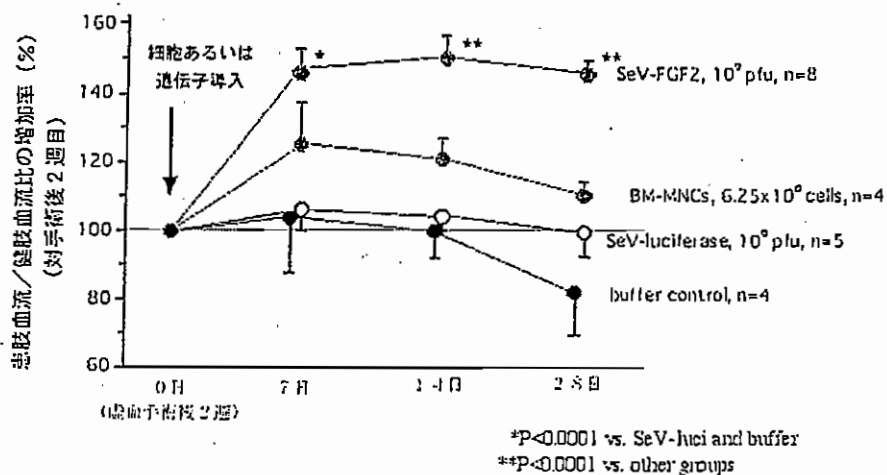


骨髄細胞移植療法や末梢血幹細胞移植療法は既に臨床応用されており、一部の症例で自覚症状の改善などの効果が臨床的に認められておりますが、現時点でその詳細なメカニズムに関しては明らかになっておりません。また、我々の遺伝子治療臨床研究計画はまだ臨床試験を開始していない状態であるため、直接的な比較は不可能であります。

従って、ここでは我々が行ったウサギ慢性虚血モデルにおける SeV/dF-FGF2 遺伝子治療と骨髄単核球細胞 (BM-MNCs) 移植の、血流回復効果に関するデータを参照させていただきます。

ウサギ下肢慢性虚血モデル (poor runoff model) における、  
SeV-FGF2の血流改善効果  
同種骨髄由来単核球細胞療法 (BM-MNCs) との比較試験



図に示します通り、骨髄細胞移植を行った群でも明らかに有意な血流の回復を認めておりますが、その効果は次第に減弱しております。一方 FGF-2 による遺伝子治療の場合、遺伝子発現が2週間でほとんど消失するにも関わらず (参考資料1: Shoji T et al. Am J Physiol 2003)、血流回復効果は骨髄細胞の2倍以上のレベルを1ヶ月以上維持しております (図には明記しておりませんが、少なくとも2ヶ月まで低下しないことを確認しております)。

また我々の施設で行っております末梢血 CD34 陽性幹細胞移植を受けた症例の内1例は、自覚症状の改善を認めておりましたが、数カ月後には再び虚血症状が悪化し、肢切断に至った症例も経験しております。

従って本遺伝子治療研究計画では、骨髄細胞移植療法や末梢血幹細胞移植療法と比較してもより高い、より持続した効果が得られる可能性があると考えられます。

さらに、骨髄細胞移植療法の場合は細胞採取のために全身麻酔を必要とします。対象となる患者は高齢かつ全身の高度の動脈硬化、呼吸機能の低下など、全身麻酔のリスクを擁する場合がありますが、本遺伝子治療の場合は全身麻酔を必要としないため、麻酔に関わるリスクを低減可能と考えております。

さらに細胞移植やサイトカインにおける血流回復効果に関して、興味深い論文が最近見受けられます。下肢などの組織血流には血管新生 (angiogenesis) よりむしろ、

血管造影にて検出し得るサイズの動脈の増加（彼等が言うところの arteriogenesis）の重要性が Schaper らにより指摘されております。この“arteriogenesis”は単球走化/活性化因子 MCP-1 により強力に促進され、VEGF にはほとんどその作用がないことは以前から知られておりました（参考資料 10 : Deindl E et al. Circ Res 2001）。最近の研究で、arteriogenesis は単球を除去すると消失すること（参考資料 11 : Pipp F et al. Circ Res 2003）、さらに MCP-1 依存性 arteriogenesis は FGF-2 の高親和性受容体である FGFR の活性遮断薬で消失すること（参考資料 12 : Deindl E et al. Circ Res 2003）が明らかになっております。

単球分画を多く含む骨髄単核球細胞では相当量の FGF-2 や VEGF が産生されることが関西医大のグループから報告されておりますが（参考資料 13 : Circulation 2001）、以上のデータを総合して考察すれば、骨髄単核球細胞や CD34 陽性細胞の移植治療における効果には、FGF-2 が重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられます。

(4) 実施計画書 11 ページ（同意書【現在研究が始まっている他の類似の治療法について】）にあるように、同施設で、末梢血幹細胞移植治療が計画されているとのことですが、科学的な観点から、臨床での治療法適用基準を明確に示していただき、その上で両者の比較評価などをどのようにされるのか示すこと。

(回答)

まず、今回申請しております遺伝子治療は安全性を主に確認する第 I、IIa 相であり、現時点で我々は、今回の組み換えセンダイウイルスベクターによる遺伝子治療と、末梢血 CD34 陽性幹細胞移植療法や骨髄細胞移植療法との比較を行うべき段階（効果判定を行う第 IIb 相以降の段階）ではないと判断している点を、まず御承知置き頂ければ幸いです。

さて、我々の施設における本申請（遺伝子治療）と末梢血 CD34 陽性幹細胞移植療法における治療法適応基準に関してについて、以下に具体的にポイントとなる項目について記載させていただきます。

- 1) 対象疾患：双方とも Fontaine 分類 IIb（間歇性跛行距離 200 m 以下）、III（安静時疼痛）、IV（潰瘍・壊死）度を対象にしており、それぞれの適応項目、除外項目に問題がない場合は、患者さんの希望により、2 種類の治療法のどちらか、あるいは参加しない旨を選択して頂くこととなります。
- 2) 採取可能細胞数：患者さんが末梢血 CD34 陽性幹細胞移植療法を選択された場合でも、G-CSF による末梢血への単核球の誘導効率が悪い、即ち治療に使用する細胞数が確保できない場合には、遺伝子治療を御紹介する予定にしております。
- 3) 糖尿病の合併：末梢血 CD34 陽性幹細胞移植療法では除外項目として、治療中の糖尿病患者を除外する規定になっております。これは移植した細胞が下肢に留まらず他臓器に播種されることによる、増殖性血管病変（例えば糖尿病性網膜症など）などを新たに誘発する危険性が払拭できないことが理由であります。一方で FGF-2 遺伝子治療の場合、治療投与量以上においても、血中への FGF-2 タンパクの有意な漏出は認めていないことから（参考資料 8

: Masaki I et al. Circ Res 2002、およびサルにおける急性毒性試験成績)、 「既存の糖尿病性網膜症や腎障害などがなく、インスリンなどで良好にコントロールされている症例」も適応に入っております。

以上が末梢血 CD34 陽性幹細胞移植療法と FGF-2 遺伝子治療における、主だった適応の相違点です。双方とも未だ萌芽期の医療でありますため、どちらが優れているという判断には、別途の試験デザインを必要とすることもあり、数年を要すると考えられます。また一部の症例では細胞療法の適応に成り難く、一方で遺伝子治療の適応がある症例も少なからず存在します（特に糖尿病の合併患者）ので、患者さんの選択肢が多いという意味でも双方を同時に進めて行くことは、倫理的にも、また科学的にも問題ないと考えます。

(5) 安全性確保の観点からサルを使った安全性試験を行っているが、虚血状態での臨床研究に使う予定の FGF-2 遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクターの中毒症の有無についての結果が得られてから判断すべきではないか。

(回答)

既にマウスでは虚血手術直後に SeV-FGF2 を投与し、非虚血下肢への SeV-FGF2 の炎症性サイトカイン誘導能は手術単独よりもはるかに低いこと、虚血手術を行った下肢へ SeV-FGF2 を投与しても、炎症性サイトカインの誘導亢進、顕著な遅延を認めていないことを明らかにしております（臨床研究実施計画申請書 p27-28）ので、この御質問は「サルにおける安全性試験」に限定して回答させていただきます。

(提出データから想定される、安全性に関する理論的、科学的妥当性)

これまでに（以下は申請時の添付資料）、

- (1) FGF-2 の蛋白製剤としての安全性に関する海外における臨床研究成績  
(文献：添付資料 7。4) ~ 7))
- (2) FGF-2 の蛋白製剤としての安全性と生体内分布に関する科研製薬から発表されている研究成績 (ラット、健常成人、皮膚潰瘍患者)  
(文献：添付資料 7。1) ~ 3))
- (3) FGF-2 搭載センダイウイルスベクターを用いたマウス虚血肢における炎症性サイトカイン誘導に関する試験成績  
(臨床研究実施計画申請書 27-28 ページ)
- (4) FGF-2 搭載センダイウイルスベクターを用いたマウス虚血肢における治療域と副作用域に関する試験成績  
(臨床研究実施計画概要書 12 ページ、参考資料 1)
- (6) 大腸菌 lacZ 遺伝子搭載センダイウイルスベクターを用いたカニクイサルを用いた急性毒性試験成績、炎症性サイトカイン誘導、ならびに血液・尿中ウイルス分布試験成績  
(臨床研究実施計画申請書 29-30 ページ、添付資料 7、2-2))
- (7) ヒト FGF-2 遺伝子搭載センダイウイルスベクターを用いたカニクイサルを

用いた急性毒性試験成績、炎症性サイトカイン誘導、ならびに血液・尿中ウイルス分布試験成績

(申請時配付済み追加資料、今回配布の参考資料14)

に関するデータを収集いたしております。

以上の成績から我々が判断致しましたことは、

- (1) 本ベクターで発現させた FGF-2 は内因性 FGF-2 と比較して 300 倍程度まで発現させてもほとんど血中に漏出せず (マウス)、仮に相当量 (血中濃度で約 60 ng/ml 以上) が漏出しても重篤な副作用は発現する可能性は極めて低い (ヒト)。
- (2) 筋肉局所での FGF-2 発現量が、臨床投与予定最大量のさらに 10 倍近く発現しても、局所毒性を示す可能性は極めて低い (マウス)。
- (3) 臨床投与予定最大量の 10 倍の組換えウイルスを投与しても、血中への炎症性サイトカイン誘導レベルは数十 pg/ml に留まり (アデノウイルスでの死亡例の 1/100 以下)、全身の炎症反応症候群 (SIRS) に至る可能性は極めて低い (サル、マウス)。実際にサル、マウスでは SIRS を疑わせる所見は得られていない。
- (4) 臨床投与予定最大量の 10 倍の組換えウイルスを投与しても、血中・尿中にウイルスゲノムは全く検出されなかった (サル) ことから、全身にウイルスが散布され、FGF-2 を発現することにより副作用を惹起する危険性は極めて低い (岡山大学のアデノウイルスベクターによる臨床研究データでは、血中・尿中に 1 日程度ベクターゲノムが検出されております)。
- (5) 臨床投与予定最大量の 10 倍のウイルスを投与しても、検査所見などにほとんど重大な影響は見られなかったことから (サル)、急性に臓器不全などを惹起する危険性は極めて低い。

であります。

つまり現時点での以上の成績から、本臨床研究に関する理論的な危険性はほとんど見当たらないと我々は科学的に判断しており、臨床研究の実施には十分な妥当性があるデータであると考えております。

さて、御質問は「サル+虚血下肢」での安全性試験が必要か否か、という点に集約されると思われませんが、これには、

- 1) 遺伝子治療の安全性試験にサルのデータを必要とするか。
- 2) サルの動物モデル (虚血肢) での安全性試験データが必要か。

という 2 つの問題が含まれております。

以下、それぞれについて私共の考えを説明させていただきます。

- 1) 遺伝子治療の安全性試験にサルのデータを必要とするか。

米国の場合、ベクターのベースになる野生型ウイルスに対し最も感受性が高い、言い換えれば最も病気を起こしやすい動物種 (例: アデノウイルスの場合、コットンラット) を用い、臨床投与ルートと同じ投与方法を採用することが最も重要とされており、サル (非ヒト霊長類) での試験は推奨されているものの、義務付けられておりません

(遺伝子治療関連企業に対する FDA のガイドライン 参考資料 1 5 : 25 ページ下線部 : VIII Preclinical Evaluation of Cellular and Gene Therapies, D. Direct Administration of Vectors In Vivo, 2. Selection of Animal Species)。

[同部分の和訳]

「動物種の選択：前臨床毒性評価試験における動物種の選択においては、ベクターの生物学的活性評価に有用な動物種を選択するのと同様に、野生型ウイルスの感染に対する感受性と病原性を考慮して選択するべきである。ウイルスの系統によっては、非ヒト霊長類（サル）よりも Rodent（マウス、ラット）の方が有用である場合もある。  
(以下省略)」

このことは、例えば、マウス・ラットを自然宿主とするセンダイウイルスベクターで安全性試験を行うとすれば、まず第1に病原性を示す自然宿主であるマウスあるいはラットでの試験が最も重要であることを意味します。

一方欧州（特に英国）の場合、同様の試験を異なる2種の動物種で施行することが義務付けられています。ここでもサルを用いた試験が必須という規定はありません。

附随して英国 Medicines Control Agency (MCA) のガイドライン (Draft Guidance Notes On Quality and Preclinical Safety Issues For Clinical Trials With Gene Therapy Products : 参考資料 1 6) を添付させていただきますが、このガイドラインにおける、安全性試験施行に対する動物種選択（ウイルスベクター）に関しても、以下のように明確な記述があります（21 ページ、第3パラグラフ）。

[同部分の和訳]

「遺伝子治療の安全性評価に選択される動物モデルは、ベクターに関わる野生型ウイルス感染に感受性があり、かつ感染による病原性の進行に感受性のある動物種を用いなければならない。また特定のウイルスベクターにおける安全性の問題は、適切な感染に許容性のある特定の動物モデルを用いなければならない。例えばヘルペスウイルスベクターの場合は、神経障害性や持続感染／再活性化の可能性に関する評価が必要とされる。(以下省略)」

事実、分担研究者の一人である米満が在籍していた英国インペリアル・カレッジの prof. Eric Alton も、「サルでの試験は、英国における動物愛護団体による規制もあり、必ずしも必要とされていない。また必要性もそれ程高く無い。事実多くの臨床研究 (human study) はサルのデータ無しで進められている。」とっておりました。

今回の我々の申請では、世界中で使用経験のない、全く新しいウイルスベクターを用いることから、米国 FDA の推奨に従ってサルを用いた安全性試験を2種のベクター (SeV/dF-lacZ, SeV/dF-hFGF2) で施行し、そのデータを添付致しておりますが、国際的な基準から鑑みても、これらのデータを必須とはされていないことを御理解頂

ければ幸いです。

## 2) サルの動物モデル（虚血肢）での安全性試験データが必要か。

我々がマウスで用いております下肢脱落モデル（autoamputation モデル）など、臨床的に Fontaine III-IV 度に相当するサルのモデルは、自発痛など相当な苦痛を伴うと考えられますために動物愛護の観点から国際的に受け入れられません。従ってもしサルに虚血肢を作成するならば、Fontaine II 度に相当する、平時には痛みを伴わない間歇性跛行に相当する動物モデルを開発する必要があります。

通常多くの研究者がラット、ウサギなどで実験的に用いております大腿動脈およびその分枝結紮モデルは、あくまで急性動脈閉塞モデルであり、なおかつ1ヶ月程の経過で血流が次第に正常レベルまで回復するために、臨床的な慢性動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症など）との血行動態が全く異なります。

世界的に「慢性動脈閉塞症の動物モデル」として認められているモデルは、我々が開発したイヌ、ウサギにおける poor runoff モデルのみであります（Morinaga K et al. J Vasc Surg 1987, Itoh H et al. Atherosclerosis 1994, Ishida M et al. Atherosclerosis 2001, Shoji T et al. Am J Physiol 2003 など）。これらの動物モデルは大腿動脈の中筋枝のみを残し、その他は全て膝上で結紮・切離するもので、通常内腸骨動脈系が発達したイヌ、ウサギなどの動物でのみ可能です。霊長類では内腸骨動脈系の発達が弱く、事実ヒトでは膝窩動脈で急性閉塞を来すと、100%が壊疽に陥ってしまいます。

以上の背景から、サルでの虚血肢を用いた安全性試験は、技術的に困難であり、またその必要性も国際的な基準を鑑みても差程高くないと考えられます。

(8) センダイウイルスベクターに由来するウイルスタンパク質が免疫原性の原因と考えられるが、安全性確保の観点からカニクイザル等の毒性試験以外に、ウイルスタンパク質の発現量など基礎的な検討を行っているか。また、行っていない場合には、その必要性についてどのように考えるか。

(回答)

御指摘の通り、センダイウイルス由来タンパク質が中和抗体産生と細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導に重要なことは、これまでの多くの基礎研究で明らかにされております。特にマウスの場合、その標的タンパクと認識されるエピトープもある程度明らかにされております。

一方でウイルスタンパク質の発現量に関する基礎検討も古くからなされております。センダイウイルスはマイナス 1 本鎖の RNA ウイルスであり、ポリメラーゼが走査する順に N、P、M、F、HN、L という各構造遺伝子が直線上に並んでおり、その極性効果から N の発現量が最も高く、以後段階的に低下することが明らかになっております。この極性効果については、外部研究協力者の長谷川らが詳細に検討しており、種々の位置にレポーター遺伝子を挿入した場合、同様の極性効果が得られることを確認しております（参考資料 17 : Tokusumi T et al. Virus Res 2002）。

(9) 本臨床研究で用いるセンダイウイルスベクターは、導入細胞内で複製するか、

また、コピー数や細胞内動態など性質に関する基礎的な検討はなされているか。

(回答)

本臨床研究で使用する非伝播型 (F遺伝子欠損) 組換えセンダイウイルスベクター (SeV/dF) は、その構造の基盤となっているセンダイウイルス (SeV) と同様、遺伝子導入された細胞の細胞質内で各種遺伝子の転写とベクターゲノムの複製 (注: ウイルスの複製ではありません) を同時に行います。諸条件によりどちらかの比率が優先されるような現象は、我々の知る限り現時点で知られておりません。

細胞内における動態としては、レポーター遺伝子 (ルシフェラーゼやGFP) による検討を数種類行っておりますが、これは用いる細胞種により異なる挙動を示しております。我々が行った試験では、数カ月間比較的安定した持続発現が得られる細胞として、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞が挙げられます (参考資料 18: Masaki I et al. FASEB J 2001)。これらの細胞では 2~4 週間で発現レベルの周期的な変動が認められ、これはいわゆる干渉ゲノム (DI genome: defective interfering genome); 不完全複製ゲノムの産生・減衰によるものと考えられます。一方で新鮮T細胞やT細胞 cell line でも 2 週間程で発現が大きく減衰します。この現象については詳細に調べており、外来遺伝子発現強度は real-time PCR 法による細胞質内ゲノムコピー数と正の相関を示すことを明らかにしております (参考資料 19: Okano S et al. Gene Ther 2003)。さらにこの現象における interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) の関与を検索するために、同様の実験を INF- $\gamma$  受容体欠損マウスから抽出した細胞で行ったところ、遺伝子発現の減衰はほとんど認められなくなりました (未公表データ)。従って、INF- $\gamma$  は T細胞においてウイルスゲノム複製の阻害因子として働くと考えられますが、このシステムが必ずしも他の種類の細胞には働いていないと推察されます。

2. 虚血部位におけるサイトカインの発現や免疫担当細胞の動態について、導入因子である FGF-2 やセンダイウイルスベクター投与による炎症反応の影響を整理して説明すること。

(回答)

ヒトの慢性虚血下肢における、サイトカインや免疫担当細胞の動態に関する公表データは、我々の知り得る限りほとんどなく、また、上述致しましたごとく慢性虚血モデルを作成し得る動物種 (ウサギ、イヌ) では、これらを解析するツールが不足しておりますため、詳細な解析は不可能であります。

従って、ここでは主にマウスとサルの我々のデータと過去の文献を総括させていただきます。

<急性虚血における生体反応>

「臨床研究実施計画申請書」(27~28 ページ) に記載しておりますごとく、マウスでは下肢に虚血を誘導しますと、まず速やかに IL-6 などの即時型の炎症性サイトカインの発現上昇を認めます。この時、病理組織学的には下肢骨格筋細胞の好酸性の増加 (細胞の虚血性変化を示唆します)、好中球の浸潤を認め、血管新生因

子であるVEGF、HGF、FGF-2は全て発現が増強しております(参考資料4: Onimaru M et al. Circ Res 2002) (~3日目頃)。それに引き続き、次第にTNF- $\alpha$ なども上昇し、一部の骨格筋は壊死に陥ります。この頃は、単球/マクロファージ、リンパ球などの浸潤が顕著になり、一部筋芽細胞(いわゆるsatellite cell)の増殖を認める部分が見られ、壊死筋肉細胞の取り囲み、吸収像を認めます(~10日目頃)。これ以後になると炎症性サイトカインの局所発現レベルは次第に減弱し、壊死筋肉細胞の吸収も進み、筋芽細胞の細胞融合、それに引き続き未熟な骨格筋の形成を認めるようになり、炎症細胞浸潤数も目立って減少します。この頃、種々の血管新生因子発現レベルも虚血前のレベルまで低下します(~2、3週間)。

#### <センドライウイルスベクターを投与した場合の生体反応>

##### 1. 非虚血(正常)骨格筋へ投与した場合:

SeV-FGF2投与マウス( $10^7$  ciu: 臨床投与予定量の体重あたり約4倍)においては、虚血誘導のみと比較してIL-6の誘導レベルは約1/20であり、またTNF- $\alpha$ はほとんど誘導されていないことから、急性炎症誘導効果という観点から、SeV-FGF2投与それ自体は虚血手術そのものより低侵襲であると考えられます。また、コントロールウイルス(SeV-luciferase)投与マウスでは、血管新生因子発現量には変化が認められておりません(参考資料9: Masaki I et al. Circ Res 2002, 参考資料4: Onimaru M et al. Circ Res 2002)。サルにおいては( $5 \times 10^9$  ciu: 臨床投与予定量の体重あたり約10倍)投与しても血中のIL-6発現レベルは3頭中1頭で最大20 pg/ml程度、他では検出されておらず、侵襲度はやはり低いものと考えられます。但し、血中のNK細胞活性、リンパ球数とその幼弱化反応はある程度亢進しておりますため、ウイルス投与に伴う全身の細網内皮系の活性化はある程度惹起され、これが生体内における遺伝子発現低下(=ウイルス排除)に寄与していると推察されます。

##### 2. 虚血骨格筋へ投与した場合:

SeV-FGF2投与マウス( $10^7$  ciu: 臨床投与予定量の体重あたり約4倍)においては、虚血誘導のみと比較して、投与後2日目にややIL-6の発現の遷延化を認めるもののすぐに正常値に復し、有意なIL-6、TNF- $\alpha$ の誘導レベルの増加は認められておりません。従って、虚血骨格筋に対するSeV-FGF2投与による急性炎症増悪効果は、ほとんどないと考えてよいと思われれます。

#### <FGF-2の炎症反応に対する影響と、筋肉細胞再生および血管新生との相関に関して

>

FGF-2そのものの炎症反応、ならびに骨格筋細胞再生・血管新生と炎症細胞反応に関する影響について、いくつかの報告が公表されております。

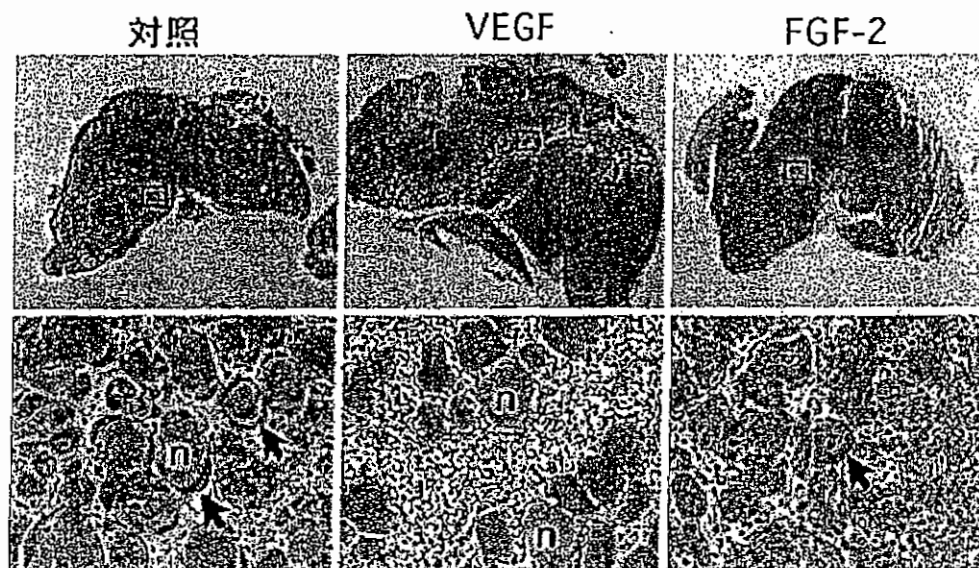
炎症細胞浸潤に関しては、特にFGF-2がTリンパ球の血管内皮細胞からの侵入・遊走を強く阻害することが知られており(Katayama J et al. Cancer Res 1994)、またTリンパ球への作用に加え、好中球、マスト細胞に対しても同様の作用があることがin vivoのラット虚血肢モデルで証明されております(Lefaucheur J-P et al. J Neuroimmunol 1996)。つまり、FGF-2そのものは、虚血組織局所では抗炎症性に機能している可能性が示唆されます。

骨格筋細胞の再生に関しては、以前よりマクロファージ由来の物質に骨格筋前駆



細胞であるsatellite cellの増殖分化の促進因子が存在することが知られておりましたが (Robertson TA, et al. Exp Cell Res 1993, Contini M et al. BBRC 1993, Contini M et al. J Neurophathol Exp Neurol 1994)、その分子実体の主なものがFGF-2で、内因性FGF-2の活性を中和抗体で遮断すると筋肉再生が遅延すること (Lefaucheur J-P et al. J Neuroimmunol 1996)、逆にFGF-2タンパクにて促進されること (Lefaucheur J-P et al. Neurosci Lett 1995) が示されております。事実、我々のデータでも、SeVによるVEGFの過剰発現では炎症細胞浸潤が遷延化、さらに筋肉再生が高度に障害されるのに対し、FGF-2の過剰発現では炎症細胞浸潤の低下と壊死骨格筋の吸収、satellite cellの増殖、筋肉再生が促進されることが示されております (図:参考資料9:Masaki I et al. Circ Res 2002)。

VEGF による遺伝子治療は虚血傷害筋肉の再生を遅延させ、  
FGF-2 による遺伝子治療は虚血傷害筋肉の再生を促進する



n= 壊死骨格筋      → 筋芽細胞、再生骨格筋

Masaki I et al. Circ Res 2002.

一方、血管新生 (angiogenesis)・動脈新生 (arteriogenesis) と炎症細胞浸潤に関しては、近年、興味深い報告がなされております。

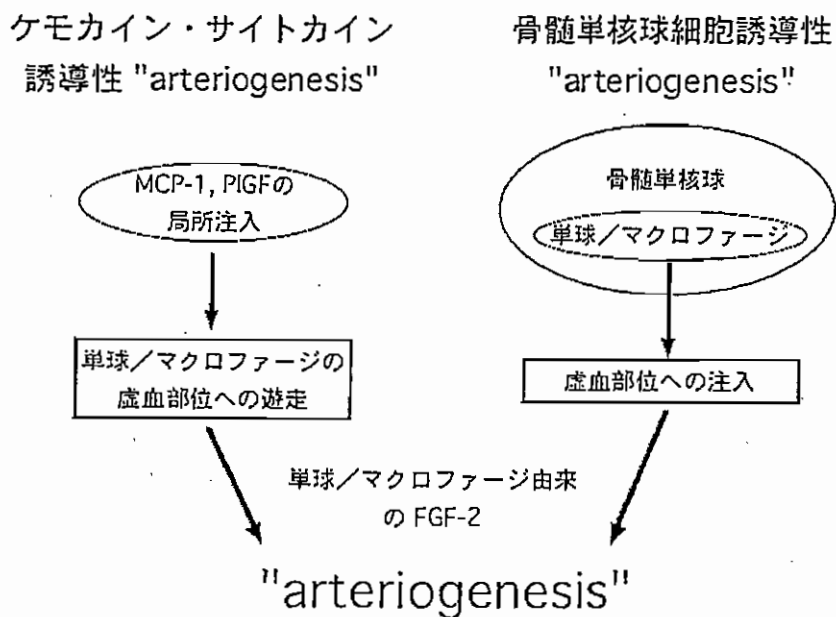
以前よりEpsteinらから、「組織血液還流を伴う機能的な新生血管と、それを伴わない意味のない無機能性新生血管が存在する。従って、血管新生治療の効果を議論する場合、血管の数を数えることは無意味である。」と提唱しておりました。一方でSchaperらは、「血管造影で確認し得るサイズの動脈で、かつ内皮細胞、平滑筋細胞の増殖を伴う血管 (これを“arteriogenesis”の定義としております) が組織還流に寄与する。」という概念を提唱しております。

繰り返しになりますが、このarteriogenesisには血管新生因子VEGFはほとんど関与せず、単球走化性因子 (MCP-1) が有効であることをSchaperらは以前より報告しておりましたが (参考資料10: Deindl E et al. Circ Res 2001)、その効果には単球/マクロファージの存在が必須であることを証明されております (単球/マクロファ

ージを除去するとMCP-1によるarteriogenesisの効果が消失する)。また、同様に単球/マクロファージは胎盤由来増殖因子 (PIGF) により遊走が促進され、PIGFもarteriogenesisの効果を持つことも証明されております (参考資料 1 1 : Pipp F et al. Circ Res 2003) ことから、これらサイトカイン・ケモカインによるarteriogenesisには局所へ遊走する単球/マクロファージが必須であると考えられます。

では、「この単球/マクロファージ由来のどの物質がarteriogenesisに重要であるか」、ということが次に問題になりますが、その候補としてFGFシステムが重要であろうと考えられております。これは、MCP-1由来のarteriogenesisがFGF受容体阻害剤により消失することにより支持されております (参考資料 1 2 Deindl E et al. Circ Res 2003) 。

以上から、組織還流を伴う血管新生治療を目的とした場合、治療遺伝子としてFGF-2を使用することは合理的であると考えられます (図)。

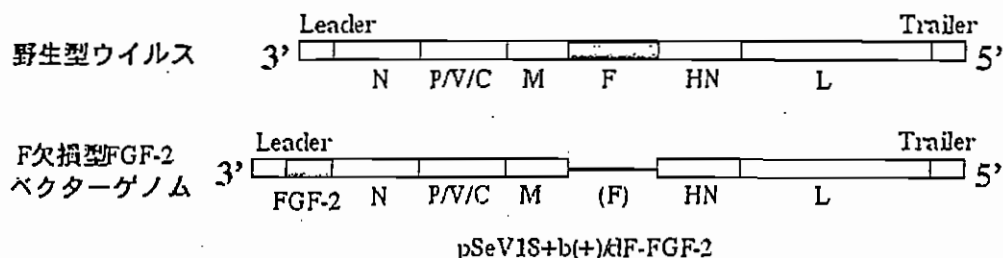


3. 本治療研究で用いるセンダイウイルスベクターについて、ベクターの基本構造や FGF-2 遺伝子の挿入部位を明確にすること。

(回答)

本件に関するベクターの基本構造、FGF-2 遺伝子挿入部位に関する具体的な記載を「臨床研究実施計画申請書：26ページ」に加え、改訂致しました (以下の図)。

FGF-2遺伝子搭載 F遺伝子欠損  
非伝播型センダイウイルスベクターのゲノム構造



4. 投与は、注射器を用いて20~30ヶ所に注入するとのことであるが、注入箇所、数は、どのような基準で決定するのか。また、注入量を明確にすること。

(回答)

注入箇所数の設定基準については、具体的な記載を「遺伝子治療実施計画概要書(6、9、12ページ)」、「臨床研究実施計画申請書(含説明書)(6、24、37ページ)」に加え、改訂致しました。

具体的には、閉塞性動脈硬化症、バージャー病患者は、個々の症例で動脈閉塞部位が異なるため、血管造影所見に基づきin flowが得られている動脈周辺より開始し、下大腿~足関節直上程度に注入する予定としております。

今回の臨床研究では投与ウイルス量を患者ごとに一定とし、注入量(液量)に関しては臨機応変(患者さんの血管造影所見により、苦痛を与えない範囲で増減する)を行う予定です。何故ならば、例えば浅大腿動脈から脛骨動脈系まで閉塞しているような閉塞性動脈硬化症患者では、大腿から下腿までの広汎な接種が必要となりますし、主に脛骨動脈等を主病変としたバージャー病患者では、下腿末梢側に限局した投与が必要となりますので、これらの患者に統一した液量を投与することは現実的ではないと判断しております。

5. アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較し、センダイウイルスベクターは、免疫原性があるかに高く、予想できない反応が生じる可能性のあることを記載する必要がないか。

(回答)

御助言有難うございました。

「予想し得ない反応が生じる可能性」については、既に【本臨床研究によって起り得る副作用】の項に記載しておりますが、患者さんの注意をより喚起する意味で他にも数カ所記載を繰り返しました。「詳細は新旧対照表」を御参照下さい。

ここで、「アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較し、センダイウイルスベクターは免疫原性があるかに高く、」という御記載の点について、我々

の考えを述べさせていただきます。

(1) 質の異なるベクター間の病原性・免疫原性の「比較」は科学的に大きな意味がないと考えられること。

通常、各種ウイルスベクターでは、それぞれの基本骨格となる野生型ウイルスに類似した生体内挙動を示します。従って、病原性や免疫原性は野生型ウイルスやウイルスベクターのトロピズムやその構造、投与経路などに大きく影響されます。

ウイルストロピズムの問題：例えば、アデノウイルスとセンダイウイルスは双方とも呼吸器に感染し病気を起すウイルスですが、アデノウイルスは主に末梢気道のクララ細胞に感染する一方、センダイウイルスは鼻粘膜～末梢気道全体の多くの種類の気道上皮細胞へ感染致します（参考資料 20：Yonemitsu Y et al. Nature Biotechnol 2000）。アデノウイルスベクターの場合、Crystal らは大動物の上気道へベクターを散布しても安全性に問題無しとして嚢胞性線維症（cystic fibrosis: CF）に対する遺伝子治療臨床研究を開始致しましたが、実際の患者さんでは気管支鏡を用いて末梢気道にベクターが散布され、激しい肺炎を引き起こしたために臨床研究が中止になっております（Nature Genet 1993）。その他の施設では、同様に疾患に対し患者さんの鼻粘膜（アデノウイルスの感染がほとんど成立しない部位）での安全性評価が行われ、これらの報告では同様のウイルス量でも大きな副作用は出ておりません（Cell 1992、Hum Gene Ther 1994 など）。つまりベクターの病原性・免疫原性は、ベクターと宿主細胞の相互作用（感染の成立や貪食細胞への取り込み）に大きく依存することは、遺伝子治療の研究分野で広く知られていることであります。

ウイルスの構造と投与経路の問題：レトロウイルスやセンダイウイルスは双方ともエンベロープを有し、血液中では極めて不安定であることが知られています（自験データでは、センダイウイルスベクターの場合、1分間血液にさらされると遺伝子導入活性が1/10,000に低下するというデータを得ております。この効果は非働化処理にて消失するため、補体によるウイルス粒子の不活性化が原因と考えられます）。一方でアデノウイルスやアデノ随伴ウイルスなどは血中で極めて安定であり、特にアデノウイルスの場合血液中に注入されると肝臓や脾臓など、細網内皮系を中心に、全身臓器に感染が成立することが知られております。その結果、アデノウイルスの場合全身の自然免疫系が活性化し、血中サイトカインの激しい上昇などがラット、サルで確認され（Mol Ther 2001 など）、同様の症状により米国ペンシルバニア大学で1999年に死亡例が出たことは記憶に新しいことと思います。一方でセンダイウイルスの場合、マウスなどの気道感染では激しい肺炎を呈し死亡例も認めるものの、その100倍以上のウイルスを骨格筋、血中などに投与してもマウスやラット、さらにはサルでもわずかなサイトカインの一過性の上昇を認めるのみで、発熱や戦慄などの症状は全く認められておりません。

このようにウイルスベクターの病原性や免疫原性を論じる際は、常にウイルスのトロピズムと構造、そして投与経路、投与量が問題となり、それぞれはベクターごとにまちまちでありますために、質の異なる複数のベクターについて、一元論的に「どちらの免疫原性が高い」と論じることは不可能であり、また科学的な意味も少ないと考えられます。そのために、先に申し上げましたように、米国FDAなどは

「臨床における投与方法と全く同じ方法で、なおかつ感染に感受性のある動物種を用いて（添付資料15）」安全性試験を実施することを推奨しているのだと考えられます。

(2) 遺伝子治療におけるベクターの病原性、免疫原性は、常に治療効果との

関係において語られるべきであること（いわゆるリスク／ベネフィット比）。

欧米における遺伝子治療審査には、いわゆる「リスク／ベネフィット比」を勘案することが義務付けられております。これはつまり、「ベネフィット（治療効果）を上げるためには、このベクター、この治療遺伝子、この投与経路、この投与量が必要。これにより、この程度（完治か、機能維持か、予防か、延命か、理論の証明‘proof of principle’か、遺伝子マーキングか、など）の効果が得られる。」を数量化し、それに伴うリスク（副作用：病原性、免疫原性を含む）を算出する考え方です。

例えば、末期がん患者に延命が大きく期待できる遺伝子治療であれば、多少のリスクもやむを得ない（治療を行うことにより患者の余命が有意に短縮しないこと、患者の苦痛が増大しないことが前提）と考えられます。しかし平均寿命が30歳である嚢胞性線維症（CF）の10歳台の患者に、導入遺伝子による電気生理学的機能回復を見る（いわゆる理論の証明‘proof of principle’）遺伝子治療研究を行い、患者が次々と肺炎を起すのであれば、「リスクが高すぎる」と判定されることとなります。

振り返って今回提出させて頂いた臨床研究を以上の観点で整理すれば、

- 1) 下肢切断に至れば生活の質（Quality of Life）を著しく損なうこと。
- 2) 下肢切断に至れば、その生命予後は大腸癌の自然予後より悪いこと。
- 3) 臨床投与と同じベクター、同じ投与経路、ベクターに感受性のある複数の動物種で行った安全性試験により予測される生体反応（免疫原性他）は比較的軽度であること。

と考えられ、リスク／ベネフィット比はかなり低いと考えられます。

6. 対象疾患の患者の虚血肢は、血行不良のために感染しやすい状態にあること、さらに、壊疽を起こしているなど、すでに感染状態にあることが予想されるが、投与によって感染部位が拡大するなどの恐れがあるが、安全性確保の観点から、検討がなされているか。

(回答)

御助言、感謝致します。

まず非感染状態の患者への投与に関し、3日間の抗生剤予防投与を行う旨、プロトコールに追加を致しました。

既に感染のある患者について、

- (1) 易感染性である糖尿病性下肢壊疽は今回のプロトコールから除外しております。
- (2) 潰瘍部から感染が全身、あるいは肢全体に波及している場合は、除外項目8)

- 活動性の炎症性疾患、に相当するため、今回のプロトコールから除外致します。
- (3) 感染が潰瘍部に限局している場合、(2)に該当した患者で抗生剤投与などにより感染がコントロールでき、さらに本人および家族に臨床研究参加の強い要望がある場合、感染拡大の危険性について十分なインフォームド・コンセントを行った上で、厳重な管理のもとで研究を実施する予定としております。

以上に関する具体的な記載を「遺伝子治療実施計画概要書10ページ」、「臨床研究実施計画申請書6～7ページ、37～38ページ」に加え、改訂致しました。

7. レトロウイルスベクターを用いた臨床研究において、重大な有害事象が生じていることを踏まえ、本臨床研究において直接関わらないとしても、事態の重大性に鑑み、遺伝子治療一般の情報として同意書に記載するとともに、患者に説明する必要があるのではないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

本件に関する記載を「説明書」に追加させて頂きました。詳細は「新旧対照表」を御参照下さい。

8. 本治療研究に伴う各検査項目について、内容や頻度など、具体的な情報を同意書に記載するとともに、患者に説明する必要があるのではないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

本件に関する記載を「説明書」に追加致しますと相当量になりますので、検査内容に関する別冊を作成することと致しました。添付資料として添付致します。

なお本別冊の内容(検査内容、頻度などを含む)は、九州大学医学部附属病院内TRC(Translational Research Coordinating)チームの意見や各領域の専門家(放射線科、眼科、臨床検査、ウイルス学など)の意見をもとに、随時微調整が行われる予定であります。

9. 協力研究者に、医師以外の関係者としてベクター開発企業の方が参加しているが、本治療研究に関わる情報の一部、もしくは全部を知りうることを同意書に記載するとともに、患者に説明する必要があるのではないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

本件に関する記載を「説明書」に追加させて頂きました。詳細は「新旧対照表」を御参照下さい。

10. 同意書の【はじめに】および【治療の実施方法】において、「お勧めする」という記述は、他の治療法と比較し、決定するのは患者自身であることから、表現を改める必要はないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

表現は全て「ご紹介する」と変更させて頂きました。

11. 同意書の【治療に用いるベクター】(3)において、「あなたの染色体の遺伝子に入り込むことがないことが既に証明されています」という記述は、理論的及びこれまでの研究から推測されることであり、表現を改める必要はないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

表現を改めました。詳細は「新旧対照表」を御参照下さい。

12. 同意書の【治療に用いるベクター】(3)において、「医薬品としての厳しい国際基準による審査を合格したもの」という記述は、医薬品として承認されたものとの誤解を生じさせることが懸念されるため、表現を改めるべきである。

(回答)

御助言、感謝致します。

表現を改めました。詳細は「新旧対照表」を御参照下さい。

13. 同意書の【治療に用いるベクター】(3)において、「既に同じものをサルに投与して重大な副作用がなかったことが確認されています」という記述は、FGF-2 遺伝子を組み込んだベクターによる毒性試験を行った上で記載すべきではないか。

(回答)

「FGF-2 遺伝子を組み込んだベクターによる毒性試験 (カニクイサル)」は既に実施しており、本件に関するデータ・報告書は既に提出済みであります。

今一度御確認下さい。なお、本データは今回さらに追加資料 14 として再提出させていただきます。

14. 同意書の【治療に用いるベクター】(3)において、「ヒトにおける経験が浅いことも確かです」という記述は、ヒトの臨床において初めて用いられることを踏まえた表現に改める必要はないか。

(回答)

御助言、感謝致します。

表現を改めました。詳細は「新旧対照表」を御参照下さい。

以上。



医学部倫理委員会委員長からの承認の通知

平成14年 9月27日

九大医庶第 334 号

平成14年 9月27日

九州大学医学部附属病院長 殿

医学部倫理委員会委員長 居石克夫

遺伝子治療臨床研究の承認について（通知）

平成13年8月30日付け九大院庶第548号で申請のありました、下記臨床研究について、遺伝子治療臨床研究審査専門委員会において審査を行った結果、研究計画の実施が適当と認められました。

遺伝子治療臨床研究審査専門委員会における審査結果に基づき、医学部倫理委員会において、当該臨床研究計画について審議した結果、平成14年9月26日開催の委員会でこれを承認しましたのでお知らせします。

記

血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載非伝播型組み換えセンダイウィルスベクターによる慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）に対する血管新生遺伝子治療臨床研究

申請者 消化器・総合外科学分野 助教授 前原喜彦  
病理病態学分野 教授 居石克夫