

ホルモン抵抗性前立腺癌転移巣に対する治療法について

後藤 章暢¹, 白川 利朗¹, 和田 義孝², 日向 信之²
 寺尾 秀治², 原 勲², 荒川 創一², 守殿 貞夫²
 岡田 弘³, 武中 篤⁴, 藤澤 正人⁴

¹神戸大学医学部医学医療国際交流センター,

²神戸大学大学院医学研究科 器官治療医学講座 腎泌尿器科学分野,

³帝京大学医学部泌尿器科, ⁴川崎医科大学泌尿器科

GENE THERAPY

Akinobu GOTOH¹, Toshiro SHIRAKAWA¹, Yoshitaka WADA², Nobuyuki HINATA²,
 Shuji TERAOKA², Isao HARA², Soichi ARAKAWA², Sadao KAMIDONO²,
 Hiroshi OKADA³, Atsushi TAKENAKA⁴ and Masato FUJISAWA⁴

¹The International Center for Medical Research, Kobe University School of Medicine

²The Division of Urology, Department of Organs Therapeutics, Faculty of Medicine,
 Kobe University Graduate School of Medicine

³The Department of Urology, Teikyo University School of Medicine

⁴The Department of Urology, Kawasaki Medical University

We selected bone-metastatic prostate cancer as the target form of recurrent prostate cancer and developed a suicide-gene therapy based on an adenovirus vector with an organ-specific osteocalcin promoter. Related clinical studies have already been conducted in the United States at the University of Virginia, where results so far have established the safety of this therapy. In the present paper, in addition to presenting the results of these gene-therapy studies from the basic research to the clinical stage, we discuss the clinical studies begun by our group in August 2003.

In the 21st century, therapeutic systems in use are undergoing major changes. Gene therapy is likely to become an important therapeutic option in recurrent prostate cancer. In terms of theory and technology however, this form of treatment is still at a very immature stage of development. We look forward to evolution in this field to provide an established treatment for recurrent prostate cancer and are committed to actively continuing with the development of gene therapy through translational research.

(Hinyokika Kyo 51 : 75-79, 2005)

Key words: Prostate cancer, Hormone refractory, Gene therapy

緒 言

泌尿器科系悪性腫瘍に関するここ数年来の分子生物学の著しい進歩と、それによる分子レベルでの疾患の解析が進むにつれて、遺伝子レベルでの治療をめざした研究が急速に進展している。中でも前立腺癌は米国を中心として多くの画期的な研究がなされているが、再燃前立腺癌に対する画期的な治療法は確立されていないのが現状である。遺伝子治療は1991年から米国を中心に、本格的に臨床応用され始めたが、まだ有意義な成果は挙げられていない。21世紀の新しい治療法として、世界中で多くの研究者がベクター開発に精力を費やしている。よりすぐれたベクターが開発されれば、それだけ臨床効果も上がるはずである。これまでわれわれは、前立腺癌に対してベクターの舵取りを行

うプロモーターを制御し、臓器特異性を利用したベクターの開発を進めてきた¹⁻³⁾。今回、再燃前立腺癌の中でも転移性前立腺癌を標的として、臓器特異性オステオカルシンプロモーターを用いたアデノウイルスベクターによる自殺遺伝子治療法を開発した⁴⁻⁶⁾。これを用いた臨床試験は、米国ヴァージニア大学ですで行われており、これまでの臨床試験において、安全性は確立されている^{7,8)}。今回のシンポジウムでは、この遺伝子治療臨床試験の基礎から臨床にわたる研究結果を紹介すると共に、われわれの組織で2003年8月から始まった臨床試験について、問題点をも含め解説する。

遺伝子治療臨床研究の流れ

近年の分子生物学の進歩に伴い、従来では治療が困

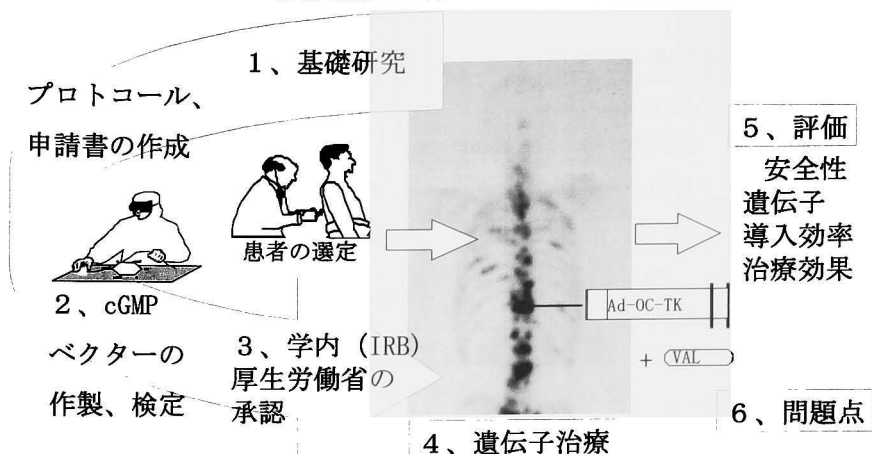


Fig. 1. 遺伝子治療臨床研究の流れ

難であった疾患を遺伝子治療で克服しようという試みが世界中でおこなわれている。遺伝子治療法の確立において、従来になかった新しい治療法である遺伝子治療を実際に患者さんに施行し、その安全性を中心に治療効果などを検討する遺伝子治療臨床研究を行わなくてはならない。遺伝子治療臨床研究の流れを Fig. 1 に示す⁹⁾ 基礎研究から始まり、プロトコルおよび申請書の作成、cGMP ベクターの作製および検定、学内 IRB や厚生労働省の承認、患者さんの選定を経て、遺伝子治療の実施、安全性や遺伝子導入効率や治療効果の評価を行っていく。このような遺伝子治療の現況は、この遺伝子治療臨床研究が日本を含め世界中でおこなわれている段階であり、実際に臨床の場で1つの確立された治療法としての、遺伝子治療というのは現時点では存在していない。その遺伝子治療臨床研究は欧米を中心にすでに約600の研究が主に癌を対象として計画され、4,000名以上の患者に実施されている。それらの臨床研究の結果から、安全性に関してはほぼ合格点が与えられると思われる。その治療効果については期待されたほどの効果は今のところ認められていない。しかしながら、遺伝子治療臨床研究は21世紀の今日より新しい局面に入りつつあり、難治性疾患の夢の治療法という見方から、より現実的な治療技術の1つとして発展しつつあると思われる⁹⁾ すなわち、従来の治療法が効果のなかった疾患に対し、根治はできないまでも、ある程度治療効果をあげたり、従来の治療法と同等の治療効果をより少ない副作用で実現したりすることは十分可能であると考えられる。ホルモン療法が効かなくなった進行性の前立腺癌に対しては、現在のところ有効な治療法はなく、新たな治療法として遺伝子治療が期待されている。前立腺癌に対する遺伝子治療臨床研究は、米国ではすでに実施中および計画中のものを合わせて約45の計画がすでに承認されている。今回、われわれの計画している遺伝子治療臨床研究について詳細を述べる⁹⁾

われわれの遺伝子治療臨床研究

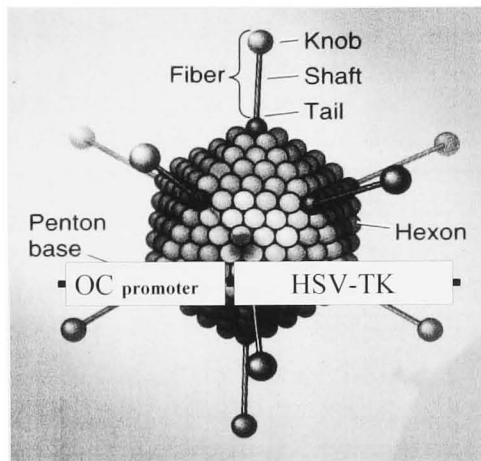
導入を企図する遺伝子は、HSV-TK タンパク質のすべての翻訳領域を含む遺伝子である。

HSV-TK 遺伝子を用いた遺伝子治療は別名「自殺遺伝子治療」と呼ばれ、遺伝子導入を受けた細胞を死に至らしめる治療法である。

HSV-TK タンパクはヒトの TK タンパクと比較して、プリン誘導体のガンシクロビルおよびアシクロビルに対しより親和しやすい。これらの同族体の、HSV-TK タンパクに対する親和性は、これら薬剤のヘルペスウイルスに対する治療効果にて証明されている。HSV-TK タンパクを発現した癌細胞は、プロドラッグ（プリン誘導体）の投与により殺傷される。HSV-TK 遺伝子はグアニンアナログであるガンシクロビルおよびアシクロビルを過リン酸化する酵素をコードする。段階的にリン酸化され、最終的に三リン酸化された代謝産物は、癌細胞における DNA 合成を阻害し、癌細胞における DNA 鎖の分裂および細胞死、アポトーシスを引き起こす^{9,10)}

本臨床研究に用いられる組換えアデノウイルスベクターの特徴は、HSV-TK 遺伝子の5'上流に臓器特異性プロモーター、マウス OC プロモーターを組み込み、臓器特異的な HSV-TK 遺伝子の発現を可能としたことである。OC プロモーターは、造骨中の骨内に見られる骨芽細胞で機能する臓器特異的なプロモーターで、OC 遺伝子の転写を誘導し OC タンパク質の発現をもたらす。組織内における OC タンパク質の発現は一般的に骨形成、骨芽細胞の活性化、石灰化、癌細胞の発育に伴う組織の微小石灰化と関係する⁹⁾。これまでのわれわれの研究において、OC プロモーターは、前立腺癌や骨肉腫の種々の細胞株において、特異的にプロモーター活性が高いことが確認されている。また、臨床検体においては、前立腺癌の原発巣および転移巣（リンパ節と骨）での組織化学的免疫染色で OC の発現が確認されており、OC プロモーターのヒト前

Recombinant Ad-OC-TK



- 1、非増殖型アデノウイルス
Type 5
E1 Deletion
- 2、OCプロモーター
臓器特異性
前立腺癌細胞、
骨肉腫細胞、骨芽細胞
などに特異的活性
- 3、HSV-TK遺伝子
自殺遺伝子
Metabolite Toxic Gene
Prodrug、VALをリン酸化
して細胞毒性を発現
DNA合成阻害

Fig. 2. 神戸大学の遺伝子治療臨床試験の使用ベクター

立腺癌の転移巣における特異的なプロモーター活性が予想される (Fig. 2)^{3,5)}

本臨床研究における遺伝子の導入方法としては、Ad-OC-TK ベクターを前立腺癌の局所再発巣、またはリンパ節や骨などの転移巣へ直接、CT または超音波ガイド下に局所注入する⁷⁻⁹⁾ Ad-OC-TK ベクターの局所への注入は、同時に付近の正常細胞にも Ad-OC-TK ベクターを暴露し、さらに血管系へのベクターの漏出による Ad-OC-TK ベクターの全身への運搬、特に肝臓の細胞への Ad-OC-TK ベクターの感染が危惧される⁷⁾

マウス OC プロモーターを HSV-TK 遺伝子の前に組み込んだ場合、OC プロモーターを活性化できる細胞（造骨中の骨芽細胞および前立腺癌細胞）でのみ HSV-TK 遺伝子は転写され、HSV-TK タンパクが発現する。すなわち、HSV-TK タンパクの発現には、細胞が OC プロモーターを活性化させることができないとしないので、肝細胞を含む OC タンパクを発現しない正常細胞においては、Ad-OC-TK ベクターが感染しても HSV-TK タンパクは発現しない^{1,5)} アデノウイルスベクターは高力価の濃縮ベク

ター液を調整することが可能であり、またアデノウイルスベクターの高い遺伝子導入効率は、腫瘍内直接投与に適していると思われるが、本臨床研究においては、臓器特異性プロモーター、OC プロモーターを用いることにより、アデノウイルスベクターの高い遺伝子導入効率に伴う周囲の正常組織への障害、または血管系へのベクターの漏出による全身性の障害、特に肝障害の危険性を軽減することが可能であると考えられる^{11,12)}

内分泌療法抵抗性の前立腺癌症例で、画像診断学的 (CT, MRI) に転移または局所再発巣を確認できる症例に対し、まず Ad-OC-TK を単独で CT または超音波ガイド下に腫瘍内に直接投与し、その後パラシクロビルを経口投与する (Fig. 3)。その際の質的、量的安全性を確認することを本試験の主な目的とする。また、治療効果の判定を行い、組織採取が可能な症例においては、画像診断学的な腫瘍退縮や血清中の前立腺特異抗原 (PSA) の低下を期待する際の根拠となる、分子生物学的効果、ベクターの感染、OC プロモーター制御下の mRNA レベルおよびたんぱく質レベルでの HSV-TK 遺伝子の発現、アポトーシスの誘

遺伝子導入方法

CT または超音波穿刺用ガイド装置を用い病変部（骨転移巣、リンパ節転移巣、または局所再発巣）に Ad-OC-TK ベクター溶液 (2.5×10^9 , 2.5×10^{10} PFU の2群) を 0.5~2 ml 局所注入する。
1 病巣のみに治療第 1 日と第 8 日目に計 2 回注入する。

パラシクロビルは遺伝子導入第 1 日目から 21 日間連日、1 回 1,000 mg を 1 日 3 回経口投与する。

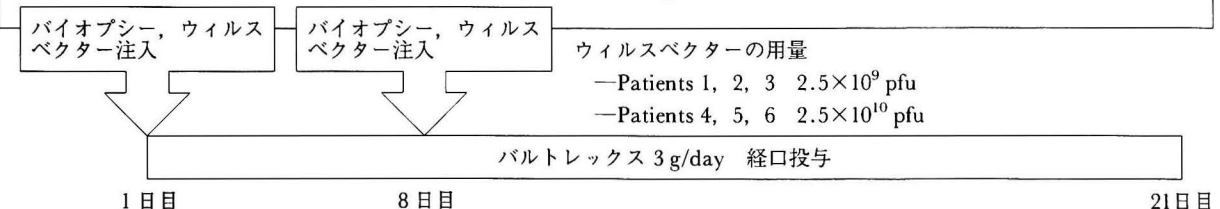


Fig. 3. 神戸大学の遺伝子治療臨床試験の治療方法

導について解析する。

安全性の評価は、1) 有害事象および副作用、2) 臨床検査値（血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査）、3) バイタルサインについて定期的に観察、測定を行い実施する。

有効性評価は、1) PSA 効果判定基準による complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD) の評価により行う。

2) Ad-OC-TK 注入病変部の治療効果判定基準による complete response (CR), partial response (PR), no change (NC), progressive disease (PD) の評価により行う⁹⁾

Ad-OC-TK ベクターを用いた遺伝子治療臨床プロトコルは、米国国立衛生研究所 (NIH) の Office of Recombinant DNA Activities (ORDA : 旧 RAC) および米国食品医薬品庁 (FDA) の認可を受け、1999年7月よりヴァージニア大学にて内分泌療法後の再燃前立腺癌患者を対象とした第1相臨床試験が実施された。現在までに Ad-OC-TK ベクター投与による有害事象に関するデータは蓄積されてきており、臨床効果の評価についても詳細な解析が進んでおり、一部は論文化され公表されている^{7,8)}

本邦において、本ワークショップ発表時（2003年11月1日）には、2名の患者にウイルスベクター投与を実施した。ウイルスベクター投与後の1日目の血中とベクター投与一週間後の組織中にウイルス DNA を検出した。またベクター投与一週間後の組織中にのみ HSV-TKmRNA が検出された。しかし、2例ともに遺伝子治療による重篤な副作用は認められなかった。今後さらに低用量1症例を実施し、重篤な副作用を認めなければ、高用量群に移行する予定である。

遺伝子治療の将来の展望

近年における、分子生物学の急速な進歩は、様々な疾患に対する新しい治療法の可能性を広げてきた。なかでも遺伝子治療や再生医療などの先端医療は21世紀

の新しい治療法として大きな期待を集めているが、それら先端医療の開発、臨床応用にはトランスレーショナルリサーチ（探索的臨床研究）の概念が必要不可欠である（Fig. 4）。

「遺伝子治療」とは、一般的には遺伝子を人工的に操作することを意味するが、2002年3月27日の文部科学省および厚生労働省より公表された指針においては、「疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」となっている。1990年に米国で最初の遺伝子治療臨床研究が行われて以来、600プロトコル以上の臨床研究が行われ、遺伝子治療を受けた患者さんは4,000人を超えるまでにいたったが、現在のところ当初期待されていたほどの治療効果を示すことなく、多くの技術的な問題点に直面している。特に1999年、米国ペンシルヴェニア大学の研究グループが、アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究に参加して死亡した18歳の少年の父親に訴えられた事件は、米国のマスコミによって衝撃的に報道された。また、2003年にも、フランスで実施されたX連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID) 患者に対するレトロウイルスを用いた遺伝子治療臨床研究に発癌症例が報告され、その発癌性が問題視された。

このように、近年では、医学の中での遺伝子治療の位置づけは次第に変わりつつある。難治性疾患の夢の治療法という見方から、より現実的な治療技術の1つとして発展しつつある⁶⁾

癌の病態は多様であり、遺伝子治療だけですべての癌の治療を行うのは現実的ではない。現在行われている臨床プロトコルの評価を行うためには、まだ多くの基礎的技術の開発が必要である。依然として、十分な導入効率で、癌細胞を特異的に攻撃できるようなベクターは実存しておらず、癌の遺伝子治療を評価できるような動物モデルも作成されていない。また、癌化のどの段階の、どの分子を標的とするべきなのか絞りきれていないのが現状である。それぞれ個々の癌に対し、これらの問題を着実に解決していく必要がある⁶⁾。遺伝子治療をトランスレーショナルリサーチとして展開させていくためにも、遺伝子治療の適応の見直し、遺伝子治療の技術的な向上、遺伝子治療を取り巻く環境の整備などを早急に行わなければならない。そうすることによって、癌の集学的治療の中での重要な選択肢の1つとして、癌の遺伝子治療は発展していくものと考えている。

結 語

—Bed to bench to bed—泌尿器癌集学的治療の新展開のシンポジウムにて、ホルモン抵抗性前立腺癌転移巣に対する治療法について、われわれの経験

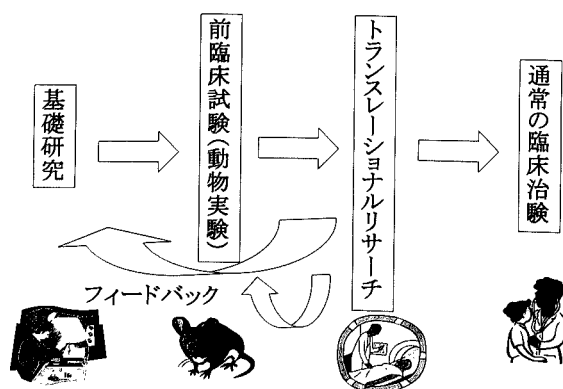


Fig. 4. 先端医療 遺伝子治療開発ステップ

え, 遺伝子治療の現状について解説した.

第53回日本泌尿器科学会中部総会会長である金沢大学泌尿器科並木幹夫教授ならびに座長の京都府立医科大学泌尿器科三木恒治教授, 神戸大学泌尿器科守殿貞夫教授には, 今回発表の機会を与えていただきましたことにあらためて厚く御礼申し上げます.

文 献

- 1) Ko SC, Cheon J, Kao C, et al.: Osteocalcin promoter-based toxic gene therapy for the treatment of osteosarcoma in experimental models. *Cancer Res* **56**: 4614-4619, 1996
- 2) Gotoh A, Ko SC, Shirakawa T, et al.: Development of prostate-specific antigen promoter-based gene therapy for androgen-independent human prostate cancer. *J Urol* **160**: 220-229, 1998
- 3) Shirakawa T, Gotoh A, Wada Y, et al.: Tissue-specific promoters in gene therapy for the treatment of prostate cancer. *Mol Urol* **4**: 73-82, 2000
- 4) Cheon J, Ko SC, Gardner TA, et al.: Chemogene therapy: Osteocalcin promoter-based suicide gene therapy in combination with methotrexate in a murine osteosarcoma model. *Cancer Gene Therapy* **4**: 359-365, 1997
- 5) Shirakawa T, Ko SC, Gardner TA, et al.: In vivo suppression of osteosarcoma pulmonary metastasis with intravenous osteocalcin promoter-based toxic gene. *Cancer Gene Therapy* **5**: 274-280, 1998
- 6) 後藤章暢, 白川利朗, 和田義孝, ほか: 難治性前立腺癌に対する治療の現状と問題点: 遺伝子治療. *泌尿紀要* **48**: 729-732, 2002
- 7) Koeneman KS, Kao C, Ko SC, et al.: Osteocalcin-directed gene therapy for prostate-cancer bone metastasis. *World J Urol* **18**: 102-110, 2000
- 8) Kubo H, Gardner TA, Wada Y et al.: Phase I dose escalation clinical trial of adenovirus vector carrying osteocalcin promoter-driven herpes simplex virus thymidine kinase in localized and metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Hum Gene Ther* **14**: 227-241, 2003
- 9) 後藤章暢, 白川利朗: 前立腺癌に対する遺伝子治療臨床研究—臓器特異性プロモーターを用いて—. *医のあゆみ* **203**: 344-348, 2002
- 10) Moolten FL and Wells JM: Curability of tumors bearing herpes thymidine kinase genes transferred by retroviral vectors. *J Natl Cancer Inst* **82**: 297-300, 1990
- 11) Desbois C, Hogue DA and Karsenty G: The mouse osteocalcin gene cluster contains three genes with two separate spatial and temporal patterns of expression. *J Biol Chem* **269**: 1183-1190, 1994
- 12) Gotoh A, Shirakawa T, Wada Y, et al.: Frontiers in human genetics: diseases and technologies; gene therapy for prostate cancer; development of tissue specific promoter-based gene therapy. pp 363-376 World Scientific Publ, Singapore, 2001

(Received on May 18, 2004)

(Accepted on May 20, 2004)