

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 臨床研究・治験推進研究事業

(英語) Project Promoting Clinical Trials for Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 難治性固形癌に対する腫瘍選択的融解ウイルス Telomelysin を用いた放射線併用ウイルス療法の臨床研究

(英語) Clinical study of endoscopic intratumoral administration of Telomelysin, a novel telomerase-specific oncolytic virus, with radiation for intractable human cancer

研究開発担当者 (日本語) 大学院医歯薬学総合研究科・教授 藤原俊義

所属 役職 氏名： (英語) Toshiyoshi Fujiwara, Professor & Chairman, Department of Gastroenterological Surgery, Okayama university Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

進行食道癌および頭頸部癌に対する標準治療は未だ確立されておらず、嚥下機能や呼吸機能への影響や合併症を有する高齢患者が多いことから、現行の広域リンパ節郭清を伴う外科切除や放射線化学療法が困難な症例が増えてきている。多くの場合、経口摂取が不能となり生活の質（QOL）の低下は極めて重篤であるが、副作用の少ない分子標的薬剤や抗体医薬品などの新規抗がん医薬品の適応も得られていないため、何らかの新しい有効な治療法の開発が望まれている。

Telomelysin（OBP-301）は岡山大学で開発された国産の抗がんアデノウイルス製剤であり、がん細胞のみで選択的に増殖して腫瘍融解を引き起す（Kawashima et al, *Clin. Cancer Res.*, 2004; Kishimoto et al, *Nature Med.*, 2006）。ヒトへの Telomelysin 局所投与の安全性は、米国食品医薬品局（US FDA）の承認のもと、2006 年より米国で実施した各種固形がんに対する第 I 相臨床試験で実証されており（Nemunaitis et al, *Mol. Ther.*, 2010）、他の治療との併用による集学的治療としての開発が待たれている。また、Telomelysin のアデノウイルス由来の E1B55kDa 蛋白質が、放射線によるがん細胞の二重鎖 DNA 障害により誘導される Mre11/Rad50/NBS1（MRN）蛋白質複合体を分解することで DNA 修復を阻害し、放射線感受性を飛躍的に増強することを証明されている（Kuroda et al, *Cancer Res.*, 2010）。

これらの非臨床 POC および第 I 相臨床試験結果に基づき、当該研究では難治性固形がんである進行食道癌および頭頸部癌患者を対象に、臨床研究として Telomelysin の内視鏡的腫瘍内投与と放射線治療の併用の安全性および臨床効果を検討するとともに、生検あるいは切除標本を分子生物学的に解析して薬剤感受性を予測するバイオマーカーを探索することを目的とする。

平成 25 年 11 月 29 日に、第 1 例目として 82 歳の胸部食道癌の女性の治療を開始し、53～92 歳の食道癌患者 7 例の治療を行った。各症例の安全性および臨床的・組織学的効果を総合的に解析・検討した結果、「リンパ球減少が無症候性で、他の有害事象を併発していない限り、治療の休止は不要である」と実施計画書の一部変更を申請し、岡山大学病院 遺伝子治療臨床研究審査専門委員会および厚生科学審議会（科学技術部会遺伝子治療臨床研究に関する審査委員会）でレベル 2（ 1×10^{11} vp；中用量）への移行とともに承認された。中間評価の指導に従い、本年 2 月に委託先の台湾 DCB（Development Center for Biotechnology）/Testing Facility for Biological Safety（TFBS）からの薬理動態ドラフトデータの報告を待って、レベル 2 での患者リクルートを開始した。

平成 28 年度は、7 月 1 日、第 8 例目（レベル 2、1 例目）の被験者として、高齢のため外科手術は困難で標準的な化学療法も難しい 89 歳男性の食道癌患者（扁平上皮癌、cT1bN0M0 Stage I）の治療を開始し、大きな有害事象なく 8 月 17 日に予定通り治療を完遂した。また、第 9 例目（レベル 2、2 例目）は、74 歳男性の食道癌患者（扁平上皮癌、cT1bN0M0 Stage I）で、神経疾患（線状体黒質変性症によるパーキンソン病）のため外科手術や標準的な化学療法は困難と判断された。平成 28 年 8 月 26 日より治療を開始し、10 月 14 日に終了したが、やはり重篤な有害事象は認められなかった。さらに、第 10 例目（レベル 2、3 例目）の被験者として、85 歳男性の食道癌患者（扁平上皮癌、cT1bN0M0 Stage I）を登録し、11 月 11 日からウイルス投与が実施されており、12 月 27 日に治療が終了した。治療期間を通して Grade 3 以上の重篤な副作用はみられず、血液系の副作用も Grade 4 は観察されなかったことから、レベル 2 においても本治療と明らかな因果関係を有する用量制限毒性（Dose-Limiting Toxicity; DLT）は認められなかった。

以上の経過より、レベル 2 での Telomelysin の安全性は確認されたものと考えており、実施計画書に基づき、レベル 3（ 10×10^{12} vp）の Telomelysin 投与を 6 名の被験者に予定する。

Telomerase activation is considered to be a critical step in carcinogenesis and its activity is closely correlated with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression. We constructed an adenovirus 5 vector Telomelysin (OBP-301), in which the hTERT promoter drives expression of E1A and E1B genes. Telomelysin causes selective replication and lysis of a variety of human cancer cells, and also inhibits the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks, leading to radiosensitization. A phase I study has confirmed the safety and biological activity of intratumoral administration of Telomelysin alone in patients with advanced solid tumors in the United States. To further determine the feasibility, efficacy, and pharmacokinetics of Telomelysin in combination with radiotherapy, a clinical study was designed in patients with esophageal cancer.

Patients with histologically confirmed esophageal cancer who were not eligible for standard treatments such as surgery and chemotherapy were enrolled into this study (UMIN000010158). Study treatment consisted of intratumoral needle injections of Telomelysin on days 1, 18, and 32 of treatment. Radiation therapy was administered concurrently over 6 weeks, beginning on day 4, to a total of up to 60 Gy. Virus administration was performed by intratumoral injection of the primary or metastatic tumor through a flexible endoscope. Telomelysin doses will be escalated initially in cohorts of two for the first 6 patients (1×10^{10} and 1×10^{11} virus particles [vp]). Six subsequent patients will receive the highest dose (1×10^{12} vp). Virus shedding will be monitored in the saliva, sputum, urine, and plasma by a quantitative DNA-PCR assay.

Seven and three patients were enrolled and treated in the cohort with 1×10^{10} vp and 1×10^{11} vp of Telomelysin, respectively. The patients comprised 7 males and 3 females, with median age of 79.5 years (range, 53 to 92 years). Only two patients had prior platinum-based chemotherapy. Six patients completed treatments; one patient was withdrawn because of progression disease (PD). Common grade 1 and 2 toxicities included fever, esophagitis, and pneumonitis. All patients developed a transient, self-limited lymphopenia; two of them showed a grade 4 lymphopenia classified as being possibly related to the treatment, although it recovered by the interruption of radiation.

Multiple courses of endoscopic Telomelysin injection in combination with locoregional radiotherapy were feasible and well tolerated in patients with esophageal cancer, and 6 more patients will be treated with the highest dose (1×10^{12} vp) of Telomelysin and radiotherapy .

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 4件、国際誌 15件)

1. Takehara, K., Tazawa, H., Okada, N., Hashimoto, Y., Kikuchi, S., Kuroda, S., Kishimoto, H., Shirakawa, Y., Narui, N., Mizoguchi, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Targeted photodynamic virotherapy armed with a genetically encoded photosensitizer. *Mol. Cancer Ther.*, 2016, 15: 199-208.
2. Ishida, M., Kagawa, S., Shimoyama, K., Takehara, K., Noma, K., Tanabe, S., Shirakawa, Y., Tazawa, H., Kobayashi, H., Fujiwara, T. Trastuzumab-based photoimmunotherapy integrated with viral HER2 transduction inhibits peritoneally disseminated HER2-negative cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 2016, 15: 402-411.

3. Yano, S., Takehara, K., Miwa, S., Kishimoto, H., Hiroshima, Y., Murakami, T., Urata, Y., Kagawa, S., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Improved resection and outcome of colon-cancer liver metastasis with fluorescence-guided surgery using in situ GFP labeling with a telomerase-dependent adenovirus in an orthotopic mouse model. *PLoS One*, 2016, 11: e0148760.
4. Sakurai, F., Narii, N., Tomita, K., Togo, S., Takahashi, K., Machitani, M., Tachibana, M., Ouchi, M., Katagiri, N., Urata, Y., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Efficient detection of human circulating tumor cells without significant production of false-positive cells by a novel conditionally replicating adenovirus. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2016, 3:16001.
5. Yoshida, K., Nagasaka, T., Umeda, Y., Tanaka, T., Kimura, K., Taniguchi, F., Fuji, T., Shigeyasu, K., Mori, Y., Yanai, H., Yagi, T., Goel, A., Fujiwara, T. Expansion of epigenetic alterations in EFEMP1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142: 1557-1569.
6. Osaki, S., Tazawa, H., Hasei, J., Yamakawa, Y., Omori, T., Sugiu, K., Komatsubara, T., Fujiwara, T., Sasaki, T., Kunisada, T., Yoshida, A., Urata, Y., Kagawa, S., Ozaki, T., Fujiwara, T. Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci Rep*, 2016, 6: 28953.
7. Urano, S., Ohara, T., Noma, K., Katsube, R., Ninomiya, T., Tomono, Y., Tazawa, H., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Kimura, F., Nouse, K., Matsukawa, A., Yamamoto, K., Fujiwara, T. Iron depletion enhances the effect of sorafenib in hepatocarcinoma. *Cancer Biol Ther*, 2016, 17: 648-656.
8. Nishitan, S., Noma, K., Ohara, T., Tomono, Y., Watanabe, S., Tazawa, H., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Iron depletion-induced downregulation of N-cadherin expression inhibits invasive malignant phenotypes in human esophageal cancer. *Int. J. Oncol.*, 2016, 49: 1351-1359.
9. Kuroda, S., Nishizaki, M., Kikuchi, S., Noma, K., Tanabe, S., Kagawa, S., Shirakawa, Y., Fujiwara, T. Double flap technique as an anti-reflux procedure in esophagogastrectomy after proximal gastrectomy. *J Am Coll Surgons*, 2016, 223: e7-e13.
10. Kumano, K., Nishinakamura, H., Mera, T., Itoh, T., Takahashi, H., Fujiwara, T., Kodama, S. Pretreatment of donor islets with papain improves allograft survival without systemic immunosuppression in mice. *Islets*, 2016, 8: 145-155.
11. Yano, S., Takehara, K., Tazawa, H., Kishimoto, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Efficacy of a cell-cycle decoying killer adenovirus on 3-D gelfoam®-histoculture and tumor-sphere models of chemo-resistant stomach carcinomatosis visualized by FUCCI imaging. *PLoS One*, 2016, 11: e0162991.
12. Onishi, T., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Takeuchi, M., Otani, T., Nakamura, S., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Kishimoto, H., Umeda, Y., Shirakawa, Y., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T. Tumor-specific delivery of biologics by a novel T-cell line HOZOT. *Sci. Rep.*, 2016, 6: 38060.
13. Yano, S., Takehara, K., Tazawa, H., Kishimoto, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. Therapeutic efficacy in vivo of a telomerase-dependent adenovirus in an orthotopic model of chemotherapy-resistant human stomach carcinomatosis peritonitis visualized with cell cycle color coding FUCCI imaging. *J Cell Biochem*, 2017, 118: 559-569.

14. Machitani, M., Sakurai, F., Wakabayashi, K., Tachibana, M., Fujiwara, T., Mizuguchi, H. Enhanced oncolytic activities of the telomerase-specific replication-competent adenovirus expressing short-hairpin RNA against Dicer. *Mol. Cancer Ther.*, 2017, 16: 251-259.
15. Yano, S., Takehara, K., Kishimoto, H., Tazawa, H., Urata, Y., Kagawa, S., Bouvet, M., Fujiwara, T., Hoffman, R.M. OBP-401-GFP telomerase-dependent adenovirus illuminates and kills high-metastatic more effectively than low-metastatic triple-negative breast cancer in vitro. *Cancer Gene Ther.*, 2017, 20: 45-47.
16. 藤原俊義 : 腫瘍融解ウイルス療法の臨床開発. *医学のあゆみ「癌標的分子と治療開発 -現状と将来」* 2016, 258: 503-508.
17. 藤原俊義 : Molecular theranostics for gastrointestinal cancer : 分子イメージングと治療の融合. *JSMI Report* 2016, 10: 7-11.
18. 藤原俊義 : ウイルス療法とは. *がん免疫療法* 2017, 1: 51-52.
19. 藤原俊義, 田澤大, 田邊俊介, 香川俊輔, 白川靖博 : 食道がんに対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究. *日本臨床「ゲノム情報と遺伝子治療」* 2017, 75: 746-751.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Fluorescence-guided imaging of gastric cancer cells for an insight into peritoneal dissemination. 口頭、香川俊輔、渡邊めぐみ、栗田和也、菊地覚次、黒田新士、坂本修一、西崎正彦、田澤大、藤原俊義、**第88回日本胃癌学会総会 (パネルディスカッション)**、2016/3/19、国内.
2. Molecular Theranostics for gastrointestinal cancer. 口頭、藤原俊義、田澤大、水口裕之、浦田泰生、香川俊輔 : **第11回日本分子イメージング学会総会・学術集会 (シンポジウム)**、2016/5/28、国内.
3. 食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究の中間報告. 口頭、田邊俊介、白川靖博、金谷信彦、岡田剛、前田直見、黒田新士、野間和広、田澤大、香川俊輔、藤原俊義、**第70回日本食道学会学術集会 (ワークショップ)**、2016/7/4、国内.
4. 食道癌に対する放射線併用ウイルス療法の臨床研究:低用量群 (Level 1) の薬理動態解析. 口頭、藤原俊義、香川俊輔、田邊俊介、田澤大、野間和広、黒田新士、菊地覚次、白川靖博、**第71回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)**、2016/7/14、国内.
5. 胃癌個別化治療に向けた腹腔内遊離癌細胞イメージング技術の応用. 口頭、渡邊めぐみ、香川俊輔、栗田和也、坂本修一、菊地覚次、黒田新士、岸本浩行、西崎正彦、田澤大、藤原俊義、**第71回日本消化器外科学会総会 (ワークショップ)**、2016/7/14、国内.
6. 標的陰性癌に対する Photoimmunotherapy. 抗原修飾による抗原陽転化と不均一性の克服. 口頭、香川俊輔、石田道弘、下山京子、竹原清人、野間和広、田邊俊介、渡邊めぐみ、田澤大、小林久隆、藤原俊義、**第71回日本消化器外科学会総会 (特別企画)**、2016/7/14、国内.
7. Next-Generation Telomelysin: multifunctional telomerase-specific oncolytic adenovirus armed with the wild-type p53 tumor suppressor gene. 口頭、藤原俊義、香川俊輔、田澤大、**第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 (シンポジウム)**、2016/7/28、国内.
8. 消化器がんに対するテロメラゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた集学的治療. 口頭、藤原俊義、**第75回日本癌学会学術総会 (シンポジウム)**、2016/10/6、国内.

9. Multidisciplinary therapy with telomerase-specific oncolytic adenovirus for human gastrointestinal cancer. 口頭、藤原俊義： **第54回日本癌治療学会学術集会（シンポジウム）**、2016/10/20、国内。
10. テロメラーゼ依存性腫瘍融解ウイルス製剤を用いた食道癌に対する集学的治療. 口頭、藤原俊義、**第39回日本分子生物学会年会（シンポジウム）**、2016/12/2、国内。
11. Clinical implications of fluorescence-emitting virus guided peritoneal cytology in gastrointestinal cancer. 口頭、Kagawa, S., Watanabe, M., Kuwata, K., Sakamoto, S., Shigeyasu, K., Tazawa, H., Kuroda, S., Kikuchi, S., Nishizaki, M., Fujiwara, T. **The 19th International Congress of Cytology**, 2016/5/31、国内。
12. PD-L1 expression as a predictive factor for recurrence pattern and prognosis in curatively resected gastric cancer. 口頭、Morihiro, T., Kuroda, S., Kubota, T., Tazawa, H., Kagawa, S., Fujiwara, T. **2016 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Minisymposium)**, 2016/4/18、国外。
13. Tumor associated macrophages promote malignant phenotypes of disseminated human gastric cancer cells in intraperitoneal cancer immune microenvironment. 口頭、Sakamoto, S., Kagawa, S., Kuwada, K., Ito, A., Kagawa, T., Kikuchi, S., Kuroda, S., Yoshida, R., Tazawa, H., Fujiwara, T. **2017 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (Minisymposium)**, 2017/4/4、国外。