のいずれの群よりも有意に強い抗腫瘍効果が観察された。 3) Telomelysin の第 I 相臨床試験 有望な前臨床研究の成果に基づき、2006 年 3 月、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) により、米国食品医薬品局 (US FDA) に治験申請 (IND application) がなされた。慎重な議論の後、8 月に承認を受け、10 月より米国テキサス州ダラスの Mary Crowley Medical Research Center (MCMRC) にて、各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験「A Phase I Dose-Escalation Study of Intratumoral Injection with Telomerase-Specific Replication-Competent Oncolytic

	Adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for Various Solid Tumors」が開始された。さらに、米国モンタナ州ビリングスの Billings Clinic を追加して多施設共同臨床試験体制とし、単回投与 16 例、複数回投与（1 回/週、5 回投与）7 例、計 23 例が登録され、単回投与 16 例、複数回投与 6 例、計 22 例に治療が行われた。腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者（悪性黒色種、唾液腺癌、舌癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、非小細胞肺癌、口腔底癌、基底細胞癌、胆嚢癌、乳癌、など）では、初期 3 例は 10^{10} virus particle (vp)、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高用量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。Telomelysin のウイルス DNA は 16 例中 13 例で一過性に血中に検出されたが、うち 3 例では 7 日後あるいは 14 日後に再度血中でウイルス DNA が認められ、腫瘍内でのウイルス増殖を示唆する結果と考えられる。投与後 28 日目の RECIST 判定では、評価可能であった 12 例中 11 例が SD、1 例が PD であり、56 日目には評価可能であった 9 例すべてが SD であった。悪性黒色腫患者 1 例では、28 日目で 33%、56 日目で 56.7% の腫瘍縮小がみられた。また、28 日目で SD であった患者のうち 4 例で生検が行われたが、組織学的に腫瘍壊死が観察された。複数回投与の症例については、現在、解析中である。これらの結果から、Telomelysin の単独投与は安全であり、ウイルス増殖が確認された症例では抗腫瘍効果が期待できると言える。 4) 腫瘍融解ウイルス(Oncolytic virus)に関する一般的な研究状況 遺伝子改変技術を応用することで、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることが可能である。最もよく研究されているのがアデノウイルスとヘルペスウイルスであり、米国を中心に前立腺がんの特異的な PSA プロモーターを用いた制限増殖型アデノウイルスや p53 遺伝子機能を欠失したがん細胞でのみ増殖可能な ONYX-015 (E1B 55kD 欠損アデノウイルス)、改変型ヘルペスウイルスである G207 や NV1020、治療遺伝子を持つ OncoVEX GM-CSF などの臨床試験が進められてきた。また、本邦でも名古屋大学などで、細胞増殖が活発にみられる癌細胞でのみ増殖可能であるヘルペスウイルスの自然変異株 HF10 の臨床応用も試みられた。さらに最近、東京大学から申請されていた進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47A を用いたウイルス療法の実施が承認されている。
安全性についての評価	1) Telomelysin の純度 本研究に用いられる Telomelysin は、現行の cGMP 基準に従って、Master Cell Bank (MCB)、Master Virus Bank (MVB) など原材料から製造工程、最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとに米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において生産されている。最終製品については、純度、確認試験、無菌試験、異常毒性否定試験、及びエンドトキシン試験等の安全性項目のすべてが確認されている。 2) 増殖性ウイルス出現の可能性 本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。しかし、293 細胞を用いた製造過程では、Telomelysin の hTERT プロモーター領域と 293 細胞が持つ内因性の E1A あるいは E1B プロモーターが相同組換えを生じる可能性は否定できない。 そこで、野生型アデノウイルス出現を防ぐ対策として、Introgen Therapeutics 社において子宮癌由来のヒト癌細胞 HeLa を用いた製造システムが開発された。Telomelysin は本来 E1 遺伝子を有しているため、E1 欠損アデノウイルスベクターのようにヘルパー細胞による E1 機能の補完は必要なく、hTERT プロモーターが活性化される細胞環境があれば複製・増殖することが可能である。アデノウイルスに感受性をもち、かつ無血清培地で浮遊状態での大量培養が可能であることから HeLa 細胞が選定された。HeLa 細胞にはプロモーター配列を含めて E1 遺伝子領域が内在せず、Telomelysin との相同部位が全く存在しないため、野生型アデノウイルスの出

	現は起こらないと理論的には考えられる。 実際に、Nested PCR 法を用いて野生型アデノウイルスの有無を確認したところ、293 細胞で製造した Telomelysin のロットには 10ng のウイルス中に 1pg (0.01%) の野生型アデノウイルスが検出可能であったが、HeLa 細胞で製造したロットでは検出限界以下であり、野生型アデノウイルスの混入はないものと考えられた。 3) Telomelysin の正常細胞での細胞障害性 ヒト正常線維芽細胞に対しては、Telomelysin は明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、ヒト正常肝細胞、ヒト正常腎上皮細胞、ヒト正常気道上皮細胞では、野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した。 4) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性 本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、コットンラットでの定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならびに測定した組織中で検出可能であった。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 E1A 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。 5) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性 Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。 6) 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験 米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、初期 3 例は 10^{10} vp、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高用量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。
遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由	岡山大学病院では、1996 年 1 月、学内に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置し、21 世紀型医療において重要な位置を占めるであろうと期待される遺伝子治療研究を推進してきた。肺癌および前立腺癌に対する遺伝子治療プロトコールは同審査委員会の了承を得て、文部省の学術審議会特定研究領域推進分科会バイオサイエンス部会専門委員会および厚生省の厚生科学審議会先端医療技術評価部会において審議され、それぞれ 1998 年、2000 年に文部大臣・厚生大臣からその実施が了承されている。 1999 年 3 月には他施設に先駆け、本邦ではじめての肺癌遺伝子治療を開始した。この臨床研究は、遺伝子治療では本邦ではじめての多施設共同研究に進み、岡山大学を中心に東京医大、東京慈恵会医大、東北大学が参画し、2005 年無事に臨床試験を終了している。また、2001 年 3 月には本邦初の前立腺癌遺伝子治療が実施され、2005 年に終了している。また、2008 年 2 月に厚生労働大臣から実施の承認を得た前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、現在も臨床研究を継続中である。したがって、ウイルス製剤の取り扱い場所、患者の研究を実際に行う施設（病棟、手術室、CT 室）およびそれらの運用を含めて、すでに整備され経験豊富なスタッフを擁しており、病院側の受け入

	れ体制は整備されている。さらに、審査体制を含めた学内の体制も充分確立され有機的に機能している。また、2003 年にはトランスレーショナル・リサーチの推進を目的として岡山大学病院内に遺伝子・細胞治療センターが設置され、2008 年には生物製剤などを用いた治療を行うための先端治療室、及びリサーチナースが治療後の患者をケアする患者回復室などが拡充整備されている。本研究も同センターの活動の一環として実施される予定である。 本研究で用いる Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、遺伝子・細胞治療センターを中心として <i>in vitro</i> から <i>in vivo</i> までの様々な前臨床研究が行われてきた。その研究成果をもとに、2004 年 3 月に Telomelysin をコア技術として岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ（株）が設立された。米国での第 I 相臨床試験はすでに終了しており、単回投与 16 例、複数回投与 7 例が登録され、安全性・忍容性、体内動態、臨床効果などに関する解析結果は FDA に報告されている。 以上より、致命的疾患である頭頸部・胸部悪性腫瘍を対象として、Telomelysin と放射線を併用してその安全性と抗腫瘍活性を検証する本研究は、岡山大学病院で実施することは十分可能であると判断した。
実 施 計 画	1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画 本研究は、進行再発頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌）症例における腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin の局所投与と放射線併用の安全性および抗腫瘍効果、生物学的反応の検討を目的とした第 I/II 相臨床研究である。治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データをもとに院内の遺伝子治療臨床研究審査委員会の下に設置された安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。部会で本研究の適応と判断された場合、文書によるインフォームド・コンセントを行い、同意が得られた場合に限り、以下の方法によって本研究を実施する。 被験者は、Telomelysin の投与を行う 21 日以上前にすべての治療（化学療法、放射線療法、免疫療法、etc.）を中止する。Telomelysin の局所投与と放射線併用による副作用の評価、治療効果、および Telomelysin の最大耐量（定義：最大の効果を認めかつ最小の副作用を示す用量）を推定するために、投与量を 1.0×10^{10} vp (viral particles) から開始して 10 倍ずつ増量し 1.0×10^{11} vp、1.0×10^{12} vp に至る 3 レベルの治療群を設定する。放射線治療は、対象疾患に応じて照射野を設定し、治療計画に従って 60Gy の治療を行う。Telomelysin の各用量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次用量レベルの上昇を行う。ただし、有害事象が発生した場合はその重篤度を評価し、プロトコールに従って症例数を追加し同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。最大耐量 (Maximum Tolerated Dose、MTD) では 3 人に投与して問題なければさらに 3 人、計 6 人の被験者で評価する。つまり、各用量レベルでの安全性の検討（最大耐量の推定）を行った後、治療効果の観察も行うことを目的とする第 I/II 相臨床研究として計画した。遺伝子治療終了後、評価基準に従って安全性ならびに治療効果を評価する。 2) 選定基準及び除外基準 【選定基準】 1) 20 歳以上の成人。 2) 組織学的あるいは細胞診によって証明された頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌）症例で、外科的切除により根治不能な局所的に進行した症例、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる症例。具体的には、遠隔転移を認めないが周辺リンパ節転移や隣接臓器への直接浸潤により治療切除が不可能な症例、また遠隔転移が認められても転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により生命予後が期待できない、あるいは著しく生活の質（QOL）を損なうような症例。また、外科療法、化学療法、放射線療法などの従来の治療法が何らかの理由（低肺機能や腎機能障害など）で受けられない症例で、被験者の希望がある場合は対象となりうる。 3) 被験者の腫瘍は、ウイルス液の局所的注入が可能であること。

- 4) 被験者の腫瘍は、測定可能、評価可能であること。
- 5) 被験者のウイルスが投与される腫瘍の面積が 1 cm^2 <、 25 cm^2 > であること。
- 6) 被験者は、12 週間以上の生存が期待でき、Performance Status (PS) が 2 以下。
- 7) 文書を用いた説明により文書による同意が得られた症例。
- 8) 妊娠・授乳をしていない、またはコンドームなどの体液の交換を伴わない適切な避妊を行っていること。
- 9) 骨髓機能と肝機能及び、腎機能が適切であること。

【除外基準】

- 1) コントロール不可能な活動性感染症等、重篤な併発疾患がある場合。
 - 2) 3 週間以内（ニトロソウレアもしくはマイトマイシン C を使用の場合は 6 週間以内）に化学療法、レーザー照射、ステント挿入が行われていた場合。
 - 3) 非局所的副腎皮質ステロイドが併用されている場合。
 - 4) 試験登録前 4 週間以内に未承認試験薬の臨床試験に参加していた場合。
 - 5) 試験対象悪性腫瘍以外の同時性、異時性悪性腫瘍がある場合。ただし根治しており、無病期間が 2 年以上に達している場合はこの限りでない。
 - 6) 試験計画書の遵守及び試験でのフォローアップが不可能である場合（精神的、家族的、社会的、地理的等の理由による）。
 - 7) 自家もしくは同種臓器、組織移植歴がある場合。
 - 8) 血清検査により、HIV 1、HIV 2、HBV、HCV が陽性の場合。
 - 9) その他担当医が不適当と認めた場合。
- 3) 実施期間及び目標症例数
実施期間は了承が得られた時点から 3 年間とする。目標症例数は原則として 12 例とするが、各用量レベルでの副作用の出現の有無によって最大 24 例とする。

4) Telomelysin の投与方法

各患者に対する Teloemelysin 投与量は、低用量 (1×10^{10} vp)、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) の 3 群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 ヲ所に注入するため、1 箇所あたり 0.2ml 程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいは CT ガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 > の腫瘍内 5 ヲ所（4 分割した区域と中心部）に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。Telomelysin の投与初日を第 1 日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ病変に投与を行い、計 3 回の治療を実施する。

5) 放射線治療の併用

すべての被験者は、第 1 日目に Telomelysin の投与を受けた後、有害事象がみられなければ、第 4 日目から 2Gy/日、5 回/週で、総線量 60Gy の放射線治療を施行される。リンパ節領域を含む広範な照射野に 5 週間で 50Gy 照射し、さらに照射野を絞って 1 週間 10Gy を追加する予定である。しかし、個々の患者の年齢、一般状態 (PS)、原発巣、病期、病理組織型、病巣の進展範囲、リスク臓器の位置などを考慮して適切な放射線治療計画をたてる。

6) 臨床検査項目及び観察項目

【治療開始前評価】

- 1) 初回の治療を開始する前に、被験者の病歴（並存疾患、アレルギー歴、手術歴、既往歴、常用薬、喫煙歴）及び現症について記録する。
- 2) 臨床検査データとしては、白血球分画、血小板数を含む CBC、PT、APTT、電解質、ビリルビン、クレアチニン、トランスアミナーゼなどを含む生化学検査一般、及び尿検査、胸部 X 線写真、心電図、腫瘍マーカーなどを記録する。
- 3) 治療開始以前に施行された抗癌療法の影響が認められる場合は、有害事象の評価指標に従ってその重篤度を判定し記録する。

- 4) 治療開始前の臨床病期を肉眼的観察、触診、画像診断、及び内視鏡診断により評価する。肉眼的あるいは内視鏡的に腫瘍が直視可能であれば一定の距離から写真撮影を行い、その位置と大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、やはりその位置と大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期は各種癌取扱規約に基づいて決定する。
- 5) 臨床的に必要と判断されれば、治療前に動脈血ガス分析、O₂ 飽和度、FEV_{1.0}を含む呼吸機能検査を施行する。
- 6) 唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 7) 血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン（Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ ）を測定する。また、アデノウイルス中和抗体価を測定する。さらに、血液中リンパ球サブセット（CD4、CD8、NK）を測定する。

【治療中評価】

- 1) 治療中定期的に被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療中定期的に行い記録する。
- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、治療中定期的に写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、定期的にその大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も定期的に再評価する。
- 4) 定期的に唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 5) 定期的に採取した血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン（Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ ）を測定する。また、血液中リンパ球サブセット（CD4、CD8、NK）を測定する。
- 6) 被験者が死亡した場合は剖検を依頼し、癌組織及び正常組織を採取し、同様に組織学的・分子生物学的検討を行う。
- 7) すべての被験者は、定期的に臨床効果及び毒性・副作用について評価される。

【治療後評価】

治療を終了した一ヶ月（28日）後、及び三ヶ月後に治療後評価を行う。

- 1) 被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査を行い記録する。
- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PETなどで抽出可能であれば、その大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も再評価する。
- 4) 生検にて癌組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて病変範囲、治療による細胞死の有無、腫瘍の消失などを初回生検組織と比較検討する。また、症例によっては抗 EIA 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の遺残を検討する。
- 5) 血液を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 6) アデノウイルス中和抗体価を測定する。
- 7) 臨床効果及び毒性・副作用について評価する。

7) 副作用の判定基準

治療中及び治療後に見られるすべての有害事象のうち、治療に関する毒性・副作用は、「副作用の評価指標」に基づいて grade 0-4 で評価する。この「副作用の評価指標」は、NCI (National Cancer Institute) の common toxicity criteria 日本語版 (有害事象共通用語基準 v3.0) に基づいて作成されたものである。副作用の認められた期間及びそれに対する治療についても記録する。致死的な副作用が生じた場合は、実施施設の長である岡山大学病院長を通じて厚生労働大臣に報告する。

Telomelysin の各濃度につき、それぞれ 3 人ずつの被験者に投与する。3 人の内 1 人に grade 3 以上 (血液系では grade 4) の副作用が認められた場合、さらに 3 人の被験者にその濃度の Telomelysin を投与する。6 人中 2 人以上の被験者で grade 3 以上 (血液系では grade 4) の副作用が見られた時点で、その濃度より 1 段階低くそれらの副作用を生じない濃度を最大耐量 (MTD) とする。MTD の副作用が認められた被験者では、1 段階低い濃度で治療を継続する。

8) 治療効果の評価方法及び評価基準

【臨床的効果】

評価は The Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group (RECIST Group) の評価基準を用いて、Telomelysin 投与病変および非投与病変について評価する。測定可能病変 (1 臓器 5 個、全体で 10 個まで) の最大長の和をもって効果を評価する。以下に RECIST 評価基準 (version 1.1) を示す。

Complete Response (CR): すべての測定可能病変の消失、病的リンパ節の短径の 10 mm 未満への縮小

Partial Response (PR): 少なくとも治療前の直径の和と比して 30% 減少

Progression (PD): 少なくとも治療前の最短径の和と比して 20% 増加、および少なくとも 5 mm の増加、あるいは新病変の出現

Stable Disease (SD): PR とするには腫瘍の縮小が不十分で、かつ PD とするには腫瘍の増大が不十分な場合

【病理組織学的検討】

腫瘍から生検にて採取した癌組織を用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて組織学的に検討する。症例によっては、抗 E1A 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の感染と拡散を確認する。

【総合効果】

各被験者の治療効果に関しては、以下の基準に従って総合的に評価する。

総合効果評価基準

投与病変	非投与病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	PR/SD	なし	PR
PR	PD を除く全て	なし	PR
SD	PD を除く全て	なし	SD
PD	全て	全て	PD
全て	PD	全て	PD
全て	全て	あり	PD

【腫瘍進行までの期間及び生存期間】

被験者の腫瘍進行までの期間は、Telomelysin 初回投与から腫瘍進行までの期間とし、生存期間は Telomelysin 初回投与日から死亡日までとする。

備 考	被験者の同意取得について：被験者は本臨床研究について、文書に基づいて説明を受け、その内容と期待される治療効果及び危険性を十分に理解し、自主的に同意をした上で、同意書に署名するものとする。なお、同意後も被験者からの申し出により同意を撤回し、本臨床研究への参加をいつでも中止することができるものである。 個人情報については、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「国立大学法人岡山大学医学部・歯学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程」に沿って適切な取り扱いを行うものとする。
-----	--

遺伝子治療臨床研究実施計画書

〔課題名〕

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

目 次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称.....	1
2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療研究に果たす役割.....	1
2.1. 総括責任者の氏名及び担当する役割	
2.2. 総括責任者以外の共同研究者氏名及びその担当する役割	
3. 実施施設の名称及びその所在地	2
4. 遺伝子治療臨床研究の目的.....	2
5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	2
5.1. 対象疾患に関する現時点での知見	
5.1.1. 頭頸部・胸部悪性腫瘍治療成績の現状	
5.1.2. 頭頸部・胸部悪性腫瘍の分子生物学的特性	
5.2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要	
5.3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選定した理由	
6. 遺伝子の種類及びその導入方法	9
6.1. hTERT プロモーターの構造と性質	
6.1.1. hTERT プロモーターの構造	
6.1.2. hTERT プロモーターの性質	
6.2. 本研究で使用するその他の組換え DNA の構造と性質	
6.2.1. E1A 及び E1B 遺伝子の構造と性質	
6.2.2. IRES の構造と性質	
6.2.3. SV40 ポリアデニレーションの性質	
6.3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的とした理由	
6.4. アデノウイルスを用いた治療法の概略及び当該治療法を選択した理由	
6.4.1. アデノウイルスを用いた治療法の概略	
6.4.2. アデノウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響	
6.4.3. 当該治療法を選択した理由	
6.5. Telomelysin の作成方法と構造	
6.5.1. Telomelysin の作製方法	
6.5.2. Telomelysin の構造	
7. これまでの Telomelysin に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果.....	22
7.1. 培養細胞を用いた研究の成果	
7.1.1. 培養細胞における Telomelysin 感染による選択的 E1 遺伝子発現とウイルス増殖	

7.1.2.	培養細胞における Telomelysin の細胞障害活性	
7.1.3.	培養細胞における Telomelysin と放射線治療の併用効果	
7.1.4.	放射線照射の培養細胞における Telomelysin の複製増殖・感染効率に及ぼす影響	
7.1.5.	Telomelysin の放射線感受性に及ぼす影響の検討	
7.2.	実験動物を用いた研究の成果	
7.2.1.	実験動物に投与された Telomelysin の抗腫瘍効果及び放射線治療との併用効果	
7.2.2.	Telomelysin を投与された実験動物における毒性及び体内分布に関する解析	
8.	安全性についての評価	36
8.1.	遺伝子導入方法の安全性	
8.1.1.	遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度	
8.1.2.	増殖性ウイルス出現の可能性	
8.1.3.	遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	
8.1.4.	体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	
8.1.5.	患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	
8.1.6.	染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	
8.1.7.	がん原性の有無	
8.2.	遺伝子産物の安全性	
9.	遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由	42
10.	遺伝子治療臨床研究の実施計画	43
10.1.	遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	
10.2.	被験者の選定基準及び除外基準	
10.2.1.	選定基準	
10.2.2.	除外基準	
10.3.	被験者の同意の取得方法	
10.4.	実施期間及び目標症例数	
10.5.	遺伝子治療臨床研究の実施方法（治療計画）	
10.5.1.	対象群及び治療群の設定	
10.5.2.	遺伝子導入方法（Telomelysin の投与方法）	
10.5.3.	放射線治療の併用	
10.5.4.	臨床検査項目及び観察項目	
10.5.5.	予測される副作用並びにその対処方法	
10.5.6.	遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判断基準	
10.5.7.	症例記録に関する記録用紙などの様式	

10.5.8. 記録の保存及び成績の公表の方法	
10.5.9. 実施計画の変更について	
11. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況	57
12. 当該遺伝子治療研究に関連する国内外の研究状況	58
12.1. 腫瘍融解ウイルス (Oncolytic virus) に関する一般的な研究状況	
12.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験	
13. 本研究における個人情報保護に関する対処	61
14. 利益相反	65
15. 参考文献のリスト	66

添付資料 1

研究者の略歴及び研究業績

添付資料 2

- 2.1. Telomelysin の全塩基配列
- 2.2. 治療開始前、治療中、及び治療後における評価項目及び評価スケジュール
- 2.3. 有害事象の評価指標

添付資料 3

説明と同意書

添付資料 4

- 4.1. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験プロトコール
- 4.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の報告書
- 4.3. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の論文

添付資料 5

医薬品医療機器総合機構 (PMDA) への製造確認申請相談資料

添付資料 6

当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況：施設概要と治療の流れ

添付資料 7

- 7.1. 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会の資料一式
 - 1) 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由

- 2) 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規程
 - 3) 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・適応判定部会要項
 - 4) 遺伝子治療臨床研究審査委員会ならびに安全・効果評価・適応判定部会名簿
 - 5) 第1回 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会要旨
 - 6) 第2回 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会資料
(アデノウイルスと放射線併用に関する安全性に関する文献的考察)
 - 7) 第2回 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会要旨
 - 8) 第3回 岡山大学病院遺伝子治療臨床研究審査委員会要旨
- 7.2. 国立大学法人岡山大学および岡山大学病院の保有する個人情報の適切な管理に関する資料
- 1) 岡山大学病院の保有する個人情報の適切な管理に関する規程
 - 2) 国立大学法人岡山大学の保有する個人情報の適切な管理に関する規程
 - 3) 国立大学法人岡山大学の情報公開に関する規程

添付資料 8

参考文献

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

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

2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療研究に果たす役割

2.1. 総括責任者の氏名及び担当する役割

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
遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の総括

2.2. 総括責任者以外の共同研究者氏名及びその担当する役割

臨床研究分担医師

那須 保友 岡山大学病院・新医療研究開発センター・教授
遺伝子治療臨床研究実施の総合判断及び研究全体の監督

金澤 右 岡山大学病院・放射線科・科長
放射線治療の施行、画像診断、臨床観察、効果判定

佐々木 朗 岡山大学病院・口腔外科・科長
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定

山本 和秀 岡山大学病院・消化器内科・科長
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定

谷本 光音 岡山大学病院・呼吸器・アレルギー内科・科長
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床観察、効果判定

白川 靖博 岡山大学病院・消化管外科・講師
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定

香川 俊輔 岡山大学病院・消化管外科・講師
患者の選定、患者への説明及び同意の取得、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定

宇野 太 岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教
ウイルスの投与、臨床観察、効果判定

田澤 大 岡山大学病院・新医療研究開発センター・助教
ウイルスの管理・調製、ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本の管理・処理、分子生物学的解析

野間 和広 岡山大学・医療教育統合開発センター・助教
ウイルスの投与、臨床観察、効果判定、標本の管理・処理

浦田 泰生 オンコリスバイオフーマ（株） 代表取締役社長
ウイルスの提供、輸入手続、受け入れ試験の実施

3. 実施施設の名称及びその所在地

名 称：岡山大学病院

所在地：〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

(TEL) 086-235-7507 (総務課) 086-235-7257 (消化器外科学)

(FAX) 086-232-1534 (総務課) 086-221-8775 (消化器外科学)

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

Telomelysin (OBP-301)は、ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格とし、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス (Oncolytic Virus)である。80-85%以上のヒト悪性腫瘍でテロメラーゼ活性の上昇が認められるため、Telomelysin は多くの癌細胞で増殖し、極めて広範な抗腫瘍活性を有する。一方、一般的にテロメラーゼ活性の低い正常組織ではその増殖が抑えられ、細胞死は誘導されず、安全性が確保される。また、前臨床研究により、Telomelysin の腫瘍内投与と局所放射線治療の明らかな併用効果が確認されている。

本研究では、頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）を対象に、Telomelysin を腫瘍内局所投与し、同時に局所放射線治療を行った場合の安全性の検討（最大耐量の推定）（主要エンドポイント）と評価可能症例における治療効果の観察（副次エンドポイント）を目的とする。まず、放射線照射量を一定として Telomelysin 投与量の段階的増量を行い、併用治療の質的・量的安全性を確認する。また、局所の治療効果の判定を行うとともに、奏効の持続期間、腫瘍進行までの期間、生存期間、癌に伴う病的状態の改善効果（quality of life ; QOL、嚥下機能、呼吸機能、疼痛軽減、Performance Status、など）について評価する。さらに、腫瘍退縮や転移抑制、生存期間の延長などを期待する際の根拠となる分子生物学的効果や病理組織学的変化について解析する。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

本研究は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した頭頸部・胸部悪性腫瘍症例、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる症例を対象とする。具体的には、遠隔転移を認めないが周辺リンパ節転移や隣接臓器への直接浸潤により治癒切除が不可能な症例、また遠隔転移が認められても転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により生命予後が期待できない、あるいは著しく生活の質（QOL）を損なうような症例から選別される。以下に、頭頸部・胸部悪性腫瘍を本研究の対象疾患とした選定理由を概説する。

5.1. 対象疾患に関する現時点での知見

5.1.1. 頭頸部・胸部悪性腫瘍治療成績の現状

a) 頭頸部癌

頭頸部癌とは、口唇・口腔、咽頭、喉頭、上顎洞、唾液腺、甲状腺から発生する悪性腫

瘍の総称であり、組織型は多彩であるが、扁平上皮癌が圧倒的に多く約 70%を占めている。男性では喉頭癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌と続くが、女性では甲状腺癌が最も多く、次いで口腔癌、咽頭癌、喉頭癌の順である。口腔癌・咽頭癌の罹患数は増加傾向にあり、1998 年の年齢調整罹患率（人口 10 万対）は男性 7.9、女性 2.7 と男女別では男性の増加が顕著であった（1）。頭頸部領域は発声、呼吸、嚥下などの機能に重要であり、また視覚、嗅覚、味覚、聴覚、平衡覚といった感覚器が存在するため、その部位や亜部位により診断や治療方針、治療成績などが異なってくる。

上顎洞癌では、周辺組織へ浸潤している T3・T4 症例の頻度が約 80%を占めており、手術、放射線治療、化学療法を組み入れた集学的治療が主体となる。1970 年代以降、再建手術の発達により治療に再建手術を伴った手術治療が積極的に取り入れられるようになり、放射線治療、化学療法と組み合わせられた 3 者併用療法が特に進行癌に対する標準治療として行われることが多くなった。また、口腔癌の一つである舌癌では、手術と小線源組織内照射を含む放射線治療を中心とした標準治療が確立されてきた。さらに喉頭癌においても、放射線化学療法の高い奏効率が確認され、喉頭摘出術を加えることによる治療成績の向上が認められた。これらの領域では、積極的な手術と治療法の進歩により、5 年生存率は向上してきたが、現行の治療法ではさらなる生存率の改善は難しく、術後の機能障害が問題となる患者も多く存在する。新しい有効な薬剤の開発は、ダウンスレージングによる切除範囲の縮小や再発腫瘍に対する局所制御に重要であり、機能温存率の向上につながると期待される。

一方、咽頭のうち中ならびに下咽頭に発生する癌は、初期には症状の自覚が乏しいため、受診する患者の 7 割以上は Stage III、IV 期の進行癌が占め、頭頸部癌の中でも難治癌の代表である。放射線単独治療の成績は特に下咽頭癌では不良で Stage I、II 期の非進行癌を含めた全体でも 5 年生存率は 20-40%と低い（2-4）。中咽頭癌は放射線に対する反応性が高いが、それでも Stage IV 期となると 30%以下と不良である。1990 年代以降、化学療法と放射線療法との同時併用の検討が進み、放射線単独治療に比較して生存率の改善が報告されているが、その改善率の向上は報告により異なるが、0-8%程度しかない（5-7）。現在、中・下咽頭癌に対する標準的治療法として、化学療法併用放射線治療＋サルベージ手術、拡大根治切除＋術後放射線・化学療法が行われており、前者は Stage I-III 期、後者は Stage III 期の一部と IV 期に用いられることが多い。問題点としては、5 年生存率が 20-40%と低いこと、特に手術による機能障害がみられること、死因として局所再発と遠隔転移いずれもが認められる点などである。また、3 者併用後の再発症例に対しては有効な治療法はなく、化学療法の延命効果もせいぜい 6 ヶ月程度とされその使用を疑問視する意見も多い。このような咽頭癌の治療成績の向上にも、やはり新たな有効な治療薬剤の開発が必要である。

現在、頭頸部癌に使用される抗悪性腫瘍薬として、シスプラチン（CDDP）と 5-フルオロウラシル（5-FU）の併用療法（PF または CF 療法）が標準であるが、最近ではこの 2 剤

にタキソテール (Taxotere) を加える TPF 療法が生存率や機能温存率が優るとされている。さらに、化学療法に放射線治療を併用する場合もあり、薬剤の代表的なものはシスプラチン (CDDP) であるが、同時併用による有害事象 (副作用) を考え、投与量を減らした PF 療法や TPF 療法も用いられる。

b) 食道癌

本邦では毎年 10,000 人以上が食道癌に罹患する。その頻度は 50 歳代以降、加齢とともに急激に増加し、ピークは 60 歳代で、70 歳以上が 30%以上と高齢者が多いのが特徴である。男女比は約 6:1 と男性に多く、男性では 6 番目に多い癌である。年間の死亡者数は 9,000~10,000 人と全癌の 3%を占めており、2001 年には男性 9,026 人、女性 1,651 人、計 10,677 人が食道癌で死亡している (8)。1998 年の全国食道癌登録調査報告書によれば、全切除例の 3 年生存率は 52.1%で、Stage 別の 3 年生存率は Stage 0、I、II a、II b、III、IVそれぞれ 94.1%、78.5%、58.2%、54.4%、36.8%、25.0%であった。Stage II、III、IV症例においては高率に再発を認めており、その多くは縦隔内を主体とするリンパ節再発ならびに局所再発である。縦隔内に再発した症例は再手術が困難である場合が多く、標準的な再発治療である化学放射線治療によっても奏効率は 34%程度に過ぎず予後不良である (9)。これらの症例に対しては、既存の手術によるリンパ節郭清のみでは予後の改善は困難と考えられ、新たな治療法の導入が期待されている。一方、放射線単独治療では、5 年生存率は 10%前後でしかない。5-FU、CDDP などを用いた化学放射線治療により放射線単独治療よりも良好な治療成績が示されているが、手術を上回る成績は得られず、血液毒性、消化器毒性、心肺毒性の発現も多い。

また、切除不能例に関してはその予後は極めて不良であり、T4 (食道癌 TNM 分類による癌組織の浸潤が他臓器に及ぶ症例) 症例の放射線単独治療例の 5 年生存率は 3.1%であった。Stage IV症例の根治的放射線照射の 5 年生存率は 0%との報告もある。現在の治療法は全身状態が良好であれば放射線、抗癌剤を併用したものが行われるが、放射線化学療法による治療後に欧米では 40-60%の局所再発が報告されており、また高齢や心・肺・肝機能異常などの理由により至適量の抗がん剤投与や放射線照射が困難な患者も多くみられる。さらに、副作用による QOL の低下などの点からも標準的治療と呼べるものはまだ確立されていない。Curative nonsurgical combined treatmentと題される Zenone らのグループの成績は T4 の 5 年生存率が 0%であった (10)。乳癌、大腸癌、非小細胞肺癌や腎臓癌などの難治性固形癌に対しては、抗体医薬品 Trastuzumab (ハーセプチン)、Bevacizumab (アバスタ)、分子標的薬剤 Gefitinib (イレッサ) や Sorafenib (ネクサバル) など、従来の抗癌剤とは作用機序の異なる新規抗癌医薬品がすでに市場に出ているが、食道癌に対しては未だ開発が進んでいないのが現状である。したがって、局所進行食道癌に対する安全性と有効性を兼ね備えた新たな治療戦略の確立が望まれている。

現在、食道癌に対する抗悪性腫瘍薬として、5-FU、シスプラチン、マイトマイシン C、

ブレオマイシン、ビンデシン、アドリアマイシン、タキソテール、ネダプラチンなどでその有効性と保険適応が認められているが、単剤での奏効率は15～30%程度と低く生存延長は認められていない。現在、最も汎用されているのは5-FU+シスプラチンの2剤併用である。近年、海外ではタキソール、イリノテカン、ゲムシタビンなど、国内ではネダプラチンなどを用いた併用療法も試みられているが、5-FU+シスプラチンを上回る効果は未だ証明されていない。

本邦では、初回治療としては5-FU+シスプラチンを行い、二次治療としてドセタキセルを行う場合が多い。いずれにしても上記の併用療法を含めた化学療法単独ではその効果には限界があり、化学療法単独の適応は切除不能の転移を有する症例に限られる。

c) 肺癌（非小細胞肺癌）

近年、本邦における肺癌患者の発生率は全年齢層において増加を続けており、2001年の肺癌による死亡者数は男性39,880人、女性15,122人、計55,002人で、年齢調整死亡率（人口10万人対）は1970年の14.0に比べて2001年には26.3に達している（1）。現在、肺癌は胃癌を抜いて本邦における男性癌死亡の第1位を占めるに至っており、全般的に日本人の癌のパターンは欧米型に近づきつつある（11）。米国では禁煙促進運動が浸透し喫煙人口が減少したにもかかわらず、年間140,000人が肺癌で死亡しており、女性の喫煙率の上昇傾向を反映して21世紀にもこの死亡率の高さは維持されると予測されている。

原発性肺癌はその病理組織型により、扁平上皮癌、腺癌、大細胞癌を一括した非小細胞肺癌と小細胞肺癌に分類される。小細胞肺癌は一般に化学療法に対して高感受性の癌であり、生存期間の延長が認められるため化学療法が第一選択の治療となっているが、原発性肺癌の80%以上を占めている非小細胞肺癌はその2/3が診断時に切除不能の進行癌であり、抗癌剤に対する感受性の低いこれらの治療成績は極めて不良である。肺癌の治療において外科的切除が最も有効な手段であることは疑いのない点であり、切除不能症例に対してもネオアジュバント療法の導入などにより外科療法の適応の拡大が図られている。1994年には、臨床病期ⅢA期を対象にした術前化学療法の無作為化比較試験の結果、再発率・生存率ともに術前化学療法群が優れており、術後合併症の頻度には差がなかったと報告された（12,13）。このような外科療法、化学療法、放射線療法などを併用する集学的治療により、奏効率の向上や一定の腫瘍縮小効果は得られるようになってきた。しかし、依然として発見時切除不能例が多く、さまざまな治療戦略が試みられているが、副作用によるQOLの低下や延命効果などの点でまだまだ満足すべき成績を達成できていないのが現状である。

現在、肺癌（非小細胞肺癌）に使用されている抗悪性腫瘍薬としては、白金製剤（シスプラチン、カルボプラチン、ネダプラチン）、植物アルカロイド（イリノテカン、エトポシド、タキソテール、タキソール、ビンレルビン、ビンクリスチン）、アルキル化剤（シクロホスファミド）、抗癌性抗生物質（マイトマイシンC、ドキソルビシン、アムルビシン）、代謝拮抗剤（ゲムシタビン）などが挙げられ、多剤併用療法が試みられている。

特定のシグナル伝達経路を阻害する分子標的薬剤は、いくつかのヒト悪性腫瘍でその有効性が認められ、実際に日常臨床で使用されるようになってきている。肺癌に対するゲフィチニブ（イレッサ）は、epidermal growth factor (EGF)受容体 tyrosine kinase 阻害剤であり、世界に先駆けて本邦で承認された。最近の研究により、EGF 受容体遺伝子の特異的な変異の有無がその感受性に大きく関わっており、喫煙歴のない日本人女性の腺癌患者で最も有効であることが明らかになってきた(14,15)。したがって、喫煙歴のある男性の扁平上皮癌患者では Gefitinib や同様の作用機構を持つ EGF 阻害剤 Erlotinib（タルセバ）の効果は期待できず、やはり新たな治療法の開発が必要と考えられる。

5.1.2. 頭頸部・胸部悪性腫瘍の分子生物学的特性

染色体 DNA 末端の短い塩基配列（TTAGGG）の繰り返しで構成されるテロメアは、細胞増殖に伴いしだいに短縮し細胞に老化（replicative senescence）を引き起す。このテロメアの短縮は発癌の抑制機構であり、前癌状態にある細胞が老化に陥り死滅することで癌化が阻止されている。逆に、無制限の増殖能を有する癌細胞はテロメアを維持する分子機構を獲得しており、代表的なものがテロメラーゼの活性化である。多くのヒト悪性腫瘍では短いテロメアと高いテロメラーゼ活性が認められており、一方、ほとんどの正常体細胞ではテロメラーゼは陰性である。本研究の対象となる頭頸部癌、食道癌、肺癌のテロメラーゼ活性に関しても、種々の報告がなされている。頭頸部扁平上皮癌 130 例中 112 例（86%）（16-20）、外科的に切除された肺癌組織においても、非小細胞肺癌 125 例中 98 例（78%）、小細胞肺癌 15 例中 15 例（100%）と高率にテロメラーゼ活性が検出されることが確認されている（21）。また、最近の 110 例の頭頸部癌及び 40 例の前癌病変を用いた解析では、78.2%の癌組織と 85%の前癌病変でテロメラーゼの活性化がみられ、これらの症例では無再発生存期間が短く、明らかに予後不良であった（22）。また、29 例の食道扁平上皮癌では 25 例（86.2%）、47 例の異型上皮では 21 例（44.7%）でテロメラーゼ活性が認められた（23）。いずれの研究結果も、テロメラーゼの活性化が発癌過程の早期から生じていることを示唆している。しかし、正常口腔粘膜ではテロメラーゼ活性が認められたのは 39 例中 1 例（3%）（17,18）、正常肺組織では 68 例中 3 例（4%）（21）とその頻度は極めて低く、テロメラーゼの活性化は癌組織に特異的であると考えられる。

テロメラーゼは、染色体の 3'末端に TTAGGG 配列を伸長しテロメア長を保つ作用を持つリボ核酸蛋白酵素であり、触媒サブユニット hTERT（human telomerase reverse transcriptase）と鋳型となる RNA サブユニット（hTERC）から構成される（図 1）（24）。テロメラーゼ活性は hTERT 遺伝子発現レベルと相関し（25）、また hTERT 遺伝子導入によりテロメラーゼ活性を誘導することができることから（26）、hTERT 分子がテロメラーゼ活性を制御していると考えられる。実際に、多くの癌細胞で hTERT 遺伝子発現が亢進しており（27）、逆に癌抑制分子である Menin や Mad1、TGF-β経路の標的分子である Sipl などにより、hTERT 遺伝子の転写抑制が生じることが明らかになってきている

(28)。プロモーターは、遺伝子上流に存在する特別な塩基配列であり、その部分に転写を促す因子が結合すると遺伝子の発現が認められる。テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。

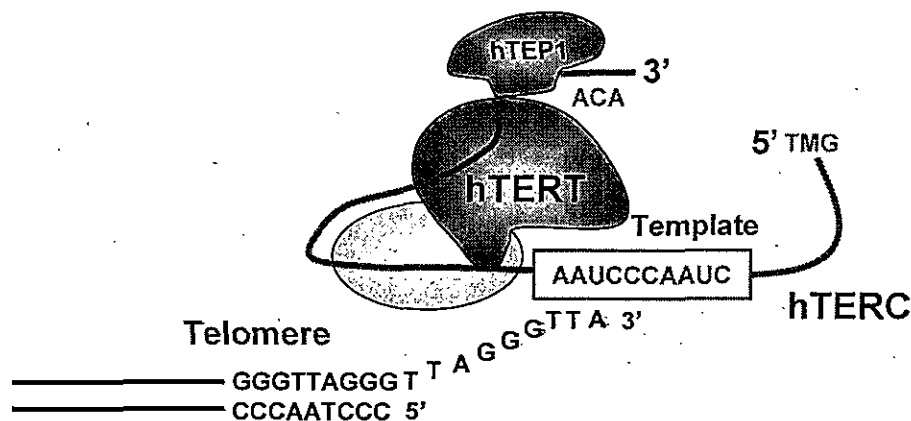


図1 テロメアとテロメラーゼ、その構成分子

hTERT: human telomerase reverse transcriptase

hTERC: template RNA

hTEP1: telomerase-associated protein

以上のことから、hTERT プロモーターを用いてアデノウイルスの増殖に必要な配列を選択的に発現させることにより、頭頸部癌、食道癌、肺癌などのテロメラーゼ活性を有するヒト固形癌でウイルスが増殖し、効率良く細胞死を誘導することが可能であると考えられる。さらに、局所放射線療法を併用することで、より強力な抗腫瘍活性が発揮されると期待される。

5.2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要

頭頸部・胸部悪性腫瘍（頭頸部癌、食道癌、肺癌）患者に、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を投与し、同時に局所放射線治療を行い、その治療効果と生物学的反応、及び安全性を検討する。Telomelysin は癌細胞に感染して細胞内で複製・増殖し、細胞破壊を引き起こすことで放出され、さらに周辺の癌細胞へと感染を広げて行く。ウイルスが癌組織内に拡散して行くとともに、連鎖的に細胞死を誘導し、広い範囲の癌組織が崩壊していくと期待される。放射線治療を併用することで Telomelysin の感染効率が増強し、Telomelysin は放射線による DNA 傷害の修復を阻害することで放射感受性を増強する。また、放射線による細胞破壊はウイルス拡散を促進すると考えられる。しかし、正常組織に到達した時点

で、テロメラーゼ活性がないためにウイルス増殖は止まり、正常細胞への影響は最小限に抑えられる。

対象症例は、組織学的に確定された頭頸部癌、食道癌、肺癌患者とし、臨床病期を考慮した上で選別される。Telomelysin は、第 1 日目、第 18 日目、及び第 32 日目に各 1 回、直接あるいは内視鏡などを用いて腫瘍内に注入し、第 4 日目から 2Gy/日、5 日/週で 6 週間、計 60Gy の体外放射線照射を施行する。安全性に問題がない場合は、Telomelysin は研究計画に定めた投与量に基づき 3 例ごとに段階的に増量し、最高容量では 6 例の患者に投与する。局所の治療効果の判定を行うとともに、奏効の持続期間、腫瘍進行までの期間、生存期間、癌に伴う病的状態の改善効果（QOL、嚥下機能、呼吸機能、疼痛軽減、Performance Status、など）について評価する。重篤な副作用、癌の進行、死亡あるいは他の治療法の必要性が生じない限り、治療開始から 3 ヶ月後に生検を行い、腫瘍退縮や転移抑制、生存期間の延長などを期待する際の根拠となる分子生物学的効果や病理組織学的変化について解析する。以後、投与開始 12 ヶ月後まで安全性、生物学的反応、及び抗腫瘍効果などを評価する。詳細については後述の「9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画」の項で述べる。

5.3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選定した理由

頭頸部癌、食道癌、肺癌が局所性に存在する場合は外科的切除が最も確実な治療法であるが、診断時に周辺リンパ節や隣接臓器への浸潤のため根治切除不能となる進行癌も多く、また初期治療後の再発症例では高率に外科的切除不可能である。腫瘍が小さくても、機能温存のために外科的切除ができない症例も多く、その場合は放射線治療や化学療法、あるいはその併用が試みられる。放射線化学療法の進歩により徐々に進行症例の予後も改善されつつあるが、化学療法の副作用により治療が完遂できない場合も多くみられ、特に高齢者などではその傾向が顕著に認められる。したがって、安全性の高い、より優れた集学的治療法の開発が望まれている。

全身投与される抗癌剤では、腫瘍局所の薬物濃度を高めるためには、投与量を増やし、持続的な有効血中濃度を確保するためには、頻回投与を行う必要がある。Telomelysin は自律増殖能を持ったウイルス製剤であり、理論的には初期投与量を低く設定することが可能である。また、代謝・排泄されることで血中濃度が減衰する抗癌剤と異なり、腫瘍局所で Telomelysin が複製・増殖するため、長期にわたってウイルス濃度が維持されると期待される。局所にて増殖した Telomelysin が血流によって微小転移巣に到達することにより、転移巣の悪性化や二次転移を防ぐ効果も考えられる。

多くの場合、抗癌剤は癌細胞にアポトーシスを誘導することで抗腫瘍効果を発揮するが、Telomelysin による細胞死では、アポトーシスに特徴的なクロマチンの凝集や核の断片化は認められない。すなわち、Telomelysin と抗癌剤は異なった分子機構で細胞死を誘導している可能性がある。化学療法において薬剤耐性の出現は重要な課題であり、その克服は治療

成績の向上には不可欠である。前臨床研究では、シスプラチン（CDDP）やタキソール（TXL）耐性となった細胞株を Telomelysin は効率良く殺傷することができ（未発表データ）、臨床的にも抗癌剤耐性克服治療薬として使用することが可能と考える。

放射線照射と併用することで、Telomelysin の腫瘍内注入は強力な局所療法になると期待され、局所効果のみであっても局所高度浸潤例において切除可能になれば予後の改善効果はあると思われる。また、気道圧迫、気道浸潤例では奏効例、不変例の一部においては予後の延長が可能と考えられる。食物の通過障害や気道閉塞の解除や疼痛緩和などの局所症状の改善がみられれば、明らかに QOL の向上につながる。

以上より、腫瘍選択的融解ウイルス製剤 Telomelysin の局所投与と放射線治療の併用は、本研究の対象疾患である頭頸部・胸部悪性腫瘍には有効な治療法と考える。

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

ウイルスは、本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。このウイルスの細胞障害活性（cytopathic effect; CPE）は、一般的に病原性として認識されているが、この活性を治療目的に応用することが可能である。すなわち、ウイルスの増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスを癌細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることができる（29）。

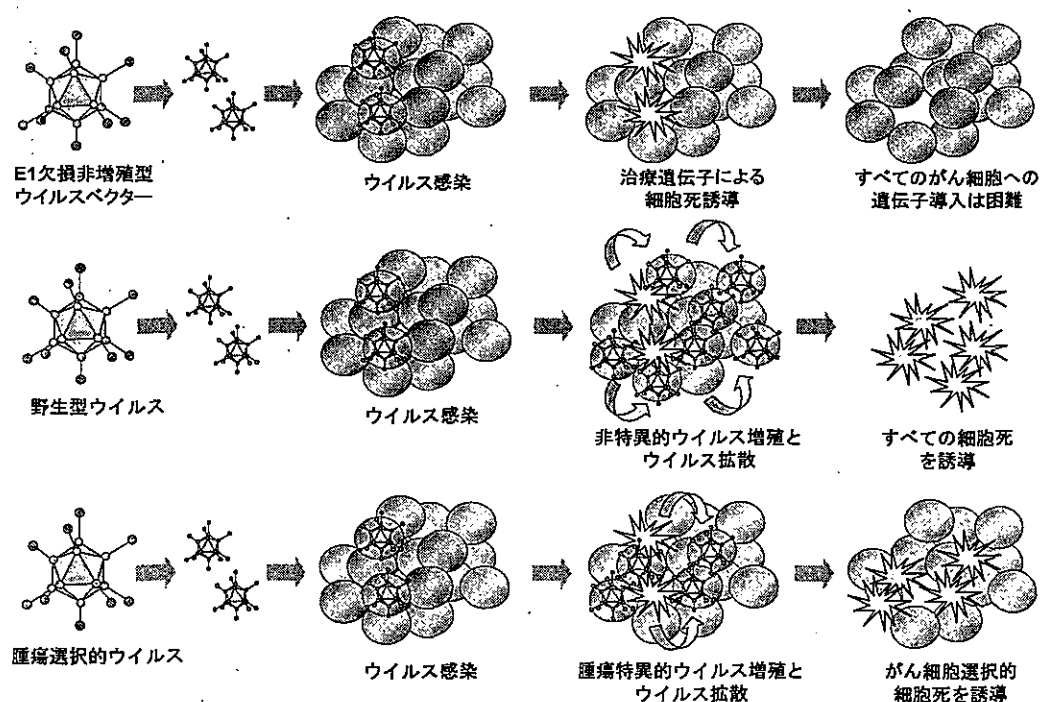


図2 癌細胞での選択的なウイルス増殖と細胞死誘導

これらのウイルスは、腫瘍融解ウイルス（Oncolytic virus）と称される。アデノウイルス

はその構造が最もよく研究されているウイルスの一つであり、非増殖型のものが多くの遺伝子治療プロトコールで使用されることによって、その安全性に関する情報が蓄積されてきている。しかし、非増殖型の遺伝子治療用アデノウイルスベクターでは、腫瘍を形成するすべての癌細胞に治療遺伝子を導入することは理論的に困難であり、また野生型のアデノウイルスでは非選択的な細胞傷害活性により正常細胞へも多大な影響が及ぶと考えられる。癌細胞で選択的に増殖し、細胞死を誘導する腫瘍融解アデノウイルスであれば、正常細胞に影響を与えずに、癌細胞のみを殺傷することが可能である（図 2）。

本研究では、テロメラーゼ活性依存性に hTERT プロモーターにより増殖し、癌細胞を選択的に破壊する腫瘍融解ウイルスである Telomelysin (OBP-301) を用いる。Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。hTERT プロモーターの特徴について、以下に概説する。

6.1. hTERT プロモーターの構造と性質

6.1.1. hTERT プロモーターの構造

hTERT プロモーターは、1999 年に複数の研究グループによりクローニングされ、その塩基配列が報告されている (30-33)。転写開始部位は ATG コドンの上流 77bp であり、mRNA 及びプロモーターの第 1 番目の塩基をそれぞれ+1、-1 とした配列図を示す（図 3-1）。-1 から上流 200-bp の領域は GC 豊富であり TATA 配列を欠いているが、TATA 配列を持たないプロモーターに多くみられる転写開始配列である CCTCTCC（アミノ酸配列：PyPyANA/TpyPy）は-3 の部位に認められる。また、Telomelysin に含まれる 378-bp の hTERT プロモーターの塩基配列も示す（図 3-2）。

hTERT プロモーターには、多くの転写因子の結合配列が認められる（図 4）。Sp1 結合配列として知られる GGGCGG が-7、-36、-56、-88、-110、及び 873 にみられ、また E-box 配列である CACGTG も-165 と+44 に 2 箇所存在する (32)。その他にも E2F1、WT1 (Wilms' tumor suppressor 1)、MZF-2 (myeloid-specific zinc finger protein 2)、AP-2、GC 分子などの結合配列が認められており、さらにエストロゲン受容体やビタミン D 受容体などの核内受容体が転写因子として作用することも明らかになっている (34)。テロメラーゼの活性化、すなわち hTERT 遺伝子発現の増強は、癌遺伝子産物やウイルス感染による hTERT プロモーターの刺激、あるいは癌抑制機能の消失による hTERT プロモーター活性の抑制機構の破綻により生じると考えられる。

6.1.2. hTERT プロモーターの性質

hTERT プロモーターにより hTERT 遺伝子発現は制御されており、テロメラーゼ活性を有する多くの癌細胞では転写活性が誘導され、一方、テロメラーゼ陰性の正常細胞では転写抑制が働く。

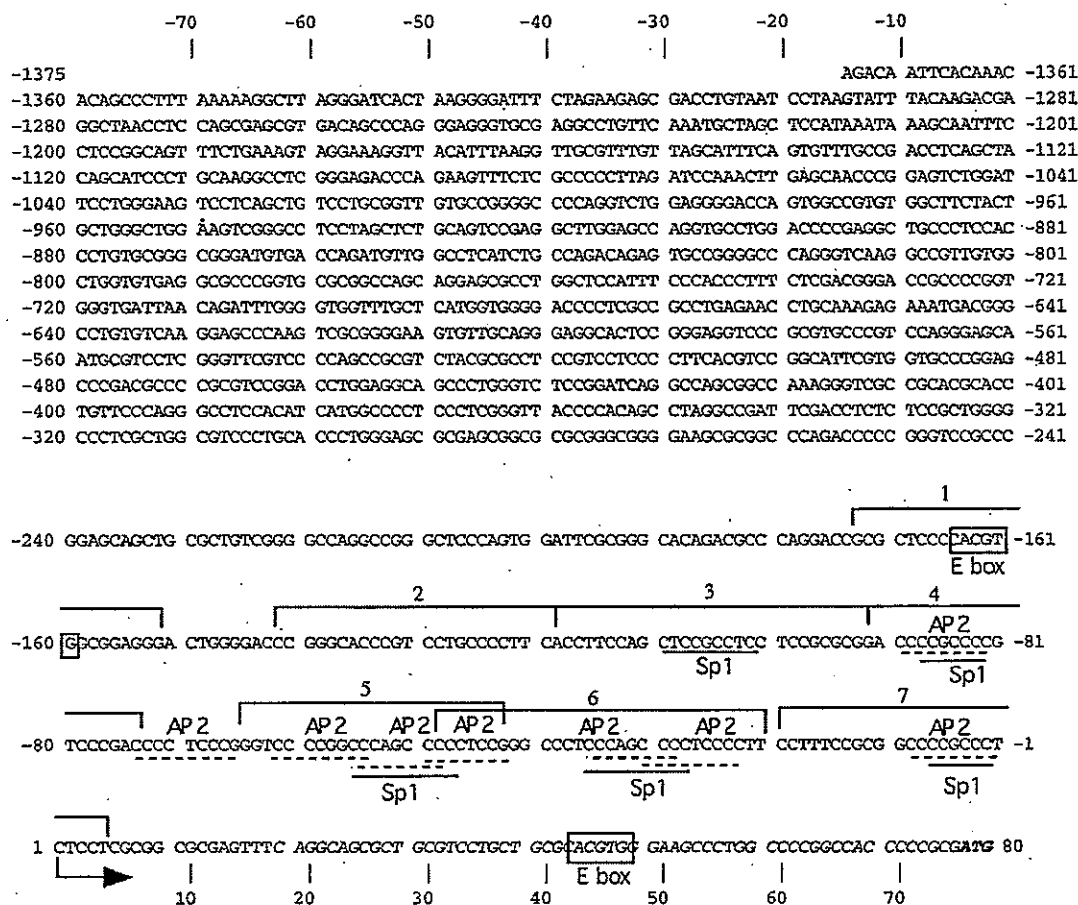


図 3-1 hTERT プロモーターの配列図 (文献 32 より引用)

TGGCCCCTCCCTCGGGTTACCCACAGCCTAGGCCGATTGACCTCTCTCCG
 CTGGGGCCCTCGCTGGCGTCCCTGCACCCTGGGAGCGCGAGCGGCGCGCGG
 GCGGGGAAGCGCGGCCAGACCCCCGGTCCGCCCCGAGCAGCTGCGCTGT
 CGGGGCCAGGCCGGGCTCCAGTGGAATTCGCGGGCACAGACGCCAGGACC
 GCGCTCCCCACGTGGCGGAGGGACTGGGGACCCGGGCACCCGTCCTGCCCC
 TTCACCTTCCAGCTCCGCCTCCTCCGCGCGGACCCCGCCCCGTCCCGACCCC
 TCCCGGGTCCCCGGCCAGCCCCCTCCGGGCCCTCCAGCCCCCTCCCTTCC
 TTTCCGCGGCCCCGCCCTCTCCTCGCGGCGCGAGTTTCAGGCAGCGCTGCGT
 CCTGCTGCGCACGTGGGAAGCCCTGGCCCCGGCCACCCCCGCG

図 3-2 Telomelysin に含まれる hTERT プロモーターの塩基配列

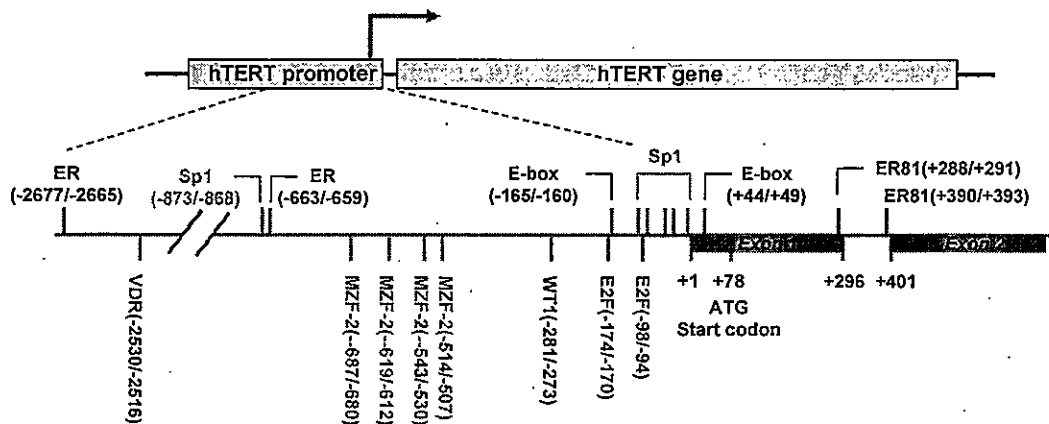


図4 hTERT プロモーターの転写因子結合配列の分布

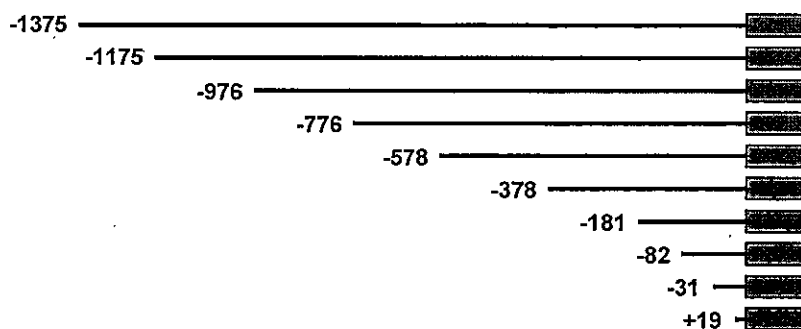


図5-1 5'末端を段階的に切断した hTERT プロモーター断片の一覧

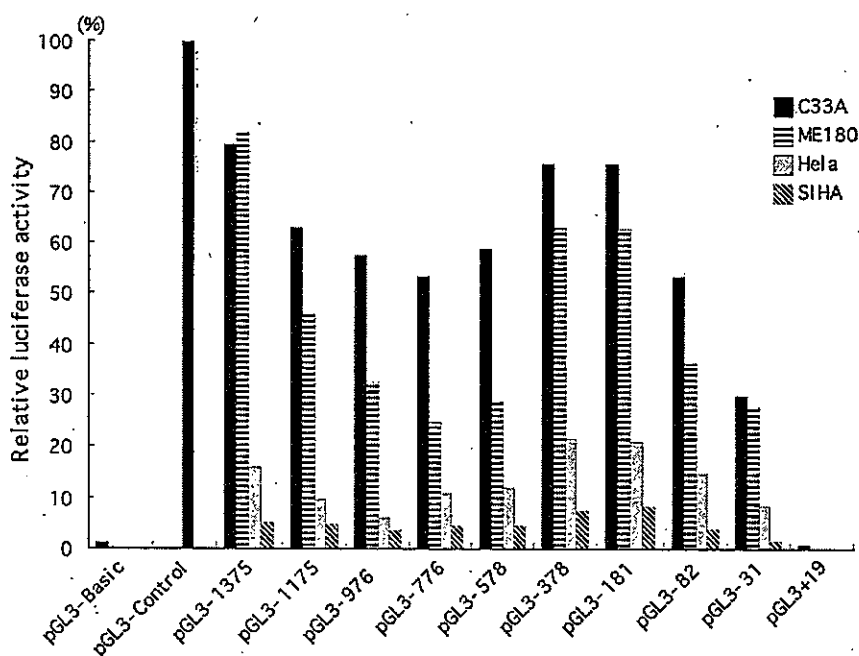


図5-2 各 hTERT プロモーター断片による luciferase 活性 (文献 32 より引用)

Gu らの報告によると、hTERT プロモーターあるいはサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターで駆動される LacZ 遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクターをヒト肺癌細胞 (H1299、A548)、ヒト大腸癌細胞 (DLD1、LoVo)、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa)、ヒト正常線維芽細胞 (NHFB)、及びヒト正常気管支上皮細胞 (NHBE) に感染させ、24 時間後に X-gal 染色により β -galactosidase 活性を測定したところ、癌細胞においては hTERT プロモーターと CMV プロモーターの活性の差は 2-10 倍であったが、2 種類の正常細胞では hTERT プロモーター活性は CMV プロモーター活性の 500 分の 1 以下であり、hTERT プロモーターの癌細胞選択的な転写活性が明らかであった (35)。CMV プロモーターは、ヒトサイトメガロウイルスに由来するプロモーター配列で、多くの哺乳類細胞において強力な遺伝子発現を促すことから各種ベクター構築に頻用されている。Takakura らは、hTERT プロモーターのコア領域を明らかにするために、ATG コドンより上流 1.4kb のプロモーター領域の 5'末端を段階的に切断し、luciferase 遺伝子を下流に置いたプラスミドベクターを作成した (図 5-1)。4 種類の子宮癌細胞 (C33A、HeLa、ME180、SiHa) にこれらのプラスミドを一過性に導入し、luciferase アッセイを行ったところ、C33A 及び HeLa 細胞においては 5'末端の切断により転写活性が減弱し、776-bp 断片が最も低い活性を示したが、さらに切断することにより転写活性は漸増し、181-bp 断片が pGL3-control の 60-80%と最も高い転写活性を呈した (図 5-2) (32)。したがって、転写開始部位より上流 181-bp が hTERT 活性化に必要なプロモーターのコア領域であり、本研究ではこの領域を含む 378-bp 断片を hTERT プロモーターとして Telomelysin を作成した (図 3-2)。

6.2. 本研究で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

6.2.1. E1A 及び E1B 遺伝子の構造と性質

ウイルスのポリヌクレオチドに含まれる E1 遺伝子とは、ウイルスの有する DNA 複製に関する初期遺伝子 (early : E) と後期遺伝子 (late : L) のうちの初期遺伝子の一つをいい、E1 遺伝子はウイルス・ゲノムの転写の制御に係わるタンパク質をコードしている。また、E1 遺伝子は、E1A、E1B から構成されることが知られている。E1A 遺伝子によりコードされる E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群 (E1B、E2、E4 等) の転写を活性化する。E1B 遺伝子でコードされる E1B タンパク質は、後期遺伝子 (L 遺伝子) の mRNA が感染した宿主細胞の細胞質へ蓄積するのを助け、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。以下に、E1A (図 6-1) 及び E1B (図 6-2) 遺伝子の塩基配列を示す。

```
ACACCGGGACTGAAAATGAGACATATTATCTGCCACGGAGGTGTTATTACC
GAAGAAATGCCCGCCAGTCTTTTGGACCAGCTGATCGAAGAGGTACTGGCT
GATAATCTTCCACCTCCTAGCCATTTTGAACCACCTACCCCTTCACGAAGTGT
```

ATGATTTAGACGTGACGGCCCCCGAAGATCCCAACGAGGAGGCGGTTTCGC
 AGATTTTCCCGACTCTGTAATGTTGGCGGTGCAGGAAGGGATTGACTTACT
 CACTTTTCCGCCGGCGCCCGGTTCTCCGGAGCCGCCTCACCTTTCCCGGCAG
 CCCGAGCAGCCGGAGCAGAGAGCCTTGGGTCCGGTTTCTATGCCAAACCTT
 GTACCGGAGGTGATCGATCTTACCTGCCACGAGGCTGGCTTTCCACCCAGTG
 ACGACGAGGATGAAGAGGGTGAGGAGTTTGTGTTAGATTATGTGGAGCACC
 CCGGGCACGGTTGCAGGTCTTGTCAATTATCACCGGAGGAATACGGGGGACC
 CAGATATTATGTGTTCCGCTTTGCTATATGAGGACCTGTGGCATGTTTGTCTA
 CAGTCCTGTGTCTGAACCTGAGCCTGAGCCCGAGCCAGAACCGGAGCCTGC
 AAGACCTACCCGCCGTCCTAAAATGGCGCCTGCTATCCTGAGACGCCCCGAC
 ATCACCTGTGTCTAGAGAATGCAATAGTAGTACGGATAGCTGTGACTCCGG
 TCCTTCTAACACACCTCCTGAGATACACCCGGTGGTCCCGCTGTGCCCCATT
 AAACCAGTTGCCGTGAGAGTTGGTGGGCGTCGCCAGGCTGTGGAATGTATC
 GAGGACTTGCTTAACGAGCCTGGGCAACCTTTGGAAGTTGAGCTGTAAACGC
 CCCAGGCCATAAGGTGTAAACCTGTG

図 6-1 E1A 遺伝子の塩基配列

CTGACCTCATGGAGGCTTGGGAGTGTTTGGAAGATTTTCTGCTGTGCGTAA
 CTTGCTGGAACAGAGCTCTAACAGTACCTCTTGGTTTGGAGGTTTCTGTGG
 GGCTCATCCCAGGCAAAGTTAGTCTGCAGAATTAAGGAGGATTACAAGTGG
 GAATTTGAAGAGCTTTTGAAATCCTGTGGTGAGCTGTTTGATTCTTTGAATC
 TGGGTCACCAAGGCGCTTTTCCAAGAGAAGGTCATCAAGACTTTGGATTTTTC
 CACACCGGGGCGCGCTGCGGCTGCTGTTGCTTTTTTGAGTTTTATAAAGGAT
 AAATGGAGCGAAGAAACCATCTGAGCGGGGGGTACCTGCTGGATTTTCTG
 GCCATGCATCTGTGGAGAGCGGTTGTGAGACACAAGAATCGCCTGCTACTG
 TTGTCTTCCGTCCGCCCCGGCGATAATACCGACGGAGGAGCAGCAGCAGCAG
 CAGGAGGAAGCCAGGCGGCGGCGGAGGAGCAGAGCCCATGGAACCCGAG
 AGCCGGCCTGGACCTCGGGAATGAATGTTGTACAGGTGGCTGAACTGTAT
 CCAGAACTGAGACGCATTTTGACAATTACAGAGGATGGGCAGGGGCTAAAG
 GGGGTAAAGAGGGAGCGGGGGGCTTGTGAGGCTACAGAGGAGGCTAGGAA
 TCTAGCTTTTAGCTTAATGACCAGACACCGTCCTGAGTGTATTACTTTTCAA
 CAGATCAAGGATAATTGCGCTAATGAGCTTGATCTGCTGGCGCAGAAGTAT
 TCCATAGAGCAGCTGACCACTTACTGGCTGCAGCCAGGGGATGATTTTGAG
 GAGGCTATTAGGGTATATGCAAAGGTGGCACTTAGGCCAGATTGCAAGTAC
 AAGATCAGCAAACCTGTAAATATCAGGAATTGTTGCTACATTTCTGGGAAC

GGGGCCGAGGTGGAGATAGATACGGAGGATAGGGTGGCCTTTAGATGTAG
CATGATAAATATGTGGCCGGGGGTGCTTGGCATGGACGGGGTGGTTATTAT
GAATGTAAGGTTTACTGGCCCCAATTTTAGCGGTACGGTTTTCTGGCCAAT
ACCAACCTTATCCTACACGGTGTAAGCTTCTATGGGTTTAAACAATACCTGTG
TGGAAGCCTGGACCGATGTAAGGGTTCGGGGCTGTGCCTTTTACTGCTGCTG
GAAGGGGGTGGTGTGTGCGCCCCAAAAGCAGGGCTTCAATTAAGAAATGCCT
CTTTGAAAGGTGTACCTTGGGTATCCTGTCTGAGGGTAACTCCAGGGTGCGC
CACAATGTGGCCTCCGACTGTGGTTGCTTCATGCTAGTGAAAAGCGTGGCTG
TGATTAAGCATAACATGGTATGTGGCAACTGCGAGGACAGGGCCTCTCAGA
TGCTGACCTGCTCGGACGGCAACTGTACCTGCTGAAGACCATTACGCTAG
CCAGCCACTCTCGCAAGGCCTGGCCAGTGTTTGAGCATAACATACTGACCC
GCTGTTCTTGCAATTGGGTAAACAGGAGGGGGGTGTTCTACCTTACCAATG
CAATTTGAGTCACACTAAGATATTGCTTGAGCCCGAGAGCATGTCCAAGGT
GAACCTGAACGGGGTGTTTGACATGACCATGAAGATCTGGAAGGTGCTGAG
GTACGATGAGACCCGACCCAGGTGCAGACCCTGCGAGTGTGGCGGTAAACA
TATTAGGAACCAGCCTGTGATGCTGGATGTGACCGAGGAGCTGAGGCCCGA
TCACTTGGTGCTGGCCTGCACCCGCGCTGAGTTTGGCTCTAGCGATGAAGAT
ACAGATTGAGGTACTGAAATGTGTGGGC

図 6-2 E1B 遺伝子の塩基配列

6.2.2. IRES の構造と性質

IRES (internal ribosome entry sites) とは、ピコルナウイルス科に特異的なタンパク質合成開始シグナルで、18S リボソーム RNA の 3'末端と相補的な配列があるためリボソーム結合部位としての役割を果たすと考えられている。ピコルナウイルス科のウイルス由来 mRNA はこの配列を介して翻訳されることが知られている。IRES 配列からの翻訳効率は高く、mRNA の途中からでもギャップ構造非依存的にタンパク質合成が行われる。したがって、Telomelysin では、hTERT プロモーターにより E1A 遺伝子と IRES 配列の下流にある E1B 遺伝子の両方が独立に翻訳される。以下に IRES の塩基配列を示す (図 7)。

TGCATCTAGGGCGGCCAATTCGCCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTA
CTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTGATT
TTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCT
GTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGC
AAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAA
GACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTG

GCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCAA
 AGGCGGCACAACCCCAAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAAGAG
 TCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGA
 AGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTAC
 ATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGA
 CGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAAGCTTGCCA

図7 IRES の塩基配列

6.2.3. SV40 ポリアデニレーションの性質

SV40 ポリアデニレーション配列 (146bp) は、シミアンウイルス 40 に由来するポリ A 付加シグナル配列で、多くの哺乳類細胞において機能することが確かめられており、発現遺伝子の翻訳効率を上昇させる配列として各種ベクターに頻用されている。

6.3. 標的細胞とした細胞の由来及び生物学的特徴並びに当該細胞を標的とした理由

本研究の標的細胞は頭頸部・胸部悪性腫瘍細胞であり、高いテロメラーゼ活性を有し、臨床的には難治性固形癌と考えられる。前臨床研究において、Telomelysin はヒト頭頸部癌細胞株、食道癌細胞株、及び肺癌細胞株に対して *in vitro* あるいは *in vivo* で高い抗腫瘍活性を示し、放射線の併用によりさらに顕著な制癌作用が期待できることが明らかになった。したがって、本研究では扁平上皮癌を中心とする頭頸部癌、食道癌、肺癌を含む頭頸部・胸部悪性腫瘍を対象とする。

6.4. アデノウイルスを用いた治療法の概略及び当該治療法を選択した理由

6.4.1. アデノウイルスを用いた治療法の概略

本研究に用いる治療用アデノウイルス Telomelysin は、患者の頭頸部・胸部に存在する腫瘍内に *in vivo* で直接反復注入され、同時に体外から患部の領域に放射線照射を行う。

6.4.2 アデノウイルスの生物学的特徴及びヒトに対する影響

a) 名称：ヒトアデノウイルス 5 型 (C 亜群)

b) 構造：

ウイルス粒子は、遺伝子 DNA と蛋白質から構成され、直径 65~80nm の大きさで、正 20 面体である (図 8)。エンベロープはなく、約 36000 塩基対の 2 本鎖線状 DNA をゲノムとして持ち、これにコア蛋白質が結合し、ウイルス粒子内部のコア (core) を構成している。コアを包んでいる正 20 面体のキャプシド (capsid) は、240 個のヘキソン (hexon) と、12 個の頂点に位置するペントンベース (pentone base) から成り、ペントンベースにファイバー (fiber) が結合している (36)。

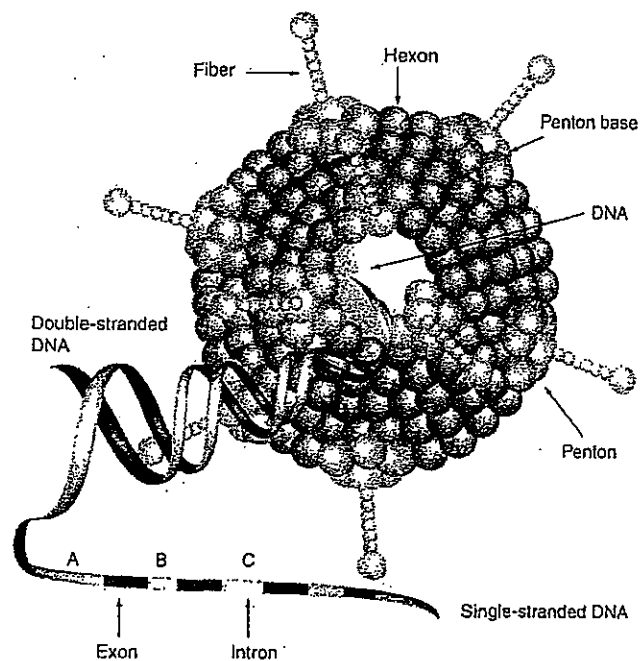


図 8 アデノウイルス粒子の外観図 (文献 36
から抜粋)

c) 生活環 :

ウイルス粒子は、ファイバーを介して標的細胞の受容体と結合し、次いでペントンベースがインテグリンに結合する。ペントンベースとインテグリンの相互作用により、ウイルス粒子はエンドサイトーシスにより細胞質に取り込まれる。細胞表面に吸着したウイルス粒子の 80～85%がエンドソーム中に取り込まれ、エンドソーム中のウイルス粒子の約 90%がエンドソームを破壊して細胞質へ移動する。その過程で、まずペントンベースが外れ、続いて粒子構造が壊れコアが核膜内に放出される。核内でウイルスゲノムは染色体外遺伝子として存在する。ウイルスゲノムから細胞由来の転写因子を利用して E1A 遺伝子産物がまず産生され、他の初期遺伝子群の発現を制御する。次いで E2 遺伝子産物の蓄積に伴い、DNA 複製反応が開始される。同時に後期遺伝子群の発現が起こり、ウイルス粒子構成蛋白質が産生される。その際、E1B 遺伝子産物及び E4 遺伝子産物により、感染細胞由来 mRNA の細胞質への移行が阻害されるとともに、細胞由来の 5'末端に存在するキャップ構造に結合する蛋白質 (CBP) が脱リン酸化され、細胞由来 mRNA の翻訳は著しく制御される。

その結果、キャップ非依存的に翻訳されるウイルス由来 mRNA が効率的に細胞質に蓄積し、ウイルス粒子構成蛋白質の産生が促進される。過剰に産生されたウイルス粒子構成蛋白質は、ウイルスゲノムとともに核内でウイルス粒子として組み立てられる。さらに、ウイルス粒子の蓄積により、その凝集塊から成る核内封入体と呼ばれる構造体が形成され

る。ウイルス粒子は、感染細胞の崩壊により、細胞外に放出される。

d) 宿主域：

ヒトアデノウイルスは、ヒトを始めとして、サル、ネコ、イヌ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、トリ等哺乳類・鳥類の細胞に幅広く感染し、取り込まれる。しかし、生活環を全うし、ウイルス粒子を産生するためには、ヒトアデノウイルスは、種特異的であり、ヒト以外では、ハムスター、コットン・ラット等ごくわずかな種でしかウイルスの増殖は認められない。ヒトに最も近いサルですら、宿主としては適当でなく、SV40 の共感染下にはじめて、ウイルス粒子が産生される。

また、ヒトアデノウイルスは、広い範囲の組織に感染可能であり、高度に分化した神経系、筋系、肝細胞から上皮細胞、線維芽細胞に至る付着系の細胞に感染することが知られているが、細胞内での増殖の程度は、組織により異なる (37,38)。

e) 病原性：

ヒトアデノウイルスは、急性の呼吸器疾患、角結膜炎、乳幼児下痢症などの起因ウイルスとして知られている。しかし、各疾患の発症はアデノウイルスの血清型と関連しており、Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターの起源ウイルスであるアデノウイルス 5 型は、乳幼児における急性発熱性咽頭炎の起因ウイルスとして知られている。最近、百日咳様症候群との関連が報告されているが、アデノウイルス 5 型の単独感染が百日咳様症候群の原因であるよりむしろ、百日咳菌の感染下に潜在ウイルスの活性化が起きている可能性が指摘されている (39)。アデノウイルス感染に関連した疾患について、表 1 に示した。

表 1 アデノウイルス感染に関連した疾患

疾 患 名	対 象 患 者	関連血清型
急性発熱性咽頭炎	乳幼児	1-3、5-7
咽頭結膜性発熱	小児	3、7、14
急性呼吸疾患	新兵 (軍人)	3、4、7、14、21
肺炎	乳幼児	1-3、7
肺炎	新兵 (軍人)	4、7
流行性角結膜炎	全世代	8、11、19、37
百日咳様症候群	乳幼児	5
急性出血性膀胱炎	乳幼児	11、21
胃腸炎	乳幼児	40、41
肝炎	肝移植レシピエント (乳幼児)	1、2、5
尿管内ウイルス存続	AIDS患者他免疫抑制状態の患者	34、35

f) 細胞傷害性：

ヒトアデノウイルスの宿主細胞に対する細胞傷害性の発現は、宿主細胞由来の蛋白質合成阻害及びウイルス構成蛋白質の貯留によると考えられている。

宿主細胞由来の蛋白質合成停止に至る過程に関しては、上記生活環の項にも示したように、ウイルス初期遺伝子群のうち E1B 遺伝子産物によりウイルス由来 mRNA のみを優先的に核から細胞質に移行させるとともに、E1B 及び E4 遺伝子産物が宿主細胞由来 mRNA の細胞質への移行を阻害し、宿主細胞由来 mRNA の翻訳を抑制している。また、ウイルス感染に伴い、細胞由来の mRNA の 5'末端に存在するキャップ構造に結合する蛋白質 (CBP) が脱リン酸化され、不活化されることにより、細胞由来の mRNA の翻訳はさらに著しく抑制される。

ウイルス構成蛋白質の一つであるペントンベースは、細胞表面に存在するインテグリンに結合することが知られており、過剰に産生されたペントンベースがインテグリンを飽和し、宿主細胞と細胞周囲の環境との相互作用は阻害される。

現在のところ、以上のメカニズムにより、宿主細胞は障害されると考えられている。

6.4.3. 当該治療法を選択した理由

ヒトアデノウイルス 5 型は、幼児期に気道感染によりいわゆる「かぜ」を起こすウイルスのひとつとして知られており、米国では 30 年以上の間、約 100 万人の兵士に対しワクチンとしてアデノウイルスが投与され、その後重篤な副作用の報告もなかった実績を持つ。

遺伝子治療の目的では、E1A、E1B、及び E3 欠損型の非増殖性アデノウイルスベクターが用いられてきた。非増殖性アデノウイルスベクターは、E1 遺伝子を持続的に発現しているヒト胎児腎由来細胞株 (293 細胞) 内で高力価になるまで増殖する。このウイルスベクター液を他の培養細胞や動物組織に感染させると、ウイルス粒子は細胞内に高率に侵入しウイルスゲノムは核内へと注入される。しかし、次に発現すべき E1 遺伝子が欠損しているため、この蛋白質により転写活性化を受ける他のすべてのアデノウイルスプロモーターは駆動することができず、ウイルスの生活環はここで停止する。そして、外来プロモーターから転写される治療遺伝子のみが発現することになる。CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) 遺伝子を組み込んだベクターによる嚢胞性線維症に対する遺伝子治療や、癌抑制遺伝子 p53 や HSV-tK (herpes simplex virus thymidine kinase) 自殺遺伝子を用いた癌の遺伝子治療など、様々な臨床応用の試みがなされてきており、その安全性に関しては多くのデータが集積されつつある (40-47)。しかし、癌を対象とした臨床試験の場合、症例によっては局所的な腫瘍縮小や増殖抑制など明らかな臨床効果が認められる一方で、ウイルスの感染効率や腫瘍内分布は十分とは言えず、非増殖性ウイルスベクターの限界が認識されてきているのも事実である。そこで本研究では、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で選択的に増殖して細胞死を引き起こす改変アデノウイルス Telomelysin を用いる。

アデノウイルスはその構造が最もよく研究されているウイルスの一つであり、比較的容

易にゲノムの改変を行うことが可能である。アデノウイルスは、染色体への積極的な組み込み機構を有しておらず、患者に直接ウイルスを投与する *in vivo* 治療においてもウイルス関連タンパク質に起因する副作用が永続する可能性は低く、また染色体への組み込みによる insertional mutagenesis を考慮する必要もないと考えられる。また、アデノウイルスは休止期 (G0/G1 期) の細胞にも感染可能であり、比較的緩やかな増殖を示す低悪性度の腫瘍や heterogeneity による増殖の遅いクローンに対しても抗腫瘍活性を期待することができる。さらに、極めて高力価のウイルスが生産可能である点も、アデノウイルスが *in vivo* での腫瘍融解ウイルス治療に適している理由の一つである。実際に米国では、前立腺がんの特異的な PSA プロモーターを用いた制限増殖腫瘍融解アデノウイルスや、p53 遺伝子機能を欠失したがん細胞でのみ増殖可能な Onyx-015 (E1B 55kD 欠損アデノウイルス) の臨床試験が進められてきている (47-49) (詳細は「12. 当該遺伝子治療研究に関連する国内外の研究状況」参照)。

6.5. Telomelysin の作成方法と構造

6.5.1. Telomelysin の作製方法

293 細胞から抽出した RNA から以下の特異的プライマー (E1A-S: 5'-ACA CCG GGA CTG AAA ATG AG-3', E1A-AS: 5'-CAC AGG TTT ACA CCT TAT GGC-3') を用いて RT-PCR を行い、897-bp の E1A 遺伝子を増幅した。また、293 細胞から抽出した DNA より以下のプライマー (E1B-S: 5'-CTG ACC TCA TGG AGG CTT GG-3', E1B-AS: 5'-GCC CAC ACA TTT CAG TAC CTC-3') を用いて DNA-PCR を行い、1822-bp の E1B 遺伝子を増幅した。それぞれの PCR 産物の TA Cloning (TA Cloning kit dual Promoter; Invitrogen) を行い、シーケンスを確認した後、制限酵素 EcoRI により、各々 911-bp (E1A)、1836-bp (E1B) の DNA 断片を切り出した。pIRES ベクター (CLONTECH) の MluI 切断部位に E1A を、SalI 部位に E1B をそれぞれ順方向に挿入した (E1A-IRES I-E1B)。制限酵素 MluI および BglII で切り出した 455-bp の hTERT プロモーター配列を、E1A-IRES-E1B の E1A 上流にある XhoI 部位に順方向に挿入した (phTERT-E1A-IRES-E1B)。pShuttle ベクターに含まれる CMV プロモーターを制限酵素 MfeI および NheI 処理により取り除き、その部位に phTERT-E1A-IRES-E1B より制限酵素 NheI および NotI で切り出した 3828-bp の配列を挿入した (pSh-hAIB)。pEGFP-N1 (CLONTECH) を AgeI/NheI で切断し、klenow fragment で平滑化し self-ligation した (pEGFP-N2)。この pEGFP-N2 を NsiI/AflIII で切断し、T4 DNA polymerase で平滑化し BglII linker を使って、BglII 部位を作製した。この BglII fragment を pHM11 の BamHI 部位に挿入した (pHM11-EGFP-N2)。作製した組換え遺伝子を制限酵素 I-CeuI および PI-SceI により 4381bp の配列を切り出し、Adeno-X Expression System (CLONTECH) の Adeno-X Viral DNA に挿入した (Adeno-X-hAIB)。Adeno-X-hAIB を制限酵素 PacI 処理で線状化した後、293 細胞にトランスフェクションし、感染性のある組換えアデノウイルス Telomelysin (開発コード: OBP-301) を作製した (50)。

本研究に用いられる Telomelysin は、米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において the current Good Manufacturing Practice (cGMP) に従った製造工程で製造された。Master Cell Bank (MCB) 由来の HeLa 細胞を Wave 200 バイオリアクターにて大量培養し、Master Virus Bank (MVB) 由来の Telomelysin ウイルスを感染させた後、カラムにて精製、各種品質試験を終えた後にバイアルに分注し保管されている。

6.5.2. Telomelysin の構造

アデノウイルスは全質量の 13% を占める DNA と 87% を占めるタンパク質を含む、直径 65-80nm の正二十面体の構造を有する (図 8)。ウイルスの DNA は約 36kb の長さである。アデノウイルスタンパク質の発現は、一般的に早期と後期とに分類される。6 つのタンパク質が早期 (E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4) に、他のタンパク質 (L1、 χ a2、 η) は後期に発現する。E1A と E1B はウイルス DNA の複製に重要な役割を果たす。E2A は DNA 結合タンパクをコードし、E2B は DNA polymerase 及びウイルスゲノムの 5'末端に見られるタンパクをコードする。E3 はウイルス DNA の複製に関連しないが、ウイルスの感染に対する宿主免疫反応を引き起こすと考えられる。E4 蛋白はウイルスの構築と関連すると考えられている。本研究に用いられる Telomelysin は、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される (図 9)。なお、hTERT プロモーター配列 (455-bp)、E1A・E1B 遺伝子配列 (911-bp : 1836-bp)、及び IRES 配列 (605-bp) の塩基配列を図 3-1、7、8、9 に示す。

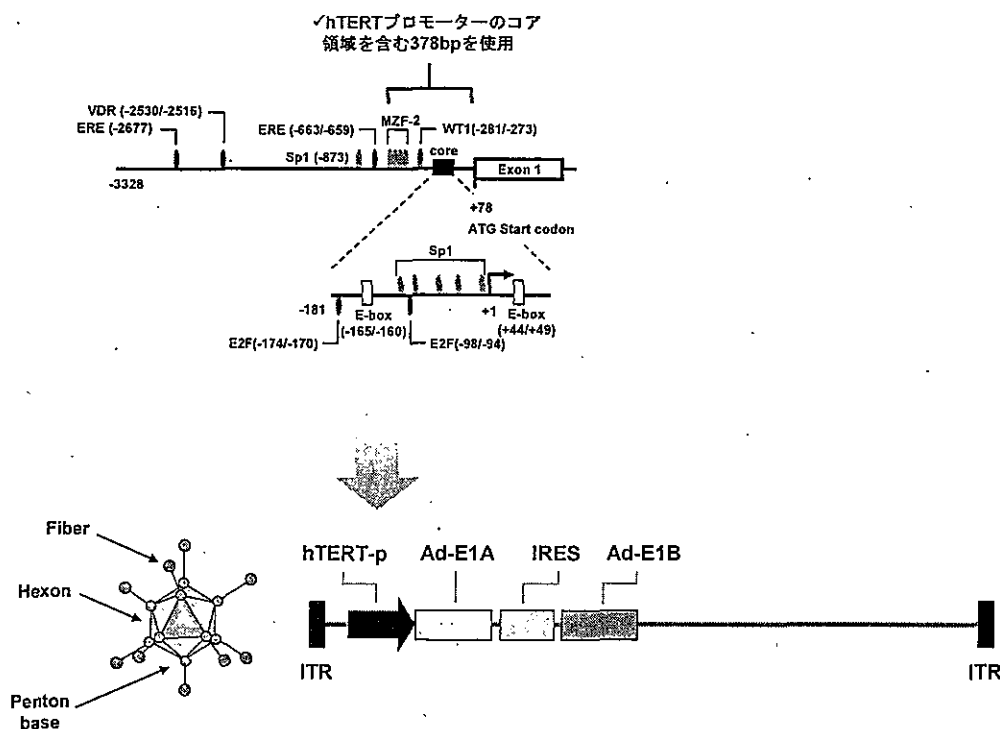


図 9 Telomelysin の構造

Telomelysin はヒトアデノウイルス 5 型由来の第 1 世代アデノウイルスベクターを基本骨格としており、ウイルス粒子構成蛋白質に対して特に修飾は加えられていないため、野生型ウイルスと同様、種特異性は低く哺乳類、鳥類由来のほとんどの細胞に感染が可能であり、かつ組織特異性も低く、様々な臓器由来の癌細胞に感染することができる。また、レトロウイルス等と異なり、休止期 (G0/G1 期) の細胞に対しても感染が可能である (41)。野生型アデノウイルスと同様、積極的に染色体に組み込まれることはなく、染色体外遺伝子として存在する (epichromosomal localization) ため、染色体に組み込まれるレトロウイルスのように、insertional mutagenesis による変異の発生の可能性は極めて低い。アデノウイルスはマルチプルに標的細胞に感染し、細胞表面に吸着したベクター粒子の 80-85% がエンドソーム中に取り込まれ、エンドソーム中のベクター粒子の約 90% が細胞質に移動し、核内に導入される。したがって、Telomelysin の感染効率他他の既存のベクターに比較して極めて高く、局所投与による *in vivo* 治療に適していると言える。

7. これまでの Telomelysin に関する培養細胞、実験動物を用いた研究成果

7.1. 培養細胞を用いた研究の成果

7.1.1. 培養細胞における Telomelysin 感染による選択的 E1 遺伝子発現とウイルス増殖

Telomelysin の癌細胞選択的な増殖と細胞死の誘導を確認するために、上皮系及び間葉系ヒト培養悪性腫瘍細胞を用いた実験を行った。まず、種々の臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株から RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて hTERT mRNA レベルを定量的に解析することで、それぞれの細胞株におけるテロメラーゼ活性を比較検討した。細胞株間で発現レベルに差はあるものの、肺癌 (H460、H1299)、食道癌 (TE8、T.Tn)、胃癌 (MKN28、MKN45)、大腸癌 (SW620、HT29)、肝臓癌 (HepG2)、膵臓癌 (Panc-1)、乳癌 (MCF-7)、頭頸部癌 (HSC-3、HSC-4、SCC-9、SCC-4)、前立腺癌 (LNCaP、PC-3)、子宮頸癌 (HeLa)、及び骨肉腫 (U-2OS) の各細胞株で hTERT mRNA 発現が確認された (図 10) (51)。一方、ヒト正常線維芽細胞 (WI-38、normal human lung fibroblast; NHLF) やヒト正常血管内皮細胞 (human vascular endothelial cell; HUVEC)、ヒト腎上皮細胞 (human renal epithelial cell; HRE) では hTERT mRNA 発現は認められなかった。

次に、hTERT プロモーターの選択的な転写活性を確認するために、SW620 ヒト大腸癌細胞と WI-38 ヒト正常線維芽細胞に 0、0.1、1 MOI (multiplicity of infection) で Telomelysin を感染させ、24 時間後に E1A 及び E1B mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。デンシトメトリーによる定量では、1 MOI の Telomelysin の感染により SW620 細胞では WI-38 細胞に比べて 5 倍の E1A mRNA 発現、及び 3 倍の E1B mRNA 発現が誘導された (図 11-1)。また、抗 E1A 抗体を用いたウエスタンブロット解析では、SW620 細胞において Telomelysin の感染後 60 時間で用量依存性に E1A タンパク質の発現が認められたが、WI-38 細胞ではその発現は強く抑制されていた (図 11-2) (50)。

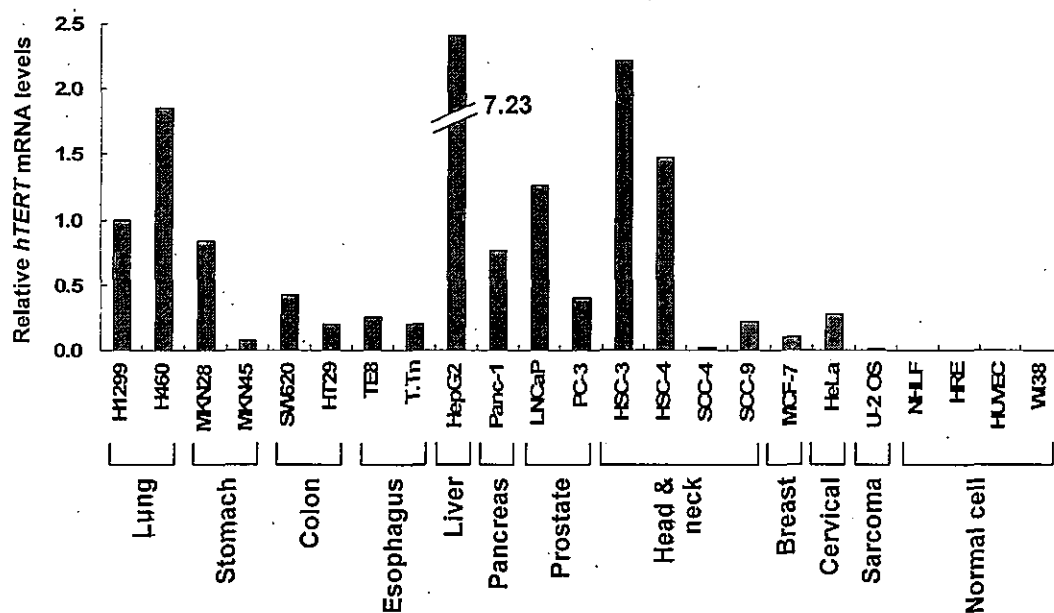


図 10 各種ヒト悪性腫瘍細胞株における hTERT mRNA 発現 (文献 51 より引用)

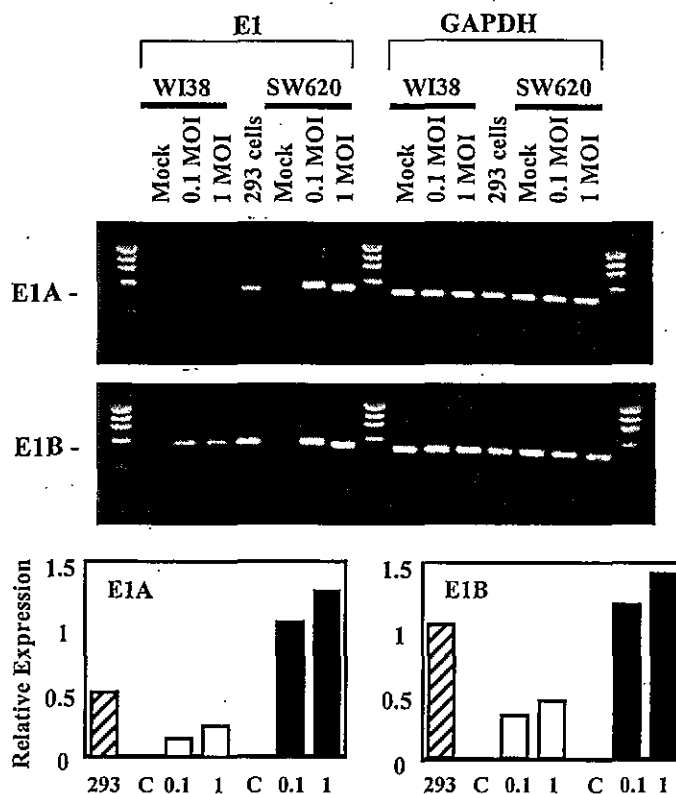


図 11-1 Telomelysin 感染後の癌細胞選択的な E1A 及び E1B mRNA 発現 (文献 50 より引用)

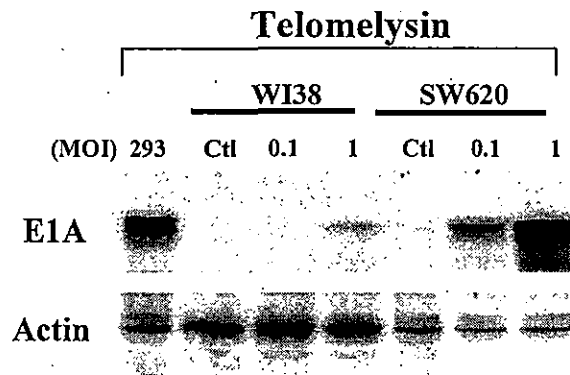


図 11-2 Telomelysin 感染後の癌細胞選択的な E1A タンパク質発現 (文献 50 より引用)

さらに、癌細胞における Telomelysin の選択的な増殖を確認するために、ヒト癌細胞 (SW620、H1299) 及び正常細胞 (WI-38、NHLF) に 1 MOI の Telomelysin を感染させ、経日的に細胞を回収し、293 細胞を用いてプラーク・アッセイを行うことで、ウイルス増殖を比較検討した。Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5 - 10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3 - 10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった (図 12-1) (50)。LNCaP ヒト前立腺癌細胞の透過型電子顕微鏡写真では、Telomelysin 感染後 24 時間で、細胞内で複製増殖するウイルス粒子が確認できた (図 12-2) (51)。

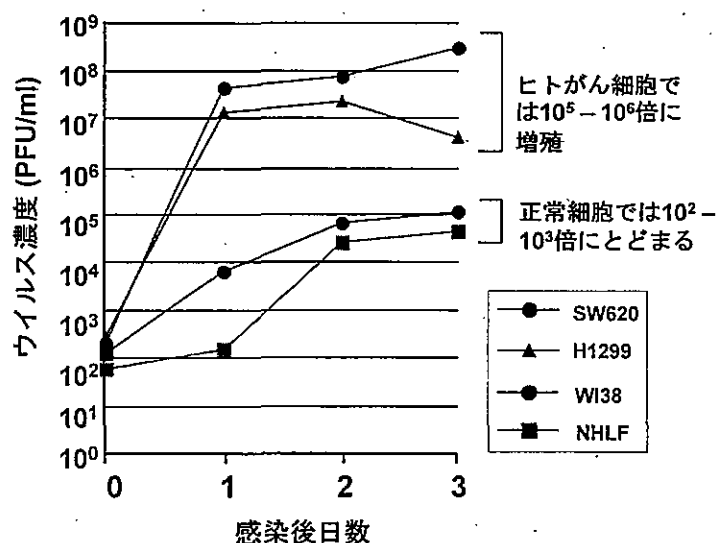


図 12-1 ヒト癌細胞及び正常細胞における Telomelysin の複製増殖効率 (文献 50 より引用)

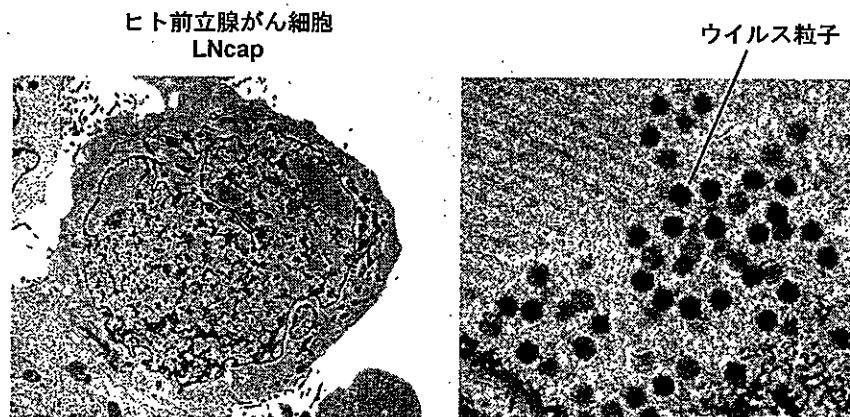


図 12-2 Telomelysin 感染後 24 時間の LNCaP 細胞の電子顕微鏡写真 (文献 52 より引用)

7.1.2. 培養細胞における Telomelysin の細胞障害活性

6 ウェルプレートに、SW620 大腸癌細胞、H1299 肺癌細胞、及び正常細胞である NHLF を蒔き、Telomelysin を感染させて 7 日後にプレートを Coomassie 染色して生細胞の比率を比較検討した。癌細胞ではウイルスの用量依存性に細胞死が認められたが、正常細胞では明らかな細胞傷害は見られなかった (図 13-1) (50)。また、Telomelysin を 0、0.01、0.1、1 MOI で感染させ、生細胞数を XTT アッセイにより経日的に測定したところ、癌細胞では 1 MOI で 3 日以内に、0.1 MOI では 5 日までにすべての細胞死が確認され、一方、NHLF では 5 日間生細胞数の減少は認められなかった (図 13-2)。さらに、様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の用量依存性の抗腫瘍活性を測定し、ID50 (50% の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin の広範な抗腫瘍効果が明らかになった (図 13-3) (53)。

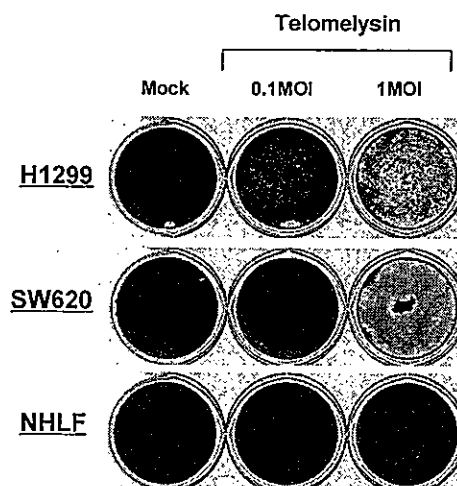


図 13-1 ヒト癌細胞及び正常細胞における Telomelysin の細胞傷害活性 (Coomassie 染色)
(文献 50 より引用)

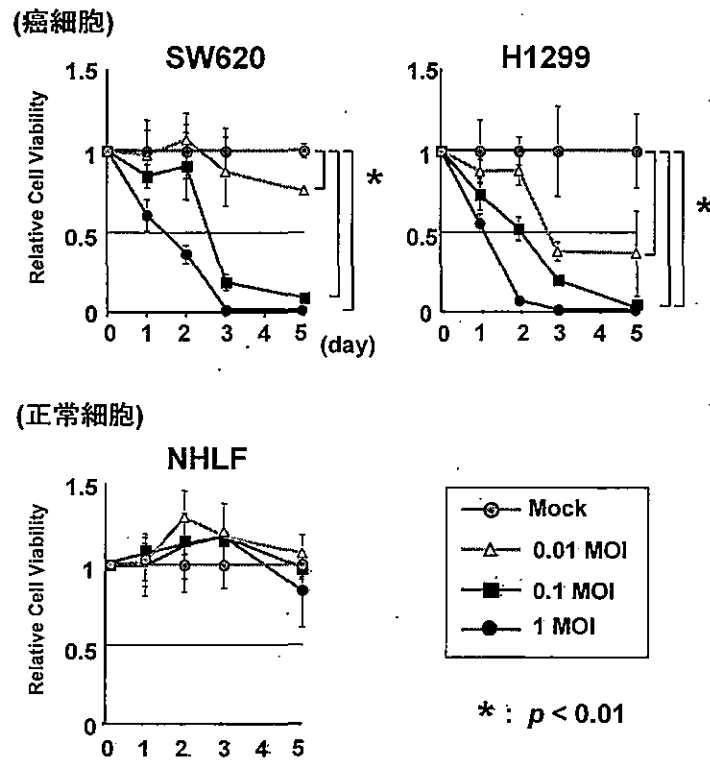


図 13-2 ヒト癌細胞及び正常細胞における Telomelysin の細胞傷害活性 (XTT アッセイ)
(文献 50 より引用)

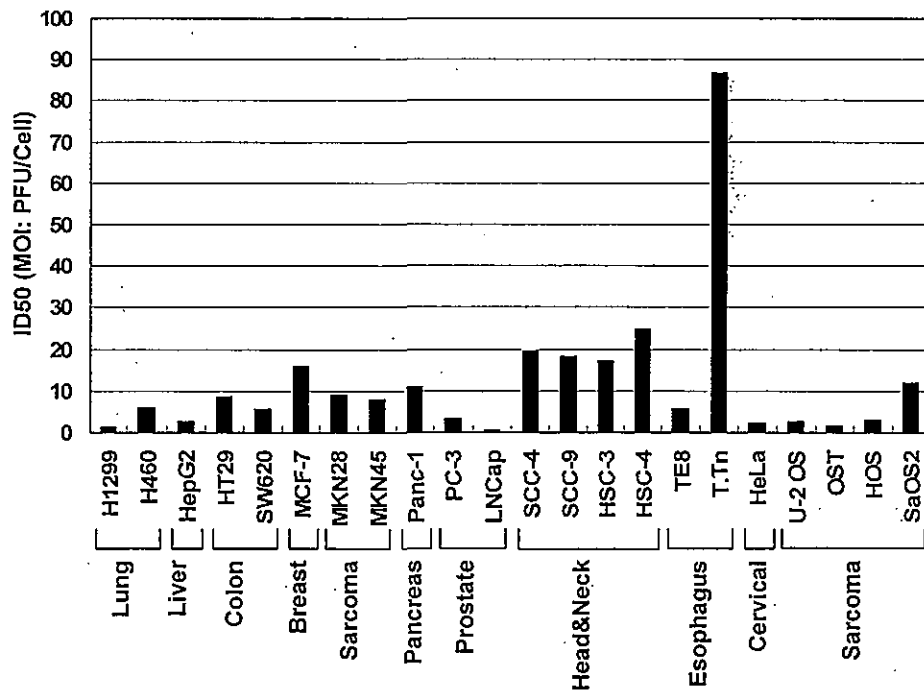


図 13-3 各種ヒト悪性腫瘍細胞株における Telomelysin の細胞障害活性 (ID50)
(文献 53 より引用)

7.1.3. 培養細胞における Telomelysin と放射線治療の併用効果

ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549、食道扁平上皮癌細胞株 TE8、食道腺癌細胞株 SEG1 を用いて、Telomelysin と放射線治療併用による細胞障害活性を *in vitro* で検討した。96 ウェルプレートにそれぞれの細胞を蒔き、Telomelysin を各濃度で感染させ、24 時間後に各線量の放射線照射を行った。5 日後の生細胞数を XTT アッセイにて測定し、各細胞株における用量反応曲線をプロットしたところ、いずれの細胞株においても放射線量依存性に Telomelysin との併用効果が認められた (図 14-1 上段) (54)。また、CalcuSyn software (ver. 2)にて Combination Index (CI) を計算したところ、ほとんどすべての組み合わせで相乗効果が確認された (図 14-1 下段)。さらに、A549、TE8 細胞に 1 MOI の Telomelysin を感染させ、24 時間後に 10Gy の放射線照射を行い、5 日目にフローサイトメリーにて活性化 caspase-3 発現細胞をカウントして、アポトーシス誘導を検討した。いずれの細胞においても、放射線単独に比べて、Telomelysin 併用により有意にアポトーシス細胞の増加が認められた (図 14-2 左)。治療後 5 日目に Hoechst 染色を行い蛍光顕微鏡下に形態学的変化を観察したところ、放射線 10Gy 照射群に比べて、Telomelysin 併用群では明らかに apoptotic body を有する死細胞の比率が増加しており、強力な抗腫瘍活性の誘導が示唆された (図 14-2 右)。Telomelysin 単独では明らかなアポトーシス細胞は観察されず、Telomelysin による細胞死の分子機構はアポトーシスとは異なると考えられる。

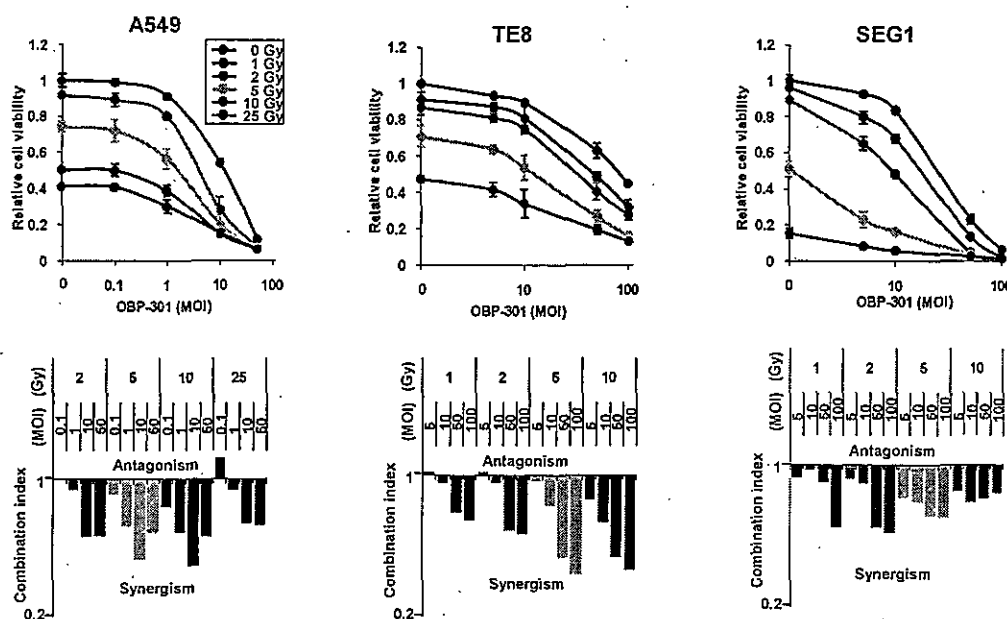


図 14-1 ヒト癌細胞における Telomelysin と放射線併用による抗腫瘍活性 (XTT 解析)
(文献 54 より引用)

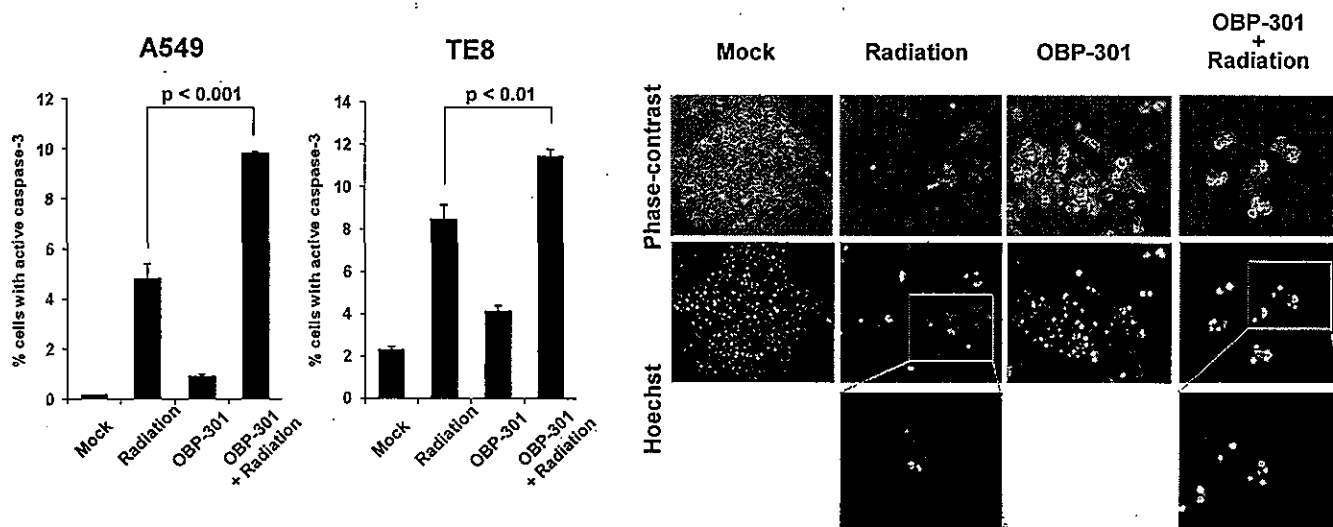


図 14-2 ヒト癌細胞における Telomelysin と放射線併用によるアポトーシス誘導
(左：FACS による活性化 caspase-3 発現、右：Hoechst 染色) (文献 54 より引用)

7.1.4. 放射線照射の培養細胞における Telomelysin の複製増殖・感染効率に及ぼす影響

放射線照射がアデノウイルスの複製増殖に及ぼす影響を検討するために、アデノウイルス E1A 配列を認識するプライマーを用いたリアルタイム PCR 解析を行った。ヒト非小細胞肺癌細胞株 A431、及び食道扁平上皮癌細胞株 TE8 に、2 Gy の放射線照射を行った直後に 1 MOI の Telomelysin を添加し、2 時間感染させた後に洗浄にて残存ウイルスを除去した。その後、経時的に抽出した DNA を用いて PCR 解析を行い、感染後 2 時間の値を 1.0 として、Telomelysin の増殖曲線を作成した (図 15)。いずれの細胞株においても、放射線治療を併用した群の増殖曲線は Telomelysin 単独感染の場合と変わらず、放射線照射は細胞内での Telomelysin の複製増殖に影響しないことが確認された。

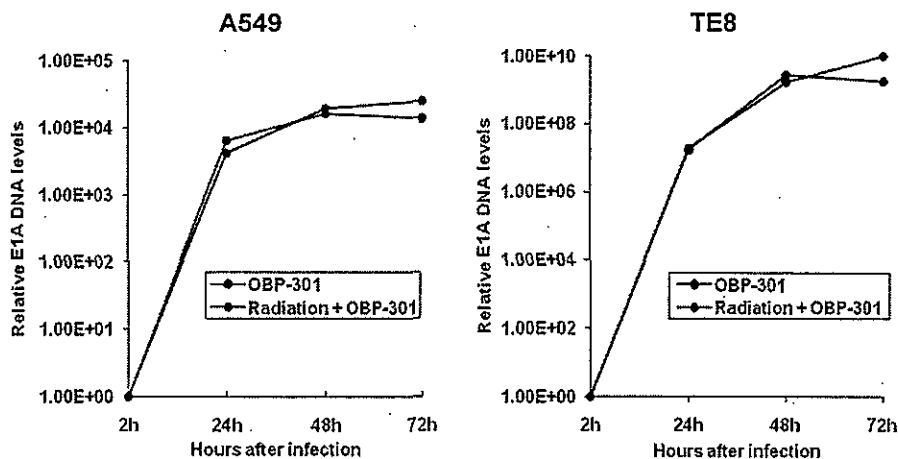


図 15 放射線照射のヒト癌細胞における Telomelysin の複製増殖に及ぼす影響
(文献 54 より引用)

放射線照射によりアデノウイルスの標的細胞への感染効率が変化することは、すでにいくつかの報告がなされている (55,56)。A549 肺癌細胞に各線量の放射線照射を行い、GFP 蛍光タンパク質を protein IX に組み込んだ非増殖型アデノウイルスを 10 MOI で感染させたところ、線量依存性に GFP 蛍光の増強が認められ、放射線照射が Telomelysin 感染効率を増強する可能性が示唆された (図 16-1)。また、放射線照射によるコクサッキー・アデノウイルス受容体 (coxsackievirus and adenovirus receptor: CAR) の発現変化をフローサイトメトリーにて定量したところ、線量依存性に平均蛍光強度 (MFI : Mean fluorescence Intensity) の増強が認められた (図 16-2)。

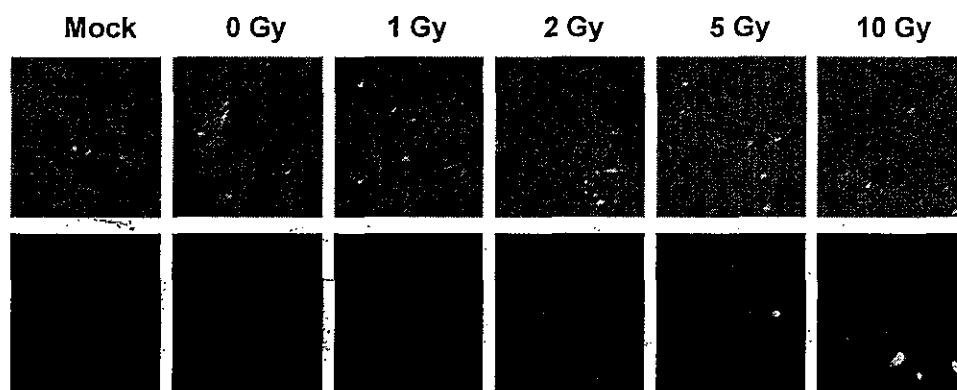


図 16-1 放射線照射のヒト癌細胞における Telomelysin の感染効率に及ぼす影響 (文献 54 より引用)

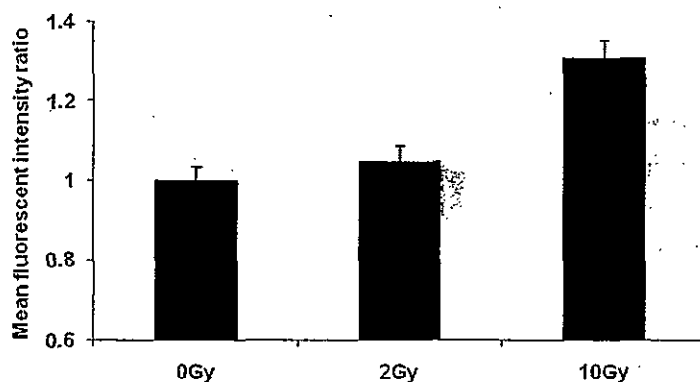


図 16-2 放射線照射によるアデノウイルス受容体発現の増強 (文献 54 より引用)

7.1.5. Telomelysin の放射線感受性に及ぼす影響の検討

最近の分子生物学的解析により、細胞における放射線感受性を規定する分子機構が明らかになりつつある (58)。放射線照射により細胞に二重鎖 DNA 切断が生じると、Mre11/NBS1/Rad50 (MRN)複合体が形成され、ATM をリン酸化することで細胞周期が止まり、DNA 修復が行われる。この過程で、Telomelysin が発現するアデノウイルス E1B

55kDa は MRN 複合体に結合してその分解を促進し、ATM のリン酸化を阻害することで、DNA 損傷の修復を阻害する。すなわち、Telomelysin の感染は、DNA 修復阻害により放射線感受性を増強すると考えられる (図 17)。

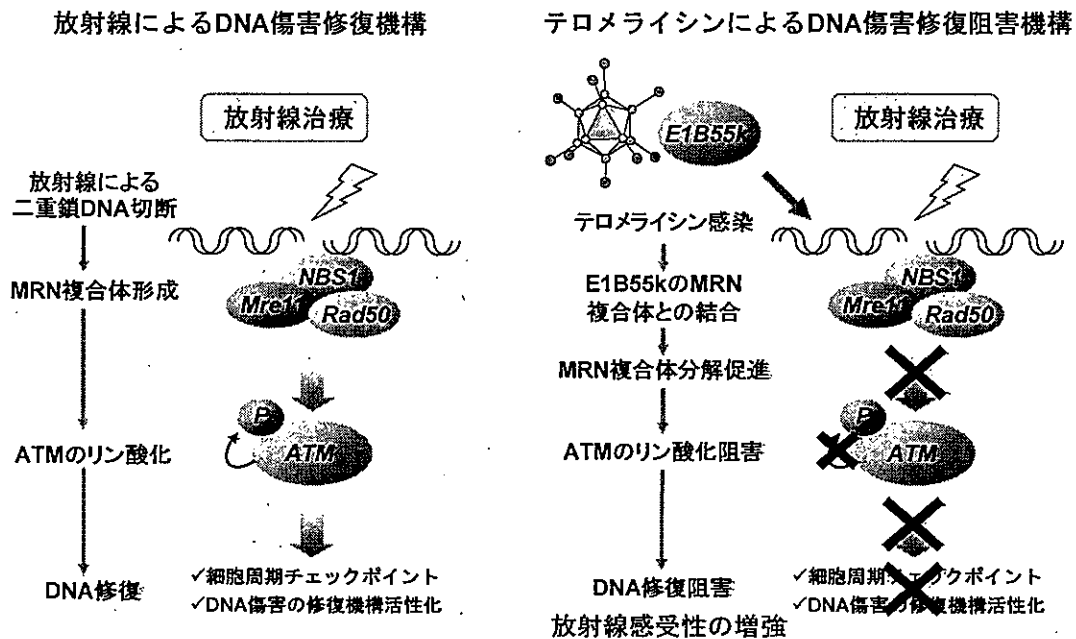


図 17 Telomelysin による DNA 損傷修復阻害による放射線感受性増強
(文献 58 より引用)

ヒト非小細胞肺癌細胞株 A549 に Telomelysin を 10 MOI で感染させ、経時的に Mre11、Rad50、NBS1、及び AdE1B55kDa の発現変化をウエスタンブロット解析にて検討した。Telomelysin 感染で E1B55kDa 発現が増強するとともに、Mre11、Rad50、NBS1、いずれの発現も減弱した (図 18-1) (54)。また、A549 細胞に Telomelysin 10 MOI を感染させた 24 時間後に 3Gy の放射線照射を行い、ATM のリン酸化を確認した。放射線照射単独ではリン酸化 ATM の発現が認められたが、Telomelysin の感染によりリン酸化 ATM の発現は完全に抑制された (図 18-2 左)。これは、リン酸化 ATM 特異的抗体による免疫蛍光染色でも確認された (図 18-2 右)。

さらに、A549 細胞で 3Gy の放射線照射後に、DNA 損傷を認識する γ H2AX 蛋白質の発現変化をウエスタンブロット解析にて検討したところ、DNA 修復が進むにつれて経時的に発現レベルが減弱したが、Telomelysin を 10 MOI で感染させておくと、その発現減弱は阻害された。すなわち、Telomelysin により DNA 損傷の修復が阻害され、 γ H2AX 発現がそのまま維持されたと考えられる (図 19)。これらの結果から、Telomelysin 感染が放射線感受性を増強させる可能性が示唆された。

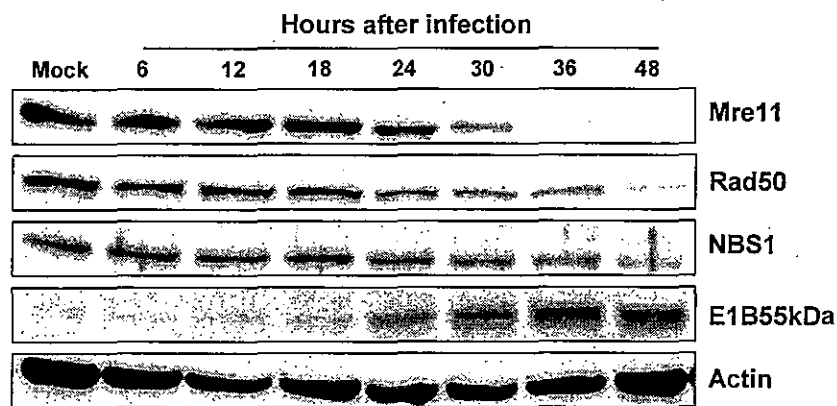


図 18-1 Telomelysin による Mre11/NBS1/Rad50 複合体の分解促進 (文献 54 より引用)

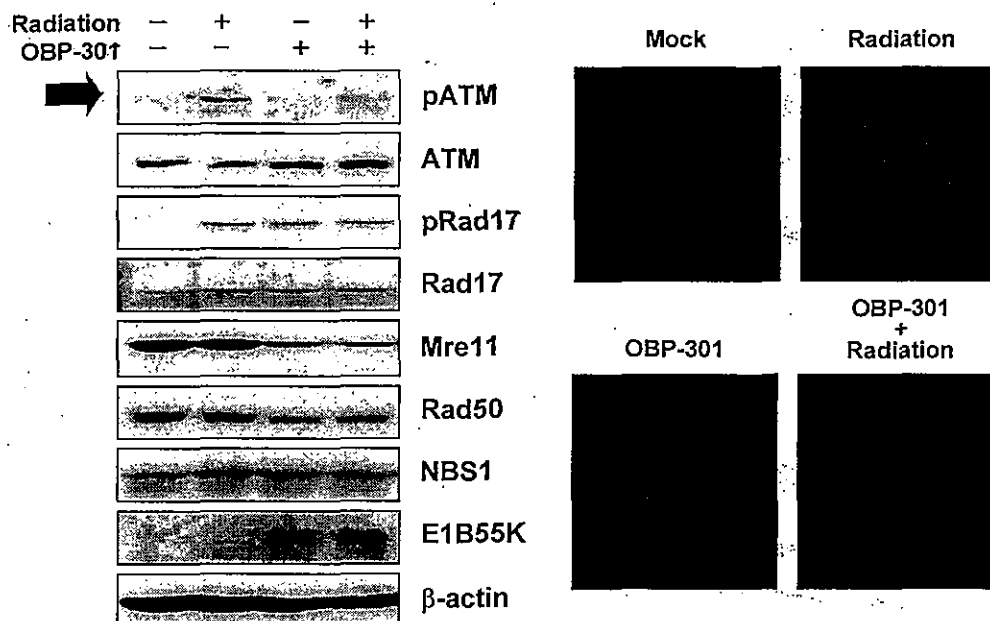


図 18-2 Telomelysin による ATM リン酸化の阻害 (文献 545 より引用)

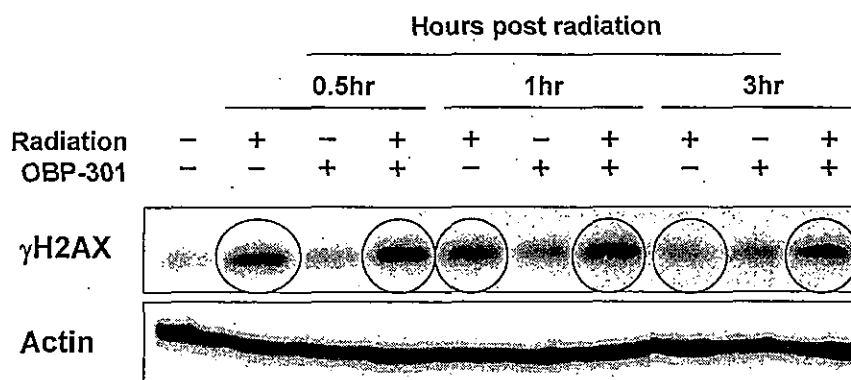


図 19 Telomelysin の DNA 損傷修復阻害によるγH2AX 発現の維持 (文献 54 より引用)

7.2. 実験動物を用いた研究の成果

7.2.1. 実験動物に投与された Telomelysin の抗腫瘍効果及び放射線治療との併用効果

ヒト舌扁平上皮癌細胞株 SAS-L とヌードマウスを用いた同所性頭頸部癌モデルにおいて、Telomelysin の腫瘍内投与の抗腫瘍効果を検討した (59)。6 週齢雌 BALB/c ヌードマウスの舌右縁に 10^6 個の SAS-L 細胞を移植し、第 7、10、13 日に 1×10^8 PFU/20 μ l/body の Telomelysin あるいは PBS (mock) を腫瘍内に投与した。注入した。3 日毎に腫瘍径を測定して推定腫瘍体積を算出するとともに、体重変化を観察した。Telomelysin により有意な腫瘍縮小がみられると同時に、体重減少からの顕著な回復が認められた (図 20)。すなわち、Telomelysin による頭頸部癌の局所制御により、経口摂取の改善による QOL の向上が期待できると考えられる。

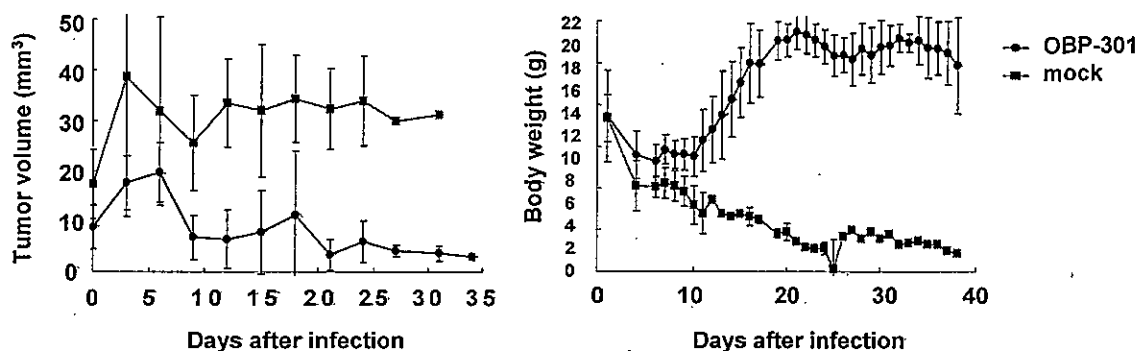


図 20 頭頸部癌同所性モデルにおける Telomelysin の *in vivo* 抗腫瘍効果
(文献 59 より引用)

ヒト培養癌細胞を用いた *in vitro* の実験において、Telomelysin と放射線治療の併用による抗腫瘍効果の増強が明らかとなり、放射線による Telomelysin の感染効率の増強や Telomelysin による DNA 損傷修復阻害を介した放射線感受性の増強などの理論的根拠も確認された。それらの結果に基づき、ヒト癌細胞とヌードマウスによる皮下腫瘍モデルを用いて *in vivo* における抗腫瘍効果を検討した。5 週齢雌 BALB/c ヌードマウスの背部皮下に A549 ヒト肺癌細胞、TE8 ヒト食道扁平上皮癌細胞、SEG1 ヒト食道腺癌細胞を移植し、腫瘍径が 7-12 mm 大になった時点で、麻酔下に腫瘍部位に 2Gy の放射線照射を行い、直後に Telomelysin を腫瘍内に 1×10^8 PFU/50 μ l/body ずつ注入した。この治療を第 1、3、5 日 (A549) あるいは第 1、8、15 日 (TE8、SEG1) に施行した。対照として、無治療群 (PBS を腫瘍内に投与)、放射線照射単独群、Telomelysin 単独投与群を設定した。3 日毎に腫瘍径を測定し、推定腫瘍体積を算出した。放射線単独群、Telomelysin 単独群でも無治療群に比べて有意な抗腫瘍活性が認められたが、併用群では腫瘍の部分的な退縮がみられ、他のいずれの群よりも有意に強い抗腫瘍効果が観察された (図 21-1) (54)。A549 腫瘍では、治療開始後 28 日目に併用群では 6 匹中 3 匹に腫瘍の完全退縮がみられ (図 21-2)、組織学的には著明な腫瘍組織の破壊と硝子様変性が観察された (図 21-3)。

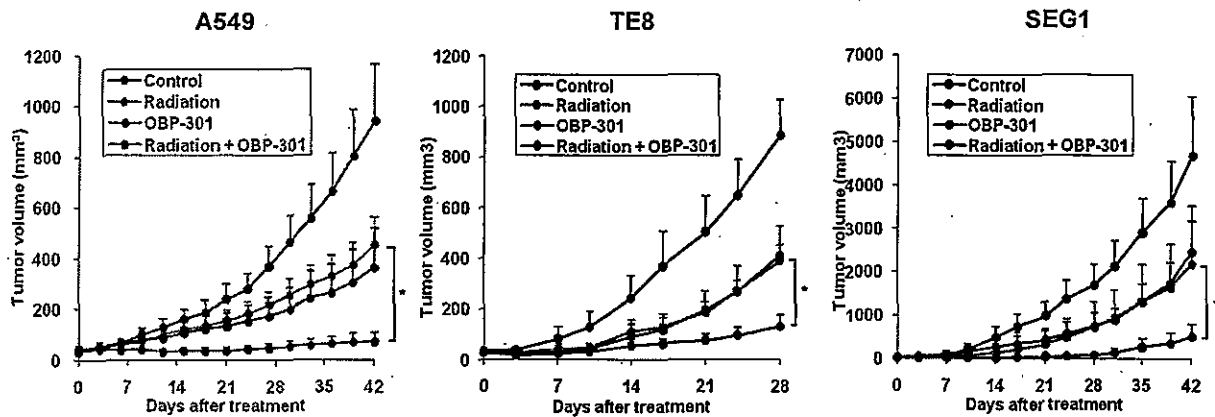


図 20-1 *In vivo* における Telomelysin 腫瘍内投与と局所放射線治療併用による抗腫瘍効果
(文献 54 より引用)

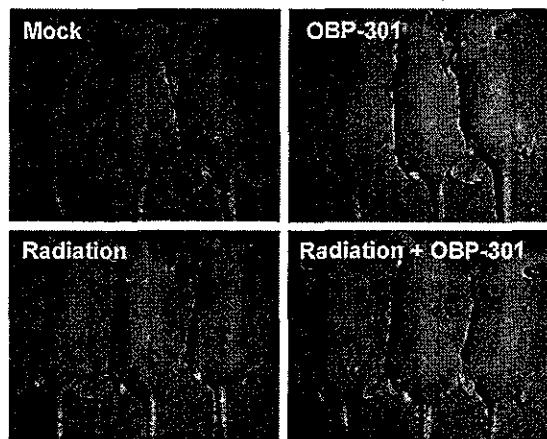


図 20-2 Telomelysin 腫瘍内投与と局所放射線治療併用療法後の肉眼所見 (28 日目)
(文献 54 より引用)

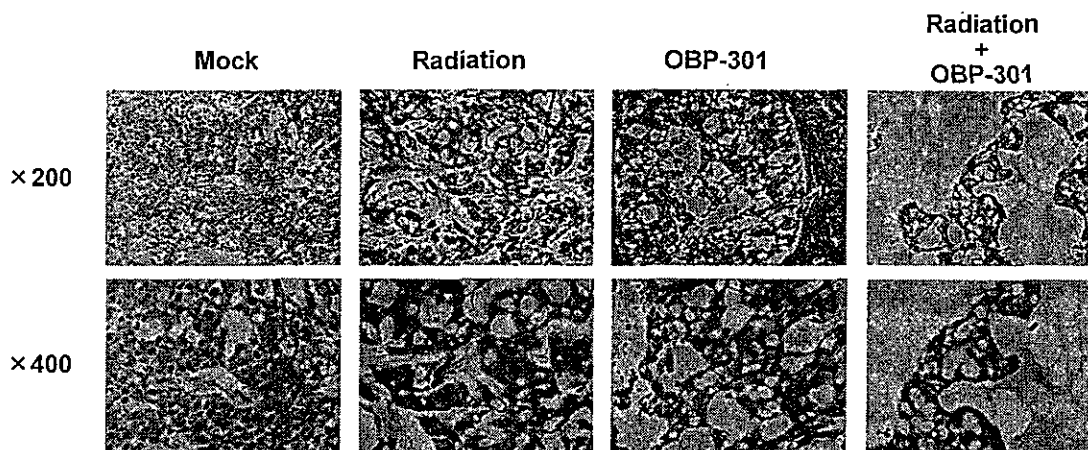


図 20-3 Telomelysin 腫瘍内投与と局所放射線治療併用療法後の組織変化 (28 日目)
(文献 54 より引用)

7.2.2. Telomelysin を投与された実験動物における毒性及び体内分布に関する解析

a) コットンラットへの単回皮下投与あるいは静脈内投与による毒性試験及び生体内分布

Non-Good Laboratory Practice (GLP) 規格の Telomelysin による予備毒性試験を行った。一群雌雄 6 匹ずつのコットンラット (7 週齢) に、 1×10^9 (Group 1)、 1×10^{10} (Group 2)、 1×10^{11} (Group 3) viral particle (VP)/body の Telomelysin を筋肉内に、あるいは 1×10^{11} VP/body の Telomelysin を静脈内 (Group 4) に単回投与した。投与後 3 日目に血液採取を行い、8 日目に剖検にて血液と各臓器を回収、腎臓、肝臓、肺、精巣 (雄)、卵巣 (雌)、膀胱、子宮 (雌) に関しては病理組織学的解析を行った。死亡動物はなく、一般状態、体重、摂餌量についても特記すべき変化は認められなかった。血液性化学検査では、8 日目に Group 3 と 4 で白血球数とリンパ球数の高値を示した。Group 3 では血小板数の上昇が確認されたが、Group 4 ではみられなかったことから、生物学的に意味のある変化ではないと思われた。また Group 4 では、ALT、AST、ALP (雄と雌)、及び γ -GTP (雄) の上昇が認められた。静脈内投与の Group 4 の雄で認められた肝機能パラメーターの変化以外は、毒性学的に意味のある変化はないと考えられた。病理組織学的には、静脈内投与の Group 4 で主に肝臓の単細胞壊死などの軽度から中等度の組織学的変化が認められたが、やはり毒性学的には問題となるレベルではないと思われた。

血中及び組織中に分布した Telomelysin を検出するために、Telomelysin に特異的な E1A 配列に対するプライマーを用いた定量的 PCR 解析を行った (53)。Telomelysin は、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目に血液ならびに測定した組織中で検出可能であったが、筋肉内投与では静脈内投与に比較し、テロメライシン DNA 量が少なかった (図 21)。

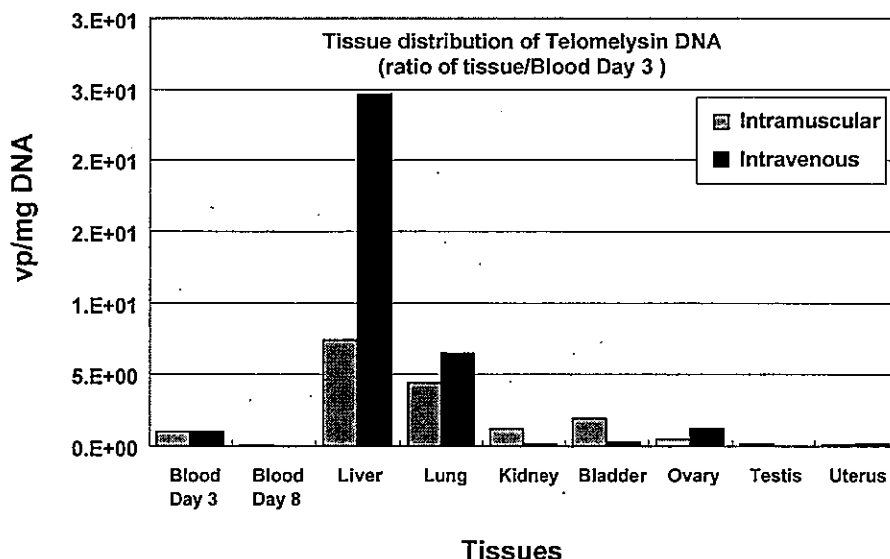


図 21 筋肉内投与あるいは静脈内投与後の Telomelysin のウイルス DNA 体内分布
(投与 3 日後における血液の値を 1 とした場合の比率を示す)

(添付資料 5・確認申請資料概要-5 章 5.7.1 参照)

b) コットンラットへの単回皮下投与による毒性試験

Non-GLP 規格の Telomelysin による予備毒性試験の結果に基づき、GLP 基準で精製した Telomelysin による毒性試験を行った。一群雌雄 20 匹ずつのコットンラット（7 週齢）に、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} viral particle (VP)/body の Telomelysin 及び対照群として溶解液を筋肉内に単回投与した。投与量はすべての群で 0.1 ml/body とした。各群雌雄 5 匹ずつを投与後 5、14、28、85 日目に屠殺して、血液学的及び血液生化学的検査を行うとともに各組織を回収、さらに高容量群では肝臓、腎臓、肺、精巣（雄）、卵巣（雌）、膀胱、子宮（雌）に関しては病理組織学的解析を行った。観察期間中に死亡動物はみられなかった。一般状態、体重、摂餌量については、対照群と比較して特記すべき変化は認められなかった。血液生化学検査においては、各投与群において変動した項目が散見されたが、変化の程度は軽度かつ一過性であった。また、投与後 85 日において、対照群と比較して散発的に違いが認められている変化があるが、用量依存性もなく、またその他の項目は対照群との違いは認められなかった。したがって、毒性学的に意味のある変化はないと考えられた。病理組織学的には、最高容量（ 1×10^{11} VP）の Telomelysin を投与したコットンラットにおいて、投与部位の炎症性変化、筋線維変性、出血などがみられたが、所見は軽度であり、時間経過とともに発現頻度は低下した。また、肝臓においては、対照群では認められていない肝細胞変性や急性炎症の所見が観察されたが、散発的で用量依存性も認められず、その変化は非常に軽度であり毒性学的に問題となるものではないと考えられた。

c) ヌードマウスの背部皮下に移植した A549 肺癌腫瘍内投与による毒性試験及び体内分布

A549 ヒト非小細胞肺癌細胞を 50 匹の雌ヌードマウスの右側胸部皮下に移植し、腫瘍が 350-450 mg に達した時点で 5 群に分け、 1×10^7 (Group 3)、 1×10^8 (Group 4)、 1×10^9 (Group 2 & 5) VP/body の Telomelysin 及び対照群として溶解液(Group 1)を腫瘍内に単回投与した。Group 1 及び Group 2 は 28 日目に、また Group 3-5 は 70 日目に屠殺して、腫瘍、脳、心臓、肺、卵巣、肝臓、子宮、腎臓、膀胱、大腸、腋窩及び腸間膜リンパ節の各組織を回収した。病理組織学的解析の結果、Telomelysin に起因する毒性学的に明らかな所見は認められなかった。

Group 2 及び Group 5 のマウスから回収した組織では、ウイルス DNA を測定するため定量的 PCR 解析を行った。投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった（図 22）。これは、投与部位での高濃度の Telomelysin が全身に流れたものと考えられるが、各組織の抗 E1A 抗体を用いた免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。

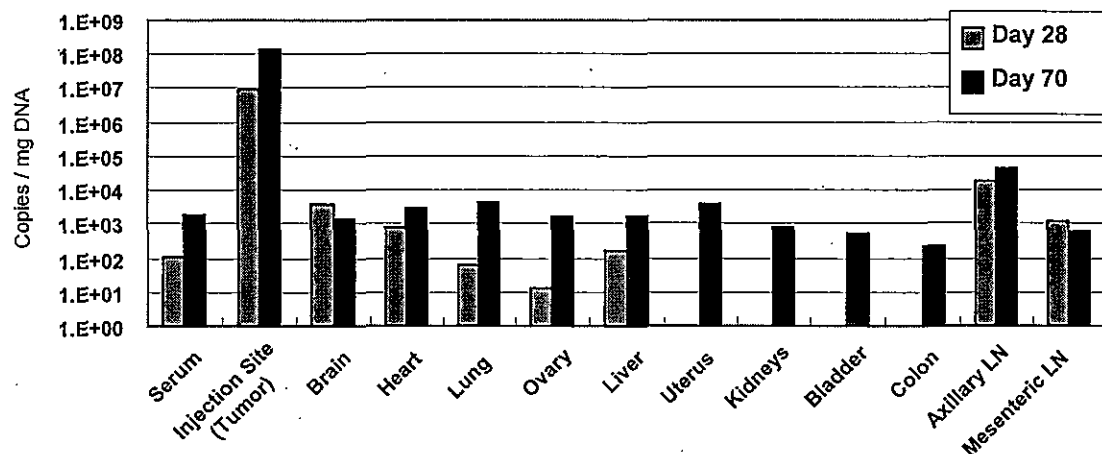


図 22 ノードマウス背部 A549 肺癌腫瘍内投与後の Telomelysin のウイルス DNA 体内分布
(投与 3 日後における血液の値を 1 とした場合の比率を示す)
(添付資料 5 確認申請資料概要-5 章 5.7.4 参照)

8. 安全性についての評価

8.1. 遺伝子導入方法の安全性

8.1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの純度

本研究に用いられる Telomelysin は、現行の cGMP 基準に従って、Master Cell Bank (MCB)、Master Virus Bank (MVB) など原材料から製造工程、最終製品に至るまで一貫した品質管理のもとに米国テキサス州ヒューストンの Introgen Therapeutics 社において生産されている。最終製品については、純度、確認試験、無菌試験、及びエンドトキシン試験等の安全性項目のすべてが確認されている (表 2-1)。

表 2-1 ウイルスベクター最終製品の品質管理試験

試験項目	内容
純度	外観、力価測定、OD 比、粒子試験、ウイルス粒子濃度、ウイルス粒子/PFU 比、HPLC 法
確認試験	回収液量、pH 測定、ヒトゲノム DNA 解析、制限酵素マッピング
無菌試験	培養上清中の好気性・嫌気性細菌、真菌、ヒトパピローマウイルス 18 型の混入
エンドトキシン試験	Limulus Amebocyte Lysate (LAL) gel-clot 法を用い検体中のグラム陰性菌のエンドトキシン・レベルを定量的に検出する。

また、Telomelysin の調製に使用する HeLa 細胞 MCB 及び Telomelysin MVB に対しても品質管理試験が施行され、各項目における安全性が確認された。MCB 及び MVB の試験項

目を表 2-2、2-3 に記す。

表 2-2 Master Cell Bank (MCB) の品質管理試験

No.	試験項目
1	ウイルス存在否定 in vitro 試験
2	ウイルス存在否定 in vivo 試験
3	透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の評価
4	HIV 否定試験 (バイオアッセイ・ELISA)
5	アイソザイムによる細胞確認試験
6	ソフト・アガロース培養試験
7	サイトメガロウイルス否定 in vitro 試験
8	B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)検出試験
9	EB ウイルス DNA 検出 in vitro 試験
10	Adeno-Associated Virus (AAV) DNA 検出 in vitro 試験
11	ヒトパルボウイルス B-19 DNA 検出試験
12	HTLV-I、HTLV-II 検出 PCR 試験
13	無菌・真菌否定試験
14	マイコプラズマ否定試験
15	レトロウイルス否定試験 (逆転写酵素活性)
16	C 型肝炎ウイルス検出試験(PCR)
17	腫瘍形成能確認試験 (ヌードマウス)

表 2-3 Master Virus Bank (MVB) の品質管理試験

No.	試験項目
1	無菌試験
2	ウイルス存在否定 in vitro 試験
3	ウイルス存在否定 in vivo 試験
4	マイコプラズマ否定試験
5	HTLV-I、HTLV-II 検出 PCR 試験
6	HIV 検出 PCR 試験
7	EB ウイルス検出 PCR 試験
8	サイトメガロウイルス検出 PCR 試験
9	B 型肝炎ウイルス検出 PCR 試験
10	Adeno-Associated Virus (AAV) DNA 検出 in vitro 試験
11	ヒトパルボウイルス B-19 DNA 検出試験

8.1.2. 増殖性ウイルス出現の可能性

遺伝子治療に用いられるほとんどのアデノウイルスベクターは、ウイルス複製に必要な E1 領域がウイルスより除かれ、特定の目的遺伝子に置き換えられている。それらの組換え型アデノウイルスでは、293 細胞のような E1 遺伝子を内在するヘルパー細胞が E1 由来転写活性因子をトランスに発現しなければ複製増殖することが出来ないが、アデノウイルスベクターの大量製造過程でベクターのゲノムが 293 細胞に組み込まれている E1 遺伝子領域に近接して相同組換えが起きることがある。その結果、現在のアデノウイルスベクター生産技術では、ある程度の確率で増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) が生じてしまうことは避けられないと考えられている。米国食品医薬品局 (US Food and Drug Administration, FDA) では RCA 量の許容限度を推奨しており、本邦では FDA の推奨値を参考としながら、RCA が混入している場合に想定されるリスクをケースバイケースの原則で評価した上で個別に許容限度を設定している (ICH-GTDC 会議における RCA に関する見解: 2004 年 6 月 10 日)。

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用のアデノウイルスベクターと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ RCA であるため、RCA 量を制限するこの評価基準の適応とはならない。しかし、293 細胞を用いた製造過程では、Telomelysin の hTERT プロモーター領域と 293 細胞が持つ内因性の E1A あるいは E1B プロモーターが相同組換えを生じる可能性は否定できない。Telomelysin に恒常的な遺伝子発現を誘導する E1 領域プロモーターが組み込まれた場合、Telomelysin の癌細胞特異的な制限増殖機能が消失し、いわゆる野生型アデノウイルスが生じることになる。一般的に、293 細胞への 1 粒子の組換え型アデノウイルスの感染は 10000 粒子以上の子孫アデノウイルスを生じうる。同時に、組換え型アデノウイルスと 293 細胞間の一回の相同組換えが起こる頻度は最低で 10^6 回の組換えイベントに一回であると予想される。実際に、293 細胞で製造した Telomelysin のロットには 0.01% 程度の相同組み換え体 (homologous recombinant) が存在していることが、Nested PCR 技術を用いた解析により明らかになっている。

a) HeLa 細胞使用による野生型アデノウイルス出現リスクの低減

野生型アデノウイルス出現の原因となる E1 領域プロモーターと hTERT プロモーターの相同組換えを防ぐ対策として、Introgen Therapeutics 社において子宮癌由来のヒト癌細胞 HeLa を用いた製造システムが開発された。Telomelysin は本来 E1 遺伝子を有しているため、E1 欠損アデノウイルスベクターのようにヘルパー細胞による E1 機能の補完は必要なく、hTERT プロモーターが活性化される細胞環境があれば複製・増殖することが可能である。80-85% 以上のヒト悪性腫瘍でテロメラーゼ活性の上昇が認められるため、多くの細胞株がヘルパー細胞の候補となりうるが、アデノウイルスに感受性をもち、かつ無血清培地で浮遊状態での大量培養が可能であることから HeLa 細胞が選定された。HeLa 細胞にはプロモーター配列を含めて E1 遺伝子領域が内在せず、Telomelysin との相同部位が全く存在し

ないため、野生型アデノウイルスの出現は起こらないと理論的には考えられる。

b) 野生型アデノウイルスの検出方法

理論上、HeLa 細胞を用いた製造では野生型アデノウイルスの出現は起こりえないと考えられるが、本研究で用いる Telomelysin のロットでは、Nested PCR 法を用いて野生型アデノウイルスの有無を確認した。E1A あるいは E1B 配列を標的として、以下のプライマーを用いて 1st PCR および 2nd PCR を行った。それぞれ 30 サイクルの増幅を行った後、ゲル電気泳動にて野生型アデノウイルスの混入を確認した。293 細胞で製造した Telomelysin のロットには、10ng のウイルス中に 1pg (0.01%) の野生型アデノウイルスが検出可能であったが、HeLa 細胞で製造したロットでは検出限界以下であり、野生型アデノウイルスの混入はないものと考えられた。

1st PCR

▪ E1A sets:

- forward primer: 5'-CTTGAGTGCCAGCGAGTAGAGTTTT-3'
- reverse primer: 5'-AATTACCACACCAAACCCACCACTCTA-3'
- Amplicon: 666bp

▪ E1B sets:

- forward primer: 5'-TTTGTTTGCTGAATGAGTTGATGTAAGTT-3'
- reverse primer: 5'-AAAGAATCAAACAGCTCACCACAGGA-3'
- Amplicon: 327bp

2nd PCR

▪ E1A sets:

- forward primer: 5'-CCCCGAAGATCCCAACGA-3'
- reverse primer: 5'-CACCCACTGCCATAATTTTCACTT-3'
- Amplicon: 423bp

▪ E1B sets:

- forward primer: 5'-GTTTGCTGAATGAGTTGATGTAAGT-3'
- reverse primer: 5'-GGATGAGCCCCACAGAAAC-3'
- Amplicon: 235bp

8.1.3. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性

前述 7.1.2 の培養細胞における Telomelysin の細胞障害活性の項で示したように、ヒト正常線維芽細胞 NHLF (normal human lung fibroblast) に対しては 1 MOI の Telomelysin の感染によっても 5 日後の生細胞数の有意な減少は認められなかった (図 13) (50)。また、ヒ

ト正常肝細胞 hNHep (human normal hepatocytes)、ヒト正常腎上皮細胞 HRE (human renal epithelial cell)、ヒト正常気道上皮細胞 NHBE (normal human bronchial epithelial cell) に Telomelysin と野生型アデノウイルスを 0.01 MOI で感染させ、5 日後の生細胞数を比較したところ、Telomelysin は野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した (図 23)。

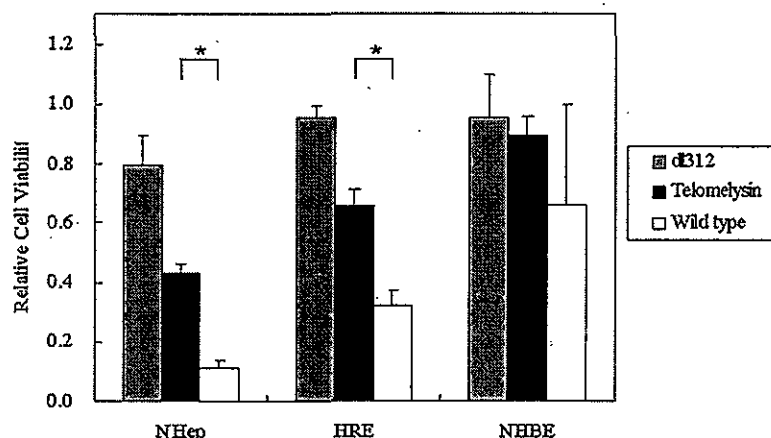


図 23 ヒト正常細胞における Telomelysin と野生型アデノウイルスの細胞障害活性の比較

また、前述 7.2.2 の *in vivo* 毒性試験において、コットンラットに最高 1×10^{11} VP/body の Telomelysin を筋肉内投与あるいは静脈内投与したところ、死亡動物はなく、一般的な全身状態や血液学的検査、病理組織学的解析などで、生物学的あるいは毒性学的に意味のある変化は認められなかった。さらに、ヌードマウスの皮下に移植したヒト腫瘍に最高 1×10^9 VP/body の Telomelysin を局所注入しても、観察期間中いかなる副作用もみられず、病理組織学的解析でも Telomelysin に起因する毒性学的に明らかな所見は認められなかった。従って、Telomelysin は本研究の投与濃度では細胞傷害性は極めて低いと考える。

8.1.4. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、非増殖型アデノウイルスベクターの腫瘍内投与の臨床試験において、末梢血中でのウイルスの循環が確認されている (43)。実際に、前述 7.2.2 の E1A 遺伝子に対する定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならびに測定した組織中で検出可能であった (図 21)。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった (図 22)。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 E1A 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。さ

らに、免疫系が正常な個体では、投与されたアデノウイルスは免疫機構により排除されるため、ウイルスおよびウイルス感染細胞が感染性を保持したままで長期にわたり多くの組織で存在し続けるとは考え難い。

8.1.5. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低いが、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。また、8.1.2.の項で示したように、本研究に使用する Telomelysin は HeLa 細胞を宿主として生産されているため、理論上、野生型アデノウイルスの混入は起こりえない。

8.1.6. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

アデノウイルス DNA は宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく複製・作用するため、積極的に染色体内に組み込まれる機構を持っていない。万が一、染色体に組み込まれた場合でも、組み込まれたウイルス粒子が活性化され染色体上から複製を認めた報告はない。

8.1.7. がん原性の有無

ヒトアデノウイルスには多くの種類があり、現在、血清学的に少なくとも 47 種までの亜型が知られており、各型間のウイルス DNA の相同性の違いから 6 亜群に分類されている。げっ歯類におけるその腫瘍形成能は群によって異なり、A 亜群及び B 亜群に属するウイルスは新生児ハムスターに造腫瘍性があり、特に A 亜群に属するウイルスでは 4 ヶ月以内に 100% の腫瘍形成を示す。しかし、Telomelysin の由来する 2 型、5 型を含む C 亜群、ほとんどの D 亜群のウイルス、および E 亜群のウイルスは、*in vivo* で造腫瘍性を示さない。アデノウイルス 5 型は幼児期の「かぜ」の原因ウイルスの一つであり、ヒトにおいても感染による悪性腫瘍の発生は報告がない。最近、D 亜群に属するアデノウイルス 9 型の E4 領域にコードされている *E4 orf1* 遺伝子産物が、ヒト細胞に形質転換能を持つという報告がなされたが、A 亜群及び B 亜群のウイルスが注入部位に腫瘍を造るのに対し、9 型は新生児 Wistar-Furth ラットの雌においてエストロゲン依存性の乳癌を生じさせる (71)。しかし、アデノウイルス 5 型では形質転換能は認められず、ヒトでのがん原性はないと考えられる (72)。

8.2. 遺伝子産物の安全性

Telomelysin は特殊な治療遺伝子を持たず、hTERT プロモーターにより制御されるウイルス増殖により細胞死を誘導する。hTERT プロモーターおよび IRES 配列はアデノウイルスゲノムにとって外来遺伝子ではあるが、いずれも制御機能を有しているのみで、遺伝子産物が産生されるわけではない。したがって、Telomelysin 感染後に細胞内で産生される蛋白質はすべてアデノウイルス由来であり、前述のごとく Telomelysin は正常細胞での増殖が抑制され低い細胞障害活性を示すこと（図 13、23）、またアデノウイルスにがん原性が認められないことから、その遺伝子産物に関しては安全であると考えられる。

9. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断した理由

岡山大学病院では、1996 年 1 月、学内に遺伝子治療臨床研究審査委員会を設置し、21 世紀型医療において重要な位置を占めるであろうと期待される遺伝子治療研究を推進してきた。肺癌および前立腺癌に対する遺伝子治療プロトコールは同審査委員会の了承を得て、文部省の学術審議会特定研究領域推進分科会バイオサイエンス部会専門委員会および厚生省の厚生科学審議会先端医療技術評価部会において審議され、それぞれ 1998 年、2000 年に文部大臣・厚生大臣からその実施が了承されている。

1999 年 3 月には他施設に先駆け、本邦ではじめての肺癌遺伝子治療である「非小細胞肺癌に対する正常型 p53 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びシスプラチンを用いた遺伝子治療臨床研究」を開始した。この臨床研究は、遺伝子治療では本邦ではじめての多施設共同研究に進み、岡山大学を中心に東京医大、東京慈恵会医大、東北大学が参画し、2005 年無事に臨床試験を終了している（43）。また、2001 年 3 月には「前立腺癌に対する Herpes Simplex Virus-thymidine kinase 遺伝子発現アデノウイルスベクター及びガンシクロビルを用いた遺伝子治療臨床研究」が本邦初の前立腺癌遺伝子治療として実施され、順調に症例を重ね、やはり 2005 年に終了している（46）。また、2008 年 2 月に厚生労働大臣から実施の承認を得た「前立腺癌に対する Interleukin-12 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究」は、2008 年 5 月に第一例目の治療が行われ、現在も臨床研究を継続中である。したがって、ウイルス製剤の取り扱い場所、患者の研究を実際に行う施設（病棟、手術室、CT 室）およびそれらの運用を含めて、すでに整備され経験豊富なスタッフを擁しており、病院側の受け入れ体制は整備されている。さらに、審査体制を含めた学内の体制も充分確立され有機的に機能している。また、2003 年からは遺伝子治療を代表とする一連のトランスレーショナル・リサーチの推進を目的として岡山大学病院内に遺伝子・細胞治療センターが設置され稼動しており、2008 年には生物製剤などを用いた治療を行うための先端治療室、及びリサーチナースが治療後の患者をケアする患者回復室などが拡充整備されている。本研究も同センターの活動の一環として実施される予定である。

本研究で用いる Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であ

り、遺伝子・細胞治療センターを中心として *in vitro* から *in vivo* までの様々な前臨床研究が行われてきた (50,61-68)。その研究成果をもとに、2004 年 3 月に Telomelysin をコア技術として岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) が設立された。毒性試験や生体内分布に関する前臨床データを IND (Investigational New Drug) application として 2006 年 3 月に米国連邦食品医薬品局 (US Food and Drug Administration, FDA) に提出、8 月に承認を受けた上で、10 月より米国ダラスの Mary Crowley Medical Research Center (MCMRC) にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験「A Phase I Dose-Escalation Study of Intratumoral Injection with Telomerase-Specific Replication-Competent Oncolytic Adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for Various Solid Tumors」を開始した。すでに試験は終了しており、単回投与 16 例、複数回投与 7 例が登録され、安全性・忍容性、体内動態、臨床効果などに関する解析結果は FDA に報告されている。(詳細は「12.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験」、及び「添付資料 4.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の報告書」参照)

以上より、致死性疾患である頭頸部・胸部悪性腫瘍を対象として、Telomelysin と放射線を併用してその安全性と抗腫瘍活性を検証する本研究は、岡山大学病院で実施することは十分可能であると判断した。

10. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

10.1. 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画

本研究は、進行再発頭頸部・胸部悪性腫瘍(頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌)症例における腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin の局所投与と放射線併用の安全性および抗腫瘍効果、生物学的反応の検討を目的とした臨床研究である。具体的には、本研究の適応が予測される患者について、岡山大学病院にて患者ならびに家族(あるいは親族)に対して文書によるインフォームド・コンセント(第 1 回目)を行い、同意が得られた場合に限り、本研究へ登録し治療前検査を開始する。治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、治療前検査データをもとに院内の遺伝子治療臨床研究審査委員会の下に設置された安全・効果評価・適応判定部会にて適応を評価する。安全・効果評価・適応判定部会で本研究の適応と判断された場合、岡山大学病院にて患者ならびに家族(あるいは親族)に対し、文書によるインフォームド・コンセント(第 2 回目)を行う。同意が得られた場合に限り、以下の方法によって本研究を実施する。

被験者は、Telomelysin の投与を行う 21 日以上前にすべての治療(化学療法、放射線療法、免疫療法、etc.)を中止する。Telomelysin の局所投与と放射線併用による副作用の評価、治療効果、および Telomelysin の最大耐量(定義:最大の効果を認めかつ最小の副作用を示す容量)を推定するために、投与量を 1.0×10^{10} vp (viral particles)から開始して 10 倍ずつ増量し 1.0×10^{11} vp、 1.0×10^{12} vp に至る 3 レベルの治療群を設定する。放射線治療は、対象疾患に応じて照射野を設定し、治療計画に従って 60Gy の治療を行う。Telomelysin の

各容量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次容量レベルの上昇を行う。ただし、有害事象が発生した場合はその重篤度を評価し、プロトコールに従って症例数を追加し同一容量で検討するか、試験を中止するかを判断する。最大耐量 (Maximum Tolerated Dose、MTD) では 3 人に投与して問題なければさらに 3 人、計 6 人の被験者で評価する。つまり、各容量レベルでの安全性の検討 (最大耐量の推定) を行った後、治療効果の観察も行うことを目的とする臨床研究として計画した。遺伝子治療終了後、評価基準に従って安全性ならびに治療効果を評価する。

10.2. 被験者の選定基準及び除外基準

10.2.1. 選定基準

次のすべての項目に該当する被験者を本試験の対象とする。

- 1) 被験者は 20 歳以上の成人としその年齢に上限を設けないが、医学的に本研究を遂行するに足る十分な身体的機能を有すると判断された者。
- 2) 組織学的あるいは細胞診によって証明された頭頸部・胸部悪性腫瘍 (頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌) 症例で、標準的な放射線化学療法が何らかの理由 (高齢、低肺機能、腎機能障害など) で受けられず、以下のいずれかの範疇に入る症例。
 - a) 外科的切除により根治不能な局所的に進行・再発した症例
 - b) 遠隔転移が認められても、転移巣より原発巣の浸潤などの局所症状により著しく生活の質 (QOL) を損なうような症例
- 3) 被験者の腫瘍は、直視下、内視鏡もしくは超音波下、あるいは経皮的に穿刺可能で、ウイルス液の局所的注入が可能であること。
- 4) 被験者の腫瘍は、理学的検査、内視鏡、エコー、X線、CT、MRI、もしくは FDG-PET で測定可能、評価可能であること。
- 5) 被験者のウイルスが投与される腫瘍の面積が 1 cm^2 <、 25 cm^2 > であること。
- 6) 被験者は、効果判定のため少なくとも 12 週間以上の生存が期待でき、Performance Status (PS) が 2 以下の者とする。
- 7) 文書を用いた説明により文書による同意が得られた症例。
- 8) 妊娠・授乳をしていない、かつコンドームなどの体液の交換を伴わない適切な避妊を行っていること。
- 9) 以下の項目を満たし、骨髓機能と肝機能及び、腎機能が適切であること。

好中球数 $\geq 1.5 \times 10^3/\mu\text{l}$

血小板数 $\geq 10 \times 10^4/\mu\text{l}$

ヘモグロビン $\geq 8\text{ g/dl}$

総ビリルビン : 正常範囲上限の 1.5 倍以下

ALT, AST : 正常範囲上限の 2 倍以下

アルカリフォスファターゼ： 正常範囲上限の 5 倍以下
クレアチニン ≤ 1.5 mg/dl
PT 及び APTT： 正常範囲内

10.2.2. 除外基準

症例の選定に際し、次の項目に該当する被験者は本試験の対象としない。

- 1) コントロール不可能な活動性感染症等、重篤な併発疾患がある場合。
- 2) 3 週間以内（ニトロソウレアもしくはマイトマイシン C を使用の場合は 6 週間以内）に化学療法、レーザー照射、ステント挿入が行われていた場合。
- 3) 非局所的副腎皮質ステロイドが併用されている場合。ただし、低容量（経口プレドニゾンとして 10mg/day 以下相当）を長期投与（6 ヶ月超）している場合はこの限りでない。
- 4) 試験登録前 4 週間以内に未承認試験薬の臨床試験に参加していた場合。
- 5) 試験対象悪性腫瘍以外の同時性、異時性悪性腫瘍がある場合。ただし根治しており、無病期間が 2 年以上に達している場合はこの限りでない。
- 6) 試験計画書の遵守及び試験でのフォローアップが不可能である場合（精神的、家族的、社会的、地理的等の理由による）。
- 7) 自家もしくは同種臓器、組織移植歴がある場合。
- 8) 血清検査により、HIV 1、HIV 2、HBV、HCV が陽性の場合。
- 9) その他担当医が不適当と認めた場合。
- 10) 放射線治療歴の既往がある場合。

10.3. 被験者の同意の取得方法

本研究の理論的背景と動物実験成績、安全性に関する成績に関して十分な説明を患者本人ならびに家族（あるいは親族）もしくは立会人（患者に家族ならびに親族がいない場合、患者の親しい間柄の人を同席させたいという希望が患者からあった場合）に対して行い、十分な理解を得た上で自由な意思によって本研究の被験者となることについて、日本語で作成された文書に基づいて同意を得る。この文書は、遺伝子治療臨床研究実施計画書とともに施設内遺伝子治療臨床研究審査委員会、厚生労働省厚生科学審議会科学技術部会に提出して承認を得る。また、同意に関連しうる新たな重要な情報を入手した場合は、その情報を被験者ならびに家族（あるいは親族）に伝え、継続して参加するか否かについて被験者の意思を確認する。

10.4. 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は了承が得られた時点から 3 年間とする。目標症例数は原則として 12 例とするが、各容量レベルでの副作用の出現の有無によって最大 24 例とする（「10.5.1.

対象群及び治療群の設定」、「10.5.5. 予測される副作用及びその対処方法」参照）。

10.5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法（治療計画）

10.5.1. 対象群及び治療群の設定

本研究は第 I/II 相の投与量増量試験であるため対象群は設定しない。

Telomelysin の局所投与による副作用の評価、治療効果、及び Telomelysin の最大耐量の決定のために 1 群 3 レベルを以下に示すごとく設定する。

・ レベル 1	1×10^{10} vp (virus particles)
・ レベル 2	1×10^{11} vp
・ レベル 3	1×10^{12} vp

<投与量設定の根拠>

・ 抗癌剤の臨床試験の初回投与量は、10%致死量 (LD_{10}) の 1/10 量が目安とされている。マウス及びコットンラットの皮下に 10^{12} vp の Telomelysin を投与しても死亡例は認められなかったが、米国の臨床試験において FDA は 10^{10} vp を初回投与量と承認した。これらの基礎試験成績及び米国での第 I 相臨床試験にて単独投与で 10^{12} vp までの良好な忍容性が確認されているが、放射線治療と併用は初めてであるため、本研究では米国での第 I 相臨床試験と同様の 10^{10} vp を初回投与量と設定した。10 倍量の増量については、必要最小限の症例数で最大耐量を推定するため、米国の臨床プロトコルを参考に設定した。

それぞれの容量レベルで、それぞれ 3 人の被験者を評価し、最大耐量 (Maximum Tolerated Dose、MTD)（「10.5.5 副作用の判定基準」参照）では 6 人の被験者を評価する。各容量レベルに振り分けられた被験者においては、治療期間中に投与ウイルス量の増加は行わない。また、各容量レベルが終了すれば、逐次容量レベルの上昇を行う。容量レベルの上昇の適応評価については各容量レベル終了後に安全・効果評価・適応判定部会を開催することとし、当該容量レベルの最終症例における 3 回目投与 28 日以降に開催し、全ての症例について 3 回目投与 28 日後までのデータを基に総合評価する。安全であると判定された後、次の容量レベルを開始する。

10.5.2. 遺伝子導入方法（Telomelysin の投与方法）

① Telomelysin の容量

各患者に対する Telomelysin 投与量は、10.5.1. に記したとおり、低容量 (1×10^{10} vp)、中容量 (1×10^{11} vp)、高容量 (1×10^{12} vp) の 3 群で、投与ウイルス液量は原液 (1×10^{12} vp/ml) を 5% デキストロース溶液 (Dextrose 5% water、D5W) で希釈調製して 1 ml とする。腫瘍内 5 カ所に注入するため、1 箇所あたり 0.2ml 程度ずつ注入することになる。

②Telomelysin の投与経路及び投与方法

局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいは CT ガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 > の腫瘍内 5 ヲ所（4 分割した区域と中心部）に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。Telomelysin の投与初日を第 1 日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ病変に投与を行い、計 3 回の治療を実施する。第 4 日目より $2\text{Gy}/\text{日}$ 、5 回/週でリンパ節領域を含む広範な放射線照射を 5 週間で 50Gy 施行し、さらに照射野を絞って 1 週間 10Gy を追加し、総線量 60Gy の放射線治療を行う。

③被験者の管理

すべての被験者は、Telomelysin の投与から 24 時間ウイルスの飛沫散布を防止するためのサージカルマスクを着用し、レベル 1、2 では投与後 48 時間まで、レベル 3 では投与後喀痰中のウイルス DNA の陰性が確認されるまで個室に管理され厳重に観察される。レベル 3 での喀痰検査は投与後 1 日目に行い、ウイルス DNA が検出された場合はさらに 48 時間おきに再検査を行い、陰性を確認する。被験者に接するすべての医療従事者は、必要に応じてマスクや予防衣（disposable）の着用など注意を払う。

<管理の時間設定の根拠>

・現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、ウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能になっている。すなわち、外来患者として臨床試験に参加しているわけである。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後に患者の体液に排泄されるウイルス量は極めて微量であり、アデノウイルスの感染により引き起こされる可能性のある副作用などを考慮しても、重大な問題は起こらないと判断しているためである。実際に、米国での Telomelysin の臨床試験における生体内動態データでは、レベル 1、2 では体液中のウイルス DNA は検出されていない。レベル 3 では 10 例中 2 例において喀痰のみで検出されているが、1 例は投与翌日、1 例は投与後 7 日目であり、いずれもウイルスコピー数は極めて微量であった。したがって、レベル 1、2 では投与後 48 時間以降は個室管理を解除しても差し支えない。また、レベル 3 では喀痰内のウイルス DNA が陰性であることを確認して個室管理を解除することとする。（「添付資料 4.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の報告書」、及び「添付資料 4.3. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の論文」参照）

④Telomelysin の追加投与の判断基準

Telomelysin 投与後に以下に示す症状を認めた場合は適切な対処法を行い、症状の改善を認めない場合は Telomelysin の追加投与の中止を考慮する。（副作用に対する対処法については、10.5.5. 予測される副作用並びにその対処法を参照）

- 1) 感冒様症状（発熱、鼻水など）、局所反応（注射部位の疼痛、発赤など）
- 2) 消化器症状（下痢、吐き気など）
- 3) アレルギー症状（発疹、喘息発作、ショックなど）
- 4) 腎機能障害
- 5) 骨髄抑制（貧血、白血球減少など）
- 6) 血液凝固障害（出血傾向、血栓症など）

10.5.3. 放射線治療の併用

①線量

すべての被験者は、第 1 日目に Telomelysin の投与を受けた後、第 4 日目から 2Gy/日、5 回/週で、総線量 60Gy の放射線治療を施行される。

②照射野及び照射法

リンパ節領域を含む広範な照射野に 5 週間で 40～50Gy 照射し、さらに照射野を絞って 1 週間 10～20Gy を追加する予定である。しかし、個々の患者の年齢、一般状態（PS）、原発巣、病期、病理組織型、病巣の進展範囲、リスク臓器の位置などを考慮して適切な放射線治療計画をたてる。

<放射線線量設定の根拠及び放射線治療の開始を第 4 日目とした理由>

・ 腫瘍領域を完全に含む照射野で、1 回 2Gy 前後で総線量 60～70Gy を照射するのが放射線治療の基本原則である。「放射線治療計画ガイドライン・2004（2005 年 11 月 15 日更新）」（69）によれば、頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌に対する放射線治療も総線量 60～70Gy が一般的に行われており、本研究でも放射線治療の総線量を 60Gy に設定した。

・ 基礎的研究において、Telomelysin の感染は癌細胞の放射線感受性を増強し、また放射線照射は Telomelysin の癌細胞への感染効率を亢進させることが示唆されている。第 1 日目に投与された Telomelysin は、第 4 日目には腫瘍内で増殖して放射線感受性を増強すると推測される。また、第 18 日目、第 32 日目には放射線照射後に Telomelysin が投与されるため、その抗腫瘍活性が増強すると考えられる。さらに、第 1 日を金曜日に設定することで第 4 日が月曜日となり、平日 5 日間の放射線治療を連続することができる。

③放射線治療の中断

放射線治療に起因する副作用が認められた場合、放射線治療を最大 2 週間まで中断する

ことができる。放射線治療を中断している期間は、Telomelysin の投与も延期することとする。放射線治療を再開した時点で、当初の治療スケジュールに基づき Telomelysin の投与日を再設定する。具体的には、Telomelysin の投与初日を第 1 日目、放射線治療開始日を第 4 日目とし、治療中断期間を除いて第 18 日目、第 32 日目に Telomelysin の投与を実施する。

10.5.4. 臨床検査項目及び観察項目

10.5.4.1. 治療開始前評価 (添付資料「治療開始前、治療中、及び治療後における評価項目及び評価スケジュール」参照)

- 1) 初回の治療を開始する前に、被験者の病歴（並存疾患、アレルギー歴、手術歴、既往歴、常用薬、喫煙歴）及び現症について記録する。この記録には PS (performance status)、体重、最近の体重減少、他の悪性あるいは良性疾患の有無及びその治療状況、さらに過去に行われた抗癌治療の方法と施行年月日などの治療スケジュールを含む。
- 2) 臨床検査データとしては、白血球分画、血小板数を含む CBC、PT、APTT、電解質、ビリルビン、クレアチニン、トランスアミナーゼなどを含む生化学検査一般、及び尿検査、胸部 X 線写真、心電図、腫瘍マーカーなどを記録する。
- 3) 治療開始以前に施行された抗癌療法の影響が認められる場合は、有害事象の評価指標（添付資料「有害事象の評価指標」参照）に従ってその重篤度を判定し記録する。
- 4) 治療開始前の臨床病期を肉眼的観察、触診、画像診断、及び内視鏡診断により評価する。肉眼的あるいは内視鏡的に腫瘍が直視可能であれば一定の距離から写真撮影を行い、その位置と大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X 線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PET などで抽出可能であれば、やはりその位置と大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期は各種癌取扱規約に基づいて決定する。
- 5) 臨床的に必要と判断されれば、治療前に動脈血ガス分析、O₂ 飽和度、FEV_{1.0} を含む呼吸機能検査を施行する。
- 6) 唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する E1A あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 7) 血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン (Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ) を測定する。また、アデノウイルス中和抗体価を測定する。さらに、血液中リンパ球サブセット (CD4、CD8、NK) を測定する。

10.5.4.2. 治療中評価 (添付資料「治療開始前及び治療中における評価項目及び評価スケジュール」参照)

- 1) 治療中定期的に被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査は、治療中定期的に行い記録する。

- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、治療中定期的に写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X 線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PET など抽出可能であれば、定期的にその大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も定期的に再評価する。
- 4) 定期的に唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 5) 定期的に採取した血液サンプルから血清を分離し、ELISA 法にてサイトカイン（Interleukin 6 ; IL-6、IL-10、Interferon- γ ; IFN- γ ）を測定する。また、血液中リンパ球サブセット（CD4、CD8、NK）を測定する。
- 6) 被験者が死亡した場合は剖検を依頼し、癌組織及び正常組織を採取し、同様に組織学的・分子生物学的検討を行う。
- 7) すべての被験者は、定期的に臨床効果及び毒性・副作用について評価される。

10.5.4.3. 治療後評価

治療を終了した一ヶ月（28 日）後、及び三ヶ月後に治療後評価を行う。

- 1) 被験者の病状及び PS や体重を含む現症を記録する。
- 2) 被験者の CBC、血小板数、PT、APTT、電解質、生化学検査一般などの検査を行い記録する。
- 3) 腫瘍が肉眼的あるいは内視鏡的に直視可能であれば、写真撮影し、その大きさ（できれば長径と短径）を記録する。また、X 線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PET など抽出可能であれば、その大きさ（長径と短径）、周辺組織への浸潤程度、及び癌細胞の活動性を記録する。さらに、臨床病期も再評価する。
- 4) 生検にて癌組織を採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて病変範囲、治療による細胞死の有無、腫瘍の消失などを初回生検組織と比較検討する。また、症例によっては抗 EIA 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の遺残を検討する。
- 5) 血液を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定量的 PCR を行う。
- 6) アデノウイルス中和抗体価を測定する。
- 7) 臨床効果及び毒性・副作用について評価する。

10.5.4.4. 長期的フォローアップ

患者の長期フォローアップとして、以下の条件に該当するまで岡山大学病院において追跡調査をする。

- 1) 他の治療法（抗癌剤、腫瘍部位への放射線療法、レーザー照射又はステント）を受

けた場合。

- 2) 死亡した場合。
- 3) 治療終了から12ヶ月が経過した場合。
- 4) 投与部位における腫瘍が進行した場合、患者の状態（生存／死亡）のみを、患者が上記のいずれかの条件に該当するまで調査する。

10.5.5. 予測される副作用並びにその対処方法

10.5.5.1. Telomelysin 投与によって生じると考えられる副作用とその対処法

欧米ならびに中国を中心としてすでにアデノウイルス・ベクターを用いた遺伝子治療は1000例以上に施行されており、主な副作用は注入部位の疼痛、吐気、発熱等であった。アデノウイルスは通常、風邪以外の疾患を起こさないことが知られているため、たとえアデノウイルスベクターが感染力をもっても、重篤な合併症の心配はないと考えられる。また、通常のアデノウイルスの他者への伝染の可能性に関する米国における興味深い調査結果が報告されているが、それによると子供がアデノウイルスに感染した場合でも、両親には感染しなかったか、少なくとも症状を引き起こしたり、ウイルスが検出されたりすることはなかったとのことである。免疫系がアデノウイルス・ベクターに反応して、急性アレルギー反応及び（または）アデノウイルス・ベクターの急速な破壊が起こり、かゆみ、発疹、息苦しさ、喘鳴、低血圧等の症状が発現する場合がある。この場合には、発現した症状に応じて適切かつ最善の処置を施すことで対応可能である。

米国テキサス州ダラスの Mary Crowley Medical Research Center (MCMRC) を中心に行われた Telomelysin の第Ⅰ相臨床試験では、 10^{12} vp のレベルまで安全に投与可能であり、高頻度にみられる重篤な副作用は認められないことが明らかとなった（70）。（詳細は「添付資料4.2. 米国での Telomelysin の第Ⅰ相臨床試験の報告書」参照）

したがって、本研究においても Telomelysin 投与に起因する重篤な副作用は予測されないが、考えられる有害事象としては以下のような症状が上げられ、治療期間中は厳重な症状観察を行い、症状に応じて適宜対処する。

①軽い副作用

対処法は定型的なものを記載するが、これに限るものではない。

- 1) 感冒様症状（発熱、鼻水、など）、局所反応（注射部位の疼痛、発赤、など）
→（対処法）消炎鎮痛剤、消炎酵素剤、抗生物質、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤などの投与
- 2) 消化器症状（下痢、吐き気など）
→（対処法）症状に合わせた薬剤の投与
- 3) 軽いアレルギー性反応（発疹など）
→（対処法）抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤、ステロイドなどの投与

4) 軽度の白血球減少

→ (対処法) 原則的に経過観察

②比較的強い副作用

対処法は典型的なものを記載するが、これに限るものではない

1) 腎機能障害

→ (対処法) 試験中止、抗ウイルス薬、輸液、利尿剤などの投与

2) 骨髄抑制 (高度の貧血、高度の白血球減少など)

→ (対処法) 試験中止、抗ウイルス薬、G-CSF 投与、輸血

3) 重畳アレルギー症状 (喘息発作、ショック)

→ (対処法) 試験中止、ステロイド投与

4) 血液凝固障害 (出血傾向、血栓症など) など

→ (対処法) 試験中止、蛋白分解酵素阻害剤、血栓溶解剤投与など

10.5.5.2. 放射線によって生じると考えられる副作用とその対処法

頭頸部領域への放射線治療によって発生する副作用としては、以下のものが上げられる。急性障害としては、放射線皮膚炎と口腔、咽頭の粘膜炎、唾液分泌障害、味覚障害、嚥下障害などが考えられる。これらの有害事象に対しては、うがいなどで口腔内をつねに清潔に保ち、消炎鎮痛剤や表面麻酔薬の投与を行う。また、晩期障害としては、骨髄炎や骨壊死、難治性粘膜潰瘍形成、白内障、緑内障、放射線網膜症、角膜炎、視神経障害、慢性中耳炎、頸部軟部組織硬化、視床下部・下垂体機能障害、横断性脊髄症、喉頭浮腫、喉頭咽頭壊死、食道咽頭の狭窄、喉頭粘膜の炎症のため嚥声、披裂部浮腫、喉頭軟骨壊死などがあり、これらの有害事象が起こらないような治療計画の設定が重要である。

食道癌、非小細胞肺癌に対する放射線治療によって生じる可能性のある副作用としては、色素沈着、骨髄抑制、皮膚炎、食道炎、食道潰瘍、食道穿孔、食道出血、肺炎などがある。放射線食道炎に対しては、粘膜保護剤や表面麻酔薬投与で対応する。放射線肺炎は照射終了直後～数か月で照射野に一致してみられることが多く、急速に進行する場合にはステロイド投与が必要となる。また、50Gy を越えた場合には、まれに心筋炎や心外膜炎、骨髄炎がみられることもある。

10.5.5.3. 副作用の判定基準

治療中及び治療後に見られるすべての有害事象のうち、治療に関する毒性・副作用は、「副作用の評価指標」に基づいて grade 0-4 で評価する。この「副作用の評価指標」は、NCI (National Cancer Institute) の common toxicity criteria 日本語版 (有害事象共通用語基準 v3.0) に基づいて作成されたものである。副作用の認められた期間及びそれに対する治療についても記録する。致死的な副作用が生じた場合は、実施施設の長である岡山大学病院

長を通じて厚生労働大臣に報告する。

最大耐量の決定方法	
grade 3 以上（血液系では grade 4） の副作用が見られた被験者数	次回 Telomelysin 投与量
0/3	10 倍増量
1/3	さらに 3 人の被験者を評価
1/3+0/3	10 倍増量
1/3+1/3	中止：10 分の 1 量＝最大耐量
1/3+2/3	中止：10 分の 1 量＝最大耐量
1/3+3/3	中止：10 分の 1 量＝最大耐量
2/3	中止：10 分の 1 量＝最大耐量
3/3	中止：10 分の 1 量＝最大耐量

Telomelysin の各濃度につき、それぞれ 3 人ずつの被験者に投与する。3 人の内 1 人に grade 3 以上（血液系では grade 4）の副作用（添付資料「副作用の評価指標」参照）が認められた場合、さらに 3 人の被験者にその濃度の Telomelysin を投与する。6 人中 2 人以上の被験者で grade 3 以上（血液系では grade 4）の副作用が見られた時点で、その濃度より 1 段階低くそれらの副作用を生じない濃度を最大耐量（MTD）とする。MTD の副作用が認められた被験者では、1 段階低い濃度で治療を継続する。

10.5.6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判断基準

10.5.6.1. 治療効果の評価方法及び評価基準

①臨床的効果

- ・ 腫瘍評価は治療中及び治療後に、X 線写真、超音波エコー、CT、MRI、FDG-PET、もしくは理学検査を用いて、全ての病変に対して定期的に行う。
- ・ 腫瘍は全て mm 単位まで測定し、腫瘍の最も長い直径と、それに垂直な最も広い幅を記録すること。
- ・ 評価は The Response Evaluation Criteria in Solid Tumor Group (RECIST Group) の評価基準を用いて、Telomelysin 投与病変および非投与病変について評価する。測定可能病変（1 臓器 5 個、全体で 10 個まで）の最大長の和をもって効果を評価する。以下に RECIST 評価基準（version 1.1）を示す（71）。

Complete Response (CR): すべての測定可能病変の消失、病的リンパ節の短径の 10 mm 未満への縮小

Partial Response (PR): 少なくとも治療前の直径の和と比して 30% 減少

Progression (PD): 少なくとも治療前の最短径の和と比して 20%増加、および少なくとも 5 mm の増加、あるいは新病変の出現

Stable Disease (SD): PR とするには腫瘍の縮小が不十分で、かつ PD とするには腫瘍の増大が不十分な場合

- ・ 比較性を確保するため、ベースラインとその後の全ての評価は同じ方法で行うこと（標準的な量の同じ造影剤をボーラス投与し、その直後に、できれば同じスキャナーを用いてスキャンする、など）。
- ・ 病変が評価可能な患者の治療効果評価は、少なくとも 2 名の評価者による病変検討で行わなければならない。
- ・ 腫瘍退縮が観察されたときは、その観察から 28 日以上経過後に確認検査を行う。その確認には、測定可能、評価可能及び評価不能である全ての病変の評価が必要である。
- ・ 奏効患者の臨床記録と画像記録のフィルムは全て、施設外機関による審査（extramural review）に使用できるようにしておくこと。

②病理組織学的検討

- ・ 腫瘍から生検にて採取した癌組織を用いて、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色にて組織学的に検討する。症例によっては、抗 E1A 抗体あるいは抗ヘキソン抗体を用いて免疫組織学的染色を行い、Telomelysin の感染と拡散を確認する。

③総合効果

- ・ 各被験者の治療効果に関しては、以下の基準に従って総合的に評価する。

総合効果評価基準			
投与病変	非投与病変	新病変	総合効果
CR	CR	なし	CR
CR	PR/SD	なし	PR
PR	PD を除く全て	なし	PR
SD	PD を除く全て	なし	SD
PD	全て	全て	PD
全て	PD	全て	PD
全て	全て	あり	PD

④腫瘍進行までの期間及び生存期間

- ・ 被験者の腫瘍進行までの期間は、Telomelysin 初回投与から腫瘍進行までの期間とし、生存期間は Telomelysin 初回投与日から死亡日までとする。

10.5.6.2. 治療中止の判定基準

- 1) 腫瘍が進行した場合。また、治療が続行できない状態まで患者の状態が悪化した場合。
- 2) 血小板数減少、肝機能障害等の重篤な副作用が認められた場合。その他の有害事象〔特に生命に危険がある、及び（又は）非可逆性で対症療法、容量減量及び（又は）投与延期によって管理できないと考えられるもの〕が発現した場合。
- 3) Telomelysin を投与した腫瘍部位に放射線療法、レーザー照射又はステントを行った場合。
- 4) 抗癌剤や Telomelysin 以外の実験的薬物を投与した場合。
- 5) 本研究に登録された後に、被験者の都合で必要な検査、調査の実施が不可能であることが判明した場合。
- 6) 被験者が本研究の円滑な遂行に非協力的である場合。
- 7) 被験者が治療の中止を申し出た場合。
- 8) その他、担当医が中止の必要性を認めた場合。

10.5.6.3. 試験の安全性の確保

本研究は、医薬品の臨床試験の実施に関する基準（GCP 基準）及びヘルシンキ宣言（香港版 1989 年 9 月）に準拠して行う。本実施計画書は、岡山大学病院に設置された遺伝子治療臨床研究審査委員会で審議され承認を得た後、厚生科学審議会科学技術部会ならびにがん遺伝子治療臨床研究作業委員会にて科学面、倫理面について審議される。

安全・効果評価・適応判定部会は、「抗悪性腫瘍薬の臨床評価方法に関するガイドライン」により第三者的な委員会として設置することが推奨されている効果・安全性評価委員会に相当する。本部会は、担当医師及び総括責任者より提出された被験者の病歴や諸検査結果などの情報をもとに本研究における被験者の適格性を科学的・倫理的に評価し、その上部組織である遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出しなければならない。また、治療中あるいは治療後に集積されたデータの妥当性を検討し、個々の被験者における治療効果について評価し、遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見を提出する。さらに、予期しない重篤な副作用が発現した場合、または Telomelysin の最大耐量の判定が可能となった場合に、本研究を中止あるいは終了するか否かを協議する。

重篤な有害事象や副作用が確認されたとき、担当医師は直ちに治療（投与）を中止するなど適切な処置を講ずる。その場合、症状（検査値）が投与開始直前の状態にほぼ回復するまで、経過観察するのものとし、ほぼ現状に回復したと認められる場合でも、最低 28 日間（4 週間）は経過観察しなければならない。総括責任者は岡山大学病院長、安全・効果評価・適応判定部会、遺伝子治療臨床研究審査委員会、ならびに所轄官庁へ速やかな報告を行う（認知から 24 時間以内。文書での報告は 15 日以内）。また試験継続の可否につ

いて安全・効果評価・適応判定部会に諮るものとする。

10.5.7. 症例記録に関する記録用紙などの様式

被験者の容態、治療内容、検査内容と結果、及び家族への説明などは一般の入院患者と同様に診療記録（電子カルテ）に記載し保存する。診療記録とは別に、本研究に関連する全ての事項は症例記録に関する記録用紙の様式に従って、定期的に記入する。

10.5.8. 記録の保存及び成績の公表の方法

本研究によって得られる情報は、個人情報に該当するため適切な取り扱いが求められる。

- 1) 被験者からの正式な同意は、すべての試験手順を開始する前に、対象となる被験者本人ならびに家族（あるいは親族）もしくは立会人（患者に家族ならびに親族がいない場合、患者の親しい間柄の人を同席させたいという希望が患者からあった場合）に「遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書」に基づいて十分に説明する。被験者が内容をよく理解したことを確認した上で、本研究への参加について被験者本人の自由意志による同意を文書にて得るものとする。記名捺印または署名された2通の同意書の1通を被験者に手渡し、他の1通を診療記録とともに保存する。
- 2) 被験者の同意が得られた後、担当医師は被験者の登録を行う。この時、各被験者ごとに症例報告書（症例記録）を作成する。症例記録には、臨床病期、PS (performance status)、体重減少、登録前に施行された治療及びその結果などを記載する。
- 3) Telomelysin 投与前に、本研究に携わっている医師及び看護師は治療の遂行が可能かどうかを十分に検討し、その結果を症例記録に記載する。
- 4) 担当医師は、被験者と接するときに毎回、具体的質問や検査（適宜）によって有害事象に関する情報を調査する。有害事象に関する情報は、直ちにすべて症例記録の有害事象記録欄に記載する。重篤な有害事象については、それ以外に重篤有害事象報告書にも必要事項を記入する。明らかに関連性がある徴候、症状及び異常な診断検査結果は、まとめて単一の事象として症例記録に記入する。研究期間中に発生した有害事象はすべて症例記録に記載する。各事象の臨床経過は、消失または安定化するまで、かつ Telomelysin 投与や放射線治療、試験への参加が原因でないことが確認されるまで追跡する。本研究終了時にも持続している重篤な有害事象は、転帰が明らかになるまで追跡する。臨床研究終了後に発生した重篤な有害事象は薬剤投与もしくは試験への参加によるものである疑いがあると考えられる場合は、そのすべてを直ちに症例記録に記載する。
- 5) 治療期間中及び治療終了後の臨床検査データは、岡山大学病院医事課にて保存し、必要に応じて統計解析を行う。
- 6) 治療期間中及び治療終了後、本研究に携わっている医師は評価基準に基づいて治療効果と副作用を判定する。その結果は、安全・効果評価・適応判定部会において評

価され、上部組織である遺伝子治療臨床研究審査委員会に意見が提出される。ここでその評価が了承されれば、必要に応じて統計学的解析を行う。

- 7) 本研究に関するすべての記録は、総括責任者の責任のもと岡山大学病院医事課に保存される。
- 8) 本研究の結果を医学雑誌や学会で報告する場合でも被験者のプライバシーは守られる。
- 9) 実施施設の長である岡山大学病院病院長は、遺伝子治療臨床研究審査委員会が判断した基準のもと、本研究に関する適切かつ正確な情報の公表等の措置を講じるよう努める。

10.5.9. 実施計画の変更について

実施計画を変更する必要がある場合は、指針第3章第4の2により、病院長を介して厚生労働大臣（大学等にあつては、厚生労働大臣及び文部科学大臣）に対し報告する。具体的には総括責任者は変更内容を遺伝子治療臨床研究審査委員会に報告する。委員会での審査を行いその結果を委員長は病院長に通知する。

11. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況

岡山大学病院には、従来の研究・医療体制とは異なる、先端医療の臨床実践に特化した機能単位として、2003年4月に「遺伝子・細胞治療センター Center for Gene and Cell Therapy (CGCT)」が設置されている。基礎研究の臨床応用、いわゆるトランスレーショナル・リサーチ（探索研究）の推進による先端医療開発が遺伝子・細胞治療センターの使命である。ハード面では、中央診療棟5階に細胞分離・培養から遺伝子治療用生物製剤の調製までに対応できる設備として、安全キャビネット・大量培養装置などを含むクリーンルーム（2室）とP2ルーム（2室）、治療用材料の純度や安全性を確認するための品質管理室を備え、Good Manufacturing Practice (GMP)基準に準拠した施設となっている。クリーンルームは室外からの汚染を防ぐために室内は陽圧に、またP2ルームは生物製剤の室外への流出を防ぐために室内は陰圧に維持されており、これらは24時間のモニタリング・システムにより制御されている。さらに、セキュリティーを伴う治療用生物製剤や細胞の保管設備（凍結、冷蔵、常温）も完備している。また2008年には、センターに隣接して、麻酔器や手術台・機材を完備した先端治療室と患者の治療後の容態をリサーチナースが観察するための患者回復室を拡充整備しており、本研究の円滑な運用が可能である。（「添付資料6. 当該遺伝子治療臨床研究の実施施設の状況：施設概要と治療の手順」参照）

遺伝子・細胞治療センターでは、日常的に各種癌細胞や正常細胞の組織培養が行われており、プラスチック器具や各種培養液は常備されている。また、切除標本や生検材料の免疫組織学的染色や定量的PCR、ウェスタンブロット解析などの分子生物学的実験や蛋白

質分析の実験も行われている。したがって、米国Introgen Therapeutics社に保管されているTelomelysinの臨床用ロットを搬入した際の受け入れ試験として、変性の有無を確認する外観試験、ウイルスの力価の測定、さらにTelomelysinの生物学的活性を確かめるための殺細胞効果試験は容易に実施可能である。本研究に用いるTelomelysinは、「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令（平成16年文部科学省・環境省令第1号）」の「別表第一（第四条関係）」における「へ 自立的な増殖力及び感染力を保持したウイルス又はウイロイド」に相当する。すなわち、Telomelysinを用いた実験は「大臣確認実験」となるため、平成16年8月に「第二種使用等拡散防止措置確認申請書」を作成、学内の担当部署での検討の後に文部科学省に申請し、研究計画の実施が承認されている。

岡山大学病院では、頭頸部癌、食道癌、非小細胞肺癌患者に対する術前検査として、内視鏡検査や画像検査、CT ガイド下穿刺による生検などは頻繁に行われており、またこれらの悪性腫瘍患者への放射線治療も日常的に施行されている。したがって、臨床的技術の点では本研究の実施には何ら問題はないと思われる。先端治療室で Telomelysin の投与を受けた被験者は患者回復室で一時的に観察した後に病棟個室にて管理され、もし重篤な副作用が認められた場合は、集中治療室（ICU）で麻酔科蘇生科の管理下で治療を行うことができる。以上のように、施設設備の面では基礎レベルから臨床レベルまで治療計画で設定したすべての事項を遂行することができる。また、本研究中に生じた重篤な副作用など不測の事態に対しても適切に対処することが可能であると考ええる。

12. 当該遺伝子治療研究に関連する国内外の研究状況

12.1. 腫瘍融解ウイルス（Oncolytic virus）に関する一般的な研究状況

ウイルスは本来ヒトの細胞に感染、増殖し、その細胞を様々な機序により破壊する。その増殖機能に選択性を付加することにより、ウイルスをがん細胞のみを傷害する治療用製剤として用いることが可能となる。最もよく研究されているのがアデノウイルスとヘルペスウイルスであり、米国を中心に前立腺がんの特異的な PSA プロモーターを用いた制限増殖型アデノウイルス（72,73）や p53 遺伝子機能を欠失したがん細胞でのみ増殖可能な ONYX-015（E1B 55kD 欠損アデノウイルス）（74-79）、改変型ヘルペスウイルスである G207（80,81）や NV1020（82）、治療遺伝子を持つ OncoVEX GM-CSF（83）などの臨床試験が進められてきた。また、本邦でも名古屋大学などで、細胞増殖が活発にみられる癌細胞でのみ増殖可能であるヘルペスウイルスの自然変異株 HF10 の臨床応用も試みられた（84）。さらに最近、東京大学から申請されていた進行性膠芽腫患者に対する増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δ を用いたウイルス療法の実施が承認されている。

現在、アデノウイルスに癌細胞に特異的な増殖機能を発揮させるために、大きく二つの方法が開発されている。最初の試みは、アデノウイルスの初期遺伝子に特定の変異あるいは欠失を加えることにより、癌細胞の生物学的な特殊性に基づいた制限増殖性を期待する

方法である。第二の試みは、腫瘍特異的および臓器特異的なプロモーターによる初期遺伝子の転写制御をメカニズムとして、癌細胞特異的あるいは特定の臓器由来の癌細胞に特異的な制限増殖性を付加する方法である。以下に、それぞれ代表的なウイルス製剤の臨床応用について概説する。

1) Onyx-015 (dl1520)

Onyx-015 は 2 型および 5 型のキメラタイプのアデノウイルスであり、E1B 初期遺伝子の 55kD を欠損した変異ウイルスである。本来、E1B-55kD 蛋白質は癌抑制遺伝子産物である p53 蛋白質に結合し、その機能を不活化する働きを担っている。したがって、Onyx-015 は、正常な p53 機能を持つ細胞では p53 によるウイルスの複製増殖の抑制を制御することができない。一方、p53 機能を喪失している癌細胞では、E1B-55kD が作用する必要がなく、Onyx-015 は複製増殖により細胞融解を誘導することが可能となる。

p53 はヒト悪性腫瘍の約 50% で異常が認められる癌抑制遺伝子であり、したがって多くのヒト悪性腫瘍が Onyx-015 の治療の対象となる。極めて魅力的なコンセプトに基づいたウイルス治療薬として、Onyx-015 は早期の臨床応用が進められた。しかし、その後の研究により、その選択的増殖性は必ずしも p53 機能の有無に因らないことが明らかになってきた (85,86)。また、ヒトの正常細胞での増殖複製の可能性も示唆され、慎重な臨床データの解析が必要と思われる (87)。

Onyx-015 を用いたいくつかの第 I 相および第 II 相臨床試験はすでに終了しており、安全性および臨床効果に関するデータが集積されつつある。投与経路は、まず腫瘍内局所投与が行われ (74)、次いで腹腔内および肝動脈内投与 (75)、さらに静脈内全身投与が試みられた (76)。すべての投与ルートにおいて、 $2 \times 10^{12} - 2 \times 10^{13}$ vp ($10^{11} - 10^{12}$ PFU) の Onyx-015 は安全に投与可能であり、発熱などの流感様症状が最も高頻度にみられた有害事象であった。臨床効果については、Onyx-015 単剤では頭頸部腫瘍において 15% 以下の患者で抗腫瘍効果が見られたにすぎず、膀胱癌、大腸癌、卵巣癌患者などでは客観的な効果は認められなかった (77)。一方、抗癌剤を併用した第 II 相臨床試験では好ましい結果も出ている。頭頸部腫瘍を対象とした Onyx-015 の腫瘍内投与とシスプラチン、5-FU の全身投与の併用では、27% の CR、36% の PR が認められた (78)。また、消化器癌の肝臓転移に対する Onyx-015 の肝動脈内投与と 5-FU、ロイコボリンの全身投与では、11% の PR と 15% の minor response (MR) が得られた (79)。これらの結果をもとに、頭頸部腫瘍でランダム化第 III 相臨床試験が計画されたが、開発を担当していた企業の方針変更により、現在の臨床開発は中止となっている。

2) CV706 (CG7870)

前立腺癌の診断や血中 prostate-specific antigen (PSA) 値の測定は重要であり、悪性度の判定にも極めてよく相関すると言われている。この PSA プロモーターにより E1A 遺伝子

の発現を制御することにより、PSA 産生前立腺癌細胞で選択的に増殖するアデノウイルス (CV706) が作成された。CV706 は E3 領域を欠損したアデノウイルス 5 型を基本骨格とし、PSA プロモーター/エンハンサー配列が E1A 遺伝子配列の上流に組込まれている。ヌードマウスに移植した PSA 産生 LNCaP 腫瘍は、CV706 の腫瘍内投与により顕著な腫瘍退縮を来し、血清 PSA 値の急速な減少が認められた。

放射線治療後に再発した前立腺癌患者を対象に、CV706 の腫瘍局所投与の安全性および臨床効果を検討するための第 I 相臨床試験が行われた (72)。 $10^{11} - 10^{13}$ vp の CV706 が、経直腸エコーガイド下に 20 例に投与された。有害事象としては発熱や局所の疼痛が多くみられたが、不可逆的な Grade 3 以上の重篤なものは認められなかった。臨床的には、高濃度の CV706 を投与された 5 例では、全例で PSA の 50% 以上の低下が観察され、その有効性が示唆された。また、血漿中のウイルス値の変化では興味深い知見が得られている。投与直後の第一のピークとは別に投与後 2-8 日で第二の血漿中ウイルス濃度の上昇が観察されており、これは腫瘍内で確かに CV706 の複製増殖が生じたことを示していると言える。また最近、ホルモン不応性の転移性前立腺癌患者 23 例に、第 I 相臨床試験として 10^{13} vp までの CV706 (CG7870) を投与したところ、5 例で PSA の減少が認められたことが報告されている (73)。開発企業の経営状況の理由から、本製剤の臨床開発も中止となっている。

12.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験

2006 年 3 月、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株) により、米国食品医薬品局 (US FDA) に治験申請 (IND application) がなされた。慎重な議論の後、8 月に承認を受け、10 月より米国テキサス州ダラスの Mary Crowley Medical Research Center (MCMRC) にて、各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験「A Phase I Dose-Escalation Study of Intratumoral Injection with Telomerase-Specific Replication-Competent Oncolytic Adenovirus, Telomelysin (OBP-301) for Various Solid Tumors」が開始された。さらに、米国モンタナ州ビルングスの Billings Clinic を追加して多施設共同臨床試験体制とし、単回投与 16 例、複数回投与 (1 回/週、5 回投与) 7 例、計 23 例が登録され、単回投与 16 例、複数回投与 6 例、計 22 例に治療が行われた。腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者 (悪性黒色種、唾液腺癌、舌癌、平滑筋肉腫、神経内分泌腫瘍、非小細胞肺癌、口腔底癌、基底細胞癌、胆嚢癌、乳癌、など) では、初期 3 例は 10^{10} vp、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった (70)。Telomelysin のウイルス DNA は 16 例中 13 例で一過性に血中に検出されたが、うち 3 例では 7 日後あるいは 14 日後に再度血中でウイルス DNA が認められ、腫瘍内でのウイルス増殖を示唆する結果と考えられる。投与後 28 日目の RECIST 判定では、評価可能であった 14 例中 11 例が SD、3 例が PD であり、56 日目には 28 日目

にSDであった症例中7例がSDであった。悪性黒色腫患者1例では、28日目で33%、56日目で56.7%の腫瘍面積の縮小がみられた。また、28日目でSDであった患者のうち4例で生検が行われたが、組織学的に腫瘍壊死が観察された。複数回投与の症例については、現在、解析中である。これらの結果から、Telomelysinの単独投与は安全であり、ウイルス増殖が確認された症例では抗腫瘍効果が期待できると言える。（詳細は「添付資料 4.2. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の報告書」、及び「添付資料 4.3. 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験の論文」参照）

13. 本研究における個人情報保護に関する対処

本項目は遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成16年12月28日公表、平成17年4月1日から適用）、「第6章 個人情報の保護に関する措置」に準拠している。

13.1. 個人情報の定義について

「個人情報」とは「個人情報の保護に関する法律」（平成21法49）（以下「個人情報保護法」という）、「医療・介護関係事業者における個人情報の適切な取り扱いのためのガイドライン」（平成16年12月24日厚生労働省）（以下「ガイドライン」という）および「遺伝子治療臨床研究に関する指針」（以下「指針」という。）に基づく症例に関する情報を示し、「生存する個人に関する情報であつて、当該情報に含まれる氏名、生年月日その他の記述等により特定の個人を識別することができるもの（他の情報と容易に照合することができ、それにより特定の個人を識別することができることとなるものを含む。）をいう」と定義する。また、研究は、遺伝情報を明らかにする研究ではなく、研究において個人の遺伝情報が明らかになるものではない。

13.2. 研究を行う機関の長の最終的な責務

研究を行う機関の長である岡山大学学長は、遺伝子治療臨床研究の実施に際し、個人情報保護が図られるよう務める。個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するため必要があると認めるときは、総括責任者に対して、監督上必要な命令をする。

13.3. 診療・教育機関としての岡山大学病院における個人情報の一般的な取り扱い

岡山大学病院は診療・教育機関として、臨床医学の発展と次世代を担う医療人の育成という社会的な使命の実現に向けて、一般的な診療行為・教育に関する以下の目的に限り、患者様の個人情報を使用する。この使用に関しては、個人情報の保護の法律に基づいた国立大学法人岡山大学病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程や研究活動の実施に関する法令や倫理指針等を遵守した上で取り扱われる。

1) 岡山大学での利用

- ・ 被験者が受ける医療サービス

- ・ 医療保険事務
 - ・ 被験者に関係する管理運営業務（入退院等の病棟管理、会計・経理、医療事故の報告、医療サービスの向上）
- 2) 岡山大学病院および岡山大学での医療教育における利用
- ・ 医学・歯学・薬学・保健学系の教育（病院内での診療等に関わる医学教育に限る）
 - ・ 教職員の研修（研修医や新任看護師等への病院内研修や病院事務系職員の研修等に限る）
 - ・ 研究活動（遺伝子治療臨床研究を含め、実施に関する法令や倫理指針、関係団体等のガイドライン等が定められている場合は、それを遵守する）
- 3) 他の事業者等への情報提供
- ・ 他の病院・診療所・薬局・訪問看護ステーション・介護サービス事業者等との医療サービス等に関する連携
 - ・ 他の医療機関等からの医療サービス等に関しての照会の回答
 - ・ 被験者の診療等にあたり、外部の医師等の意見・助言を求める場合
 - ・ 検体検査業務の委託、その他業務委託
 - ・ 被験者の家族等への診療に関わる説明
 - ・ 医療保険事務
 - ・ 審査支払機関または保険者からの照会への回答
 - ・ 関係法令等に基づく届出および報告書
 - ・ 関係法令に基づいて事業者等からの委託を受けて健康診断を行った場合の事業者等へのその結果の通知
 - ・ 医師賠償責任保険等に関わる医療に関する専門の団体、保険会社等への相談または届出等
 - ・ 医療上の安全に関わる行政機関または医療に関する専門の団体等への届出等
 - ・ 医学・歯学・薬学・保健学系の教育研究機関への提出
 - ・ 他の医療機関等との医学の発展を目的とした共同研究活動

13.4. 本研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取り扱い

本研究で扱う被験者の診療録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡など、被験者の生命を守るために用いる。その他、特別の目的で使用する場合は、事前に被験者および家族（あるいは親族）（以下「被験者等」という。）に再度説明し、了解を得てから使用する。また本臨床研究の成果検討時や医療向上のためなどを目的に、研究成績などを公表・公開する場合は、個人を特定できない形、すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは被験者等への同意説明文書中に記載し、被験者への個人情報および使用目的について通知し、同意を得ることとする。

13.5. 利用目的による制限

総括責任者は、あらかじめ被験者等の同意を得ないで、あらかじめ特定された利用目的の達成に必要な範囲を超えて個人情報を取り扱わない。ただし以下に列挙する場合であつて、遺伝子治療臨床研究審査委員会が承認した場合については、適用しない。

- 1 法令に基づく場合。
- 2 人の生命、身体又は財産の保護のために必要がある場合であつて、被験者等の同意を得ることが困難であるとき。
- 3 公衆衛生の向上のために特に必要がある場合であつて、被験者等の同意を得ることが困難であるとき。
- 4 国の機関若しくは地方公共団体又はその委託を受けた者が法令の定める事務を遂行することに対して協力する必要がある場合であつて、被験者等の同意を得ることにより当該事務の遂行に支障を及ぼすおそれがあるとき。

13.6. 適正な取得と取得に際しての利用目的の通知等

総括責任者は本研究において、偽りその他不正の手段により個人情報を取得しない。個人情報を取得した場合は、あらかじめその利用目的を公表している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者等に通知し及び公表するとともに、利用目的を変更した場合は、変更された利用目的について被験者等に文書にて通知し、及び公表するものとする。

13.7. 内容の正確性確保

治療結果データを含めた個人情報は、定期召集される安全・効果評価・適応判定部会で常に検証されるものとし、その内容の正確性と最新の内容に保つよう努める。

13.8. 安全管理措置

組織的、人的、物理的、および技術的安全管理措置については、「個人情報保護法」、「ガイドライン」、「指針」および「国立大学法人岡山大学医学部・歯学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程」（平成 17 年 3 月 24 日）に基づいた措置を講ずる。

13.9. 委託者等の監督

本研究は岡山大学病院内で実施され、被験者から取得したデータは治験と同様、個人を容易に特定できないよう個人情報が図られている。しかし、一部の臨床検査データは外部検査業者に委託されるため、岡山大学病院は、契約書及び機密保持契約書にて岡山大学病院個人情報規程に定められている業務の委託に関する条項について、岡山大学病院が求める個人情報の管理状況について確認している。

13.10. 第三者提供の制限

本研究は、オンコリスバイオファーマ（株）との共同研究であり、データを共有する可能性についてあらかじめ「説明と同意書」に記載・説明し、同項についても合わせて文書での同意を得るものとする。また原則として、共同研究機関以外に対する個人情報の提供は行わないが、止む得ず研究・解析目的での提供が必要な場合には、適切な目的であることを確認し、「指針」の第六章第九に従い、その旨被験者へ文書にて通知する。

13.11. 保有する個人情報に関する事項の公表等

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知り得る状態（被験者等の求めに応じて遅滞なく回答する場合を含む。）におく。

- 1 本臨床研究を行う機関の名称
- 2 すべての保有する個人情報の利用目的
- 3 利用目的の通知、個人情報の開示、訂正、利用停止に応じる手続き
- 4 保有する個人情報の取扱いに関する苦情の申出先

13.12. 個人情報の開示

総括責任者は、被験者等から、当該被験者が識別される保有する個人情報の開示（当該被験者が識別される保有する個人情報が存在しないときにその旨を知らせることを含む。以下同じ。）を求められたときは、被験者等に対し書面の交付による方法（被験者等が同意した方法があるときには、当該方法）で開示する。ただし以下に記載した事項に該当する場合はその全部又は一部を開示しない。

- 1 被験者又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがある場合
- 2 研究を行う機関の業務の適正な実施に著しい支障を及ぼすおそれがある場合
- 3 他の法令に違反することとなる場合

13.13. 個人情報の訂正および利用停止等

被験者または代諾者から、岡山大病院が保有する被験者が識別される個人情報の内容が事実でないという理由によって当該情報に対して訂正、追加または削除を求められた場合、総括責任者が調査を行い、その結果に基づき総括責任者は必要な是正措置を行う。なお法定代理人等を含めた代諾者からの申し出も受け付けるものとするが、その事実性や提供者の判断および理解力について、総括責任者は慎重に判断するものとする。

13.14. 理由の説明

「10.12.、10.13.」に関して個人情報の開示、訂正、利用停止等に関し、被験者等から求

められた措置の全部又は一部について、その措置をとらない旨を通知する場合またはその措置と異なる措置をとる旨を通知する場合は、被験者等に対し、その理由を説明するよう努める。

13.15. 個人情報の開示、訂正、利用停止等の求めに応じる手続

個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続きは、岡山大学病院個人情報保護法取り扱い規定（国立大学附属病院における個人情報の適切な取り扱いのためのガイドラインに準拠）に基づいた一連の指針に沿って実施する。

13.16. 苦情の対応

苦情相談の窓口として、以下のとおり設置する。

岡山大学病院 医事課患者支援係

岡山市北区鹿田町 2-5-1（郵便番号 700-8558） 電話 086-235-7205

14. 利益相反

本臨床研究の総括責任者は Telomelysin の臨床開発を進めてきたオンコリスバイオファーマ（株）の非常勤取締役であり、同社の代表取締役社長も共同研究者となっている。Telomelysin は一般の薬剤と異なる生物製剤であるため、その開発や管理には特殊な知識と技術が必要であり、他の人材による代替えが困難である。本臨床研究の利害関係については、岡山大学利益相反マネジメント委員会の承認を得ており、当該研究経過を定期的に委員会へ報告等を行うことにより、本臨床研究の利害関係についての公平性を保っていく。

15. 参考文献のリスト

1. 厚生労働省がん研究助成金「地域がん登録の精度向上と活用に関する研究」（主任研究者：津熊秀明）平成 14 年度報告書
2. Meoz-Mendez RT et al. Analysis of the results of irradiation in the treatment of squamous carcinoma of the pharyngeal walls. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 4: 579, 1978.
3. Keane TJ et al. Carcinoma of the hypopharynx: results of primary radical radiation therapy. *Int Radiat Oncol Biol Phys* 9: 659, 1983.
4. Axon PR et al. A comparison of surgery and radiotherapy in the management of post-cricoid carcinoma. *Clin Otolaryngol* 22: 370-374, 1997.
5. Pignon JP et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. *Lancet* 355: 949-955, 2000.
6. Samant S et al. Concomitant radiation therapy and targeted cisplatin chemotherapy for the treatment of advanced pyriform sinus carcinoma: Disease control and preservation of organ function. *Head and Neck* 21: 595-601, 1999.
7. Prades JM et al. Concomitant chemoradiotherapy in pyriform sinus carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128: 384-388, 2002.
8. 厚生労働省大臣官房統計情報部「人口動態統計」（平成 13 年）
9. Shimada H, Okazumi S, Matsubara H, Ochiai T et al. Treatment response and prognosis of patients after recurrence of esophageal cancer. *Surgery* 133, 24-31, 2003.
10. Zenone et al. Curative non-surgical combined treatment of squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Eur J Cancer* 28A: 1380-1386, 1992.
11. 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センター：複数部位の集計-年次推移-. (http://ganjoho.jp/pro/statistics/gdb_trend.html?1%1)
12. Roth JA, et al. A randomized trial comparing perioperative chemotherapy and surgery with surgery alone in resectable stage IIIA non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 86: 673-680, 1994.
13. Rosell R, et al. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 330: 153-158, 1994.
14. Paez JG, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497-1500, 2004.
15. Lynch TJ, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139, 2004.
16. Kim NW, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015, 1994.
17. Califano J, et al. Detection of telomerase activity in oral rinses from head and neck squamous

- cell carcinoma patients. *Cancer Res* 56: 5720-5722, 1996.
18. Mao L, et al. Telomerase activity in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent tissues. *Cancer Res* 56: 5600-5604, 1996.
 19. Mutirangura A, et al. Telomerase activity in oral leukoplakia and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 56: 3530-3533, 1996.
 20. Hohaus S, et al. Telomerase in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2: 1895-1900, 1996.
 21. Hiyama K, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 87: 895-902, 1995.
 22. Patel MM, et al. Clinical usefulness of telomerase activation and telomere length in head and neck cancer. *Head Neck* 24: 1060-1067, 2002.
 23. Yu HP, et al. Telomerase activity and expression of telomerase genes in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *J Surg Oncol* 86:99-104, 2004.
 24. Smogorzewska A and de Lange T Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 73: 177-208, 2004.
 25. Nakayama J, et al. Telomerase activation by hTERT in human normal fibroblasts and hepatocellular carcinomas. *Nat Genet* 18: 65-68, 1998.
 26. Beattie TL, et al. Reconstitution of human telomerase activity *in vitro*. *Curr Biol* 8: 177-180, 1998.
 27. Hiyama E, Hiyama K Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 194: 221-233, 2003.
 28. Lin SY, et al. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113: 881-889, 2003.
 29. Hawkins LK, et al. Oncolytic biotherapy: a novel therapeutic platform. *Lancet Oncol* 3: 17-26, 2002.
 30. Wen J et al. Reconstitution of wild-type or mutant telomerase activity in telomerase-negative immortal human cells. *Hum Mol Genet* 8: 1137-1142, 1999.
 31. Horikawa PL et al. Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene. *Cancer Res* 59: 826-830, 1999.
 32. Takakura M et al. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 59: 551-557, 1999.
 33. Wick M et al. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Gene* 232: 97-106, 1999.
 34. Janknecht R On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells. *FEBS Lett* 564: 9-13, 2004.
 35. Gu J, et al. Tumor-specific transgene expression from the human telomerase reverse

- transcriptase promoter enables targeting of the therapeutic effects of the Bax gene to cancers. *Cancer Res* 60: 5359-5364, 2000.
36. Rein DT, Breidenbach M, Curiel DT. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy. *Future Oncol* 2:137-43, 2006.
 37. Bergelson JM et al. Isolation of a common receptor for coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323, 1997.
 38. 鐘ヶ江裕美, 高森晃一, 斎藤泉. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入. *実験医学* 12: 1804-1810, 1994.
 39. Neumann R et al. Detection of adenovirus nucleic acid sequences in human tonsils in the absence of infectious virus. *Virus Res* 7: 93-97, 1987.
 40. Hay JG, et al. Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Hum Gene Ther* 6: 1487-1496, 1995.
 41. Swisher SG, et al. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 763-771, 1999.
 42. Swisher SG, et al. Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin Cancer Res* 9: 93-101, 2003.
 43. Fujiwara T, et al. Multicenter phase I study of repeated intratumoral delivery of adenoviral p53 (ADVEXIN) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 24: 1689-1699, 2006.
 44. Sterman DH, et al. Adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir gene therapy in patients with localized malignancy: results of a phase I clinical trial in malignant mesothelioma. *Hum Gene Ther* 9: 1083-1092, 1998.
 45. Dewey RA, et al. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat Med* 5: 1256-1263, 1999.
 46. Nasu Y et al. Suicide gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tK gene for patients with local recurrence of prostate cancer after hormonal therapy. *Mol Ther* 15:834-840, 2007.
 47. DeWeese TL, et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 61: 7464-7472, 2001.
 48. Khuri FR, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6: 879-885, 2000.
 49. Reid T, et al. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520):

- phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res* 62: 6070-6079, 2002.
50. Kawashima T, et al. Telomerase-specific replication-selective virotherapy for human cancer. *Clin Cancer Res* 10: 285-292, 2004.
 51. Kishimoto H, et al. *In vivo* imaging of lymph node metastasis with telomerase-specific replication-selective adenovirus. *Nature Med*, 12, 1213-1219, 2006.
 52. Fujiwara T, et al. Telomerase-specific gene and vector-based therapies for human cancer. In "Telomeres and Telomerase in Cancer" (Hiyama, K., ed.), pp293-312, Humana Press, New York, USA, 2009.
 53. Hashimoto Y et al. Establishment of Biological and Pharmacokinetic Assays of Telomerase-Specific Replication-Selective Adenovirus (TRAD). *Cancer Sci* 99:385-390, 2008.
 54. Kuroda S, et al. Telomerase-dependent oncolytic adenovirus sensitizes human cancer cells to ionizing radiation via inhibition of DNA repair machinery. *Cancer Res*, 70: 9339-9348, 2010.
 55. Zhang M, et al. Ionizing radiation increases adenovirus uptake and improves transgene expression in intrahepatic colon cancer xenografts. *Mol Ther* 8: 21-28, 2003.
 56. Qian J, et al. Ionizing radiation-induced adenovirus infection is mediated by Dynamin 2. *Cancer Res* 65: 5493-5497, 2005.
 57. Stracker TH, Carson CT, Weitzman MD. Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418: 348-352, 2002.
 58. Fujiwara T. A novel molecular therapy using bioengineered adenovirus for human gastrointestinal cancer. *Acta Med Okayama*, 65: 151-162, 2011.
 59. Kurihara Y et al. Telomerase-specific virotheranostics for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 15: 2335-2343, 2009.
 60. Javier RT. Adenovirus type 9 E4 open reading frame 1 encodes a transforming protein required for the production of mammary tumors in rats. *J Virology* 68: 3917-3924, 1994.
 61. Umeoka T, et al. Visualization of intrathoracically disseminated solid tumors in mice with optical imaging by telomerase-specific amplification of a transferred green fluorescent protein gene. *Cancer Res* 64: 6259-6265, 2004.
 62. Taki M, et al. Enhanced oncolysis by a tropism-modified telomerase-specific replication selective adenoviral agent OBP-405 ("Telomelysin-RGD"). *Oncogene* 24: 3130-3140, 2005.
 63. Watanabe T, et al. Histone deacetylase inhibitor FR901228 enhances the antitumor effect of telomerase-specific replication-selective adenoviral agent OBP-301 in human lung cancer cells. *Exp Cell Res* 312: 256-265, 2006.
 64. Fujiwara T, et al. Enhanced antitumor efficacy of telomerase-selective oncolytic adenoviral agent (OBP-401) with docetaxel: Preclinical evaluation of chemovirotherapy. *Int J Cancer* 119: 432-440, 2006.
 65. Endo Y et al. Virus-mediated oncolysis induces danger signal and stimulates cytotoxic-T-

- lymphocyte activity via proteasome activator upregulation. *Oncogene* 27: 2375-2381, 2008.
66. Hioki M et al. Combination of oncolytic adenovirotherapy and Bax gene therapy in human cancer xenografted models. Potential merits and hurdles for combination therapy. *Int J Cancer* 122: 2628-2633, 2008.
 67. Ikeda Y et al. A novel antiangiogenic effect for telomeras-specific virotherapy through host immune system. *J Immunol* 182: 1763-1769, 2009.
 68. Liu D et al. Preclinical evaluation of synergistic effect of telomerase-specific oncolytic virotherapy and gemcitabine for human lung cancer. *Mol Cancer Ther* 8: 980-987, 2009.
 69. 「放射線治療計画ガイドライン・2004（2005年11月15日更新）」
(<http://web.sapmed.ac.jp/radiol/guideline/>).
 70. Nemunaitis J et al. A phase I study of telomerase specific replication competent oncolytic adenovirus (Telomelysin) for various solid tumors. *Mol Ther* 18: 429-34, 2010.
 71. Eisenhauer EA et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* 45: 228-247, 2009.
 72. DeWeese TL et al. A phase I trial of CV706, a replication-competent, PSA selective oncolytic adenovirus, for the treatment of locally recurrent prostate cancer following radiation therapy. *Cancer Res* 61:7464-7472, 2001.
 73. Small EJ, et al. A phase I trial of intravenous CG7870, a replication-selective, prostate-specific antigen-targeted oncolytic adenovirus, for the treatment of hormone-refractory, metastatic prostate cancer. *Mol Ther* 14: 107-117, 2006.
 74. Nemunaitis J, et al. Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: a phase II trial. *Cancer Res* 60:6359-6366, 2000.
 75. Reid T, et al. Intra-arterial administration of a replication-selective adenovirus (dl1520) in patients with colorectal carcinoma metastatic to the liver: a phase I trial. *Gene Ther* 8:1618-1626, 2001.
 76. Nemunaitis J, et al. Intravenous infusion of a replication-selective adenovirus (ONYX-015) in cancer patients: safety, feasibility and biological activity. *Gene Ther* 8:746-759, 2001.
 77. Kim D, Martuza RL, Zwiebel J. Replication-selective virotherapy for cancer: Biological principles, risk management and future directions. *Nat Med* 7:781-787, 2001.
 78. Khuri FR, et al. A controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6:879-885, 2000.
 79. Reid T, et al. Hepatic arterial infusion of a replication-selective oncolytic adenovirus (dl1520): phase II viral, immunologic, and clinical endpoints. *Cancer Res* 62:6070-6079, 2002.
 80. Mineta T, et al: Attenuated multmutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant

- gliomas. *Nat Med* 1: 938–943, 1995.
81. Markert JM, et al. Conditionally replicating herpes simplex virus mutant, G207 for the treatment of malignant glioma: results of a phase I trial. *Gene Ther* 7: 867–874, 2000.
 82. Kemeny N, et al. Phase I, open-label, dose-escalating study of a genetically engineered herpes simplex virus, NV1020, in subjects with metastatic colorectal carcinoma to the liver. *Hum Gene Ther* 17: 1214–1224, 2006.
 83. Hu JC, et al: A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* 12: 6737–6747, 2006.
 84. Kimata H, Iet al: Pilot study of oncolytic viral therapy using mutant herpes simplex virus (HF10) against recurrent metastatic breast cancer. *Ann Surg Oncol* 13: 1078–1084, 2006.
 85. Turnell AS, Grand RJ, Gallimore PH. The replicative capacities of large E1B-null group A and group C adenoviruses are independent of host cell p53 status. *J Virol* 73:2074–2083, 1999.
 86. Goodrum FD, Ornelles DA. p53 status does not determine outcome of E1B 55-kilodalton mutant adenovirus lytic infection. *J Virol* 72:9479–9490, 1998.
 87. Rothmann T, et al. Replication of ONYX-015, a potential anticancer adenovirus, is independent of p53 status in tumor cells. *J Virol* 72:9470–9478, 1998.

添付資料 3

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

説明と同意書

平成 21 年 3 月 6 日初版
平成 21 年 7 月 23 日第 2 版
平成 22 年 7 月 8 日第 3 版
平成 23 年 2 月 8 日第 4 版
平成 23 年 10 月 22 日第 5 版
平成 24 年 3 月 10 日第 6 版
平成 24 年 5 月 8 日第 7 版

遺伝子治療臨床研究に参加をご希望の患者さんへの説明と同意書

説 明

1. はじめに

最近の遺伝子工学の進歩により、ウイルスなどの微生物の遺伝子进行操作してがん治療薬を開発することが可能になってきつつあります。これらの進歩に支えられて、岡山大学病院では、頭頸部がん、食道がん、肺がんの新しい治療として、がん細胞の中だけで増えてがん細胞を殺すウイルス療法と放射線治療を併用する遺伝子治療臨床研究（以下「臨床研究」と略します）を計画いたしました。

これから、この臨床研究で行われるウイルス療法の仕組み、期待される効果、安全性、予想される副作用などについてご説明いたしますので、この臨床研究に被験者（患者）として参加してこの治療を受けられるかどうかをご検討ください。

もちろん、実際にはこの文書に基づいて担当の医師が詳しくお話いたしますし、わからない点があれば何度でも説明いたします。

このような臨床研究に参加される方の人権を守るため、あなたが臨床研究に参加することは、あくまでもあなたの自主性に基づいた自由意思によるものであることを前提として以下のことを約束します。

- a) 臨床研究に参加することを私たちがお勧めして、あなたが拒否された場合も、今後の治療には不利益を受けることは一切ないこと。
- b) 臨床研究に参加することに同意した場合でも、あなたが健康に不安を感じたり、あなたにとって何らかの不都合が生じたりした場合は、いつでも研究参加の同意を撤回することが出来ること。

2. 臨床研究について

臨床研究（あるいは臨床試験）とは、新しく考え出された治療方法や薬物を患者さんのご協力を受けて投与することにより、実施の診療・治療の場で安全性や治療効果を検討することを言います。このような新しい治療法を一般的に実施し、広く患者さんが恩恵を受けることができるようにするためには、臨床研究を行い、安全性に問題がないか、そして治療効果があるかについて科学的な評価を受けなければなりません。

一般的に臨床研究は治療あるいは薬剤の副作用を確認し、安全であるかどうかを調べる段階(第Ⅰ相試験)、第Ⅰ相試験で定められた方法で治療を行って効果を調べる段階(第Ⅱ相試験)、現在一般的に使われている治療や薬剤と比較する段階(第Ⅲ相試験)に分けられます。これらの臨床試験を経て、十分な効果があることが科学的に証明され、かつ安全性に大きな問題がないと判断されたものが医薬品として認められます。

ウイルス療法に関する臨床研究は、まだ研究段階の治療です。患者さんにとって、本当に効果があるかどうか、安全に行えるかどうか、わからないところもたくさんあります。今回、患者さんに紹介する臨床研究は、治療の安全性を調べることを主たる目的(主要エンドポイントと呼びます)とし、同時に治療の効果も調べることを目的としており(副次エンドポイントと呼びます)、第Ⅰ/Ⅱ相試験に相当します。

ただ、この試験は、製薬会社などが新薬の厚生労働省の承認を得るために行う臨床試験、いわゆる治験ではありません。

3. あなたのご病気について

あなたのがん(頭頸部がん、食道がん、肺がんのいずれか)は、手術で完全に切除することが難しい状態にあります。このまま病気が進行しますと、がんによって咽頭や食道、気管・気管支といった食物や空気の通り道が閉塞されたり、がんが大きくなって痛みの原因になったりすることが予測されます。

このような時、一般的には抗がん剤治療、放射線治療、あるいはその併用治療が行われますが、確実に効果が得られる決定的な治療法の組み合わせが定まっていないのが現状です。抗がん剤治療は新しい薬剤が次々に承認され、いろいろな薬剤を組み合わせる治療が試みられていますが、多くの副作用がみられています。

そこで、私たちは、より副作用の少ないと期待されるウイルス療法と放射線治療を併用することで、がんの増殖を抑えたり縮小させたりしようと考えています。

4. この臨床研究の概要

一般的に、ウイルスは細胞に感染すると細胞の中で増殖して、その細胞を殺すことで他の細胞へと感染を拡げていきます。したがって、ウイルスをがん細胞に感染させると、がん細胞を殺すことができますが、野生のウイルスの場合、正常な細胞にも感染して増殖するので、正常な細胞も殺してしまうことになります。

そこで私たちは、遺伝子組み換え技術を用いて、がん細胞に感染したときだけ増殖するウイルス製剤、テロメライシン(Telomelysin)を開発しました。テロメライシンは、

がん細胞に感染すると増殖してがん細胞を殺しますが、正常な細胞では増殖が抑えられるため、細胞は生き続けることができます。したがって、テロメライシンはがん細胞を選択的に殺傷する抗がん剤として用いることができます。また基礎研究において、テロメライシンは放射線ががん細胞を殺す機能を増強する効果があることが明らかになっています。

この臨床研究では、テロメライシンの投与と放射線治療を同時に行うことで、より強力な抗腫瘍効果を期待しています。

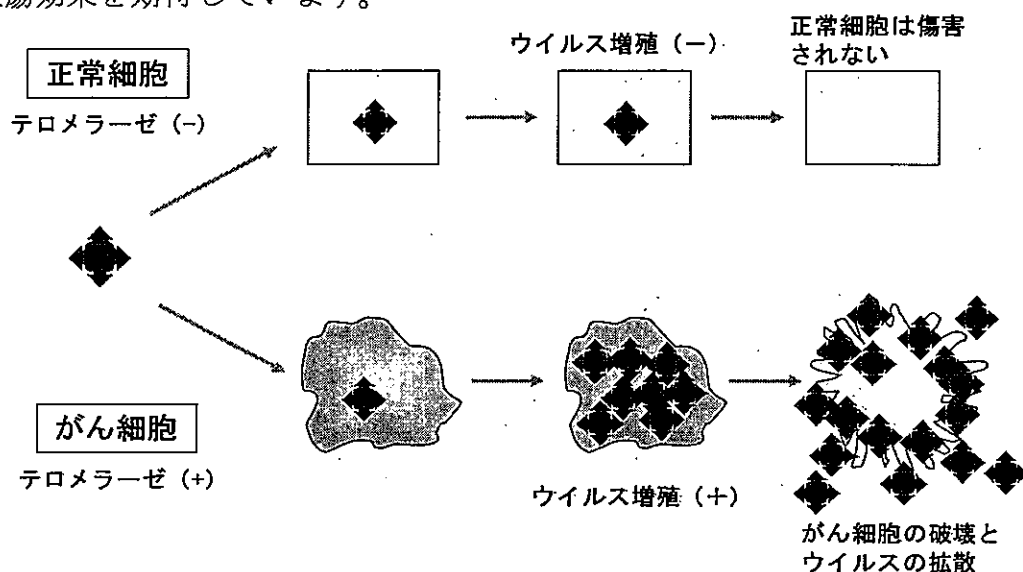


図1 テロメライシンの作用機序

5. この臨床研究の目的

この臨床研究の主な目的は、テロメライシンをがんの中に投与し、同時に放射線治療を行うことで、重い副作用なく頭頸部がん、食道がん、あるいは肺がんの増殖を抑制したり、縮小させたりすることができるか否かを検討することです。テロメライシンの安全性はすでに米国での第Ⅰ相臨床試験で確かめられており、患者さんによってはがんの縮小もみられました。この臨床研究では、さらに次のステップとしてより効果を強めるために放射線治療を併用します。しかし、テロメライシンの投与が放射線治療と同時に使われた経験はまだありません。そこで、低い容量のテロメライシンから開始して段階的に使用する量を増やし、第Ⅰ/Ⅱ相試験として安全性および身体での反応、有効性を検討する予定です。

私たちは、がんの増殖が止まったり、がんが小さくなったりすることで、痛みが和らいだり、症状がよくなることを期待しています。しかし、テロメライシンと放射線を併

用する臨床研究は初めての試みであり、はっきりとした臨床効果を期待するのはこれからのことなのです。治療の効果がなく症状が強くなる場合も考えられます。そのような場合、症状緩和のための手段を尽くします。多くの人のデータを集め、良い結果と悪い結果の両方をよく検討して次の段階の治療に貢献するよう進めますのでご理解下さい。

6. テロメラインについて

テロメラインは、遺伝子組み換え技術を用いてアデノウイルス 5 型をもとに作成されました。アデノウイルスの型によっては結膜炎や胃腸炎、重症肺炎などを起こす場合もありますが、アデノウイルス 5 型は幼児の「かぜ」を起こすウイルスの一つと考えられています。テロメラインは、テロメラーゼという細胞を不死化する酵素を持つ細胞に感染した時に増殖することができます。ヒトの 80% 以上のがんではテロメラーゼの活性が認められることから、ほとんどのがん細胞でテロメラインは増殖して、そのがん細胞を殺すことができると考えられます。米国では、さまざまな固形がんの患者さんを対象に、テロメラインの投与量を段階的に増やして安全性を確認するための第 I 相臨床試験が行われ、テロメライン単独での腫瘍内投与の安全性が確認されています。

また、テロメラインが感染したがん細胞では、放射線により傷ついた DNA が修復されるのが抑えられるため、放射線治療の効果がより強力にみられることが明らかになっています。逆に、放射線が照射されたがん細胞はテロメラインがよく感染することもあります。すなわち、それぞれの効果を増強することで、テロメラインと放射線治療は相乗効果を発揮することができるのです。この有望な基礎研究成果に基づいて、いよいよ実際の患者さんについてその効果と安全性を確かめる段階となりました。

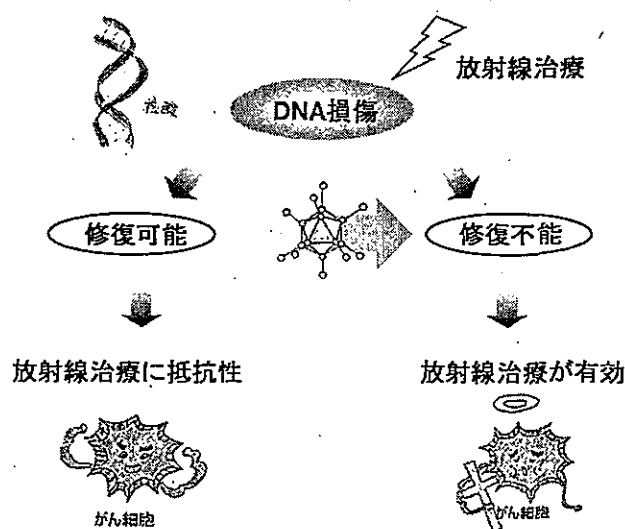


図2 テロメラインによる放射線治療の効果増強

テロメラインが DNA 修復を阻害して放射線治療の効果を増強する。

7. この臨床研究に参加できる患者さんの条件

がんの治療法は多数ありますが、がんの種類や進行の状況を診断して、もっともよいと思われる治療法を選ばなければなりません。

この臨床研究の対象となるのは、頭頸部がん、食道がん、あるいは肺がん（非小細胞肺がん）の患者さんで、全身状態あるいはがんの状況から外科的な手術によりがんを完全に取り除くのは難しいと判断された方、あるいは手術のあとがんが再発された方です。外科的な切除にともなう危険性の高い方も対象となります。肺がんの中で、非小細胞肺がんとは扁平上皮がん、腺がん、大細胞がんの総称で、抗がん剤の比較的良好に効く小細胞肺がんはこの治療の対象とはなりません。

担当医師によりこの臨床研究の適応症例に該当すると判断された場合、あなたの病歴、全身状態を含めた検査結果は岡山大学病院の本臨床研究審査委員会の中にある安全・効果評価・適応判定部会に提出されます。この部会にてあなたが遺伝子治療を受けるに適切であると判断され、そしてあなたが同意書に自署又は捺印をして遺伝子治療を受けることに同意されますと、治療が開始されることになります。

研究に参加いただける患者さんの医学的な主な条件は以下の通りです。

- 1) 年齢は20歳以上で上限はないが、医学的に本臨床研究を行うために十分な身体的機能を有すると判断されること。
- 2) 手術により切除できない頭頸部がん、食道がん、非小細胞肺がん（扁平上皮がん、腺がん、大細胞がん）を有していること。
- 3) ウイルス液のがんへの局所的注入が可能であること。
- 4) がんの面積が 1 cm^2 ＜、 25 cm^2 ＞であること。
- 5) 無症状であるか、あるいは症状があっても歩行可能か、ベッド上にいるのが1日の半分以下であること。
- 6) 骨髄機能、肝機能、腎機能、心機能、肺機能に重い障害がないこと。
- 7) 妊娠・授乳をしていないこと。

8. この臨床研究の進め方

この臨床研究では、テロメライシンを投与し、同時に放射線治療を行った場合の人体での安全性と治療効果を調べるために、投与量を段階的に増やしながら進めます。

まず、ある濃度のウイルス投与と放射線治療を3人の患者さんに行い、副作用とがんに対する効果の有無を調べます。この治療で重い副作用が認められなければ、続く別の

3 人の患者さんでは、10 倍増量したウイルス投与と放射線治療を行い、同じように副作用と治療効果を観察します。この段階で重い副作用が認められない場合には、10 倍増量した最大投与量のウイルス投与と放射線治療による安全性と効果を確認するために、さらに 6 人の患者さんの治療を行います。なお、ウイルスを増量した場合も、放射線治療は標準的に使われている照射量に保ち、増やすことはありません。計画通りに進めば合計 12 人の患者さんでこの臨床研究が終了することとなります。ただし、この臨床研究の途中で重い副作用が認められたときは直ちに投与を中止し、副作用に対する治療に努めることになります。その場合、安全に投与できる最大投与量を決定するために、そのレベルでの患者さんの数を増やして検討することになります。

このように安全性を確認しながら一つ一つの段階を進みますので、あなたがこの臨床研究に参加された場合、その時の臨床研究の進行状況によってあなたに用いるウイルスの投与量が決まっています。この臨床研究は、安全性を確認するためのデータの収集を目的としており、治療の途中であなたに投与するウイルスの量を増やしたりすることはできません。

これは重い副作用がおこるのを未然に防ぐなど、安全に臨床研究を進めるために必要なことなのです。この臨床研究の進め方と現在の進行状況について十分に説明を受けて、納得されたうえで同意するか否かの判断をして下さい。

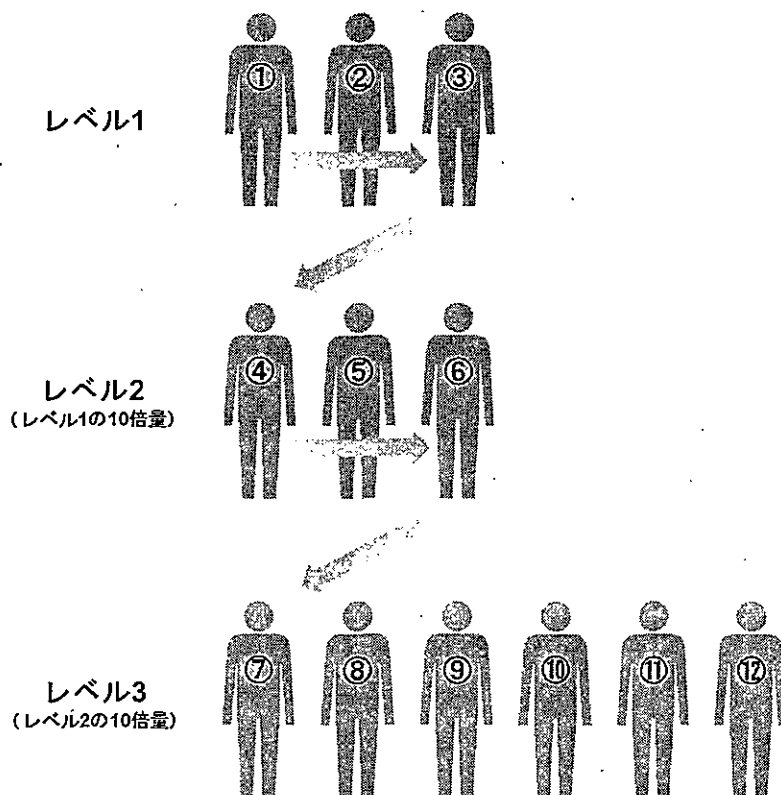
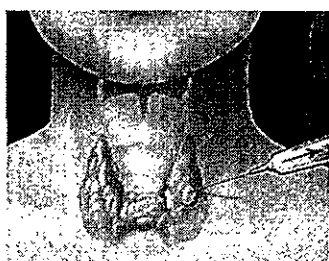


図 3 臨床研究の進め方

9. この臨床研究での治療の実際

1) テロメラシンの投与

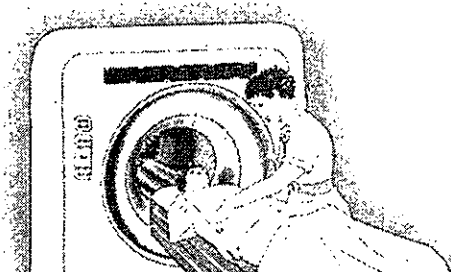
テロメラシンのウイルス液の投与は、局所麻酔、咽頭麻酔、あるいは全身麻酔のもとで、直接がんを見ながら、あるいは内視鏡（消化管内視鏡あるいは気管支内視鏡）を用いて注射を行います。また、コンピューター断層撮影（CT）というレントゲンの透視下や超音波エコーでがん病巣を確認しながら、体の外から針を刺して投与することもあります。注射は細い針を使って、原則としてがんの中5ヶ所に行います。この治療は、問題となる副作用が認められない限り、投与初日を第1日目として、第18日目、第32日目に同じ場所のがんに行い、計3回の投与を行う予定です。米国で行われた第I相臨床試験では、週1回、5週間、計5回のテロメラシン投与が行われましたが、投与が中止になるような重篤な副作用はみられませんでした（「13. 外国での状況について」参照）。しかし、人種や体格の差などを考慮して、本臨床研究では3回投与とし、間隔も1週間以上開けるようにしています。



1) 体の表面のがんに直接注射
(頭頸部がん)



2) 内視鏡を用いて注射
(頭頸部がん、食道がん、肺がん)



3) CTを見ながら体の表面から注射
(食道がん、肺がん)

図4 テロメラシンの投与方法

2) 放射線治療

第1日目にテロメラシンの投与を受けた後、問題となる副作用が認められなければ、すべての患者さんは第4日目から原則として週5回（平日5日）、6週間の放射線治療を受けていただきます。これは一般的にあなたのがんに行われる放射線治療と同じスケジュールです。

準備として、治療開始前に放射線治療計画用CTを行い、照射すべきがん病変とその周辺の画像を撮影し、局所への照射範囲を決めます。その後、放射線治療担当医師が医学物理の専門家や放射線技師とともに、一番よい照射方法をコンピュータープログラムを用いて決めます。その決められた方法に従って、放射線治療担当医師と技師が放射線

治療を行います。

原則として1日1回、月曜日から金曜日までの週5回で、一回の照射時間は数分程度です。照射中の患者さんには苦痛はありません。第18日目、第32日目に行うテロメラインの投与は、同日の放射線治療の後に行います。

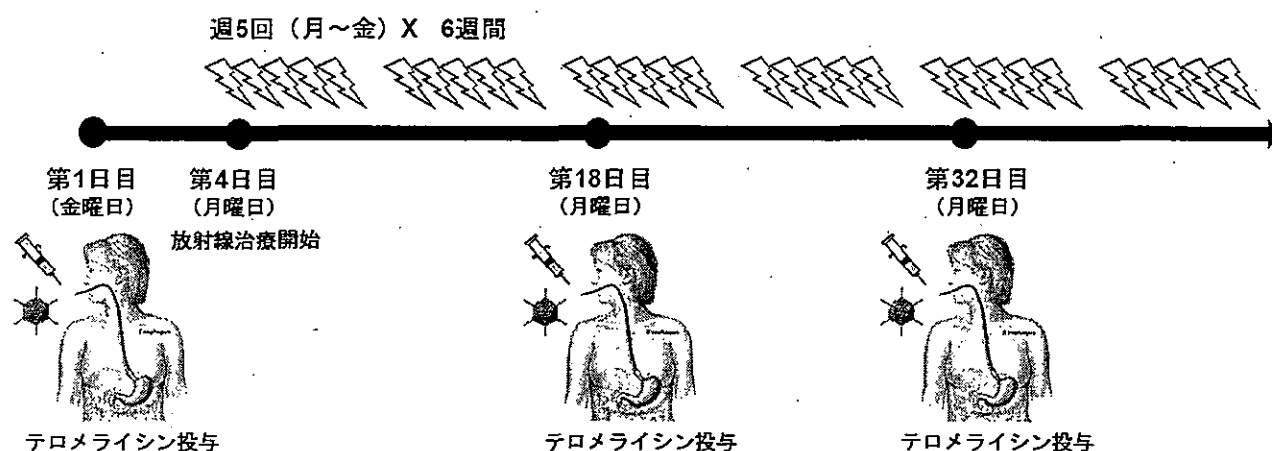


図5 治療のスケジュール（食道がんの場合）

3) 治療中および治療後の検査

テロメラインの投与後、定期的に採血やレントゲン撮影などを行い、副作用とがんの進行や治療の効果を確かめます。ウイルス投与後48時間は個室にとどまっていたいただき、個室外に出る自由が制限されます。専用の着衣の着用が義務づけられ、排泄物、着衣や病室内も消毒等が実施されます。これらは、遺伝子組み換えウイルスであるテロメラインが環境中に散らばって、自然界の生物および微生物に影響を与える可能性を最小限に抑えるためのものですので、ご協力をお願いいたします。

入院期間はあなたの健康状態により異なりますが、放射線治療終了から数日間経過を観察して、担当医師が問題ないと判断しましたら退院していただきます。その後、約一ヵ月後、三ヵ月後に採血やCT、あるいは核磁気共鳴画像診断（MRI）、陽電子放射断層撮影（PET）で、副作用と治療効果判定を行います。また、治療後三ヶ月の時点では、テロメラインを投与したのと同じ方法でがんの一部を取り、顕微鏡で治療効果があるかどうかを確認します。

治療および検査のスケジュール表

治療経過		治療 開始前	治療期間中							退院時	外来での フォローアップ	
サイクル日 (治療開始日を第1日目とする)		-28 ~ -1	1	4	11	18	25	32	39	46	退院 1ヵ月後	退院 3ヵ月後
ウイルスの投与			○			○		○				
放射線の治療	平日5日間、6週間			○ (4-8)	○ (11-15)	○ (18-22)	○ (25-29)	○ (32-36)	○ (39-43)			
臨床研究の説明	同意書の取得	○										
問診		○										
診察	症状の評価	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
理学所見の記録	血圧、脈拍、体温、 体重など	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
血液検査	血液一般、生化学 腫瘍マーカーなど	○	○ ³⁾	○	○	○	○	○	○	○	○	○
尿検査		○								○		
心電図		○ ¹⁾										
胸部X線検査		○ ¹⁾										
腫瘍検査	内視鏡検査、CT、 MRI、FDG-PET、 超音波エコー検査	○ ²⁾									○	○
ウイルス検査	血液	○	○ ⁴⁾	○	○	○ ⁴⁾		○		○	○	
	唾液、喀痰、尿	○	○ ³⁾							○		
	組織生検	○										○

¹⁾ 治療期間中は、医学的に必要とされた時のみ実施する。

²⁾ 肉眼的観察、内視鏡、超音波エコーなどの検査は、症例によって適宜行う。

³⁾ 薬剤投与後24時間でサンプルを採取し検査を行う。

⁴⁾ 薬剤投与後30、60、90分、24時間でサンプルを採取し検査を行う。

10. 期待される治療効果について

テロメライシンの注射と放射線治療の併用によって、具体的な効果としてはがんの増殖が停止したり、縮小したりすること、あるいはがんによる痛みが和らぐことなど、進行したがんによる症状が改善されることを期待しています。進行したがんが治癒することまでは期待できません（延命効果については不明です）が、がんによる症状が軽減し、生活しやすくなり、その状態が長く続けば治療として有用であると考えます。

11. 安全性と副作用について

1) テロメライシンの安全性

テロメライシンは、アデノウイルス 5 型をもとに遺伝子組み換え技術によって作成されました。今回の臨床研究で使用するテロメライシンは、米国で行われた第 I 相臨床試験で使われたのと同じものであり、米国食品医薬品局（FDA）によってその安全性が認められ、ヒトへの使用が許可されたものです。

アデノウイルス 5 型は「かぜ」症状を起こすウイルスです。テロメライシンは、がん細胞のみで増殖するように改変されたアデノウイルスで、正常な細胞ではその増殖が抑えられることが基礎研究で確認されています。また、米国での第 I 相臨床試験では、これまでに 23 人の患者さんがこの臨床試験に参加されています。なお、この臨床試験では放射線治療は併用されません。テロメライシンを 1 回だけ投与された患者さん 16 例の中で多く認められた副作用は発熱、寒気（37.5%、6/16）、倦怠感（56.3%、9/16）、投与部位の疼痛（37.5%、6/16）などで、重篤なものは認められませんでした。したがって、ウイルス自体による重篤な副作用は予測されませんが、注射による炎症でがん部がはれて、炎症を起こしたりすることが考えられます。もしもそのようなことになったら、抗生物質投与をはじめとする適切な治療をいたします。

また、先にも述べたようにアデノウイルスは「かぜ」症状を起こすウイルスなので、たとえ増殖可能なアデノウイルスが存在しても、重い副作用には結びつかないと考えています。実際に、週 1 回、5 週間、計 5 回のテロメライシン投与の際も、リンパ球数減少症、疼痛、筋骨格痛など 1 回投与ではみられなかった症状が認められましたが、投与が中止になるような重篤な副作用はみられませんでした。

1999 年 9 月に、米国でアデノウイルスを用いた遺伝子治療で患者が死亡しました。これは、肝臓の重要な酵素を生まれつき作ることができない患者さんに、その酵素を作る遺伝子をアデノウイルスに組み込んで、肝臓の動脈内に直接注入するという遺伝子治療臨床試験でのことです。この試験では初めの 17 例までは特に重篤な副作用は認められな

かったのですが、18 例目の患者さんでは、投与 1 日後に黄疸が認められ、その 3 日後に多臓器不全のため亡くなりました。原因は、肝臓の血管内に高濃度のベクターを注入したために引き起こされたと考えられています。この臨床研究とは投与方法などが異なりますが、アデノウイルスを用いた臨床研究という点では同じですので、安全性に十分配慮し、慎重に臨床研究を進めて行きます。

2) テロメラインの投与による副作用

この治療では、直接がんを見ながら、あるいは内視鏡を用いてがん細胞を採取したり、ウイルス液をがん部に注射したりします。その際、針穴より少量の血液が流出したり、唾液や痰に血が混ざったりすることがあるかもしれません。通常は一時的なもので自然に軽快しますが、まれに出血が多いことがあります。そのような場合には緊急に適切な処置をいたします。

CT を用いて体の外から直接がんを穿刺して治療する場合には、肺から空気が漏れて気胸となり肺がしぼむことがあります。自然に軽快することがほとんどです。膨らみが悪い場合は、肺を膨らますための処置をいたします。

3) 放射線治療による副作用

放射線治療による副作用としては、頭頸部がんの場合、口腔、咽頭の粘膜炎（口内炎）、皮膚炎、唾液分泌障害、味覚障害、嚥下障害など、食道がん、肺がんの場合は、色素沈着、皮膚炎、食道炎、食道潰瘍、食道穿孔、食道出血、肺臓炎などが予測されます。また、骨髄機能が低下すれば、感染や出血しやすくなります。これらは通常の放射線治療でも見られる副作用であります。

以上が予測される副作用ですが、テロメラインの投与と放射線治療を同時に行うことは、まだ人では試みられておりません。何らかの予測できない副作用が生じる可能性はありますので、すべての患者さんは厳重に経過観察を受け、副作用が生じれば速やかに対処されます。

また、あなたの病状については、本臨床研究の担当医師以外に、先に述べました安全・効果評価・適応判定部会の複数の委員が監視する仕組みとなっています。もちろん予測されなかった事態が生じた時には、私たちは全力でそれに対処しますが、治療を中止する場合もあることを、予めご理解いただきたいと思います。その際は、事前あるいは事後に十分に説明させていただきます。

12. この臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について

臨床研究の期間中及び終了後にあなたが身体の異常に気づかれたときは、担当医師や看護師にすぐに申し出て下さい。専門の医師が直ちに適切な処置を行います。

このような自覚症状がなくても、治療による何らかの有害事象が発見された場合には、まずあなたにお知らせし、その上で適切な治療を行います。

岡山大学病院は、本臨床研究による治療が原因で生じたいかなる身体的障害に対しても十分な医療的処置を提供します。ただし、金銭的な補償はいたしません。また、この臨床研究で対象とした病気以外によるものや、明らかに臨床研究用薬に関連して起きた症状（いわゆる副作用）と考えられないものについては、通常の治療及び支払い方法（例えば健康保険など）となります。

通院や入院、社会的問題などによる臨床研究期間中の減収や不快感などの精神的または肉体的な不利益に対する補償をすることは出来ませんので、了解した上で、本臨床研究に参加して下さい。

13. 外国での状況について

テロメラインの第Ⅰ相臨床試験「各種固形がん患者を対象としたテロメラゼ特異的に増殖する腫瘍溶解性アデノウイルス、テロメライン（OBP-301）の第Ⅰ相単回投与試験」は、米国食品医薬品局（FDA）の承認のもと、2006年10月から開始されました。テキサス州ダラスのマリー・クローリー医学研究センター、モンタナ州ビリングスのビリングスクリニックで16例の患者さんに投与され、安全性や治療効果に関する情報が集められています。また、2008年6月からは、週1回、5週間、計5回のテロメライン投与を行う反復投与試験が、さらに6例の患者さんに追加で行われました。

テロメラインを1回のみ投与された初めの16例の患者さんについての報告によりますと、多くみられた副作用は発熱、寒気（37.5%、6/16）、倦怠感（56.3%、9/16）、投与部位の疼痛（37.5%、6/16）などでしたが、いずれも軽いもので軽快しています。治療後もなく病気の進展によって何らかの症状が発生したり、亡くなられたりした方もありますが、テロメラインの投与と明らかに関係した高率に発生する重大な副作用は認められていません。

治療効果に関しては、テロメライン投与後28日目の時点で評価可能であった12例中1例でがんの20%以上の増大がみられましたが、11例の患者さんでは増大は認められず、56日目でも評価可能であった9例すべてでがんの進行はみられませんでした。悪性黒色腫の患者さん1例では、28日目で33%、56日目で56.7%のがんの縮小が認められてい

ます。また、28 日目でがんの増大がみられなかった患者さんのうち 4 例で組織が調べられましたが、がんの壊死が観察されたということです。

今回、私たちが計画している臨床研究では、この第 I 相臨床試験と同じテロメライシンを用いて治療を行う予定です。

外国で行われた他の遺伝子治療の情報についてもお伝えしておきます。

がんに対する遺伝子治療ではありませんが、1999 年 9 月に酵素欠損症の 18 歳の青年に酵素の遺伝子を持つアデノウイルスを投与したところ、直後に急性の心肺肝不全で死亡する事故が報告されています。ただ、規定量以上のアデノウイルスを投与したことによる事故であり、遺伝子治療自体の安全性に問題があるわけではないと考えられています。また、免疫不全症の患児にレトロウイルスによって遺伝子を導入した幹細胞を投与する臨床研究では、患児の一部に白血病が発症する問題が生じましたが、テロメライシンは染色体に組み込まれないアデノウイルスであるため、このような副作用は理論的には発生しません。

14. 臨床研究に参加される患者さんの権利と義務ならびに注意点について

人権にかかる重要なことがらは最初に説明しましたが、念のためにもう一度以下のことを申し上げますので確認して下さい。

あなたがこの臨床研究に参加されるかどうかは、あなたの自由意思によって決められるもので、決して強制されるものではありません。担当医師から紹介された臨床研究なので参加を断わりにくいなど考えることはありません。疑問があればどんどん質問して下さい。もしも満足する答えが得られない場合は、参加しないことを考えてもよいでしょう。その場合には、他の新しい抗がん剤の治療や抗がん剤と放射線治療を併用する方法などを選ぶことが考えられますし、症状を緩和することに重きをおいた緩和医療を選ぶのも良いと思います。臨床研究に参加することを断られても、あるいは一度同意した後に、その同意を撤回して治療中止の申し出をされても、その後の治療であなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。臨床研究の参加に同意されても、医療訴訟を提起する権利や人権が制約されることはありません。

臨床研究に参加されましたら、治療がひとまず終わっても経過観察の必要がありますので、岡山大学病院、あるいはそれと密接な関連を持つ医療施設（担当医師からお知らせします）を定期的に受診されることをお勧めします。このことは何よりも、あなたにとって不利益となる副作用を監視し、それを防止するためであり、さらに治療の効果を

明らかにするためです。なお、不幸にして何らかの原因でお亡くなりになった場合には、治療の効果を確認するために病理解剖にご協力下さいますようお願いする場合があります。

また注意していただきたい点として、本臨床研究実施中に他院・他科の診察を受ける場合には本臨床研究を受けている旨を必ず他院・他科の担当医に報告し、本臨床研究の担当医にも必ず報告してください。また他院・他科で処方された薬や、あなた自身が薬局で購入した薬がある場合、可能な限り服用前に本臨床研究担当医に相談するとともに、服用後は必ず本臨床研究担当医に報告してください。

15. 治療に関わる諸経費について

あなたは、この臨床研究のために発生する費用（検査・画像診断や治療のための投薬・注射にかかわる費用、入院費用など）については、岡山大学が負担いたしますので支払う必要はありません。治療後の検査の場合、あなたの病状に関わるものであるものについては保険適応となりますが、本臨床研究に特有の検査についてはすべて岡山大学病院が負担いたします。

ただし、この研究と関係のない病気に要する医療費は、これまでどおり健康保険が適応され、その費用の自己負担分は支払って頂く必要があります。もし、費用などのことで心配やわからないことがあれば、いつでも臨床研究担当医師に相談して下さい。

16. 遺伝子治療臨床研究実施に必要な手続きについて

日本国内で遺伝子治療臨床研究を実施する場合には、国が定めた「遺伝子治療臨床研究に関する指針」の規定に従って、岡山大学病院の遺伝子治療臨床研究審査委員会、厚生科学審議会科学技術部会ならびにがん遺伝子治療臨床研究作業委員会にて、研究の安全性、予測される効果、倫理的な諸問題などについて慎重に審議し、臨床研究の実施に問題がないことを確認します。すべての審議で了承されて、初めて臨床研究を開始することが許されています。

今回、あなたに提案した遺伝子治療臨床研究はこのような手続きを経て承認された臨床研究です。

17. 同意の撤回について

臨床研究に参加することをいったん同意した後や臨床研究が開始されてからでも、い

つでもあなたの希望に従い研究参加の同意を撤回することが出来ます。同意を撤回された場合、その後の治療についてあなたが何ら不利益を受けないことを保証いたします。同意の撤回に際しては、撤回することを担当医師に口頭で伝え、その後、確認のために所定の同意撤回書を提出していただきます。

18. 同意撤回後の資料取り扱いについて

同意を撤回される以前のあなたの臨床経過や検査結果ならびに保管されている臨床検体については、貴重な資料となりますので、遺伝子治療臨床研究の資料として使用させていただきますことを、改めて同意いただきますようお願い申し上げます。

19. 個人情報の保護について

1) あなたの診療記録および同意書など、この遺伝子治療臨床研究に伴う診療記録や臨床データは、以下の法律等の規定に基づき、岡山大学病院医事課で保管し秘密を厳守します。得られた臨床データはこの臨床研究に利用する他、この研究の結果を医学雑誌や学会、厚生労働省およびその審議会に報告することがありますが、あなたの個人情報は保護されます。なお、利用目的に変更が生じた場合には、改めてご連絡させていただきます。

① 個人情報の保護に関する法律（平成 15 年 5 月 30 日法律第 57 号、平成 21 年法 49 号で一部改正）

② 遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成 16 年 12 月 28 日全面改訂 文部科学省・厚生労働省告示）

③ 国立大学法人岡山大学医学部・歯学部附属病院の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する規程（平成 17 年 3 月 24 日施行）

2) この臨床研究により得られたあなた自身のものであることがわかる個人情報の開示を求めることができます。

3) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の内容が事実ではないと判断した場合」には、訂正・追加または削除を求めることができます。訂正・追加または削除できない場合には、必要に応じてその旨を説明します。

4) あなたは、この臨床研究により得られた「あなた自身が識別できる個人情報の内

容が事実ではないと判断した場合、本臨床研究の目的達成に必要な範囲を超えて利用されていると判断した場合あるいは不正の手段により個人情報取得されたものと判断した場合」には利用の停止または消去を求めることができます。その際には、総括責任医師が内容を調査し、違反が判明した場合には必要な措置を講じるとともに、必要に応じてその旨を説明します。なお、利用の停止または消去ができない場合にも、必要に応じてその旨を説明します。

5) 個人情報に関してあなたのご理解を深めていただくため、個人情報の保護に関する法律及び当病院の個人情報に関する院内規定を当病院のホームページ上に掲載しております (<http://www.uro.jp/okayama/index.html>)。また、個人情報の開示等に関する詳細な内容の照会や疑問等については、下記担当係にお問い合わせ願います。

担当係： 岡山大学病院医事課患者支援係
(電話 086-235-7205)

20. 緊急連絡先および質問の問い合わせ先について

この臨床研究への参加者としてのあなたの権利や、研究に関連した障害などについて、何らかの問題や質問が生じたときには、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・腫瘍外科学 (TEL 086-235-7257、FAX 086-221-8775)、または岡山大学病院総務課 (TEL 086-235-7507) にご連絡下さい。

21. 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制

1) 研究の名称

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

2) 実施施設

岡山大学病院

連絡先：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器外科学

TEL 086-235-7257

FAX 086-221-8775

3) 総括責任医師

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）

4) 研究担当医師

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 消化管外科 講師）

宇野 太（岡山大学病院 新医療研究開発センター 助教）

田澤 大（岡山大学病院 新医療研究開発センター 助教）

野間 和広（岡山大学 医療教育統合開発センター 助教）

22. 利益相反

総括責任医師は、本臨床研究に用いるテロメライシンを開発しているオンコリスバイオファーマ株式会社の非常勤取締役であり、同社の代表取締役社長も共同研究者になっています。テロメライシンは一般の薬剤と異なる生物製剤であるため、その開発や管理には特殊な知識と技術が必要であり、他の人材による代替えが困難であります。本臨床研究の利害関係については、岡山大学利益相反マネジメント委員会の承認を得ており、当該研究経過を定期的に委員会へ報告等を行うことにより、本臨床研究の利害関係についての公平性を保ちます。

遺伝子治療臨床研究に関する同意書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、腫瘍選択的融解ウイルス テロメライシンを用いた放射線併用ウイルス療法について、口頭および文書により説明を受け、下記の内容を理解しました。臨床研究に参加することに同意します。また、上記臨床研究を行う上で必要な処置、及び上記臨床研究において予測されない状況が発生した場合、それに対応するための緊急処置を受けることも併せて同意します。

- ☐ はじめに
- ☐ 臨床研究について
- ☐ あなたの病気について
- ☐ この臨床研究の概要
- ☐ この臨床研究の目的
- ☐ テロメライシンについて
- ☐ この臨床研究に参加できる患者さんの条件
- ☐ この臨床研究の進め方
- ☐ この臨床研究での治療の実際
- ☐ 期待される治療効果について
- ☐ 安全性と副作用について
- ☐ この臨床研究に関わる有害事象が生じた場合について
- ☐ 外国での状況について
- ☐ 臨床研究に参加される患者さんの権利と義務ならびに注意点について
- ☐ 治療に関わる諸経費について
- ☐ 遺伝子治療臨床研究実施に必要な手続きについて
- ☐ 同意の撤回について
- ☐ 同意撤回後の資料取り扱いについて
- ☐ 個人情報の保護について
- ☐ 緊急連絡先および質問の問い合わせ先について
- ☐ 遺伝子治療臨床研究の正式名称と実施組織体制

以上の内容を証明するため、ここに署名、または記名捺印いたします。

同意年月日 平成 年 月 日

患者氏名（署名又は記名捺印） (印)

連絡先

生年月日 年 月 日

代諾者（患者の）後見人、配偶者、子（未成年を除く）、父母、兄弟姉妹の順に。（該当部分をまるで囲んでください）

代諾者（署名又は記名捺印） (印)

連絡先

患者様との関係

生年月日 年 月 日

立会人（署名又は記名捺印） (印)

連絡先

患者様との関係

説明をした医師及び説明日

平成 年 月 日

(署名) (印)

(署名) (印)

遺伝子治療臨床研究に関する同意撤回書

岡山大学病院

病 院 長 殿

私は、腫瘍選択的融解ウイルス テロメライシンを用いた放射線併用ウイルス療法について、研究協力を依頼され、同意書に署名しましたが、その同意を撤回する事を担当医師に口頭で伝え、確認のため、同意撤回書を提出します。

平成 年 月 日

患者氏名（署名又は記名捺印）(印)

連絡先

生年月日 年 月 日

代諾者（患者の）後見人、配偶者、子（未成年を除く）、父母、兄弟姉妹の順に。（該当部分をまるで囲んでください）

代諾者（署名又は記名捺印）(印)

連絡先

患者様との関係

生年月日 年 月 日

立会人（署名又は記名捺印）(印)

連絡先

患者様との関係

平成 24 年 7 月 13 日

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
法律に基づき申請のあった第一種使用規程に係る意見について

遺伝子治療臨床研究に係る生物多様性
影響評価に関する作業委員会

委員長 小澤 敬也

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（平成 15 年法律第 97 号）に基づき申請のあった下記の遺伝子組換え生物等の第一種使用規程について、本作業委員会で検討を行い、その結果を別紙 1 のとおりとりまとめたので報告いたします。

なお、本作業委員会においては、とくにウイルスのモニタリングに関して慎重な審議が行われましたので、その概要を別紙 2 のとおり報告いたします。

記

1. ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス（Telomelysin）

申請者：岡山大学病院 病院長 槇野 博史

申請日：平成 23 年 11 月 14 日

【作業委員会の評価結果（岡山大学病院）】

1. ヒトアデノウイルス 5 型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)
第一種使用等の内容：治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
申請者：岡山大学病院 病院長 横野 博史
(1) 生物多様性影響評価の結果について ① 他の微生物を減少させる性質 申請されている第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしてもその量は極めて微量と考えられる。また、Telomelysin の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型ヒトアデノウイルス 5 型 (Ad5) と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。さらに、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しない。したがって、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin は環境中に拡散したとしてもやがて消滅すると考えられる。 また、Telomelysin の感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等であるため、Telomelysin は微生物には感染せず、また、競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、他の微生物を減少させる性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
② 病原性 Telomelysin の感染する動植物等の種類は野生型 Ad5 と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。また、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖せず、正常細胞での細胞障害性は乏しい。このため、Telomelysin が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、病原性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
③ 有害物質の産生性 Telomelysin の有害物質の産生性は知られておらず、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、有害物質の産生性に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
④ 核酸を水平伝達する性質 第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量と考えられる上、Telomelysin の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 と同等であり、自然界で感染する対象はヒトのみである。さらに、Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しない。 これらのことから、第一種使用規程に従った使用を行うかぎり、核酸を水平伝達する性質に起因する生物多様性影響が生じるおそれはないとした申請者の結論は妥当であると判断した。
(2) 生物多様性影響評価書を踏まえた結論 以上を踏まえ、Telomelysin を第一種使用規程に従って使用した場合に生物多様性影響が生じるおそれはないとした生物多様性影響評価書の結論は妥当であると判断した。

作業委員会における審議の概要
(ウイルスのモニタリングに関して)

(1) 審議の経緯

本作業委員会は、以下の会合を開催して審議を行った。

第1回：平成24年3月27日(火) 18:15～18:55

また、会合の前後においても、各委員より申請者に対して意見・照会事項を送付し、申請者よりそれに対する回答を得るなどした。

(2) 本作業委員会における意見

- 本件第一種使用規程の申請に係る遺伝子組換え生物 (Telomelysin) は、腫瘍選択的に増殖するウイルスである。

そのため、投与後腫瘍細胞内において増殖したウイルスが喀痰、尿中等に移行することにより、セカンドピーク (投与後いったん減少した喀痰、尿中等のウイルスが再び増加すること) が検出される可能性がある。

- このため、投与後の喀痰、尿中等のウイルスのモニタリングについては、セカンドピークを考慮した適切な手法 (期間、頻度) を検討する必要がある。

- もっとも、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とし、その場合であっても生物多様性影響が生ずるおそれがないことを確認して使用するものであるから、必ずしも厳格なモニタリングを行う必要はないとも考えられる。

しかしながら、第一種使用の場合であっても遺伝子組換え生物等の環境中への拡散はなるべく低減することが望ましいこと、また、Telomelysin の腫瘍選択的な増殖性を確認する上でもウイルスの体内動態データを収集することは意味があることから、一定のデータが蓄積されるまでの間は、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリングを行うことを検討すべきである。

- なお、上記のとおり、第一種使用は、遺伝子組換え生物等が環境中に拡散することを前提とした使用であるから、仮に上記の継続的なモニタリング中に喀痰、尿中等からウイルスが検出されたとしても、直ちに患者を個室管理に移す必要はないものと考えられる。

(3) 申請者の対応

- 上記の意見を受け、患者の個室管理について、第一種使用規程の見直しが行われた。なお、ウイルスの体内動態等の評価を目的とした継続的なモニタリングについては、すでに46日目までのモニタリングが計画されていることから、更なる期間の延長は行わないこととされた。

厚生科学審議会科学技術部会
 遺伝子治療臨床研究作業委員会に係る
 生物多様性影響評価に関する作業委員会 委員名簿

【岡山大学病院】

「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」

氏 名	所 属
○ いわさき かずひろ 岩崎 一弘	(独)国立環境研究所 主任研究員
おざわ けいや 小澤 敬也	自治医科大学 医学部教授
かんだ ただひと 神田 忠仁	(独)理化学研究所 新興・再興感染症研究ネットワーク推進センター 業務展開チーム チームリーダー
さいとう いずむ 斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
しまだ たかし 島田 隆	日本医科大学 医学部教授
はやかわ たかお 早川 義夫	近畿大学 薬学総合研究所所長
やまぐち てるひで 山口 照英	国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部研究員

○：委員長（五十音順 敬称略）



第一種使用規程承認申請書

平成 23 年 11 月 14 日

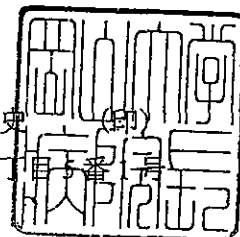
厚生労働大臣 殿

環境大臣 殿

申請者 氏名 岡山大学病院

病院長 榎野 博史 (印)

住所 岡山市北区鹿田町二丁目5番 青



第一種使用規程について承認を受けたいので、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第4条第2項の規程により、次のとおり申請します。

遺伝子組換え生物等の 種類の名称	ヒトアデノウイルス5型を基本骨格としてテロメラーゼ活性依存性に制限増殖する腫瘍融解ウイルス (Telomelysin)
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の内容	治療施設におけるヒトの治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為
遺伝子組換え生物等の 第一種使用等の方法	治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町2丁目5番1号 治療施設の名称 岡山大学病院 (1) Telomelysin 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。 (2) 凍結状態の Telomelysin 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビネット内で行う。Telomelysin 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Telomelysin 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (3) Telomelysin 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.18%若しくは 0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬（以下「消毒薬」という）又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、岡山大学病院で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。 (4) P2 実験室内の安全キャビネット内で Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Telomelysin 液」という）した後、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。 (5) 被験者に対する Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Teloemelysin 投与量は、低用量（1×10^{10} vp (viral particles)）、中用量（1×10^{11} vp）、高用量（1×10^{12} vp）の3群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 ヶ所に

注入するため、1箇所あたり0.2ml程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいはCTガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 >の腫瘍内5ヵ所（4分割した区域と中心部）に病変全体を3次的にカバーする様に直接注入する。Telomelysinの投与初日を第1日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第18日目、第32日目に同じ病変に投与を行い、計3回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には敷布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。

(6) 被験者へのTelomelysin投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、治療室又はCT室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室に移送する。

(7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又はCT室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気はHEPAフィルターを用いた換気により約5分に1回（1時間に12回）入れ替わる。

(8) 投与後48時間まで、被験者を個室内で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用によるウイルス漏出予防措置を義務付ける。

(9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、研究用検体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Telomelysin溶液の取扱いに準ずる。排泄物等が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不

	活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。 (11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の喀痰、唾液及び尿中の Telomelysin が陰性であることを確認する。Telomelysin が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。また排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。 (12) 個室における被験者の管理の解除後に、被験者の喀痰、唾液及び尿中から Telomelysin が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。 なお、必要と判断された場合は、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。
--	---

生物多様性影響評価書

(区分：遺伝子治療臨床研究)

I 宿主又は宿主の属する分類学上の種に関する情報

1 分類学上の位置付け及び自然環境における分布状況

ヒトアデノウイルスはアデノウイルス科マストアデノウイルス属に分類されている(文献 1、2)。これまでに分離されたウイルスは、中和抗体を誘導する抗原性の違いで 51 の血清型に分けられており(文献 1、2)、テロメラーゼ活性依存性に癌細胞で増殖して細胞死を誘導する腫瘍選択的融解ウイルス(Telomelysin)はヒトアデノウイルス 5 型(Ad5)を宿主として作製された。

Ad5 は 4 歳以下の乳幼児の多くに感染しており、咽頭及び糞便からウイルスが分離される(文献 2)。Ad1、2、5、6 に対する中和抗体保有率は 1~2 歳齢では 46.7~93.3%で、20 歳齢までに 100%に達している。(文献 3)。自然環境において、ヒト以外の動物での増殖は報告されていない。実験室内では、コトンラット及びニュージーランドウサギへの経鼻接種でウイルス増殖が報告されている(文献 1)。

文献 1 : Kaipe, D. M., Howley, P. M. ed.: Fields VIROLOGY fourth edition, pp.2265-2326, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001)

文献 2 : 畑中正一編: ウイルス学, pp.198-208, 朝倉書店, 東京 (1997)

文献 3 : 水田克巳など: 山形県衛生研究所報, 32: 5-7 (1999)

2 使用等の歴史及び現状

Ad5 を生ワクチン等に使用した報告はない。Ad5 に由来する組換えアデノウイルスが遺伝子治療で汎用されている(IV 章参照)。

3 生理・生態学的特性(文献 1、2)

(1) 基本的特性

ウイルスキャプシドは直径 80 nm の正二十面体で、エンベロープはない。ゲノムは約 36 kb の 2 本鎖 DNA である。

(2) 生育又は生育可能な環境の条件

ヒトに感染し、増殖する。培養細胞でも、ヒト由来の細胞でのみ効率よく増殖する。サル由来培養細胞で低レベルの増殖が起こる。経口感染することから推定されるように、室温で比較的安定である。

(3) 捕食性又は寄生性

自然界では、ヒトやコットンラット等でのみ増殖を伴う感染が起こる。

(4) 繁殖又は増殖の様式

Ad5 は、ヒトに経口感染し、増殖したウイルスは便と共に排泄される。

(5) 病原性

Ad5 の感染は不顕性に終わることが多いが、4 歳以下の乳幼児では急性熱性咽頭炎となる場合もある。いずれの場合も感染後に産生される中和抗体で再感染は阻止される。リンパ節に潜伏する例や小児の腸重積症に関わる可能性も指摘されている。

(6) 有害物質の産生性

Ad5 の感染で細胞内に産生される蛋白質等の毒性は報告されていない。

(7) その他の情報

物理的不活化法として Ad5 は 56℃、30 分の加熱で感染性を失う（文献 4）。また化学的不活化法として用いる消毒薬としては以下のものを含む：塩素系漂白剤（たとえば次亜塩素酸ナトリウム）、グルタールアルデヒドなど（文献 5）。特に次亜塩素酸ナトリウムはごく低濃度においても細菌に対して速効的な殺菌力を発揮し、またウイルスに対する効力の面でも最も信頼のおける消毒薬である。0.1%～1%の高濃度であれば結核菌を殺菌することもでき、この濃度においては高水準消毒薬に分類される（文献 6）。

文献 4 : Bardell, D.: J. Clin. Microbiol. 4: 322-325 (1976)

文献 5: APIC guidelines for infection control practice

(<http://www.phac-aspc.gc.ca/msds-ftss/msds3e-eng.php>)

文献 6: http://www.yoshida-pharm.com/text/05/5_2_3.html

II 遺伝子組換え生物等の調製等に関する情報

1 供与核酸に関する情報

(1) 構成及び構成要素の由来

Telomelysin (OBP-301)では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。

(2) 構成要素の機能

Telomelysin は、テロメラーゼ活性と非常によく相関する hTERT (human telomerase reverse

transcriptase) 遺伝子のプロモーター活性に依存して増殖し、癌細胞を選択的に破壊する。テロメラーゼは多くの癌細胞でその活性の上昇が認められているため、癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーター（別紙 1）が、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されており、hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現される。E1A タンパク質は、感染可能なウイルス産生に必要な遺伝子群の転写を活性化し、E1B タンパク質は、宿主細胞のタンパク質合成を阻害することで、ウイルスの複製を促進する。また、E1B の 55kDa タンパク質は、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することが明らかになっている。

2 ベクターに関する情報

(1) 名称及び由来

Telomelysin (OBP-301)組換えアデノウイルスは pGL3-Basic vector の hTERT-promoter を用いて作製される。pGL3-Basic vector から hTERT promoter を MluI+BglII により切り出し (455bp)、E1A-IRES-E1B の E1A 上流にある XhoI site に順方向に挿入、hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)を作成する。最終的に、Adeno-X Viral DNA に pSh-hAIB を組み込み、組み換えアデノウイルスを作成した。（別紙 3）

(2) 特性

Adeno-X Viral DNA はアンピシリン耐性遺伝子を有する。

3 遺伝子組換え生物等の調製方法

(1) 宿主内に移入された核酸全体の構成

Telomelysin (OBP-301)では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されている。（別紙 2）。

(2) 宿主内に移入された核酸の移入方法（別紙 3 の各図を参照）

pSh-hAIB の作製法を以下に示す。

① E1A遺伝子を、RT-PCRにて増幅した。プライマーは、

E1A-S ; aca ccg gga ctg aaa atg ag、E1A-AS ; cag agg ttt ac acct tat ggcを用いた。また、E1B遺伝子を、ゲノムDNAのPCRにて増幅した。プライマーは、E1B-S ; ctg acc tca tgg agg ctt gg、E1B-AS ; gcc cag aca ttt cag tac ctcを用いた。それぞれ、PCR productのTA cloning (TA Cloning Kit Dual Promoter ; Invitrogen) (Fig1) を使い、シークエンスを確認した後、EcoRIによりそれぞれ911bp、1836bpのfragmentを切り出した。

- ② E1AをpIRES(CLONTEC)(Fig.2)のMCS-AのMluI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ③ E1BをE1A-IRESのMCS-BのSalI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ④ hTERT promoter(Fig.3)をMluI+BglIIにより切り出し (455bp)、E1A-IRES-E1BのE1A上流にあるXhoI siteに順方向に挿入した (blunt end ligation)。
- ⑤ hTERT promoter-E1A-IRES-E1B(hAIB)をNheI+NotIにより切り出し (3828bp)、MfeI+NheI digestionによりCMV promoterを除去したpShuttle vector(Fig.4a)に順方向に挿入した(pSh-hAIB) (Fig.4b)。
- ⑥ I-CeuI+P1-SceIにより4381bpのpSh-hAIB断片を切り出し、Adeno-X Viral DNA(Fig.5)に挿入した (AdenoX-hAIB)。
- ⑦ Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従って、hAIBを持つ組み換えアデノウイルスを作製した。

(3) 遺伝子組換え生物等の育成の経過

作製した Telomescan は Adeno-X Expression System(CLONTECH)(Fig.6)のマニュアルに従い、293 細胞を使って増殖させた。Telomelysin は、岡山大学で開発された国産の抗がんウイルス製剤であり、岡山大学発バイオベンチャー オンコリスバイオファーマ (株)によって臨床開発が進められている。本臨床研究では、米国で行われた各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験のために、オンコリスバイオファーマ (株)が Introgen Therapeutics 社にて製造した Telomelysin の臨床ロットを輸入して使用する。凍結した状態で日本へ輸送した最終製品は、岡山大学病院遺伝子・細胞治療センター (P2 レベル) において保存される。

具体的には、最終製品は岡山大学病院中央診療棟 5 階遺伝子・細胞治療センターのベクター保存室内のディープフリーザーに施設の上、保管される (当該治療施設の地図及び保管場所の概略図は別紙 4)。

4 移入した核酸の存在状態及び当該核酸による形質発現の安定性

移入した核酸は Telomelysin の 2 本鎖 DNA ゲノムの一部として存在し、保管中は極めて安定で、感染する動植物等の種類及び感染様式が保管中に変化することはない。細胞に感染すると、Telomelysin のゲノムは核内の染色体外に存在し、テロメラーゼ活性と非常によく相関する hTERT (human telomerase reverse transcriptase) 遺伝子のプロモーター活性に依存して増殖する。

5 遺伝子組換え生物等の検出及び識別の方法並びにそれらの感度及び信頼性

Telomelysin の検出は、定期的に唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する E1A あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いて定

量的 PCR を行う。これらのプライマーにより、血漿中の Telomelysin を定量可能であることが確認されており、検出感度はそれぞれ 1×10^2 PFU/ml、 1×10^3 PFU/ml であった（文献 7）。また、米国での臨床試験において、唾液、喀痰、血液、尿中の Telomelysin 検出にも使用可能であることを確認しており（文献 8）、これらのプライマーを用いた定量的 PCR は十分信頼できるといえる。

文献 7: Hashimoto, Y. *et al.*: Cancer Science, pp.385-390, WILEY-BLACKWELL, Malden (2008)

文献 8: Nemunaitis, J. *et al.*: Molecular Therapy, pp.429-434, Nature Publishing Group, New York (2010)

6 宿主又は宿主の属する分類学上の種との相違

Telomelysin は特別な治療遺伝子を持たず、外来性の塩基配列として hTERT プロモーターが挿入されている点が野生型アデノウイルスの配列との大きな違いである。Telomelysin では、内因性の E1A プロモーターの代わりに hTERT プロモーターが、また内因性の E1B プロモーターの代わりに IRES 配列が挿入されている。癌細胞では hTERT 遺伝子の発現制御を行っている hTERT プロモーターのスイッチがオンになると考えられる。hTERT プロモーター依存性に E1A 及び E1B 遺伝子が発現され、ウイルスが増殖する。これらの点を除くと、Telomelysin の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

III 遺伝子組換え生物等の使用等に関する情報

1 使用等の内容

治療施設におけるヒト遺伝子治療を目的とした使用、保管、運搬及び廃棄並びにこれらに付随する行為。

2 使用等の方法

治療施設の所在地 岡山県岡山市北区鹿田町二丁目 5 番 1 号

治療施設の名称 岡山大学病院

(1) Telomelysin 溶液は、容器に密封後、凍結状態で治療施設に輸送し、施設内の P2 レベルの実験室（以下「P2 実験室」という。）内の冷凍庫に保管する。

(2) 凍結状態の Telomelysin 溶液の融解、希釈及び分注操作は、P2 実験室内の安全キャビ

- ネット内で行う。Telomelysin 希釈溶液の保管は、P2 実験室内の冷凍庫において行う。なお、Telomelysin 希釈溶液又はその凍結品を開放系区域を通して他の P2 レベル区域に運搬する必要がある場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。
- (3) Telomelysin 溶液（希釈溶液を含む。）を廃棄する際には、ウイルス不活化（0.18%若しくは 0.24%次亜塩素酸ナトリウム溶液による消毒薬（以下「消毒薬」という）又は高圧蒸気滅菌処理による。以下同じ。）を行った後、岡山大学病院で定められている医療廃棄物管理規程（以下「医療廃棄物管理規程」という。）に従い廃棄する。
- (4) P2 実験室内の安全キャビネット内で Telomelysin 溶液を緩衝液で希釈し所定の投与量に調整（以下「Telomelysin 液」という）した後、二重に密閉し、環境中への拡散防止措置を適切に執った治療室（以下「治療室」という。）又は放射線部コンピュータ断層撮影装置室（以下「CT 室」という。）に直ちに運搬し、専用の注入用穿刺針、注射器及びチューブからなるデバイス（以下「注入セット」という。）に充填する。
- (5) 被験者に対する Telomelysin の投与は、外科的切除により根治不能な局所的に進行した、あるいは外科的切除後に再発し、追加切除が困難と考えられる頭頸部・胸部悪性腫瘍症例を対象とする。各患者に対する Telomelysin 投与量は、低用量（ 1×10^{10} vp）、中用量（ 1×10^{11} vp）、高用量（ 1×10^{12} vp）の 3 群で、投与ウイルス液量は 1 ml とする。腫瘍内 5 カ所に注入するため、1 箇所あたり 0.2ml 程度ずつ注入することになる。局所麻酔下、咽頭麻酔下、あるいは全身麻酔下に、細い注射針を装着した注射器、内視鏡の生検鉗子孔を通した穿刺吸引針、あるいは CT ガイド下や超音波ガイド下穿刺用の穿刺針を用いて、面積が 1 cm^2 <かつ 25 cm^2 > の腫瘍内 5 カ所（4 分割した区域と中心部）に病変全体を 3 次元的にカバーする様に直接注入する。Telomelysin の投与初日を第 1 日目とし、重篤な副作用を認めない場合は第 18 日目、第 32 日目に同じ病変に投与を行い、計 3 回の治療を実施する。注入針の抜去は慎重に行い、Telomelysin 液の漏出及びエアロゾル化を防止する。注入部位の周辺には敷布（滅菌された不織布）を二重に敷き詰める。
- (6) 被験者への Telomelysin 投与終了後、被験者の創部を消毒する。ウイルス漏出予防のためにマスク及びガウンを着用した被験者を、治療室又は CT 室から、環境中への拡散防止措置を適切に執った陽圧でない個室（以下「個室」という。）に移送する。
- (7) 上記(5)及び(6)で用いた注入セット等の器具並びに布及びガーゼ類は、ウイルス不活化を行い、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。また、穿刺用ガイド装置等は、ウイルス不活化を行い、再利用する。これらのウイルス不活化を治療室又は CT 室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。治療後の当該治療室は床を消毒液で掃き清掃する。なお、治療室内の空気は HEPA フィルターを用いた換気により約 5 分に 1 回（1 時間に 12 回）入れ替わる。
- (8) 投与後 48 時間まで、被験者を個室で管理する。検査等の理由で被験者が一時的に個室から外の開放系区域に出る場合には、採血や排泄等を最小限に留め、マスク及びガウン着用によるウイルス漏出予防措置を義務付ける。
- (9) 個室における管理期間中の被験者の排泄物（血液、体液、尿及び糞便等）は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。なお、研究用検

体として使用する被験者の排泄物等の取扱いは、Telomelysin 溶液の取扱いに準ずる。
排泄物等が床等に落下した場合は床を消毒液で掃き清掃する。

(10) 個室における管理期間中、被験者に対して侵襲的に使用した器具等及び被験者の排泄物等に接触した器具等は、ウイルス不活化を行った後、医療廃棄物管理規程に従い廃棄又は十分洗浄する。ウイルス不活化を個室以外の区域で行う場合には、二重に密閉した容器に入れて運搬する。

(11) 個室における被験者の管理を解除する前に、被験者の喀痰、唾液及び尿中の Telomelysin が陰性であることを確認する。Telomelysin が確認されたときは、個室における被験者の管理を継続する。また排泄物等の床等への落下の有無にかかわらず、個室における管理終了後は床を消毒液で掃き清掃する。

(12) 個室における被験者の管理の解除後に、被験者の喀痰、唾液及び尿中から Telomelysin が検出された場合には、被験者を個室における管理下に移す必要性について検討する。

なお、必要と判断された場合は、上記(8)から(11)までと同様の措置を執る。

3 承認を受けようとする者による第一種使用等の開始後における情報収集の方法

対外へのウイルス排出の有無は、唾液、喀痰、血液、尿を採取し、DNA サンプルより Telomelysin を特異的に検出する EIA あるいは IRES 配列に対するプライマーを用いての PCR で検出を行う。血液によるウイルス DNA 検査は投与後 1、4、11、18、32 日目、退院時、退院 1 カ月後に行う。唾液、喀痰、尿によるウイルス DNA 検査は投与後 1 日目と退院時に行う。

4 生物多様性影響が生じるおそれのある場合における生物多様性影響を防止するための措置

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 EIA および EIB 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス (Replication competent adenovirus, RCA) であるため、RCA 量を制限する評価基準の適応とはならない。

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。Telomelysin を低用量あるいは中用量投与された被験者は、投与後 48 時間まで個室管理される。高用量投与された被験者は、投与後喀痰中のウイルス DNA の陰性が確認されるまで個室管理される。喀痰検査は投与後 1 日目に行い、ウイルス DNA が検出された場合はさらに 48 時間おきに再検査を行い、陰性を確認する。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

5 実験室等での使用又は第一種使用等が予定されている環境と類似の環境での使用等の結果

1) Telomelysin の前臨床研究

Telomelysin を癌細胞に感染させると、E1A、E1B mRNA、および E1A タンパク質の発現がみられたが、正常細胞ではそれらの発現は抑制されていた。また、Telomelysin は、癌細胞では 3 日以内に 10^5 - 10^6 倍に増殖したが、正常細胞では 100-1000 倍にとどまり、正常細胞では癌細胞に比べてその増殖が 10^3 - 10^4 分の 1 に抑えられることが明らかになった。肺癌、大腸癌、胃癌、食道癌、頭頸部癌、乳癌、肝癌、膵癌、前立腺癌、子宮頸癌、卵巣癌、など様々な臓器由来のヒト悪性腫瘍細胞株を用いて Telomelysin の容量依存性の抗腫瘍活性を測定し、ID50 (50%の標的癌細胞を殺すことのできるウイルス濃度) を算出したところ、ほとんどの細胞株で 20 MOI (PFU/cell) 以下であり、Telomelysin は広範な抗腫瘍活性を有していた。

2) Telomelysin の正常細胞での細胞障害性

ヒト正常線維芽細胞に対しては、Telomelysin は明らかな細胞障害活性を認めなかった。また、ヒト正常肝細胞、ヒト正常腎上皮細胞、ヒト正常気道上皮細胞では、野生型アデノウイルスに比べて低い細胞障害活性を示した。

3) 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本研究のプロトコールでは Telomelysin は病巣に直接局所注入されるが、コットラットでの定量的 PCR による Telomelysin の体内分布解析において、筋肉内投与あるいは静脈内投与後 8 日目において血液中ならびに測定した組織中で検出可能であった。また、ヌードマウスの背部皮下に移植したヒト腫瘍内に Telomelysin を投与すると、投与部位でのウイルス DNA は極めて高値であったが、投与後 70 日目のその他の組織でもウイルス DNA は検出可能であった。すなわち、投与部位で増殖した Telomelysin が全身循環に入ったものと推測されるが、抗 E1A 抗体を用いた各組織の免疫組織染色では投与部位以外の正常組織は染色されず、投与部位以外の正常組織ではウイルス増殖は認められないことが確認された。

4) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い、患者の家族や医療従事者への感染を防止するために、治療中はマスクや予防衣の着用など注意を払う。現在、米国で実施されている Telomelysin の臨床試験においては、外来患者としてウイルスを投与された後、患者は帰宅することが可能である。これは、高濃度のウイルスを取り扱う投与時は他の患者や医療関係者への感染の危険性を極力回避する処置が取られているが、投与された後、患者から感染性のあるウイルスが排泄される可能性が極めて低いと考えられているからである。

5) 動物実験でのウイルスの体内での増殖や体内分布、排出について

Telomelysin ウイルスの体内での増殖や体内分布は、ヒト腫瘍細胞を皮下移植した担

癌ヌードマウスに Telomelysin を腫瘍内投与する単回投与毒性試験（試験番号：FXT00022）と、アデノウイルスに感受性のあるコottonラットに Telomelysin を筋肉内投与する単回投与毒性試験（試験番号：FXT00014）において正常細胞・組織でのウイルス DNA 分布と拡散を検討した。Telomelysin ウイルス由来の DNA 塩基配列の体内分布及びウイルス残存量は、qPCR 解析により評価した。

<体内分布について>

担癌ヌードマウスに Telomelysin を腫瘍内投与した場合、投与 28 日後および投与 70 日後ともに、最も高い濃度のウイルス DNA が検出されたのは、Telomelysin 投与部位であった。次いで、血中、腋窩リンパ節、脳、心臓で Telomelysin のウイルス DNA が検出可能であった。一部のマウスで肺、卵巣、子宮、腎臓、膀胱、大腸への分布が検出されたが、ほとんどのマウスが検出限界以下であった。一方、コottonラットに筋肉内投与した場合、最も高いウイルス DNA 分布が認められたのは、投与部位で、Telomelysin 投与 5 日後に検出上限を超える濃度 ($> 5,000,000$ VP/ μ g) が検出されたが、投与 85 日後の測定まで急速に低下した ($29,167 \pm 21,904$ VP/ μ g)。投与部位以外では、投与後 5 日目に 1000 VP/ μ g 以上のウイルス DNA が大腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、骨髄で検出されたが、その後時間の経過とともに低下し、たとえば大腸、肝臓、肺、リンパ節、脾臓などでは投与後 14 日で 5-10 分の 1 程度に減少した。脳および膀胱では最も低い濃度であった。血中においてもウイルス DNA は、投与 5、14 ならびに 28 日後に検出されたが、1000 VP/ μ g 以下であり、また時間経過とともに減少し、85 日後には、検出限界以下となった。投与 85 日後までウイルス DNA が残存した組織検体での Telomelysin の増殖が起きていたかを検討するため、免疫染色により EIA 発現を分析したところ、投与 5 日後の投与部位及び肝臓のみで陽性を示し、85 日後では、陽性検体は認められなかった。

以上の所見から、テロメラインを腫瘍内に局所投与した場合、低用量でも腫瘍内での薬物濃度は長期間保持され、一方、血中へ漏出して他の非腫瘍組織に分布されても増殖はみられず、時間とともに減衰し全身的なウイルス暴露は少ないことが示唆された。

6 国外における使用等により得られた情報

5) 米国での Telomelysin の第 I 相臨床試験

米国にて各種進行固形癌を対象とした Telomelysin の第 I 相臨床試験が行われ、腫瘍内単回投与を受けた 16 例の進行固形癌患者では、初期 3 例は 10^{10} vp、次の 3 例目は 10^{11} vp が投与され、最高容量 10^{12} vp は 10 例に投与されている。投与部位の疼痛や硬結などの局所反応と発熱などの全身症状はみられたが、重篤な有害事象はなく、安全に投与可能であった。

Telomelysin 投与後の血液、唾液、喀痰、尿中のウイルス DNA の検出を行った際に、低用量 (10^{10} VP) 投与した場合、投与後 24 時間以内に血中のウイルス DNA を検出した。中用量 (10^{11} VP) あるいは高用量 (10^{12} VP) 投与した場合、投与後 24 時間以内と、投与後 7 日目から 28 日目までに血中のウイルス DNA を検出した。喀痰でのウイルス DNA

は高用量のみで検出され、唾液や尿中でのウイルス DNA は検出されなかった。

Telomelysin を高容量で投与した場合、単回投与 10 例中 3 例 (30%) と複数回投与 6 例中 2 例 (33%) と同程度に投与後 24 時間以内と 7 日目以降に血中のウイルス DNA を検出したことから、単回投与と複数回投与でのウイルス排出に大きな変化はないと思われる。

放射線治療を併用した場合、腫瘍細胞の細胞死が増強し、腫瘍細胞内に存在する Telomelysin が血液中に多く漏出する可能性がある。しかし、血中に多く存在する抗アデノウイルス抗体によって中和される可能性が高く、複数回投与の場合と同様にウイルス排出に大きな変化はないと思われる。

IV 生物多様性影響評価

1 他の微生物を減少させる性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Telomelysin の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、微生物に感染せず、また、競合、有害物質の産生により他の微生物を減少させることはないと考えられる。よって、影響を受ける可能性のある微生物は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

(該当せず。)

(3) 影響の生じやすさの評価

(該当せず。)

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、他の微生物を減少させる性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

2 病原性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Telomelysin の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである (文献 1、2)。

(2) 影響の具体的内容の評価

Telomelysin の患者以外の人への感染の可能性は極めて低い。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。さらに、Telomelysin が効率よく感染する対象はヒトに限られること（文献 1、2）Telomelysin の正常細胞での細胞障害性は乏しいことを踏まえると、Telomelysin が被験者以外のヒトに対して病原性を示す可能性は極めて少ないと考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、病原性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

3 有害物質の産生性

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Telomelysin の有害物質の産生性は知られておらず、影響を受ける可能性のある野生動植物等は特定されなかった。

(2) 影響の具体的内容の評価

（該当せず。）

(3) 影響の生じやすさの評価

（該当せず。）

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、有害物質の産生性について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

4 核酸を水平伝達する性質

(1) 影響を受ける可能性のある野生動植物等の特定

Telomelysin の感染性は野生型 Ad5 と同一と考えられるので、自然界で感染する対象はヒトのみである（文献 1、2）。

(2) 影響の具体的内容の評価

Telomelysin の核酸を水平伝達する性質は野生型 Ad5 と同等である。

(3) 影響の生じやすさの評価

第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極めて微量である。Telomelysin が効率よく感染する対象はヒトに限られること（文献 1、2）及び正常細胞内での増殖能は乏しいことも踏まえると、Telomelysin はやがて環境中から消滅すると考えられる。

(4) 生物多様性影響が生ずるおそれの有無等の判断

よって、核酸を水平伝達する性質について、第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

5 その他の性質

なし。

V 総合的評価

本研究に用いる Telomelysin は、遺伝子治療用の組換えアデノウイルスと異なり、本来 E1A および E1B 遺伝子を含んだ増殖性ウイルス（Replication competent adenovirus, RCA）である。Telomelysin は、腫瘍細胞内にて選択的に増殖するウイルスであり、正常細胞では増殖しないウイルスである。Telomelysin の感染する動植物等の種類、感染経路、伝搬様式等は野生型 Ad5 とまったく同等である。すなわち、ヒト及び他の哺乳動物、植物並びに微生物に新たな影響を与えることはないと考えられる。第一種使用規程承認申請書に記載した遺伝子組換え生物等の第一種使用等の方法によるかぎり、Telomelysin の環境中への拡散は極力抑えられており、拡散したとしても、その量は検出レベル以下であると推定される。Telomelysin 使用により生物多様性影響が生ずるおそれはないと判断される。

別紙 1：hTERT promoter の構造

別紙 2：Telomelysin (OBP-301)組換えアデノウイルス

別紙 3：Telomelysin (OBP-301)の作成方法

別紙 4：治療施設の地図及び保管場所の概略図