

遺伝子治療臨床研究実施計画の終了報告について

○ 信州大学医学部附属病院からの終了報告書P1

課題名：正電荷多重膜リポソーム包埋ヒト β 型インターフェロン
遺伝子を用いる進行性悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究

○ 神戸大学医学部附属病院からの終了報告書P17

課題名：前立腺癌転移巣及び局所再発巣に対する臓器特異性オステオ
カルシンプロモーターを組み込んだアデノウイルスベクター
(Ad-OC-TK) 及びバラシクロビルを用いた遺伝子治療臨床
研究

遺伝子治療臨床研究終了報告書

平成18年8月29日

厚生労働大臣 殿

実 施 施 設	所在地	長野県松本市旭3-1-1 (郵便番号 390-8621)
	名称	信州大学医学部附属病院 (電話番号 0263-35-4600) (FAX番号 0263-37-3024)
	代表者 役職名・氏名	信州大学医学部附属病院長 勝山 努

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の終了報告書を提出します。

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
正電荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行性悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究	信州大学医学部皮膚科学講座 教授 齋田 俊明

遺伝子治療臨床研究終了報告書

平成14年8月30日

研究の名称	正重荷多重膜リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる進行期悪性黒色腫の遺伝子治療臨床研究
研究の実施期間	平成15年7月1日から平成18年6月30日まで

総括責任者	所属部局の所在地	長野県松本市旭3-1-1 (郵便番号 390-8621)	
	所属機関・部局・職	信州大学医学部・皮膚科学講座・教授	
	氏名	齋田俊明	
実施の場所	所在地	長野県松本市旭3-1-1 (郵便番号 390-8621)	
	名称	信州大学医学部附属病院	
	連絡先	長野県松本市旭3-1-1 信州大学医学部皮膚科学講座 (電話番号 0263-37-2643)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	高田実	信州大学医学部・皮膚科学講座・助教授	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	松本和彦	信州大学医学部附属病院治験管理センター・助教授 名古屋大学大学院医学系研究科細胞情報医学専攻脳神経病態制御学脳神経外科学分野・非常勤講師 (平成17年3月31日まで)	遺伝子製剤の調製・薬剤投与・臨床観察・効果判定
	宇原久	信州大学医学部・皮膚科学講座・講師	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	久保仁美	信州大学医学部・皮膚科学講座・助手	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	村田浩	信州大学医学部・皮膚科学講座・助手	薬剤投与・臨床観察・効果判定
	吉田純	名古屋大学大学院医学系研究科・脳神経外科学分野・教授	本臨床研究に関する基礎的・臨床的指導・助言
	水野正明	名古屋大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学分野・助教授	遺伝子製剤の調製とその品質管理と安全性の確認
	影下登志郎	熊本大学医学部・皮膚科学講座・助教授	アポトーシス等の免疫組織化学的検索

審査委員会の開催状況	平成 16 年 1 月 19 日、平成 16 年 3 月 8 日、平成 16 年 3 月 26 日、平成 16 年 4 月 12 日、平成 16 年 5 月 24 日、平成 16 年 7 月 12 日、平成 17 年 6 月 27 日、平成 17 年 8 月 15 日、平成 18 年 8 月 23 日に開催し、本遺伝子治療臨床研究に係る対象患者の適否についての審査、および本臨床研究の進行状況、各症例に対する本遺伝子治療の有効性、安全性についての検討を行った。	
	審査委員会の長の職名	氏 名
	信州大学医学部 社会予防医学講座・教授	福 嶋 義 光

研究の区分	○遺伝子治療臨床研究 遺伝子標識臨床研究
研究の目的	<p>転移を生じた進行期の悪性黒色腫は化学療法、放射線療法などに抵抗性で、予後はきわめて不良である。本研究の目的は、この難治な進行期悪性黒色腫に対する新しい治療法として、正電荷リポソームに包埋したヒトβ型インターフェロン遺伝子を用いる遺伝子治療の安全性と効果を検討することであり、第Ⅰ／Ⅱ相試験として実施する。悪性黒色腫の皮膚などへの転移巣を対象とし、病巣内へ遺伝子製剤を注入し、局所的、全身的効果と有害反応の有無・程度を検討する。遺伝子製剤は2000年4月に名古屋大学医学部附属病院脳神経外科で共同研究者の吉田らが悪性グリオーマに対して開始した臨床研究で用いているものと同じ製剤を用いる。名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室では、安定性と保存性に優れ、液剤と同等の品質、効果を確認済みの凍結剤と凍結乾燥製剤の作製に成功している。本臨床研究では信州大学の共同研究者が名古屋大学の研究者と共同して、名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室において凍結乾燥製剤を調製し、それを信州大学へ輸送して、最終調製と活性の確認、検定を行った後に院内製剤として使用する。本研究は、このような共同研究のモデルケースとしても大きな意味を有する。</p>
対象疾患	悪性黒色腫
実施方法	<p>1. 本臨床研究の対象者の選択基準及び除外項目</p> <p>① 組織学的に悪性黒色腫の診断が確定されている第Ⅳ期の患者、または他の治療法が不可能と判定された他の病期の患者で、皮膚、皮下あるいはリンパ節に転移がある症例から選択する。ただし、脳転移のある患者、及び生命予後が6カ月以内と予想される患者は除外する。</p> <p>② 治療前に肉眼的にあるいは超音波、CT、MRIなどの画像検査にて腫瘍径などの評価が可能な病変を有する症例から選択する。</p> <p>③ 手術療法あるいはこれまで有効性が確認されている化学療法などの療法を施行したにもかかわらず無効な症例、あるいはこれらの治療法の適応がないと判定された症例から選択する。ただし、前治療が行われた患者については、治療終了から4週間以上経過し、その影響が認められない症例から選択する。</p> <p>④ 対象病変は注射針にて刺入可能な病変で、腫瘍の直径が2cm程度までのものを選択する。</p> <p>⑤ 尿・血液検査などの結果、重篤な合併症が無く、原則として血液データが下記を満足する症例を選択する。</p> <p>白血球数 > 3000/mm³ 血小板数 > 100000/mm³ ヘモグロビン > 8.5 g/dl 出血・凝固時間：正常</p>

血清ビリルビン<2.5 mg/dl

sGOT・sGPT<50 U/l

血清クレアチニン<1.5 mg/dl

⑥ 18歳以上の男女を対象とする。ただし、妊娠している可能性のある場合や母乳育児中の者、75歳以上の患者、及び担当医が本臨床研究の対象として不適切であると判断した症例は除外する。

2. 実施期間及び目標症例数

本研究の実施期間は厚生労働省の了解が得られてからすべての患者の臨床研究が終了するまで約2年間を予定し、さらに約1年間の経過観察期間を設ける。本治療法の臨床研究は5症例を予定する。

3. 遺伝子治療臨床研究の実施方法

① 遺伝子導入方法

本臨床研究では名古屋大学医学部附属病院遺伝子治療製剤調製室にて作製、調製されたpDRSV-IFN β 包埋リポソームIAB-1の凍結乾燥製剤を用いる。

転移腫瘍巣部に注射針を刺入し、リン酸緩衝液1ml中に30 μ g DNAを含有する製剤を転移巣内とその周囲に注入する。1転移巣への1回当たりの注入DNA量は、直径1cm程度までの病巣には10 μ g、それ以上で直径2cm程度までの病巣には30 μ gとする。注入頻度と回数は隔日ごとに週3回、2週連続の合計6回を予定する。第1例目では1回投与量を30 μ gDNAまでとして安全性を確認する。転移巣が多発している場合には、第2例目以降はdose escalationし、2個以上の転移巣にそれぞれ30 μ gDNA量までの同製剤を注入する。ただし、1回当たりのDNA注入総量は150 μ gまでとする。各症例について投与終了から4週後に安全性と有効性を評価する。その結果、安全性が確認され、かつ注入転移巣の一つ以上でPR(有効)以上の反応が認められ、病理組織学的にも抗腫瘍効果が確認され、かつ患者が追加治療を希望した場合は、上述と同様の遺伝子治療をさらに2コース追加できるものとする。

② 臨床検査項目および観察項目

(1)臨床症状を十分に観察する。

(2)肉眼的に計測可能な皮膚、皮下、リンパ節病変については原則として週3回、腫瘍径を計測する。画像診断が必要な病変については適時に超音波、CTあるいはMRIなどにより腫瘍径を計測する。

(3)必要があれば病巣の細胞診あるいは摘出を行い、光顕的および電顕的観察を施行し、腫瘍細胞の変性やアポトーシス、炎症反応などにつき解析する。また、ヒト β 型インターフェロン遺伝子発現(蛋白量、mRNA)の有無と程度についても検討する。

(4)入院中は週1~3回、尿および末梢血を採取し、各種血液・生化学検査を施行する。血中5-S-cysteinyldopa

値も経時的に測定する。

(5)免疫学的検討事項

免疫学的検討項目を以下に示す。

(1) 摘出組織

- 1.HE、免疫染色 (CD3, 4, 8, macrophage, NK, apoptosis)
- 2.遺伝子発現 (RT-PCR, in situ hybridization: IFN- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6)
- 3.HSP (heat shock protein)

(2) 血液

- 1.PCR (plasmid DNA) , RT-PCR
- 2.CD4/8
- 3.抗プラスミド抗体
- 4.EIA (サイトカインアッセイ: IFN- β , TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6)

(3) 尿

- 1.PCR (plasmid DNA)
- 2.細胞診

この中でも特に、①ヒト β 型インターフェロン遺伝子の腫瘍内での発現の有無、②ヒト β 型インターフェロン遺伝子の導入により腫瘍細胞のアポトーシスが誘導されているか否か、③腫瘍局所へ細胞障害性 T リンパ球や NK 細胞が誘導されるか否かに注目して検討する。

4. 遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準および中止判定基準

(1)安全性の評価

理学的所見、血液・尿の検査所見、免疫学的検査、遺伝子発現などの検索により行う。

(2)治療効果の評価

有効性は治療終了から4週後の時点における腫瘍の縮小効果にて判定する。局注病巣の病巣別評価とともに非局注病巣への効果も含めた個体別評価についても検討する。追加投与が行われた症例については、各コース毎に同様の評価を行う。全コース終了後も原則として月1回の経過観察を行い、少なくとも1年間は安全性と効果の評価を継続する。

可能であれば評価可能病変を治療終了後に生検して検索する。

(3)中止判定基準

(1)重篤な副作用とは以下に示すような生命に直接危機を及ぼす可能性のあるものと定義し、これが発生し、かつ今後治療の継続が困難と判断された場合、中止する。

- 1.外科的治療が必要とされる出血
- 2.アナフィラキシーショック
- 3.その他、重篤な臓器障害

	<p>なお副作用が発生した場合、臨床研究担当者はそれを詳細にカルテに記載すると同時に本院に設置されている遺伝子治療臨床研究審査委員会に報告し、その重篤さの程度を検討してもらい、中止すべきか否かの判断を下してもらおう。</p> <p>(2)患者が拒否した場合、または主治医が無効例と認めた場合には臨床研究を中止する。</p> <p>5. 遺伝子治療臨床研究の責任の所在</p> <p>本遺伝子治療臨床研究において、万一事故が発生した場合、その最終的責任は総括責任者が負うものとする。</p>
<p>研究結果の概要 及 び 考 察</p>	<p>概要</p> <p>5 症例が登録され、総合的な効果判定結果は MR 1 例、NC 1 例、PD 3 例であった（別紙 1 参照）。実施コース数は、すべての患者で 1 コースのみであった。</p> <p>1) MR 症例の経過</p> <p>MR と判定された患者（症例 1）は 63 歳、男性。左臀部に原発したメラノーマで、原発巣切除と左鼠径、骨盤リンパ節郭清術施行後、種々の化学療法を施行したが、皮膚転移、臓器転移を生じてきた症例である。遺伝子治療開始前には縦隔リンパ節と両側肺野に多数の転移がみられ、また左大腿部前面に多数（37 個）の微小な皮膚転移巣が、左臀部の原発巣切除後の植皮部内に大豆大までの転移巣が 3-4 個認められた。DNA 量として 10μg の IAB-1 を左臀部の皮膚転移巣のひとつに週 3 回、2 週間、合計 6 回局所注入した。同部は 2 回目の注入後から結節周囲に発赤が生じてきて、徐々に鱗屑、痂皮も生じ、平坦化した。注入終了後 8 日目ころには鱗屑、痂皮もとれ、臨床的に癒痕となり、その後変化はなかった。左大腿前面の多数の微小な皮膚転移巣は臀部転移巣への遺伝子製剤注入 4 回目ころから約半数の結節周囲に発赤を認め、表面に軽い鱗屑を伴うようになり、徐々に平坦化した。しかし、他方では皮膚転移巣の新生もあって、左大腿部の皮膚転移巣の数は増加した。</p> <p>組織学的に IAB-1 注入転移巣は癒痕組織となっており、腫瘍細胞は全く認められず、完全消失と判定した。非注入皮膚転移巣の注入終了後 3 日目の発赤、鱗屑を認める結節の組織では、腫瘍細胞周囲に CD4 陽性細胞が主体の著明なリンパ球浸潤がみられ、腫瘍細胞には HLA-Class I 抗原のみでなく、Class II 抗原を発現するものもみられた（治療前の組織では腫瘍細胞は Class I 抗原（+）、Class II 抗原（-））。注入終了後 31 日目の平坦化した結節の組織では変性した腫瘍細胞がリンパ球（主として CD8 陽性細胞）やマクロファージに混在して認められ、退縮と判断した（腫瘍細胞の Class I 抗原、Class II 抗原はともに陽性）。皮膚転移巣については、このように退縮した病変がある一方で、前述のごとく新生する転移巣もみられた。内臓病変は増大傾向を示したが、新生は検出されなかった。以上より、本症例を MR と判定した。血清中、尿中の HuIFNβ、Plasmid DNA の濃度を検討したところ、Plasmid DNA、HuIFNβ が IAB-1 投与期間中、血清中に一過性に検出された。</p>

	<p>2) PD 症例の経過 (別紙 2 参照)</p> <p>PD の症例 (症例 2, 3, 4) では IAB-1 投与終了後に遺伝子製剤注入皮膚転移巣が一旦平坦化した症例 (症例 2, 4) もみられたが、最終的には症例 4 のひとつの注入皮膚転移巣以外のすべての注入部皮膚転移巣や非注入部皮膚転移巣が増大した。内臓転移巣も縮小傾向はみられなかった。以上より PD と判定された。</p> <p>3) NC 症例の経過 (別紙 2 参照)</p> <p>症例 5 は IAB-1 注入皮膚転移巣、非注入皮膚転移巣、内臓転移巣に治療前後に大きさの変化がなく、また新たな転移巣も認められず、NC と判定した。</p> <p>なお、5 症例のうち腫瘍細胞に Class I 抗原を発現していた症例は症例 1 と症例 3 の 2 症例のみであった。</p> <p>5 症例とも遺伝子製剤投与によると考えられる検査値の変動、有害事象は認められなかった。</p> <p>まとめと考察</p> <p>メラノーマ患者 5 症例が本臨床研究に登録された。治療効果は MR 1 例 (症例 1)、NC 1 例 (症例 5)、PD 3 例であった。Class I 抗原を発現していた症例は症例 1 と症例 3 のみであったが、そのうちの症例 1 では IAB-1 注入部位の皮膚転移巣の完全消退と IAB-1 注入部位 (左臀部) から遠く離れた左大腿の皮膚転移巣のうち約半数のものが平坦化し、組織学的に腫瘍細胞の変性、リンパ球の浸潤がみられた。内臓の転移巣には 5 症例とも明らかな効果はみられなかった。症例 1 のような現象が見られたことは、腫瘍細胞が Class I 抗原の発現を保持していれば、本遺伝子治療によって T 細胞の関与する全身的な免疫応答を誘導できる可能性があることを示唆するものと思われる。なお、本治療によると考えられる有害事象は全くみられなかった。(名古屋大学の遺伝子治療との成績の比較は別紙 3 参照)</p> <p>本遺伝子製剤の投与量を増加させたり、樹状細胞療法や他のサイトカイン療法と併用することにより、全身的な免疫応答を誘導し、より高い治療効果を引き起こすよう工夫することが望まれる (別紙 4 参照)。</p>
<p>研究成果の公表状況</p>	<p>本臨床研究の要旨は第 11 回日本遺伝子治療学会 (平成 17 年 7 月 28-30 日、東京) 及び第 43 回癌治療学会学術総会 (平成 17 年 10 月 25-28 日、名古屋) にて発表し、日本臨床 63 (増刊): 566-571, 2005 及び日本臨床 64(7):1321-1326, 2006 に誌上公表した。また、細胞 2006 年 10 月臨時増刊号にて誌上公表予定。</p>

別紙1 IFN-β 遺伝子治療を施行したメラノーマ5症例の概要 (2006年7月)

患者	原発部位	病期(転移部位)	治療期間	評価					転帰
				IAB-1 注入皮膚転移巣 (注入個数と注入量)	非注入皮膚転移巣	内臓転移巣	総合判定	副作用	
63歳、 男性	左臀部	IV (皮膚、 肺、縦隔 LNs)	1/19~1/30/04	完全消失 (1個に10μg 注入)	注入部位から離れた 転移巣の半数は平坦 化, 転移巣は増数	新たな転移臓器なし, それぞれの転移巣は増 大したが増数なし	MR*	(-)	12/15/04 永眠 (脳転 移)
73歳、 男性	右拇趾	IV (皮膚、 右腸骨 LNs)	4/5~4/16/04	一旦平坦化したが、その 後増大 (3個に10μg ず つ注入)	それぞれ増大, 増数	新たな転移臓器はない が, 増数, 増大	PD	(-)	10/17/04 永眠 (肺転 移)
33歳、 女性	頭部	IV (皮膚、肺、 腎、肝、眼窩、 LNs)	5/24~6/4/04	増大 (1個に30μg 注入)	それぞれ増大した が, 数は増えない	新たな転移臓器なし, それぞれの転移巣は増 大したが増数なし	PD	(-)	4/24 /05 永眠 (多臓 器不全)
71歳、 男性	右足蹠	III (皮膚)	6/27~7/8/05	3個のうち2個は一旦平 坦化したがその後増大。1 個は平坦化 (3個に10μ g ずつ注入)	それぞれ増大, 増数	転移臓器なし	PD	(-)	生存 (7/13/06)
61歳、 女性	右足蹠	IV (皮膚、右 腸骨~下大 動脈周囲、後 腹膜 LNs)	6/27~7/8/05	変化なし (1個に10μg 注入)	変化なし	新生, 増大なし	NC	(-)	生存 (7/13/06)

* MR (Mixed Response) : Some of their tumors showed regression by >25% of the pretreatment mass while others showed progression by >25% of the pretreatment mass or new metastases appeared. (日本臨床 64: 1321-1326, 2006 改変)

別紙2 PDの症例(症例2, 3, 4)とNCの症例(症例5)の経過

症例2

73歳、男性。右第1趾原発のメラノーマで、右第1趾切断術と右膝窩、右浅・深鼠径リンパ節郭清術(右膝窩、右浅・深鼠径リンパ節いずれも転移あり)を施行後、化学療法(DAV-Feron)を行った。その後、右下肢に皮膚、皮下転移が生じ、インターフェロンβ蛋白(Feron)の転移巣への局注、化学療法(DAC-tam)を行ったが、皮膚、皮下転移の増数と右腸骨動脈周囲リンパ節の転移を認めた。遺伝子治療開始前には右下肢に灰青色から黒色の2cm程度までの大きさの皮内から皮下の結節が多数(601個)存在していた。

右大腿部の3個の転移巣にそれぞれDNA量として10μgのIAB-1を週3回、2週間連続の合計6回局注した。注入転移巣は3回目注入後頃から周囲に発赤と表面に鱗屑を認め、注入中はこれらの症状が増強した。注入終了3日後より周囲の発赤は徐々に減じてきたが、病巣表面の鱗屑は投与終了12日後まで増加した。この時点において病巣は少し柔らかく触知し、大きさはやや平坦化した。その後、徐々に病巣とその周囲の鱗屑は減少し、結節は徐々に増大した。右下肢に多発する皮膚および皮下の遺伝子製剤非注入転移巣は製剤投与期間、投与終了後を通じて、周囲に紅暈を生じることや、表面に鱗屑を認めるなどの変化は認められなかった。効果判定のために非注入転移巣の5個を選択し大きさを計測したが、投与開始から投与終了後4週間の経過観察終了まで漸次増大した。皮膚転移巣の数も増加し、投与前に601個あった右下肢の転移巣は投与終了後31日目には727個になった。

組織学的に、IAB-1を注入した3個の病変(投与終了後31日目)では腫瘍細胞が真皮上層から皮下組織まで存在しており、腫瘍層の中央部では腫瘍細胞の変性、壊死がみられ、この部位ではメラニンや脂肪を貪食したマクロファージが認められた。腫瘍辺縁にはリンパ球、マクロファージの浸潤がみられた。このうち2個の組織ではこの変性病変に接して大型で類円形の腫瘍細胞のシート状の増殖が見出され、残存腫瘍細胞の再増殖と考えられた。非注入転移巣(投与終了後4日目)では、腫瘍細胞がシート状に真皮に存在し、リンパ球が腫瘍巣周囲の血管周囲にわずかにみられたのみで、治療前と同様の組織像であった。腫瘍細胞は治療前、治療後ともにHLA-Class I抗原は陰性、Class II抗原は陽性であった。

内臓病変は増大傾向を示し、右鼠径、右外腸骨動脈領域から右鼠径部の多発するリンパ節は治療前に比べ増大し、大動脈傍領域にも内部に壊死を伴うリンパ節が新たに出現した。以上より本症例をPDと判定した。血清中、尿中のHuIFNβ、Plasmid DNAの濃度を検討したところ、HuIFNβのみがIAB-1投与期間中、血清中に一過性に検出された。

症例3

33歳、女性。後頭部の皮膚に原発したメラノーマ。腫瘍の広汎切除、左後頭部リンパ節郭清(55個中1個に転移あり)後、化学療法(DAV療法、3クール)が施行された。その後、皮膚、肝、肺に複数の転移がみられ、化学療法を変更(DAC-Tam療法)したが、肝、

肺の転移巣に変化なく、皮膚転移巣は増数した。そのため1ヶ月に1回インターフェロンβ蛋白 (Feron) の点滴と、(本人の希望により) 他院で免疫細胞療法(詳細不明)を1ヶ月に1回行っていた。右眼窩内転移と脊柱管内転移が出現し、肝転移巣に動注化学療法、脊柱管転移巣に放射線療法を行った。本遺伝子治療開始前には両側性多発肺転移、多発肝転移、多発腎転移を認め、縦隔、左肺門、肝門部、副腎周囲、脾門部、大動脈周囲、腓背側、両側頸部、鎖骨窩、腋窩のリンパ節および皮下に多数の転移が認められた(皮下転移は胸腹部、背部に合計22個)。

左胸部の1個の皮下転移巣にDNA量として30μgのIAB-1を隔日週3回、2週間連続の合計6回局注した。2回目の遺伝子製剤注入後頃より発赤が出現し、転移巣周囲および上部が浮腫状にやわらかく触知した。6回注入終了後まではこのような状態であったが、その後、発赤、浮腫は減少し、注入終了後5日目には注入前のような硬い結節に戻り、次第に増大してきた。遺伝子製剤非投与部位の胸腹部、背部に多発する皮内、皮下の転移巣は製剤投与期間、投与終了後を通じて、周囲に紅暈を伴ったり、表面に鱗屑を付着することはなかった。効果判定のため、5個の非注入転移巣を計測したが、投与開始から経過観察終了時(投与終了後4週)まで漸次増大傾向を示した。皮膚転移巣の新生はなかった。

IAB-1注入転移巣(投与終了後32日目)の組織では、腫瘍細胞はシート状に皮下に増殖し、腫瘍巣内には広範な壊死巣が散在していた。腫瘍巣は結合織性の被膜に被われ境界は鮮明であった。腫瘍巣の上方の皮下組織には泡沫状の胞体を有する組織球の集塊および、ごく軽度のリンパ球浸潤が見出された。IAB-1非注入転移巣(右側腹部、投与終了4日後)の組織では、腫瘍細胞巣は皮下の脂肪織内に存在し、大型で類円形の腫瘍細胞がシート状に増殖していた。周囲には小円形細胞の浸潤はほとんどみられなかった。遺伝子製剤投与前の組織所見と同様であった。この症例では腫瘍細胞は治療前、治療後ともにHLA-Class I抗原、Class II抗原を発現していた(ただし、Class I抗原は低発現であった)。

両側眼窩内や頭部皮膚、両側頸部、鎖骨上窩のリンパ節などの転移巣の明らかな増大、増数はみられなかったが、両側性多発肺転移、多発肝転移、多発腎転移および、縦隔、左肺門、肝門部、副腎周囲、脾門部、大動脈周囲、腓背側リンパ節などの転移巣の大きさはそれぞれわずかに増大していた。内臓には転移巣の新生はみられなかった。総合的効果判定は進行(PD)であった。HuIFNβ、Plasmid DNAは治療中、治療後ともに血清中、尿中に検出されなかった。

症例4

71歳、男性。右踵部原発のメラノーマ。原発巣拡大切除、右鼠径リンパ節郭清術を施行され(右鼠径リンパ節には転移なし)、その後化学療法(DAV-Feron療法)を3クール行ったが、右下肢に小さな皮膚転移巣が出現し、増数した。皮膚転移巣の切除、インターフェロン蛋白(Feron)局所注入、化学療法(DAC-Tam)で治療された。遺伝子治療開始までに皮膚転移巣172個を切除されていた。内臓諸臓器に転移はない。本遺伝子治療開始前に

は右下肢に多数（106個）の微小な皮膚転移巣を認めた。

右下肢の3個の皮下転移巣にそれぞれDNA量として10 μ gのIAB-1を隔日週3回、2週間連続の合計6回局所注入した。なお、遺伝子製剤10 μ gの1回投与後1週間目、6回投与後1週間目の腫瘍の組織反応を調べるため、遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認下で、さらに2つの病変にDNA量として1回量10 μ gのIAB-1を規定回数投与し、生検した。注入部位の病変はいずれも1回目の遺伝子製剤注入後より、結節及びその周囲に発赤を認め、強い浸潤を触知した。2日後では結節部が浮腫状で一部水疱を形成し、表面に鱗屑、痂皮を認めた。3回目投与後頃から結節中央部に潰瘍を形成し潰瘍周囲に広く鱗屑を伴う紅斑を認めるようになった。（1回のみ遺伝子製剤を注入した転移巣も注入後1週間で結節中央に小さい潰瘍を形成し、痂皮の付着がみられた。）6回投与した腫瘍病変の潰瘍は徐々に小さくなり、1週間後には痂皮が付着してきた（組織反応確認用の1個の病変はこの時点で切除）。その後、結節は平坦化し、浸潤も徐々に触れなくなり、鱗屑を付着した赤褐色斑が残ったが、3個のうち2個の転移巣では投与終了後2～3週間より褐色斑中央に再び小結節が出現し、徐々に増大してきた。右下肢に多発する遺伝子製剤非投与小転移巣は、転移巣周囲の発赤や表面に鱗屑を認めることはなかった。5個の非注入皮膚転移巣の大きさを計測していたが、いずれも治療前に比べ治療後4週ではわずかに増大していた。皮膚転移巣は新生し、投与前106個の転移巣が、投与終了後31日目には211個と急激に増数した。

組織学的には、遺伝子製剤注入転移巣（4週間の観察期間終了後の組織）で再発がみられなかった病変は、真皮中層に大型類円形でメラニンを多量に含んだ変性した腫瘍細胞が個別性に、多くのリンパ球、脂肪を貪食したマクロファージに混在する状態で存在した。結節が再発した病変の組織では臨床的にみられた小さな結節の部分に一致して、表皮直下から真皮上層に大型類円形の腫瘍細胞のシート状、一部胞巣状の増殖がみられた。表皮内にも腫瘍細胞の浸潤がみられた。この病巣の下方の真皮網状層では変性した腫瘍細胞や脂肪を貪食したマクロファージやリンパ球の浸潤がみられた。遺伝子製剤を1回投与した病変の1週間後の組織では表皮は壊死に陥り、潰瘍を形成していたが、潰瘍底から真皮上層にかけて大型類円形の腫瘍細胞がシート状、一部胞巣を形成しながら増殖していた。真皮上層から中層にかけて泡沫状の胞体をもつ組織球の集塊がみられ、中等度のリンパ球浸潤を伴っていた。同部には腫瘍細胞も個別性に存在していた。浸潤リンパ球はCD4陽性細胞、CD8陽性細胞が同程度であった。遺伝子製剤を6回投与した病変の投与1週後の組織像では真皮中層から深層にかけて広汎な壊死組織を認め、その周囲には泡沫状の胞体をもつ組織球の集塊がみられた。同部には腫瘍細胞は認めなかったが、表皮直下には大型類円形の腫瘍細胞がわずかにみられ、その周囲にはリンパ球の稠密な浸潤をみた。リンパ球のマーカーはCD4陽性細胞とCD8陽性細胞が同程度であった。遺伝子製剤非投与の皮膚転移巣では類円形で大型の腫瘍細胞は表皮下より真皮上層にシート状に、一部は胞巣を形成して存在し、一部、表皮内へも腫瘍細胞は浸潤していた。ごくわずかな小円形細胞浸潤が腫瘍

巣周囲にみられた。治療前の組織と同様であった。腫瘍細胞は治療前後ともに HLA-Class I 抗原の発現はなく、HLA-Class II 抗原は1回注入後1週間の組織、6回注入後1週間の組織では陽性であったが、治療前、6回投与後4週間の組織では陰性であった。

内臓の転移巣は治療後も検出されなかった。

治療効果に関しては、遺伝子製剤注入部位では3個のうち2個に再増殖を認めたが、これは表皮下に残っていた腫瘍細胞が再増殖したものと考えた。非投与部位である左下肢の皮膚転移巣は増数しており、全体の評価は進行 (PD) であった。HuIFN β 、Plasmid DNA は治療中、治療後において血清中、尿中に検出されなかった。

症例 5

61 歳、女性。右踵部原発のメラノーマ。原発巣切除術及び化学療法 (DAV-Feron 療法、2クール) を施行し、術後3ヶ月目に右鼠径、外腸骨リンパ節郭清術を行った (リンパ節転移なし)。その後化学療法 (10回の DAV-Feron 療法、5回の DTIC-Feron 療法) を施行したが、術後2年6ヶ月、右鼠径部から大腿にかけて皮下転移が出現し、インターフェロン蛋白 (Feron) の局注を施行された。施行中は大腿から鼠径部の皮下の転移巣は変化がなかった。本遺伝子治療開始前には右外腸骨から両側総腸骨、傍大動脈領域のリンパ節腫大を新たに認め、また骨盤内に大きな病変がありリンパ節転移と考えられた。右下肢全体に浮腫があり、右大腿部前面に3~4個の皮下結節を触知した。

右大腿部の1個の転移巣に DNA 量として $10\mu\text{g}$ の IAB-1 を週3回、2週間連続の合計6回局注入した。遺伝子製剤注入部位は1回目の遺伝子製剤注入1日後より腫瘍の被覆皮膚に軽度発赤を認め、2日後には同部に強い浸潤を触れた。2回目投与後から徐々に発赤がおさまり、投与終了後1週間で発赤は消失した。皮下の腫瘍結節の大きさは治療前後で大きさの変化はなかった。遺伝子製剤注入部位以外の大腿部に触知される皮下転移巣は、遺伝子製剤の注入中、注入後の経過観察期間中に発赤などの変化を認めることはなく大きさも変わらなかった。

組織学的には遺伝子製剤注入皮膚転移巣は皮下脂肪織にメラニンを多量に含む大型の腫瘍細胞巣が周囲と境界明瞭に存在し、腫瘍巣の上方から側方に向けリンパ球と泡沫状の胞体をもつマクロファージの浸潤がみられた。遺伝子製剤非投与皮膚転移巣は真皮深層から皮下脂肪織にかけ、メラニンを多量に含む大型の腫瘍細胞巣が周囲と比較的境界明瞭に存在した。腫瘍細胞巣の中央部は広範な壊死に陥っていたが、腫瘍巣周囲のリンパ球浸潤は一部にわずかにみられたのみであった。遺伝子製剤投与前の組織と同様であった。

内臓転移巣の大きさの変化はなく、新たな転移巣も検出されなかった。総合的効果判定は不変 (NC) であった。HuIFN β 、Plasmid DNA は治療中、治療後において血清中、尿中に検出されなかった。

別紙3 本臨床研究と名古屋大学の遺伝子治療臨床研究との治療成績の比較

インターフェロンβ発現ベクターを用いた遺伝子治療は、今までのところ名古屋大学におけるグリオーマに対する臨床研究以外には、報告がない。

名古屋大学で行われた「正電荷リポソーム包埋ヒトβ型インターフェロン遺伝子による悪性グリオーマの遺伝子治療臨床研究」は、悪性グリオーマ（悪性星細胞腫または膠芽腫）の症例のうち、放射線治療、化学療法、あるいは免疫療法などの補助療法をしたにも拘わらず腫瘍の再発あるいは増悪進行が確認された症例を対象としている。治療法は再度開頭術で腫瘍を摘出した後に、取り残した腫瘍内に IAB-1 を DNA 量として 30 μg を直視下に数ヶ所に分けて直接注入し、術後 2 週間目より神経内視鏡、定位脳手術装置を介し、組織学的に腫瘍確認後、腫瘍内に週 2 回の割合で IAB-1 を DNA 量として 15 μg を 5 回あるいは週 1 回の割合で合計 3 回注入し、その治療効果と安全性を検討している。28 歳から 64 歳までの 5 人の悪性グリオーマ患者（男性 1 人、女性 4 人）が登録され、IAB-1 の投与回数は 6 回（術中 1 回、術後 5 回）が 1 症例、4 回（術中 1 回、術後 3 回）が 3 症例、1 回（術中 1 回のみ）が 1 症例であった（1 回のみ投与した症例はその後組織学的にグリオーマ細胞が確認できなかったことによる）。治療効果は腫瘍の大きさが比較的小さな 2 症例に PR、そのほかの 3 症例のうち 2 症例が NC、1 症例は腫瘍細胞が最初から確認できず判定不能という結果であった。PR の 2 例は治療後それぞれ、15 ヶ月、16 ヶ月は腫瘍の再発・再燃は認めなかったが、その後治療部位とは異なった場所に播種を起こし、最終的にはそれぞれ治療後 26 ヶ月、29 ヶ月で亡くなられた。一般状態、神経学的な改善は治療開始から 3 ヶ月の時点で 4 症例にみられ、残りの 1 症例も 2 ヶ月間は改善がみられた。

名古屋大学の臨床研究は遺伝子治療のみならず手術療法も合わせた治療法の効果であり、遺伝子製剤のみを投与する今回のメラノーマに対する遺伝子治療と治療法が全く異なるのでその効果判定の比較はできない（グリオーマに対する治療で PR 症例が 2 例あったことから、インターフェロンβ遺伝子の投与による治療効果はグリオーマのほうがメラノーマより高いと結論づけることはできない）。遺伝子製剤 IAB-1 投与の安全性に関しては本臨床研究と同様に名古屋大学の臨床研究においても遺伝子製剤によると考えられる有害事象、検査値の異常はなく、今回と同程度の量では比較的安全に使用できる製剤であると考えた。

別紙4 遺伝子治療の今後の展開

本臨床研究ではインターフェロン β 遺伝子導入によるインターフェロン β の直接的な抗腫瘍効果及びインターフェロン β の産生による免疫学的な抗腫瘍効果を期待していたが、登録5症例のうち、1例のみMixed Response (MR)という結果であり、今回の投与方法では十分な治療効果が得られなかった。免疫学的な抗腫瘍効果としては細胞障害性T細胞(CTL)を中心とする細胞性免疫の誘導が重要となるが、この効果は腫瘍細胞がHLA-Class I抗原を発現していることが必要である。本治療に登録された5症例のうちメラノーマ細胞にHLA-Class I抗原を提示していた症例は2症例のみであり、残りの3症例の腫瘍細胞はHLA-class I抗原を欠落していたため、CTL誘導による免疫学的効果は期待できない。また、今回の遺伝子治療で遺伝子製剤注入転移巣は一旦退縮傾向を認めたが、その後再増殖をみたものが多く、このことは遺伝子製剤が腫瘍全体に十分量、分布していなかったためと考えられた。今後は遺伝子製剤の投与量の増加、さらに樹状細胞療法の併用を考えている。