

REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクターを用いた悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療

豊岡 伸一

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 臨床遺伝子医療学

キーワード：悪性胸膜中皮腫, REIC/DKK-3, 遺伝子治療

Gene therapy using REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector for the treatment of malignant pleural mesothelioma

Shinichi Toyooka

Clinical Genomic Medicine, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒言

悪性胸膜中皮腫は、中皮由来の悪性腫瘍であり、アスベストの曝露が主な危険因子である。アスベスト曝露から発症まで約20~40年の潜伏期間があると言われている¹⁾。米国では早期のアスベスト規制の結果、すでに2004年をピークに悪性胸膜中皮腫の患者数、死亡数とも減少傾向に向かっている²⁾。一方、我が国では規制の遅れ、予想では2025年頃にピークに達するといわれている。

腫瘍の特性としては胸壁側の胸膜あるいは胸膜下組織から発生し、胸腔内、胸壁に進展する局所浸潤性が強い腫瘍である。横隔膜を超えて腹腔側にも進展することもある。胸腔内には胸水が貯留し、また胸壁、肺に広範囲に浸潤すると呼吸機能の低下を来し、呼吸困難感で発見されることか多い。また、局所浸潤のみでなくリンパ節転移、血行性転移を来すこともある。

悪性胸膜中皮腫に対する標準的な治療としては、病期Ⅱ期までの症例では外科切除も考慮されるが、根治手術が施行され、かつ根治となる症例は極めて限られている。そのため、化学療法としてペメトレキセドとシスプラチンによる抗癌剤の投与が適応となることが多いがその成績は1年生存期間中央値12.1ヵ月と満足いくものではなく³⁾、新しい治療法の開発が望まれている。このような中、以前より岡山大学病院の泌尿器

科において、前立腺癌に対し *REIC/Dkk-3* 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-REIC) を用いた遺伝子治療が第Ⅰ/Ⅱ相試験として行われている。さらに、前臨床研究の結果、Ad-REIC が悪性胸膜中皮腫においても効果を示すことが報告されており、実際にヒトに対する Ad-REIC による遺伝子治療の開発を目指して臨床研究を計画した。本稿では悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療の現状と今回計画した Ad-REIC による遺伝子治療の概略について紹介する。

悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療の現状

悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療は世界的に見てもあまり類をみない。現在まで報告のある悪性胸膜中皮腫に対する遺伝子治療として、米国からはペンシルベニア大学において herpes simplex virus-thymidine kinase (HSV-tk) を組み込んだアデノウイルスベクターの胸腔内投与とガンシクロピルの全身投与を組み合わせた自殺遺伝子治療、Interferon- β 、Interferon- α を組み込んだアデノウイルスベクター胸腔内投与による遺伝子治療が報告されている^{4,7)}。また、オーストラリアから西オーストラリア大学での Interleukin-2 を組み込んだワクシニアウイルスベクターによる腫瘍内投与の遺伝子治療が報告されている⁸⁾。しかしながら、いずれの試験においても明らかな腫瘍サイズの縮小、有意な予後改善効果には至っていないのが現状である。

REIC 遺伝子と Ad-REIC の癌に対する効果

がん抑制遺伝子である *REIC/Dickkopf-3* (以下 REIC) は、2000年にヒト正常線維芽細胞の不死化に伴

平成26年12月受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7436 FAX：086-235-7437

E-mail：toyooka@md.okayama-u.ac.jp

って発現が減弱する遺伝子として岡山大学で同定された遺伝子である⁹⁾。REIC 遺伝子からの産物である REIC タンパク質は正常細胞では発現しているが、様々な悪性腫瘍で DNA のメチル化などにより発現が低下していることが報告されている¹⁰⁻¹³⁾。REIC は Wnt 受容体を介した Wnt シグナルを阻害することでアポトーシスの誘導、転移の抑制に関係することが知られている。また、Ad-REIC による癌におけるアポトーシスの誘導には、REIC タンパク質の過剰発現により小胞体ストレスが引き起こされ、小胞体ストレスは JNK の活性化を誘導し、アポトーシスに至ることが報告されている¹³⁾。さらに Ad-REIC の局所腫瘍内投与は直接作用による細胞死の結果生じるがん抗原の樹状細胞様細胞への取込みによる特異的腫瘍免疫が誘導されること¹⁴⁾、また、腫瘍組織内間質細胞などからの Interleukin-7 の産生による NK 細胞活性化が惹起されることから¹⁵⁾、抗腫瘍免疫の賦活化の結果、局所がん病巣のみならず遠隔転移病巣への治療効果が in vivo の実験で示されている¹⁶⁾。これらの Ad-REIC の効果について図 1 にまとめた。

Ad-REIC 遺伝子治療における症例の選択基準

症例の選択基準のうち、主な適格基準として

- ① 病理学的に悪性胸膜中皮腫であることが確認されている患者

- ② ペメトレキセドを含む全身化学療法による治療を受けたことのある患者
- ③ 画像診断により同定可能な腫瘍性病変を有している患者
- ④ 同意取得時点の年齢が20歳以上75歳未満の患者
- ⑤ Performance Status (ECOG PS score を用いる) 0～1 の患者
- ⑥ 症例登録日から少なくとも12週以上の生存が期待できる患者
- ⑦ 主要臓器の機能が保持されている患者(検査値の規定は以下の通りである)
 - ・ヘモグロビン量：9.0 g / dL以上
 - ・白血球数：3,000/mm³以上，又は 好中球数：2,000/mm³以上
 - ・血小板数：10万 /mm³以上
 - ・AST 及び ALT：各実施医療機関の基準値上限の2.5倍以下
 - ・総ビリルビン：各実施医療機関の基準値上限の1.5倍以下
 - ・血清クレアチニン：1.5mg / dL未満
 - ・大気吸入下での SpO₂ (又は PaO₂)：92%以上 (PaO₂：60mmHg 以上)

を定めている。原則として、他に治療法がないが登録時点では全身状態は比較的良好である程度予後も期待できる症例としている。

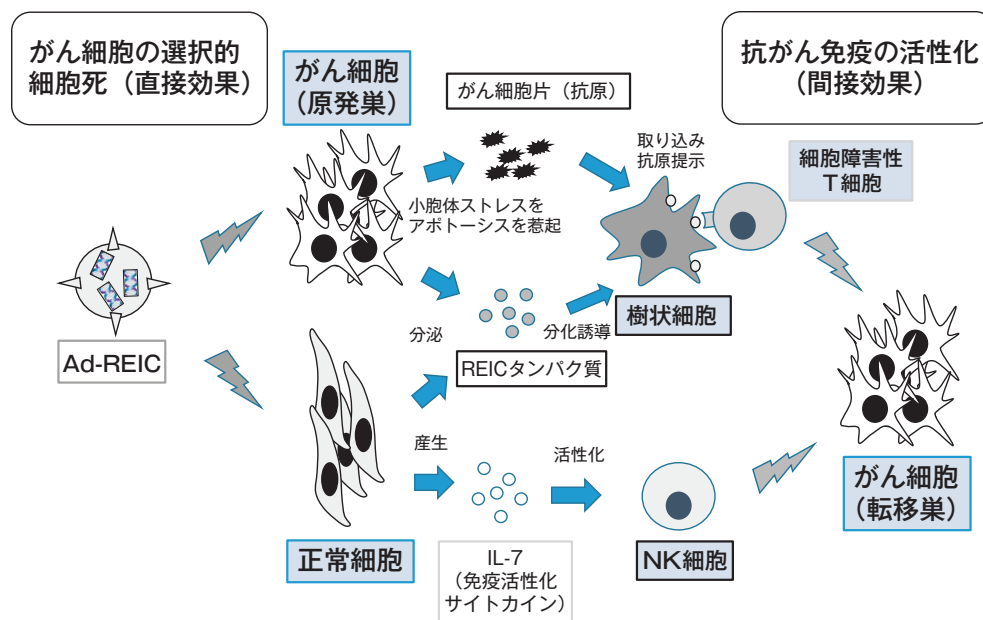


図 1 REIC/Dkk-3 遺伝子発現アデノウイルスベクター (Ad-REIC) の抗腫瘍効果

次に主な除外基準として

- ① 重度又はコントロールが困難な全身疾患の合併を有する患者
- ② 活動性感染症を有する患者
- ③ 活動性の重複がんを有する患者
- ④ 有症状の脳転移がある患者又は治療を必要とする脳転移がある患者
- ⑤ 胸部単純X線にて、明らかな間質性肺炎、肺線維症を有する患者
- ⑥ 胸膜肺全摘手術施行後に再発した悪性胸膜中皮腫患者
- ⑦ CT 上、治療を必要とする心嚢水を有する患者を規定している。これらにより安全に臨床研究が施行可能であることを担保している。

研究の目的とデザイン

Ad-REIC の局所投与による副作用の評価、Ad-REIC の最大耐量を決定し、効果も評価することを目的とする第 I / II 相試験である。開始投与量を 3.0×10^{10} viral particle (vp) とし、1 レベル毎に約 3 倍ずつ増量し、最大 3.0×10^{12} vp に至る 5 レベルの治療群を設定する (表 1)。各用量レベルでそれぞれ 3 人の被験者を評価し、有害事象が発生しなければ逐次用量レベルを引き上げる。ただし、有害事象によっては、安全・効果評価・適応判定部会における検討結果に従い、症例数を追加して同一用量で検討するか、試験を中止するかを判断する。最大耐量では 3 人に投与して問題がなければさらに 3 人、計 6 人の被験者で評価する。各用量レベルでの安全性の検討を行った後、治療効果を継続して観察し安全性ならびに治療効果を評価する。

Ad-REIC の投与と評価

上述したように、悪性胸膜中皮腫患者には胸水貯留が認められることが多い。そのため、投与方法としては Ad-REIC 製剤を胸腔内に注入する経路が考えられる。

表 1 各レベルにおける投与 Ad-REIC 量

段階	投与 Ad-REIC (virus particle)
レベル 1	3.0×10^{10}
レベル 2	1.0×10^{11}
レベル 3	3.0×10^{11}
レベル 4	1.0×10^{12}
レベル 5	3.0×10^{12}

具体的には CT ガイド下に胸水貯留を認める胸腔内にカテーテルチューブを挿入し、カテーテルチューブから可能な限り胸水を排出したのち、50ml の生理的食塩水に溶解したアデノウイルスベクターを注入する。また、胸水貯留があまり顕著でない場合など症例によっては直接、腫瘍自体に CT ガイド下に 1 ~ 2 ml のアデノウイルスベクター溶液を注入することを予定している。

治療後は Ad-REIC 治療の安全性ならびに効果についての総合評価を安全・効果評価・適応判定部会において行う。また、効果判定に関し、通常の胸部 CT や PET-CT による画像評価を行うが、効果に関連する可能性があるバイオマーカーの探索として Mesothelin や IFN- γ 、IL-2、NK 細胞活性、IL-7 などの発現レベルを血液、胸水などで解析する予定である。

おわりに

悪性胸膜中皮腫に対する有効な治療法が限られている中、新しい治療法への挑戦として本研究は計画された。有効な治療法が極めて限られている悪性胸膜中皮腫に対する新しい治療法確立の試みは、遺伝子治療も含め様々な側面から、今後も推し進められるべきである。今回の臨床研究の結果、安全性と有効性が確認できれば、さらに先の臨床試験フェーズを実施し、治療薬としてのエビデンスを積み重ねている必要がある。また、上述したように REIC 遺伝子は岡山大学で発見された遺伝子であり、アカデミア発のシーズを育成し実臨床につなげることは昨今、大学に求められている橋渡し研究そのものを体現している。本臨床研究は橋渡し研究加速ネットワークプログラム事業と臨床研究中核病院事業に選定された岡山大学での研究プロジェクトのモデルとなるよう取り組んでいきたい。

文 献

- 1) Robinson B, Musk A, Lake R : Malignant Mesothelioma. Lancet (2005) 366, 397-408.
- 2) Robinson B, Lake R : Advances in Malignant Mesothelioma. N Engl J Med (2010) 353, 1591-1603.
- 3) Vogelzang N, Rusthoven J, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, Manegold C, Niyikiza C, Paoletti P : Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin alone With Malignant Pleural Mesothelioma. J Clin Oncol (2003) 21, 2636-2644.
- 4) Stermann DH, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung L, DeLong P, Amin KM, Litzky LA, Wilson JM, Kaiser LR,

- Albelda SM : Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* (2005) 11, 7444-7453.
- 5) Sterman DH, Recio A, Carroll RG, Gillespie CT, Haas A, Vachani A, Kapoor V, Sun J, Hodinka R, Brown JL, Corbley MJ, Parr M, et al. : A phase I clinical trial of single-dose intrapleural IFN-beta gene transfer for malignant pleural mesothelioma and metastatic pleural effusions : high rate of antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* (2007) 13, 4456-4466.
 - 6) Sterman DH, Recio A, Haas AR, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT, Cheng G, Sun J, Moon E, Pereira L, Wang X, Heitjan DF, et al. : A phase I trial of repeated intrapleural adenoviral-mediated interferon-beta gene transfer for mesothelioma and metastatic pleural effusions. *Mol Ther* (2010) 18, 852-860.
 - 7) Sterman DH, Haas A, Moon E, Recio A, Schwed D, Vachani A, Katz SI, Gillespie CT, Cheng G, Sun J, Papasavvas E, Montaner LJ, et al. : A trial of intrapleural adenoviral-mediated Interferon-alpha2b gene transfer for malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med* (2011) 184, 1395-1399.
 - 8) Mukherjee S, Haenel T, Himbeck R, Scott B, Ramshaw I, Lake RA, Harnett G, Phillips P, Morey S, Smith D, Davidson JA, Musk AW, et al. : Replication-restricted vaccinia as a cytokine gene therapy vector in cancer : persistent transgene expression despite antibody generation. *Cancer Gene Ther* (2000) 7, 663-670.
 - 9) Tsuji T, Miyazaki M, Sakaguchi M, Inoue Y, Namba M : A REIC gene shows down-regulation in human immortalized cells and human tumor-derived cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 268, 20-24.
 - 10) Tsuji T, Nozaki I, Miyazaki M, Sakaguchi M, Pu H, Hamazaki Y, Iijima O, Namba M : Antiproliferative activity of REIC/Dkk-3 and its significant down-regulation in non-small-cell lung carcinomas. *Biochem Biophys Res Commun* (2001) 289, 257-263.
 - 11) Kurose K, Sakaguchi M, Nasu Y, Ebara S, Kaku H, Kariyama R, Arao Y, Miyazaki M, Tsushima T, Namba M, Kumon H, Huh NH : Decreased expression of REIC/Dkk-3 in human renal clear cell carcinoma. *J Urol* (2004) 171, 1314-1318.
 - 12) Hayashi T, Asano H, Toyooka S, Tsukuda K, Soh J, Shien T, Taira N, Maki Y, Tanaka N, Doihara H, Nasu Y, Huh NH, et al. : DNA methylation status of REIC/Dkk-3 gene in human malignancies. *J Cancer Res Clin Oncol* (2012) 138, 799-809.
 - 13) Abarzua F, Sakaguchi M, Takaishi M, Nasu Y, Kurose K, Ebara S, Miyazaki M, Namba M, Kumon H, Huh NH : Adenovirus-mediated overexpression of REIC/Dkk-3 selectively induces apoptosis in human prostate cancer cells through activation of c-Jun-NH2-kinase. *Cancer Res* (2005) 65, 9617-9622.
 - 14) Sakaguchi M, Kataoka K, Abarzua F, Tanimoto R, Watanabe M, Murata H, Than SS, Kurose K, Kashiwakura Y, Ochiai K, Nasu Y, Kumon H, et al. : Overexpression of REIC/Dkk-3 in normal fibroblasts suppresses tumor growth via induction of interleukin-7. *J Biol Chem* (2005) 284, 14236-14244.
 - 15) Watanabe M, Kashiwakura Y, Huang P, Ochiai K, Futami J, Li SA, Takaoka M, Nasu Y, Sakaguchi M, Huh NH, Kumon H : Immunological aspects of REIC/Dkk-3 in monocyte differentiation and tumor regression. *Int J Oncol* (2009) 34, 657-663.
 - 16) Edamura K, Nasu Y, Takaishi M, Kobayashi T, Abarzua F, Sakaguchi M, Kashiwakura Y, Ebara S, Saika T, Watanabe M, Huh NH, Kumon H : Adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene transfer inhibits tumor growth and metastasis in an orthotopic prostate cancer model. *Cancer Gene Ther* (2007) 14, 765-772.