

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 24日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592060

研究課題名（和文） ハイリスク前立腺癌に対するネオアジュバント遺伝子治療

研究課題名（英文） Neoadjuvant in situ gene therapy with adenoviral delivery of HSV-tk gene for patients with high-risk prostate cancer

## 研究代表者

佐藤 威文（SATO TAKEFUMI）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50286332

## 研究成果の概要（和文）：

ハイリスク限局性前立腺癌に対し、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に注入し、抗ウイルス剤であるガンシクロビルを全身投与した後、根治的前立腺摘除術を施行した場合の直接的な抗腫瘍効果と、間接的な免疫学的効果の解析・評価を目的とした。

術後5年以内に35%以上の確率で再発するとされる予後不良前立腺癌（Kattan Nomogram 115点以上）を対象とし、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に注入し、抗ウイルス剤であるガンシクロビルを全身投与した後（計2サイクル施行）、根治的前立腺摘除術を施行した。

5症例における解析の結果、同治療後の血清 PSA 値の低下に加え、activated T リンパ球（CD8+DR+, CD4+DR+）の持続的な増加と、regulatory T リンパ球（CD4+CD25+）の減少、naïve および memory T リンパ球（CD4+ CD62L+, CD4+ CD62L-）の変動が確認された。また病理学的評価において、変性した癌組織内には、L26 陽性 B cell と比較して、cytotoxic T cell（CD8）が優位に浸潤しており、CD68 陽性マクロファージの遊走も増加するなど、同遺伝子治療による免疫担当細胞の誘導が確認された。これらより、同遺伝子治療により、その臨床効果と合わせて患者免疫の応答が確認され、現在、腫瘍特異的免疫担当細胞の検出につき解析を進めている。

## 研究成果の概要（英文）：

Neoadjuvant in situ cytotoxic gene therapy can potentially trigger a systemic immune response, which could impact occult micro-metastatic disease. We are currently conducting adenoviral vector mediated Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (HSV-tk) gene plus ganciclovir (GCV) therapy as neoadjuvant intraprostatic injection for localized high-risk prostate cancer. This study evaluates the systemic T-cell response following gene therapy.

We enrolled 5 men with clinically localized prostate cancer but high risk for recurrence (Kattan nomogram score > 115) in this Phase I-II trial. Intraprostatic viral injections (two) were followed by 2 weeks of GCV and prostatectomy 4 weeks later.

A reduction in serum PSA was observed immediately after vector injection and GCV therapy in all patients. The mean reduction was 31.1% and ranged from 24.8 to 38.9%.

The pretreatment mean percentage of CD8+ T cells positive for the HLA-DR marker of activation was 10.6%. For day 2, day 7, day 14, day 16 and day 56 post treatment, the mean percent of CD8+ DR+ T cells increased by 14.0%, 12.3%, 19.7%, 25.4% and 14.9%, which were statistically significant (day 14;  $p = 0.0431$ , day 16;  $p = 0.0431$ ).

We present evidence of systemic T-cell responses following HSV-tk + GCV gene therapy under clinical trial condition. There was an increase in activated CD8+ T cells in the peripheral blood following vector injection suggesting the potential for activation of components of cell-mediated immune response in this neoadjuvant setting.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：前立腺癌 遺伝子治療 ネオアジュバント

1. 研究開始当初の背景

外科的切除は可能ではあるが、手術前における血清前立腺特異抗原値 (PSA)、臨床病期、および前立腺生検の病理学的分化度を指標とした予測 (ノモグラム評価) において、術後5年以内に35%以上の確率で再発するとされるハイリスク群症例 (総得点115点以上) で、かつ臨床的に遠隔転移を認めない限局性前立腺癌患者を対象とする。

この背景として、近年、本邦における前立腺癌患者の発生は増加の一途を辿っている。前立腺癌による死亡者数は、1950年には83人であったが、1970年にはその約10倍の930人となり、1990年には約45倍の3,460人となった。さらに1999年には7,005人に達し、1990年から僅か10年足らずの間に2倍以上の増加となっている。またその罹患者数についても、1994年は10,940人であったが、2015年には30,285人へと著しい増加が予測されている。一方米国においては、2006年度は234,460人が新たに前立腺癌と診断され、27,350人が同疾患で死亡すると推定されている。

前立腺に限局した癌の場合は一般に根治的前立腺摘除術が適応となる事が多く、近年PSAのスクリーニングにより、外科的切除可能と判断される早期癌の患者が増加してきている。しかしながら外科的切除後の全体での再発頻度は、20~57%とその高い再発率が問題となっている。悪性腫瘍の治療において、外科的切除後の再発に対する追加治療で完治することは困難なことが多く、前立腺癌においても同様であるとされる。このような高い再発率の一因として、腫瘍の被膜外浸潤、精嚢浸潤、リンパ節転移、あるいは外科切除縁陽性など様々な理由で外科的切除が不完全に終わることが約半数にも見られることがあげられる。この状況を改善するべく無作為抽出を含めた数々のトライアルがなされてきた。その多くは術前一定期間の内分泌療

法後に根治的前立腺摘除術を適用し、より完全な切除を目指そうというものである。然るに、根治成績に関しては術前内分泌療法を併用しても術後PSA再発のリスクは軽減することはなく不満足な結果となっている。同様のトライアルは放射線治療の分野でも行われているが、術前内分泌療法後のテストステロン分泌回復の遅れなどが影響するため、その優位性については未だ明らかな結論は得られておらず、当該疾患に対する治療戦略の一環として「新たな術前治療による根治的前立腺摘除術成績の向上を目指した検討」が必要とされている。このような背景に基づき、本研究の対象患者として術後再発する可能性の高い (ハイリスク群) 限局性前立腺癌患者を選定し、アデノウイルスベクターによりHSV-tk遺伝子を直接癌細胞に導入し、ガンシクロビルを投与する遺伝子治療と根治的前立腺摘除術を併用する臨床研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、単独治療では治療後に再発する可能性が高い (ハイリスク群) 限局性前立腺癌に対し、Herpes Simplex Virus-thymidine kinase (以下: HSV-tk) 遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に注入し、抗ウイルス剤であるガンシクロビル (Ganciclovir: GCV) を全身投与した後、根治的前立腺摘除術 (以下鏡視下手術を含む) を施行した場合の安全性、および直接的な抗腫瘍効果と、間接的な免疫学的効果の解析・評価を目的とした第I/II相試験である。

臨床的に遠隔転移を認めず、かつ術後5年以内に再発する可能性の高い予後不良限局性前立腺癌に対し、まずHSV-tk遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に直接注入し、次いでGCVを全身投与する。その後同治療を反復加療した後、根治的前立腺摘除術を施行する。当該検討のプライマリーエンドポイントは、アデノウイルスを用いた

HSV-tk 遺伝子発現ベクターの反復投与、ならびに外科手術を併用するネオアジュバント療法としての安全性の確認であり、セカンダリーエンドポイントは、当該遺伝子治療における有効性を来す可能性のある免疫学的な反応の解析と、同治療効果の病理学的な評価を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は、単独治療では治療後に再発する可能性が高い（ハイリスク群）限局性前立腺癌に対し、HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターを前立腺内に注入し、抗ウイルス剤である GCV を全身投与した後、根治的前立腺摘除術（以下鏡視下手術を含む）を施行した場合の安全性の検討、および直接的な抗腫瘍効果と間接的な免疫学的効果の解析・評価を目的とした第 I/II 相試験に相当する。本研究の主要評価項目は、アデノウイルスを用いた HSV-tk 遺伝子発現ベクターの反復投与、ならびに外科手術を併用するネオアジュバント療法としての安全性の確認である。副次的評価項目は、当該遺伝子治療における有効性を来す可能性のある免疫学的な反応の解析と、同治療効果の病理学的な評価である。また HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターは、増殖性アデノウイルスの混入否定試験をはじめ、各種安全性試験を経た後、臨床研究材料として本研究に用いられる。

遺伝子導入方法は被験者に対し経直腸的超音波を用い病変部を確認した後、その超音波に装着された穿刺用ガイド装置を用い HSV-tk 遺伝子発現アデノウイルスベクターの溶液を 4 ヶ所に注入する（計  $10^{10}$  PFU）。GCV の投与は遺伝子導入 24 時間後から開始する。1 回投与量は体重 1 kg あたり原則として 5 mg とし 1 日 2 回 14 日間投与する（計 28 回）が、腎機能に応じてその投与量を調節する。薬剤は 500 mg が 1 バイアルに包装されており 10 ml の生理食塩水で溶解し 50 mg/ml に調整する。この一連のベクター投与から GCV 投与終了までを 1 サイクルとし、初回ベクター投与日より 2 週間後に、2 サイクル目の投与を同一スケジュールで行う。最終ベクター投与日より起算して 6 週間後に根治的前立腺全摘除術を行い、プロトコルを遵守してその治療効果の評価を行なう。

対象は北里大学病院、あるいはその関連病院に通院中のハイリスク前立腺癌で、以下の選択基準を満たし、かつ以下の除外基準のいずれにも該当しない症例とする。

#### 選択基準：

1) 被験者は 35 歳以上から 75 歳以下の成人男性を原則とし、医学的に本研究を遂行するに足る十分な身体的機能を有すると判断された者。

2) 前立腺生検にて組織学的に前立腺癌と診断され、かつ臨床的に前立腺に局在すると判断された者。

3) ノモグラムにおいて、手術後再発する可能性が高いと判断されるハイリスク症例であること。（注記 1）

4) 画像診断上明らかな転移病巣を認めないこと。（注記 2）

5) 被験者は以下の骨髄機能、肝機能、腎機能を保っていること。その指標としては、末梢血顆粒球数  $>2,000$  /mm<sup>3</sup>、血小板数  $>100,000$  /mm<sup>3</sup>、総ビリルビン  $<1.5$  mg/dl、クレアチニン  $<1.5$  mg/dl。

6) 出血傾向を認めない（PT・PTT の著明延長を認めない）。

注記 1： 手術前の血清前立腺特異抗原値（PSA）、臨床病期、および前立腺生検での病理学的評価（Gleason Sum）を加味したノモグラムにおいて（Kattan MW et al. J Natl Cancer Inst 90: 766-71, 1998）、総得点 115 点以上を占めるもの。すなわち手術後 5 年以内に 35% 以上の症例が再発すると考えられる予後不良症例を示す。

注記 2： 骨シンチグラフィにて骨転移の有無、CT にて腹部並びに骨盤部における転移の有無を検索し、骨シンチグラフィにて疑わしい病変を認めた場合は磁気共鳴装置（MRI）にて確認する。

#### 除外基準：

- 1) GCV、又は類似化合物（アシクロビル等）に対する過敏症の既往歴を有する場合。
- 2) 本研究参加以前に放射線治療や内分泌療法を受けた治療歴を有する場合。
- 3) 前立腺に対し、経尿道的前立腺切除術や温熱療法等の外科的治療歴を有する場合。
- 4) 副腎皮質ホルモン製剤による加療を行っている場合。
- 5) コントロールされていない活動性感染症など、重篤な併発疾患がある場合。
- 6) 本研究参加前 6 ヶ月以内に未承認薬の治験/臨床研究に参加している場合。
- 7) 前立腺癌以外の悪性腫瘍歴がある場合。ただし根治しており、無病期間が 2 年以上に達している場合はこの限りではない。
- 8) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入療法歴がある場合。
- 9) その他、担当医が不相当と認める場合。

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臨床効果及び危険性を理解した上で、同意書に署名したものとする。

また被験者の適格性・有効性・安全性の判断・評価・確認を客観的に行うため、学外の前立腺癌専門医が入る安全・効果評価・適応判定専門小委員会を北里大学病院 C 倫理委員

会の下に設置し、登録時の被験者の適格性の判断、ならびに有効性および安全性の判定を行う。

#### 4. 研究成果

##### 1) アデノウイルスベクターの生体内における移行

①血液中へ移行：治療後 2 日、7 日、14 日、16 日、21 日、28 日、42 日、56 日の各時点で検査を実施し、血液中へのアデノウイルスベクターの移行は全てのポイントで同定されなかった。

②尿中への移行：治療後 2 日、7 日、14 日、16 日、21 日、28 日、42 日、56 日の各時点で検査を実施し、尿中へのアデノウイルスベクターの移行につき評価を施行するも、治療後 2 日の時点を含め、尿中へのアデノウイルスベクターは同定されなかった。

③鼻腔への移行：治療後 2 日、7 日、14 日、16 日、21 日、28 日、42 日、56 日の各時点で検査を実施し、鼻腔へのアデノウイルスベクターの移行につき評価を施行するも、全てのポイントにおいてアデノウイルスベクターは同定されなかった。

##### 2) アデノウイルス抗体

ベクター投与後の抗アデノウイルス中和抗体価の上昇は、全ての症例に治療後 14 日目、および 28 日目に最大で 1024 倍まで上昇したが、その後低下する一過性の上昇であった。

##### 3) 血清前立腺特異抗原 (PSA: prostate specific antigen)

治療効果の指標として腫瘍マーカーである PSA は、5 例中 5 例の全例において低下を認めた。遺伝子治療後 56 日目までの最大 PSA 減少率 (PSA reduction) は平均 23.1% (1.7 - 32.0%) であり、遺伝子治療毎となる 2 峰性に一過性の PSA 上昇を認めた後、緩やかに低下する結果であった。

##### 4) 末梢血 T リンパ球におけるフローサイトメトリー解析

Activated T リンパ球 (CD8+DR+, CD4+DR+) の持続的な増加と、regulatory T リンパ球 (CD4+CD25+) の減少、naïve および memory T リンパ球 (CD4+ CD62L+, CD4+ CD62L-) の変動が確認された。

##### 5) 病理学的解析

###### ①殺細胞効果 (Cytopathic Effect)

殺細胞効果に関して ssDNA LI を用いて解析を行い、症例間での比較において、症例 4 が有意に高い殺細胞効果を示し、全体を通して前立腺尖部 (apex) における殺細胞効果が高い結果が確認された。また前立腺の解剖学的領域での検討では、前立腺移行領域

(transition zone) との比較において、殺細胞効果は辺縁領域 (peripheral zone) に高く認められる結果であった。

また各因子間の比較において、ssDNA と CD68, CD4 の逆相関が認められた。

###### ②局所免疫反応 (Local Immune Response)

炎症細胞浸潤は症例 1、症例 5 に強く認められ、CD68、CD3、CD8 は、全体を通して前立腺尖部 (apex) と中部 (mid) に高い浸潤が確認された。また CD20 のみ、前立腺辺縁領域 (peripheral zone) との比較において、移行領域 (transition zone) に高い傾向が確認された。また各因子間の比較において、CD20 は治療効果との弱い負の相関を認めた。CD68、CD3、CD4、CD8 の各因子間において、有意な正の相関が認められた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 14 件)

1. Satoh T, Kubo M, Tabata K, Kurosaka S, Matsumoto K, Fujita T, Obata F, Nasu Y, Kumon H, Kadmon D, Brenner MK, Thompson TC, Baba S. Systemic T-cell activation following neoadjuvant in situ gene therapy in high-risk prostate cancer patients. American Urological Association Annual Meeting, Atlanta, USA, 2012. 5. 19

2. Kubo M, Satoh T, Tabata K, Matsumoto K, Baba S, Obata F. Enhanced CD8+ T cell activation after in situ gene therapy of repeated HSV-tk injection and ganciclovir administration in prostate cancer patients 第 40 回日本免疫学会総会・学術集会 (幕張) 2011 年 11 月 27 日

3. 佐藤威文 mCRPC に対する治療戦略と課題 第 49 回日本癌治療学会学術集会 (名古屋) 2011 年 10 月 27 日 (教育セミナー)

4. 佐藤威文 久保 誠 田畑健一 黒坂眞二 柳澤信之 松本和将 藤田哲夫 佐藤絵里奈 伊東一郎 小幡文弥 三枝 信岡 安 勲 那須保友 公文裕巳 馬場志郎 ハイリスク前立腺癌に対するネオアジュバント HSV-tk 遺伝子治療の検討 第 49 回日本癌治療学会学術集会 (名古屋) 2011 年 10 月 27 日

5. 佐藤威文 前立腺癌治療の最前線 第 17 回

神奈川泌尿器科診療所懇話会 (横浜) 2011  
年 2 月 26 日 (特別講演)

6. Kubo M, Satoh T, Tabata K, Matsumoto K,  
Baba S, Obata F. Immune responses in  
prostate cancer patients received in situ  
gene therapy of repeated HSV-tk injection  
and ganciclovir administration. 14th  
International Congress of Immunology  
(Kobe) 2010. 8. 22

7. Kubo M, Satoh T, Tabata K, Matsumoto K,  
Baba S, Obata F. Immune responses in  
prostate cancer patients received in situ  
gene therapy of repeated HSV-tk injection  
and ganciclovir administration. 16th  
Japan Society of Gene Therapy (Utsunomiya)  
2010. 7. 1

8. 佐藤威文、久保 誠、柳澤信之、田畑健  
二、松本和将、佐藤絵里奈、大草 洋、岩村  
正嗣、小幡文弥、岡安 勲、那須保友、公文  
裕巳、馬場志郎 Neoadjuvant In Situ  
Therapy for Prostate Cancer: Kitasato  
Trial 平成 21 年度科学技術振興調整費  
国際共同研究の推進「アジア人の癌体質と遺  
伝子治療共同臨床研究」第 3 回 国際研究者  
打合せ会 (岡山) 2010 年 3 月 4 日

9. Kubo M, Satoh T, Tabata K, Matsumoto K,  
Baba S, Obata F. The increase of  
activated CD8+ T cells in prostate cancer  
patients received in situ gene therapy of  
repeated HSV-tk injection and ganciclovir  
administration. 第 39 回 日本免疫学会総  
会・学術集会 (大阪) 2009 年 12 月 2 日

10. 佐藤威文、久保 誠、柳澤信之、田畑健  
二、松本和将、佐藤絵里奈、大草 洋、岩村  
正嗣、小幡文弥、岡安 勲、那須保友、公文  
裕巳、馬場志郎 ハイリスク前立腺癌に対  
するネオアジュバント遺伝子治療の検討  
第 97 回日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009  
年 4 月 16 日

11. 佐藤威文 High Risk Prostate Cancer  
に対する治療戦略とマネージメント第 97 回  
日本泌尿器科学会総会 (岡山) 2009 年 4 月  
16 日 (教育セミナー)

12. 佐藤威文、久保 誠、柳澤信之、田畑健  
二、松本和将、佐藤絵里奈、大草 洋、岩村  
正嗣、小幡文弥、岡安 勲、那須保友、公文  
裕巳、馬場志郎 Neoadjuvant In Situ Gene  
Therapy for Prostate Cancer 平成 20 年  
度科学技術振興調整費 国際共同研究の推  
進「アジア人の癌体質と遺伝子治療共同臨床

研究」第 2 回 国際研究者打合せ会 (岡山)  
2009 年 3 月 4 日

13. Kubo M, Satoh T, Tabata K, Matsumoto  
K, Baba S, Obata F. Immune responses in  
prostate cancer patients received in situ  
gene therapy of repeated HSV-tk injection  
and ganciclovir administration. 第 38 回日  
本免疫学会総会・学術集会 (京都) 2008 年  
12 月 1 日

14. 佐藤威文、久保 誠、柳澤信之、田畑健  
二、松本和将、佐藤絵里奈、大草 洋、岩村  
正嗣、小幡文弥、岡安 勲、那須保友、公文  
裕巳、馬場志郎 ハイリスク前立腺癌に対  
する HSV-tk ネオアジュバント遺伝子治療 平  
成 20 年度科学技術振興調整費 国際共同  
研究の推進 「アジア人の癌体質と遺伝子治  
療共同臨床研究」 第 1 回 国際研究者会議  
(岡山) 2008 年 6 月 7 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 威文 (SATO TAKEFUMI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：50286332

### (2) 研究分担者

馬場 志郎 (BABA SHIRO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：00051889

松本 和将 (MATSUMOTO KAZUMASA)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：70306603

岡安 勲 (OKAYASU ISAO)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：20014342

柳澤 信之 (YANAGISAWA NOBUYUKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20014342

小幡 文弥 (OBATA FUMIYA)  
北里大学・医療衛生学部・教授  
研究者番号：60129236

久保 誠 (KUBU MAKOTO)  
北里大学・医療衛生学部・助教  
研究者番号：40464804

田畑 健一 (TABATA KENICHI)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号：20327414