

進行食道扁平上皮癌に対する p53 遺伝子治療第 I/II 相臨床試験

島田英昭、松原久裕、岡住慎一、白鳥 享、清水孝徳、
首藤潔彦、青木泰斗、宮崎信一、落合武徳

千葉大学大学院医学研究院 先端応用外科学

要 旨

放射線化学療法に抵抗性の進行食道癌に対する新たな治療法の開発が求められている。我々は、食道癌の発癌初期段階から約半数に p53 遺伝子異常を認めていること、p53 遺伝子異常は化学療法に対する抵抗性と関連していること、予後不良因子であることなどを明らかとしてきた。そこで、新たな治療戦略として進行食道癌に対する p53 遺伝子治療の基礎的検討をすすめてきた。現在までに、放射線治療抵抗性の進行食道癌 10 例に対して、合計 51 回の遺伝子治療を実施した。10 例中 6 例が 1 年以上生存しており、そのうち 1 例は 3 年以上生存している。現在まで、重篤な副作用なく安全に治療が施行されている。

はじめに

当科では、過去 50 年間に 2000 例以上の食道癌手術を施行しており、約 40 年前からは手術と放射線照射との併用治療について検討してきた(1)。また、3 領域リンパ節郭清を主体とする系統的リンパ節郭清方法を確立し、安全かつ効果的な手術治療としてその普及に努めてきた(2)。しかし、食道癌は、診断時にすでに手術不能進行癌であるものが多く、当科の症例では手術不能症例が 43% を占めており、手術施行例においても stage III, IV 症例がそれぞれ 37%, 42% と多くを占めている。手術不能進行食道癌に対しては、放射線療法と 5-FU ならびに CDDP 併用を主体とした化学療法を施行するのが標準治療であるが、非奏効例の 3 年生存率は 5% 前後と極めて予後不良である。食道癌では、p53 遺伝子異常が癌化や癌の進展に深く関与しており、化学療法・放射線治療抵抗性と相関する予後因子であることが明らかとなってきた(3,4,5)。非奏効例は遺伝子異常に起因するアポトーシス抵抗性を獲得していると推測されるため、我々は新たな治療手段として、アポトーシス経路を制御する正常型 p53 遺伝子を食道癌細胞へ導入する遺伝子治療の開発を進めてきた(6,7)。厚生省並びに文部省による臨床試験の安全性に関する審査を終了し、2000 年 12 月より化学療法・放射線治療抵抗性の手術不能進行食道癌に対する p53 遺伝子治療の第 I/II 相臨床試験を開始した。本稿では、食道癌治療における遺伝子治療の現況、意義と問題点、今後の展望について報告する。

食道癌における p53 遺伝子異常の臨床的意義

当科における食道癌切除標本を用いて p53 遺伝子異常を解析した(8)。1986 年から 1993 年までに根治手術を施行した進行食道癌 42 例について、癌部・非癌部・異型上皮病変のパラフィン包埋切片から抽出した DNA の p53 遺伝子の exon 5-9 の変異の有無を検索した。変異は、14 例(33%)に認め、変異を認めた症例の予後が有意に不良であった(8)。一方、p53 遺伝子異常を反映するとされる p53 タンパク異常を検索すると、p53 タンパク陽性症例の予後が不良であり、血管新生因子 thymidine phosphorylase 発現異常を同時に呈する症例で有意に予後不良であった(8)。さらに、p53 遺伝子異常ならびに p53 タンパク異常を反映すると考えられる血清 p53 抗体を測定すると、p53 抗体陽性症例で抗癌剤感受性が低く、かつ予後不良であった(9,10)。

アデノウイルスベクターによる食道癌遺伝子治療前臨床試験

用いたベクターは組換え型非増殖性の 5 型アデノウイルス (E1 と E3 遺伝子を欠損している) で、E1 遺伝子の部分にサイトメガロウイルスのプロモーターと正常型ヒト p53 遺伝子を導入して正常型 p53 ベクター (Ad5CMV-p53) を作成した(11)。p53 ベクターの正常食道粘膜に対する毒性を検討する目的で食道癌に隣接する正常食道上皮から得られた初代培養細胞株を用いて感染実験を行った結果、1000MOI までは毒性を認め

なかった。次に、ヒト食道扁平上皮癌細胞株 (T.Tn 細胞) を用いて、p53 ベクターの抗腫瘍効果を検討した (7)。その結果、T.Tn 細胞では、10MOI の条件で治療効果が確認され、100MOI でほぼ全ての細胞が死滅した。TUNEL 法にて、アポトーシスが惹起されていることを確認した。

次に、p53 遺伝子導入による in vivo における治療効果を検討した (図 1)。ヌードマウス皮下腫瘍モデルを用いて、p53 ベクターを Day1 および Day3 に腫瘍内へ局注し、腫瘍サイズを経時的に測定した。コントロール群には LacZ ベクターを投与して腫瘍増殖速度を比較検討した。p53 ベクター投与群において、治療開始後 1 週間以内に増殖が停止し、増殖停止状態は観察した 8 週間持続した。さらに、放射線治療との併用効果を検討した結果、良好な併用効果を確認した (12)。

食道癌 p53 遺伝子治療臨床試験の概要

以上の基礎的検討を踏まえて、2000 年 12 月より食道癌に対する p53 遺伝子治療を開始した。千葉大学医学部附属病院にて実施した進行食道扁平上皮癌に対する p53 遺伝子治療の対象症例は、①切除不能進行食道扁平上皮癌症例であり化学療法や放射線療法に対して抵抗性であることが判明しているかあるいは副作用などにより化学療法や放射線療法が施行不可能な症例、②腫瘍内へ p53 アデノウイルスベクターを直接投与可能であること、③腫瘍の大きさが測定可能であり長径の和が 10cm 以下であること、④年齢は 20 歳以上 80 歳以下であること、⑤ Performance status は 0, 1, 2 であり 3 ヶ月以上生存可能であること、などの条件のすべてを満たす症例である。適応基準を記載した患者紹介状をあらかじめ FAX にて受け付けて、適応症例のスクリーニングを行っている (図 2)。米国における頭頸部癌に対する臨床試験の結果では p53 遺伝子異常に関わらず治療効果を確認したことから、腫瘍における p53 遺伝子異常の有無は問わないこととした。

治療は、内視鏡下、エコーガイド下あるいは CT ガイド下に穿刺針を用いて、腫瘍内へ直接ベクターを局注する (図 3)。ベクター濃度は、米国における頭頸部癌に対する臨床試験により安全性の確認された 2×10^{10} から 1×10^{11} PFU までのベクターを腫瘍の長径に応じて投与する。試験方法は、はじめの 10 例に対して、第 1 日目と第 3 日目の 2 回投与し、28 日目に評価を行い、重篤な副作用を認めない限り最低 2 サイクル施行する。CR、PR または SD と評価され投与継続が有用と判断さ

れる場合には患者さんの希望に従って最長 6 サイクル施行する。10 例中有効例を認めない場合には、第 1 日目、第 3 日目及び第 5 日目の 3 回投与とし、28 日目に評価を行う。主たる評価項目は、安全性、局所の抗腫瘍効果及び生物学的反応であり、それに加えて、生存期間、有効症例の有効期間、QOL などを評価する。

治療に用いるベクター液は、フランスの企業により製造精製され、安全性検査の後凍結状態で空輸され、千葉大学医学部附属病院薬剤部の遺伝子治療用ベクター専用冷凍庫 (-80°C) にて厳重管理されている。治療施行直前に附属病院薬剤部内に設置された P2 調剤室のクラス 2 ベンチ内で希釈する。治療中の患者は、附属病院食道胃腸外科病棟内の遺伝子治療専用病室内に個室隔離管理し、ベクター投与後の喀痰、体液、排泄物などの分泌物は全て塩素系漂白剤で消毒する。本臨床試験計画は、千葉大学医学部附属病院遺伝子治療倫理委員会にて承認され、厚生省ならびに文部省において承認されている。ベクターの安全性に関する審査を 2000 年 5 月に終了し、9 月の治験審査委員会を経て、10 月から症例登録作業を開始した。12 月 19 日より第 1 症例の治療を開始した。食道癌に対しての遺伝子治療としては世界で初めての試みであるため、未知の副作用を考慮して、第 I/II 相臨床試験と位置付けている。現在までに、10 例に対して合計 51 回の遺伝子治療を施行した。

遺伝子治療実施症例の概要 (表 1)

年齢は、48 歳から 78 歳、9 例は男性、1 例が女性であった。前治療として、全症例において、根治的放射線化学療法が施行されている。いずれも、治療に抵抗性あるいは一旦は CR と判定されたが再燃した症例である。UICC 病期では、stage II が 3 例、stage III が 1 例、stage IV が 6 例であった。Exon5-9 における p53 遺伝子変異の有無では、8 例で変異を認めた。観察された有害事象は、10 例全例で発熱を認めた。また、3 例で局所の疼痛を認めた。そのほかには、高血糖、高カルシウム血症、PTT 延長、アミラーゼ高値、クレアチニン高値を認めたがいずれも grade 1 と軽度であり、重篤な副作用を認めていない (表 2)。

症例 1, 2, 3 においては、腫瘍生検組織中に DNA が検出された。また、RNA レベルの上昇が確認された (表 3)。症例ごとの p53, p21, MDM2 遺伝子発現レベルの推移を示したのが図 4 である。大部分の症例で、発現レベルの上昇が確認され、全症例の平均値では、全ての遺伝子発現の上昇と p21/MDM2 発現比率の上昇も確認された。

アデノウイルスに対する抗体価は、全症例で、治療開始と同時に上昇した。また、中和抗体については、症例1, 2, 3において検討した結果、全例で、7日目で上昇を認めた(図5)。

症例2ならびに3の画像を提示する。症例2(図6)は、合計5サイクル10回の治療を実施した。この間、腫瘍は、不変であり、一時的には、扁平上皮癌細胞が検出されない時期もあった。最終的には、全身への血行性転移により治療開始後15ヶ月にて死亡した。症例3(図7)は、放射線治療に全く反応せず、遺伝子治療開始時点では、唾液も通過しない状況であった。遺伝子治療開始後、通過障害が改善し、流動食の経口摂取が可能となった。図8に全10症例の治療開始後の予後を示す。現在1例が3年以上の生存を得ているが、9例は、主として遠隔転移で死亡している。通常、放射線化学療法抵抗性の症例においては、平均的な予後が3から6ヶ月程度であることから、長期間にわたる腫瘍増殖抑制により、延命効果があったものと推測された。

消化管癌に対する世界初の遺伝子治療であることから、バイオハザードについて、詳細な検討を行った。治療後、1日、3日、7日目に継続的に、唾液、喀痰、糞便、血液、尿中のウイルスベクターの存在の有無についてPCRにて検索した。その結果、2例については、合計2回、7日目の糞便中にウイルスベクターのDNAが検出された。それ以外は、ウイルスベクター最終投与日から7日目には全ての生体排泄物のウイルスは消失した。

食道癌遺伝子治療の意義と問題点

食道癌におけるp53遺伝子解析研究から遺伝子治療への臨床応用を実現したということで、今回の遺伝子治療臨床試験の意義は大きいといえる。わが国における食道癌の分子生物学的解析は世界をリードしており、今後種々の診断・治療標的分子が同定される可能性が高い。分子標的に対する治療法として、遺伝子導入技術は重要な基盤技術である。最終評価をまたなければ公式見解とはいえないが、現在のところ重篤な副作用なく臨床試験

が実施されたことより、新しい分子標的に対する遺伝子治療への発展が期待される。

一方、今回の遺伝子治療で用いた非増殖型ウイルスベクターによる遺伝子治療は、ウイルス粒子が感染した腫瘍細胞以外には、効果が少ないため、転移病変やベクター注入局所の周囲の腫瘍細胞への治療を工夫する必要がある。現在、開発が進められている制限増殖型ウイルスは、この問題点に対する回答のひとつであり、腫瘍特異的発現遺伝子プロモーターを用いることで、安全かつ有効な治療となりうるものと期待されている。

今後の展望

今回のp53遺伝子治療は、p53単独治療の効果を検討するものであるが、将来的には、化学療法・放射線療法との併用治療を検討する予定である。また、早期癌に対する遺伝子治療あるいは、局所再発高危険群に対する補助療法として、集学的治療の一翼を担う治療法として臨床応用を検討している(図9)。

このp53遺伝子治療はあくまでも食道癌局所への治療であり、予後を改善するためには、全身に転移した微少癌細胞に対して腫瘍特異的発現プロモーターを用いた新しい遺伝子治療法の開発が望まれる。なかでも、癌細胞特異的発現タンパクとしてミッドカインのプロモーターを用いた遺伝子治療は有望と思われる(13)。また、p53遺伝子の機能を補助する複数の治療遺伝子を併用することで、治療効果を増大することも有望な治療戦略と考えられる(14)。化学療法抵抗性の症例に対する遺伝子治療として、5-FU代謝酵素遺伝子を用いた基礎的検討で良好な治療効果を確認しており、今後の発展が期待される(15)。

謝辞

遺伝子治療臨床研究にご協力いただいた千葉大学医学部附属病院食道胃腸外科のスタッフならびにベクター調整にご協力いただきました中佐啓詳先生をはじめとする薬剤部のスタッフに御礼申し上げます。

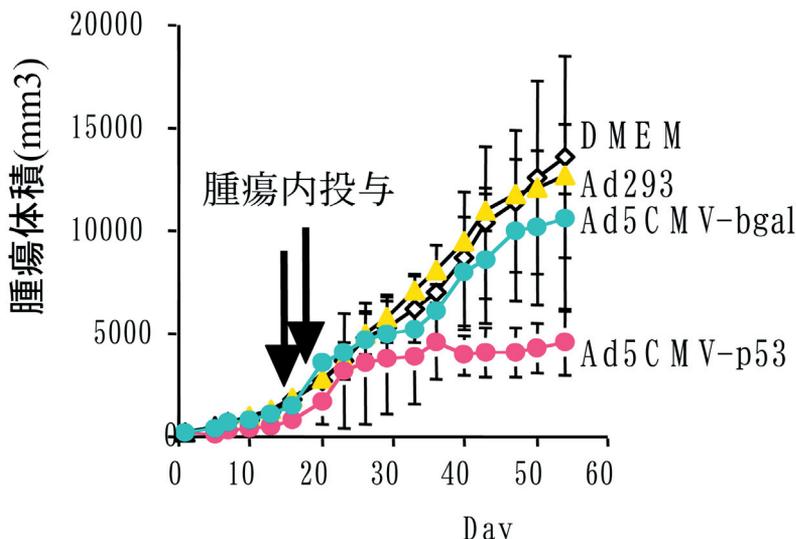


図1. マウスモデルでの食道癌 p53 遺伝子治療の効果

年齢 20歳以上80歳以下 (歳) (生年月日: 西暦 年 月 日)

診断名 進行・再発食道扁平上皮癌非切除例

前治療 切除不能で前治療抵抗性または副作用のため前治療施行不可能

腫瘍部位 内視鏡もしくは超音波ガイド下に腫瘍生検・腫瘍内投与可能

腫瘍径を画像検査により評価可能

病変の長径の和が10cm以下

PS/予後 PS0, 1, 2のいずれかである。

治療開始後12週間以上の生存が期待される

臨床検査

好中球>1500/mm³

血小板>100000/mm³

ヘモグロビン>8g/dl

総ビリルビン: 正常上限の1.5倍以下

AST/GOT、ALT/GPT: 正常上限の2倍以下

アルカリフォスファターゼ: 正常上限の5倍以下

クレアチニン<1.5mg/ml

PT及びPTT: 正常範囲

除外基準

腹部食道癌

コントロール不可能な活動性感染症、重篤な併発疾患

4週間以内に化学療法、放射線療法、レーザー照射またはステント挿入を施行

6週間以内にニトロソウレア系製剤またはマイトマイシンCを使用

非局所的副腎皮質ステロイドを併用している

(用量: プレドニゾン相当 mg/day; 投与期間 ヶ月)

4週間以内に未承認の臨床試験に参加している

食道癌以外の同時性、異時性悪性腫瘍がある (無病期間: 年以上)

試験実施計画書の遵守及び試験でのフォローアップが不可能である

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入歴がある

自家もしくは同種臓器、組織移植歴がある

HIV-1, HIV-2, HBV 及び HCV が陽性である

図2. 食道癌 p53 遺伝子治療の適応基準

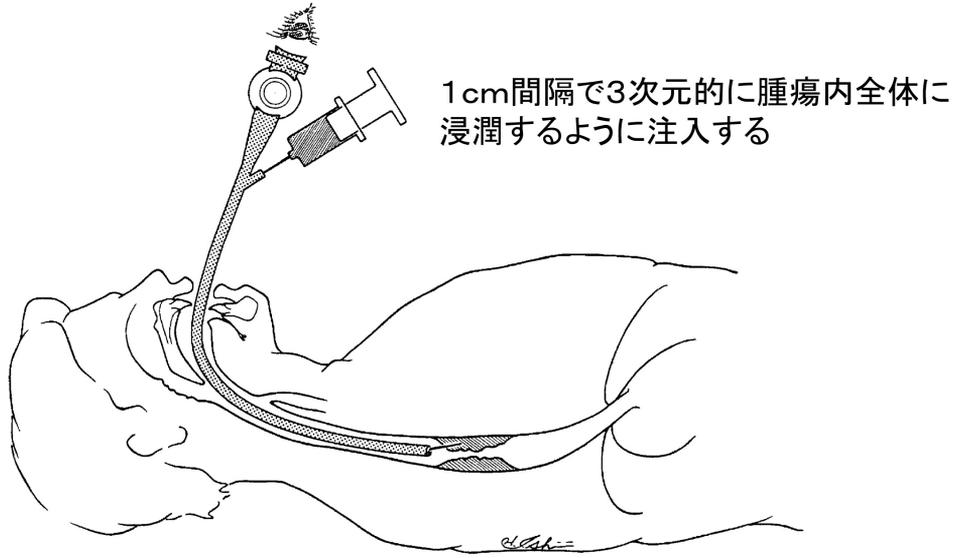


図3. 内視鏡下あるいは経皮的に腫瘍内へベクター局所注入

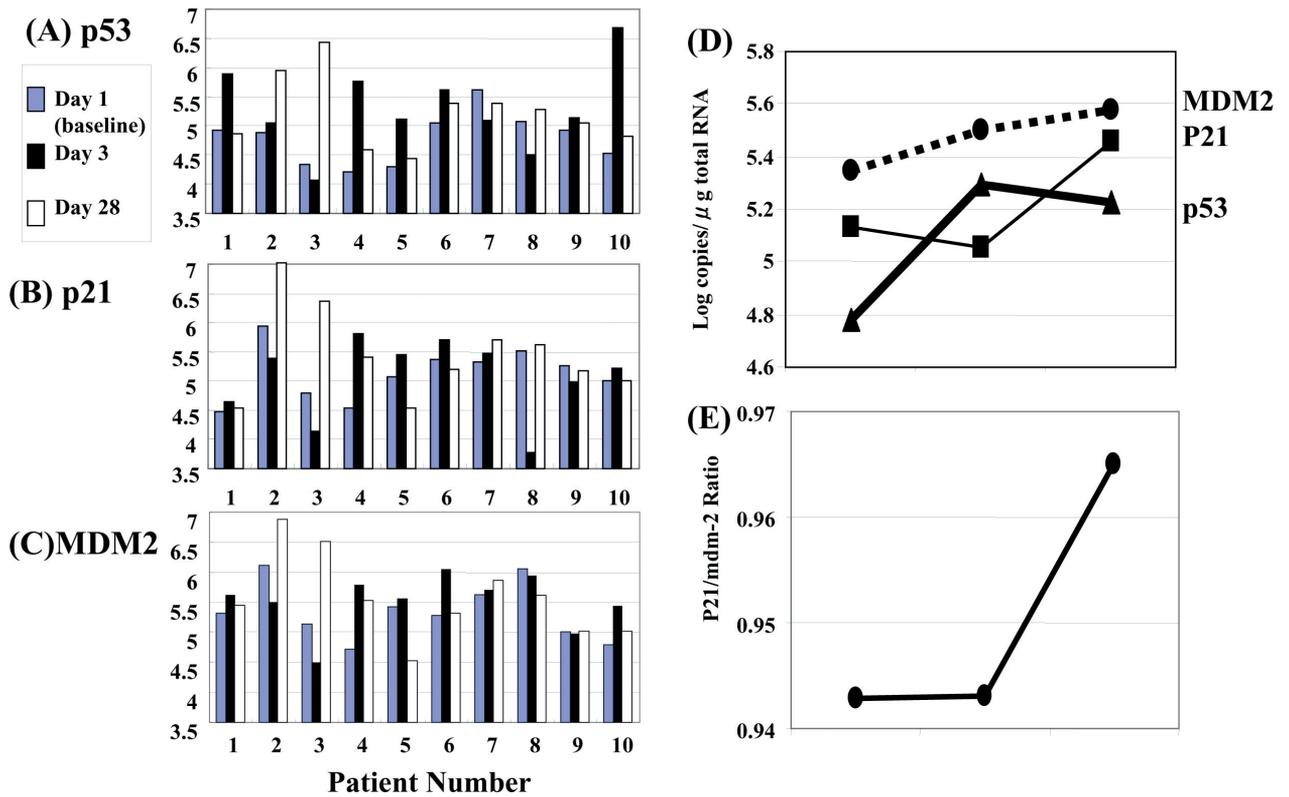


図4. 腫瘍局所における p53、p21、MDM2 遺伝子発現レベルの推移

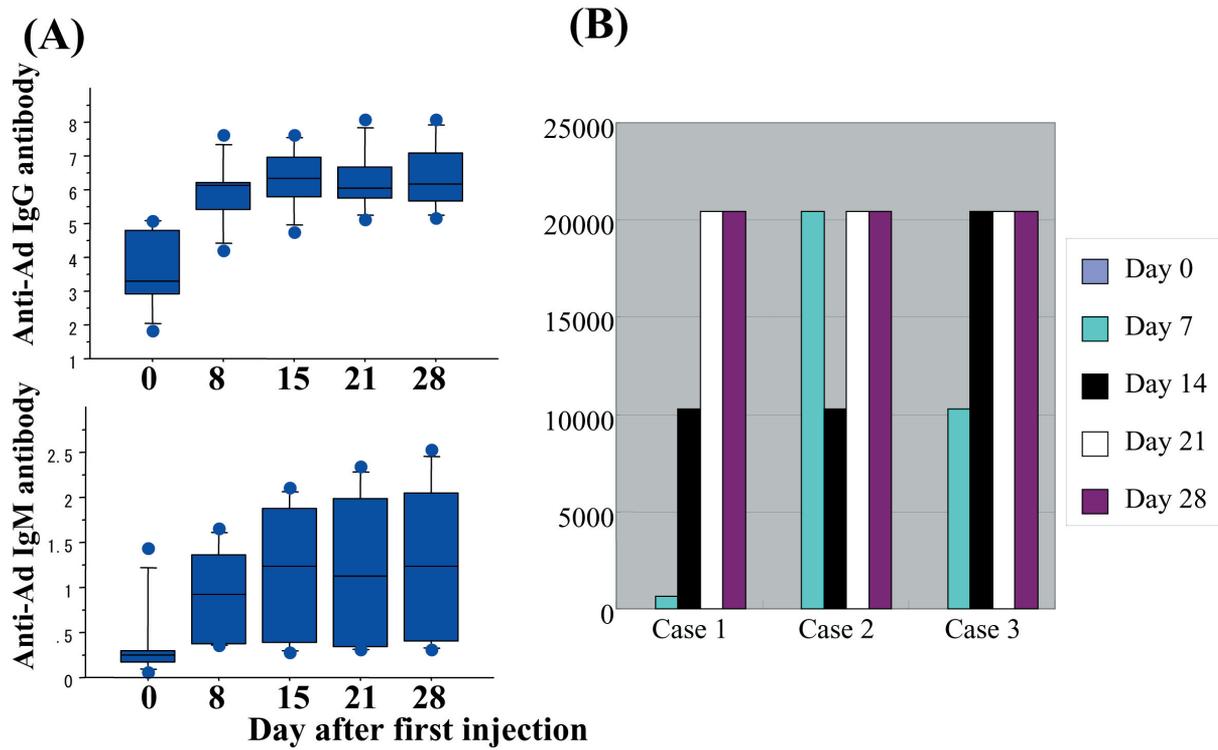


図5. (A) 抗アデノウイルス抗体価の推移 (B) 抗アデノウイルス中和抗体価の推移

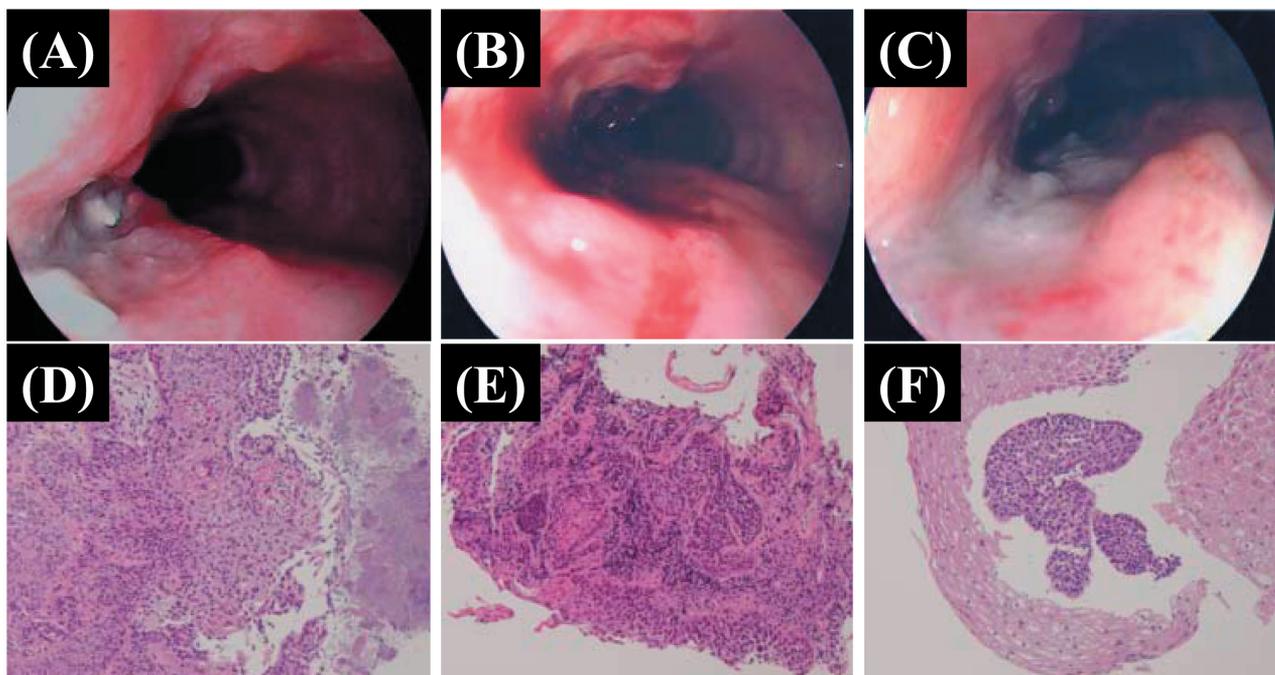


図6. 症例2における内視鏡所見ならびに組織所見の変化

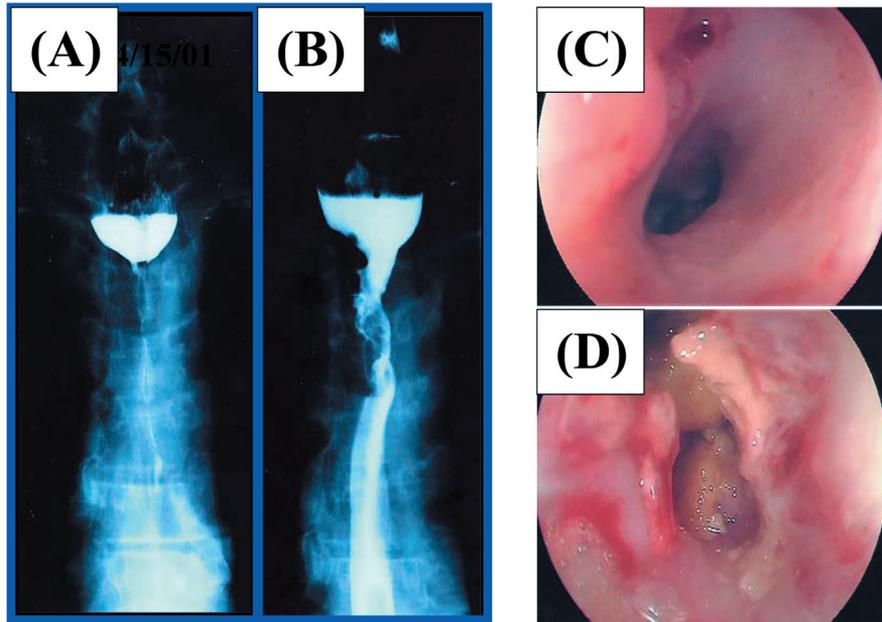


図7. 症例3における食道造影ならびに内視鏡所見の変化

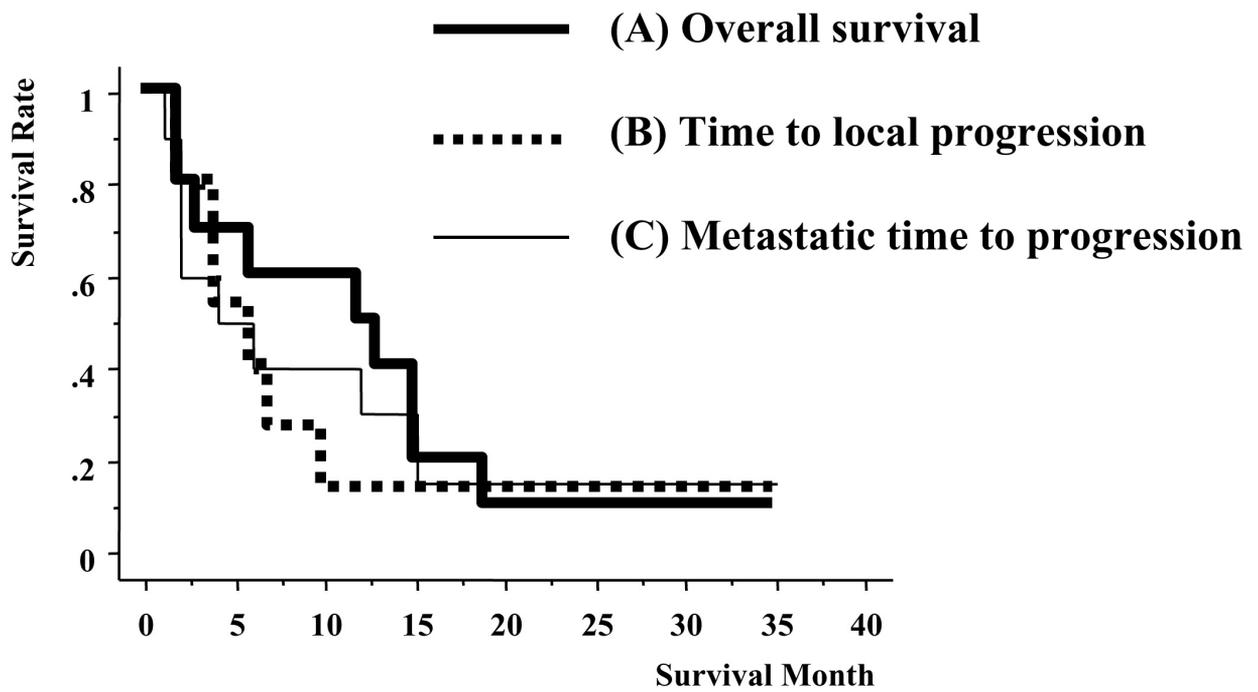


図8. 遺伝子治療開始後の予後

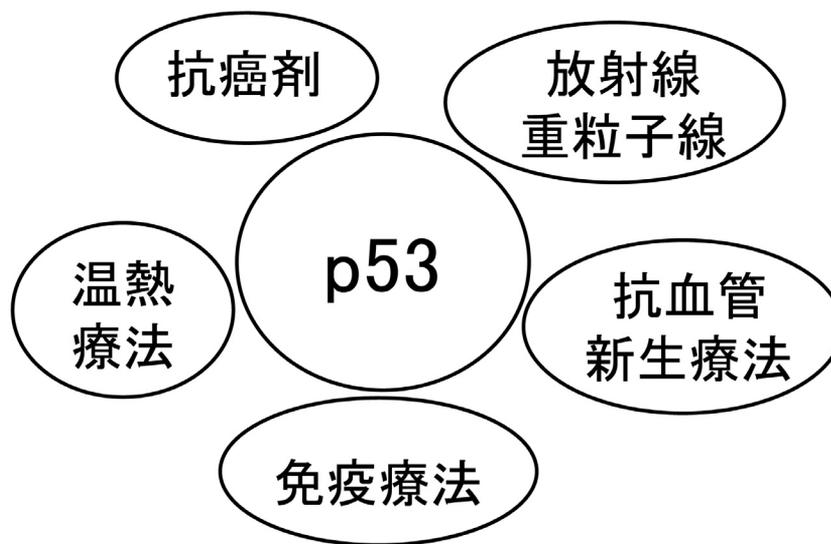


図9. p53 遺伝子治療を併用した集学的治療法

表1. p53 遺伝子治療実施症例の概要

| Patient No. | Age & Gender | Time to Tumor Progression ^a | UICC Stage | Injection Site ^b | Site of p53 Mutation | Viral Particles | Treatment Cycles | Tumor Size | Local & Overall Response ^e | Prognosis after GT ^f |
|-------------|--------------|--|------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 64M | 7M | IIB | E | Exon 5 | 15 x 10 ¹¹ | 2 | 43mm | SD & SD | 19M dead |
| 2 | 71M | 7M | III | E | Exon 7 | 10 x 10 ¹¹ | 5 | 25mm | SD & SD | 15M dead |
| 3 | 62M | 5M | IVA | E | Negative ^c | 15 x 10 ¹¹ | 3 | 50mm | SD & PD | 3M dead |
| 4 | 78M | 2M | IVA | E | Exon 8 | 10 x 10 ¹¹ | 2 | 30mm | PD & PD | 6M dead |
| 5 | 66M | 2M | IIA | E | Exon 7 | 10 x 10 ¹¹ | 3 | 40mm | SD & SD | 35M alive |
| 6 | 60M | 1M | IIVB | E | Exon 7 | 20 x 10 ¹¹ | 1 | 70mm | SD & PD | 2M dead |
| 7 | 67F | 4M | IVA | E+N | Exon 5 | 10 x 10 ¹¹ | 2 | 38mm ^d | SD & SD | 13M dead |
| 8 | 58M | 8M | IIA | E | Exon 6 | 10 x 10 ¹¹ | 2 | 40mm | SD & SD | 15M dead |
| 9 | 48M | 2M | IVA | E | Exon 7 | 25 x 10 ¹¹ | 4 | 100mm | SD & SD | 12M dead |
| 10 | 77M | 12M | IVA | N | Negative ^c | 20 x 10 ¹¹ | 2 | 68mm | SD & PD | 2M dead |

a. Time to tumor progression after completion of chemo-radiation therapy.

b. Location of tumor injected Ad.CMV-p53. E, esophageal tumor. N, lymph node.

c. No mutation among exon 5, 6, 7 and 8.

d. Tumor size was sum of esophageal tumor and lymph node.

e. Treatment response was determined 4 weeks after completion of therapy by external review board.

SD, stable disease; PD, progressive disease.

f. Survival months after first injection of Ad.CMV-p53.

表 2. 10 症例において観察された有害事象

| Adverse events | Grade 1 | Grade 2 | Grade 3 | Grade 4 | Total |
|----------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| Fever | 1 (10%) | 9(90%) | 0 | 0 | 10(100%) |
| Pain | 1 (10%) | 2(20%) | 0 | 0 | 3(30%) |
| Hyperglycemia | 3(30%) | 0 | 0 | 0 | 3(30%) |
| Hypocalcemia | 2(20%) | 0 | 0 | 0 | 2(20%) |
| PTT elongation | 1(10%) | 0 | 0 | 0 | 1(10%) |
| Amylase | 1(10%) | 0 | 0 | 0 | 1(10%) |
| Creatinine | 1(10%) | 0 | 0 | 0 | 1(10%) |

表 3. 生検標本で検出されたベクター由来 p53DNA と RNA レベル

| Patient No. | SCC ^a Day 28 | p53 DNA Day 3 | Quantity /10 ⁵ gene copies | p53 mRNA Log copies/ μ g total RNA ^c | |
|-------------|----------------------------|------------------|--|---|----------------------------|
| | | | | Preinjection ^d | Postinjection ^e |
| 1 | Positive | Positive | 2.60x10 ⁴ | 4.93 | 5.88 |
| 2 | Negative | Positive | 3.74x10 ⁴ | 4.88 | 5.05 |
| 3 | Negative | Positive | 1.73x10 ⁵ | 4.33 | 4.07 |
| 4 | Positive | Positive | NA ^b | 4.21 | 5.77 |
| 5 | Negative | Positive | NA | 4.29 | 5.11 |
| 6 | Positive | Positive | NA | 5.06 | 5.62 |
| 7 | Positive | Positive | NA | 5.61 | 5.10 |
| 8 | Positive | Positive | NA | 5.07 | 4.51 |
| 9 | Positive | Positive | NA | 4.93 | 5.13 |
| 10 | Positive | Positive | NA | 4.53 | 6.68 |

a. SCC, squamous cell carcinoma.

b. NA, not applicable.

c. Values represent the mean of duplicate samples.

d. Preinjection samples were obtained just before first injection.

e. Postinjection samples were obtained on day 3 just before second injection.

文 献

1. Nakayama K. Concentrated preoperative irradiation therapy. *Arch of Surgery*. 87: 796-811, 1963.
2. Isono K, Sato H, Nakayama K. Results of a nationwide study on the three-field lymph node dissection of esophageal cancer. *Oncology*. 48: 411-420, 1991.
3. Hollstein MC, Metcalf RA, Welsh JA, Montesano R, Harris CC. Frequent mutation of the p53 gene in human esophageal cancer. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 87:9958-9961,1990.
4. Sarbia M, Porshen R, Borchard F, Horstmann O, Willers R, Gabbert HE. p53 protein expression and prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer*. 74: 2218-2223, 1994.
5. Kobayashi S, Koide Y, Endo M, Isono K, Ochiai T. The p53 gene mutation is of prognostic value in esophageal squamous cell carcinoma patients in unified stages of curability. *Am J Surgery*. 177: 497-502, 1999.
6. Matsubara H, Kimura M, Sugaya M, Koide Y, Gunji Y, Takenaga K, Asano T, Ochiai T, Isono K, Sakiyama S, Tagawa M. Expression of wild-type p53 gene confers increased sensitivity to radiation and chemotherapeutic agents in human esophageal carcinoma cells. *Int J Oncology*. 14:1081-1085, 1999.
7. Shimada H, Shimizu T, Ochiai T, Liu TL, Sashiyama H, Nakamura A, Matsubara H, Gunji Y, Kobayashi S, Tagawa M, Sakiyama S, Hiwasa T. Preclinical study of p53 gene therapy for esophageal cancer. *Surgery Today*. 31:597-604, 2001.
8. Oota M, Takeda A, Shimada H et al. Prognostic significance of thymidine phosphorylase and p53 co-expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*. 9: 23-28, 2002.
9. Shimada H, Nabeya Y, Okazumi S, Matsubara H, Funami Y, Shiratori T, Hayashi H, Takeda A, Ochiai T. Prognostic significance of serum p53 antibody in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Surgery*. 132:41-47, 2003.
10. Shimada H, Okazumi S, Takeda A, Nabeya Y, Matsubara H, Funami Y, Hayashi H, Gunji Y, Suzuki T, Ochiai T. Presence of serum p53 antibodies is associated with decreased in vitro chemosensitivity in patients with esophageal cancer. *Surg Today*. 31:591-596, 2001.
11. Zhang WW, Alemany R, Wang J, Koch PE, Ordenoz NG, Roth JA. Safety evaluation of Ad5CMV-p53 in vitro and in vivo. *Human Gene Ther*. 6: 155-164, 1995.
12. 平成 14 年度放射線医学総合研究所重粒子線がん治療装置等共同研究報告書 .
13. Miyauchi M, Shimada H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Matsubara S, Ikematsu S, Takenaga K, Asano T, Ochiai T, Sakiyama S, Tagawa M. 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.
14. Shimada H, Hiwasa T, Ochiai T et al. Stimulation of adenoviral wild-type p53-induced apoptotic cell death by overexpression of p33ING1 in T.Tn human esophageal carcinoma cells: possible involvement of MDM2. *Oncogene*. 21:552-557, 2002.
15. Shimizu T, Shimada H, Ochiai T, Hamada H. Enhanced growth suppression in esophageal carcinoma cells using adenovirus-mediated fusion gene transfer (uracil phosphoribosyl transferase and herpes simpley virus thymidine kinase.) *Cancer Gene Therapy*. 8:512-521, 2001.