

遺伝子治療臨床研究実施計画について

【 千葉大学医学部附属病院 】

課題名 : 切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型
アデノウイルスベクターによる臨床研究

遺伝子治療臨床研究実施計画に係る意見について

- 審査委員会の意見 P. 1
- 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会 名簿 P. 9
- 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書 及び概要書 P. 11
- 実施計画書 P. 19
- 説明同意文書 P. 87

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

- 審査委員会の意見 P. 121
- 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会 名簿 P. 123
- 第一種使用規程承認申請書 P. 125
- 生物多様性影響評価書 P. 129

平成 25 年 7 月 12 日

千葉大学医学部附属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に関する審査委員会
委員長 山口 照英

千葉大学医学部附属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、本審査委員会^{注)}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. 切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウ
イルスベクターによる臨床研究
申請者：千葉大学医学部附属病院 病院長 宮崎 勝
申請日：平成 23 年 10 月 27 日

注) 本審査委員会は、前身となる「遺伝子治療臨床研究作業委員会」及び「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」を平成 25 年 4 月に統合して設置された。

その際、前身の各委員会において審議中であった事項については本審査委員会が審議を引き継ぐこととされ、本臨床研究についても前身の「遺伝子治療臨床研究作業委員会」から本審査委員会に審議が引き継がれたものである。

別紙では、本審査委員会と「遺伝子治療臨床研究作業委員会」を特に区別せず、「審査委員会」と記載している。

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画の概要

(1) 研究課題名: 切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究

(2) 申請年月日: 平成 23 年 10 月 27 日

(3) 実施施設: 千葉大学医学部附属病院
代表者: 病院長 宮崎 勝

(4) 総括責任者: 千葉大学大学院医学研究院
呼吸器内科学 教授 巽 浩一郎

(5) 対象疾患: 悪性胸膜中皮腫
導入遺伝子: NK4 遺伝子
ベクターの種類: アデノウイルスベクター
用法・用量: 穿刺針を用いて被験者の胸腔内の腫瘍に近い部位に、ウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を含む調製液を生理食塩水 100ml に混和し 1 回投与する。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 群とする。

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: 9 例 (低用量 3 例、中用量 3 例、高用量 3 例)

(6) 研究の概略:

本研究は、切除不能で化学療法無効あるいは化学療法拒否の悪性胸膜中皮腫の症例を対象として、NK4 遺伝子 (NK4 は、悪性胸膜中皮腫の進展に関与している HGF/c-Met のシグナル伝達や血管新生を阻害する。) を搭載したアデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を胸腔内投与する遺伝子治療臨床研究であり、当該遺伝子治療の安全性を検討することを主たる目的とする。

(7) その他 (外国での状況等):

国内外において、NK4 遺伝子を治療に用いた臨床試験の例はない。

ただし、米国では、他のアデノウイルスベクター (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子、インターフェロン・アルファ 2b 遺伝子、またはインターフェロン・ベータ遺伝子を搭載したもの。) を胸腔内投与する遺伝子治療 (第 I 相試験またはパイロット試験) が複数実施され、それらの結果が 2005 年から 2011 年にかけて報告されている。当該試験においては、悪性胸膜中皮腫の症例が合計 61 例含まれており、主な有害事象として、一部の被験者において、部分トロンボ

プラスチン時間の延長（但し肺がん患者）、心タンポナーデ（同）、リンパ球減少等が報告されている。

2. 遺伝子治療臨床研究に関する審査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

審査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1月27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、平成24年2月29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。

(審査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. NK4 遺伝子を治療に用いる臨床研究はこれまでにないとのことであるが、NK4 タンパク質を投与する臨床研究の有無についても示すこと。

【回答】NK4タンパク質を投与する臨床試験・臨床研究は実施されていない。なお、マウスにNK4タンパク質を投与した実験結果は報告されているが、NK4タンパク質の投与によるマウスの特段の変化や有害事象は見られていない。

イ. 実施計画書では増殖性アデノウイルス（RCA）の発生が起これないとされているが、非相同組換えにより RCA が出現することが報告されているため、記載を修正すること。また、本研究では RCA 混入試験の実施が必須であり、試験を実施していればその結果を示すこと。

【回答】低い頻度ではあるものの RCA が生じる可能性があるため、実施計画書を修正した（実施計画書 30、35 ページ）。RCA 混入試験の結果から、検出限界を考慮して RCA の混入割合は 3×10^8 vp 中 1 個未満と考えられる。

ウ. 本研究に用いる製剤（ウイルス液）は 2006～2007 年頃に作成されているようであるが、安定性の観点から、これまでの保存状態や一部解凍した際のウイルスベクターとしての機能性について検討すること。

【回答】保存してある当該ウイルスについて、一部を解凍しその活性を検討したところ、ウイルス力価は 2007 年時点と大差ないことを確認した。

エ. マウスの実験において精巣組織にNK4の発現が認められていることに関し、ベクターの水平伝播の可能性について考察すること。

【回答】マウスの実験結果からは、本アデノウイルスベクター（Ad5CMV-NK4）投与によるNK4の発現レベルは、内因性の発現レベル（ベクターを投与していない対照群においてもNK4 mRNAが発現している。）と比べても低いこと等から、精巣にウイルスDNAが移行する可能性は高くなく、感染レベルも低

いと考えられる。また、アデノウイルスは染色体に取り込まれる確率は極めて低く、水平伝播の可能性は低い。さらに、本研究における被験者の選択基準として、コンドーム使用等の適切な避妊を行うことを含めている。これらことから、水平伝播、配偶者への感染の可能性は極めて低いと考えられる。

オ. マウスの実験において組織的に肝障害は見られなかったとのことであるが、肝臓の逸脱酵素等の動きについて示すこと。

【回答】肝臓の逸脱酵素の測定は行っておらず、また血清の保存はしていない。

注) この点につき、下記2) ②イ. の指摘事項及びそれに対する回答も参照のこと。

カ. 本研究への参加により、治療前後の2ヶ月程度の期間は抗がん剤が使用できなくなるが、被験者の病状の進行を考えたときに大きな問題とならないか。

【回答】本研究における被験者の選択基準は、切除不能症例あるいは手術拒否例で、かつ、第一選択薬に治療効果を示さなかった、あるいは化学療法を拒否した症例である。そして、化学療法不応症例に対する第二選択薬はなく、当該症例に対しては、エビデンスがない他の薬剤を使用するか、ベストケアサポートに移行することになる。したがって、治療面で有用な方法がない現状では、2ヶ月間エビデンスのない抗がん剤を使用せずとも病状の進行、予後にほとんど影響はないと考えられる。なお、胸水の再貯留などの場合は、その状況等に応じて適切な処置を講じる。

キ. 本アデノウイルスベクターの投与は1回に限定されているが、安全性や治療効果の判定次第では継続投与の可能性を残しておくべきとも考えられる。再投与を実施しない理由を示すこと。

【回答】再投与を実施しないのは、アデノウイルス投与後に生じる抗体が、第2回目以降のアデノウイルス投与後の効果を妨げるおそれがあり、その場合の結果の評価が難しくなると考えられるためである。仮に、本研究の結果が良好であれば、次の機会に別途プロトコールを策定し、再投与について考慮したい。

ク. 被験者の除外基準として「アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療歴がある場合」を含めた理由を説明すること。

【回答】一度アデノウイルスベクターの投与を受けた場合、抗アデノウイルス抗体が産生されている場合があり、本研究のアデノウイルスベクターの投与によって二次免疫応答が生じる場合がある。上記キ. の回答で述べたように、そのような症例が含まれた場合は研究結果に影響を与えるおそれがあるため、除外基準に含めたものである。

ケ. 患者のフォローアップが1年間とされているが、患者が生存している範囲でより長期にインタビュー等のフォローアップをする必要はないか。

【回答】化学療法不応症例が主な対象患者となるため、多くの場合1年間のフォローアップで十分と考えられるが、それを越えてより長期生存が観察される場合は、患者の状態（生存/死亡）や受けた治療等の医療情報について調査することとしている。

コ. 利益相反の有無について、実施計画書及び説明同意文書に記載すること。

【回答】当該項目について、実施計画書及び説明同意文書に記載した（実施計画書 59 ページ、説明同意文書 26 ページ）。

2) 審査委員会における審議

① 開催日時：平成24年3月27日(火) 13:00~17:15

② 議事概要：

平成23年10月27日付けで千葉大学医学部附属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：悪性胸膜中皮腫）についての審議を行った。

まず、実施計画について総括責任者等より説明を受けた後、委員間で実施計画の妥当性等について審議が行われた。その結果、遺伝子を搭載したベクターの安全性に関する評価、患者説明文書に研究状況等を適切に記載すること等に関する各委員の意見について、事務局で整理し、申請者に検討を依頼することとされた。

なお、指摘事項は平成24年4月23日に発出され、申請者より、同5月11日に回答が提出された。さらに、申請者からの回答に対する指摘事項が同6月6日（同6月18日回答）、同7月11日（同10月30日及び11月13日回答）、同11月26日（平成25年3月20日及び4月4日回答）に発出され、申請者よりそれぞれ回答が提出された。これらを踏まえた実施計画書等の整備については、平成25年6月27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。

(審査委員会の主な指摘事項及びそれに対する回答)

ア. RCA に関する検査結果に関して、RCA の有無を適切に評価できるよう当該検査の検出限界を明確にすること。

【回答】検出限界を明確にした検査方法において再度検査を行った結果、本アデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) 中の RCA は 3×10^{10} vp に1個以下であると判定された。

イ. 本アデノウイルスベクターの安全性に関して、胸腔内への投与によるベクター及び NK4 の生体内分布及び安全性（肝機能への影響等を含む。）について、前臨床研究の結果を整理して考察すること。

【回答】本アデノウイルスベクターの胸腔内投与に関して、適切な研究成果・論文がないことから、ベクター及び NK4 の生体内分布及び安全性について、マウスを用いた実験により検討を行った。

マウスの胸腔内または静脈内に高用量（体重換算でヒト臨床投与量の 380 倍）の本アデノウイルスベクターを単回投与する実験を行ったところ、血清中 AST・ALT の上昇や肝臓における軽度の肝細胞の変性と炎症性細胞浸潤が認められた。そして、肝機能障害については、胸腔内投与では、静脈内投与に比較して軽微であるものの、遷延化の可能性があると考えられた（胸腔内投与後 71 日目においても、一部のマウスを除いて、血清中 AST・ALT が正常値まで低下しなかった。）。

また、生体内分布については、胸腔内投与では、静脈内投与に比較して肺にアデノウイルスがより多く取り込まれるが、その一部が血行性にその他の臓器に移行するものと想定された（胸腔内投与では、投与後より肺に多くウイルスが検出されるが、時間経過とともに肺からは急速にウイルスが消失し、その後は脾臓、肝臓等に比較的多く検出された。）。

以上より、臨床研究においては急性期の肝機能障害及び肝機能障害の遷延化の可能性に注意する必要がある、これらについて説明同意文書に記載した（説明同意文書 17、20 ページ）。ただし、本研究におけるヒトへの投与量は上記実験における投与量の 380 分の 1 であることや、アデノウイルスベクターを胸腔内投与した米国の臨床試験の結果からすれば、肝機能障害があっても比較的軽度であると想定される。

ウ. ヒトの胸腔内へアデノウイルスベクター（本研究とは異なる遺伝子を搭載したもの）を投与した試験に関する最新の論文（Mol Ther. 2010/Am J Respir Crit Care Med. 2011.）について、安全性の観点から言及すること。

【回答】当該論文に関する情報を実施計画書に追加記載した（実施計画書 39、40、51 ページ）。

また、当該論文においては、1 例の心タンポナーデの症例が観察され、著者らはアデノウイルス投与後の腫瘍に対する炎症あるいは非特異的な炎症がその原因であると推定し、心嚢液を有する患者を除外基準に含めることとしたことが報告されている。このため、本研究においても、除外基準に心嚢液貯留症例を追加した（実施計画書 3、41 ページ、説明同意文書 10 ページ）。

エ. 説明同意文書に以下の点を記載すること。特に本研究は First in Human 試験であること（ヒトへの安全性は未確認であること）から、被験者に対するより慎重な対応として、そのことの危険性を含めた事実を十分に説明することが必要である。

- ① 投与方法（アデノウイルスベクターの胸腔内投与）が特殊であることを含めて本研究は研究途上の段階であること。
- ② 本研究で用いるベクターが GMJ というベンチャー企業で作られた日本初のアデノウイルスベクターであること。
- ③ 動物実験における有効性と安全性に関する結果や、最新の臨床研究で明らかになったアデノウイルスベクターの胸腔内投与による有害事象（心タンポナーデ等）。

【回答】「First in Human 試験であることの危険性」を含め、指摘された事項について説明同意文書に記載した（説明同意文書 5、7、8、16、17 ないし 20 ページ）。

オ. 有害事象が生じた場合の対応について、本研究が First in Human 試験であることを踏まえ、有害事象の報告期限等を含めたより詳細な内容を記載すること。

【回答】有害事象が生じた場合の具体的な報告手順や報告期限（例：24 時間以内に病院長へ第一報を報告）等について、実施計画書に記載した（実施計画書 52 ページ）。

カ. 遺伝子治療臨床研究審査委員会等の構成について、研究の透明性と客観性を確保する観点からは、「院内委員」と「院外委員」という区別ではなく、大学に所属せず大学と利害関係を持っていない委員を「外部委員」とした上で、委員会は複数の外部委員を含むように構成すること。また、委員会の規程においてその点を明確にすることを検討すべき。

【回答】当該審査委員会には現在複数の外部委員が含まれているが、「院内委員」と「院外委員」との区分は今後用いず、外部委員であることが明確に判るようにする。また、規程についても改訂作業を進める。

3. 遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の検討結果

千葉大学医学部附属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：悪性胸膜中皮腫）に関して、遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会は、主として科学的観点から以上の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、本審査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に関する審査委員会 委員名簿

(平成25年4月1日以降)

氏名	所属
荒戸 照世	北海道大学大学院 医学研究科教授
岩崎 一弘	内閣府 政策統括官付参事官
大橋 十也	東京慈恵会医科大学 DNA医学研究所教授
小野寺 雅史	国立成育医療研究センター研究所 成育遺伝研究部長
神田 忠仁	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
久米 晃啓	自治医科大学 医学部遺伝子治療研究部准教授
斎藤 泉	東京大学医科学研究所 遺伝子解析施設教授
竹内 隆正	国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 主任研究官
谷 憲三朗	九州大学生体防御医学研究所 所長
中西 真人	産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター 副研究センター長
那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
三宅 弘一	日本医科大学 医学部准教授
○ 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

なかの たかし 中野 孝司	兵庫医科大学 内科学呼吸器・RCU科主任教授
------------------	------------------------

○：委員長（五十音順 敬称略）

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

【 千葉大学医学部附属病院 】

「切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究」

(平成25年3月31日以前)

氏名	所属
あらと 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 であら まさゆみ 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
なす やすとも 那須 保友	岡山大学病院 新医療研究開発センター教授
みずぐち ひろゆき 水口 裕之	大阪大学大学院 薬学研究科分子生物学分野教授
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

なかの たかし 中野 孝司	兵庫医科大学 内科学呼吸器・RCU科主任教授
------------------	------------------------

○：委員長（五十音順 敬称略）

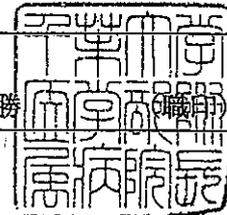
別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

当初申請 平成 23 年 10 月 27 日
一部修正 平成 25 年 7 月 1 日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
	名称	千葉大学医学部附属病院 (電話番号) 043-222-7171 (FAX 番号) 043-226-2687
	代表者 役職名・氏名	千葉大学医学部附属病院長 宮崎 勝



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画書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
切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子 発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究	千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学・教授 巽 浩一郎



遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

平成23年10月27日

研究の名称	切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究
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	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号260-8670)	
	所属機関・部局・職	千葉大学大学院医学研究院・呼吸器内科学・教授	
	氏名	巽 浩一郎 (印)	
実施の場所	所在地	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号260-8677)	
	名称	千葉大学医学部附属病院	
	連絡先	千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1 (郵便番号260-8670) 千葉大学大学院医学研究院・呼吸器内科学 (電話番号043-222-7171 内線5471)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	廣島 健三	東京女子医科大学大学院医学研究院 診断病理学 教授	病理学的診断、治療効果判定
	多田 裕司	千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科 助教	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床試験の実施
	由佐 俊和	千葉労災病院 副院長 呼吸器外科部長 アスベスト疾患センター長	患者の選定、治療効果判定
	瀧口 裕一	千葉大学大学院医学研究院 先端化学療法学 教授	患者の選定、患者への説明及び同意の取得、臨床試験の実施
	北村 淳史	聖路加国際病院 呼吸器内科 医師	患者の選定、治療効果判定
	北園 美弥子	多摩総合医療センター 呼吸器内科 医師	患者の選定、治療効果判定
	北園 聡	国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科 医師	患者の選定、治療効果判定
岩澤俊一郎	千葉大学医学部附属病院 臨床腫瘍部 助教	患者への説明及び同意の取得、患者の選定、臨床試験の実施	

総括責任者以外の研究者	芦沼 宏典	千葉県がんセンター 呼吸器内科 医師	患者の選定、治療効果判定
	田川 雅敏	千葉県がんセンター がん治療開発グループ 部長、 千葉大学大学院医学研究院 分子腫瘍生物学 客員教授	生物学的反応の検討、治療効果判定
	新行内雅斗	千葉県がんセンター 呼吸器内科 医長	患者の選定、治療効果判定
	島田 英昭	東邦大学大森病院 一般消化器外科 教授 千葉大学医学部附属病院 疾患プロテオミクス研究部門 客員教授	生物学的反応の検討、治療効果判定
	松下 一之	千葉大学大学院医学研究院 分子病態解析学 准教授	ベクターの作製・保存・調製、生物学的反応の検討、治療効果判定
	白川 利朗	神戸大学大学院医学系研究科感染症センター 准教授	ベクターの作製・保存
	北田 光一	千葉大学未来医療教育研究センター 特任教授	ベクターの保存・調製
	今井 千晶 松本 邦夫	千葉大学医学部附属病院 薬剤部 薬剤師 金沢大学がん研究所 腫瘍動態制御研究分野 教授	ベクターの保存・調製 生物学的反応の検討

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	
	審査委員会の長の職名	氏 名
	千葉大学医学部附属病院 遺伝子治療臨床研究 審査委員会委員長	松原 久裕 

研究区分	○遺伝子治療臨床研究	遺伝子治療標識研究
研究の目的	<p>HGF (hepatocyte growth factor) は癌-間質相互作用のメディエーター等として様々な癌の浸潤・転移に関わり、また VEGF (vascular endothelial growth factor)、bFGF (basic fibroblast growth factor) などとともに腫瘍血管新生因子として同定されている。NK4 は HGFα鎖由来の分子で、HGF とその受容体である c-Met との結合を阻害する。その結果 NK4 は HGF/c-Met のシグナル伝達を阻害し、当該分子の機能を阻害する。さらに NK4 は VEGF, bFGF による血管新生作用も阻害することが知られている。本研究は、HGF/c-Met のシグナル伝達や血管新生がその進展に関与している悪性胸膜中皮腫に対して、NK4 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を使用し、当該疾患に対する当該遺伝子治療の安全性</p>	

	<p>及び有用性を検討することを目標としている。すなわち本臨床研究は、切除不能で化学療法無効あるいは化学療法拒否の悪性胸膜中皮腫症例に対する、Ad5CMV-NK4 胸腔内投与の臨床研究であり、当該遺伝子治療の安全性を検討し、さらに局所の抗腫瘍効果を検討することにある。また、癌に伴う病的状態に対してQOL (Quality of Life) の評価、疼痛の評価、Performance Status の評価をおこない、その改善効果も評価する。さらに、治療群の病理標本及び試料が採取可能であれば、病理組織学的及び分子生物学的解析を行う。</p>
<p>対象疾患及びその選定理由</p>	<p>悪性胸膜中皮腫は体腔内面を広く覆う漿膜に発生する腫瘍で、胸膜、腹膜、心膜や稀に精巣鞘膜からも発生する。疫学的研究から悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露が主因であり、曝露から平均38年にわたる長期の潜伏期間を経て発症する。多くの場合患者は高齢者であり呼吸機能が低下している例も多い。また典型的な症状を欠くこともあって、早期発見が困難な疾患である。過去のアスベスト使用量と悪性胸膜中皮腫の潜伏期を考慮すると、米国では患者発生のピークを過ぎたと推測されるが、欧州諸国、豪州、及び日本では、今後も症例数の増加が継続することが考えられ、欧州と日本では2025年頃をピークに累計死亡者数がそれぞれ、25万人及び10万人と予測されている (New Engl J. Med., 353: 1591-1603, 2005)。さらにアスベストが現在も使用され、しかもその使用量が増加している経済新興国 (中国、インドなど) では今後とも患者数が増加する事が予想されている。このように悪性胸膜中皮腫は今後、重要性を増す疾患でありながら、アスベスト曝露後の悪性胸膜中皮腫発症の予防法が知られておらず、簡便かつ有用な診断法に乏しく早期発見が困難であり、さらに本疾患は有効な治療法が確立されておらず、現実の臨床症例の多くは進行例であり治療の選択肢が非常に限られている。</p> <p>悪性胸膜中皮腫は、びまん性に胸腔内に進展するため、外科的切除や放射線療法にはおのずと限界がある。手術は腫瘍の進展が一侧の胸腔内に留まりリンパ節転移、遠隔転移を有さない早期症例が適応とされるが、切除境界が決定し難く胸膜肺全摘術という侵襲の強い術式となり、このため術後の呼吸不全などが起こりやすく患者のQOLが著しく低下する。また、術後の局所再発も高頻度で外科療法のみでの根治性を期待することは困難である。放射線治療に関しても、悪性胸膜中皮腫自体が放射線抵抗性であり、腫瘍の進展形式から照射野が広範になるため、呼吸機能の低下を伴う上に、放射線性肺臓炎や心膜炎なども危惧される。したがって放射線治療は術後療法又は疼痛緩和等の目的で施行されるにすぎない。以上のように上記の治療法には限界があることから、大半の症例では化学療法が施行されている。これまでもアンスラサイクリン系を初め多くの薬剤が検討されてきたが、単剤で10%以上の奏効率を示すものは数少なく、比較的有効とされた薬剤も少数例での第II相臨床試験であるために、エビデンスレベルは必ずしも高くない。しかし、その中においてシスプラチン+ペメトレキセド併用とシスプラチン単剤の第III相比較試験の結果、併用群が単剤使用群に比べて、奏効率、無増悪期間中央値、生存期間中間値とも優れており (H3EMCJMCH 試験, J. Clin. Oncol., 21: 2636-2644, 2003)、シスプラチン+ペメトレキセドが化学療法における第一選択薬剤となっている。</p> <p>現在、この両剤を用いた化学療法に放射線、手術を含めた multimodality treatment の有効性が検討されているが、それ以外の治療法の開発も当該疾患の治療選択肢を広げることに大いに貢献できるはずである。悪性胸膜中皮腫は幸いにも遠隔転移が少なく、胸腔内に浸潤をきたすために、本研究で使用するウイルスベクターによる遺伝子治療の利点を生かしやすい。すなわち胸腔内投与したウイルスベクター製剤は、拡散せずに閉鎖空間である胸腔内に留まり、その結果腫瘍との接触時間が増加し遺伝子導入効率が上昇する。しかも胸腔内は陰圧のためウイルスベクターは胸腔内全域に行き渡り、播種病変に対してもじゅうぶんに接触</p>

	<p>が可能である。またウイルスベクターに対する抗体産生は通常の投与経路と比較しても大差なく (Hum. Gene Ther., 9:2121-2166, 1998, Mol. Ther., 18:852-860, 2010)、さらに胸腔内投与ではアデノウイルスベクターの特性である肝への過剰な集積が起こりにくく、肝障害が少ないと想定される。また、悪性胸膜中皮腫の進展には血管新生が深く関与しており、この阻害が当該疾患に対して抗腫瘍効果を発揮できると想定している。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>本遺伝子治療で用いる NK4 遺伝子はシグナル配列を含めて 473 残基のアミノ酸をコードしている。NK4 蛋白質は HGF/c-Met 系のシグナル伝達の活性化に拮抗し、VEGF 等を介した血管新生阻害活性も有しており、がんの増殖と進展を阻害して抗腫瘍作用を発揮する。本遺伝子治療では、サイトメガロウイルス (CMV) の転写調節領域で NK4 cDNA を発現させるタイプ 5 型アデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を用いる。Ad5CMV-NK4 では、アデノウイルスの初期転写因子である E1A/E1B をコードする遺伝子を欠損させて、その欠損領域に CMV 転写調節領域、ヒト NK4 cDNA、SV40 ウイルスのポリアデニレーションシグナルが組込まれている。その結果、Ad5CMV-NK4 はそれ自体では増殖能を持たず非増殖性であるが、E1A/E1B 遺伝子産物が持続的に発現する細胞内では増殖し、この性質を利用してウイルスの増幅と調製が可能である。本臨床研究では Ad5CMV-NK4 ウイルスを胸腔内に投与することにより、NK4 遺伝子の腫瘍内導入を行う。アデノウイルスは染色体への組み込み機構を有しておらず、導入遺伝子の発現も細胞の分裂や細胞死によって一過性となり、遺伝子発現による有害事象が継続する可能性は低い。また、ヒト正常線維芽細胞株に当該ウイルスを感染させた場合は、細胞毒性を示さず、その増殖にも影響を与えなかった。さらにヒト悪性胸膜中皮腫培養細胞を用いた結果から、遺伝子導入効率は細胞によっても異なるが、多くの細胞で plaque forming unit (pfu)=30 のウイルス量で 60% 以上の細胞に遺伝子が導入される。実際の臨床例では、タイプ 5 型ウイルスの受容体発現が異なり遺伝子導入効率も同じではないが、アデノウイルスは高力値のベクターとして調整可能であるため、高効率の遺伝子発現が期待できる。また、NK4 蛋白質は分泌蛋白で、細胞表面に存在する c-Met に結合して生物学的活性が惹起されるため、遺伝子が導入されなかった腫瘍細胞に対しても抗腫瘍効果の誘導が期待できる。また本疾患においては、通常の抗がん剤治療の方法を変更することはなく、その効果の上に当該ベクターによる効果が付加されると考えられる。</p>
<p>これまでの研究成果</p>	<p>NK4 蛋白質を投与することにより、肺がん、乳がん、前立腺がんにおいて浸潤・転移能が抑制され、腫瘍血管新生阻害等による腫瘍の増殖阻害が認められる。さらに Ad5CMV-NK4 投与により、ヒト腫瘍の浸潤・転移の阻害、増殖抑制が生じる。悪性胸膜中皮腫細胞を使用した場合、Ad5CMV-NK4 の投与によって、ヌードマウスの皮下に生着した当該腫瘍の増殖が阻害された。上記のいずれにおいても NK4 蛋白質投与、Ad5CMV-NK4 投与による目立った副作用は観察されなかった。Ad5CMV-NK4 を用いた遺伝子治療は、その遺伝子産物の性質からしても有害事象の少ない、比較的安全性が確保されている方法ではないかと考えられる。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>Ad5CMV-NK4 ウイルスはヒトアデノウイルス 5 型から作成されている。ヒトアデノウイルス 5 型は、多くの疫学調査等からヒトに対するがん原性が認められておらず、一般的には幼児期において気道感染によりいわゆる「かぜ」症状をおこすウイルスの 1 つである。Ad5CMV-NK4 は E1 領域遺伝子を欠損させた非増殖性ウイルスベクターである。Ad5CMV-NK4 を正常気道上皮細胞、ヒト線維芽細胞に感染させた結果、正常細胞の増殖に影響を与えない。Ad5CMV-NK4 をマウス尾静脈から単回投与した毒性試験の結果、6.5×10^9 pfu/kg (体重) までの用量において、重篤な毒性症状は認められなかった。この用量は本試験で使用する最高用量 (1×10^{12} virus particle(vp) で 1×10^{11} pfu に相当) の約 3 倍量 (ヒト体重を 50 kg を仮</p>

	<p>定)に相当する Ad5CMV-NK4 を静脈経由で投与した場合に相当している。実際の臨床研究では、より毒性の低い投与方法として、Ad5CMV-NK4 を 100 ml に希釈して胸腔内に注入する。アデノウイルスは遺伝的に安定な二重鎖 DNA ウィルスであり、生体内で突然変異が起きる可能性は低い。また宿主細胞のゲノムに組み込まれる可能性は極めて少なく、Ad5CMV-NK4 ウィルスを患者に投与しても、体内で野生型ウィルス等との組換えにより増殖性ウィルスが出現する可能性も極めて低い。本研究に用いられる Ad5CMV-NK4 は、cGMP 基準に従ってマスターセルバンク、マスターウィルスシードストック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、神戸バイオメディカル創造センターBiologics Laboratory を運営管理している神戸大学発ベンチャーのジ GMJ (旧株式会社ジーンメディスンジャパン) 社において生産されている。最終製品については、無菌試験、エンドトキシン検出試験、replication-competent adenoviruses (RCA) 検出試験などが施行され、当該ウィルスの安全性が確認されている。なお、ウィルスを cGMP 基準で生産する際に、ウィルス産生細胞として PER.C6 細胞を使用しており相同組換えによって生ずる RCA 混入の可能性は理論的にはない。臨床試験の対象となった患者に野生型アデノウイルスが同時に感染しても上記のように RCA が出現する確率は極めて低い。しかし臨床研究の実施にあたって、当該研究に係る規定の遵守、患者に対するじゅうぶんな観察、検査などにより RCA の出現を検出し、RCA の施設外への拡散を防止する。なお千葉大学において、すでに p53 がん抑制遺伝子発現アデノウイルス (タイプ 5 型) を用いた食道がんに対する臨床研究が実施され、10 症例に対して 51 回のウィルス投与が施行されているが、当該臨床試験においてアデノウイルスによる重篤な副作用は見られなかった。</p> <p>胸腔内に非増殖性アデノウイルス (HSV-TK 遺伝子あるいは interferon-β 遺伝子を有する) を投与した症例は米国の 42 例があるが、いずれにおいて重篤な有害事象は報告されていない (Clin. Cancer Res., 11:7444-7453, 2005, Clin. Cancer Res., 13:4456-4466, 2007)。ただし、NK4 遺伝子を発現するアデノウイルスをヒトに投与した例はない。</p>
<p>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</p>	<p>切除不能悪性胸膜中皮腫症例に対する標準的治療は、シスプラチンとペメトレキセドの併用が主体であるが、生存期間中央値は 12.1 箇月にすぎない。また高齢者の患者が比較的多く、侵襲の少ない治療が望まれるが、実際上記抗がん剤に加えてさらなる治療効果を求める場合に有用な手段に乏しい。またシスプラチンとペメトレキセドの第一選択薬剤に抵抗性となった症例に対して、第二選択薬として有用な薬剤は知られていない。そこで本臨床研究は、アデノウイルスベクターの胸腔内投与によって血管新生阻害剤を腫瘍局所で作用させようとするものである。化学療法無効あるいは拒否の悪性胸膜中皮腫患者を対象として、病名の告知、本研究のじゅうぶんな説明によって患者の同意が得られている場合、当該遺伝子医薬の臨床効果は不明であるものの、ウィルス製剤の安全性が確保され、しかも胸腔内投与は通常の治療手技であることから、倫理的に許容できると考えられる。当該施設では、ウィルスベクターを用いた基礎的な研究も豊富であり、各種腫瘍における遺伝子治療の基礎的なデータを多くの学会にて報告してきている。さらに、千葉大学病院では、10 例の食道癌症例に p53 遺伝子発現アデノウイルスベクターを合計 51 回の治療を実施した実績があり、またじゅうぶんにウィルスベクターの拡散を防止できる施設を有している。アデノウイルスベクター投与による有害事象は、局所の疼痛や一時的な発熱など特段重篤なものがないことが知られており、胸腔内投与例は少ないとはいえ、従来の知見を大きくこえて危険性が高まるとは想定し難い。また治療中の患者のバイオハザードの解析結果から、水平感染の危険性がほとんどないことが確認されている。</p>
<p>実施計画</p>	<p>対象は切除不能の悪性胸膜中皮腫症例である。文書により同意を得た被験者に、胸腔内に穿刺針を用いて腫瘍部位に近い部位より Ad5CMV-NK4 の調製液を</p>

	<p>生理食塩水 100 ml に混和し投与する。試験期間は 28 日（4 週間）とし、第 1 日目に Ad5CMV-NK4 を 1 回投与し、4 週間後（試験期間終了時）まで安全性について、また 4 週間後並びに試験終了 1 箇月後に抗腫瘍効果を判定する。合計 9 例で投与量増量試験（低用量：1×10^{10} vp、中用量：1×10^{11} vp、高用量：1×10^{12} vp）を行う。主要評価項目は安全性の評価であり、理学所見、血液学的検査、生化学的検査、尿検査、心電図等の各種検査及び、アデノウイルスベクターの排泄調査、抗アデノウイルス抗体の検出を行う。さらに、Positron emission tomography-CT あるいは CT 画像による腫瘍量の測定、血清中からは NK4 及び HGF 蛋白質、抗 NK4 抗体、抗 HGF 抗体、抗アデノウイルス抗体、胸水採取が可能であれば胸水中の NK4 及び HGF 蛋白質量、胸水中細胞における NK4 遺伝子の導入及び発現量の検討及び HGF シグナル経路の活性化を評価する。上記の検討項目は、通常の化学療法を受ける悪性胸膜中皮腫患者の治療経過観察に要する検査と大差なく、身体的負担は同等であると考えられる。効果判定の判断として、上記の画像診断による抗腫瘍効果に加えて、癌に伴う病的状態（QOL 評価、疼痛評価、Performance Status）に対する効果を検討する。</p> <p>全患者について、Ad5CMV-NK4 投与終了後上記の期間まで安全性を確認する。さらに重篤な副作用は回復するまで追跡調査する。フォローアップは、死亡ないしは投与開始後 1 年が経過するまで 2 箇月毎に行う。将来における解析及び研究のため被験者の血清等の検体は可能な限り保管する。</p>
備考	<p>1) 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じゅうぶんに理解し、自主的に同意した上で同意書に署名した者とする。なお、被験者はその申し出により同意を撤回し、本臨床研究への参加を中止することができる。</p>

遺伝子治療臨床研究実施計画書

【課題名】

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型
アデノウイルスベクターによる臨床研究

研究代表者：巽 浩一郎
千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学

第2版 2012年2月修正
第3版 2012年5月修正
第4版 2013年3月修正
第5版 2013年4月修正
第6版 2013年7月修正

研究事務局

多田裕司

千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科

260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1

電話 : 043-222-7171 内線 5471

FAX: 043-226-2176

E-mail: ytada@faculty.chiba-u.jp

田川雅敏

千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍生物学 (連携大学院)

千葉県がんセンター がん治療開発グループ

260-8717 千葉市中央区仁戸名町 666-2

電話 : 043-264-5431 内線 5101

FAX: 043-265-4459

E-mail: mtagawa@chiba-cc.jp

新行内雅斗

千葉県がんセンター 呼吸器内科

260-8717 千葉市中央区仁戸名町 666-2

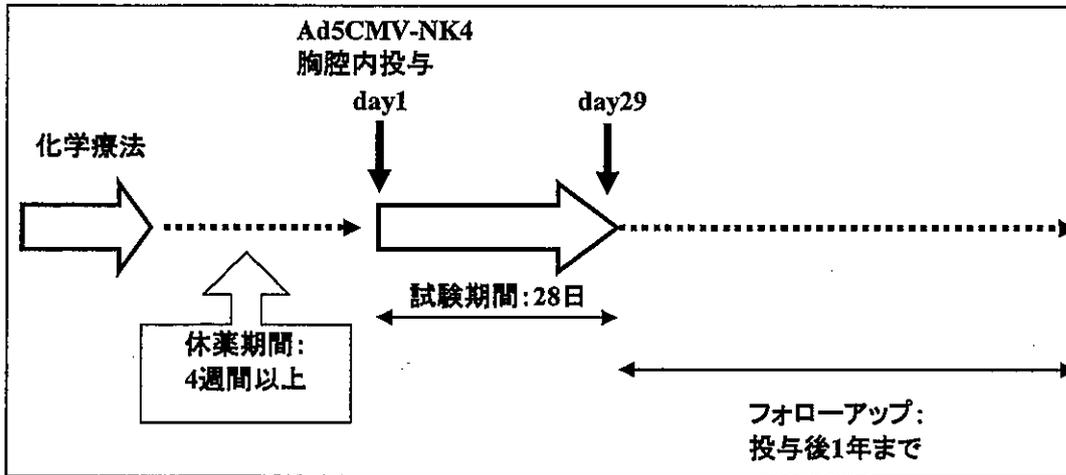
電話 : 043-264-5431

FAX: 043-265-4459

E-mail: mshingyoji@chiba-cc.jp

0. 遺伝子治療臨床研究の概要

0.1. 臨床研究計画のシエーマ



0.2. 目的

切除不能悪性胸膜中皮腫症例を対象とした、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) 転写調節領域を用いた NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) の胸腔内投与による臨床研究である。主たる評価項目は投与量の増加による有害事象の有無、及び推奨用量の決定である。従たる評価目的として画像診断による抗腫瘍効果を評価する。またがんに伴う病的状態、すなわち quality of life (QOL)、疼痛、performance status (PS) に対する改善効果の評価も行う。Ad5CMV-NK4 による臨床効果の評価は従来の臨床例との比較において行う。

0.3. 対象

0.3.1. 選択基準

- 1) 切除不能悪性中皮腫症例であり放射線治療歴を有さない症例。切除不能悪性中皮腫症例とは、生検等によって病理学的に悪性胸膜中皮腫が確認されている症例で、臨床病期は問わず、登録時点で手術不能と診断されているか、手術を拒否している症例を指す。
- 2) 以下のいずれかに該当する症例。
 - A) 悪性胸膜中皮腫に対する化学療法後に PD と判定された症例。
 - B) 悪性胸膜中皮腫に対する化学療法を拒否している症例。なおいずれの症例についても、化学療法を受けた場合については、Ad5CMV-NK4 投与前に、化学療法施行後 4 週以上経過していること。
- 3) 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。
- 4) Ad5CMV-NK4 を含む溶液を注入可能なスペースを胸腔内に有するもの。
- 5) 同意取得時点の年齢が 20 才以上 80 才以下の男性及び女性。

- 6) ECOG PS が 0 あるいは 1 であること。
 PS0：全く問題なく活動できる。発病前と同じ日常生活が制限なく行える。
 PS1：肉体的に激しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座っての作業は行うことができる。例) 軽い家事、事務作業。
 PS2：歩行可能で自分の身の回りのことはすべて可能だが作業はできない。日中 50% 以上はベッド外で過ごす。
 PS3：限られた自分の身の回りのことしかできない。日中の 50%以上をベッドか椅子で過ごす。
 PS4：全く動けない。自分の身の回りのことは全くできない。完全にベッドか椅子で過ごす。
- 7) 妊娠・授乳をしていない、又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。患者あるいは患者の配偶者が妊娠した場合、患者が臨床研究分担医師にその旨伝えることについて、同意していること。
- 8) 以下の項目を満たし、骨髄機能、肝機能及び腎機能が適切であること。
- ① 白血球数：3000/mm³ 若しくは好中球数 2000/mm³ 以上
 - ② 血小板数：10 万/mm³ 以上
 - ③ ヘモグロビン量：9.0 g/dl 以上
 - ④ 総ビリルビン：医療施設の基準値上限の 1.5 倍以下
 - ⑤ ALT/SGPT, AST/SGOT：医療施設の基準値上限の 2 倍以下
 - ⑥ アルカリフォスファターゼ：医療施設の基準値上限の 5 倍以下
 - ⑦ 血清クレアチニン：1.5 mg/dl 未満
 - ⑧ PT 及び APTT：医療施設の基準範囲内
 - ⑨ 大気吸入下での経皮的酸素飽和度 (SPO₂) が 92%以上
 - ⑩ 心電図 正常範囲内
- 9) 症例登録から 3 箇月以上の生存が期待できるもの。
- 10) 総括責任者あるいは臨床研究分担医師が被験者の安全性に問題がないと判断した場合。

0.3.2. 除外基準

- 1) 重度又はコントロール困難な活動性感染症、重篤な併発疾患、合併症がある場合。
- 2) 悪性胸膜中皮腫以外の同時性あるいは異時性腫瘍を有する場合。ただし当該腫瘍が根治しており、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。
- 3) 有症状の脳転移がある患者、又は治療を必要とする脳転移がある患者。
- 4) 試薬を注入可能なスペースが胸腔内にないもの、または治療を要する心嚢液貯留症例。
- 5) 試験登録前 4 週間以内に未承認試験薬あるいは治験薬の臨床試験に参加していた場合。
- 6) 試験登録から試験終了までの間に何らかの抗がん治療を受ける予定がある場合。
- 7) 症例登録時点で胸膜癒着術が既に施行されているもの。
- 8) 症例登録時点で CTCAE Ver 4.0 の基準でグレード 2 以上の末梢神経障害を有するもの。
- 9) 胸部単純 X 線にて明らかな間質性肺炎、肺線維症が認められたもの。
- 10) 試験計画書の遵守及び試験での経過観察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ものを含む。
- 11) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療歴がある場合。
- 12) 自家若しくは同種臓器、組織移植歴がある場合。
- 13) 血清検査により、HIV 抗体、HBV 抗原、HCV 抗体、HTLV-1 抗体が陽性であるもの。
- 14) その他、総括責任者あるいは臨床研究分担医師が本試験の対象として適切でないと判

断したもの。

0.4. 治療

Ad5CMV-NK4 の 1 回の治療あたり投与量

- A グループ 低用量群 (1×10^{10} vp) ; 3 例
- B グループ 中用量群 (1×10^{11} vp) ; 3 例
- C グループ 高用量群 (1×10^{12} vp) ; 3 例

試験期間は 28 日 (4 週間) とし、投与日を第 1 日目とする。第 1 日目に Ad5CMV-NK4 を投与し、安全性、抗腫瘍効果、ならびに生物学的反応を判定する。投与用量として、低用量 (1×10^{10} vp)、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) の 3 群を設定する。目標症例数はそれぞれ、低用量群 (1×10^{10} vp) : 3 症例、中用量群 (1×10^{11} vp) : 3 症例、高用量群 (1×10^{12} vp) : 3 症例である。本臨床研究は低用量投与から開始し、安全性を確認した後、順に中用量群、高用量群へと移行する。基本的には合計 9 例で投与量増量試験を行い、安全性の検討、適切な投与量の設定、抗腫瘍効果の有無を観察、有効性ならびに有害事象を検討する。

0.5. 予定登録症例数と研究期間

予定登録数 : 合計 9 例
登録期間 : 2 年
実施期間 : 1 年
総研究期間 : 3 年

0.6. 問い合わせ先

多田裕司
千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科
260-8677 千葉市中央区亥鼻 1-8-1
電話: 043-222-7171 内線 5471
FAX: 043-226-2176
E-mail: ytada@faculty.chiba-u.jp

田川雅敏
千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍生物学 (連携大学院)
千葉県がんセンター がん治療開発グループ
260-8717 千葉市中央区仁戸名町 666-2
電話: 043-264-5431 内線 5101
FAX: 043-265-4459
E-mail: mtagawa@chiba-cc.jp

新行内雅斗
千葉県がんセンター 呼吸器内科
260-8717 千葉市中央区仁戸名町 666-2

電話: 043-264-5431
FAX: 043-265-4459
E-mail:mshingyoji@chiba-cc.jp

0.7. 略号リスト (LIST OF ABBREVIATIONS)

aa;	amino acid
AAV;	adeno-associated virus
Ad5CMV-NK4;	adenoviruse type 5 expressing NK4 gene with the CMV promoter
AE;	adverse event
AIDS;	acquired immune deficiency syndrome
ALP;	alkaline phosphatase
ALT/SGPT;	alanine aminotransferase
ANC;	absolute neutrophil count
APTT;	activated partial thromboplastin time
AST/SGOT;	aspartate aminotransferase
β-HCG;	beta-subunit of human chorionic gonadotropin
bFGF;	basic fibroblast growth factor
bp;	base pair
BUN;	blood urea nitrogen
CA125;	cancer antigen 125
CBC;	complete blood count
CEA;	carcinoembryonic antigen
cGMP;	current good manufacturing practice
CrCl;	creatinine clearance
cGy;	centi-Gray
CMV;	cytomegalovirus
CPE;	cytopathic effect
CPK;	creatinine phosphokinase
CR;	complete response
CRF;	case report form
CRO;	contract research organization
CRP;	C-reactive protein
CT;	computed tomography
CTCAE;	Common Terminology Criteria for Adverse Events
CYFRA;	cytokeratin 19 fragment
dl;	deciliter
DNA;	deoxyribonucleic acid
EB;	Epstein Barr
ECG;	electrocardiogram
ECOG;	Eastern Cooperative Oncology Group
EGFR;	epidermal growth factor receptor
EIA;	enzyme immunoassay
ELISA;	enzyme-linked immunosorbent assay
EORTC QLQ-C30;	European Organization for Research and Treatment of Cancer QLQ-C30
FDA;	Food and Drug Administration (USA)
γ-GTP;	gamma-glutamyl transpeptidase
GCP;	good clinical practice
GMP	good manufacturing practice
HBV;	hepatitis B virus
HCV;	hepatitis C virus
HEK;	human embryonic kidney cell
HGF;	hepatocyte growth factor
HIV;	human immunodeficiency virus
HSV;	herpes simplex virus

HTLV-1;	human T-cell lymphotropic virus type 1
IATA;	International Air Transport Association
ICR;	Crlj:CD1
IFN- β ;	interferon-beta
IND;	investigational new drug
IRB;	Institutional Review Board
IV;	intravenous(ly)
LAL;	Limulus Amebocyte Lysate
LDH;	lactic acid dehydrogenase
ml;	milliliter
MRI;	magnetic resonance imaging
NC;	no change
NCI-CTC;	National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria
NON NCI;	NON national Cancer Institute
OD;	optical density
PBS;	phosphate buffered saline
PCR;	polymerase chain reaction
PD;	progressive disease
PET;	positron emission tomography
PET-CT;	positron emission tomography - computed tomography
pfu;	plaque forming units
PR;	partial response
PS;	performance status
PT;	prothrombin time
PTT;	partial thromboplastin time
QOL;	quality of life
RBC;	red blood cell
RCA;	replication-competent adenovirus
RECIST;	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RT-PCR;	reverse transcription-polymerase chain reaction
SAE;	serious adverse event
SD;	stable disease
SDS-PAGE;	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SPO ₂ ;	O ₂ saturation on pulse oximetry, percutaneous oxygen saturation
SV40;	simian virus 40
TCID ₅₀ ;	50% tissue culture infectious dose
TK;	thymidine kinase
VAS;	Visual Analogue Scale
VEGF;	vascular endothelial growth factor
vp;	virus particles
WBC;	white blood cell
WHO;	World Health Organization

- 1) 治療開始前検査は試験開始前3日以内に実施する。
- 2) 抗がん剤使用等によるドロップアウト、死亡、試験中止希望の場合が該当する。またフォローアップ中に死亡した場合も含む。
- 3) 入院中の場合のみ実施する。
- 4) 治療開始後は診療時に実施する。
- 5) Ad5CMV-NK4 投与前後に実施する。
- 6) CTによる腫瘍病変の評価を意味し、初回投与前3週間以内のデータはベースライン値として採用可能とする。
- 7) Ad5CMV-NK4 投与後は48時間までモニターする
- 8) 女性のみで実施する。
- 9) 胸水及び胸水中の細胞に関する検査。胸水採取可能時に実施。かならずしも十分な試料が得られない場合もあり、その場合標本量に応じて実施可能と判断される順位等に従って検査を進める。採取後直ちに検体を保存する。検査の実施は後日行う。
- 10) 同意取得から試験開始までの間で胸水採取可能時に行う。
- 11) 胸水採取が可能な時点で実施する。
- 12) 実施可能な症例のみ実施する。
- 13) 試験開始前検査として胸水が採取可能となっていれば、その時点の胸水中ヒアルロン酸を測定し、さらに胸水採取可能な時点があれば、その時点の胸水中ヒアルロン酸を測定する。血中、CYFRA、CA125はスクリーニング時、Ad5CMV-NK4 投与後2週間後、4週間後、フォローアップ時に測定する。
- 14) 唾液、血液及び尿について、ウイルス排泄が陰性化するまでPCR検査を実施する。

目次

0. 遺伝子治療臨床研究の概要	2
0.1. 臨床試験計画のシエーマ	2
0.2. 目的	2
0.3. 対象	2
0.3.1. 選択基準	2
0.3.2. 除外基準	3
0.4. 治療	4
0.5. 予定登録症例数と研究期間	4
0.6. 問い合わせ先	4
0.7. 略号リスト (LIST OF ABBREVIATIONS)	6
0.8. スケジュール	8
1. 遺伝子治療臨床研究の名称	16
2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名ならびに当該臨床研究における役割	16
2.1. 総括責任者の氏名及び担当する役割	16
2.2. 総括責任者以外の共同研究者及び臨床研究分担医師の氏名と担当する役割	16
3. 実施施設の名称及びその所在地	17
4. 遺伝子治療臨床研究の目的	17
5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	18
5.1. 対象疾患に関する現時点での知見	18
5.1.1. 悪性胸膜中皮腫の治療成績の現状	18
5.1.2. 悪性胸膜中皮腫における血管新生と分子生物学的特性	18
5.2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要	19
5.3. 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	19
6. 遺伝子の種類及びその導入方法	20
6.1. 人に導入する遺伝子の構造と性質	20
6.1.1. NK4遺伝子の構造	20
6.1.2. NK4遺伝子の性質	20
6.1.3. 導入遺伝子からの生成物 (NK4蛋白質) の構造及びその生物活性	22
6.2. 本計画で使用するその他の組換えDNAの構造と性質	24
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	25
6.4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由	26
6.4.1. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の概略	26
6.4.2. 当該導入法を選択した理由	26
6.5. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入	27
6.5.1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響	27
6.5.2. ウイルスベクターの作製方法	30
6.5.3. ウイルスベクターの構造	31
6.5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴	32
7. 安全性についての評価	32
7.1. 遺伝子導入方法の安全性	32
7.1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクター	32
7.1.2. 患者に投与する物質の安全性	34

7.1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性	34
7.1.4. 遺伝子導入に用いるウイルスベクターの細胞傷害性	35
7.1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性	36
7.1.6. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性	36
7.1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	36
7.1.8. がん原性の有無	37
7.2. 遺伝子産物の安全性	38
8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠	38
8.1. 当施設における悪性胸膜中皮腫の診療の実績	38
8.2. 臨床試験の報告からみた本研究の妥当性について	39
9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	40
9.1. 研究の概要	40
9.2. 被験者の選択基準及び除外基準	40
9.3. 被験者の同意の取得方法	42
9.3.1. 患者への説明	42
9.3.2. 同意	42
9.4. 研究方法・試験期間・目標症例数	43
9.5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法	44
9.5.1. 対照群の設定方法	44
9.5.2. 遺伝子導入方法	44
9.5.3. 抗がん剤以外の前処理及び併用療法の有無	45
9.5.4. 臨床検査項目及び観察項目	45
9.5.5. 予測される有害事象並びにその対処方法	49
9.5.6. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	53
9.5.6.1. 有効性評価方法	53
9.5.6.2. 安全性評価方法	55
9.5.6.3. 疼痛評価	55
9.5.6.4. QOL 評価	55
9.5.6.5. ECOG Performance Status	56
9.5.6.6. 試験中止判定基準	56
9.5.7. 症例記録に関する記録用紙等の様式	56
9.5.8. 記録の保存及び成績の公表の方法	56
10. 統計的事項	56
10.1. 主たる評価項目の解析と判断規準	56
10.2. 予定登録数・登録期間・追跡期間	57
10.3. 従たる評価項目の解析と判断規準	57
10.4. 最終解析結果について	57
11. 倫理的事項	57
11.1. 本臨床研究における個人情報保護	57
11.1.1. 個人情報保護に関する責務	57
11.1.2. 第三者提供の制限	58
11.1.3. 個人情報の開示、訂正、利用停止等	58
11.2. 臨床試験計画の遵守	58
11.3. 臨床試験計画の内容変更について	58
11.4. 利益相反	59

12. モニタリング	59
12.1. 定期モニタリング	59
12.1.1. モニタリングの項目	59
12.1.2. 有害事象の許容範囲	59
12.1.3. 臨床試験計画の逸脱	60
13. その他必要な事項	60
14. 参考文献	61

添付資料 1

研究者の略歴及び研究業績

添付資料 2

当該遺伝子治療臨床研究に関連する内外の研究状況

添付資料 3

当該遺伝子治療臨床研究に関する基礎的研究の成果

添付資料 4

NK4 遺伝子発現アデノウイルスベクターの全塩基配列

添付資料 5

最終製品、マスターセルバンク、ワーキングセルバンク、マスターウイルスシードストックの品質試験の結果

添付資料 6

マウスを用いた単回静脈内投与毒性試験の結果

添付資料 7

千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科学遺伝子治療取扱い指針

添付資料 8

実施施設の施設設備の状況および感染管理治療部の病棟・病室の見取り図・患者の動線

添付資料 9

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究 説明同意文書

添付資料 10

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会規定および千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定小委員会要項

添付資料 11

千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会安全・効果評価・適応判定小委員会名簿

添付資料 12

ECOG Performance Status (PS) 日本語訳

添付資料 13

疼痛・QOL 評価

添付資料 14

Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v4.0

添付資料 15

症例報告書

添付資料 16

国立大学法人千葉大学個人情報管理規程

添付資料 17

千葉大学医学部附属病院個人情報管理規程

添付資料 18

国立大学法人千葉大学個人情報開示請求等取扱規程

添付資料 19

Ad5CMV-NK4 ベクターの作製法

添付資料 20

GMP 製造の指示記録書—総括

添付資料 21

Ad5CMV-NK4 生産フロー図

添付資料 22

ARM Virus Particle Titer 評価表

添付資料 23

千葉大学医学部附属病院 平成 23 年度遺伝子治療関連委員会委員

添付資料 24

NK4 タンパク質の血中動態

添付資料 25

千葉大学-臨床研究の利益相反に関する自己申告書

添付資料 26

Ad5CMV-NK4 静脈内反復投与—安全性試験報告書

添付資料 27

Ad5CMV-NK4 の試験報告書 2012 年 2 月 29 日

添付資料 28

Ad5CMV-NK4 の RCA 試験報告書 2012 年 4 月 20 日

添付資料 29

Ad5CMV-NK4 の RCA 試験報告書 (spiked sample を併用した RCA 検出の試験報告)
2012 年 8 月 24 日

添付資料 30

Ad5CMV-NK4 のマウスにおける胸腔内投与安全性試験報告書 2012 年 10 月 25 日

添付資料 31

Ad5CMV-NK4 のマウスにおける胸腔内投与安全性試験報告書 (NK4 遺伝子発現の追加試験)
2012 年 11 月 13 日

添付資料 32

Ad5CMV-NK4 のマウスにおける胸腔内投与と静脈内投与での安全性試験報告書
2013 年 3 月 18 日

添付資料 33

千葉大学医学部附属病院における遺伝子治療に関わる重篤な有害事象発生時の報告手順

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究

2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該臨床研究における役割

2.1. 総括責任者（研究代表者）の氏名及び担当する役割

巽 浩一郎 千葉大学大学院医学研究院呼吸器内科学 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及び臨床研究分担医師の氏名と担当する役割 (添付資料1：略歴・業績参照)

廣島 健三 東京女子医科大学附属八千代医療センター病理診断科 病理診断科 教授
患者への説明同意の取得、病理学的診断、治療効果判定

多田 裕司 千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科 助教
患者の選定、患者への説明同意の取得、臨床試験の実施

由佐 俊和 千葉労災病院 副院長 呼吸器外科部長 アスベスト疾患センター長
患者の選定、治療効果判定

瀧口 裕一 千葉大学大学院医学研究院 先端化学療法学 教授
患者の選定、患者への説明同意の取得、臨床試験の実施

北村 淳史 聖路加国際病院 呼吸器内科 医師
患者の選定、治療効果判定

北園美弥子 多摩総合医療センター 呼吸器内科 医師
患者の選定、治療効果判定

北園 聡 国立がん研究センター中央病院 呼吸器内科 医師
患者の選定、治療効果判定

岩澤俊一郎 千葉大学医学部附属病院 臨床腫瘍部 助教
患者の選定、患者への説明同意の取得、臨床試験の実施

芦沼 宏典 千葉県がんセンター 呼吸器内科 医師
患者の選定、治療効果判定

田川 雅敏 千葉県がんセンター がん治療開発グループ 部長
千葉大学大学院医学研究 分子腫瘍生物学 客員教授
生物学的反応の検討、治療効果判定

新行内雅斗 千葉県がんセンター 呼吸器内科 医長
患者の選定、治療効果判定

白川 利朗 神戸大学大学院医学系研究科感染症センター 准教授
ベクターの作製・保存

島田 英昭 東邦大学大森病院 一般消化器外科 教授
千葉大学医学部附属病院 疾患プロテオミクス研究部門 客員教授
生物学的反応の検討、治療効果判定

松下 一之 千葉大学大学院医学研究院 分子病態解析学 准教授
ベクターの作製・保存・調製、生物学的反応の検討、治療効果判定

北田 光一 千葉大学未来医療教育研究センター 特任教授
ベクターの保存・調製
今井 千晶 千葉大学医学部附属病院 薬剤部 薬剤師
ベクターの保存・調製
松本 邦夫 金沢大学がん研究所 腫瘍動態制御研究分野 教授
生物学的反応の検討

3. 実施施設の名称及びその所在地

千葉大学医学部附属病院 郵便番号 260-8677
千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1
(TEL) 043-222-7171 内線 5471 (呼吸器内科学)
(FAX) 043-226-2176 (呼吸器内科学)

4. 遺伝子治療臨床研究の目的

線維芽細胞やがん細胞より分泌される hepatocyte growth factor (HGF) と、その受容体でチロシンキナーゼ活性を有する c-Met との結合は、多くのヒトのがんにおいて、がん-間質相互作用に深く関与し、浸潤・転移を促進する。HGF の分子内断片である NK4 分子は、HGF の競合的アンタゴニストで、がんの浸潤・転移を阻害することができる。さらにこの NK4 分子は、VEGF, FGF による血管新生を阻害し、がんの進展を抑制することが知られている (1, 2)。これまでにヒト腫瘍のマウスモデルにおいて、NK4 遺伝子を発現する非増殖性組換えアデノウイルス (Ad5CMV-NK4) を腫瘍局所に投与すると、多くのヒトがんに対して浸潤や転移を阻害し、増殖の抑制などの抗腫瘍効果が得られることが報告されている (3-8)。さらにヒト悪性中皮腫に対しても Ad5CMV-NK4 は抗腫瘍効果を惹起することが判明している (9)。そこで本研究は、切除不能の悪性胸膜中皮腫症例に対して Ad5CMV-NK4 を胸腔内に投与し、当該遺伝子治療の安全性を検討する。当該臨床研究の主たる評価項目は有害事象の有無すなわち当該ウイルスの胸腔内投与に関する安全性の評価及び推奨用量の検討であり、従たる評価項目は、画像診断を用いた抗腫瘍効果、すなわち治療効果の持続期間、腫瘍進行までの時期、全生存期間であり、がんに伴う病的状態、すなわち QOL、疼痛、PS に対する改善効果も評価する。さらに可能な範囲において生物学的反応の有無も合わせて検討する。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

5.1. 対象疾患に関する現時点での知見

5.1.1. 悪性胸膜中皮腫の治療成績の現状

悪性胸膜中皮腫はびまん性に胸腔内に進展するため、手術や放射線療法などの治療法にはおのずと限界がある。手術は腫瘍の進展が一側の胸腔内に留まり、リンパ節転移や遠隔転移を有さない早期症例が適応とされるが、多くの症例では広範囲に胸壁浸潤が起り、また術式自体が胸膜肺全摘術という侵襲の強い手術であるため、術後の呼吸不全など患者のQOLが著しく低下する。また、術後の再発も高頻度にみられ、ほとんどの場合手術によって治癒を期待することは難しい。放射線治療に関しては、中皮腫自体が放射線に低感受性であり、腫瘍の進展様式のため照射野が広範にわたるため、放射線性肺臓炎、放射線性心膜炎、腎機能障害が危惧される。そこで現在、放射線治療は術後療法の一環として、また疼痛緩和目的で施行されるという役割にとどまっている。以上のことから大半の症例では全身化学療法が施行されている。これまでもアンスラサイクリン系を初め多くの薬剤が投与されてきたが、単剤で10%以上の奏効率を示すものは少なく、プラチナ製剤ではシスプラチン、カルボプラチン、代謝拮抗剤では高用量のメソトレキセート、ラルチトレキセド、ペメトレキセド、ビノレルビン、多剤併用ではアンスラサイクリン系、プラチナ製剤のいずれかを含む治療法が報告されている。しかしいずれも少数例の第Ⅱ相臨床試験によるものであるために標準治療として確立するには至っていない。その中であって Vogelzang らが報告したシスプラチン+ペメトレキセド対シスプラチン単剤の第Ⅲ相比較臨床試験では、奏効率が併用で41.3%、単剤で16.7%、無増悪期間中央値が併用で5.7箇月、単剤で3.9箇月、生存期間中央値が併用で12.1箇月、単剤で9.3箇月という結果であった(10)。そこで、現在ではシスプラチン+ペメトレキセドが化学療法における第一選択の治療レジメンとされている。シスプラチンの代わりにカルボプラチンを用いた報告もあるが、生存期間中央値が僅かに延長するに過ぎない。またシスプラチン+ペメトレキセドによる治療に抵抗性となった場合、第二選択薬として有用な薬剤は知られておらず、各種の薬剤による臨床試験が各国で試みられている段階に過ぎない。したがって、第一選択薬において抗腫瘍効果が見られなかった症例については、緩和ケアを視野に入れた治療が行われているのが現状である。

5.1.2. 悪性胸膜中皮腫における血管新生と分子生物学的特性

がんの浸潤・転移、腫瘍血管新生に HGF/c-Met 系が重要な働きをしていることが明らかにされており(1, 2)、HGF/c-Met 系による細胞内シグナル伝達系を阻害できれば、抗腫瘍効果が期待される。事実、悪性胸膜中皮腫においても c-Met の発現が上昇しており、この発現異常が悪性胸膜中皮腫の進展に関わっていること、また HGF/c-Met 系の阻害によって抗腫瘍効果を惹起されることが示されている(11-13)。さらに悪性胸膜中皮腫では血管増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) が血清中、胸水中で上昇しており、このような患者の予後は不良であることが知られている(14)。しかも VEGF 受容体である VEGFR-1 や VEGFR-2 も悪性胸膜中皮腫細胞株では上昇している。また、チロシンキナーゼ受容体 epidermal growth factor receptor (EGFR) も悪性胸膜中皮腫で陽性であり、しかも石綿によって EGFR が誘導されるとも報告されている(14)。したがって、悪性胸膜中皮腫において、HGF/c-Met 経路の阻害、VEGF 経路を中心とする血管新生の阻害、EGFR 受容体タイプのチロシンキナーゼの活性阻害は、いずれも有用な治療法となる

と考えられる。たとえばヒト化抗 VEGF 抗体 bevacizumab (15) など、血管新生阻害剤は悪性胸膜中皮腫に対してもその有用性が検討されている (14)。

NK4 は HGF の分子内断片であり 4 つのクリングル構造を有する分子で、HGF アンタゴニストとして HGF/c-Met 経路を阻害する (16, 17)。また、VEGFR のチロシンキナーゼ活性を阻害して血管新生阻害活性を示すこと (18, 19)、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) 増殖因子の受容体チロシンキナーゼをも阻害することも知られている (18)。すなわち、NK4 分子は HGF アンタゴニスト活性と血管新生阻害活性の複数の機能を有しており、そのため悪性胸膜中皮腫において、同分子を作用させれば、一定の抗腫瘍効果が惹起されると考えられる。動物実験においても、NK4 遺伝子を発現させるアデノウイルス (Ad5CMV-NK4) を使用することによって悪性胸膜中皮腫の対する抗腫瘍効果を得ている (9)。なお悪性胸膜中皮腫ではがん抑制遺伝子 p53 は多くの症例で変異はなく、染色体 9p21 における INK4a/ARF 領域の欠失が 70%以上の悪性胸膜中皮腫細胞株で認められている (20)。INK4a/ARF 領域には p14^{ARF}、p16^{INK4a} 遺伝子が存在しており、これらの遺伝子でコードされる蛋白質はそれぞれ p53 及びがん抑制遺伝子 pRB の発現とその制御に寄与することから、悪性胸膜中皮腫では p53 及び pRB 蛋白質の機能が実質的に喪失していると考えられ、当該細胞では細胞死に至る経路の活性化が比較的困難となり、この遺伝子欠失が抗がん剤、放射線に対して耐性を示す一つの要因であると考えられている。

5.2. 当該遺伝子治療臨床研究の概要

切除不能の悪性胸膜中皮腫患者に対し、胸腔内に NK4 遺伝子を発現しうるアデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を投与し、このアデノウイルス投与による安全性、治療効果、可能であれば生物学的反応を検討する。投与方法は試験期間を 28 日間とし、Ad5CMV-NK4 を第 1 日目に 1 回胸腔内に注入する。当初は低用量 (1×10^{10} vp) で開始し、安全性に問題がない場合は、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) と 3 例ごとに増量する。試験終了時に安全性及び抗腫瘍効果について検討し、投与開始 12 箇月後まで 2 箇月毎に経過観察を継続する。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

悪性胸膜中皮腫は集学的治療により徐々にその予後は改善されつつあるが、初診時に進行症例となっていることが多く、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、より優れた集学的治療法の開発が望まれている。現在、シスプラチン+ペメトレキセドを用いた化学療法と放射線、手術を含めた multi-modality treatment の有効性が検討されているが、その効果については未だ確固たる結果が得られていない。また、第一選択薬による治療で抗腫瘍効果がなかった症例に対して、有効性が示されている第二選択薬はなく、積極的な治療の選択肢は残されていない。悪性胸膜中皮腫は幸いにも遠隔転移が少なく、胸腔内での局所浸潤がその主たる病変であるため、ウイルスベクターによる遺伝子治療が行い易い状況にある (21)。すなわちウイルスベクターを胸水中、胸腔内に投与すれば閉鎖空間である胸腔に留まり、腫瘍との接触時間が長くウイルス感染効率の向上が期待できる。しかも胸腔内は陰圧のためウイルスベクターは胸腔内全域に行き渡り、主病巣から離れた、胸腔内病変に対しても効果を及ぼす。また胸腔内投与では、ウイルスベクターに対する抗

体産生は通常の腫瘍内投与と比較しても大差なく (69, 70)、一方アデノウイルスベクターの肝への過剰な集積が起こりにくく、肝障害が少ないと想定される。また悪性胸膜中皮腫は他の悪性腫瘍と同様に血管新生能が高く、その作用の阻害は腫瘍の進展阻害に有用である。本臨床研究では安全性の検討が主であるが、NK4 蛋白質発現によって局所の腫瘍増殖の制御、治療による胸水の減少、呼吸困難感や疼痛の減少など QOL の改善効果も期待できる。また局所で産生された NK4 蛋白質が他の病変部位にも作用するため、遺伝子導入がされなかった病巣に対しても抗腫瘍効果を発揮できると考えられる。さらに遺伝子治療は蛋白製剤とは異なる利点を有している。NK4 蛋白質は血中半減期が 2 時間以内と短く短期間で失活するのに対して、腫瘍における遺伝子の発現によって、腫瘍局所、胸腔内での NK4 蛋白質の産生が比較的長期にわたって可能となる。したがって本研究の対象疾患である悪性胸膜中皮腫についてもアデノウイルスによる遺伝子発現は有効な治療法の一つとなりうると考えられる。

また本研究においては実施しないが、当該アデノウイルスと抗がん剤によるがん細胞に対する作用機序は異なるために、本遺伝子治療が有用であれば両者の併用効果も期待できる。

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

本臨床試験ではヒト NK4cDNA を組込んだ NK4 遺伝子発現組換えアデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を用いる。

6.1. 人に導入する遺伝子の構造と性質

6.1.1. NK4 遺伝子の構造

ヒト NK4 遺伝子はヒト HGF 遺伝子の部分配列であり、ヒト HGF 遺伝子は第 7 染色体長腕 (7q11.2-21) 上に位置し、18 個のエクソンから成り、728 アミノ酸残基 (aa) の蛋白質をコードする。HGF 蛋白質は α 鎖と β 鎖から成るヘテロダイマーであるが、 α 鎖と β 鎖は共に HGF 遺伝子にコードされており、1 本鎖のプレプロ HGF として翻訳後、2 本鎖にプロセッシングされる (図 6-1)。NK4 遺伝子は、HGF 遺伝子 5'側の 13 番目のエクソン途中までに相当し、HGF α 鎖全長から 16 アミノ酸残基少ない蛋白質をコードする。また NK4 蛋白質は、HGF 蛋白質がエラスターゼによって切断される分子内断片である (図 6-2)。HGF 蛋白質には、5 アミノ酸欠損 (aa162-166) したスプライシングバリエントが存在し (5 残基欠損型 HGF : 723aa)、本研究に使用する NK4cDNA はこの 5 残基欠損型 HGFcDNA から調製した。

6.1.2. NK4 遺伝子の性質

1419 bp からなる NK4cDNA の塩基配列を図 6-3 に示す。NK4cDNA は開始コドンのメチオニンからバリンまで 473 アミノ酸残基をコードする。本研究で使用する Ad5CMV-NK4 の構築には、ヒト RNA から RT-PCR 法によりクローニングされたヒト NK4cDNA を

用いている。

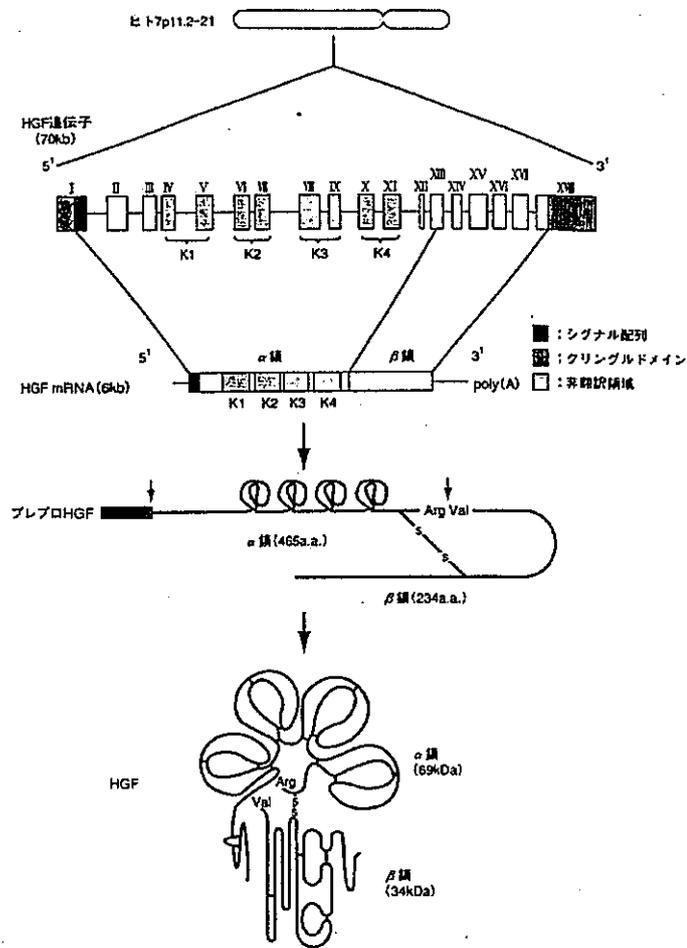


図 6-1: HGF 遺伝子、HGFmRNA、プレプロ HGF、並びに成熟 HGF 分子の模式的構造

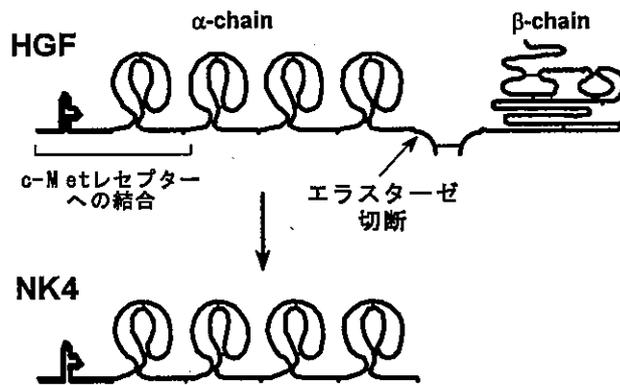


図 6-2. NK4 蛋白質の模式的構造

```

ATGTGGGTGACCAAACCTCTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCCTCCTGCATCTCCTCCTGCTC
CCCATCGCCATCCCCTATGCAGAGGGACAAAGGAAAAGAAGAAATACAATTCATGAATTCAAAAA
TCAGCAAAGACTACCCTAATCAAAATAGATCCAGCACTGAAGATAAAAACCAAAAAAGTGAATACT
GCAGACCAATGTGCTAATAGATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGCAAGGCTTTTGT
TTTGATAAAGCAAGAAAACAATGCCTCTGGTTCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAAAA
GAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAAAACAAAGACTACATTAGAACTGCATCATTTGGTAAA
GGACGCAGCTACAAGGGAACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGCCCTGGAGTTCC
ATGATAACCACACGAACACAGCTATCGGGGTAAAGACCTACAGGAAAACACTACTGTCGAAATCCTCGA
GGGAAGAAGGGGGACCCCTGGTGTTCACAAGCAATCCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATT
CCTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTATCGAGGTCTCATGGATCAT
ACAGAATCAGGCAAGATTTGTGACGCTGGGATCATCAGACACCACACCGGCACAAATTCCTTGCC
GAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTAATGCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCA
TGGTGTCTATACTCTTGACCCCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATTAATAACATGCGCTGACAAT
ACTATGAATGACACTGATGTTCTTTGGAAACAACCTGAATGCATCCAAGGTCAAGGAGAAGGCTAC
AGGGCACTGTCAATGACATTTGGAATGGAATCCATGTCAGCGTTGGGATTCTCAGTATCCTCAC
GAGCATGACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGCAAGGACCTACGAGAAAATTAAGTCCGAAATCCA
GATGGGTCTGAATCACCCCTGGTGTTTTACCCTGATCCAAACATCCGAGTTGGCTACTGCTCCCAA
ATTCCAAACCTGTGATATGTCACATGGACAAGATTGTTATCGTGGGAATGGCAAAAAATTATATGGGC
AACTTATCCCAAACAAGATCTGGACTAACATGTTCAATGTGGGACAAGAACATGGAAGACTTACAT
CGTCATATCTTCTGGGAACCAGATGCAAGTAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAAAATCCAGATGAT
GATGCTCATGGACCCTGGTGTCTACACGGGAAATCCACTCATTCCTTGGGATTATTGCCCTATTTCT
CGTTGTGAAGGTGATACCACACCTACAATAGTC

```

図 6-3. ヒト NK4cDNA の塩基配列 (1419 bp、終止コドンは含まない)

6.1.3. 導入遺伝子からの生成物 (NK4 蛋白質) の構造及びその生物活性

a) NK4 蛋白質の構造

図 6-4 に、ヒト NK4cDNA より予想されるヒト NK4 蛋白質の全アミノ酸配列を示した。ヒト NK4 蛋白質 (5 残基欠損型) は N 末端の分泌シグナル配列 (31 アミノ酸残基) を除く 442 アミノ酸残基から構成され、下記のような特徴的ドメインを有する。

細胞外分泌シグナル配列 :	aa1-31
N 末端ヘアピン構造 :	aa39-122
第 1 クリングル構造 :	aa126-202
第 2 クリングル構造 :	aa203-284
第 3 クリングル構造 :	aa297-379
第 4 クリングル構造 :	aa383-465

HGF は不活性型 1 本鎖プレプロ HGF として翻訳された後、細胞外分泌シグナル配列によって細胞外に分泌されプロセッシングを受けて 2 本鎖の活性型成熟分子となる (図 6-1)。N 末端ヘアピン構造とそれに続く第 1 クリングル構造は、c-Met レセプターとの結合に関与する。クリングル構造は、デンマークの菓子パンの構造と似ていることから名付けられた蛋白質の構造上の特徴であり、プラスミノーゲンなどの造血因子蛋白質に多く見られ、蛋白質間相互作用に関与すると考えられている (22)。各クリングル構造内には 3 箇所のジスルフィド結合があり立体構造を保持している。プラスミノーゲンの分子内断片でクリングル構造を持つアンジオスタチンにも血管新生阻害作用が認められており (23)、クリングル構造と血管新生阻害作用との関連が示唆されているが、詳細なメカニズムは不明である (22)。

NK4 蛋白質には下記のように 3 箇所の糖鎖付加部位が存在するが、グリコシダーゼ処理によって糖鎖を除去しても HGF アンタゴニスト活性及び血管新生阻害活性に影響は見られない。

アスパラギン (aa289) : N-結合型糖鎖
 アスパラギン (aa397) : N-結合型糖鎖
 スレオニン (aa471) : O-結合型糖鎖

Met Trp Val Thr Lys Leu Leu Pro Ala Leu Leu Leu Gln His Val Leu Leu His Leu
Leu Leu Leu Pro Ile Ala Ile Pro Tyr Ala Glu Gly Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr
 Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu
 Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg
 Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln
 Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His
 Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly
 Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp
 Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr
 Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu
 Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys
 Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln
 Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp
 Lys Gly Phe Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys
 Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp
 Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln
 Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg
 Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys
 Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe
 Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met
 Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser
 Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His
 Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn
 Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp
 Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val

図 6-4. ヒト NK4 蛋白質の全アミノ酸配列
 (473 アミノ酸残基、下線部はシグナル配列)

b) NK4 蛋白質の生物活性

HGF は、細胞膜を貫通する c-Met レセプターに結合することにより、細胞増殖促進、血管新生、遊走促進、形態形成など多面的な生物活性を発揮する。c-Met レセプターには、細胞質内領域にチロシンキナーゼ酵素活性を持つ部分が存在し、HGF が c-Met に結合すると細胞質チロシンキナーゼ酵素が活性化され、これにより細胞内に様々なシグナルが伝達される (24)。がん細胞の多くはこの c-Met を過剰発現しており、HGF の結合によって c-Met が活性化されると、カドヘリンなどの細胞接着分子を介した細胞間接着能が減少し、がん細胞の原発巣からの離脱が促される。また、HGF は基底膜やコラーゲンなど細胞外基質を分解する様々な蛋白質分解酵素の産生を促すとともに、がん細胞の活発な遊走をおこし、さらにはがん細胞と血管内皮細胞の接着を促進する。すなわち HGF/c-Met シグナル経路はがん細胞の浸潤・転移を強力に促進する (25, 26)。

一方 NK4 蛋白質は、c-Met 受容体への結合に関与する N 末端ヘアピン構造と第 1 クリングル構造をもっているため c-Met には結合するものの、c-Met のチロシンキナーゼを活性化しない (16, 24) (図 6-5)。つまり、NK4 はそれ自身生物活性を発揮することなく、HGF が c-Met 受容体に結合するのを競合的に阻害するアンタゴニストとして作用し、HGF の関与するがん細胞の浸潤・転移を強力に抑制する。さらに、NK4 は HGF のみならず VEGF や bFGF による血管新生をも抑制する作用を有する (18, 19)。従って、NK4 は

HGF アンタゴニスト活性と血管新生阻害活性を同時に有し、新規抗がん剤としての利用が期待される。

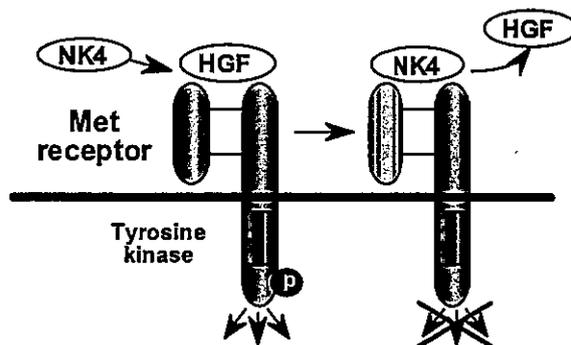


図 6-5. NK4 蛋白質による HGF アンタゴニスト作用

実験動物にがん細胞を移植する *in vivo* の実験系においても、NK4 蛋白質の抗腫瘍効果が実証されている。NK4 蛋白質を投与すると、胆嚢がん、肺がん、乳がん、前立腺がんなどの腫瘍でがんの浸潤・転移、腫瘍血管新生阻害が生じ、がんの増殖阻害が認められた (18, 27, 28)。また、膵臓がんの同所移植モデルにおいて、NK4 蛋白質はがんの増殖阻害に加え、腹膜播種性転移や腹水の貯留を強力に抑制し、延命作用を発揮した (29)。さらに、NK4 遺伝子を生体内で発現するための組換えアデノウイルスベクター、hydrodynamics 法によるプラスミドベクター投与などにより、肺がん、膵臓がん、胃がん、卵巣がん、大腸がんなどに対して、浸潤・転移阻害、増殖阻害等の抗腫瘍効果を惹起し、担がん動物の生存延長が観察されている (3-8, 30-32)。また、上記のいずれにおいても NK4 蛋白質の投与、NK4 遺伝子発現による目立った副作用は観察されないことから、NK4 遺伝子を腫瘍細胞等に発現させる方法は、副作用の少ない安全でかつ有効な治療法になることが期待できる。こらら内外の研究成果のうち、特に組換えアデノウイルスベクターを用いた成果を (添付資料 2, 3) にまとめた。

6.2. 本研究で使用するその他の組換え DNA の構造と性質

NK4 遺伝子発現カセットは、ヒト CMV プロモーター配列、コザック配列、NK4cDNA、SV ウイルス 40 (SV40) ポリアデニレーション配列から成る (図 6-6)。

CMV プロモーター配列 (828 bp) は、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。コザック配列 (6 bp) は、細菌由来のグアニン-シトシンを多く含む DNA 配列で、遺伝子の ATG 開始コドンの周辺で見つかった。遺伝子発現を最適化する作用を持つ。SV40 ポリアデニレーション配列 (146 bp) は、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。

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTTCATTGGTTATATAGCA TAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTT
 GTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCA ACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAG
 TTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCA TATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAA
 TGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACG TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTACGCCAAT
 AGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTACGGTAA ACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCC GCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGA
 CTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGTATT ACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGG
 GCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCAC CCCATTGACGTCATGGGAGTTTGTTTTGGCACCA
 AAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAAC TCCGCCCCA TTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGA
 GGCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCC TGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAG
 AAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGCCGGGAACGGTGC ATTGGAAGCTTGCCACCATGTGGGTGACCAAATC
 CTGCCAGCCCTGCTGCTGCAGCATGTCTCTGTCATCTCTCC TGCTCCCCATCGCCATCCCCATGCAGAGGGACAA
 AGGAAAAGAAGAAATACAAATTCATGAATTCAAAAATCAGCAA AGACTACCCTAATCAAATAGATCCAGCACTGAAG
 ATAAAAACAAGAAAGTGAATACTGCAGACCAATGTGCTAATA GATGTACTAGGAATAAAGGACTTCCATTCACTTGC
 AAGCTTTTGTGTTTTGATAAAGCAAGAAACAATGCCTCTGGT TCCCTTCAATAGCATGTCAAGTGGAGTGAAGAAA
 GAATTTGGCCATGAATTTGACCTCTATGAAAACAAGACTACA TTAGAACTGCATCATTGGTAAAGGACGCAGCTAC
 AAGGGAACAGTATCTATCACTAAGAGTGGCATCAAATGTCAGC CTTGGAGTCCATGATACCACAGAACACAGCTAT
 CGGGGTAAAGACTACAGGAAACTACTGTGCAAAATCCTCGAG GGGAGAAGGGGGACCCCTGGTGTTCACAAGCAAT
 CCAGAGGTACGCTACGAAGTCTGTGACATTCCTCAGTGTTCAG AAGTTGAATGCATGACCTGCAATGGGGAGAGTTAT
 CGAGGTCTCATGGATCATACAGAATCAGGCAAGATTTGTCAGC GCTGGGATCATCAGACACCACCGGCACAAATTC
 TTGCCTGAAAGATATCCCGACAAGGGCTTTGATGATAATTATP GCCGCAATCCCGATGGCCAGCCGAGGCCATGGTGC
 TATACTCTTGACCCCTCACACCCGCTGGGAGTACTGTGCAATTA AACATGCGCTGACAATACATGAATGACACTGAT
 GTTCCTTTGGAACAACCTGAATGCATCCAAGTCAAGGAGAAG GCTACAGGGGCACTGTCAATACCATTTGGAATGGA
 ATCCATGTTCAGCGTTGGGATTCCTCAGTATCCTCAGGAGCATG ACATGACTCCTGAAAATTTCAAGTGAAGGACCTA
 CGAGAAAATTACTGCCGAAATCCAGATGGGTCTGAATCACCCT GGTGTTTTACCCTGATCCAACATCCGAGTTGGC
 TACTGCTCCCAATTCCAAATGTCATGATGTCACATGGACAAG ATGTTATCGTGGGAATGGCAAAAATTATATGGGC
 AACTTATCCCAACAAGTCTGGACTAACATGTTCAATGTGGG ACAAGAACATGGAAGACTTACATCGTCATATCTTC
 TGGGAACCGATGCAAGTGAAGCTGAATGAGAATTACTGCCGAA ATCCAGATGATGATGCTCATGGACCCTGGTGTCTAC
 ACGGGAATCCACTCATTCTTGGGATTTATGCCCTATTTCTC GTTGTGAAGGTGATACCACCTACAATAGTCTGA
 TAACTAGACGAGATCCGAACCTGTTTATTGACGCTTATAATG GTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACA
 AATAAAGCATTTTTTTCCTGCATTCTAGTTGTGGTTGTGCCA AACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTAGATCT

図 6-6. NK4 発現カセットの全塩基配列。CMV プロモーター配列：赤文字 (1-828)、コ
 ザック配列：茶文字 (834-839)、NK4cDNA：緑文字 (840-2265、開始コドン 1 つと終止
 コドン 2 つを含む)、SV40 ポリアデニレーション配列：黒文字 (2271-2416)、制限酵素
 部位：青文字 (AAGCTT=Hind III, TCTAGA=Xba I)

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

ヒト由来の悪性胸膜中皮腫細胞 EHMS-10 (5×10⁶ 個) をヌードマウスの皮下に接種
 し、腫瘍接種後 10、14、21、28、35 日目に 10⁹ plaque forming unit (pfu) の Ad5CMV-NK4
 を腫瘍内に投与し、その後の腫瘍体積の変化を検討した。また、実験の対照として同じタ
 イプ 5 型で大腸菌の beta-galactosidase 遺伝子を発現するアデノウイルスベクター Ad-LacZ
 をやはり同用量の pfu で当該腫瘍内に投与した。その結果、Ad5CMV-NK4 を投与した腫
 瘍の増殖は著しく抑制されていたが、対照の Ad-LacZ 投与を受けた腫瘍の増殖は、未処理
 の場合と同程度であった (図 6-7)。また、当該腫瘍の蛋白質抽出液を調製し、ELISA 法
 を用いて NK4 蛋白質を定量したところ、Ad5CMV-NK4 を投与した腫瘍からは NK4 蛋白
 質が検出されたが、Ad-LacZ を投与した腫瘍からはまったく当該蛋白質は検出されなかつ
 た (図 6-7)。すなわち、Ad5CMV-NK4 投与によって NK4 蛋白質が産生され、その結果
 悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果が確認された。

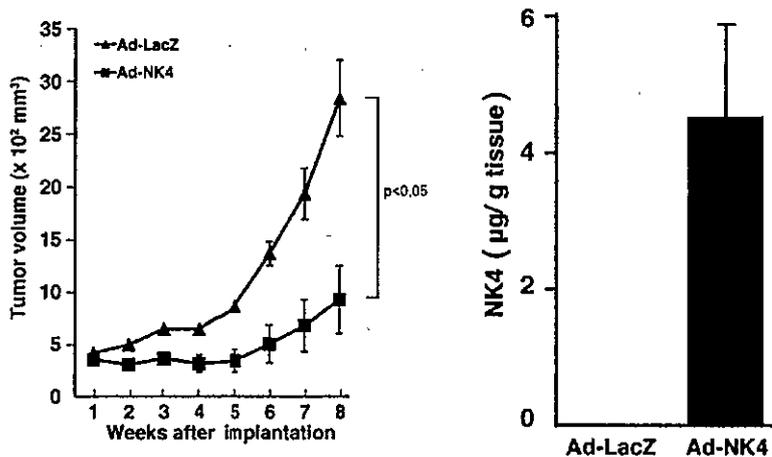


図 6-7. Ad5CMV-NK4 (Ad-NK4) の抗腫瘍効果。(左) ヒト悪性中皮腫細胞をヌードマウスに接種し、生着した腫瘍内に Ad5CMV-NK4 あるいは Ad-LacZ を投与し、その後の腫瘍体積を測定した。(右) Ad5CMV-NK4 あるいは Ad-LacZ を投与した腫瘍から蛋白質を抽出し、NK4 蛋白質の量を ELISA 法で測定した。

6.4. 遺伝子導入方法の概略及び当該導入法を選択した理由

6.4.1. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入方法の概略

本ベクターは、患者の胸腔内に直接注入する方法によって投与を行う。病理学的に確定診断を得た症例に対して、第一日目に Ad5CMV-NK4 を生理的食塩水で希釈し合計 100 ml とし、穿刺針を用いて一般的には第 6 肋間より静かに注入する。全量を注入した後、針を抜去し止血を確認し、約 2 時間ほど安静を保つ。腫瘍の位置に応じて適切な体位を選択し、腫瘍局所にウイルスがよく接触できるよう図る。

6.4.2. 当該導入法を選択した理由

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 (33)。

遺伝子導入で使用するのは、E1 領域欠損型の非増殖性アデノウイルスベクターである。Ad5CMV-NK4 では、E1A/E1B 遺伝子が欠損して、代わりにヒト NK4cDNA が CMV プロモーター及び SV40 ポリアデニレーションシグナルとともに組み込まれている。Ad5CMV-NK4 は通常の細胞では非増殖性であるが、E1A/E1B 遺伝子産物を持続的に発現させたヒト胎児性腎芽細胞由来 293 細胞やヒト胎児性網膜芽細胞由来の PER.C6™ 細胞 (Crucell 社) などの細胞で増殖し、高タイトーのウイルスとして調製することができる。この Ad5CMV-NK4 を他の培養細胞や動物組織に感染させると、高率に細胞内に侵入しウイルスのゲノムは染色体外に存在する。しかし、当該ウイルスは E1A 遺伝子が欠損しているため、E1A 遺伝子産物により発現制御されている他のすべてのアデノウイルスのプロモーター

ターは駆動することができず、ウイルスの生活環は停止しウイルスは増殖しない。一方感染細胞の核内では、外来性 CMV プロモーターにより転写活性化される NK4 遺伝子のみが翻訳され、当該蛋白質を発現する。アデノウイルスベクターは、染色体への積極的な組み込み機構を有しておらず、導入遺伝子の発現は細胞分裂とともに減少するため一過性となる。したがって、患者に直接ウイルスを投与する場合、当該ウイルスによる有害事象が長期にわたる可能性は少なく、また染色体への組み込みによる insertional mutagenesis が起こる可能性もほとんどない。また、アデノウイルスベクターは休止期 (G0/G1 期) の細胞にも感染可能であるため、ヒト正常組織にも当該遺伝子の発現は可能である。しかし、ヒト正常線維芽細胞株を用いた実験においては、NK4 遺伝子を過剰発現させた時にも細胞毒性を示さずその増殖にも影響を与えなかった。一般にアデノウイルスは 1×10^{12} vp までの高タイトアの調製が可能であり、過半数のヒト悪性上皮腫培養細胞では pfu=30 のウイルス量で 60%以上の細胞に遺伝子が導入される。また、ヒト肺癌細胞株のマウス皮下腫瘍モデルにおいて、 1×10^{10} pfu のアデノウイルスベクターを腫瘍内直接注入したとき、約 50-80%の細胞で発現を認めている。遺伝子導入効率は個々のがん細胞のタイプ 5 型アデノウイルスの受容体発現レベルによって異なると考えられるが、用いるベクターの用量を上げること、腫瘍に広く本ベクター液が分布するように投与することにより、高率な導入遺伝子発現を得ることができると考える。たとえ高率に遺伝子導入されなくとも、NK4 蛋白質は細胞外に分泌される蛋白質であり、腫瘍細胞表面の c-Met を介して効果を発揮するため、遺伝子非導入細胞に対しても抗腫瘍効果は期待できる。

6.5. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入

6.5.1. 野生型ウイルスの生物学的特徴及び人に対する影響

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、DNA と蛋白質から構成され、直径 65-80 nm の大きさで、正 20 面体である (図 6-8)。エンベロープはなく、約 36,000 塩基対の二本鎖線状 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 (33-37)。

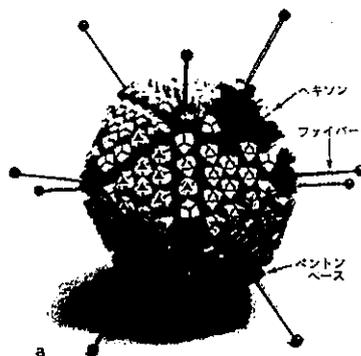


図 6-8. アデノウイルス粒子のキャプシド構造の模型図

c) 生活環 :

ヒトアデノウイルスの生活環は次のように考えられている (図 6-9) (33-38)。ウイルス粒子は、ファイバーを介して標的細胞の受容体 (33) 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が脱リン酸化され、細胞由来 mRNA の翻訳は著しく抑制される。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。

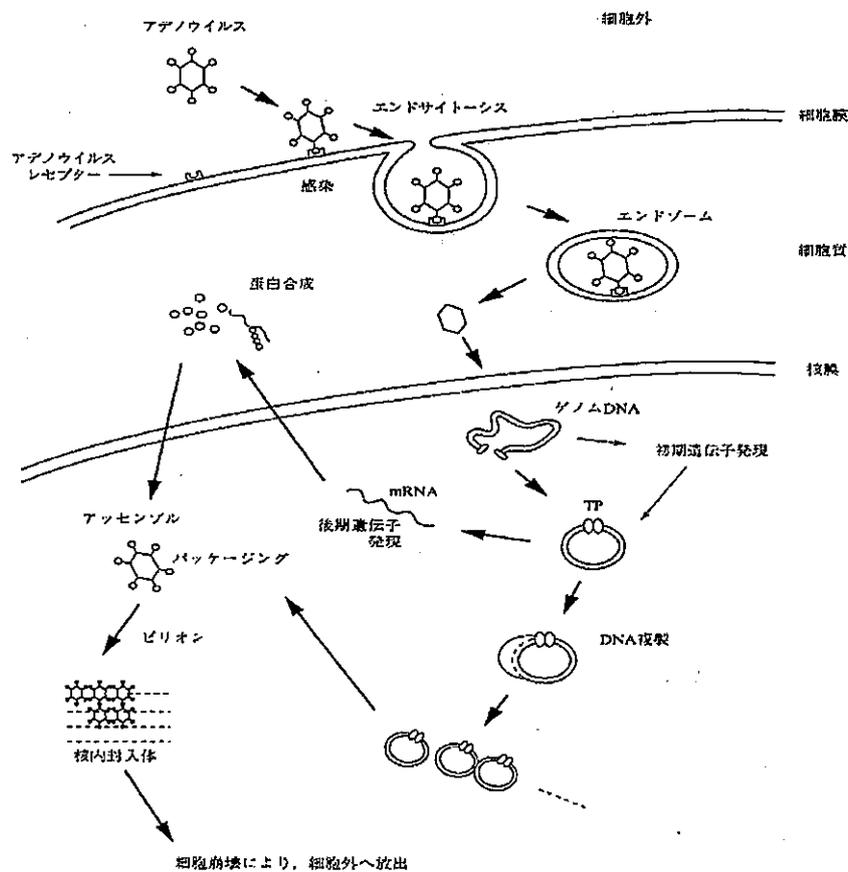


図 6-9. アデノウイルスの生活環

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、生活環を全うして、ウイルス粒子を産生できる動物種は限られており、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。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 (39)。

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由来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)。また肝移植患者において、免疫抑制剤服用下にアデノウイルス C 亜群由来のアデノウイルス肝炎が報告されている (39)。

アデノウイルス感染に関連した疾患について、表 6-1 に示した (39-46)。

表 6-1 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 (39)。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、ウイルス由来 mRNA が優先的に核から細胞質に移行し、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、宿主細胞は傷害されると考えられている。

6.5.2. ウイルスベクターの作製方法

本研究に用いられる Ad5CMV-NK4 は、分子生物学を専門とする者にとっては容易に作製しうるものであり、以下の手順によって作製された。プラスミドベクター pAdApt (Crucell 社) の Hind III 及び Xba I 制限酵素サイトにコザック配列 (GCCACC) を付加した NK4cDNA を挿入し、プラスミドベクター pAdApt.NK4 (図 6-10) を作製した。pAdApt.NK4 を Pac I 及び Sal I 制限酵素で、Ad5 ゲノム DNA を含むコスミドベクター pWE.AdAflII-rITRsp (Crucell 社、図 6-11) を PacI 制限酵素にて直鎖状にし、各 DNA 断片を精製した。上述の 2 種の DNA 断片をウイルス産生細胞である PER.C6TM (後述 7.1.3 ②) (47) に Lipofectamine200CD (Invitrogen 社) を用いたリポソーム法によって同時に組み込んだ。2 種の DNA 断片の相同組換えにより Ad5 の E1 領域が NK4 発現カセット (図 6-6) に組み換えられた Ad5CMV-NK4 の DNA 全長が形成された (Ad5CMV-NK4 の全塩基配列は添付資料 4 参照)。PER.C6TM ヘルパー細胞は Ad5 の E1 領域を約 4kb を内在しており転写活性因子 E1 を産生する細胞株である。この転写活性因子が E1 領域を除去した (M73260 において 460-3514 が欠損している) Ad5CMV-NK4DNA に働き、Ad5CMV-NK4 ウイルスが産生される。なお、PER.C6TM 細胞は従来の 293 細胞と異なり、Ad5CMV-NK4 の発現ベクターのカセット前後領域との相同部位を持たないので、PER.C6TM 由来の E1 遺伝子と Ad5CMV-NK4 の発現カセットとの相同組換えが理論上起こらない。しかし実際には低頻度ながら replication-competent adenovirus (RCA) の発生が報告されている。Ad5CMV-NK4 の全シーケンスは ALF ExpressTM 自動 DNA 解析装置 (Pharmacia Biotech 社) により、解析及び確認を行った。

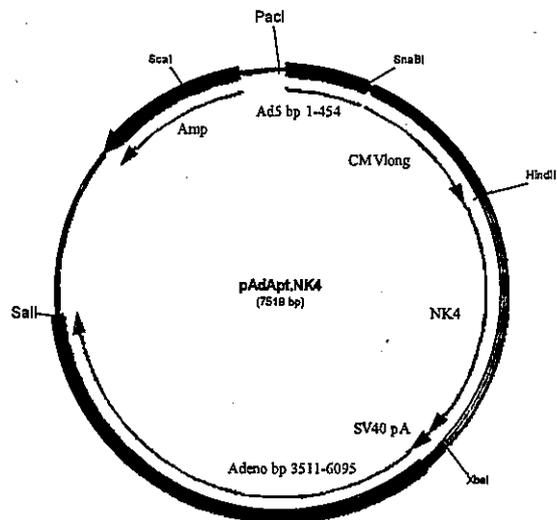


図 6-10. プラスミドベクター pAdApt.NK4 の制限酵素地図

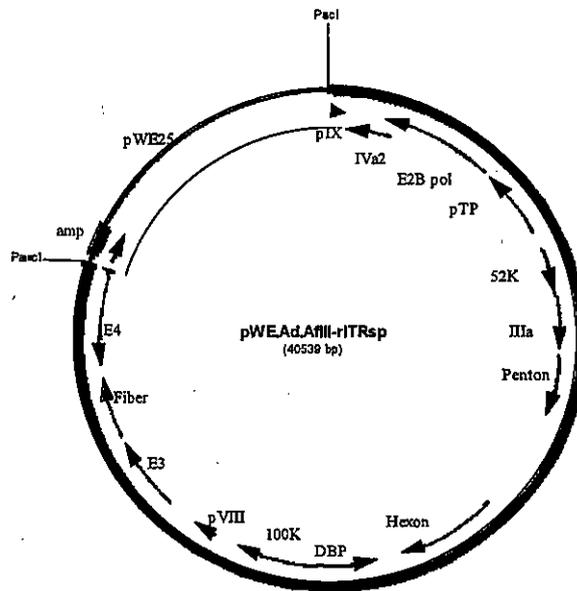


図 6-11. コスミドベクター pWE.AdAflIII-rITRsp の制限酵素地図

本研究に用いられるウイルスベクターは、神戸バイオメディカル創造センターの Biologics Laboratory で、cGMP 基準（国内薬事法に基づく医薬品 GMP 基準、及び現行の米国 Food and Drug Administration (FDA) の GMP 基準）に準拠して製造された。上記 Biologics Laboratory は神戸大学発ベンチャーの GMJ (旧株式会社ジーンメディシンジャパン) 社によって運営管理されており、神戸大学における膝関節細胞移植臨床研究の細胞調製を行っている実績もある。今回のウイルスベクター製造は、千葉大学の臨床研究実施研究者が共同研究者である神戸大学の臨床研究実施研究者と共に実施し、GMJ 社の指導をうけてなされており、マスターセルバンク、マスターウイルスシードストック（マスターウイルスバンク）など原材料から製造工程、最終製品に至るまで GMP 基準に準拠した品質管理がなされている。

6.5.3. ウイルスベクターの構造

アデノウイルスは全質量の 13%を占める DNA と 87%を占める蛋白質から成り、直径 65-80nm の正二十面体の構造を有する（図 6-8）。ウイルス DNA は約 36kb の長さで、アデノウイルス蛋白質の発現は、一般的に早期蛋白質と後期蛋白質とに分類される。6 つの早期蛋白質が E1A、E1B、E2A、E2B、E3、E4 であり、後期蛋白質は L1、Iva2、IX である。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 蛋白質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 Ad5CMV-NK4 ベクターは、E1A 及び E1B 部分が欠損しておりその欠損部に CMV プロモーターで転写制御される NK4cDNA が挿入されている。なお、CMV プロモーター配列、コザック配列、NK4cDNA 遺伝子及び SV40 ポリアデニレーション配列を含む発現カセットの全塩基配列を図 6-6 に、Ad5CMV-NK4 ベクターの全塩基配列を添付資料 4 に示す。

6.5.4. ウイルスベクターの生物学的特徴

Ad5CMV-NK4 は、ヒトアデノウイルス 5 型由来の非増殖型アデノウイルスベクターであり、ウイルス粒子構成蛋白質には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に種特異性は低く、哺乳類・鳥類由来のほとんどの細胞に遺伝子導入が可能であり、かつ組織特異性も低く分化程度の高い神経系、筋系、肝細胞から未分化な上皮細胞、線維芽細胞まで遺伝子を導入することができる (34, 36, 38)。また、レトロウイルス等と異なり、休止期 (G0/G1 期) の細胞に対しても遺伝子導入が可能である (48)。さらに野生型アデノウイルスと同様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、外来遺伝子の発現は一過性になる。また、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 (34, 36, 38)。アデノウイルスベクターは標的細胞の受容体に結合し、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 (36)。すなわちアデノウイルスベクターの遺伝子導入効率は他の既存のベクターに比較して極めて高く、ウイルスの用量依存的に導入遺伝子の発現量を上げることが可能である。導入遺伝子の発現は、導入される細胞や用いられるプロモーターによって異なるが、上記のように green fluorescence protein を CMV プロモーターで発現制御可能なアデノウイルスを用いた場合、 $pfu=30$ の条件下でヒト悪性中皮腫細胞 NCI-H226 では 80%、NCI-H28 では 85%、NCI-H2452 では 55% の遺伝子導入効率を得ている。

7. 安全性についての評価

7.1. 遺伝子導入方法の安全性

7.1.1. 遺伝子導入に用いるウイルスベクター

本研究に用いられる Ad5CMV-NK4 ウイルスベクターは、神戸バイオメディカル創造センターの Biologics Laboratory で、千葉大学と神戸大学の臨床研究実施研究者が共同で cGMP 基準 (国内薬事法に基づく医薬品 GMP 基準、及び現行の米国 FDA の GMP 基準) に準拠して製造した。GMP 基準に準拠したウイルスベクター製造の指導を、上記 Biologics Laboratory を運営管理している神戸大学発ベンチャーの GMJ 社 (旧株式会社ジーンメディクスジャパン) が行い、マスターセルバンク、マスターウイルスシードストック (マスターウイルスバンク) 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ウイルスベクターが製造され、保管されている。最終製品については、各種ウイルスやマイコプラズマの混入がなく、無菌試験、エンドトキシン試験にて下記項目が陰性であることが確認された (表 7-1)。当該検査の試験の結果は添付資料 5 に示す。

表 7-1 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
力価測定	吸光度による virus particle、TCID ₅₀ 法
ウイルス検出試験	PCRによるHBV, HCV, HIV-1, HTLV-1, Parvovirus B19の検出
マイコプラズマ検出試験	PCRによるマイコプラズマ遺伝子検査
無菌試験	ソイビーンカゼインダイジェスト培地、液状チオグリコール酸培地

	にて生育可能な細菌・真菌の検討
エンドトキシン検出試験	第十五改正日本薬局方におけるエンドトキシン試験法
RCA 検出試験	A549細胞を用いたCPE検出法

また、アデノウイルスベクターの調製に使用する PER.C6™ 細胞のマスターセルバンク、ワーキングセルバンク及び Ad5CMV-NK4 マスターウイルスシードストック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。マスターセルバンク等及びマスターウイルスシードストックの試験項目は下記の表 7-2、7-3 のとおりである。当該検査の試験の結果は添付資料 5 に示す。

表 7-2 マスターセル・ワーキングセルバンクの品質管理試験

No.	試験項目
1	チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
2	エンドトキシン否定試験
3	マイコプラズマ否定試験
4	HTLV-I 否定試験 (PCR 法)
5	HCV, HBV 否定試験 (PCR 法)
6	HIV-1 否定試験 (PCR 法)
7	サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
8	EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
9	Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)
10	アデノウイルス検出試験 (抗アデノウイルス抗体による蛍光染色)
11	ウイルス分離試験 (HEL ヒト胎児肺由来細胞、HeLa, Vero, RD ヒト横紋筋由来細胞、MDCK イヌ腎臓由来細胞, A549 細胞を用いた CPE 検出試験)

表 7-3 マスターウイルスシードストックの品質管理試験

No.	試験項目
1	チオグリコレートブイヨン・トリプケースイブイヨンによる無菌試験
2	エンドトキシン否定試験
3	マイコプラズマ否定試験
4	HTLV-I 否定試験 (PCR 法)
5	HCV, HBV 否定試験 (PCR 法)
6	HIV-1 否定試験 (PCR 法)
7	サイトメガロウイルス否定試験 (PCR 法)
8	EB ウイルス否定試験 (PCR 法)
9	Parvovirus B19 DNA 否定試験 (PCR 法)

7.1.2. 患者に投与する物質の安全性

ベクターの安全性を調べるために以下の毒性試験を実施した。Crlj: CD1 (ICR) 系雄性マウスを用いて Ad5CMV-NK4 の単回静脈内投与による安全性試験を実施した。Ad5CMV-NK4 の投与量は、高用量 (1.25×10^8 pfu/匹) 及び低用量 (1.25×10^6 pfu /匹) の 2 用量とし、対照群のマウスには PBS(-) を静脈内投与した。投与後 1、3 及び 14 日後に採血し血清を採取した。また、採血終了後、脳、肺、肝臓、腎臓及び精巣を摘出し重量測定後、肺、腎臓及び精巣については左側を、脳については正中線で 2 分割した左側を、肝臓については最も大きい葉 (左葉) を液体窒素で凍結し保存した。他方はホルマリン固定して保存した。試験群構成と使用動物数を表 7-4 に示す。

表 7-4 毒性試験群構成と使用動物数

試験群	使用動物数 (動物番号)		
	解剖時期		
	投与 1 日後	投与 3 日後	投与 14 日後
対照群	6 (101-106)	6 (107-112)	6 (113-118)
高用量群	6 (201-206)	6 (207-212)	6 (213-218)
低用量群	6 (301-306)	6 (307-312)	6 (313-318)

投与 1 日後に低用量群の 1 匹が死亡した。しかし、高用量群で死亡例はなかったことから、死因はマウス尾静脈注射の手技上の問題に起因すると考えられる (49)。投与 2 及び 3 日後に高用量群の 2 匹に、自発運動減少、脱毛、後肢浮腫及び痂皮形成がみられ、低用量群の 2 匹に脱毛及び自発運動減少がみられた。投与 3 日後に低用量群の 1 例に自発運動減少、失調歩行、脱毛及び体温低下がみられた。ホルマリン固定後の各臓器の H-E 染色標本では、高用量群、低用量群とも対照群と同様の組織像で、Ad5CMV-NK4 の正常組織への病理組織学的影響は認められなかった。高用量投与群、すなわち 6.25×10^9 pfu/kg 体重 (マウスの体重 20 g) までの用量では重篤な毒性症状は認められなかった。本臨床研究の高用量群 1×10^{12} vp は pfu 換算 (vp/pfu = 10) では 1×10^{11} pfu に相当し、ヒト体重を 50 kg と仮定すると 2×10^9 pfu/ kg 体重の用量となる。したがって、本毒性試験では、ヒトへの高用量群の 3 倍以上の Ad5CMV-NK4 を静脈投与したことになる。実際の臨床研究の投与方法は、より毒性の低い胸腔内投与である。なお、本毒性試験の詳細な結果を添付資料 6 に示す。

7.1.3. 増殖性ウイルス出現の可能性

①増殖性アデノウイルス (RCA) 出現の機序

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 2 型若しくは 5 型の C 型アデノウイルスである。また外来性の遺伝子を発現するアデノウイルスは、多くの場合ウイルス複製に必要な E1 領域がウイルスゲノムより除かれ、この部分に特定の目的遺伝子に置き換えられた非増殖性ウイルスである。それらの組換え型アデノウイルスでは、E1 遺伝子を有する細胞に導入された時、すなわち細胞由来の E1 由来転写活性因子が存在する状況においてはじめて複製増殖可能となる。言いかえると、非増殖性アデノウイルスは、感染によって目的遺伝子の発現は可能であるが、E1 遺伝子を発現しない一般の細胞内ではウイルスの複製増殖が生じない。ウイルス複製増殖の起こらないこのようなベクターを

用いた場合のウイルス感染及び遺伝子発現の過程は、いわゆる第1世代アデノウイルスベクターを用いたほとんどの場合に共通である。このような非増殖型アデノウイルスベクターの増幅に用いられる細胞株として、293細胞株がその代表である。293細胞株は胎児性腎細胞由来であり、アデノウイルスのE1領域遺伝子が導入されて、同細胞はヒト5型アデノウイルスの左腕の12%を含んでいる。組換え型アデノウイルスが293細胞に感染すると（あるいは当該アデノウイルス遺伝子の導入によって）、293細胞により提供されるE1遺伝子産物によって、初めて組換え型アデノウイルスの複製が可能となる。作製されたアデノウイルスはさらに293細胞内にて次々と増殖させることができる。

上述のように、293細胞の内在するE1領域はアデノウイルスゲノムのnt 1-4137の領域に相当するが、非増殖型の組換え型アデノウイルスは多くの場合nt 400-3500の領域のみが欠失しているだけで、依然として共通部位を有している。したがって、293細胞内のE1領域と組換え型アデノウイルスの発現カセットの当該領域との間に相同組換えが生じ、E1領域を含む増殖性アデノウイルス（RCA）が産生される可能性がある。一般に、293細胞への1粒子の組換え型アデノウイルスの感染は10,000粒子以上の子孫アデノウイルスを生じ、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 10^6 回の組換えイベントに1回程度であると想定されている。

②PER.C6™細胞使用による増殖性アデノウイルス出現リスクの低減

RCA出現の原因となるウイルス産生細胞と組換え型アデノウイルスとの間での相同組換えの対策として、PER.C6™ヘルパー細胞がオランダにあるCrucell社によって開発された(47)。PER.C6™細胞はヒト胎児性網膜芽細胞に、Ad5ゲノムのE1A及びE1B領域（Ad5 nt 459-3510）のみを含んだE1領域遺伝子を導入したものである。このE1領域にはAd5のE1プロモーター及びポリAシグナルは含まれておらず、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター及びB型肝炎ウイルスのポリA付加シークエンスが組み込まれている。また同時にAd5のE1領域（Ad5 nt 455-3510）を欠失させた組換え型アデノウイルスを作製するためのpAdAptシャトルベクター（6.5.2. ウイルスベクターの作製方法の項参照）も同時に開発された。これらのPER.C6™システムにより作製された組換え型アデノウイルスは、PER.C6™細胞との相同部位を全く持たないため、従来の293細胞に比較してRCAの出現頻度は低下している。

7.1.4. 遺伝子導入に用いるウイルスの細胞傷害性

前述7.1.2のマウスを用いた毒性試験において、Ad5CMV-NK4の正常組織への病理組織学的影響は認められなかった。また、6-7週齢ICRマウスの尾静脈に 1.25×10^8 pfuのAd5CMV-NK4ウイルスベクターを投与したところ、1箇月間に渡って血中、肝臓、肺、腎臓においてNK4の産生が認められたが、この間マウスに外見的な異常はなく、大きな副作用は全く認められなかった（添付資料6）。さらに、ヌードマウスの皮下に移植した腫瘍に 1×10^9 pfuのAd5CMV-NK4ベクターを局所注入あるいは腹腔内投与しても、1箇月間の観察期間中いかなる副作用も認められなかった（3-5, 7）。従って、Ad5CMV-NK4ベクターは本臨床研究の投与濃度では細胞傷害性は極めて低いと考える。

7.1.5. 体内の標的細胞以外の細胞への遺伝子導入の可能性

本臨床研究では、Ad5CMV-NK4 を胸腔内に直接局所注入する。しかし胸腔内からウイルスが血管系に漏出する可能性を完全に否定できない。そこで、血中にウイルスを注入し各組織における NK4 遺伝子発現様式を調べた。7.1.2. で述べた毒性試験において、各組織より抽出した DNA を用いてウイルス投与後の各臓器中に存在するアデノウイルス量を検討した結果では、高用量投与群において、投与 14 日後でも肝組織中にアデノウイルス DNA の存在が確認され、肺には投与 1 日後のみアデノウイルス DNA の存在が確認されたが、低用量投与群においては、いずれの臓器においてもアデノウイルス DNA の存在は確認されなかった。一方、組織より抽出した RNA を用いて各臓器中での NK4 mRNA 発現を確認した結果においては、高用量投与群の投与 1 日後の肺・肝・精巣組織、また、投与 3 日後の肝組織にアデノウイルス非投与の対照群と比較して高いレベルで NK4 の発現を認めたと、それ以外では対照群と同程度のレベルの NK4 mRNA の発現状況であった。

以上より、高用量の Ad5CMV-NK4 ウイルスペクターが投与される時、肝臓及び肺にベクターが分布する可能性が示された。しかし、アデノウイルスベクターの性質上 NK4 mRNA の発現は一過性となり、また免疫系が作用する生体では長期間にわたり、アデノウイルスベクターが各組織で存在することは考え難い。

7.1.6. 患者以外の人に遺伝子が導入される可能性

Ad5CMV-NK4 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、アデノウイルス投与を受けた患者は、心電図モニターを装着して状態を管理し、排泄物に関しては投与後 1 週間ないしはウイルスの陰性化が確認されるまでバイオハザードとして取り扱う。院内における患者並びに患者の検体の取り扱いについては、「千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科学 遺伝子治療取扱い指針」（添付資料 7）に従って管理する予定である。米国で実施されている臨床試験においては、アデノウイルスベクターを投与された後、患者は帰宅することが可能であるが、その理由としては患者の尿中あるいは唾液中に排泄されるベクターは、最高投与量の 1×10^{11} pfu 投与時でも 1×10^6 pfu と、投与されたベクターの 10 万分の 1 量にすぎないからである。また、7.1.3. の項で示したように、本臨床研究に使用する Ad5CMV-NK4 は PER.C6TM 細胞を宿主として生産されるため、理論上 RCA の出現は起こりえない。

7.1.7. 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

アデノウイルスは宿主細胞のゲノムに組み込まれることなく複製し、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く、また組み込み部位も一定の部位ではない。さらに、Ad5CMV-NK4 ウイルスペクターによる NK4 蛋白の発現は、遺伝子導入細胞の分裂、細胞死等により一過性である点も、安全性を考慮する上で長所と考えられる。

7.1.8. 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 51 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 (表 7-5)。

表 7-5 ヒトアデノウイルスの分類と造腫瘍性

亜 群		ウイルス DNA の相同性		造腫瘍性	トランスフォー メーション
		亜群内	他亜群		
A	12, 18, 31	48-69%	8-20%	強 (4 箇月以内 100%腫瘍形成)	+
B	3, 7, 11, 14, 16, 21	89-94%	9-20%	弱 (4-18 箇月で 少数の動物で腫 瘍形成)	+
C	1, 2, 5, 6	94-100%	10-16%	-	+
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42- 47	94-99%	4-14%	- (9 型はラット 乳腺に線維腺腫 を形成)	+
E	4	-	4-23%	-	+
F	40, 41	未知	未知	未知	未知

上記 6 亜群中、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 箇月以内に 100%の腫瘍形成を示す。しかし、Ad5CMV-NK4 が由来する 5 型を含む C 亜群、ほとんどの D 亜群のウイルス、及び E 亜群のウイルスは造腫瘍性を示さない (50)。最近、12 型及び 5 型のウイルスを用いた解析から造腫瘍性の有無は、各亜群のウイルスの E1A 遺伝子の機能の有無によることが明らかにされてきた。すなわち、E1A 遺伝子が、宿主細胞の組織適合性抗原を支配する遺伝子 (マウスでは H-2) の発現を抑制する機能を持つ時に造腫瘍性が認められる (50)。また最近になって、D 亜群に属する 9 型が造腫瘍性を示すことが報告された。A 亜群及び B 亜群のウイルスが注入部位に腫瘍を作るのに対し、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がんを生じさせる。この乳がんの発症には、9 型の E4orf1 遺伝子産物が必要であることが知られている (51-53)。しかし、現時点においてヒトアデノウイルスがヒトの腫瘍に関与していないことは疫学的にも知られており、ヒトでのがん原性はないと考えられる (48, 50-53)。

一方、*in vitro* では、C 亜群を含むほとんどすべてのヒトアデノウイルスは、ハムスター、ラット等齧歯類の培養細胞をトランスフォームする。齧歯類の培養細胞をトランスフォームするためには、初期遺伝子中 E1A、E1B の両領域の遺伝子が関与することが知られている (50)。E1A 遺伝子産物は、他のアデノウイルス由来初期遺伝子を活性化させるばかりでなく、転写因子として宿主由来の様々な遺伝子の転写の促進又は抑制に関与している。また、培養胎児細胞の不死化に必要であり、RB 蛋白等がん抑制遺伝子に結合することが知られている。E1B 遺伝子産物は、E1A 遺伝子産物と共同でトランスフォーメーションに関

与しており、E1B-55K 蛋白質は、正常型 p53 蛋白質と結合し、その機能を阻害する一方、E4 と結合し、宿主細胞由来の mRNA の核から細胞質への移行を阻害する (53)。最近、5 型の E4 領域にコードされている蛋白質 (E4orf6) が、p53 蛋白質に結合することによりその機能を抑制し、E1A 及び E1B と共存することにより齧歯類の細胞をトランスフォームすることが示されたが、E4orf6 蛋白質だけでは細胞をトランスフォームすることはできない (52, 53)。一方 9 型の E4 領域にコードされている蛋白質 (Ad9, E4orf1) が、E1A 及び E1B と共存することなく、単独でラット新生児由来細胞をトランスフォームすることが可能である (51)。9 型の E4orf1 蛋白質が細胞をトランスフォームするときのメカニズムは明らかになっていないが、9 型と 5 型の当該領域の DNA の相同性が 14%以下と低いことが明らかになっている (52)。Ad5CMV-NK4 では E4 領域は残存しているが、E1A、E1B 領域は欠損しているため、齧歯類の細胞に対してもトランスフォーメーション活性はなく、ヒトにおけるがん原性はないと考えられる。また、本ベクター製剤中に、僅かな野生型アデノウイルスの RCA が混入していたとしても、この野生型のアデノウイルスはヒトに発がん性を有しておらず、RCA がヒトの造腫瘍性に関与することはない。したがって、本製剤をヒトに投与することによりがんを生じる可能性は極めて低いと考えられる。

7.2. 遺伝子産物の安全性

6.1.で述べたように NK4 蛋白質は HGF の分子内断片であり、エラスターゼ消化によって HGF から生産されることから、生体内にもともと存在し HGF のアンタゴニストとして恒常性の維持に寄与しているものと推測される。また、7.1.4.で述べたように正常細胞において NK4 蛋白質が過剰発現しても、細胞傷害性や増殖抑制作用は認められなかった。さらに、マウス担がんモデルにおいて、NK4 蛋白質を腹腔内に 1.5 mg/kg/day を 2 回/日で連日投与、400 mg/kg/day の持続投与、9 mg/kg/day を 2 回/日で連日投与などを行ったが、肝及び腎機能の低下等の特段の毒性は観察されず、体重減少なども認められなかった (28, 29)。NK4 の腹腔内投与後の血中動態から 1.5 mg/kg/day を 2 回/日、腹腔内投与の場合、血中濃度が約 0.5 ng/ml レベルと推定される。Ad5CMV-NK4 による NK4 蛋白質の発現は、遺伝子導入細胞の生存に依存して一過性であり、長期的発現に伴う副作用についてもその可能性は低いと考えられる。通常の生理的条件下では血中の HGF レベルは非常に低く (0.2-0.3 ng/ml)、HGF は恒常的な生理機能を維持するのに重要な機能を担ってはいないと考えられる。しかし、NK4 が HGF の生理作用を抑えることによって軽度の肝傷害、創傷治癒の遅延などの副作用が懸念される。特に、肝傷害の発生時、あるいは組織障害の発生時には、肝再生の抑制・遅延、創傷治癒の遅延が懸念される。また、すでに臨床で使用され血管新生阻害効果を有する bevacizumab (アバスタチン®) において、胃腸穿孔、出血、血栓症、高血圧などの有害事象の可能性が報告されていることから、同様な抗血管新生作用を有する Ad5CMV-NK4 においても当該有害事象の可能性が想定される。

8. 遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する根拠

8.1 当施設における悪性胸膜中皮腫の診療の実績

悪性胸膜中皮腫の症例は本邦においては年間 1,000 例を越えた程度であり、当該施設においても多いものではない。しかし当該疾患の診療では共同研究施設である千葉労災病院がアスベスト疾患センターを有しており、南関東近辺で多くの症例が集積されている施設の一つである。また、南関東周辺の悪性胸膜中皮腫の確定診断が千葉大学で集中的に行わ

れ、症例が集積されている。当施設では 1997 年より難治性腫瘍に対する遺伝子治療研究を行っており、ウイルスベクターを用いた基礎的な実験の経験も豊富である。遺伝子治療の基礎的研究成果を数多く報告している (54-58)。また、千葉県がんセンター等の施設とも共同研究体制も確立しており、当施設の分子生物学及びウイルスベクターに関する基礎的背景は十分であると考えられる。さらに、当施設ではすでに本臨床研究で供試する Ad5CMV-NK4 と同様の構造を持つ Ad5CMV-p53 (CMV プロモーターでがん抑制遺伝子 p53 を発現しうるタイプ 5 型アデノウイルス) による遺伝子治療臨床研究が実施されており、これまでに 10 例の食道がん患者に合計 51 回の治療実績を有している (59)。従って、遺伝子治療における知見が十分に蓄積されており、また遺伝子治療を実施するにあたり、排気がヘパフィルターを介し P2 に対応した感染管理部の個室を使用することから、必要な設備も整備されている (添付資料 7, 8 参照)。以上より切除不能例の悪性胸膜中皮腫を対象とした遺伝子治療臨床研究は当施設において実施可能であると判断した。

8.2. 臨床試験の報告からみた本研究の妥当性について

本臨床研究は切除不能例悪性胸膜中皮腫に対するものであり、胸腔内にアデノウイルスを投与する。NK4 遺伝子を治療に用いた臨床試験はまだなく、悪性胸膜中皮腫を対象とした臨床試験も本邦ではまだ行われていない。しかし以下にあるように、米国において他のアデノウイルスベクターを胸腔内に投与した悪性胸膜中皮腫に対する第 I 相遺伝子治療臨床試験で十分な安全性の成績が得られている。

- 1) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、千葉大学、岡山大学、神戸大学などで実施され、国内外の遺伝子治療臨床研究に用いられるベクターとしてアデノウイルスベクターは安全性が高いとされている (59)。当施設でもすでに本臨床研究で使用する Ad5CMV-NK4 と同様の構造を持つ Ad5CMV-p53 による遺伝子治療臨床研究が実施されており、これまでに 10 例の食道がん患者に合計 51 回の治療実績がある (60)。遺伝子治療における知見が十分にあり、本臨床研究の実施における安全性を十分確保した上で、施行可能である。
- 2) 米国ではペンシルバニア大学で Ad5CMV-NK4 と同じタイプ 5 型に属するアデノウイルスベクターを用いた悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療として実施され、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (アデノウイルスベクター投与後にプロドラッグであるガンシクロビルを投与) あるいはインターフェロン・ベータ (interferon-beta, IFN- β) 遺伝子を悪性胸膜中皮腫患者等の胸腔内に投与する研究が報告されている (61, 62)。これらはすべて第 I 相の臨床試験であるが、安全性については全症例において重篤なものはなく、また一部では長期生存の例も報告されている (61)。また、胸腔内投与は比較的容易な手法である。
- 3) また最近、2)と同じ研究グループより、2 種類のアデノウイルス (IFN- β および IFN- α 2b) を 2 回胸腔内投与した臨床試験の結果が報告された (79, 80)。最初のアデノウイルス投与によって生じた抗アデノウイルス抗体によって、2 回目の投与の遺伝子導入効率が落ちる可能性があり、そのため 2 回目の投与はより早期に行うべきであることがその論文の主旨であるが、一方で腫瘍に対する抗体が生じた可能性にも言及している。安全性については、IFN- β を発現するアデノウイルスベクターのフェーズ I 試験 (最大投与量 3×10^{12} vp、7 例を含む) で、17 名の対象患者中、肺がん患者 1 名に部分トロンボプラスチン時間の延長、肺がん患者 1 名に心タンポナーデが見られたが、そ

の他には重篤な有害事象はなかった (79)。また、同試験において、前者はその他特段の異常を認めず、後者は心嚢穿刺で症状が改善されていた。また、IFN- α 2b を発現するアデノウイルスベクターを用いたパイロット試験 (最大投与量 1×10^{12} vp) では、IFN- α 2b によると思われるインフルエンザ様症状が見られたが、その他リンパ球減少 (グレード4) 以外、おおむね忍容性が確保されていた (80)。

- 4) 中国ではすでにアデノウイルスベクターを用いた p53 遺伝子治療剤 "Gendicien" (SiBiono GeneTech 社、<http://www.sibiono.com>) (63) と E1B-55kDa 分子を欠損させた "Oncorine" (開発コード:H101、Shanghai Sunway 社、<http://www.sunwaybio.com.cn/>) (64) が中国 FDA によって認可され販売されている。「Gendicien」「Oncorine」とも頭頸部がんが主な対象疾患であり、その臨床試験成績ならびに安全性については公開されている (65, 66)。両遺伝子医薬とも重篤な副作用は認められず、唯一の副作用として3分の1の症例で発熱の症状が確認され、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療の安全性と有用性が確認されている。とりわけ胸腔内投与の例も一部ではあるが報告されており (67)、いずれの症例においても安全性が高いことが確認されている。

9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画

9.1. 研究の概要

切除不能悪性胸膜中皮腫症例を対象として、NK4 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) の局所投与による臨床研究である。主たる評価項目は Ad5CMV-NK4 1 回投与の際の投与量の増加による安全性の検討、有害事象の有無であり、従たる評価目的として抗腫瘍効果、すなわち奏効の持続期間、腫瘍進行までの期間、生存期間を評価する。またがんに伴う病的状態 (QOL、疼痛、PS) に対する改善効果の評価も行う。

9.2. 被験者の選択基準及び除外基準

下記の基準を満たす患者を対象とする。

- 1) 切除不能悪性中皮腫症例であり、放射線治療歴を有さない症例。切除不能悪性中皮腫症例とは、生検等によって病理学的に悪性胸膜中皮腫が確認されている症例で、臨床病期は問わず、登録時点で手術不能と診断されているか、手術を拒否している症例を指す。
- 2) 以下のいずれかに該当する症例
 - A) 悪性胸膜中皮腫に対する化学療法後に PD と判定された症例。
 - B) 悪性胸膜中皮腫に対する化学療法を拒否している症例。なおいずれの症例についても、化学療法を受けた場合については、Ad5CMV-NK4 投与前に、化学療法施行後4週以上経過していること。
- 3) 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。
- 4) Ad5CMV-NK4 を含む溶液を注入可能なスペースを胸腔内に有するもの。
- 5) 同意取得時点の年齢が20才以上80才以下の男性及び女性。

- 6) ECOG PS が 0 あるいは 1 であること。
 PS0：全く問題なく活動できる。発病前と同じ日常生活が制限なく行える。
 PS1：肉体的に激しい活動は制限されるが、歩行可能で、軽作業や座っての作業は行うことができる。例) 軽い家事、事務作業。
 PS2：歩行可能で自分の身の回りのことはすべて可能だが作業はできない。日中 50% 以上はベッド外で過ごす。
 PS3：限られた自分の身の回りのことしかできない。日中の 50%以上をベッドか椅子で過ごす。
 PS4：全く動けない。自分の身の回りのことは全くできない。完全にベッドか椅子で過ごす。
- 7) 妊娠・授乳をしていない、又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。患者あるいは患者の配偶者が妊娠した場合、患者が臨床研究分担医師にその旨伝えることについて、同意していること。
- 8) 以下の項目を満たし、骨髄機能、肝機能及び腎機能が適切であること。
 ① 白血球数：3000/mm³ 若しくは好中球数 2000/mm³ 以上
 ② 血小板数：10 万/mm³ 以上
 ③ ヘモグロビン量：9.0 g/dl 以上
 ④ 総ビリルビン：医療施設の基準値上限の 1.5 倍以下
 ⑤ ALT/SGPT, AST/SGOT：医療施設の基準値上限の 2 倍以下
 ⑥ アルカリフォスファターゼ：医療施設の基準値上限の 5 倍以下
 ⑦ 血清クレアチニン：1.5 mg/dl 未満
 ⑧ PT 及び APTT：医療施設の基準範囲内
 ⑨ 大気吸入下での経皮的酸素飽和度 (SPO₂) 92%以上
 ⑩ 心電図 正常範囲内
- 9) 症例登録から 3 箇月以上の生存が期待できるもの。
 10) 統括責任者又は臨床研究分担医師が被験者の安全性に問題がないと判断した場合。

下記のいずれかに該当する患者は除外する。

- 1) 重度又はコントロール困難な活動性感染症、重篤な併発疾患、合併症がある場合。
- 2) 悪性胸膜中皮腫以外の同時性あるいは異時性腫瘍を有する場合。ただし当該腫瘍が根治しており、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。
- 3) 有症状の脳転移がある患者、又は治療を必要とする脳転移がある患者。
- 4) 試薬を注入可能なスペースが胸腔内にないもの、または治療を要する心嚢液貯留症例。
- 5) 試験登録前 4 週間以内に未承認試験薬あるいは試験薬の臨床試験に参加していた場合。
- 6) 試験登録から試験終了までの間に何らかの抗がん治療を受ける予定がある場合。
- 7) 症例登録時点で胸膜癒着術が既に施行されているもの。
- 8) 症例登録時点で CTCAE Ver 4.0 の基準でグレード 2 以上の末梢神経障害を有するもの。
- 9) 胸部単純 X 線にて明らかな間質性肺炎、肺線維症が認められたもの。
- 10) 試験計画書の遵守及び試験での経過観察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ものを含む。
- 11) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療歴がある場合。
- 12) 自家若しくは同種臓器、組織移植歴がある場合。
- 13) 血清検査により、HIV 抗体、HBV 抗原、HCV 抗体、HTLV-1 抗体が陽性であるもの。
- 14) その他、統括責任者、臨床研究分担医師が本試験の対象として適切でない判断したもの。

9.3. 被験者の同意の取得方法

9.3.1. 患者への説明

登録に先立って、担当医は患者本人に説明文書を患者本人に渡し、以下の内容を口頭で詳しく説明する。この際には、患者の家族への説明も同時に行うことが望ましい（家族を有しない患者である場合にはこの限りではない）。また、立会人として看護師などの同席が望ましい（添付資料9）。

- 1) 本治療法が臨床研究であること、臨床研究と一般診療との違いについて。
- 2) 悪性胸膜中皮腫治療の現況
- 3) 本治療法の概要
- 4) 本研究の特徴
- 5) 本治療法参加に必要な条件
- 6) 治療の内容：薬品名、投与方法、投与量、治療コース、治療全体の期間等
- 7) 本研究中に施行される検査
- 8) 本研究が中止となる場合
- 9) 予期される有害事象、合併症、後遺症とその対処法について：合併症、後遺症、治療関連死を含む予期される有害事象の程度と頻度、及びそれらが生じた際の対処法について。
- 10) 治療により期待される効果：延命効果、腫瘍縮小効果、症状緩和効果など。
- 11) 代替治療法：現在の一般的治療法や標準治療法の内容、効果、副作用等、代替治療法を選択した場合の利益と不利益について。
- 12) 費用負担と補償：通常の悪性胸膜中皮腫やそれ以外の疾患の治療にかかる費用は保険制度でまかなわれること。遺伝子治療実施とその検査に関わる費用の負担はないこと。臨床研究での健康被害の場合には患者の医療費負担はないが、健康被害が生じた場合の医療費以外の実費や、症状が固定した後の治療費や療養費については補償されないことなどの説明。
- 13) 本研究に関連する情報の提供
- 14) 同意拒否と同意撤回：臨床試験研究参加に先立っての同意拒否が自由であることや、いったん同意した後の同意の撤回も自由であり、それにより不当な診療上の不利益を受けないこと。
- 15) 人権保護とデータの二次利用：個人情報守秘されるための最大限の努力が払われること。個人識別情報とリンクしない形でデータを二次利用する可能性があること。
- 16) 本研究参加者の遵守事項：本研究参加者は妊娠していないことの確認が必要であること。また本研究参加中は避妊法の実施が必要であること。
- 17) 本研究の臨床研究担当医師
- 18) 質問の自由：総括責任者及び臨床研究担当医師の連絡先を文書で知らせ、研究や治療内容について自由に質問できることの説明。

9.3.2. 同意

研究についての説明を行った翌日以降に、患者が研究の内容をよく理解したことを確認した上で、研究への参加について依頼する。患者本人が本臨床研究への参加に同意した場合、添付資料9の同意書を用い、説明をした医師名、説明を受け同意した患者名、同意を

得た日付を記載し、医師、患者各々が署名する。この際には、患者の家族への確認も同時に行い、署名をすることが望ましい（家族を有しない患者である場合にはこの限りではない）。また、立会人として看護師などの同席・署名が望ましい。同意文書は3部作成し1部を患者本人に手渡し、1部はカルテに保管し、1部を研究事務局（医師保存用）が保管する。

9.4. 研究方法・試験期間・目標症例数

図9-1に臨床研究計画の概要を示す。試験期間は28日（4週間）とし、投与日を第1日目とする。第1日目にAd5CMV-NK4を投与し、安全性、抗腫瘍効果、ならびに生物学的反応を判定する。投与用量として、低用量（ 1×10^{10} vp）、中用量（ 1×10^{11} vp）、高用量（ 1×10^{12} vp）の3群を設定する。

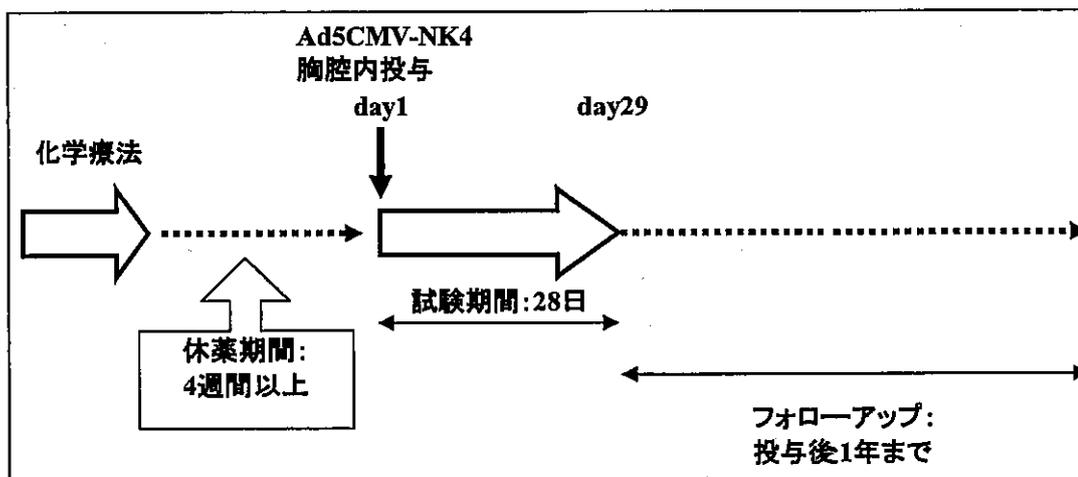


図9-1 研究方法のシエーマ

目標症例数はそれぞれ、低用量群（ 1×10^{10} vp）：3症例、中用量群（ 1×10^{11} vp）：3症例、高用量群（ 1×10^{12} vp）：3症例である。本臨床研究は低用量投与から開始し、安全性を確認した後、順に中用量群、高用量群へと移行する。基本的には合計9例で投与量増量試験を行い、安全性の検討、適切な投与量の設定、抗腫瘍効果の有無を観察、有効性ならびに有害事象を検討する。

Ad5CMV-NK4の1回の治療あたり投与量

A グループ	低用量（ 1×10^{10} vp）； 3例
B グループ	中用量（ 1×10^{11} vp）； 3例
C グループ	高用量（ 1×10^{12} vp）； 3例

Ad5CMV-NK4投与の4週間後（28日目）までに重篤な有害事象が生じなければ、低用量投与群3症例終了後に中用量投与群に移行し、中用量投与群3症例終了後に高用量投与群に移行する。全患者についてAd5CMV-NK4投与の1年後まで安全性を確認する。本臨床研究について、3例毎に千葉大学医学部附属病院遺伝子治療臨床研究審査委員会（添付資料10, 11）において、これまで発生した有害事象に関して遺伝子治療との因果関係等を

検討する。各治療群において、1例の重篤かつ被験薬との因果関係が否定できない有害事象が発生した場合には、さらに3例を追加し6例中2例以上の重篤かつ被験薬との因果関係が否定できない有害事象が発生した場合には、治療回数の増加を行わないこととする。したがって、最大で、低用量、中用量及び高用量治療群各6例の合計18例が登録される。重篤な有害事象が発生しなかった場合には、低用量、中用量及び高用量治療群各3例の合計9例である。

9.5. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

9.5.1. 対照群の設定方法

本臨床研究は少数例による投与量増量試験であり対照群は設定しない。死亡あるいは他の抗がん剤投与など中止基準（後述）に相当することが生じない限り、アデノウイルス投与後1箇月間の観察を行う。本臨床研究終了後、患者の状態に応じて加療を行う必要がある場合についても、全患者についてフォローアップを行う。フォローアップは、死亡若しくは、投与開始後1年が経過するまでのいずれかに該当するまで2箇月に1回行う。採取可能となった標本等について病理組織学的及び分子生物学的解析を行い、AdCMV-NK4投与に伴う遺伝子発現、生物学的効果等を検討する。

9.5.2. 遺伝子導入方法

試験期間の第1日にアデノウイルスベクターの胸腔内投与を、感染症管理治療部のベットサイドで行う。具体的には、試験薬は細い注射針を用い、経皮的に胸腔内（胸水がある場合は胸水内）に注入する（図9-2）。アデノウイルスベクターの1回当たりの投与量は 1×10^{10} - 1×10^{12} vp とするが、胸腔内全域に行き渡るように試験薬を100 mlの生理食塩水に希釈し注入する。なお治療開始前に中等量以上の胸水がある症例では、治療開始時までに胸腔穿刺にて胸水の排除を行っておく。大量の胸水が存在し、持続吸引をしている場合で、アデノウイルスを投与するケースでは、投与後に一度クランプにて持続吸引を12-24時間止めて、その後吸引を再開する。治療開始前は胸膜癒着術を施行しない。胸腔内にトロッカーカテーテルを留置して排液している症例では、トロッカーカテーテルからの試験薬投入は可能であるが、感染や局所浸潤リスクが高まるため可及的速やかに抜去することが好ましい。またトロッカーカテーテル刺入部への腫瘍の直接浸潤を予防するために局所への放射線照射（7 Gy/回×3回）を行うこともある（注射針で注入する場合は不要）。注入後の胸痛、発熱に対しては非ステロイド性抗炎症剤などによる対症療法を行う。嘔気予防のための制吐剤や副腎皮質ステロイド剤は通常通り使用してもさしつかえない。各患者に対する投与量は9.4に記したとおり、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、原液濃度は約 1.5×10^{12} vp/mlであるので必要量に希釈して用いることとする。

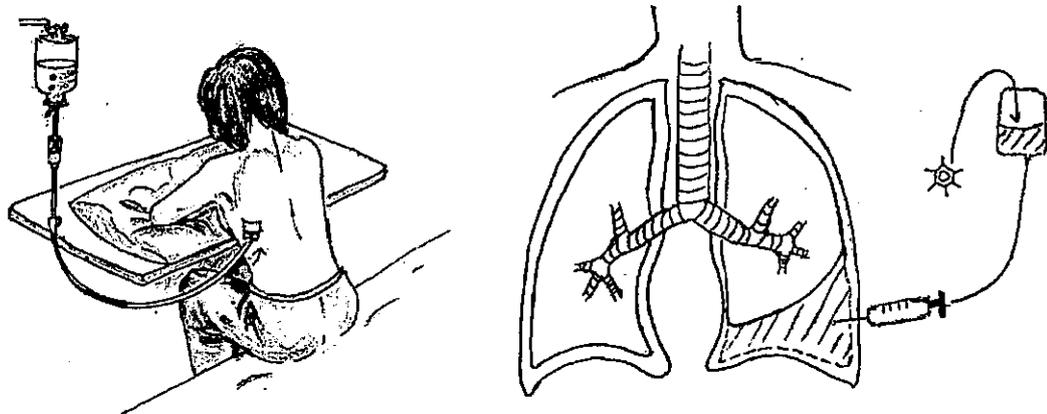


図 9-2 アデノウイルスベクターの注入方法

9.5.3. 抗がん剤以外の前処理及び併用療法の有無

前治療薬は可能な限り、症例報告書に名称と使用期間を記録すること。

①併用を認める薬剤

併用薬は全て症例報告書に名称と使用期間を記録すること。非ステロイド性抗炎症剤は医師が必要と認めた場合は投与してよい。試験薬投与時に表面麻酔や伝達麻酔（例：神経ブロック等）として、局所麻酔薬を用いてもよい。麻酔薬と Ad5CMV-NK4 を混ぜたり、直接接触したりしないように配慮しなければならない。

②併用禁止薬及び併用禁止療法

1. 治験薬及び研究中の治療法。
 2. 他の抗がん剤及び抗がん治療法。
 3. 被験薬の生物学的活性、有効性若しくは評価に影響する可能性のある治療薬。
- なお、アデノウイルス投与後 1 箇月を経過した場合はこの限りではない。

9.5.4. 臨床検査項目及び観察項目

①試験開始前評価（表 9-1）

試験開始前の開始基準（検査データは試験開始前 3 日以内のデータとする）

ECOG PS : 0-1

骨髄機能：ヘモグロビン 9.0 g/dl 以上、白血球数 3000/mm³ 以上若しくは好中球数 2000/mm³ 以上、血小板数 10 万/mm³ 以上

肝機能；AST/SGOT 及び ALT/SGPT；各実施施設基準値上限の 2 倍以下

腎機能：血清クレアチニン 1.5 mg/dl 以下

非血液学的症状：末梢神経障害 グレード 2 以下

胸部単純 X 線；間質性肺炎に起因した広範なびまん性の陰影が認められないこと。

経皮的酸素飽和度 (SPO₂) : 92 %以上 (大気吸入下)

その他: 担当医が、当該被験者がウイルスベクター試薬の投与を安全に開始できると判断できること。

表 9-1 試験開始前評価

評価項目	手順・検討内容等	時期
文書による同意	本試験に関わるすべての手順開始前に被験者から文書による同意を取得する	試験開始前 14日以内
選択/除外基準	研究実施計画書の選択基準を満たし、除外基準に該当しないこと	同意取得後、 試験開始前 7日以内
既往歴、診断、前治療薬	悪性胸膜中皮腫の診断及びステージ、合併症、それまでの治療歴及びアレルギー歴を含む	同上
徴候及び症状	全ての徴候と症状及び併発症状を記録する	試験開始前 3日以内
理学所見		同上
バイタルサイン	身長、体重、酸素飽和度 (経皮 SPO ₂) を含む	同上
Performance Status	ECOG Performance Status (添付資料 12)	同上
その他の併用剤使用	鎮痛剤使用量を含む全ての薬剤	同上
血液学的検査	CBC (ヘモグロビン、ヘマトクリット、赤血球数、白血球数、血小板数、白血球分画) 及び、PT、APTT	同上
生化学的検査	アルカリフォスファターゼ、LDH、AST/SGOT、ALT/SGPT、 γ -GTP、総ビリルビン、直接ビリルビン、コリンエステラーゼ、血清クレアチニン、電解質 (Na、K、Cl)、総蛋白、A/G 比、アルブミン、CRP、アミラーゼ、CPK、血糖、尿酸及び BUN を含む	同上
尿検査	蛋白、糖、ウロビリノーゲン、潜血、沈渣、pH	同上
腫瘍評価	部位と大きさを明らかにするため適切な画像検査 (胸部 CT 等) による病変及びその他部位を評価する。必要に応じて PET-CT による評価も行う。	同上
心電図	12 誘導	同上
血清-HCG	妊娠可能な女性の場合	同上
血清検査	HIV1、HIV2 抗体、HBV 抗原、HCV 抗体	同上
疼痛評価	VAS (添付資料 13) で評価	同上
胸部 X 線	間質性肺炎像等の有無	同上
QOL 評価	EORTC QLQ-C30 で評価 (添付資料 13)	同上
生物学的反応*	胸水採取が可能な場合、 (1) 胸水中 NK4 及び HGF の定量 (2) 胸水中細胞: Ad5CMV-NK4 について PCR 及び RT-PCR による遺伝子導入と発	同意取得後、 試験開始までの 間で採取可能な 時に

	現の検討、リン酸化 c-Met のウエスタン プロットないしは免疫染色	
	血清中 NK4 及び HGF の定量、抗 NK4 抗体、 抗 HGF 抗体、抗アデノウイルス抗体	試験開始前 3 日以内
腫瘍マーカー	・ 胸水ヒアルロン酸 ・ CYFRA ・ CA125	同上
アデノウイルス 体内分布・排泄調査	・ 唾液、血液及び尿 (PCR) (ベースライン の確認)	同上

*: かならずしも腫瘍検体が十分な試料が得られない場合もあり、その場合標本採取量に
応じて実施可能と判断される順位等に従って検査を進める。

#: 確定診断後の生検サンプルが十分にあった場合、当該試料より c-Met の変異の有無につ
いて塩基配列を決定する。

②試験期間 (表 9-2)

試験期間は投与後 28 日までとする。これらの検査については、第 1 日目の検査につい
ては当日行うものとし、それ以降の検査については指定された日の前後 1 日までの誤差を
許容する。

表 9-2 試験期間中の評価項目

評価項目	手 順	時 期
徴候及び症状	全ての徴候と症状及び併発症状を記録す る。	1 日目、3 日目に各 1 回、2 週目以降は週 1 回
理学所見		試験開始後診察時
バイタルサイン	酸素飽和度 (経皮 SPO ₂) を含む	1 日目は投与前後に各 1 回、3 日目 1 回、2 週 目以降は毎週 1 回
Performance Status	ECOG Performance Status (添付資料 12)	同上
血液学的検査	CBC (ヘモグロビン、ヘマトクリッ ト、赤血球数、白血球数、血小板数、 白血球分画)、PT、APTT	同上
生化学的検査	アルカリフォスファターゼ、LDH、 AST/SGOT、ALT/SGPT、γ-GTP、総ビ リルビン、直接ビリルビン、コリンエ ステラーゼ、血清クレアチニン、電解 質 (Na, K, Cl)、総蛋白、A/G 比、ア ルブミン、CRP、アミラーゼ、CPK、血 糖、尿酸及び BUN を含む	同上
尿検査	蛋白、糖、ウロビリノーゲン、潜血、 沈渣、pH	同上
腫瘍評価	CT により腫瘍量の判定を行う。必要に 応じて PET-CT による評価も行う。	29 日目
心電図	12 誘導	1 日目、3 日目に各 1 回、2 週目以降は毎週 1 回
疼痛評価	VAS (添付資料 13)	同上

胸部 X 線	間質性肺炎像の有無の確認	8 日目、15 日目、22 日目、29 日目
QOL 評価	EORTC QLQ-C30 で評価 (添付資料 13)	1 日目、3 日目に各 1 回、2 週目以降は毎週 1 回
生物学的反応	胸水採取が可能の場合*、 (1) 胸水中 NK4 及び HGF の定量 (2) 胸水中細胞：Ad5CMV-NK4 について PCR 及び RT-PCR による遺伝子導入と発現の検討、リン酸化 c-Met のウエスタンブロットないしは免疫染色	試験期間中、実施可能な場合に実施する。採取後直ちに検体を保存する。検査の実施は後日。
	血清中 NK4 及び HGF の定量、抗 NK4 抗体、抗 HGF 抗体、抗アデノウイルス抗体	1 日目、3 日目及び 8 日目に各 1 回、その後は毎週 1 回
腫瘍マーカー	・ 胸水ヒアルロン酸 ・ CYFRA ・ CA125	15 日目及び 29 日目。 胸水は採取可能であれば実施。
アデノウイルス体内分布・排泄調査**	唾液、血液及び尿 (PCR)	1 日目、3 日目に各 1 回、2 週目以降はウイルス排泄が陰性化するまで週 1 回、あるいは必要に応じて。
有害事象	CTCAE Ver 4.0 及び評価指標 (添付資料 14)	試験開始後週 1 回。及び必要に応じて。確認された投与関連性有害事象については、全て消失するまで追跡する。
その他の併用剤使用	鎮痛剤使用量を含む全ての薬剤	治療開始後毎週 1 回

*：かならずしも十分な試料が得られない場合もあり、その場合標本採取量に応じて実施可能と判断される順位等に従って検査を進める。

**：必要と判断された場合

③フォローアップ (表 9-3)

試験終了後も、以下のいずれかの条件に該当するまで 2 箇月に 1 回のフォローアップを継続する。これらの検査については、指定された期日の前後 1 週間までの誤差を許容するものとする。

- 死亡した場合
- 治療開始から 12 箇月が経過した場合
- 総括責任者あるいは臨床研究分担医師が判断した場合

ただし、診察が継続する限りにおいて患者の状態 (生存/死亡) について、また当該患者が受けた治療について、その他の医療情報を必要に応じて調査する。

表 9-3 フォローアップ期間中の検査項目

評価項目	手 順	時 期
徴候及び症状	全ての徴候と症状及び併発症状を記録する。	診察ごとに
理学所見		同上
バイタルサイン	酸素飽和度（経皮 SPO ₂ ）を含む	同上
Performance Status	ECOG Performance Status（添付資料 12）	同上
有害事象	CTCAE Ver 4.0 副作用評価指標（添付資料 14）	確認された投与関連性有害事象については、全て消失するまで追跡する。
腫瘍評価	CTにより腫瘍体積の判定を行なう。必要に応じてPET-CTによる評価も行なう。	以下のいずれかの条件に該当するまで2箇月に1回継続実施する。 <ul style="list-style-type: none"> ● 死亡した場合。 ● 治療開始から12箇月が経過した場合。 ● 総括責任者あるいは臨床研究分担医師が判断した場合。
疼痛評価	VAS（添付資料 13）	診察ごとに
胸部 X 線	間質性肺炎像の有無の確認	同上
QOL 評価	EORTC QLQ-C30 で評価（添付資料 13）	同上
生物学的反応	胸水採取が可能の場合、 (1) 胸水中NK4 及び HGF の定量 (2) 胸水中細胞：Ad5CMV-NK4 について PCR 及び RT-PCR による遺伝子導入と発現の検討、リン酸化 c-Met のウエスタンブロット ないしは免疫染色	実施可能な場合に実施。ただし、測定感度以下になっていれば、それ以降は実施しない。
	血清中NK4 及び HGF の定量、抗NK4 抗体、抗HGF 抗体、血清抗アデノウイルス抗体	診察ごとに。ただし、測定感度以下になっていれば、それ以降は実施しない。
腫瘍マーカー	・ 胸水ヒアルロン酸 ・ CYFRA ・ CA125	同上。胸水は採取可能であれば実施。
有害事象	CTCAE Ver 4.0 及び評価指標（添付資料 14）	診察ごとに、及び必要に応じて。確認された投与関連性有害事象については、全て消失するまで追跡する。
その他の併用剤使用	鎮痛剤用量を含む全ての薬剤	診察ごとに。

9.5.5. 予測される有害事象並びにその対処方法

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

3,000 例以上に施行されており、主な有害事象は注入部位の疼痛、吐気、発熱等であるがすべて対処療法等で治癒している。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なんらかの理由で局所に大量に感染するとしても、成人は抗体を有しており重篤な合併症の心配はないと考えられる。ただし、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が誘発されたり、アデノウイルスベクターの急速な破壊により、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。

アデノウイルスベクターには急性毒性があるものの、用量と有害事象の間に直線的な相関性がなく、一定のレベル以上のアデノウイルスベクターが投与されると有害事象が生じることが示されている。1999 年 9 月、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対するアデノウイルスベクターを用いた米国の遺伝子治療で患者が死亡した例があったが、この死亡例では、肝動脈から非増殖性アデノウイルスベクターが 3×10^{13} vp 投与されていた。また 3×10^{12} vp の接種を受けた患者に強い有害事象が認められた例も報告されているが、一方 3×10^{12} vp でも忍容性があるという報告もある。その後の米国の調査によれば、死亡した患者は特異的な症例であったという可能性が示唆されている。また最高投与量 1×10^{12} vp、3 日間連続静脈内投与でも、重篤な有害事象はなかったとされている (68)。いずれにしても当該試験における最高投与量は 1×10^{12} vp で死亡例における投与量の 30 分の 1 であり、また直接血管内に投与するわけではなく 100 ml に希釈され胸腔内に投与するもので、投与経路の相違も考慮に入れると本研究で予定している最高投与量でも有害事象は許容範囲と想定される。

胸腔内投与においては、出血、気胸など胸腔内ドレナージ等の手技によって起こりうる有害事象が想定されるが、これらは通常の治療で経験することであり、その場合は状況に応じて適切に対処する。また胸腔穿刺に伴う皮膚への進展については、放射線照射等で適切に対処する。アデノウイルスの胸腔内投与については、本邦での臨床試験の報告はなく、米国では 2 つのベクターで悪性胸膜中皮腫 42 例に投与例 (第 I 相臨床試験) が報告されている (61, 62)。

一つは単純ヘルペスウイルス (herpse simplex virus: HSV) のチミジンキナーゼ (thymidine kinase: TK) 遺伝子を発現する非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-HSVTK) を用いて、34 名の対象患者について最大用量 5×10^{13} vp (生理的食塩水 50 ml ないし 100 ml で希釈) が投与されている (61)。この最大用量において、グレード 4 の一過性のリンパ球減少とグレード 3 のトランスアミナーゼの上昇が各 1 名に観察されたが、いずれも特段の治療することなく経過した。その他 3 名にグレード 1 の発熱があったが自然に解熱した。1 名にグレード 2 の低血圧と低酸素血症があり、これについては酸素吸入と輸液で回復した。また、この低血圧の患者において正常値の 2-3 倍のトランスアミナーゼの上昇が認められているが、その他肝機能の悪化を示すデータは得られなかった。また 1 名に低ナトリウム及び低カリウム血症にともなう premature ventricular contraction と頻脈が観察されたが、輸液にて改善している。以上の結果から、最大耐量は 5×10^{13} vp 以上と判断された。

またもう一つの臨床試験は IFN- β 遺伝子を発現する非増殖型アデノウイルスベクター (Ad-IFN- β) を使用したもので、8 例の悪性胸膜中皮腫患者と 2 名の非悪性胸膜中皮腫患者 (肺がんと卵巣がん各 1 名) の胸腔内に投与されている (62)。低用量の 9×10^{11} vp (生理的食塩水 50 ml で希釈) が投与された 6 例 (悪性胸膜中皮腫 4 例、非悪性胸膜中皮腫 2 例) においては、グレード 1 ないし 2 の胸痛、鼻炎、一過性発熱、貧血、一過性の肝

機能低下が観察された。高用量の 3×10^{12} vp (生理的食塩水 50 ml で希釈) が投与された悪性胸膜中皮腫 4 例では、グレード 3 の血圧低下とトランスアミナーゼの上昇が 1 名に観察された。血圧低下をきたした患者には心不全の既往歴があり、輸液によって 11 時間後に血圧は正常化した。またトランスアミナーゼの上昇した患者には、その上昇が 3 週間継続したが、臨床的に肝機能障害を示す所見はなかった。よって、本研究において最大耐量は 9×10^{11} vp と判断された。

以上のように、アデノウイルスの胸腔内投与によって有害事象は見られているが、いずれも一般的な処置で対応可能であった。本臨床試験で使用するアデノウイルスの最大用量は 1×10^{12} vp であり、Ad-HSVTK の 50 分の 1 以下である一方、Ad-IFN- β の最大耐量を 10 % 程度超える量となるが、安全性を十分に確認しながら用量を段階的に増加する予定である。最近、上記臨床試験を行った研究グループよりさらに 2 つの論文が発表された (79, 80) が、その詳細は 8.2 臨床試験の報告からみた本研究の妥当性について (p38-39 参照) に記載されたとおりである。これらの臨床研究から、有害事象時における対処は一般的なものとどまり、アデノウイルス投与に伴う特別の対処法は不要と考える。

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」に基づいてグレード 0-4 で評価する。この「副作用の評価指標」は、CTCAE Ver 4.0 (添付資料 14) に基づき作成する。有害事象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。アデノウイルスを投与した 3 人の内 1 人に肝機能、腎機能、循環器系、神経系等においてグレード 3 以上 (血液系ではグレード 4) の副作用が認められた場合、さらに 3 人の被験者に同用量の Ad5CMV-NK4 ベクターを投与する。この追加した 3 人のうち 1 人以上の被験者で肝機能、腎機能、循環器系、神経系等においてグレード 3 以上 (血液系ではグレード 4) の副作用が見られた場合その時点で臨床研究を中止し次の用量群には移行しない。(表 9-4)。

表 9-4 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準 (1)

重篤な有害事象が認められた 低用量投与群の被験者数 (全被験者数)	Ad5CMV-NK4 投与量
0/3	中用量群に移行
1/3	さらに 3 症例を低用量群で評価
1/3 + 0/3	中用量群に移行
1/3 + 1/3	中止
1/3 + 2/3	中止
1/3 + 3/3	中止
2/3	中止
3/3	中止

中用量投与群については上記と同様な基準で高用量群への移行あるいは中止を決定する。高用量投与群の場合は以下のとおりとする (表 9-5)。

表 9-5 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準 (2)

重篤な有害事象が認められた 高用量投与群の被験者数 (全被験者数)	Ad5CMV-NK4 投与量
0/3 あるいは 1/3	高用量でさらに 3 症例を追加
2/3 あるいは 3/3	臨床試験を終了

被験者の死亡、死亡につながる可能性のあった場合、治療のため入院または入院期間の延長が必要となった場合、障害（日常生活に支障をきたす機能不全）の可能性のあった場合、障害につながる可能性のあった場合等、またその他遺伝子治療臨床研究の実施に際して生じた重大な事態及び遺伝子治療臨床研究の実施に影響を及ぼす恐れのある有害事象が生じた場合、あるいは内外の情報によりそのような知見を得た場合は、以下のような手順にしたがって、速やかな対応をとる(添付資料 33)。すなわち、実施施設の長である千葉大学医学部附属病院長は、遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書により厚生労働大臣、文部科学大臣に報告を行う。

- 1) (第一報) 重篤な有害事象が発生した場合、総括責任者又は代理の者は認知してから 24 時間以内に病院長に口頭または電話で連絡する。また、総括責任者又は代理の者は速やかに厚生労働省、文部科学省に連絡する(第一報)。
- 2) (一次報告) 第一報を受けて、病院長は遺伝子治療臨床研究審査委員会(以下「審査委員会」)委員長(安全・効果評価・適応判定小委員会(以下「小委員会」)の主査を兼務)に有害事象対応を依頼する。審査委員会委員長が兼務する小委員会主査は小委員会を招集する。小委員会は、総括責任者からのデータにもとづき当該時点までに把握できている情報を記載した一次報告書(遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書)をもって審査委員会に答申し、審査委員会は病院長に報告する。病院長は一次報告書を厚生労働省、文部科学省に FAX にて送付する(一次報告)。一次報告は認知してから 72 時間以内に完了する。
- 3) (緊急対策協議) 小委員会は、重篤な有害事象について引き続き緊急対策の協議を行い、その結果を審査委員会に答申する。当該答申を受け審査委員会は審議し、審査委員会は病院長にその結果を報告する。
- 4) (緊急対策指示と処置) 病院長は、審査委員会及び小委員会による緊急対策に関する協議結果を総括責任者に報告・指示する。総括責任者と実施担当医師はそれに基づき、継続している患者の処置を変更する。
- 5) (総括責任者による二次報告書作成) 総括責任者は、認知してから 7 日以内に、4)の患者の処置、経緯および追加詳細データにもとづき二次報告書(遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書)を作成し、病院長に報告する。
- 6) (小委員会による二次報告書の評価) 病院長は二次報告書を以て、審査委員会での評価を審査委員会委員長に依頼する。審査委員会からの諮問により、小委員会は二次報告書を受けて評価を行い、審査委員会に答申する。
- 7) (審査委員会による二次報告書の評価) 審査委員会は、小委員会からの答申を受け、評価された二次報告書にもとづき審議を行い評価した二次報告書を病院長に文書報告する。
- 8) (二次報告) 病院長は二次報告書を厚生労働省、文部科学省に認知してから 15 日以内に報告する(二次報告)。
- 9) (最終報告) 総括責任者は、重篤な有害事象の転帰確定後「重篤な有害事象に関する報告書」を完成させ(最終報告)、病院長に報告する。病院長は、審査委員会委員長に、審査委員会での最終報告書の評価を依頼する。審査委員会は、病院長の依頼に基づき、最終報告書に関する評価・審議を行い、評価した最終報告書を病院長に文書報告する。病院長は最終報告を厚生労働省、文部科学省に提出・報告する。

なお厚生労働大臣および文部科学大臣宛の連絡先は、以下の通りである。

厚生労働省 大臣官房厚生科学課 〒100-8916 東京都千代田区霞が関 1-2-2

TEL : 03-3595-2171 FAX : 03-3503-0183

文部科学省 研究振興局ライフサイエンス課 生命倫理・安全対策室

〒100-8966 東京都千代田区霞が関 1-3-2

TEL : 03-5253-4113 FAX : 03-5252-4114

9.5.6. 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

9.5.6.1. 有効性評価方法

a) 腫瘍縮小効果

- ① 腫瘍量の評価は試験終了時に行う。Ad5CMV-NK4 を投与した胸腔内の病変を CT スキャンで測定する。評価病変の測定結果については、RECIST 法 (ver 1.0) あるいは修正 RECIST 法 (ver 1.1) で記載する。
- ② 腫瘍量の変化は Ad5CMV-NK4 投与後も当該患者の状況に応じて追跡する。
- ③ CT の横断面像を用いて、少なくとも 1 cm 以上離れた 3 レベルにおいて、各レベルで 1 cm 以上離れた 2 箇所の胸膜病変の厚さを測る。腫瘍の厚みを胸壁に対して垂直に測定する。この 6 計測値の総和を胸膜一方向測定値として用いる。比較性を確保するため、ベースラインとその後の全ての CT は同じ条件で行う。
- ④ 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を行う。
- ⑤ 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に使用できるようにしておくこと。

b) 測定可能病変・測定不能病変の定義

① 測定可能病変 (Measurable Lesion)

● 胸膜病変

横断面像で測定した時の、胸壁若しくは縦隔面と垂直方向の最も厚い胸膜の厚さによって定義する。CT にて 5 mm 以上の胸膜病変を測定可能病変とし、厚さ 5 mm 未満の病変は測定不能病変とする。なお、胸膜病変の計測には原則として 5 mm 以下のスライス厚を用いる。

● 転移病変

以下のいずれかに該当する者を測定可能病変と定義する。

- 1) 従来の検査法にて最長径が 10 mm 以上の病変
- 2) CT にて最長径がスライス厚の 2 倍以上の病変

② 評価可能で測定不能な病変 (Non-measurable Lesion)

- 1) 上記測定可能病変の規準を満たさない病変
- 2) 真の測定不能病変：骨病変、髄膜病変、腹水、胸水・心嚢液、皮膚リンパ管炎・肺リンパ管炎、画像検査で確認されない腹部腫瘤、嚢胞性病変

c) 標的病変・非標的病変の定義

① 標的病変 (Target Lesion)

すべての測定可能病変の中で以下の標的病変選択規準に基づく病変を標的病変と定義する。ベースラインにおいて測定・記録する。

- 胸膜病変
 - 1) 横断像で1スライスあたり2病変
 - 2) 合計3スライス, 6病変
各スライスは10 mm 以上離す
 - 3) 繰り返して正確に測定するのに適した病変
 註) 経過を通じて同じ場所及び同じスライスレベルにて胸膜病変を測定する。
- 転移病変
 - 1) 全ての転移病変の代表として1臓器あたり5病変まで
 - 2) 合計10病変まで

② 非標的病変 (Non-Target Lesion)

非標的病変は標的病変以外のすべての病変である。ベースラインにおいて記録する。

d) 他覚的奏効

評価にあたっては、投与に対する他覚的奏効が得られたかどうかを各患者について評価する。患者がフォローアップ期間中のいずれかの時点で局所抗腫瘍効果として CR 若しくは PR を示し、かつ4週間以上持続した場合、当該患者でそのような奏効が得られたものとする。

e) 抗腫瘍効果の判定方法

著効: Complete Response (CR)

測定可能病変がすべて消失し、その状態が少なくとも4週間以上持続したもの。

有効: Partial Response (PR)

一方向測定可能病変の縮小が30%以上で、その状態が少なくとも4週間以上持続した場合。

不変: Stable Disease (SD)

一方向測定可能病変の縮小が30%未満であるか、又は20%未満の増大にとどまり、その状態が少なくとも4週間以上持続した場合。

進行: Progressive Disease (PD)

一方向測定可能病変が20%以上の増大、又は新病変の出現を認めた場合。

f) 奏効の持続期間

1. 他覚的奏効の持続期間

CR 若しくは PR が確認されてから腫瘍進行までの時間。CR 若しくは PR に1回も達しなかった患者も、他覚的奏効までの期間をゼロとして解析に含める。

2. CR の期間

CR が確認されてから腫瘍病変進行までの期間。CR に1回も達しなかった患者も、CR までの期間をゼロとして解析に含める。

3. 腫瘍進行までの期間

腫瘍進行までの期間は、試験薬初回投与から腫瘍進行までの期間とする。

4. 生存期間

生存期間は、試験薬初回投与日から死亡日までとする。

【効果観察方法】

原則として試験薬投与後1年を経過するまで観察を継続するが、死亡、追跡不能例及び中止基準により中止した症例については病変の観察期間を試験中止判定日までとする。

【効果判定】

CR又はPRを有効とする。最初にその総合評価を満たした時点から4週間以降に行われる再評価にて、その基準を満たしているかどうかを確認する。

【その他の検査】

PET-CTの画像は、CTによる評価の際の参考として利用する。腫瘍マーカーはその値の増減をもって評価するが、PET-CTとともに、有効性評価の参考値とする。

9.5.6.2. 安全性評価方法

a) 臨床的評価

1. 有害事象：試験期間中に各患者について有害事象を評価する。毒性は、CTCAE Ver 4.0（添付資料14）にしたがってグレードを判定する。
2. 理学検査
3. バイタルサイン
4. 徴候・症状
5. アデノウイルス体内分布・排泄調査
6. その他必要に応じて

b) 臨床検査による評価

1. 血液学的検査：
2. 生化学的検査：
3. 尿検査：
4. 心電図
5. 胸部X線
6. その他必要に応じて

なお将来における分析、解析や研究のため、生検材料、血清等の試料を可能な限り保管する。

9.5.6.3. 疼痛評価

疼痛強度を、患者自身によるVASで評価する（添付資料13）。評価は、治療開始前、試験期間中及びフォローアップ中に行う。VASは有害事象報告とは別に症例報告書に記入し、相互の情報は互いに独立しているものとする。

9.5.6.4. QOL 評価

EORTC QLQ-C30（第2版、日本語版）（添付資料13）を用いて患者のQOLを評価する。

9.5.6.5. ECOG Performance Status

添付書類 12 に準拠して評価する。

9.5.6.6. 試験中止判定基準

- ① AdCMV-NK4 投与中、生命に危険など重大な状況が発生し対症療法、用量減量等によって管理できないと考えられる場合。
- ② 患者が研究参加の同意を撤回した場合。
- ③ 総括責任あるいは臨床研究分担医師が判断した場合。
- ④ アデノウイルス投与後 1 箇月以内に抗がん剤を投与した場合。
- ⑤ アデノウイルス投与後に除外基準に相当する不適格性が判明した場合。
- ⑥ 患者による試験実施計画書の不遵守。
- ⑦ その他重大な試験実施計画違反が生じた場合。
- ⑧ 患者の死亡。

9.5.7. 症例記録に関する記録用紙等の様式

添付資料 15 に症例記録に用いる症例報告書を別途定めることとする。

9.5.8. 記録の保存及び成績の公表の方法

- 1) 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千葉大学医学部附属病院に保管される。
- 2) 本研究を行う上で知りえた被験者個人に関する情報は、正当な理由なく公表されない。
- 3) 実施施設の長である千葉大学医学部附属病院長は、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. 統計的事項

10.1. 主たる評価項目の解析と判断規準

本臨床研究の主たる評価項目は安全性であり、従たる評価項目は画像診断による抗腫瘍効果、及びがんに伴う病的状態 (QOL 評価、疼痛評価、PS) に対する効果である。主たる解析目的は、投与量の増加による有害事象の検討である。低用量治療群最低 3 例について重篤な有害事象を認めない場合に中用量治療群へ移行する。もし 1 例の重篤な有害事象が発生した場合には、さらに 3 例を追加して 6 例とし、この中に 2 例以上の重篤な有害事象が発生した場合には、投与量の増加を行わないこととする。追加した 3 症例で重篤な有害事象を認めない場合に中用量治療群へ移行する。すなわち各治療群において、1 例の重篤な有害事象が発生した場合には、さらに 3 例を追加して、6 例中 2 例以上の重篤な有害事象が発生した場合には、投与量の増加を行わないこととする。中用量治療群から高用量

治療群への移行も同様である。したがって、最大で、低用量、中用量及び高用量治療群各6例の合計18例が登録される。

10.2. 予定登録数・登録期間・追跡期間

年間の悪性胸膜中皮腫症例を10例として、このうち約半数が本臨床研究に参加すると仮定すると、年間の予定登録数は5例程度と予想される。低用量治療群、中用量治療群、高用量治療群の3群それぞれ最低3症例の登録を行うがその登録数は上記のとおりである。登録期間は、2年間を予定する。追跡期間は、治療開始日から最長で1年間（治療終了日から11箇月）である。治療開始日から1年以内に死亡した場合には、追跡期間は死亡日までとする。

10.3. 従たる評価項目の解析と判断規準

従たる評価項目は画像診断による抗腫瘍効果、がんに伴う病的状態（QOL 評価、疼痛評価、PS）に対する効果であり、それについては各項目について評価をする。

10.4. 最終解析結果について

追跡期間終了後、最終調査によりデータを確定した後すべての目的に対する解析を行う。最終解析結果は研究事務局が「最終解析レポート」としてまとめ、厚生労働省ならびに学内倫理委員会・評価部会に提出する。

11. 倫理的事項

11.1. 本臨床研究における個人情報保護

11.1.1. 個人情報保護に関する責務

国立大学法人千葉大学（以下、本学という）は、独立法人等の保有する個人情報の保護に関する法律、独立法人等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指針に基づき、本学が保有する個人情報の管理について国立大学法人千葉大学個人情報管理規程（添付資料16）に必要な事項を定めている。本学の学長は文部科学大臣により任命され、本学の個人情報保護体制の最高責任者である。学長は本学の個人情報保護の管理体制として個人情報総括保護管理者を置き、個人情報総括保護管理者の下に個人情報保護管理者、個人情報保護担当者を置き、個人情報保護管理の徹底を行っている。個人情報総括保護管理者は、学長により指名され、総務担当理事が任命を受けている。千葉大学医学部附属病院においては、千葉大学医学部附属病院長、病院事務部管理課長はそれぞれが個人情報総括保護管理者により個人情報保護管理者として指名を受けており、千葉大学医学部附属病院長、病院事務部管理課長は国立大学法人千葉大学個人情報管理規程、千葉大学医学部附属病院個人情報管理規程（添付資料17）に従い組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である千葉大学医学部附属病院長、病院事務部管理課長はこれらの規

程に従い、本臨床研究に関す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に必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置をとることができる。

11.1.2 第三者提供の制限

総括責任者は、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者等の同意を得ないで個人情報を第三者に提供してはならない。また、第三者への個人情報の提供を行う場合は、適切な目的であることを確認し、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九に従い、その旨被験者等へ通知する。

11.1.3. 個人情報の開示、訂正、利用停止等

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、被験者等の知りうる状態にしなければならない。

- 1) 臨床研究実施機関の名称
- 2) 個人情報の利用目的
- 3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き

本臨床研究においては、1) 及び2) について、同意説明文書に明記した。また、3) については、それらの手続きができることを同意説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を国立大学法人千葉大学個人情報開示請求等取扱規程（添付資料 18）に従い被験者及び家族（あるいは親族）に説明する。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についての開示、訂正、利用停止等について、国立大学法人千葉大学個人情報開示請求等取扱規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行うほか、対応結果について被験者等に通知しなければならない。

11.2. 臨床試験計画書の遵守

本研究に参加する研究者は、患者の安全と人権を損なわない限りにおいて本研究実施計画書を遵守する。

11.3. 臨床試験計画の内容変更について

臨床試験計画内容変更の際には、変更内容の実行に先だって「臨床試験計画改訂申請」を安全・効果評価・適応判定小委員会に提出し承認を得なければならない。臨床研究審査委員会承認後の臨床試験計画内容の変更を改正・改訂の2種類に分けて取り扱うが、改正・改訂の区別は効果・安全性評価委員長が行うため、研究者の委員会申請はすべて「改訂申請」となる。

- 1) 研究に参加する患者の危険を増大させる可能性のある臨床試験計画の部分的変更。

安全・効果評価・適応判定小委員会及び遺伝子治療臨床研究審査委員会の審査承認を要する。表紙に安全・効果評価・適応判定小委員会の承認日を記載する。

- 2) 研究に参加する患者の危険を増大させる可能性がなく、かつ研究の主たる目的に影響を与えない軽微な臨床試験計画の変更。効果・安全性評価委員長の承認を要する（従来の「委員長決裁」に相当する）。表紙に安全・効果評価・適応判定小委員会の承認日を記載する。

11.4. 利益相反

千葉大学の規定にしたがって検討し、本研究の総括責任者、臨床試験に関わる医師に関して、本研究の計画、実施、報告において、研究の結果および結果の解釈に影響を及ぼすような「起こりえる利益の衝突」は存在しない。

12. モニタリング

12.1. 定期モニタリング

研究が安全に実施されているか、データが正確に収集されているかを確認する目的で、原則として年2回定期モニタリングが行われる。モニタリングは研究事務局に収集される症例報告書（添付書類 14）の記入データに基づいて行われる。

12.1.1. モニタリングの項目

1. 集積達成状況：登録数の累積
2. 適格性の検討、治療前背景因子
3. 臨床試験治療中、治療終了の別、中止あるいは終了の理由
4. すべての有害事象と重篤な有害事象
5. フォローアップの評価項目とその結果
6. その他、研究の進捗や安全性に関する項目

12.1.2. 有害事象の許容範囲

食道がんに対するアデノウイルスベクターを用いた Ad-p53 遺伝子治療臨床研究では全 51 例中全例に発熱、局所の疼痛が出現したが、いずれもグレード 1 ないし 2 のレベルであった。また、高血糖 3 例、低カルシウム血症 3 例、APTT 延長 1 例、高アミラーゼ血症 1 例、高クレアチニン血症 1 例が観察されたが、いずれもグレード 1 のレベルであった。本臨床研究においても Ad-p53 遺伝子治療の局所投与と同様の、さらに米国におけるアデノウイルスベクター胸腔内投与の同様の有害事象が発生することが予想される。またアデノウイルス投与に関連した死亡例が出た場合、その時点で登録を即刻中止する。この時治療中の患者のその後の治療に関しては、その時点で検討する。治療関連死がない場合は、

各治療群の3症例ごとに安全・効果評価・適応判定小委員会に報告し、その判断を仰ぐが、審査結果が得られるまでは原則として登録を継続する。

12.1.3. 臨床試験計画の逸脱

臨床検査や毒性・有効性の評価等が著しく規定とは異なったものを逸脱例とし、原則として評価より除外する。

13. その他必要な事項

本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令/省令等を遵守して実施される。

- ・ 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」
平成16年文部科学省・厚生労働省告示第二号、平成16年12月28日)
- ・ 「臨床研究に関する倫理指針」
(厚生労働省告示第四百十五号、平成20年7月31日)
- ・ 「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」
(薬食発第0219011号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成16年2月19日)
- ・ 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」
(薬発第1062号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成7年11月15日)
- ・ 「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」
(医薬発第329004号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成14年3月29日)
- ・ 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」
(平成15年6月18日法律第97号)

14. 参考文献

1. Matsumoto K, et al. NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci.*, 94: 321-327, 2003.
2. Jiang WG, et al. Hepatocyte growth factor, its receptor, and their potential value in cancer therapies. *Clinical Reviews in Oncology/Hematology*, 53: 35-69, 2005.
3. Maemondo M, et al. Targeting angiogenesis and HGF function using an adenoviral vector expressing the HGF antagonist NK4 for cancer therapy. *Mol. Ther.*, 5: 177-185, 2002.
4. Hirao S, et al. Tumor suppression effect using NK4, a molecule acting as an antagonist of HGF, on human gastric carcinomas. *Cancer Gene Ther.*, 9: 700-707, 2002.
5. Kikuchi T, et al. Tumor suppression induced by intratumor administration of adenovirus vector expressing NK4, a 4-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, and naive dendritic cells. *Blood*, 100: 3950-3959, 2002.
6. Maehara N, et al. Gene transduction of NK4, HGF antagonist, inhibits in vitro invasion and in vivo growth of human pancreatic cancer. *Clin. Exp. Metastasis*, 19: 417-426, 2002.
7. Saimura M, et al. Intraperitoneal injection of adenovirus-mediated NK4 gene suppresses peritoneal dissemination of pancreatic cancer cell line AsPC-1 in nude mice. *Cancer Gene Ther.*, 9: 799-806, 2002.
8. Manabe T, et al. Cell-based protein delivery system for the inhibition of the growth of pancreatic cancer: NK4 gene-transduced oral mucosal epithelial cell sheet. *Clin. Cancer Res.*, 9: 3158-3166, 2003.
9. Suzuki Y, et al. Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer*, 2010. (in press)
10. Vogelzang NJ, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.*, 21: 2636-2644, 2003.
11. Jagadeeswaran R, et al. Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.*, 66: 352-361, 2006.
12. Cao X, et al. Up-regulation of Bcl-xl by hepatocyte growth factor in human mesothelioma cells involves ETS transcription factors. *Am. J. Pathol.*, 175: 2207-2216, 2009.
13. Cipriani NA, et al. MET as a target for treatment of chest tumors. *Lung Cancer*, 63: 169-179, 2009.
14. Lee AY, et al. Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer*, 109: 1454-1461, 2007.
15. Kerr DJ. Targeting angiogenesis in cancer: clinical development of bevacizumab. *Nature Clin. Practice Oncol.*, 1: 39-43, 2004.
16. Date K, et al. HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth

- factor. *FEBS Lett.*, 420: 1-6, 1997.
17. Date K, et al. Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene*, 17: 3045-3054, 1998.
 18. Kuba K, et al. HGF/NK4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res.*, 60: 6737-6743, 2000.
 19. Kuba K, et al. Kringle 1-4 of hepatocyte growth factor inhibits proliferation and migration of human microvascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279: 846-852, 2000.
 20. Whitson BA, et al. Molecular pathways in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Lett.*, 239: 183-189, 2006.
 21. Tada Y, et al. Gene therapy for malignant pleural mesothelioma: present and future. *Oncol. Res.*, 17: 239-246, 2008.
 22. Geiger JH, et al. What the structure of angiostatin may tell us about its mechanism of action. *J. Thromb. Haemost.*, 2: 23-34, 2004.
 23. O'Reilly MS, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79: 315-328, 1994.
 24. Matsumoto K, et al. Cooperative interaction between alpha- and beta-chains of hepatocyte growth factor on c-Met receptor confers ligand-induced receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. *J. Biol. Chem.*, 273: 22913-22920, 1998.
 25. Iwazawa T, et al. Primary human fibroblasts induce diverse tumor invasiveness: involvement of HGF as an important paracrine factor. *Jpn. J. Cancer Res.*, 87: 1134-1142, 1996.
 26. Saeki H, et al. Concurrent overexpression of Ets-1 and c-Met correlates with a phenotype of high cellular motility in human esophageal cancer. *Int. J. Cancer*, 98: 8-13, 2002.
 27. Davies G, et al. The HGF/SF antagonist NK4 reverses fibroblast- and HGF-induced prostate tumor growth and angiogenesis in vivo. *Int. J. Cancer*, 106: 348-354, 2003.
 28. Martin TA, et al. Growth and angiogenesis of human breast cancer in a nude mouse tumour model is reduced by NK4, a HGF/SF antagonist. *Carcinogenesis*, 24: 1317-1323, 2003.
 29. Tomioka D, et al. Inhibition of growth, invasion, and metastasis of human pancreatic carcinoma cells by NK4 in an orthotopic mouse model. *Cancer Res.*, 61: 7518-7524, 2001.
 30. Saga Y, et al. Expression of HGF/NK4 in ovarian cancer cells suppresses intraperitoneal dissemination and extends host survival. *Gene Ther.*, 8: 1450-1455, 2001.
 31. Saimura M, et al. Tumor suppression through angiogenesis inhibition by SUIT-2 pancreatic cancer cells genetically engineered to secrete NK4. *Clin. Cancer Res.*, 8: 3243-3249, 2002.
 32. Kubota T, et al. Reduced HGF expression in subcutaneous CT26 tumor genetically modified to secrete NK4 and its possible relation with antitumor effects. *Cancer Sci.*, 95: 321-327, 2004.

33. 瀬戸口靖弘. 「遺伝子導入用ベクターの種類と特徴」 アデノウイルスベクター, 最新医学 50: 39-51, 1995.
34. Nermut MV. The architecture of adenoviruses. *The Adenoviruses*, PLENUM PRESS, pp.5-34, 1984.
35. 吉田幸一ら. 「アデノウイルスの遺伝子構造」 蛋白質核酸酵素 37: 2366-2373, 1992
36. Shenk T. Group C Adenoviruses as vectors for gene therapy. *Viral vectors*, Academic Press, Inc., pp.43-54, 1995.
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. 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.
39. Horwitz MS. Adenoviruses. *Fields Virology*, 3rd edition, Lippincott-Raven Publishers, pp.2149-2171, 1996.
40. Jones N, et al. Isolation of deletion and substitution mutants of adenovirus type 5. *Cell*, 13: 181-188, 1978.
41. Jones N, et al. Isolation of adenovirus type 5 host range deletion mutants defective for transformation of rat embryo cell. *Cell*, 17: 683-689, 1979.
42. McGrory WJ, et al. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology*, 163: 614-617, 1988.
43. Graham FL, et al. Manipulation of adenovirus vectors. *Methods in Molecular Biology*, 7: 109-128, 1991.
44. 和田忠士ら. 「アデノウイルスの複製と遺伝子発現」 蛋白質核酸酵素 37: 2511-2518, 1992.
45. Bett AJ, et al. F1: DNA sequence of the deletion/insertion in early region 3 of Ad5 dl309. *Virus Res.*, 39: 75-82, 1995.
46. Gingras M-C, et al. Potential salmon sperm origin of the E3 region insert of the adenovirus 5 dl309 mutant. *Cancer Gene Ther.*, 3: 151-154, 1996.
47. Fallaux FJ, et al. New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.*, 9: 1909-1917, 1998.
48. Shenk T. Adenoviridae: The viruses and their replication. *Fields Virology*, 3rd Edition, Lippincott-Raven Publishers, pp. 2111-2148, 1996.
49. Groman EV, et al. Method to quantify tail vein injection technique in small animals. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 43: 35-38, 2004.

50. 羽倉明. 「ウイルス感染と腫瘍」 病原ウイルス学、改訂 2 版、金芳堂 pp.229-240, 1997.
51. 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.
52. Moore M, et al. Oncogene potential of the adenovirus E4orf6 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93: 11295-11301, 1996.
53. Nevels M, et al. The adenovirus E4orf6 protein can promote E1A/E1B-induced focus formation by interfering with p53 tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 94: 1206-1211, 1997.
54. Miyauchi M, et al. Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy. *Jp. J. Cancer Res.*, 90: 469-475, 1999.
55. Shimada H, et al. MHC Class II alpha/beta heterodimeric cell surface molecules expressed from a single proviral genome. *Hum. Gene Ther.*, 10: 2397-2405, 1999.
56. Shimizu T, et al. Enhanced growth suppression in esophageal carcinoma cells using adenovirus-mediated fusion gene transfer (uracil phosphoribosyl transferase and herpes simplex virus thymidine kinase). *Cancer Gene Ther.*, 8: 512-521, 2001.
57. Sonntag K-C, et al. Tolerance to solid organ transplants through transfer of MHC class II genes. *J. Clin. Inv.*, 107: 65-71, 2001.
58. Shimada H, et al. Facilitation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33 (ING1) in T.Tn human esophageal carcinoma cells. *Oncogene*, 21: 552-557, 2002.
59. 中神啓徳ら. 「遺伝子治療におけるトランスレーショナルリサーチ」 遺伝子治療フロンティア、株式会社メディカルレビュー社 pp.167-171, 2004.
60. Shimada H, et al. Phase I/II adenoviral p53 gene therapy for chemoradiation resistant advanced esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.*, 97: 554-561, 2006.
61. Serman DH, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin. Cancer Res.*, 11: 7444-7453, 2005.
62. Serman DH, et al. A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN- β gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions: high rate of antitumor immune responses. *Clin. Cancer Res.*, 13: 4456-4466, 2007.
63. Pearson S, et al. China approves first gene therapy. *Nature Biotechnol.*, 22: 3-4, 2004.
64. Nemunaitis J, et al. Phase II trial of intratumoral administration of ONIX-015, a replication-selective adenovirus, in patients with refractory head and neck cancer. *J. Clin. Oncol.*, 19: 289-298, 2001.
65. Yu W, et al. Clinical trials with oncolytic adenovirus in China. *Current Cancer Drug Targets*, 7: 659-670, 2007.

66. Pann JJ, et al. Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. *J. Clin. Oncol.* 27: 799-804, 2009.
67. Liu D, et al. Clinical effect of p53 gene Gendicine in treatment of malignant effusions *Chin. J. Cancer Prev. Treat.*, 13: 1108 – 1109, 2006.
68. Tolcher AW, et al. Phase I, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of intravenously administered Ad5CMV-p53, an adenoviral vector containing the wild-type p53 gene, in patients with advanced cancer. *J. Clin. Oncol.*, 24: 2052-2058, 2006.
69. Molnar-Kimber KL, et al. Impact of preexisting and induced humoral and cellular immune responses in an adenovirus-based gene therapy phase I clinical trial for localized mesothelioma. *Hum. Gene Ther.*, 20: 2121-2133, 1998.
70. Sterman DH, et al. A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol. Ther.*, 18: 852-860, 2010.
71. Brockmann, M.A., Papadimitriou, A., Brandt, M., Fillbrandt, R. et al., Inhibition of intracerebral glioblastoma growth by local treatment with the scatter factor/hepatocyte growth factor-antagonist NK4. *Clin. Cancer Res.* 2003, 9, 4578-4585.
72. Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T. Angioinhibitory Action of NK4 Involves Impaired Extracellular Assembly of Fibronectin Mediated by Perlecan-NK4 Association. *J. Biol. Chem.*, 284: 22491-22499, 2009.
73. Tolnay E, Kuhnen C, Wiethage T, König JE, Voss B, Müller KM. Hepatocyte growth factor/scatter factor and its receptor c-Met are overexpressed and associated with an increased microvessel density in malignant pleural mesothelioma. *J Cancer Res Clin Oncol*, 124: 291-296, 1998.
74. Klominek J, Baskin B, Liu Z, Hauzenberger D. Hepatocyte growth factor/scatter factor stimulates chemotaxis and growth of malignant mesothelioma cells through c-met receptor. *Int J Cancer*, 76: 240-249, 1998.
75. Harvey P, Warn A, Dobbin S, Arakaki N, Daikuhara Y, Jaurand MC, Warn RM. Expression of HGF/SF in mesothelioma cell lines and its effects on cell motility, proliferation and morphology. *Br J Cancer*, 77: 1052-1059, 1998.
76. Mukohara T, Civiello G, Davis IJ, Taffaro ML, Christensen J, Fisher DE, Johnson BE, Jänne PA. Inhibition of the met receptor in mesothelioma. *Clin Cancer Res*, 11: 8122-8130, 2005.
77. Li, Q., Kawamura, K., Okamoto, S., Yamanaka, M., Okamoto, S., Yang, S., Yamauchi, S., Fukamachi, T., Kobayashi, H., Tada, Y., Takiguchi, Y., Tatsumi, K., Shimada, H., Hiroshima, K. and Tagawa, M.: Up-regulated p53 expression activates apoptotic pathways in wild-type p53-bearing mesothelioma and enhances cytotoxicity of cisplatin and pemetrexed. *Cancer Gene Ther.* 19: 218-228, 2012.
78. Boutin C et al., *CHEST* 1995 ;108:754-758, 1995.
79. Sterman D.H, et al. A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-β gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol. Ther.* 18: 852-860, 2010.

80. Stermán D.H, et al. A trial of intrapleural adenoviral-mediated interferon- α 2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 184: 1395-1399, 2011.

臨床研究課題名

切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発
現型アデノウイルスベクターによる臨床研究

説明同意文書

- 第 2 版 2012 年 2 月修正
- 第 3 版 2012 年 5 月修正
- 第 4 版 2012 年 6 月修正
- 第 5 版 2012 年 10 月修正
- 第 6 版 2013 年 3 月修正

よくお読みください

臨床研究参加の説明書

「切除不能悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療」

この説明書は、「切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究」に参加される予定の患者さんに、具体的な内容をご説明するためのものです。

この説明書の内容について、わからないことやお聞きになりたいことがありましたら、いつでもご遠慮なくお申し出ください。

千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科

千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学

目次

1. はじめに -臨床研究とは-	3
2. 悪性胸膜中皮腫の治療法と課題について	4
3. この臨床研究の概要と目的	5
4. この臨床研究の特色と背景	6
5. この臨床研究に参加していただくための条件	8
6. 臨床研究の具体的な方法	10
7. 臨床研究中の検査について	13
8. 臨床研究を中止させていただく場合があります。	15
9. この臨床研究に際して予想される危険性について	16
10. 予想される効果	19
11. 悪性胸膜中皮腫の治療法の選択について	20
12. 治療にかかわる費用について	22
13. 健康被害の治療とその医療費について	23
14. この臨床研究に関連した新しい情報についてはすぐにご説明 いたします。	23
15. この臨床研究に参加しなくても不利益は受けません。 参加していただいた場合でも、いつでもやめることができます。	24
16. プライバシーの保護について	25
17. 守っていただきたいことについて	26
18. 知的財産権と利益の相反について	26
19. 臨床研究担当医師について	27
20. 患者さんからの質問ならびに臨床研究担当医師からの説明	28

NK4 遺伝子治療に関するご説明文書

1. はじめに -臨床研究とは-

千葉大学医学部附属病院では、悪性胸膜中皮腫の患者さんに最善の治療を提供するとともに、より優れた新しい治療法の開発を目指した研究を行っております。私たちは現在、悪性胸膜中皮腫に有効と思われる薬を開発していますが、今回の臨床研究の治療方法に関して、その期待される効果と安全性についてご説明し、あなたに治療にご協力いただきたいと考えています。もちろん、この臨床研究への参加に際しては、あなたの自由な意思が尊重されます。また臨床研究に参加されなくとも、今後のあなたの治療に不利益になることはありません。

臨床研究とは、ある病気の患者さんに新しい治療法を試みて、それが安全であるかどうか、あるいは効果があるかどうかを判定するために医師が行う研究です。その治療法は、患者さんで行う前に動物実験をはじめとする様々な基礎的な研究を行って、少なくとも動物実験レベルでは安全であること、効果があることが確認されたものです。

この臨床研究については、国の定めた指針に基づいて計画され、実施する病院の倫理委員会と国の審議会の審議を受けた後に行われます。私たちの研究もこのような審査を受けた後に実施するものです。ただし、動物で安全で効果があったからといって、人でも同じように安全で効果があるとは言い切れません。したがって多くの患者さんに応用する前に、少ない患者さんで治療を行ってみて、安全性と効果を確認する必要があります。このように、臨床研究には文字通り研究的な一面があることを十分ご理解ください。それでは、以下の文章を読み、説明をお聞きください。

2. 悪性胸膜中皮腫の治療法と課題について

悪性胸膜中皮腫は肺の外側の胸膜にできる悪性腫瘍(がん)の一種で、胸壁の内部にそって広がり、心臓を包む心膜なども巻き込んでいく性質をもっています。現在その標準的な治療法には手術、放射線治療、化学療法があります。

手術は病巣が片方の胸腔に限局した、ごく早期の方がその治療の対象となります。しかし広域にわたって胸膜・胸壁を切除したり、片方の肺を丸ごと一緒に切除するため、手術後の呼吸機能が低下し、手術によって体に与える影響(侵襲)としてはかなり大きなものがあります。また手術で完全に切りきったと判断される場合でも、実際には手術後の再発も比較的多くみられ、完全に治癒することはなかなか難しいと考えられています。

また悪性胸膜中皮腫には、あまり放射線治療の効果も期待できません。がんが胸腔内を這うように拡がるために、放射線照射の目標を定めにくく、また照射範囲が広がるため、照射ががん組織の周囲の正常な組織(肺、せき髄など)にも及び、これらの組織に与える放射線障害(副作用)を無視できないからです。したがって放射線治療だけでは、悪性胸膜中皮腫の治癒は期待できず、現在では疼痛コントロールなど症状の緩和目的で行われています。

したがって、手術で切除不可能な悪性胸膜中皮腫に対しては、現在は抗がん剤による化学療法が主に行われています。これまで悪性胸膜中皮腫に対する標準的な化学療法がありませんでしたが、ここ最近、シスプラチンとペメトレキセドという2つの抗がん剤を併用して点滴投与することで、生命予後(治療後の生存率)が一定程度改善する事が明らかになっています。最近では、化学療法、放射線治療、手術を組み合わせた集学的治療についての臨床試験が行われ始めていますが、患者さんに与える侵襲も大きく、また生命予後に与える効果に関してはまだ明確ではありません。このような治療の状況で、手術、放射線、化学療法による治療成績は良好ではなく、今までの治療法以外の新しい治療法の開発が必要となってきております。

3. この臨床研究の概要と目的

この臨床研究では、悪性胸膜中皮腫の患者さんの中で、手術を実施するのが困難あるいは不可能で、①抗がん剤による治療を行ったもののあまり効果が認められなかった患者さんや、②抗がん剤による治療を望まない患者さんに対して、NK4 という遺伝子を有するアデノウイルスベクターを用いる遺伝子治療を行います。NK4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターは、すでに基礎的な研究で抗がん剤としての治療効果が認められています。しかし、悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療に限らず、遺伝子治療そのものに関する臨床研究は、まだ研究段階の治療です。患者さんに行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。今回の臨床研究の主たる目的は、この治療法の安全性の確認であり、どのような副作用が起こるのか、ということ調べます。次に、がんが進行するのを抑えたりすることがすこしでもできるのか、症状がすこしでも軽快するのか、そして可能であればがん細胞にどのような作用があるのか、ということ調べます。

なお、この臨床研究では、1 回だけアデノウイルスベクターを投与します。その後 1 ヶ月の間、アデノウイルスベクターによる効果や影響を観察させていただきます。したがって、アデノウイルスベクター投与後 1 ヶ月の間は、特別の理由がなければ、抗がん剤の投与は致しません。またアデノウイルスベクター投与は、これまで受けられた抗がん剤投与が終わってから少なくとも 1 ヶ月の間をおいてからになります。アデノウイルスベクター投与は 1 日で終了いたしますので、アデノウイルスベクター投与前後計 2 ヶ月は抗がん剤の投与はないということになります。なお、臨床研究はアデノウイルスベクター投与後 1 ヶ月を過ぎても継続し、投与後 1 年後まで観察期間が続きます。患者さんの診察や治療は、途中で中断することなく、臨床研究の終了後も引続き継続されます。なお、NK 遺伝子を有するアデノウイルスを使用した臨床研究は、この研究が世界で初めてあり、そのためどのような副作用があるのかについては正確には不明です。予期せぬ重大な副作用の可能性も否定できません。

4. この臨床研究の特色と背景

この臨床研究の大きな特色は、従来の治療法とは異なり、遺伝子を治療に使用することです。遺伝子が体内の細胞に入ると蛋白質を作り、作り出された蛋白質がその効果を発揮することを期待しているものです。この臨床研究で私たちは、NK4 と呼ばれる遺伝子を使用します。NK4 はもともと体内に存在する HGF（肝細胞増殖因子）という蛋白質が分解されてできる蛋白質です。動物実験の結果、この NK4 遺伝子をがん細胞に導入すると、NK4 蛋白質が作られて、その結果がんの増殖が止まる、がん細胞が死滅する、がんの他の臓器への浸潤が抑制される、がんの転移を防ぐ等の効果があることがわかっています（図1）。しかし、ヒトに対して臨床研究が実施され、同様な効果があると証明されたわけはありません。そもそも今回の NK4 遺伝子を用いた臨床研究は、世界で最初にヒトに対して実施されるものです。また遺伝子治療による悪性胸膜中皮腫を対象とした臨床研究も、これまで報告された限りにおいて、米国を中心に 73 例（このうち、アデノウイルスベクターによる治療は 61 例です）の患者さんに対して実施された以外はありません。

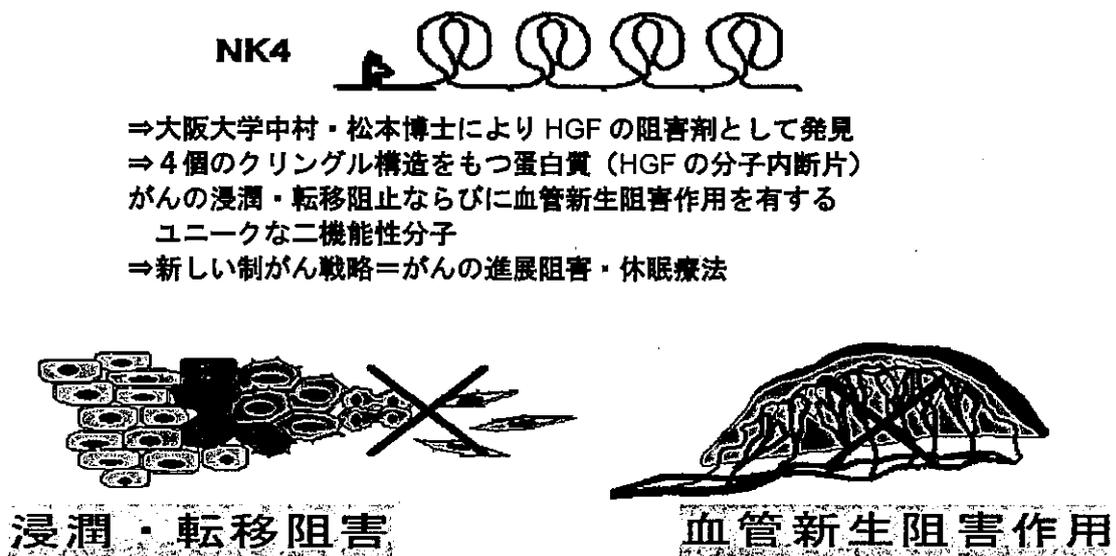


図1. NK4 の構造と機能の概略

NK4 遺伝子をがん細胞に導入するには、アデノウイルスというウイルスを使用します。天然のアデノウイルスは、風邪などの呼吸器障害を起こすことが多いウイルスですが、大部分の方は自然に治ってしまいます。遺伝子をがん細胞に導入する運び屋（ベクター）と

して用いるアデノウイルスは、ヒトの体内で増殖できないようにウイルスを変化させて、いわば無毒化させています。この変化させたウイルスは、「アデノウイルスベクター」(図 2) と呼ばれています。

あなたの悪性胸膜中皮腫に注射するアデノウイルスベクターは、千葉大学と神戸大学の共同研究チームが神戸大学の関連施設(株)ジーンメディスンジャパン:現(株)GMJ、<http://www.genemedicine.jp/>)で製造したものです。このアデノウイルスベクターの基本的な構造は、すでに千葉大学先端応用外科が、食道がんを対象に行った遺伝子治療の臨床研究で用いたベクターと同じものです。今回用いるベクターは、食道がん用いた p53 遺伝子の代わりに NK4 という遺伝子を組み込んだものです(使用する医薬としては Ad5CMV-NK4 という名称です)。今回の臨床研究は、主にこのアデノウイルスベクターを投与した場合の安全性および身体での反応を検討し、さらに有効性を検討するものです。この臨床研究には、合計で 9 人の患者さんに参加していただく予定です。NK4 遺伝子を投与する臨床研究は今回が世界で初めてであるため、ヒトにおける安全性については不明です。しかし、小動物(マウス)を用いた試験では、重大な副作用は認められませんでした。また、米国では、今回用いるアデノウイルスベクターとほぼ同様の構造をした 3 種類のアデノウイルスベクターを使って、合わせて 61 人の悪性胸膜中皮腫の患者さんの胸腔内に投与された経験(臨床研究)がありますが、その結果から、今回の治療に使う予定のベクターの量では重篤な副作用がないことが予想されます(これについては、9. この臨床研究に際して予想される危険性について、でさらに詳しく説明します)。なお、米国の臨床試験で使用されたアデノウイルスベクターでは、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子、ベターインターフェロン遺伝子、アルファインターフェロン遺伝子が組み込まれています。今回の臨床研究で使用するものと同じアデノウイルスベクターを使用していますが、組み込まれた遺伝子の種類が異なっております。したがって、アデノウイルスの投与そのものによる副作用は、過去の経験からおおよそどのようなものであるか想定できますが、NK 蛋白質が体内に入った場合の副作用については不明のままです。

なお、この臨床研究で使用するアデノウイルスベクターは、千葉大学と神戸大学の共同研究チームが上記ジーンメディスンジャパン社という神戸大学発のバイオベンチャー企業の支援を受けて製造した、日本で最初のアデノウイルスベクターで、まだ研究途上の段

階にあるものです。また、これまで実施された遺伝子治療の臨床研究と異なり、アデノウイルスベクターを胸腔内に投与する点が特殊であることをご確認下さい。

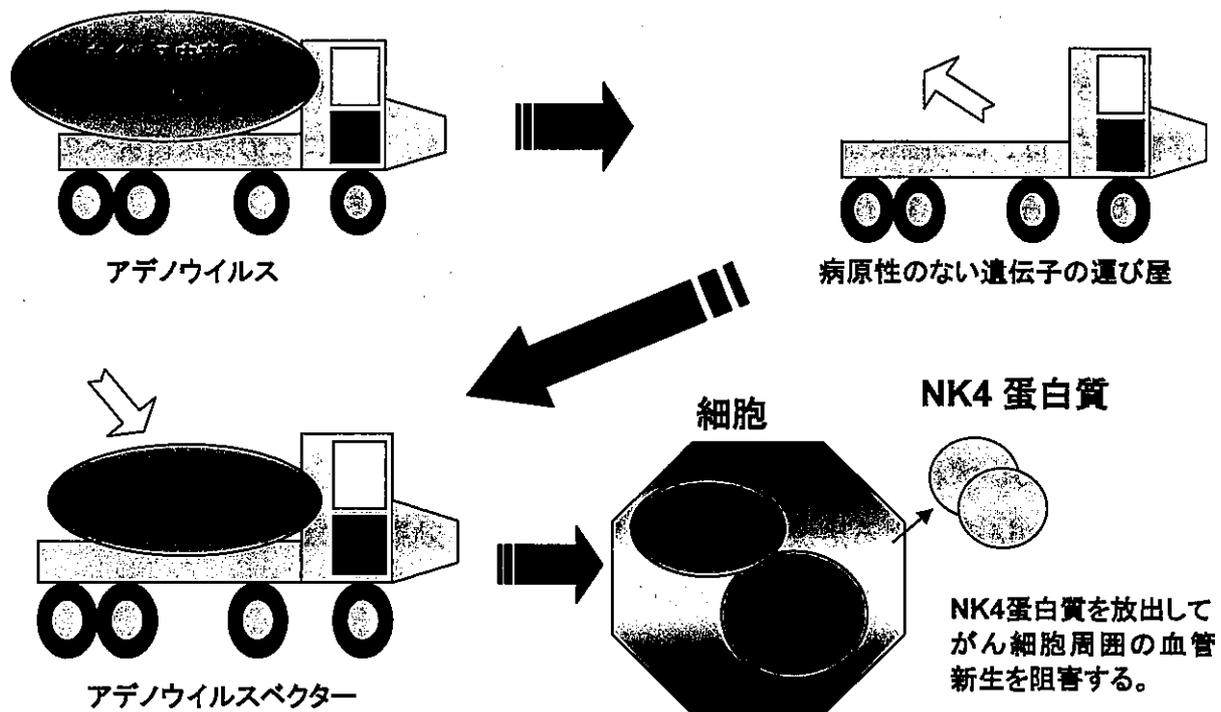


図2. アデノウイルスベクターの構造とその作用

5. この臨床研究に参加していただくための条件

この臨床研究に参加していただく患者さんは、悪性胸膜中皮腫と診断された方で、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患者さん（切除に伴う危険性の高い方、切除しても生命の延長が期待できない方）が対象となります。

悪性胸膜中皮腫はその進行度に応じて4つのステージに分けられており、あなたの現在の病期はステージ（ ）です。

投与に先立ち、投与可能であるか否かを確認するためにいくつか検査を行います。実施

するのは、理学検査（聴診や体温、脈拍測定等）、血液検査（エイズウイルス、肝炎ウイルスの検査を含む）、血圧測定、唾液・血液及び尿におけるアデノウイルスベクターの有無（試料を集め、後日の検査の対照に使用します）、心電図、尿検査、疼痛評価（痛みの状況をお尋ねする検査）またはがんの大きさを測定するための画像診断（X線撮影、CT スキャン、可能であればPET-CT）などです。なお、臓器または組織移植歴のある方（腎臓移植や骨髄移植など）は、この臨床研究に参加することはできません。以下にこの臨床研究への参加できる方の条件と参加できない方の条件についてご説明いたします。

この臨床研究に参加できる方

- 1) 切除手術不能な悪性胸膜中皮腫を有しており、放射線による治療を受けたことがない方。
- 2) 以下のいずれかに当てはまる方。
 - A) 抗がん剤による治療を受けたものの、あまり効果がなかった方。
 - B) 抗がん剤による治療を望まない方。

なお、以前抗がん剤による治療を受けたことがある方は、治療用アデノウイルスベクターの投与を受けるまで4週間以上の間をおく必要があります。
- 3) 患者さん本人が、文書を用いて十分な説明を受けたうえで臨床研究の参加に同意し、同意書に署名した方。
- 4) 胸腔内に治療用アデノウイルスベクターが直接投与できる方。
- 5) 年齢が20歳以上80歳以下の男性及び女性
- 6) 現在、日常生活が制限なく行えるか、あるいは歩行可能で自分の身の回りのことは全て可能だが作業はできず、ベッド上で過ごす時間が一日の半分以下である方。（Performance Status が良好な方）。
- 7) 女性の場合は妊娠・授乳をしていない方。コンドームを用いた避妊に同意された方。
- 8) 骨髄機能や肝機能、腎機能等が適切である方。

この臨床研究に参加できない方

- 1) コントロール不可能な活動性感染症等、がん以外の重い疾患がある方。
- 2) 悪性胸膜中皮腫以外の他のがんの治療をうけた方あるいはうけている方。ただし、すでに完治して2年以上経っている方は参加できます。

- 3) 脳への転移がある方。
- 4) 胸腔内に治療用アデノウイルスベクターを直接投与できない方、あるいは治療を要するほど心嚢液（心臓のまわりをとりかこむ袋である心嚢と心臓の間に貯留する液体）が溜まっている方。
- 5) 本臨床研究登録前 4 週間以内に、他の未承認試験薬の臨床試験に参加したことのある方。
- 6) 本臨床研究登録から試験期間終了までの間（1 ヶ月半から 2 ヶ月）に本臨床研究以外の抗がん剤治療等の中皮腫の治療を受ける予定のある方。
- 7) すでに胸膜癒着術という手術を受けたことがある方。
- 8) 中程度以上の末梢神経障害のある方。
- 9) 間質性肺炎や肺線維症にかかっている方。
- 10) 研究計画書に従った治療や経過観察が難しい事情がある方。
- 11) 過去にアデノウイルスベクターを用いた遺伝子の導入療法を受けたことがある方。
- 12) 骨髄移植や臓器移植の治療を受けたことがある方。
- 13) 妊娠されている方、妊娠の可能性のある方、授乳中の方。また避妊に同意頂けない方。
- 14) 血清検査により、エイズウイルス又は肝炎ウイルスに感染していると判断される方。
- 15) その他、臨床研究担当医師が本研究の対象として不相当と判断した方。

6. 臨床研究の具体的な方法

参加することが決まった時点で、NK4 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを以下の方法により投与いたします。試験期間は 28 日間(4 週間)です。試験開始第 1 日目にアデノウイルスベクターを胸腔内に投与します。その後安全性を検討する検査を行い、試験期間終了時とその後にも治療効果の判定をします（図 3）。投与量は、アデノウイルスベクター量として低用量(1×10^{10} vp)、中用量(1×10^{11} vp)、高用量(1×10^{12} vp)の 3 群を設定します（vp はウイルス量を示す単位で virus particle の略称で、ウイルス粒子の数量を示しま

す)。

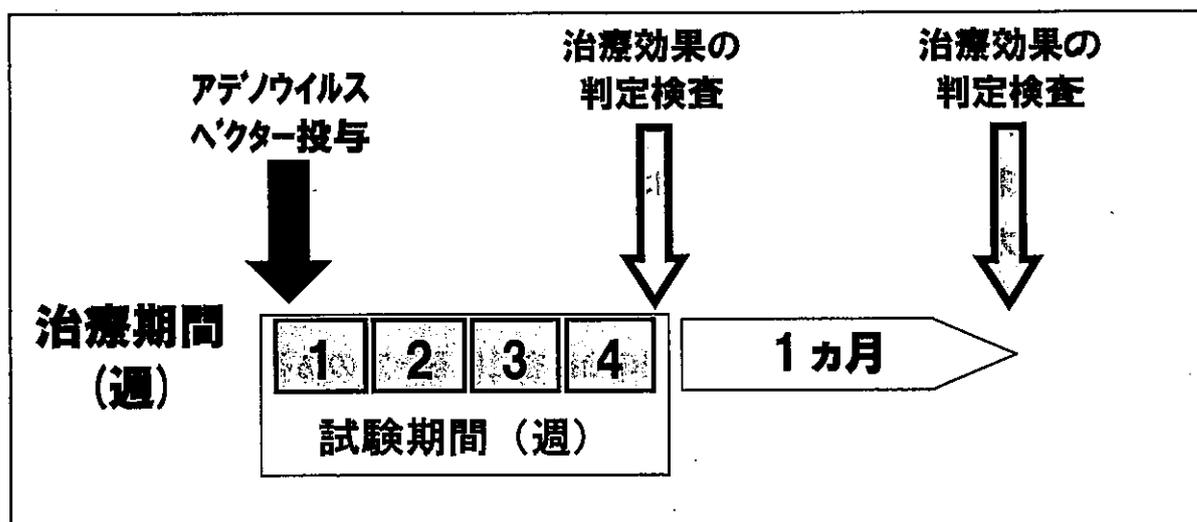


図 3. 臨床研究のスケジュール

- アデノウイルスベクター投与による遺伝子治療は、試験開始第 1 日目に行います。
- 治療開始後安全性を検討する検査をほぼ毎週行い、試験期間終了時とその後も治療効果を判定する検査を行います。
- アデノウイルスベクターの投与は 1 回でその投与量は、低用量 (1×10^{10} vp)、中用量 (1×10^{11} vp)、高用量 (1×10^{12} vp) の 3 通りです。それぞれ 3 名の方の治療を行って徐々に投与量を増やしていきます。
- 現在までに、_____ 名の方が治療を受けていらっしゃいます。
- あなたは、(低・中・高) 用量で、_____ vp の投与量です。

投与は超音波によって投与する部位の位置を確認しつつ、がんに近い肋骨の間から細い注射針を用いて、胸腔内にゆっくりと注入します。アデノウイルスベクターは生理的食塩水に溶かして 100 ミリリットルになっています。(図 4)。注射針を刺す箇所の不快感緩和のため、臨床研究担当医師が局所麻酔を行う場合があります。またアデノウイルスベクターを投与後一定の時間、アデノウイルスベクターとがん組織との接触を高めるため、体の位置を決めてその姿勢を取って戴くことがあります。これは、胸腔内は液体の移動が可能な空間であるため、一度注入されたアデノウイルスベクターを広く行き渡らせるためです。また、胸腔内に 100 ミリリットルの液体を注入しますが、この胸腔内に 100 ミリリッ

トルの液体が貯留することによって、痛みが生じることはありません。また、胸にチューブを入れて持続的に胸水を排出している場合には、そのチューブよりアデノウイルスベクターを入れた後 12-24 時間の間排出をいったん中止して、その後排出を再開いたします。これは注入したアデノウイルスベクターをとがん組織との接触を高めるためです。なお、アデノウイルスベクターの投与は千葉大学附属病院感染症管理治療部の病室で行います。

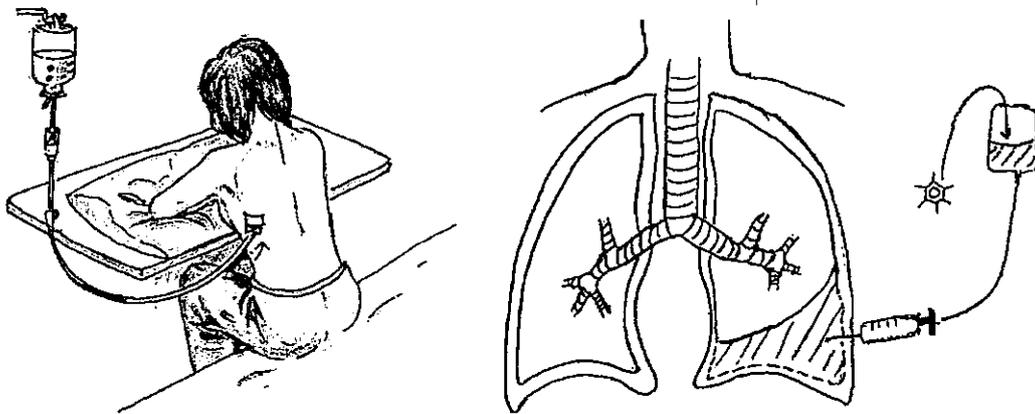


図 4. アデノウイルスベクターの注入方法

入院期間はあなたの健康状態により異なります。治療に使われたアデノウイルスベクターのうち尿を介して体外に出るものはごく一部分とされますが、仮に体外に出た場合にそのアデノウイルスベクターが他人に感染する可能性が全くないとはいえません。そこで、アデノウイルスベクターを投与した後、ある期間（下記）隔離された個室（東棟 3 階の感染症管理治療部：面会は可能です）で過ごしていただきます。また、1 週間は、排泄物や個室から持ち出すものについて、医療スタッフが決められた消毒作業を行います。また、必要と判断された場合に、アデノウイルスベクターの排泄があるかどうかを確認し、アデノウイルスベクターの排泄がなくなるまでの間は排泄物の消毒作業を行います。アデノウイルスベクターが体外に排泄されると考えられるのは、尿を介してです。アデノウイルスベクターが排泄されないことが証明されるまでは退院することができません（通常は投与から 7～10 日間程度と推測されます）。この排泄の有無の検査は、唾液、血液、尿の一部を採取して行います。また、アデノウイルスベクターが排泄されないことが確認できれば退院可能となります。

7. 臨床研究中の検査について

この臨床研究に参加されている期間の種々の検査につきましては、表 1 に示します。まず悪性胸膜中皮腫かどうか診断を確定するためがん組織の一部を採取し病理検査が行われておりますが、この際に採取された組織の一部を用いて検査をさせていただきます。この目的は、NK4 遺伝子を注入前に、がん組織中の NK4 遺伝子の状態を記録するためです。また体内のアデノウイルスベクター分布・排泄を検査するために、当初は週 2 回、その後は週 1 回、血液、尿、唾液を採取させていただきます（必要と判断された場合は追加して実施します）。採取したサンプルは、将来における分析・解析・研究のために超低温フリーザーにて保管されます。この臨床研究にご同意いただくことは、このサンプル採取と保存にご了解をいただくことを含んでおります。

あなたの身体が今回投与されたアデノウイルスベクターにより有害な影響を受けていないかをチェックするため、定期的いくつかの検査を行います。実施するのは、理学検査、血圧測定、血液検査、心電図及び尿検査などです。またがんに対する効果も検討するため、X線撮影、CT スキャン（可能であれば PET-CT）、血液検査（腫瘍マーカーの検査）、疼痛評価などを行います。また、胸水などが蓄積してくれば、胸水を採取し、そこに含まれている細胞の検査も可能であれば行います。

投与終了後は、臨床研究担当医師が定期的に経過を診察させていただきます。この臨床研究の治療が開始された日から 1 年間は、がんの状況と疼痛評価などの把握にご協力をお願いします。また、この臨床研究に参加している間は、他の臨床試験には参加できませんのでご了解お願いいたします。なお、アデノウイルスベクター投与後 1 ヶ月を過ぎれば、患者さんの状況や希望に応じて適切な治療を行います。

この臨床研究には、3 年間の研究期間内に合計で 9 名の患者さんに参加していただく予定です。

表 1. 臨床研究中の検査スケジュール

期間	同意取得	スクリーニング	登録	試験開始 前検査	試験期間						7月-7月 ⁷⁾	中止 ²⁾	
					14日以前	14-7日前	7日前 ~前日	3日前~ 前日 ¹⁾	当日(1 日目)	2日目			7日目
同意取得	X												
被験者登録			X										
既往歴、診断、前治療 歴		X											
徴候・症状 ⁴⁾		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
理学所見 ⁴⁾		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
Ad5CMV-NK4投与					X								
バイタルサイン		X		X	X ⁵⁾	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
Performance Status ⁴⁾		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
血液学的検査・ 血液生化学的検査		X		X	X	X	X	X	X	X	X		
尿検査		X		X	X	X	X	X	X	X	X		
腫瘍評価 ⁶⁾		X								X	X		
心電図 ⁷⁾		X		X	X	X	X	X	X	X			
妊娠検査 (β-HCG) ⁸⁾		X											
HIV1, HIV2, HBV, HCV 検査		X											
疼痛評価 ⁴⁾				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
胸部X線検査		X					X	X	X	X	X		
QOL評価 ⁴⁾				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
胸水検査 ⁹⁾				X ¹⁰⁾						X ¹¹⁾	X ¹¹⁾	X ¹¹⁾	
血清による生物学的反 応				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X ³⁾
PET-CT ¹²⁾		X								X	X		
腫瘍マーカー ¹³⁾		X		X				X		X	X		
アデノウイルスベク ター体内分布・排泄調 査 ¹⁴⁾				X	X	X	X	X	X	X			
有害事象													
薬剤投与歴		X											

- 1) 試験開始前 3 日以内に実施します。
- 2) 他の抗がん治療を行う場合や、試験の中止を希望された場合、試験を中止します。
- 3) 入院していた場合はこの検査を実施します。
- 4) 治療開始後は診療時に実施します。
- 5) 投与の前後に実施します。
- 6) 臨床研究期間を通じて、同一の測定方法を用います。
- 7) 投与後は 48 時間の間モニターを装着して頂きます。
- 8) 女性の方のみ実施します。
- 9) 実施が可能な場合だけ実施します。
- 10) 実施が可能な時点で実施します。
- 11) 実施が可能な時点で実施します。
- 12) 実施可能な方のみ実施します。
- 13) 実施可能な方のみ実施します。
- 14) 唾液、血液および尿について、アデノウイルスベクター排泄がなくなるまで PCR 検査を実施します。

8. 臨床研究を中止させていただく場合があります。

以下の場合はこの臨床研究の実施を中止いたします。

1. 対症療法でも対処できないほどの重い副作用が、アデノウイルスベクター投与中に認められたとき。
2. アデノウイルスベクター投与後 1 ヶ月以内に、この臨床研究以外の抗がん剤投与など臨床研究の評価に影響を与える治療を行ったとき。
3. あなたが妊娠しているなど、上記の臨床研究に参加できない条件に当てはまることが明らかになったとき。
4. あなたが臨床研究への参加の辞退を申し出たとき。
5. 臨床研究担当医師が医学上中止の必要があると判断したとき。
6. 臨床研究の実施に関して承認をうけた計画書に従っていないことが判明し、これが計画書に対する重大な違反と判断されるとき。

この臨床研究が中止となった場合には、その時点でご相談の上で、あなたにとって適切な治療方法へ変更いたします。

9. この臨床研究に際して予想される危険性について

NK4 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを人の体内に注入する遺伝子治療はこれまで世界中のどこでも行われておらず、この臨床研究が最初のケースであることから、その危険性を正しく評価することは困難です。しかし、マウスを用いた安全性試験の結果から、一部の副作用があるにしろ、この臨床研究を比較的安全に行うことがおそらく可能であると現在判断しています。もちろん、予測を超える重大な副作用が出現する可能性は否定できません。

このアデノウイルスベクターを人体に投与する臨床研究は、米国を中心に少なくとも500名を越える方を対象に行われており、中国では実際にかん治療に医師がアデノウイルスベクターを使用しております（少なくとも3,000人以上の方に使用されています）。したがってこれまでの経験から、アデノウイルスベクターの副作用については、かなりのことが明らかになっております。アデノウイルスベクターは注射で投与しますので、最も多く認められた副作用は、注射した部位の痛みです。この痛みは、鎮痛剤を必要とする強い痛みではなく、いずれも投与後半日程度のうちに消失しています。また、発熱が多くの方に見られましたが、いずれも39-40℃以下の発熱で、時間経過とともにあるいは解熱剤を使用して消失しています。そのほかには、注射部位の腫れや出血、発疹、精神的な不安、さむけ、場合によっては頭痛などインフルエンザのような上気道感染症の症状、悪心、軽度の浮腫などがあります。ただし、これらはアデノウイルスベクターをどの部位に、どの程度の量を投与するかによって異なってきます。

遺伝子を運ぶアデノウイルスベクターは改良されており、このままで感染症を起こすことはありませんが、まれにアデノウイルスベクターが変化し、感染症がおきる可能性を否定できません。しかしアデノウイルスは、通常かぜ以外の疾患を起こさないため、たとえばアデノウイルスベクターが感染力を持っても、重い合併症の心配はないと考えられます。しかし、生体防禦の担い手である免疫系（リンパ球、抗体など）が、アデノウイルスベクターそのものに強く反応して、急性アレルギー反応やそれによるアデノウイルスベクターの急速な破壊により、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ります。この臨床研究とは別の遺伝子を用いた研究で、オルチニントランスカルバミ

ラーゼという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ベクターに組み込んで、肝臓の動脈内に直接注入するという遺伝子治療の臨床研究が米国の大学で行われました。この研究で、初めの17例までは特に重い副作用は認められませんでした。18例目の患者さんが投与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（1999年）。今回の臨床研究では、(1)ベクターを肝臓の動脈内に直接投与するのではなく胸腔内に投与すること、(2)今回使用するベクターの量が米国死亡例の10分の1程度であること、の2点が異なります。しかし、マウスを用いた動物実験や、米国で行われた悪性胸膜中皮腫の遺伝子治療の臨床研究から、胸腔内へのアデノウイルス投与であっても、血中にウイルスが移行し、最終的には肝臓に多く集積して（アデノウイルスベクターは肝臓に集積をして、大量に投与すると肝障害をおこすことが知られています）、肝障害を起こす可能性は十分にあります。しかも、この肝障害は場合によっては長期化することも考えられます。ただし、これまでの臨床研究の結果から判断して、ウイルスによる肝障害は時間経過と共に次第に改善するものと予想をしております。

胸腔内にアデノウイルスベクターを投与した臨床研究については、米国でアデノウイルスベクターを用いた3つの遺伝子治療研究の報告（単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ遺伝子、ベクターインターフェロン遺伝子、アルファインターフェロン遺伝子が組み込まれたアデノウイルスベクターを使用）があり、合計61名の悪性胸膜中皮腫の患者さんに投与が行われました。このうち、今回の臨床研究で使用する最高用量（すなわち高用量、 1×10^{12} vpの群）と同じか、これを超えるアデノウイルスベクターの投与を受けた患者さんは40名です。これらの患者さんに生じた副作用には、血液中のリンパ球の減少、肝機能の障害などがありましたが、いずれも自然に回復しています。その他、低血圧と低酸素、低ナトリウムや低カリウム血症にともなう心室性期外収縮と頻脈が観察されましたが、いずれも酸素吸入、輸液にて改善しております。さらに胸痛、鼻炎、一時的な発熱、貧血も報告されていますが、これも症状はあまり重くありませんでした。しかし、アルファインターフェロン遺伝子のアデノウイルスベクターの投与を受けた方の中に、7日から10日間続くインフルエンザ様の症状が継続した方が2名おられました。この症状は、遺伝子治療によって産生されたアルファインターフェロン蛋白質によるものと考

えられますが、遺伝子治療による副作用であった可能性も否定できません。また、悪性胸膜中皮腫の患者さんではありませんが、ベータインターフェロン遺伝子のアデノウイルスベクターを胸腔内に投与された3名の肺がん患者さんのうち1名の方に、血液凝固に関わる検査値に異常（部分トロンボプラスチン時間の延長）が見られました。この方は、その後も経過を観察されておりましたが、実際には血液凝固異常による症状が出現しませんでした。しかし、この3名のうち別の肺がん患者さん1名の方に、アデノウイルスベクター投与後に心タンポナーデが出現致しました。心タンポナーデとは心臓を包む膜（心嚢）と心臓の間に液体が貯留することで、大量の液が急速に貯留すると、重篤な場合は呼吸困難、血圧低下、意識障害がおこる場合があります。この患者さんでは、心嚢内に針を刺し入れ貯留液を排出させたため症状が改善しました。この心タンポナーデの原因として、もとの肺がんに対する炎症なのか、それ以外の原因たとえばアデノウイルスベクターによる炎症によるものなのか、現時点でも不明のままです。この肺がん患者さんのような副作用は、もとの疾患であるがんの種類に限らず、胸腔内にアデノウイルスベクターを投与することによって起こる可能性があります。そのほか胸腔内投与そのものについても、副作用が報告されています。それは、治療のため胸腔内に持続的にチューブを入れておいた患者さんの中に、そのチューブを入れた部位に細菌感染が生じた例ですが、この症例では抗生物質を使用して細菌感染症が対処されております。以上の米国での研究結果から、今回の臨床研究でも、おそらく治療が困難な重い副作用は出ないと予想しておりますが、過去の臨床試験とは投与する遺伝子の種類が異なりますので、実際にはどのような副作用がおきるか明らかでなく、慎重な投与を心がけるように致します。

また今回の胸腔内へのアデノウイルスベクター投与では、注射針を胸腔内に刺し入れる操作を伴うことがあり、この手技によって生じる頻度の高い危険性（副作用）は、疼痛、出血、気胸（注射針で肺に小さな穴があいてパンクの状態となることですが、程度が軽ければ肺は自然と膨らみます）です。さらに可能であれば、胸腔内での組織または細胞採取、胸水の採取を行いますが、これらの処置での危険性も疼痛、出血、気胸です。しかし、これらの危険性は、がんの患者さんで通常の診断・治療目的で実施される組織、胸水の採取等の場合と変わりありません。また、今回の遺伝子治療に限らず胸腔内に針を刺し入れる操作により、胸腔内の腫瘍細胞が体表面に出て腫瘍を形成することがありますが（いろい

るな場合がありますが、平均して約 20%の頻度です)、放射線をその部位に照射することによって事前にこれを予防するなど、適切に処置を行います。

NK4 蛋白質自体の作用から推測される副作用としては、NK4 が HGF の生理作用を抑えることによる軽度の肝障害、創傷治癒の遅延などがあります。特に、肝障害あるいは組織障害の発生時には、肝再生の抑制・遅延、障害を受けて組織の創傷治癒の遅延が考えられます。すなわち、肝障害が通常に比べて長引く可能性があります。NK4 ががん組織の血管新生を阻害することによって懸念される副作用としては、すでにがん治療に利用されている Bevacizumab (商品名：アバステン)と同様に、胃腸穿孔、出血、血栓症、高血圧などがあります。また、NK4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターによる、想定外の副作用もあり得ます。

いずれにしましても、これらの副作用が予期された時点で、あるいはそれが生じた時点で、適切な処置を講じて副作用の悪化を防ぎ、またその軽減を図るよういたします。

10. 予想される効果

このアデノウイルスベクター投与によって、がんの増殖が停止したり、縮小したりする可能性があります。またがんに関連する症状（たとえば痛み、食欲低下）が緩和される可能性もあります。しかし、NK4 遺伝子を用いた遺伝子治療は世界でも初めてであることから、本治療法の有用性を証明する臨床のデータはなく、あなたにとってこのアデノウイルスベクターが有用かどうかはわかりません。今までに行われた種々の基礎研究の結果では、NK4 蛋白質は、がん細胞（たとえば膀胱がんや乳がんなど）を養う血管系の増加を阻止したり、周囲組織へのがんの浸潤を抑制して、がんの増殖を抑制することが動物実験等で示されております。また、この治療用ベクターに組み込まれた NK4 遺伝子のがん細胞に導入すると、やはりがんの増殖が止まったり、いっしょに用いた抗がん剤の効果が高まる可能性があることがわかっています。さらに、このアデノウイルスベクターの効果は、ヒトの悪性胸膜中皮腫の細胞を用いた場合も同様で、がん細胞の増殖が抑制されること、さらに実験動物を用いた研究でも悪性中皮腫の増殖が抑制されることが観察されております。一

方、副作用に関しては、あくまでも動物実験レベルですが、NK4 蛋白質を正常なマウスに投与しても重い障害や、肝機能や腎機能の大きな低下などはありませんでした。アデノウイルスベクターを用いてNK4 遺伝子をマウスに投与した場合も、同様に重篤な副作用や、大きな異常はこれまでのところ生じておりません。しかし、安全性を検討する過程で、NK4 遺伝子を有するアデノウイルスベクターを大量にマウスの胸腔内に投与すると、多くのマウスで肝障害が長期にわたって見られており、肝障害はこの臨床研究の実施にあたって留意すべき点の一つです。あなたにとっては、効果と副作用のバランスを考えることが必要だと思われませんが、このアデノウイルスベクターを用いた臨床研究が、あなたにとってどのような効果があるのか、また臨床研究による副作用がどのようなもので、どの程度なのかについては、過去に前例がないことから現時点では不明で、予期せぬ事態が生じる可能性もあります。

1.1. 悪性胸膜中皮腫の治療法の選択について

この遺伝子治療法は、現在のがんに対する治療にとって代わるものではありません。本臨床研究では、抗がん剤による化学療法が有効でなかった患者さん、化学療法を受けないと決められた患者さんに、アデノウイルスベクターを投与する遺伝子治療を行います。

悪性胸膜中皮腫の通常の治療は手術療法、放射線治療、抗がん剤による化学療法があり、またこれらを組み合わせた治療も行われています。どの治療法を選択するかは、患者さんの病状、体力などによってほぼ決まってくることになります。

- 1) 手術療法は、もし実施可能な状況であれば、治療効果が最も期待できる治療法です。ただしがんが広範に広がり周囲の組織に拡がっている場合、手術に耐えられる体力がない場合は行えません。悪性胸膜中皮腫の手術は胸壁を切除するため、高度な技術が必要で熟練した胸部外科医のもとでしか行う事ができず、それでも数%の確率で手術によって生命を落とす危険もあります。さらにがんが局所にとどまらず、他の臓器等への転移があきらかな場合も治療効果は期待できません。
- 2) 放射線治療はがんの部位を中心に放射線をあてる治療法です。手術に比べ臓器を切

除しないため機能が温存されます。ただし現在までのところ完全に治癒させる方法とは言えません。照射部位によって副作用は異なりますが、肺臓炎、心、脊髄などの障害を起こすことがあります。悪性胸膜中皮腫は胸腔内をほうように拡大するため、照射の範囲を広く取らざるを得ず、他のがんと比べて副作用が強く出る可能性があります。すでに放射線治療を行っている場合には同じ部位に繰り返し放射線治療を行うことはできません。

- 3) 抗がん剤による治療として、幾つかの薬剤が認められていますが、単独の薬剤で効果が期待できる（がんが小さくなる）割合は 25%以下であることから、単一薬剤での効果はあまり期待できません。悪性胸膜中皮腫は症例数が少ないため、肺がんのような大きな規模な臨床試験が行えず、限られた人数による結果しか明らかになっていません。その中で現在ではシスプラチンとペメトレキセドという 2 剤の組み合わせによる治療が最も治療成績がよく、一般的に行われています。この組み合わせでは部分的にがんが小さくなる確率（部分奏効率 Partial Response）は 41%で、必ずしも満足できるものではありません。その他の薬剤の組み合わせについても各国で臨床試験がされていますが、シスプラチンとペメトレキセドの組み合わせ治療とほとんど効果が変わりません。また、上記化学療法で効果がない場合、次に有効な抗がん剤（組み合わせを含みます）は、残念ながらこれまでのところ知られておりません。
- あなたの場合は、上記の化学療法を行った結果、残念ながらあまり効果がなかったことが分かっています。
- あなたの場合は、化学療法を受けることを望まないという意思表示がなされています。
- 4) その他、症状を緩和する対症療法のみを行い、積極的な治療（がんを小さくしたり生存期間をなるべく延長したりする目的での治療）を受けないという選択肢もあります。特にごく早期で手術が可能である一部の方を除いて、完全に治癒を目指すということが困難であるという事が残念ながら分かっています。そこで、いろいろな条件を考慮して、症状の緩和や苦痛を除くことを最大の目的として、あえて積極的な治療を受けないという選択をとる方もおられます。この場合でも、体力を消耗し

ない程度にがんに対する治療を併用することも可能です。なお、積極的な治療を行う場合も、苦痛を除去するためには最大の措置を行います。

なお、あなたの場合、手術療法、放射線治療はすでに困難であることが判っております。

1 2. 治療にかかわる費用について

通常診察では、費用は患者さんの公的医療保険で支払われ、その費用の一部を定められた割合にしたがって患者さんが負担しています。したがって、あなたが悪性胸膜中皮腫と診断され、入院されていた場合、通常診察にかかる費用については、あなたの公的医療保険でまかなわれ、個室料金などの自己負担分の医療費についてもご負担いただくこととなります。しかし、今回本臨床研究に参加される場合、入院から退院まで基本的に遺伝子治療に関わることで、臨床研究実施に必要な費用、たとえば使用する感染症管理治療部の個室に関わる費用、遺伝子治療に必要な薬剤や、これに関連する特殊な検査などについては、千葉大学病院が管理する私たちの研究費から支払われ、患者さんに新たにご負担頂く費用はありません。具体的には、次のような遺伝子治療に関連するものと、それに関わる検査の費用について、研究費より負担を致します。

- 遺伝子治療のために使用する病室の費用
- 遺伝子治療に使用する薬剤（アデノウイルスベクター製剤）の費用
- 遺伝子治療を実施する手技（胸腔内投与）やそれに使用する物品に関する費用
- アデノウイルスベクターの排泄状況、抗アデノウイルス抗体検査など遺伝子治療の安全性に関わる検査の費用
- がん組織や胸水を調べ、治療効果を検討するための特殊検査の費用

ただし、この臨床研究と関係のない病気に要する医療費には、公的医療保険が適応され、その医療費にかかる一部負担金等は負担していただきます。もし、詳しい費用の内容をお知りになりたいというご希望があれば臨床研究担当医師等ご連絡下さい。

13. 健康被害の治療とその医療費について

この臨床研究は、これまでの報告に基づいて科学的に計画され、その実施にあたっては慎重に行われます。重い副作用などの健康被害がおこらないように注意深く行ってまいります。もし臨床研究の期間中あるいは終了後に遺伝子治療に由来するなんらかの副作用が起こった場合には、現在の医療水準で私たちが行うことができる最善の治療を行います。もしこの臨床研究への参加によってあなたの健康に被害が生じた場合、健康被害の治療に要する費用については病院が負担しますので、患者さんの負担はありません。一方、医療費以外の実費や休業補償、後遺障害に対する補償、差額ベッド料金の補填、医療手当等その他の補償は受けられません。なお、本臨床研究への参加の同意は、患者さんが賠償請求権を放棄することを意味するものではありません。例えば、遺伝子治療に由来するなんらかの重い副作用が起こって、幸いにも一旦助かったとしても、治療の継続が困難となり、最終的にはお亡くなりになる可能性もあります。このような場合には、遺伝子治療の副作用に由来する急性期と回復期の医療費について、病院が負担いたします。しかし、症状が固定した後の医療費は補償されません。また、急性期と回復期の医療費にかかる医療費以外の費用として、例えばお見舞いなどでご家族が病院においでになる時の交通費や食事代なども補償されません。さらに、あなたやご家族がこの治療に関係して仕事を休んだりしたために収入が減ったとしても、それも補償されません。

この臨床研究では、アデノウイルスベクターを胸腔内へ注入するという治療を行います。この治療には現時点では予測できない副作用が起こる可能性もありますが、いかなる状況においても私たち研究グループは、患者さんの状況の応じて適切な処置を行います。

14. この臨床研究に関連した新しい情報はすぐにご説明いたします。

臨床研究への参加を続けるかどうかに関して、あなたの意思決定に影響するような重大な所見が新たに得られた場合、あるいは臨床研究の内容の大幅な変更（スケジュールや投与方

法の変更など)があった場合には、その内容を速やかにお知らせいたします。その場合には、この臨床研究への参加を続けられるかどうかについて、あなたの意思をお尋ねします。

15. この臨床研究に参加しなくても不利益は受けません。

参加していただいた場合でも、いつでもやめることができます。

この臨床研究への参加は、あなたの自由な意思が尊重されます。したがって、あなたがこの臨床研究への参加に同意されない場合でも、今後の治療において不利益を受けることは一切ありません。病状に応じた治療法によって、最善の努力をいたします。また、いったんこの臨床研究への参加に同意された後でも、いつでもあなたのご希望によりこの臨床研究への参加を取りやめることができます。臨床研究参加を取り消しても、これまでと同様の治療を受けることができ、取り消したことにより不利益を受けることは一切ありません。そのほかの治療法については、11. 悪性胸膜中皮腫の治療法の選択についての内容を参考にしてください。

化学療法を希望されなかった方が、遺伝子治療を受けた後に化学療法を希望された時は、化学療法を受けられる状態かどうかを確認した後で、化学療法を受けることもできます。あるいは、遺伝子治療を受けず、その後に化学療法を希望された場合も、同様に状況を確認の上、化学療法を受けることも可能です。遺伝子治療を受けられた場合、その1ヵ月間は基本的には化学療法を受けることはできません。遺伝子治療終了後1ヵ月間たった後の治療については、病状等に応じてさらにご相談の上、適切な治療法を選択致します。

ただし、アデノウイルスベクターを胸腔内へ注入した後は、アデノウイルスベクターを取り除くことができませんので、たとえあなたが臨床研究の中止を希望されたとしても、あなたの体からアデノウイルスベクターが排泄されないことが証明されるまでは、退院することができません。この期間はアデノウイルスベクターの注入後、7~10日間程度と予想していますが、状況によってその期間は前後します。退院後は、希望される治療等を受けることができます。

16. プライバシーの保護について

この臨床研究の結果は、医学関係の専門の学会、医学雑誌などに発表されることがありますが、その際にあなたの名前や身元などが明らかになるようなことはありません。しかし、研究へのあなたの参加はマスメディア等の関心を引くかもしれません。臨床研究担当医師はできる限り秘密を守る努力をします。

また、あなたが、遺伝子治療臨床研究に参加されることを承諾されますと、遺伝子治療の内容を確認するため、もしくは適切に実施されていることを確認するために、学内の臨床研究審査委員会の人や厚生労働省や文部科学省の人のほか、千葉大学が確認依頼をした医療に携わる資格（医師や薬剤師など）をもつ学外の人が、あなたのカルテをみるがありますが、こういった方は法律上の守秘義務がありますので、あなたやあなたのご家族のプライバシーが外部に漏れる心配はありません。臨床研究の結果の整理を専門の企業が請け負うことがあるかもしれませんが、この場合においても、個人を特定できるような事柄は伏せて行われますので、あなたの名前や身元などが明らかになるようなことはありません。

なお、この遺伝子治療臨床研究に参加されることを承諾される日以前の通常診療において実施された検査の結果も、この遺伝子治療臨床研究のために使用されることがありますが、その場合も同様にあなたのプライバシーは保護されます。

また、このアデノウイルスベクターを、将来一般の治療薬としてあなたと同じ病気で悩む患者さんに使用するためには、厚生労働省で定められた基準に従って、さらに詳細な臨床試験を行い、より多くの患者さんの有効性と安全性のデータを集めなければなりません。そのためには、大学病院だけではなく、アデノウイルスベクターを開発する企業（製薬会社）にも臨床研究の企画・立案に参加してもらう必要がでてくるかも知れません。その際、この臨床研究の結果は、アデノウイルスベクターを開発するための資料として、当該企業に開示されるかもしれません。もちろん、企業に開示する情報は今回の臨床研究結果に限定したもので、参加していただいたあなたの個人情報（名前など）は記号などに置き換え、プライバシー保護を厳守致します。ただ、現時点において、このような企業はなく、またそれを希望している企業もありません。

また、個人情報の開示、訂正、利用停止等に関しては、患者さんのお申し出に応じて手続きすることが可能です。手続き方法につきましては、このご説明文書の最後に添付した参考資料：国立大学法人千葉大学個人情報開示請求等取扱規程をご参照ください。

17. 守っていただきたいことについて

妊娠する可能性がある女性は、臨床研究開始前に妊娠検査（尿検査）を行って妊娠していないことを確認する必要があります。現在のところ、この治療法の胎児に対する長期の影響は確認されていないため、臨床研究参加中は医学的に確立された避妊法を実施していただくようお願いいたします。もし妊娠された場合は本臨床研究を中止していただくこととなります。また、あなたとあなたの配偶者には、臨床研究参加中は障壁法による避妊を行うようお願いいたします。あなたかあなたの配偶者が妊娠された場合は、その旨を臨床研究担当医師にお申し出ください。なお、この臨床研究に参加中あるいは終了後に、他の診療科や他の病院・医院などを受診する際、可能なかぎり本臨床研究担当医師にご相談ないしはご連絡下さい。

18. 知的財産権と利益の相反について

この臨床研究によって、経済的利益を生じる新たな知見や、特許に結びつくような発見があるかもしれませんが、それらによって生じた知的財産権や経済的な利益は研究機関などに帰属します。この臨床研究に参加していただいた患者さんが、この権利を主張することはできません。また、本臨床研究では、本研究の総括責任者、臨床研究に関わる医師に関して、臨床結果およびその結果の解釈に影響を及ぼすような利益相反（起こりうる利害の衝突）が存在していません。

19. 臨床研究担当医師について

総括責任者 : 巽 浩一郎

臨床研究担当医師 : 多田 裕司

連絡先 : 千葉大学医学部附属病院 呼吸器内科

〒260-8677 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-1

(TEL) 043-222-7171 (内線 5471)

(FAX) 043-226-2176

20. 患者さんからの質問ならびに担当医からの説明

この臨床研究について十分に理解していただきましたでしょうか？もし、この臨床研究に参加してもよいとお考えでしたら、次のページにある「臨床研究への参加に関する同意書」という用紙にご署名いただきたいと思います。また、わからないこと、心配なことがありましたら、どうぞ遠慮なく総括責任者あるいは臨床研究担当医師にご質問ください。

医療機関名	:	千葉大学医学部附属病院
診療科名	:	呼吸器内科
電話番号	:	043-222-7171（内線 5471）
総括責任者	:	巽 浩一郎
臨床研究担当医師	:	多田 裕司

—ご質問事項ならびにご説明—

(同意者保存用)

臨床研究への参加に関する同意書

私は、切除不能悪性胸膜中皮腫を対象とした NK4 遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究の目的、方法及び期間、予想される利点及び不都合について説明を受け、この臨床研究に参加することに同意します。また、この臨床研究に必要な検査・処置・麻酔を受けること、採取された検体の保存についても同意します。

私はこれら情報の説明書を読み、その内容について質問することができました。私は本臨床研究への参加を拒否すること、いつでも同意を取り消すことができ、また、それにより不利益を受けることがないことを知っています。同意を取り消す場合、私は_____医師にその旨通知し、他の治療法について助言してもらいます。

私は、他の臨床研究に参加しないことに同意します。また私は、遺伝子治療の内容を確認するため、もしくは適切に実施されていることを確認するために、学内の臨床研究審査委員会の人や厚生労働省や文部科学省の人のほか、千葉大学が確認依頼した医療に携わる資格(医師や薬剤師など)をもつ学外の人が私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合私のプライバシーは保護されるものと理解します。さらに、このアデノウイルスベクター (Ad5CMV-NK4) を一般の治療薬として私と同じ病気で悩む患者さんに使用する目的で開発を希望する企業 (製薬会社) がある場合には、その企業の人私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合も私のプライバシーは保護されるものと理解します。いずれの時点であれ、本臨床研究に基づいて作成されたいかなる発表文献または報告書においても、私個人が識別できるような記載がなされることはないと理解しました。

また本臨床研究中に疑問が生じた場合、私は_____医師に質問することができます。私は本同意書のコピーを受領し、これを保管します。

患者署名 : _____ 平成 年 月 日

家族署名 (患者との関係 :) : _____ 平成 年 月 日

立会人 (職名 :) : _____ 平成 年 月 日

臨床研究担当医師署名 : _____ 平成 年 月 日

(カルテ保存用)

臨床研究への参加に関する同意書

私は、切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究の目的、方法及び期間、予想される利点及び不都合について説明を受け、この臨床研究に参加することに同意します。また、この臨床研究に必要な検査・処置・麻酔を受けること、採取された検体の保存についても同意します。

私はこれら情報の説明書をもらい、その内容について質問することができました。私は本臨床研究への参加を拒否すること、いつでも同意を取り消すことができ、また、それにより不利益を受けることがないことを知っています。同意を取り消す場合、私は_____医師にその旨通知し、他の治療法について助言してもらいます。

私は、他の臨床研究に参加しないことに同意します。また私は、遺伝子治療の内容を確認するため、もしくは適切に実施されていることを確認するために、学内の臨床研究審査委員会の人や厚生労働省や文部科学省の人のほか、千葉大学が確認依頼した医療に携わる資格(医師や薬剤師など)をもつ学外の人が私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合私のプライバシーは保護されるものと理解します。さらに、このアデノウイルスベクター(Ad5CMV-NK4)を一般の治療薬として私と同じ病気で悩む患者さんに使用する目的で開発を希望する企業(製薬会社)がある場合には、その企業の人でも私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合も私のプライバシーは保護されるものと理解します。いずれの時点であれ、本臨床研究に基づいて作成されたいかなる発表文献または報告書においても、私個人が識別できるような記載がなされることはないかと理解しました。

また本臨床研究中に疑問が生じた場合、私は_____医師に質問することができます。私は本同意書のコピーを受領し、これを保管します。

患者署名 :	_____	平成 年 月 日
家族署名(患者との関係:) :	_____	平成 年 月 日
立会人(職名) :	_____	平成 年 月 日
臨床研究担当医師署名 :	_____	平成 年 月 日

(医師保存用)

臨床研究への参加に関する同意書

私は、切除不能悪性胸膜中皮腫を対象としたNK4遺伝子発現型アデノウイルスベクターによる臨床研究の目的、方法及び期間、予想される利点及び不都合について説明を受け、この臨床研究に参加することに同意します。また、この臨床研究に必要な検査・処置・麻酔を受けること、採取された検体の保存についても同意します。

私はこれら情報の説明書を受け、その内容について質問することができました。私は本臨床研究への参加を拒否すること、いつでも同意を取り消すことができ、また、それにより不利益を受けることがないことを知っています。同意を取り消す場合、私は_____医師にその旨通知し、他の治療法について助言してもらいます。

私は、他の臨床研究に参加しないことに同意します。また私は、遺伝子治療の内容を確認するため、もしくは適切に実施されていることを確認するために、学内の臨床研究審査委員会の人や厚生労働省や文部科学省の人のほか、千葉大学が確認依頼した医療に携わる資格(医師や薬剤師など)をもつ学外の人が私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合私のプライバシーは保護されるものと理解します。さらに、このアデノウイルスベクター(Ad5CMV-NK4)を一般の治療薬として私と同じ病気で悩む患者さんに使用する目的で開発を希望する企業(製薬会社)がある場合には、その企業の人でも私の医療記録を閲覧する可能性があることに同意しますが、その場合も私のプライバシーは保護されるものと理解します。いずれの時点であれ、本臨床研究に基づいて作成されたいかなる発表文献または報告書においても、私個人が識別できるような記載がなされることはないことを理解しました。

また本臨床研究中に疑問が生じた場合、私は_____医師に質問することができます。私は本同意書のコピーを受領し、これを保管します。

患者署名： _____ 平成 年 月 日

家族署名(患者との関係：)： _____ 平成 年 月 日

立会人(職名)： _____ 平成 年 月 日

臨床研究担当医師署名： _____ 平成 年 月 日

参考資料

国立大学法人千葉大学個人情報開示請求等取扱規程

制 定 平成17年 4月 1日
 改 正 平成17年10月 1日
 平成17年10月26日

(趣旨)

第1条 国立大学法人千葉大学(以下「本学」という。)における保有個人情報の開示請求、訂正請求及び利用停止請求(以下「開示請求等」という。)の取扱いについては、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律(平成15年法律第59号。以下「法」という。)、独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律施行令(平成15年政令第549号。以下「施行令」という。)その他の法令等に定めるもののほか、この規程の定めるところによる。

(定義)

第2条 この規程において「個人情報」、「保有個人情報」、「個人情報ファイル」及び「本人」とは、法第2条に規定する個人情報、保有個人情報、個人情報ファイル及び本人をいう。

2 この規程において「部局等」とは、各学部、各大学院研究科、各大学院研究院、大学院医学薬学府、附属図書館、医学部附属病院、各全国共同利用施設、各学内共同教育研究施設、事務局、知的財産本部、総合安全衛生管理機構、キャンパス整備企画室、防災危機対策室及び情報・広報室をいう。

(個人情報ファイル簿)

第3条 法第11条の規定により作成し、公表しなければならない帳簿は、別表のとおりとする。

(請求書等の様式)

第4条 法及び施行令に基づく保有個人情報の開示請求等に係る請求書等の様式は、別紙第1号から第3号までのとおりとする。

(開示請求等の受付)

第5条 本学の保有個人情報に係る開示請求等は、企画総務部総務課において受け付けるものとする。

2 開示請求等の請求書を受理したときは、開示請求等をした者及び開示請求等のあった個人情報を保有する部局等の長に対し、当該請求書の写しを送付するものとする。

(手数料)

第6条 法第26条第1項の規定により納付しなければならない手数料の額は、開示請求に係る保有個人情報が記録されている法人文書1件につき300円とする。

2 前項の手数料は開示請求書を提出するときに、前項の手数料は開示を実施するときに、次の各号のいずれかの方法により納めなければならない。

- 一 銀行振込
- 二 郵便小為替
- 三 現金

3 保有個人情報の開示を受ける者は、手数料のほか郵送料を納付して、法人文書の写しの送付を求める

ことができる。この場合においては、当該郵送料は、郵便切手で納付しなければならない。

(開示等の審査)

第7条 開示請求等に係る保有個人情報の開示又は不開示、訂正又は不訂正及び利用停止又は不停止の審査は、国立大学法人千葉大学情報公開・個人情報保護委員会（以下「委員会」という。）が、当該個人情報を保有する部局等の長の意見を聴いて行う。

(開示の実施方法)

第8条 保有個人情報の開示の実施方法については、国立大学法人千葉大学情報公開実施規程第5条の規定を準用する。この場合において、同条第3項中「法第15条第2項」とあるのは「独立行政法人等の保有する個人情報の保護に関する法律第24条第2項」と読み替えるものとする。

(開示請求及び開示の特例)

第9条 第4条及び第5条第1項の規定にかかわらず、本学が行う入学試験のうち一般選抜に係る個人情報は、本学が別に定めるところにより、開示請求を行うことができる。

2 前項の規定により開示請求があったときは、第7条の規定にかかわらず、当該開示請求に係る個人情報の開示又は不開示の決定をしないで、直ちに開示するものとする。

3 前項の開示は、前条の規定にかかわらず、本学が別に定める方法により行うものとし、この場合において、第6条第1項の手数料は徴収しないものとする。

(異議申立て)

第10条 開示等の決定、訂正等の決定、利用停止等の決定又は開示請求等に係る不作為について、行政不服審査法（昭和37年法律第160号）による異議申立てがあったときの審査は、委員会が行う。

(個人情報相談窓口)

第11条 企画総務部総務課に個人情報相談窓口を置く。

2 個人情報相談窓口では、開示請求等をしようとする者に対し、個人情報ファイル管理簿その他関連資料等を用いて、保有個人情報の特定に資する情報の提供その他開示請求等をしようとする者の利便を考慮した適切な措置を講ずるとともに、本学における個人情報の取扱いに関する苦情の処理を行うものとする。

(補則)

第12条 この規程に定めるもののほか、保有個人情報の開示請求等の取扱いに関し必要な事項は、委員会が別に定める。

附 則

この規程は、平成17年4月1日から施行する。

附 則

この規程は、平成17年10月1日から施行する。

附 則

この規程は、平成17年10月26日から施行する。