



別紙様式第1の別添

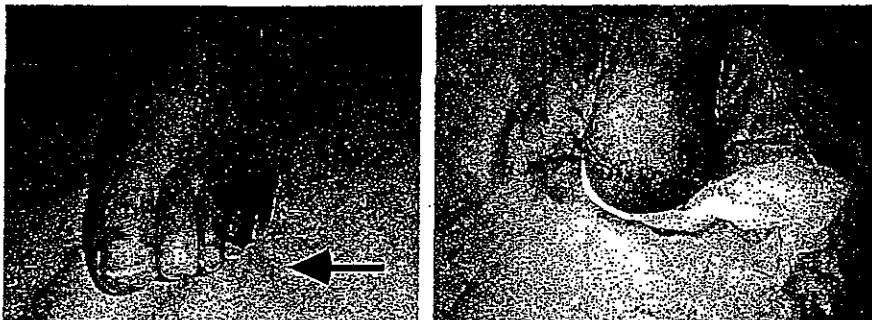
遺伝子治療臨床研究 実施計画 概要書

H14年 10月 28日	(申請年月日)
H15年 9月 1日	(第1回改訂)
H16年 10月 12日	(第2回改訂)
H17年 3月 14日	(第3回改訂)
H17年 9月 28日	(第4回改訂)

研究の名称		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換えセンダイウイルスベクターによる慢性重症虚血肢(閉塞性動脈硬化症、パージャヤ病) に対する血管新生遺伝子治療臨床研究	
研究実施期間		平成 年 月 日(承認日) から36ヶ月間	
総括責任者	所属部局の所在地	福岡市東区馬出3丁目1-1(郵便番号812-8582)	
	所属機関・部局・職	九州大学病院 第2外科・科長 九州大学大学院医学研究院 消化器・総合外科学・教授	
	氏名	前原 喜彦(まえはら よしひこ) ; 	
実施の場所	所在地	福岡市東区馬出3丁目1-1(郵便番号812-8582)	
	名称	九州大学病院 第2外科病棟、冠動脈疾患治療部遺伝子治療室	
	連絡先	福岡市東区馬出3丁目1-1(電話番号092(642)5461)	
総括責任者以外の研究者	氏名	所属機関・部局・職	役割
	居石 克夫	九州大学大学院医学研究院・病理病態学・教授	副総括責任者、基礎分野、臨床研究の評価と総括 副総括責任者、臨床分野 臨床研究の評価と総括 臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進 臨床分野からの研究計画の推進 ベクターの設計、構築、管理、基礎分野からの研究計画の推進
	砂川 賢二	九州大学大学院医学研究院・循環器内科学・教授	
	小野原俊博	九州大学病院・第2外科・講師	
	江頭 健輔	九州大学病院・循環器内科・講師	
	米満 吉和	九州大学大学院医学研究院・病理病態学・助教授	
協力研究者	<p>(九州大学病院)            本田 浩(放射線科・教授)、高橋成輔(麻酔科蘇生科・教授)、古山 正(第2外科・医員)、池田康博(眼科・助手)</p> <p>(九州大学大学院医学研究院)            柳 雄介(ウイルス学・教授)、中川和憲(病理病態学・講師)、岡野慎士(病理病態学・助手)、鬼丸満穂(学術研究員)、金 成豪(学術研究員)、高野壮史(大学院生)、金子和裕(大学院生)、井口博之(大学院生)、藤井孝明(大学院生)、竹下寛子(テクニカルスタッフ)</p> <p>(外部研究協力者)            永井美之(富山県衛生研究所・所長、名古屋大学名誉教授)            古森公浩(名古屋大学血管外科・教授)、今泉 勉(久留米大学第3内科・教授)            室原豊明(名古屋大学器官制御内科・教授)            加藤 篤(国立感染症研究所・ムンプス感染研究部・室長)            長谷川謙(ダイナベック株式会社・代表取締役社長)</p>		

審査委員会 が研究計画 の実施を適 当と認める 理由	<p>審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画概要書、実施計画書を慎重に審査した結果、本遺伝子治療臨床研究計画は平成14年文部科学省・厚生労働省告示第一号（「遺伝子治療臨床研究に関する指針」平成14年3月27日告示）の必要条件を満たしていることを認めた。</p> <p>さらに動物実験における前臨床試験成績から、従来の治療法では対処困難である対象疾患に対し治療効果が十分に期待できること、さらに本研究で使用される組換えウイルスの品質及び安全性は十分に評価できるものであることを認めたため、所轄官庁に臨床研究実施計画を申請することを決定し、平成14年10月28日付で申請書類の提出を承認した。</p>	
	<p>以後、厚生科学審議会科学技術部会末梢血管疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会において、計3回に渡る慎重な審議（平成15年2月17日、同16年6月17日、同17年2月7日）が行われ、同委員会より送付された照会事項・指示事項に則り、臨床研究実施プロトコールの一部変更、さらに最新の法令等（文部科学省・厚生労働省告示第二号「遺伝子治療臨床研究に関する指針」平成16年12月28日告示、等）に準拠し臨床研究実施計画書が全面的に改訂され、総括責任者より再度審査委員会に付議された。</p> <p>審査委員会では、改訂された臨床研究実施計画書を慎重に検討した結果、改訂は適当と判断し、改訂した実施計画書を所轄官庁へ提出することを承認した。</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
九州大学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会・委員長 九州大学大学院医学研究院 分子細胞生化学・教授	竹重 公一朗	
研究の区分	遺伝子治療臨床研究	遺伝子標識臨床研究

研究の目的	<p>Fontaine III・IV度の重症虚血肢による肢切断は、QOLの悪化のみならず生命予後も<u>進行大腸癌</u>より悪い重篤な疾患であり、有効な治療法は確立していない。</p> <p>我々は独自に開発したセンダイウイルスベクターによる血管新生因子（塩基性線維芽細胞増殖因子：FGF-2）を用いた遺伝子治療が下肢重症虚血の救肢に最も効果的であることを動物実験で見出した。</p> <p>本臨床研究計画では、1）ヒトにおけるSeV/dF-hFGF2投与の安全性を明らかにし（<u>主要エンドポイント</u>）、2）臨床効果を示すと考えられる投与量を決定する（<u>副次エンドポイント</u>）ことを目的とする。</p>
-------	--

対象疾患 及び その選定理由	<p><u>1. 対象疾患</u></p> <p>閉塞性動脈硬化症あるいは閉塞性血栓性動脈炎患者 [Fontaine III度あるいはIV度（<u>Rutherford慢性虚血肢重症度分類III度6群を除く</u>）] で、人工血管あるいは自家静脈グラフトによる大腿動脈以下の血行再建術の適応がなく、2週間の継続した薬物療法で改善が見られない患者、かつ40歳以上の症例。</p>
	
	<p>Fontaine IV度の虚血性壊死      同一患者の下腿切断術後</p> <p><u>2. 対象疾患の選定理由</u></p> <p>閉塞性動脈硬化症などによる重症虚血肢は、患者の生活（QOL）を大幅に制限し長期臥床を強いることにより、下肢のみならず全身状態ひいては生命予後の悪化の原因となっている。</p> <p>最近の手術・薬物療法の進歩により、虚血肢の予後は向上したものの、膝窩動脈以下へのバイパス手術成績は5年開存率40%程度と、今なお十分な成績は得られていない。さらに、末梢側の病変が強くバイパス術の適応にならない場合や他臓器における動脈硬化進行のため全身状態が不良で耐術し得ない場合も多く、やむを得ず肢切断に至る症例も数多く存在する。また肢切断に至った症例の生命予後は極めて不良である。</p>

対象疾患 及び  
その選定理由  
(続き)

重症虚血肢 (Fontaine III-IV) 治療に関する多施設試験成績  
Eur J Vasc Endovasc Surg 1997

69施設 574症例 追跡 2年  
(イタリアI.C.A.I Study)  
1次切断率 9.4%

血行再建施行可能 (44.4%)
血行再建不可能 (55.6%)

3ヶ月後

死亡 50例 (8.7%)	下肢切断 70例 (12.2%)	症状持続 103例 (17.9%)
------------------	---------------------	----------------------

2年後 **最終死亡率 31.6%**

これら重症虚血肢に対し、血管新生を促す増殖因子をタンパク、あるいは遺伝子として血管内、あるいは骨格筋へ投与することにより、側副血行路を増加させるという新しい治療法 (治療的血管新生、血管新生療法: Therapeutic Angiogenesis) が注目されている。

遺伝子治療に関しては、米国ではヒト血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の遺伝子を持つプラスミドによる遺伝子治療臨床試験が進行中であり、また我が国では大阪大学のグループが肝細胞増殖因子 (HGF) を用いた同様のプロトコールの第I・IIa相試験を終了、第III相試験を開始した。

タンパク療法、遺伝子治療を含め、既に報告されている第I・II相の初期試験では、血管新生療法の有効性を示唆する成績が得られているものの、症例数を増やした多施設2重盲検試験 (第IIb相以降) では、有効性を明確に証明した試験はない。このような成績の矛盾は、循環器系疾患に対する薬剤試験によく見られるプラセボ効果によるものと考えられている。

我々は以上の背景のもと、「より効果が高く、より安全な血管新生療法の開発」を目指し、種々の検討を加えた結果、独自に開発した組換えウイルスベクター (SeV) の筋肉内注入により、1) プラスミドによる遺伝子発現より少なくとも50-500倍高い遺伝子発現を得ることができると、2) VEGF遺伝子は安全域が狭いが、線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は明確な副作用を認めず安全域が広いこと、3) FGF-2は慢性虚血肢のみならず急性重症虚血肢にも高い救肢効果が認められること、4) 治療効果を示す発現レベルでの副作用はほとんど認められないこと、を動物実験にて見出した。

以上の成績から、SeVによるFGF-2を用いた虚血肢への遺伝子治療は、他で実施されているプロトコールと比較して、さらに効果が高い治療法になる可能性があると考えられたため、今回の申請に至った。

遺伝子の種類及び  
その導入方法

1. ヒトに導入するヒトFGF-2遺伝子の構造、性質、活性  
(遺伝子の構造)

以下に実際にヒトに投与するベクター (SeV/dF-hFGF2) を再構成する際に使用されるテンプレートベクターに組み込まれているヒトFGF-2のタンパクコード領域の塩基配列を示す。この配列はGeneBankに登録されているヒトFGF-2 cDNA配列と100%一致することが、塩基配列解析で確認されている。

(Kurokawa, T et al. FEBS Lett. 213:189-194, 1987.

accession No. M27968)

```
atggcagccgggagcatcaccacgctgcccgacctgcccaggatggcggcag
gcggcgacctcccgcccggccacttcaaggaccacaagcggctgactgcaaa
aacgggggcttcttctgcgcatccaccccgacggcggagttgacgggggtccg
ggagaagagcgacctcacatcaagctacaacttcaagcagaagagagagga
gttgtgtctatcaaaggagtgtgtgtaaccgttacctggctatgaaggagatg
gaagattactggcttctaaatgtgttacggatgagtgttctttttgaacgattgg
aatctaataactacaatactaccggtcaaggaaatacaccagttggtatgtggc
actgaaacgaactgggcagataaaacttgatccaaaacaggacctgggcaga
aagctatacttttcttccaatgtctgctaagagctga
```

本塩基配列はセンダイウイルスゲノムコードタンパクの一部として発現されるため、実際に投与される場合は、相補的RNA配列として投与されることになる。

(導入遺伝子からの生成物の構造および生物活性)

以下に上記遺伝子により発現されたヒトFGF2タンパクのアミノ酸配列を示す。

```
MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFF
LRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERG VVSIKGV CAN
RYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFERLESNNYNTYRSRKY
TSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQGKAILFLPMSAKS
```

ヒトFGF2タンパクは154個のアミノ酸からなる等電点9.6、分子量18kDの一本鎖ポリペプチドで、ヘパリン結合能があり、いわゆる古典的分泌シグナルを有しない。しかし種々の細胞で実際に分泌されていることが確認されており、我々もヒトFGF-2をコードするセンダイウイルスベクターを感染させた種々の培養細胞が高いレベルのFGF-2タンパクを分泌することを確認している。

FGF-2は種々の間葉系細胞の増殖を促進するが、その中でも最も特徴的な作用は、血管内皮細胞の増殖促進・管腔形成の促進作用である。これらの作用は培養細胞のみならず、動物個体局所での作用も確認されている。FGF2は血管平滑筋細胞を含む種々の細胞でVEGFの発現を亢進し、血管新生に関与する

(Circulation 1995, Circ Res 2002, 2004, 他)。

<p>遺伝子の種類及びその導入方法 (続き)</p>	<p>また、我々はFGF-2は同様にHGFも誘導し、血管新生に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Circ Res 2002)。</p> <p>FGF-2は細胞外に放出された後、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し安定化される。我々はさらに生体内でのFGF-2の安定化にヒアルロン酸も重要であることを明らかにした (J Immunol 2002)。FGF-2の遊離にはFGF-BPやCYR61が関与し、遊離FGF-2が生理作用を発現すると考えられている (Oncogene 1997、1998、Nature Med 1997)。</p> <p><b>2. 遺伝子導入方法の概略</b> (ベクターの生産)</p> <p>既知の方法により (Li et al. J Virol 2000) ヒトFGF-2 遺伝子搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクター (SeV/dF-hFGF2) をGMP生産基準に準拠した方法で、海外委託企業 (BioReliance社: 英国スターリング) において委託生産を行い、国内に輸入する。</p> <p>(遺伝子導入方法)</p> <p>2度にわたる十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに<u>家族 (あるいは親族) の文書による同意</u>を得た後、以下の方法によって臨床試験を実施する。</p> <p>1) 術前に手術室にて腰椎硬膜外持続麻酔チューブを挿入し、前日よりソル・メドロール125 mg、<u>抗生物質</u>を点滴静注する。以後3日間点滴を継続する。</p> <p>2) 術当日、23ゲージ注射針にて大腿および下腿に計20-30ヶ所、ベクター液を注入する。<u>注入部位は血管造影所見に基づき、概ね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。ベクター液はベクター力価漸増式に4段階 (5x10<sup>7</sup>, 2x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>9</sup>, 5x10<sup>9</sup>ciu/60 kg) 設定し、各ステージの安全性を注入後少なくとも28日目までのデータを基に九州大学病院先進医療適応評価委員会にて確認できた後、次ステージを開始する。</u></p>
<p>安全性についての評価</p>	<p><b>1. 遺伝子導入方法の安全性</b></p> <p>1) ベクターの純度と安全性： GMPグレードのベクターの生産、精製、供給はBioReliance社により行われる。同社が生産したウイルスベクター (レトロウイルス、アデノウイルスを含む) は、これまで<u>海外での多数の遺伝子治療臨床試験</u>に使われており、十分な実績を有する。</p> <p>2) 増殖ウイルス出現の可能性 非伝播型センダイウイルスベクターは感染に必要なF蛋白を欠損しており、理論的に<u>感染性2次粒子</u>は放出しない。これは培養細胞レベルの実験で明らかにされている (J Virol 2000)。またセンダイウイルスは野生型と相同組み換えを起こすことは、理論的にないと考えられている。</p>

安全性について  
の評価  
(続き)

### 3) 組換えセンダイウイルスベクターの細胞傷害性

培養系において、いくつかの細胞では、ウイルス量依存的細胞傷害性 (cytopathic effect: CPE) が報告されており、また一部の培養細胞ではアポトーシスを起こすことも報告されている。但し、血管内皮細胞などでは、一時的な細胞傷害様所見を示すが、細胞死に至らずに次第に増殖が回復してくるものも存在する (FASEB J 2001)。

筋肉内投与においては、筋肉の壊死など、組織学的に重篤な細胞傷害性がないことは、マウス、ラットなどの小動物に対する投与実験にて確認した。

カニクイサルを用いた安全性試験 (SeV/dF-lacZ、SeV/dF-hFGF2) を使用：遺伝子治療臨床研究実施計画書22～24 ページ・安全性に関連する研究の成果 [添付資料] を参照) においても、組織学的に筋組織の壊死など重篤な副作用がないことは確認されている。

### 4) 標的細胞以外への遺伝子導入の可能性

センダイウイルスは多くの哺乳動物細胞へ感染可能であるため、筋肉以外の臓器への遺伝子導入が危惧されたが、マウスを用いた成績では、 $10^7$  ciu/30g までの筋肉内投与 (luciferase 遺伝子搭載付加型ベクター) では他臓器での遺伝子発現は確認できなかった。血液成分と本ベクターを混じた実験では、ウイルスの急激な不活化が観察され、一般的な非働化操作 (56℃、30分過熱) を施した全血、血清、血漿でこの効果が消失したため、ベクターの不活化には補体が発現していることが推察される。

カニクイサルを用いた安全性試験 (SeV/dF-lacZ、SeV/dF-hFGF2) を使用：遺伝子治療臨床研究実施計画書22～24 ページ・安全性に関連する研究の成果 [添付資料] を参照) においても、少なくとも全実験期間を通じて血液中、尿中にベクター由来の遺伝子配列を検出することはできなかった。

### 5) 患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性

厚生労働省吉川班によるカニクイサルを用いた水平感染に関する検討 (増殖伝播型組換えセンダイウイルスベクターを使用) では、同一ケージ内で飼育された非感染動物への水平感染は認められなかった。

本臨床研究においては、さらに安全性を確保するため、また生物学的多様性への影響を最小限にするため、ベクター投与後少なくとも1週間は陰圧で制御されている遺伝子治療室にて患者を管理する。排泄物よりベクターが検出されない (RT-PCR法、血球凝集法にて検定) ことを確認した後に、陰性の場合にのみ一般病棟へ移送する。

<p>安全性についての評価 (続き)</p>	<p>6) 染色体内への遺伝子が組み込まれる場合の問題点 非伝播型組換えセンダイウイルスベクターは細胞質で転写・複製が行なわれるため、宿主染色体と相互作用を行なわない。よって染色体内へ遺伝子が組み込まれることは理論的にないと考えられる。</p> <p>7) がん原性の有無 上記のごとく、非伝播型組換えセンダイウイルスベクターは細胞質で転写・複製が行なわれるため、宿主染色体と相互作用を行なわない。よって染色体内へ遺伝子が組み込まれることは理論的になく、宿主がん遺伝子の活性化などの危険性はレトロウイルスベクターなどと比較して低い。 またセンダイウイルスの構造蛋白に関しては、宿主細胞の細胞周期制御蛋白や細胞内増殖シグナルを活性化することを示した報告はなく、事実我々のセンダイウイルスベクターを投与した経験においても、細胞が増殖亢進を示した例は全くない。</p>
<p>遺伝子治療臨床研究の実施が可能であると判断する理由</p>	<p><u>前臨床効能試験成績より考察すると、本臨床研究計画は既存の血管新生療法と比較してさらなる高い有効性が期待できる。ヒトに対し非病原性ウイルスをベクターの基本骨格として用いていること、ベクターゲノムが宿主染色体との相互作用をしないことなどから、発がんの可能性や子孫への影響に関する理論的危険性も低いと判断される。さらに各種安全性試験成績より、本研究計画で使用を想定している投与量であれば、免疫反応を含む生体への影響は比較的低いであろうと予測される。</u></p> <p><u>既に本臨床研究に使用するベクターのGMP生産と生産物の検定試験は終了しており、九州大学病院冠動脈疾患治療部内には既に遺伝子治療専用病室(遺伝子治療室)を設置している。さらに九州大学病院第2外科は、重症虚血肢に関する永年の豊富な診療経験と優れた診断技術・治療成績、経験豊富なスタッフを擁しており、本臨床研究の対象となる患者も多く診療している。</u></p> <p>以上から本遺伝子治療臨床研究は実施可能であると判断する。</p>