


**2. 遺伝子治療臨床研究
実施計画書概要書
(変更後)**

遺 伝 子 治 療 臨 床 研 究 実 施 計 画 書 概 要 書


平成 10 年 7 月 14 日	(申請年月日)
平成 15 年 12 月 25 日	(変更年月日)

研 究 の 名 称	乳癌に対する癌化学療法の有効性と安全性を高めるための耐性遺伝子治療の臨床研究
研 究 実 施 期 間	平成 12 年 2 月 24 日から平成 18 年 12 月 31 日

総 括 責 任 者	所属部局の所在地	〒170-8455 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号	
	所属機関・部局・職	財団法人癌研究会附属病院・化学療法科・医長 兼財団法人癌研究会癌化学療法センター・臨床部・医長	
	氏 名	高橋 俊二	

実 施 の 場 所	所 在 地	〒170-8455 東京都豊島区上池袋1丁目37番1号 および 東京都豊島区上池袋1丁目30番20号	
	名 称	財団法人癌研究会附属病院化学療法科および 財団法人癌研究会癌化学療法センター分子生物治療研究部、臨床部、 基礎研究部	
	連 絡 先	東京都豊島区上池袋1丁目37番1号	(電話番号：03-3918-0111)

総 括 責 任 者 以 外 の 研 究 者	氏 名	所 属 機 関 ・ 部 局 ・ 職	役 割
		杉本 芳一	財団法人癌研究会癌化学療法センター・分子生物治療研究部・部長
	畠 清彦	財団法人癌研究会附属病院化学療法科・部長 兼財団法人癌研究会癌化学療法センター・臨床部・部長	乳癌患者の自家骨髄細胞および自己末梢血幹細胞採取の安全性とその評価
	伊藤 良則	財団法人癌研究会附属病院化学療法科・副部長 兼財団法人癌研究会癌化学療法センター・臨床部・副部長	腫瘍内科的診療。乳癌患者の骨髄中における残存癌細胞の検出及び評価
	鶴尾 隆	財団法人癌研究会癌化学療法センター・基礎研究部・部長	遺伝子治療臨床研究における基礎研究部門の総括的指導
	相羽 恵介	東京慈恵会医科大学・臨床腫瘍部・講師	研究の総括

審査委員会が研究計画の実施を適当と認める理由	本臨床研究は癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会においてその倫理性、科学性、治療方針などが妥当であると判断され、平成 10 年 2 月 24 日に承認されたものである。本変更事項については、平成 15 年 9 月 18 日の財団法人癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会およびその後の追加審議において、その倫理性、科学性について審査し、妥当と認めた。		
	審査委員会の長の職名	氏 名	
	財団法人癌研究会附属病院副院長	福井 巖	

研究の区分	遺伝子治療臨床研究
<p>研究の目的</p>	<p>本研究の目的は、癌化学療法の有効性と安全性をより高めるための耐性遺伝子治療法の研究開発を行うことである。この研究では、進行乳癌患者より採取した造血幹細胞にヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を HaMDR レトロウィルスを用いて導入し、この MDR1 遺伝子導入造血幹細胞を患者に戻すことにより患者の骨髄細胞を抗癌剤耐性とすることを目指す。一般に大量化学療法施行後の再生骨髄は脆弱なことが多く、その後に抗癌剤による地固め療法等を施行することは困難なことが多い。しかしこの耐性遺伝子治療がなされれば抗癌剤による骨髄抑制の軽減が期待され、治療効果の向上と副作用軽減に伴う QOL の向上が期待される。よってこの遺伝子治療は、治癒指向戦略として極めて重要である。</p> <p>本研究の要点は以下の (1) ~ (3) である。</p> <p>(1) 大量化学療法を受けた乳癌症例への自己末梢血幹細胞移植時に CD34 抗原陽性細胞へ導入されたヒト多剤耐性遺伝子 (MDR1) の患者の骨髄細胞、末梢白血球における発現を評価する。</p> <p>(2) 上記 MDR1 遺伝子導入に伴う安全性を評価する。</p> <p>(3) 自己末梢血幹細胞移植併用大量化学療法施行後の乳癌症例に対する化学療法の有効性と安全性を評価する。</p>
<p>対象疾患及びその選定理由</p>	<p>乳癌は女性で最も多い癌のひとつであり、1997年の乳癌死亡数は約8,400人で女性の癌死の7.7%を占め、1985年以来子宮癌死亡数を抜き女性器癌死の第1位となっている。ひとたび乳癌が進行あるいは再発した場合、治療は極めて困難である。この場合、内科的薬物療法が主体となるが治療のゴールは癌随伴性症状の緩和である。すなわち癌化学療法による効果は奏効率40~70%、生存期間の中央値はわずか1~3年であり完全治癒は稀である。近年、治癒を目指した治療法として自己造血幹細胞移植併用大量化学療法が試みられている。しかし大量化学療法に依っても生存期間の延長は困難な場合が多いため、有効な後療法が望まれる。しかし大量化学療法施行後の再生骨髄は脆弱なことが多いため、直ちに継続して癌化学療法による後療法を施行するのは困難なことが多い。本遺伝子治療臨床研究では、造血幹細胞にヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入し患者の骨髄細胞を抗癌剤耐性とすることを目指している。大量化学療法施行後にこのヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 を導入した造血幹細胞を移植する。回復骨髄には、この遺伝子が発現している造血細胞の存在が期待されるため、引き続いて化学療法を施行してもその骨髄抑制は軽減すると期待される。よって後療法(化学療法)の易遂行性の改善が期待され、骨髄抑制の軽減とそれに基づく QOL の向上及び治療効果の向上が期待される。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>本遺伝子治療臨床研究で導入を計画している遺伝子はヒト多剤耐性遺伝子 MDR1 の野生型・完全長 cDNA である。この MDR1 cDNA は、Harvey murine sarcoma virus (HaMSV)由来のレトロウィルスベクター HaMDR により患者の細胞に導入される。ヒト MDR1 cDNA は標的細胞内に導入された後 mRNA に転写され、ヒト多剤耐性遺伝子産物 P-糖蛋白が翻訳される。P-糖蛋白の発現した細胞は、adriamycin, vincristine, vinblastine, paclitaxel, docetaxel など種々の抗癌剤に耐性を示すことが明らかとなっている。遺伝子導入方法は、まず患者の末梢血単核細胞より CD34 抗原陽性細胞を分離し、サイトカイン存在下培養する。この細胞に HaMDR レトロウィルス産生細胞の培養上清を加えて2日間培養し、遺伝子導入を行う。遺伝子導入した CD34 抗原陽性細胞は洗浄後、液体窒素タンクに凍結保存する。患者に大量化学療法を施行した後、凍結されていた遺伝子導入 CD34 抗原陽性細胞を患者に戻す。</p>

(1) HaMDR レトロウィルスベクターの安全性

HaMDR レトロウィルスはその遺伝子上に HaMSV 由来の 5'-LTR、3'-LTR およびパッケージングシグナルψを有しているが、レトロウィルス粒子の構成蛋白質をコードする遺伝子 gag、pol、env は有していない。HaMDR レトロウィルス作成するためにレトロウィルスパッケージング細胞 PA317 を用いる。PA317 は、チミジンキナーゼを欠損したマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に gag、pol、env を発現する PAM3 遺伝子をトランスフェクトして作られた。gag、pol、env 遺伝子をコードする mRNA がレトロウィルスに組み込まれることはない。HaMDR レトロウィルス産生細胞上清には gag、pol、env 遺伝子をコードするレトロウィルス DNA、RNA は存在しないので、HaMDR レトロウィルスが標的細胞に導入された後は、gag、pol、env 蛋白質の発現は起こらず標的細胞において HaMDR レトロウィルスが再び生産されることはない。本臨床研究に用いられる HaMDR レトロウィルスは PA317 細胞に pHaMDR プラスミドを導入して作成された 3P26 細胞より産生される。3P26 細胞の master cell bank (MCB) は米国 BioReliance 社において米国食品医薬局 (FDA) の基準に従って作成され、種々の安全性試験に合格した後、凍結保存されている。HaMDR レトロウィルス培養上清は、米国 BioReliance 社において作成され、増殖性レトロウィルス否定試験、無菌試験、エンドトキシン試験などを行った後、凍結されて当施設へ空輸される。

(2) HaMDR レトロウィルスベクターの細胞傷害性

一般にレトロウィルス遺伝子は標的細胞の染色体にランダムに組み込まれる。したがってレトロウィルスがその細胞の生存に必須な部位に組み込まれた場合には、その細胞が死に至ることもある。しかしながらその可能性はわずかであり、レトロウィルスを導入された細胞のほとんどは正常に機能すると考えられている。

(3) 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

前述のようにレトロウィルス遺伝子は標的細胞の染色体にランダムに組み込まれる。この結果細胞機能に重要な遺伝子を破壊する可能性もあるが、たいていの場合そうした細胞は死滅すると考えられる。レトロウィルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって将来腫瘍が発症する可能性もある。2002 年にフランスで白血病の発症が確認された。この点については対象患者によく説明した上でインフォームドコンセントを取る。

(4) 癌原性の有無

上記のようにレトロウィルスの組み込みが癌遺伝子、癌抑制遺伝子の近傍に起こることによって、将来腫瘍が発症する可能性がある。この点については対象患者によく説明した上でインフォームドコンセントを取る。

(5) 遺伝子産物 (P-糖タンパク) の安全性

本研究において導入される遺伝子の産物は、本来正常のヒトの細胞に発現している P-糖蛋白と同じものである。遺伝子導入の直接の標的細胞である CD34 抗原陽性細胞はもともと少量の P-糖蛋白を発現しているため、その発現量の増大が問題となるとは考えられない。

MDR1 遺伝子が骨髓細胞に過剰発現したときに起こりうる副次的反応については MDR トランスジェニックマウスを用いて検討が加えられた。MDR1 遺伝子をニワトリの β-アクチンプロモーターにつないでマウス細胞に導入して作成された MDR1 トランスジェニックマウスの一系においては、骨髓及び末梢白血球に特異的な P-糖蛋白の過剰発現が観察された。このマウスの白血球は daunorubicin などの抗癌剤に対して耐性を示したが、マウスの生育、免疫能、生殖などには何の異常も見られなかった。

	<p>MDR1レトロウイルスを導入したマウス骨髄細胞を同系マウスに移植した実験においては、一部のマウスに遺伝子導入細胞の生体内での異常増殖がおこったことが報告されている。</p> <p>東大医科研では3匹のマーモセットにMDR1遺伝子導入細胞の移植を行い、そのうちの1匹では412日間にわたって末梢血にMDR1遺伝子導入細胞が検出されたが、この研究では、MDR1遺伝子導入細胞の異常増殖など、MDR1遺伝子導入に起因すると考えられる副作用は起きなかった。</p> <p>(6) MDR1遺伝子導入血液細胞の安全性</p> <p>MDR1レトロウイルスを導入されたCD34抗原陽性細胞は一度凍結され、患者に戻す前にその一部の細胞を用いてRCRの否定試験を行って安全性を確認する。また細菌、マイコプラズマ、真菌、エンドトキシンなどの検査を行って安全性を確認する。</p> <p>(7) 海外の臨床研究成績</p> <p>米国では1995年より同様の臨床研究が進行している。</p> <p>これまでにM.D. Anderson癌センターで20例、コロンビア大で5例、NCIで10例に対してMDR1遺伝子導入血液細胞の移植が行われた。この内、コロンビア大の2例とNCIでは10例中10例全例に患者末梢血中にMDR1遺伝子導入細胞が確認された。NCIの1例では、MDR1遺伝子導入の顆粒球の割合が、末梢血中の有核細胞の9%にも及んだ。これらの症例でMDR1遺伝子導入細胞の異常増殖など、MDR1遺伝子導入に起因すると考えられる副作用は報告されていない。またいずれの患者末梢血中からもRCRは検出されなかった。このように臨床的にも安全性が確認されている。</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>化学療法科では、1987年4月より自己造血幹細胞移植併用大量化学療法が開始され、先進的な治療法としてその治療管理ユニットは確立されている。本臨床研究に用いられるHaMDRレトロウイルスはPA317細胞にpHaMDRプラスミドを導入して作成された3P26細胞より産生される。3P26細胞のmaster cell bankは米国BioReliance社において米国FDAの基準に従って作成され、その安全性も確認されBioReliance社に保存されている。また我々はMDR1遺伝子治療の基礎的研究を精力的に進めており、ヒトのCD34抗原陽性細胞へのMDR1遺伝子導入のための設備および技術は整備されている。既に米国では1995年より3施設にて同様の遺伝子治療が開始されている。</p> <p>これまでにM.D. Anderson癌センターで20症例、NCIで10症例、コロンビア大で5症例に対し、MDR1遺伝子導入細胞の移植が行われた。このうち、NCIの10症例全て、およびコロンビア大の2症例で、患者末梢血にMDR1遺伝子導入細胞が確認された。これらの症例でMDR1遺伝子導入細胞の異常増殖など、MDR1遺伝子導入に起因すると考えられる副作用は起きなかった。とりわけ、NCIの1症例では末梢の有核細胞中のMDR1遺伝子導入顆粒球の割合が1%より高い状態が3ヶ月以上継続し、最大9%であった。この患者では治療終了まで末梢血にMDR1遺伝子陽性細胞が検出された。しかし、この患者を含め全ての患者(35名)で白血球の異常増殖が起きなかったということで、MDR1遺伝子導入細胞がヒトで異常増殖をおこす可能性は少ないと考える。</p> <p>本遺伝子治療臨床研究では、予後の悪い進行・再発乳癌症例を対象とし、18,000字に及ぶ説明文書と口頭での充分なる説明の後にインフォームド・コンセントの署名を取得する。本研究を施行する上で倫理的妥当性を欠くことはないものと考えられる。</p>

<p>実施計画</p>	<p>本遺伝子治療臨床研究では、寛解導入化学療法により完全寛解あるいは部分寛解が得られた再発あるいは進行乳癌症例を対象とする。インフォームド・コンセント取得の後、MDR1 遺伝子治療を開始する。まず患者に大量 cyclophosphamide 単独投与と G-CSF 刺激の後、患者の末梢血単核細胞の採取を3日間連日を2ないし3コース施行し、このうち約1/3量相当分よりCD34抗原陽性細胞を分離する。これをサイトカイン存在下2日間培養し、HaMDRレトロウィルス産生細胞の培養上清を加えて2日間培養することによりMDR1 遺伝子導入を行う。遺伝子導入したCD34抗原陽性細胞は使用時まで液体窒素タンク内に凍結保存する。遺伝子導入を行わない残りの約2/3量相当分の末梢血単核細胞はそのまま無処理にて凍結保存する。バックアップ用として骨髓血も採取し、凍結保存する。遺伝子導入した細胞の一部を用いて遺伝子導入と発現の検討、RCRの検索をはじめとする安全性の検査をする。自己造血幹細胞移植の用意が整ったところで大量化学療法のコンディショニングを開始し、つづいて大量化学療法を施行する。その後凍結保存しておいたMDR1 遺伝子導入CD34抗原陽性細胞を未処理の末梢血単核細胞とともに移植する。その後骨髓が再構築され末梢血所見が正常化し、患者の一般状態が完全に回復した後、docetaxelの投与を開始する。docetaxelの投与量は通常量の50%から開始し、順次増量して100%量まで増加させる。この抗癌剤投与後の末梢血所見、骨髓所見を中心に安全性と有効性を経時的に検討する。この間にdocetaxel 6コース完了かつ100%量投与到達症例として3例を、第1段階では検討する。3症例目の患者にMDR1 遺伝子導入細胞の移植を行ってから6カ月間を第1段階における急性毒性の観察期間とする。この時点までにMDR1 遺伝子導入細胞の移植に起因する急性毒性あるいは有害な副作用がおきないことを確認する。なお、過去の化学療法において心循環器系に著しい副作用が認められたときには、docetaxelに代えてpaclitaxelを用いる。投与計画はdocetaxelのものに準ずる。またdocetaxel, paclitaxelの投与あるいは治療継続が不可能と判断される病態、著しい副作用を認めた場合には、これらtaxane類抗癌剤による治療は中止する。この場合、anthracycline系抗癌剤(adriamycin, epirubicin)が有効と考えられる場合には、これらの抗癌剤による治療を考慮する。</p> <p>上記第1段階での安全性の確認の後、本研究は第2段階へと移行する。本研究の第2段階では、taxane類抗癌剤治療6コース完了かつtaxane類抗癌剤投与量100%到達症例として10例を目標症例として臨床研究を行い、遺伝子治療の安全性と有効性を検証する。</p>
<p>備考</p>	<p>(1) 被験者の同意取得について 被験者は本遺伝子治療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および危険性を十分に理解し、自主的に同意したうえで、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いつでも同意を撤回し、本遺伝子治療臨床研究への参加を中止することができる。</p> <p>(2) 本遺伝子治療臨床研究については、平成9年9月5日から平成10年2月24日まで(財)癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会で審議を行い、またこの委員会の下部委員会である倫理小委員会、基礎小委員会、臨床小委員会を適時開催し、その科学的小および倫理的妥当性について了承されている。</p> <p>癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会の開催日程</p> <p>第1回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会 日時：平成9年9月5日(金)</p>

第2回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成9年10月13日（月）

第3回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成9年11月11日（火）

第4回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成9年12月8日（月）

第5回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成10年1月19日（月）

第6回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成10年2月24日（火）

遺伝子治療臨床研究（がん）審査合同作業部会「財団法人癌研究会附属病院の遺伝子治療臨床研究実施計画書に対する意見」への回答書検討会

日時：平成10年12月21日（月）

遺伝子治療臨床研究（がん）審査合同作業部会「財団法人癌研究会附属病院の遺伝子治療臨床研究実施計画書に対する意見」への再回答書稟議

日時：平成11年9月8日（水）

遺伝子治療臨床研究（がん）審査合同作業部会「財団法人癌研究会附属病院の遺伝子治療臨床研究実施計画書に対する意見」への再々回答書稟議

日時：平成11年11月16日（火）

平成10年2月24日厚生大臣、文部大臣より遺伝子治療臨床研究を実施して差し支えない旨の意見書を受領。

第7回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成14年11月27日（水）

第8回癌研究会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会

日時：平成15年9月18日（木）