

遺伝子治療臨床研究 実施計画書

最終確定：平成17年 9月28日

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、バージャー病）に対する
血管新生遺伝子治療臨床研究

九州大学病院

目次

1. 遺伝子治療臨床研究の名称	1
2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割	
(1) 総括責任者の氏名及び担当する役割 (分担事項)	1
(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及び担当する役割 (分担事項)	1
① 分担研究者	1
② その他の協力研究者	1
3. 実施施設の名称及びその所在地	3
4. 遺伝子治療臨床研究の背景と目的	3
5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由	3
(1) 研究区分	3
(2) 対象疾患に対する現時点での知見	3
(3) 当該遺伝子治療臨床研究の概要	6
① 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の作製	6
② 遺伝子導入法	6
③ 対象患者	7
④ 除外基準	7
(4) 他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由	7
① 他の治療法との比較	7
② 遺伝子治療を選択した理由	7
(5) 研究等における倫理的配慮について	8
① 研究等の対象とする個人の人権擁護	8
② 研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法	8
③ 研究等によって生ずる個人への不利益並びに危険性、及び医学上の貢献の予測	8
6. 遺伝子の種類及びその導入方法	9
(1) ヒトに導入する遺伝子の構造と性質	9
① ヒトに導入する遺伝子の構造と性質	9
② 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性	10
(2) 本研究計画で使用するその他の DNA の構造と性質	10
(3) 標的細胞とした細胞の由来並びに当該細胞を標的細胞とした理由	10
(4) 遺伝子導入方法の概略及び当導入法を選択した理由	11
① 遺伝子導入方法の理論的根拠	11
② 遺伝子導入方法の概略	11
③ 使用するベクター (担体) の作製方法	11
④ 使用するベクター (担体) の構造	12
⑤ 使用するベクター (担体) の生物学的特徴	12
⑥ 実施施設における当該遺伝子治療臨床研究に関する研究成果	13
A. 培養細胞を用いた研究成果	13
B. 実験動物を用いた研究成果	14
7. 安全性についての評価	16
(1) 遺伝子導入方法の安全性	16
① 遺伝子導入に用いるウイルスベクター (担体) の純度	16

②患者に投与する物質の純度及びその安全性	17
③増殖性ウイルス出現の可能性	20
④遺伝子導入に用いるウイルスベクター（担体）の細胞傷害性	20
⑤体内の標的細胞以外への遺伝子導入の可能性	20
⑥患者以外のヒトに遺伝子が導入される可能性	20
⑦染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点	21
⑧がん原性の有無	21
(2) 遺伝子産物の安全性	21
(3) 安全性に関連する研究の成果	21
①マウスを用いた炎症性サイトカイン誘導に関する予備的検討	21
②カニクイサルを用いたレポーター遺伝子（大腸菌 lacZ 遺伝子）搭載非 GMP 生産 非伝播型ベクター（SeV/dF）による安全性試験（添付資料）	22
③カニクイサルを用いたヒト FGF-2 遺伝子搭載非 GMP 生産非伝播型ベクター （SeV/dF-hFGF2）による安全性試験（添付資料）	22
8. 遺伝子治療臨床研究が実施可能であると判断した理由	24
9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画	24
(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画	24
(2) 被験者の選定基準及び除外基準	26
(3) 被験者の同意の取得方法	28
(4) 実施期間及び目標症例数	28
(5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法	29
①対照群の設定方法	29
②遺伝子導入方法	30
③前処置及び併用療法の有無	30
④臨床検査項目及び観察項目	30
⑤予想される副作用及びその対処方法	33
A. 本臨床研究において、特有に見られる可能性がある副作用	33
B. これまでの国内外の報告から、遺伝子治療一般に比較的良好に見られる軽い 副作用	34
C. これまでの国内外の報告から、まれではあるが遺伝子治療に見られた比較的強い と考えられる副作用	34
D. その他、本臨床研究の実施における、評価等の検査に付随して起こりえる 副作用	35
E. 有害事象等重大事態発生時の報告等について	35
⑥遺伝子治療臨床研究の評価方法、評価基準及び中止判定基準	35
A. 効果に関する判定に必要な検査項目（別紙6）	36
B. 安全性に関する判定に必要な検査項目（別紙6）	37
C. 臨床研究の中止判定基準	38
⑦症例記録に関する記録用紙等の様式	39
⑧記録の保存及び成績公表の方法	39
(6) 本臨床研究における個人情報保護	39
①個人情報保護における責務	39
②個人情報の取得と利用に関する制限	39
1) 診療・教育機関としての九州大学病院における個人情報の一般的な取扱い	39
2) そのた本臨床研究の遂行に必要な被験者の個人情報の利用・取扱い	40
③個人情報保護に関する安全管理措置	40
④委託者等の監督	40
⑤第三者提供の制限	41

⑥個人情報の開示、訂正、利用停止等	41
10.当該遺伝子治療臨床研究に関連する国内外の研究状況	41
(1) 国内外におけるセンダイウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究	41
①英国におけるセンダイウイルスベクターを用いた遺伝子治療臨床研究計画	41
(2) 国内外における虚血性疾患に対する血管新生療法（遺伝子治療を含む）	41
①国内における下肢動脈閉塞性疾患への遺伝子治療臨床研究	41
②米国における下肢動脈閉塞性疾患への遺伝子治療臨床研究	42
③米国におけるアデノウイルスベクターと VEGF121 による下肢動脈閉塞症 (Fontaine IIb) への遺伝子治療臨床研究	42
④FGF-2 タンパクによる虚血肢あるいは虚血性心臓病への治療	42
⑤FGF-2 徐放化製剤による虚血性心疾患への治療	42
11.当該遺伝子治療臨床研究に関連する実施施設の状況	42
12.その他必要な事項	43
(1) 患者への説明・同意書（第1回目）	44
(2) 患者への説明・同意書（第2回目）	69
(3) 総括責任者及び主な分担研究者の経歴	94
(4) 参考文献リスト	101
(5) 別紙	
別紙1：九州大学病院先進医療適応評価委員会規定(案)、内規（案）	
別紙2：効果判定委員会手順書	
別紙3：実施計画書作成・改訂の流れ（フローチャート）	
別紙4：重大事態発生時の流れ（フローチャート）	
別紙5：その他審査の流れ（フローチャート）	
別紙6：検査項目一覧表	
別紙7：九州大学病院先進医療適応評価委員会に関わる様式	
別紙8：効果判定委員会に関わる様式	
別紙9：九州大学個人情報管理規程	
別紙10：九州大学病院個人情報保護規程	
別紙11：九州大学個人情報開示等取扱規程	
(6) 図表	

平成14年10月28日(申請年月日)
平成17年 月 日(改訂年月日)

遺伝子治療臨床研究 実施計画書

1. 遺伝子治療臨床研究の名称

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、パージャヤー病)に対する血管新生遺伝子治療臨床研究

(英文標記) Phase I and IIa, Dose Escalation, Non-Randomized, Safety and Efficacy Evaluation Clinical Study for Angiogenic Gene Therapy to Treat Patients with Critical Limb Ischemia via Intramuscular Injection of Non-Transmissible Recombinant Sendai Virus Expressing Human Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Gene.

2. 総括責任者及びその他の研究者の氏名並びに当該遺伝子治療臨床研究において果たす役割

(1) 総括責任者の氏名及び担当する役割(分担事項)

前原喜彦 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
(臨床研究実施及び全体の総括)

(2) 総括責任者以外の研究者の氏名及び担当する役割(分担事項)

① 分担研究者

居石克夫 九州大学病院・病理部・部長
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)

砂川賢二 九州大学病院・循環器内科・科長
九州大学大学院医学研究院・循環器内科学・教授
(副総括責任者:臨床分野、臨床研究の評価と総括)

小野原俊博 九州大学病院・第2外科・講師
(臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進)

江頭健輔 九州大学病院・循環器内科・講師
(臨床分野からの研究計画の推進)

米満吉和 九州大学大学院医学研究院 病理病態学・助教授
(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)

② その他の協力研究者

九州大学病院・放射線科・科長
教授 本田 浩(画像診断による外部評価)

九州大学病院・麻酔科蘇生科・科長
教授 高橋成輔(麻酔への協力と外部評価)

九州大学大学院医学研究院・ウイルス学
教授 柳 雄介(ウイルス学的外部評価)

ディナベック株式会社
代表取締役社長 長谷川 護
(非伝播型組換えセンダイウイルスベクターのベクター学に関する基礎的助言)

富山県衛生研究所所長・名古屋大学名誉教授
永井美之（ウイルス学的外部評価）

国立感染症研究所・ムンプス感染研究部
室長 加藤 篤（ウイルス学的外部評価）

久留米大学医学部・第3内科
教授 今泉 勉（研究協力および外部評価）

名古屋大学大学院医学系研究科・血管外科学
教授 古森公浩（研究協力および外部評価）

名古屋大学大学院医学系研究科・器官制御内科学
教授 室原豊明（研究協力および外部評価）

九州大学病院

助手（眼科） 池田康博（研究実施協力）
医員（第2外科） 古山正（研究実施協力）

九州大学大学院医学研究院

講師（病理病態学）	中川和憲	（研究実施協力）
助手（病理病態学）	岡野慎士	（研究実施協力）
学術研究員（病理病態学）	鬼丸満穂	（研究実施協力）
学術研究員（病理病態学）	金 成豪	（研究実施協力）
大学院生（消化器・総合外科）	高野 壮史	（研究実施協力）
大学院生（病理病態学）	金子和裕	（研究実施協力）
大学院生（消化器・総合外科）	井口博之	（研究実施協力）
大学院生（病理病態学）	藤井孝明	（研究実施協力）
テクニカルスタッフ（病理病態学）	竹下寛子	（研究実施協力）

3. 実施施設の名称及びその所在地

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
所在地 〒812-8582 福岡市東区馬出3-1-1

4. 遺伝子治療臨床研究の背景と目的

高齢化社会を迎え、我が国の動脈硬化性疾患（閉塞性動脈硬化症、虚血性心疾患、脳血管疾患など）に起因する死亡の総数は悪性新生物を上回り、その対策は国民福祉の向上を図る上で急務である。中でも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に加え、長期療養による医療経済の圧迫の原因となっている。

最近のバイパス手術手技、術中・術後管理、人工血管の材質、そして薬物療法の進歩により、虚血肢の予後は格段に向上したものの、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。

これら重症虚血肢に対し、米国ではヒト血管内皮細胞増殖因子（vascular endothelial growth factor: VEGF）の遺伝子を持つプラスミドを筋肉内に直接注射するという遺伝子治療臨床研究が施行されており、一定の成果が報告されている。また我が国では大阪大学のグループが肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor: HGF）を用いた同様の実施計画書を実施しており、第I・IIa相試験が終了している。これらは重症虚血肢に対する全く新しい治療法として期待されているものの、プラスミドDNAの遺伝子導入効率は低いため、治療効果の限界も予想される。

我々は病態モデル動物などの動物実験で以下のようなことを見出している。すなわち、我々が独自に開発した組換えウイルススペクター（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）遺伝子は明確な副作用を認めず安全域が広いこと、3）FGF-2は、動物病態モデルを用いた場合、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。

本臨床研究は、この九州大学独自の遺伝子治療により、1）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スペクターによる慢性重症虚血肢（Fontaine III・IV度）に対する治療法の安全性（主要エンドポイント）、2）ウイルススペクター量を 5×10^7 ciu/60kg、 2×10^8 ciu/60kg、 1×10^9 ciu/60kg、 5×10^9 ciu/60kg増加した時の本治療法の臨床効果を判定すること（副次エンドポイント）を目的とする。

5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由

(1) 研究区分

遺伝子治療臨床研究

遺伝子標識臨床研究

(2) 対象疾患に対する現時点での知見

<Fontaine III・IV度：いわゆる重症虚血肢治療の現状>

慢性動脈閉塞症に起因する虚血肢の中で、Fontaine II度以上の症状に対する第1選択は手術であるが、Fontaine III度（安静時疼痛）およびIV度（潰瘍、壊死）に分類される、いわゆる重症虚血肢の多くは手術および薬物治療に対して抵抗性が高い(1)。九州大学病院第2外科における臨床成績においても、Fontaine III、IV度の重症虚血肢は血行再建が可能、不可能症例全体の2年以内の肢切断率は30%に近く（不可能症例では50%を超える）、肢切断に至った症例の30%は2年以内に死亡する。このデータはもっとも最近報告されているイタリアにおける多施設試験成績（下図、文献2）とほぼ同様であり、肢切断による生命予後の悪化は運動耐用能の低下と、同疾患における多発性全身性の動脈硬化が相俟って引き起こされるものと考えられている(3)。

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%

このような患者の予後について、我が国においてもほぼ同様の成績が報告されている。例えば、日本血管外科学会雑誌に1992年に報告された集計では、閉塞性動脈硬化症患者5,100例中、安静時疼痛 (Fontaine III) は約10%、虚血性潰瘍 (Fontaine IV) は約12%に認められる。一方、バージャー病患者885例では重症虚血肢患者の比率はやや高く、Fontaine III: 約19%、同IV: 35%と報告されている。これは近年の人工血管材質や薬物療法が現在ほど進歩する以前に行われた1982年の厚生省バージャー病全国集計 (Fontaine III: 約16%、同IV: 約46%) と比較しても、有意な改善が得られているとは言い難い状況である。

重症虚血肢を救肢するためには、現在のところ、動脈をバイパスする手術が最も有効性が高いが、進行した動脈硬化病変やバージャー病などの多発性閉塞を伴う場合、あるいは末梢動脈に還流すべき十分なサイズの血管がない場合があり、直接的なバイパス手術の適応にならない症例も少なからず存在する。この場合、大腿四頭筋を還流する大腿深動脈への血流を増加させる目的で、in-flow バイパス術が施行され、一部の症例での有効性が確認されている(4)。これは下肢筋肉内を走行する側副血行路への血流の増加により救肢が可能であることの理論的根拠であるが、虚血性の骨格筋萎縮のため側副血行路そのものの発達が悪く、本手術の有効性も限界がある。

<虚血肢への新しい治療法として注目されている血管新生療法: その現状>

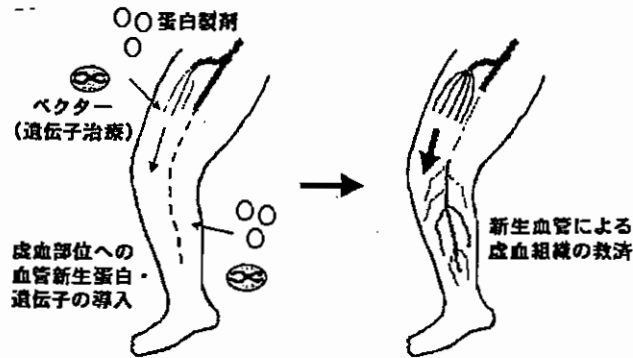
そこで近年注目されているのは、血管新生を促す増殖因子をタンパク、あるいは遺伝子として血管内、あるいは骨格筋へ投与することにより、側副血行を増加させるという新しい治療法 (治療的血管新生: Therapeutic Angiogenesis) である(5)。

血管新生因子を虚血性疾患モデルに対する治療に用いるという最初の実験的報告は、我が国の柳沢らによって1992年に心筋虚血モデルを用いて報告されている(6)。この時に用いられた血管新生因子は初めて血管新生因子として同定された塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、FGF-2) であり、これ以後下肢虚血モデル動物や心筋虚血モデル動物を用いて、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (aFGF、FGF-1)、線維芽細胞増殖因子-4 (FGF-4)、肝細胞増殖因子 (HGF) などの蛋白・遺伝子を用いた血管新生効果、血流回復効果が多数報告されている(2004年最新のレビュー: 7を参照)。

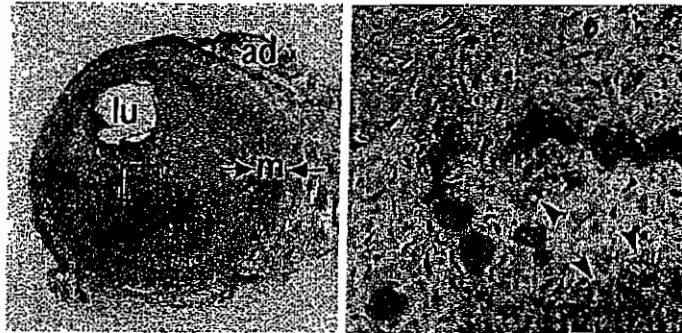
これら動物実験成績を受けて、現在欧米を中心に重症虚血肢 (Fontaine III、IV度) あるいは間歇性跛行肢 (Fontaine II) に対し、血管新生蛋白製剤あるいは血管新生遺伝子による臨床研究が進行しており、血管新生遺伝子治療に限定した場合、2004年7月1日現在、米国で52プロトコルが承認されている (虚血肢: 26、虚血性心疾患: 26、日本遺伝子治療学会 official journal、J Gene Medicine ホームページ - <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。

既に論文として試験結果が報告されているものに限定すると、遺伝子導入ベクターとしてプラスミドベクターあるいはアデノウイルスを用いたものがほとんどであり、治療遺伝子として VEGF 遺伝子、FGF-4 遺伝子、HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) 遺伝子などが用いられている。論文として報告されているものは第 I・II 相の少数例での解析であるが、血管新生遺伝子治療の安全性と一部の症例での効果が報告されている(7)。

治療的血管新生「Therapeutic Angiogenesis」の基本的コンセプト



血管壁へのVEGF遺伝子導入により惹起される血管腫様内皮細胞増生



Yonemitsu Y et al. Lab Invest, 1996

一方で最近、105例の間歇性跛行患者を対象とした無作為2重盲検試験の成績 (VEGF121 遺伝子、アデノウイルスベクターを使用) が報告された (RAVE trial: 文献8)。主要エンドポイントである最大歩行距離の延長を認めることが出来ず、副次エンドポイントである上肢/下肢血圧比 (ABI)、跛行発現距離などについても有効性が認められていない。このような第 I・IIa 相早期試験と第 IIb 相後期 2 重盲検試験成績の有効性データに関する乖離は、循環器系疾患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 (9)。

さらに VEGF に限定すれば、血管新生療法に用いる治療遺伝子としての有用性を疑問視する研究者も多い (10)。VEGF を用いた遺伝子治療臨床研究では多くの症例で投与された下肢に浮腫を生じることが報告されているが (7, 11, 12 他)、これは動物実験でも指摘されており、発現レベルを上げると逆に虚血症状の非改善、さらには悪化を認めることが、我々を含めて報告されている (13, 14)。さらに我々は VEGF が生体内で誘導する新生血管が、形態学的・機能的に未熟な血管 (血管腫様血管増生) であることを初めて報告したが (15)、その後他の研究者からも同様の指摘がなされている (16-18)。

また血管新生遺伝子治療において汎用されているアデノウイルスベクターは、通常種々の臓器・細胞に対し高い遺伝子導入効率を示すが、重症虚血肢治療のための細胞である骨格筋への遺伝子導入効率は比較的低い。これは骨格筋細胞が分化・成熟する過程でアデノウイルスのレセプターであるコクサッキー・アデノウイルスレセプター (CAR) の発現が低下するためと考えられている (19)。さらに最近の研究では、げっ歯類骨格筋に存在する CAR のレベルと比較して、ヒト骨格筋では CAR の発現がほとんど見られないことが示唆されているとのことである (未公開データ: 米国 MedStar Medical Institute, Professor Stephan Epstein より私信)。

米国での無作為2重盲検試験 (RAVE trial) において、アデノウイルスベクターによる VEGF 遺伝子治療の有効性を示すことが出来なかった可能性として以上のような要因が考えられる。従って治療的血管新生療法の効果を明確に示すためには、より有効な治療遺伝子とより効率のよい遺伝子導入ベクターを選択することが重要であると考えられる。

我々は以上の背景をもとに、「より効果が高く、より安全な血管新生遺伝子治療法の開発」を目指し、種々の治療遺伝子を比較検討した結果、病態モデル動物を用いた動物実験では FGF-2 が最も安全域が広く、治療効果も高いことを見出した (14, 20, 21, 未公表データ: 図1)。また FGF-2 の高い治療効果を引き出すために、我々は日本で独自に開発された組換えセンダイウイルスベクター (SeV) を使用するが、既に本ベクターはマウス (14)、ウサギ (21)、サル (非公開データ、添付資料) 骨格筋において高い遺伝子導入・発現効率を得ることが可能であることを明らかにしている。

本臨床研究で用いる非伝播型組換えセンダイウイルスベクターに大腸菌 lacZ 遺伝子およびヒト FGF-2 遺伝子を搭載したもの (SeV/dF-lacZ および SeV/dF-hFGF2) の安全性については非ヒト型霊長類 (サル) において 2 種類の試験を実施、終了しており、少なくともこれらの動物においては重篤な有害事象・副作用が検出されないことを確認した (添付資料)。また GMP 生産ラインにより得られた大腸菌 lacZ 遺伝子およびヒト FGF-2 遺伝子搭載 F 遺伝子欠損非伝播型ベクターによる GLP コンプライアンスによるラット・サルを用いた安全性試験は英国委託企業により実施され、終了しているが、これらの試験においても重篤な副作用あるいは異常な検査値などは見られていない。これら安全性に関わる試験は臨床研究計画と類似のプロトコルで実施されており、本臨床研究の最大投与予定量の 10 倍 (体重当り) 以上の投与において特記すべき安全性上の問題点は見出されていない。

このような動物実験での有効性を示す根拠について、我々は本前臨床研究の過程で、FGF-2 が直接的な血管新生作用のみならず、内因性の血小板由来増殖因子 (PDGF-A) を誘導することにより、VEGF および肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) を内因性に強く発現誘導し、これらと協調して還流効率が高い新生血管を形成することを明らかにした (20, 22)。従って FGF-2 による重症虚血肢に対する遺伝子治療は、いわゆる「multiple angiogenic gene therapy」と同等の効果があると考えられ、それぞれの単独使用のプロトコルと比較して、この目的のための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る。

(3) 当該遺伝子治療臨床研究の概要

① 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の作製

ヒト FGF-2 cDNA は九州大学大学院病理病態学でクローニングされ、その塩基配列が論文報告と 100% 合致したものが、クローン化 F 遺伝子欠損センダイウイルスゲノムへ挿入され、既知の方法にてウイルス回収が行なわれる (23)。本ベクターの生産は欧米で多数の遺伝子治療臨床研究のベクター生産に実績のある、BioReliance 社 (英国・スターリング) に委託し、米国 FDA の基準に合致した good manufacturing practice (GMP) 基準に従って生産されたものを使用する。

② 遺伝子導入法

2 度にわたる十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに家族 (あるいは親族) の文書による同意を得た後、以下の方法によって臨床研究を実施する。なお第 1 回目の同意取得の後に登録された患者の適応は、治療前検査の結果を踏まえ、九州大学病院内に設置する「九州大学病院先進医療適応評価委員会 (本臨床研究に関わらない学内外委員より構成される)」により判定され、その結果を踏まえ第 2 回目の同意取得が成される。

1. 術前に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、抗生物質を点滴静注する。以後 3 日間点滴を継続する。
2. 術当日、九州大学病院外来棟 3 階セルプロセッシングルームに -80 °C にて凍結保管してある組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を封入しているポリプロピレン製クリオチューブを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を溶解する。最新の患者体重を参考に、生理食塩水にて最適に希釈する。
3. 希釈した組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を専用のキャリアパック内に厳重に封入して、保冷下で九州大学病院南棟 3 階冠動脈疾患治療部内遺伝子治療室へ搬入する。
4. 腰椎硬膜外持続麻酔下、23 ゲージ注射針にて下肢の一侧の大腿および下腿に計 20-30 ケ所、組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を注入する。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、下大腿一足関節直上付近までに注入する。なお、ベクター液はベクター力価漸増的に 4 段階設定し、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安全であると判定を受けた後、次ステージを開始する。九州大学病院先進医療適応評価委員会での判定結果については、会議ごとに結果報告書ならびに参加委員全員の署名または記名捺印を受けた出席リストを添付した議事録を作成し、その写しを九州大学病院長へ提出する。九州大学病院長は委員会の結果を受けて通知書を作成し、委員会の記録の写しとともに総括責任者に提出する。またその写しを九州大学医学部倫理委員会および所轄官庁へ提出する。
5. 別紙 6 に掲げるタイムスケジュールで安全性の評価に関する検査 (バイタルサイン、呼吸機能検査、腎機能検査、肝機能検査、一般血液・血清検査、尿検査、ベクターゲノム数測定、センダイウイルス価、センダイウイルス抗体価、血液中サイトカイン濃度、血管新生因子濃度など) を行う。
6. 同意の得られた患者から投与後 2 日目に筋生検により局所の組織細胞を採取し ELISA 法にて遺伝子から発現した蛋白の定量を行う。
7. 別紙 6 に掲げるタイムスケジュールで効果判定に関する検査 (血管造影による側副血行路形成状態の観察、非侵襲的診断法など) を行い臨床症状や血流状態の経過を観察する。

8. 本臨床研究終了後、患者のフォローアップとして九州大学病院において投与後60ヶ月まで追跡調査を行う

③対象患者

以下の条件を満たす患者を対象とする。

閉塞性動脈硬化症あるいは閉塞性血栓性血管炎〔Fontaine III度あるいはIV度（Rutherford慢性虚血肢重症度分類Ⅲ度6群を除く）〕患者で、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症状の改善が見られない患者、かつ40歳以上の症例。

④除外基準

以下に適合する患者は今回の臨床研究の対象としない。

1. 重篤なアレルギーを有する、あるいは既往のある患者
2. 術前に担癌状態が証明されている、あるいは疑われる患者
3. 糖尿病性網膜症患者
4. 慢性人工透析を受けている患者
5. 重症の心機能障害、心不全を有する患者（例：左室駆出率<40%など）
6. 重篤な肝機能障害、肝硬変を有する患者
（例：AST>50 U/L、ALT>50 U/L、ICG 15分値 20%以上など）
7. 腎機能障害を有する患者（例：血清Cr>2.0 mg/dl、CCr<40ml/min）
8. 活動性の炎症性疾患（活動期の膠原病、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、敗血症など）を有する患者
9. 過去5年以内に悪性腫瘍の摘出手術を受けた患者
10. 最近6ヶ月以内に脳出血、脳梗塞などの既往のある患者
11. 血液疾患を有する患者（例：重度の貧血Hb<10g/dl、白血病、再生不良性貧血など）
12. アルコール依存、薬物依存症患者
13. 妊娠中の女性、あるいは妊娠が疑われる女性患者
14. その他、本臨床研究により不利益を受けると予測される患者、および本人ならびに家族（あるいは親族）の文書による同意が得られない患者など、九州大学病院先進医療適応評価委員会が不適当と見なした患者

（注1）高率に腎機能障害など生命維持に関わる臓器障害を持つ症例が多い糖尿病性壊疽の患者は本臨床研究から除外する。但し多臓器合併症を持たずインスリンなどで良好にコントロールされている症例は、本臨床研究計画の対象とする。

（注2）項目8）において、感染が潰瘍部に限局している場合、また下肢に広範囲の感染を認めるものの、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（あるいは親族）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本研究の対象とする。

（4）他の治療法との比較及び遺伝子治療を選択した理由

①他の治療法との比較

前述のごとく、本臨床研究の対象疾患は従来は手術療法、薬物療法に抵抗性であり、他に有効性が証明されている治療手段が存在しない。

本臨床研究計画と同様、治療的血管新生を目的とした、組換え蛋白による治療、骨髄あるいは末梢血単核球細胞移植、他のベクターや治療遺伝子を用いた遺伝子治療なども国内外で試みられているが、現時点でいずれも試験段階のものである。

②遺伝子治療を選択した理由

FGF-2 に関しては、現在組換えタンパクの大量投与による虚血性心疾患への応用が始まっているが（臨床研究あるいは試験段階）、これまでの第I・IIa相早期試験の報告では有効性が示唆されていたものの、患者数を拡大した無作為二重盲検試験においては期待された治療効果は得られていない（9）。これは組換えタンパクの生体内での半減期が極めて短く、構造的に不安定であることが原因であると考えられている（9, 10）。

血管新生因子が有効な効果を示すためには、一定期間局所濃度を維持することが必要であり、

タンパクの投与と比較して組換えタンパクを約1-2週間以上持続的に発現させることができる遺伝子治療の方が望ましいことが指摘されている(9)。またタンパク投与では大量の投与を要するため、全身への散布が確認されており、副作用として低血圧などが報告されている(24)。血中への血管新生因子の散布は、他臓器における潜在癌などの増殖促進を促す危険性が指摘されているが(9, 10)、増殖型センダイウイルスベクターを用いて FGF-2 をマウス骨格筋で過剰(内因性 FGF-2 の 300 倍の発現量)に発現させても、血中には FGF-2 タンパクは検出されなかった(14)。非伝播型センダイウイルスベクターを用いたサル安全性試験でも同様の結果であり(非公開データ、添付資料)、これは細胞外マトリックスに親和性がある FGF-2 本来の性質によるものと考えられる。

以上のように、まだヒトでは検証されていないが、導入遺伝子の局所での持続的な FGF-2 産生は、安全性および効果の両面から大量の組換え蛋白投与より望ましいと考えられる。

以上の背景から遺伝子治療を選択した。

(5) 研究等における倫理的配慮について

①研究等の対象とする個人の人権擁護

本研究実施計画書は下肢虚血性疾患に対する新たな、そしてより有効な治療法の開発を目指したものであり、患者の生命の保護ならびに生活レベルの改善を目指したものである。従って人権擁護に抵触しない。

被験者の秘密保持に関しては、遺伝子治療臨床研究が社会的に広く関心を集めていることをかんがみ、病状経過などについては個人を特定できない状態での公開(学術雑誌、学会、マスコミを含む)することを原則とする。その際は被験者の了承のもとに実施することとし、プライバシーを厳守する。

被験者の診療記録は法律(刑法)で定められた「医師の守秘義務」に則り、九州大学病院にて厳重に管理し、秘密保持を厳守する。

なお、臨床研究の経過をモニターおよびデータマネージメントを行う委託企業(CRO:イービーエス株式会社)からの調査員や関係者が被験者診療記録を閲覧することがあるが、この場合は九州大学病院長と同社の間で秘密保持契約のもとに行われるため、被験者の個人的な情報は守秘される。

さらに、九州大学病院は個人情報に関する苦情等の窓口を設置し、被験者からの苦情や問い合わせに対して迅速に対応できるような体制を整えている。

[個人情報に関する苦情等の窓口]

九州大学病院地域医療連携室 患者様相談窓口

電話: 092-642-5165

FAX: 092-642-5155

②研究等の対象となる者に理解を求め同意を得る方法

下肢虚血性疾患の病態と重症虚血状態が従来の治療法に対し抵抗性であること、本臨床研究の理論的背景と動物実験成績、安全性に関する成績、及び他の開発中の治療法に関して十分な説明を、時期を変えて2度患者本人ならびに家族(あるいは親族)に対して行い、十分な理解を得た上で本臨床研究の被験者となることについて文書により同意を得る。

③研究等によって生ずる個人への不利益ならびに危険性、及び医学上の貢献の予測

本研究に使用される遺伝子はヒト由来のものであり、その遺伝子発現産物は既に欧米において虚血臓器救済のための人体への大量投与実績のあるものである。さらに本遺伝子産物は我国においては潰瘍治療剤として製造販売がなされている(科研製薬:フィブラストスプレー)。本遺伝子あるいは遺伝子産物のヒト生体内投与に関わる致命的な副作用はこれまで報告されていない。

ベクターとして使用される組換えウイルス(F 遺伝子欠損非伝播型組換えセンダイウイルス: SeV/dF)の基盤となるセンダイウイルスは元来ヒトへの病原性が報告されていない他、ウイルスゲノムは感染宿主細胞細胞質内に留まり、細胞質内で治療遺伝子が転写されるため、宿主細胞染色体との組換えを起こすことがないと考えられていることから、遺伝学的な安全性は理論的に高いと予想される。

本臨床研究で用いる非伝播型センダイウイルスベクターの非ヒト型霊長類(サル)での基本的安全性については、レポーター遺伝子(大腸菌 lacZ 遺伝子)ならびにヒト FGF-2 遺伝子を搭載した同ベクターによる検討がなされており、本臨床研究と同様の投与方法において特記すべき安全性上の問題点は見出されていない(添付資料)。

一方、本遺伝子をマウス下肢骨格筋に投与した実験結果では、最大 300-500 ng/g という高い発現

レベルにおいても、血液中に FGF-2 蛋白を検出することは不可能であった (ELISA 法。検出限界: 5 pg/ml)。FGF-2 は細胞外マトリックスやヘパリンへ吸着する活性があるため、発現部位に留まり生理活性を発揮していると推定され、血流中への流出により全身への副作用を惹起する可能性は低いことが示唆される。

万が一の不測の事態 (組換えウイルス抗原やその遺伝子産物に対する過剰な免疫反応など) には、センダイウイルス排除に有効であることが示されている薬剤 (リバビリン、Chemotherapy 1975: 商品名レベントールカプセル) の投与 (1日 600mg-800mg を 1日 2回に分けて連日朝夕食後経口投与する。体重 60kg 以下の場合は 1日 600mg、また体重 60kg を超える場合は 1日 800mg。なお、投与量を 1日 600mg とする場合は朝食後 200mg、夕食後 400mg を経口投与) と共に、アレルギー反応に対する適切な処置を行う。また、小動物において組換えウイルス投与時に一過性の炎症性サイトカイン発現が観察されているため、予防のため本ベクター投与前後にサイトカイン発現を抑制することが既に証明されているステロイド剤の投与を行う。

本臨床研究で本方法の安全性ならびに有効性が確認された場合、本臨床研究に引き続く高次の臨床試験に進むことになるが、それら試験で有効性が証明されれば、下肢虚血性疾患患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) を改善することが可能になり、国民福祉ならびに医療経済への貢献が期待される。

6. 遺伝子の種類及びその導入方法

(1) ヒトに導入する遺伝子の構造と性質

① ヒトに導入する遺伝子の構造と性質

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 蛋白コード領域の塩基配列 (下線部分) を示す。GeneBank に登録されているヒト FGF-2 cDNA の塩基配列は以下の通りであり、ベクターに搭載されている FGF-2 遺伝子の塩基配列はこれに 100%一致することが確認されている。

```

LOCUS       HUMFGFB             3877 bp     mRNA             PRI             08-NOV-1994
DEFINITION   Human basic fibroblast growth factor (FGF) mRNA, complete cds.
ACCESSION   M27968
VERSION     M27968.1  GI:182562•KEYWORDS   basic fibroblast growth factor.
SOURCE      Human foreskin fibroblast, cDNA to mRNA, clone pTB627.
ORGANISM    Homo sapien Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 3877)
AUTHORS     Kurokawa,T., Sasada,R., Iwane,M. and Igarashi,K.
TITLE       Cloning and expression of cDNA encoding human basic fibroblast
            growth factor
JOURNAL     FEBS Lett. 213 (1), 189-194 (1987)
MEDLINE    87162468
FEATURES    Location/Qualifiers
            source          1..3877
                        /organism="Homo sapiens"
                        /db_xref="taxon:9606"
                        /map="4q25-q27"
            mRNA          <1..3877*
            gene          340..807
                        /gene="FGF2"
            CDS           340..807
                        /gene="FGF2"
                        /note="basic fibroblast growth factor"
                        /codon_start=1
                        /protein_id="AAAS2448.1"
                        /db_xref="GI:182563"
                        /db_xref="GDB:G00-119-910"
/translation="MAAGSITLPLALPEDGGSGAFPPGHFKDKPRLYCKNGGFFLRH
PDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLLASKCVTDECF
PFRLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQGKAILFLPMSAKS"
BASE COUNT 1117 a 762 c 817 g 1181 t
ORIGIN      36 bp upstream of BamHI site.
            1 gccagattag cggacgcgtg cccgcggttg caacgggagc ccgggcgctg cagcttggga
            61 ggcggctctc cccaggcggc gtcgcgggag acaaccatcc gtgaacccca ggtcccggec
            121 cgcggctcgc ccgcgcacca ggggcggcgc gacagaagag cggccgagcg gctcgaggct
            181 ggggggacccg gcgcggccgc gcgctgcccg gcgggaggct ggggggcccg gtcggggccc
            241 tgccccggag cgggtcggag gccggggccc gggccggggg acggcggctc cccgcggcgc
            301 tccagcggtc cggggatccc ggcggggccc cgcaggacca tcccaaccqa caaacatcacc
            361 acactaccqa ccttaccqa qaatgacqgc aacqacqact tcccaaccqa ccaacttcaaq
            421 aacccaqaq cacttacttq caaaaacqag qacttcttcc taccatcca ccccaaccqa
            481 caacttcaqa caactcaccqa caaaacqac cctcaccatca aactacaact tcaaacqaqa
            541 caaacqaqaq ttatqctat caaaqaqtg tctgctaacc qttactgac tatqaagaa
            601 caaacqaqaq tactaacttc taactatqtt acqaataaqt qtttcttttt taaacatq
            661 caatctaata actacaatac ttaccqatca aqaaataaca caacttqata tctgacactg

```

721 aaacqaactq qccagataaa acttqgaccc aaaacagqac ctqccagaaa acctatactt
781 tttcttccaa tctctgctaa gaqctgattt taatggccac atcctaattct atttcacatg
841 aaagaagaag tatattttag aaatttgta atgagagtaa aagaaaataa atgtgtaaag
901 ctcagtttg ataatgggc aaacaatttt ttatccagta gtaaaaatag taaccattgt

(以下省略)

本塩基配列はセンダイウイルスゲノムコード蛋白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な RNA 配列として投与されることになる。

② 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性

以下に上記遺伝子により発現されたヒト FGF-2 タンパクのアミノ酸配列を示す。

MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDKPKRLYCKNGGFFLRHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKG
VCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFERLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQKAILFLPMS
AKS

ヒト FGF-2 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、ヘパリンへの結合能があり、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 あるいはマウス FGF-2 をコードする増殖伝播型および F 遺伝子欠損非伝播型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 (14, 一部非公開データ)。

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。我々は動物を用いた実験で、新たに以下のことを明らかにした。FGF-2 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 (14, 25)。また、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 (14, 20)、さらにこのプロセスには PDGF 受容体系が重要であることを明らかにした (22)。

FGF-2 は細胞外に放出された後、ヘパリ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 (26)。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 (27, 28)。

FGF-2 の高発現時における生体への毒性は十分に明らかではないが、ヒト冠状動脈内への大量のタンパク投与の結果によると、一時的なタンパク尿、一過性の血圧低下が認められたものの、重篤な副作用は認められなかったことが報告されている (29)。また FGF-2 のトランスジェニックマウスでは、特に血管系の異常は報告されておらず、主な形態の変化は大きな頭蓋骨と軟骨異常症のみであった (30)。さらに FGF-2 タンパク質製剤は、現在科研製薬から潰瘍治療剤として市販されており (フィブラストスプレー)、既に我が国においても人体への投与実績がある。

(2) 本研究計画で使用するその他の DNA の構造と性質

本臨床研究計画では、F 遺伝子欠損非伝播型組換えセンダイウイルスベクター (SeV/dF) 以外の核酸 (DNA, RNA 共に) は使用しない。本ベクターのベクターゲノムはマイナス 1 本鎖の RNA であるため、患者に投与される遺伝子は全て RNA で投与されることになる。

(3) 標的細胞とした細胞の由来並びに当該細胞を標的細胞とした理由

血管新生遺伝子治療には、当初ハイドロゲルを用いた血管内投与が用いられてきたが (31, 32)、遺伝子導入効率が 0.1% 以下と低く、また多発狭窄病変や石灰化を伴う動脈硬化病変を有する患者では遺伝子導入操作が不可能であるなどの問題点があった。以後、このような制限がなく、血管壁の状態に遺伝子導入効率が左右されない筋肉内投与が主流となっている。

FGF-2 を含め、一般に血管新生因子が生理活性を発揮するためには一定の局所濃度を確保すればよく、一部の細胞で血管新生因子が発現すればパラクライン作用により、局所において新生血管を増加させることが可能であることが、多くの動物実験成績より明らかにされている。

骨格筋は間質の脂肪細胞や線維芽細胞などと比較して、下肢において最も占有体積が大きいためベクター注入が容易である。また血管新生遺伝子治療では血管新生因子の既存血管に対するパラクライン作用がその主たる作用機序であるため、仮に骨格筋細胞以外の間質細胞に遺伝子が導入されても、局所濃度への影響が少ない (つまり効能への影響が理論的に少ない)。従って厳密な細胞ターゲティングを必要としない。さらにセンダイウイルスベクターの骨格筋への遺伝子導入・発現効率は、マウス、ウサギ、サルを用いた試験成績から、効能を発揮するために十分な効率を有すると判断された (14, 20, 21, 22)。

以上の背景から、下肢骨格筋を遺伝子導入の標的細胞として選定した。

(4) 遺伝子導入方法の概略及び当導入法を選択した理由

① 遺伝子導入方法の理論的根拠

本臨床研究で用いる非伝播型組換えセンダイウイルスベクターの基本骨格になる「センダイウイルス Z 株：実験室株」は、我国で最初に分離された、マウスに肺炎を起こすパラインフルエンザウイルスの一種（一本マイナス鎖 RNA ウイルス）であり、ヒトには肺炎を含め、病気を起こしたことはこれまで報告されていない。

本ベクターが従来のベクターと比較して有利な点は、1) 培養細胞、呼吸器、血管壁などにおいて、既存ベクターの中では最も導入効率がよいとされているアデノウイルスベクターと比較して 100-100,000 倍という顕著に高い遺伝子発現を得ることができること (33, 34, 35)、2) レトロウイルスベクターと異なり DNA に変換されず、遺伝子の転写・発現は全て細胞質内で RNA のまま行われること、である。例えば前者について、骨格筋では欧米で使用されているプラスミド DNA 量 1 kg 当たり 50 倍の高用量で得られる遺伝子発現と比較して、相対的に低い感染力価でも 10-500 倍高い組み換えタンパクの発現を得ることができる。また後者は安全性において重要と考えられ、万が一ベクターゲノムが全身に散布され生殖細胞へ移行しても、その遺伝情報は染色体の中に入り込むことがない。これは子孫へ遺伝学上の問題を理論的に起こさない点で重要な性質である。一方でプラスミド DNA は低頻度ながら宿主細胞ゲノムに取り込まれることが最近の研究で明らかにされていることから (36)、宿主遺伝情報のかく乱がないことは、安全性におけるセンダイウイルスベクターの理論的優位性と捉えることができる。

また動物実験から得られた結果から予測して、筋肉内に投与されたベクターと FGF-2 の遺伝子、蛋白は投与後 2 週間で 99% 以上、4 週間で完全に除去されると考えられる。

本臨床研究において用いるベクターでは、筋肉内への直接注入という簡便な方法で治療に要する生理活性として十分と考えられる遺伝子発現を得られることから、本導入法とベクターを採用した。

② 遺伝子導入方法の概略

2 度にわたる十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに家族（あるいは親族）の文書による同意を得た後、以下の方法によって臨床研究を実施する。

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、抗生物質を点滴静注する。以後 3 日間点滴を継続する。

2) 術当日、腰椎硬膜外持続麻酔下 2-3 ゲージ注射針にて下肢の側の大腿および下腿に計 20-30 ケ所、組換え非伝播型センダイウイルスベクター液を注入する。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、下大腿一足関節直上程度に注入する。なお、ベクター液はベクター力価漸増式に 4 段階設定し、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安全性を確認できた後、次ステージの対象症例のエントリーを開始する。

③ 使用するベクター（担体）の作製方法

我々の協力研究者である永井らはまず、このウイルスのうち Z 株の全塩基配列をクローン化し、cDNA からウイルスを再構築することに成功し (37, 38)、外来遺伝子を発現させることに成功した（付加型増殖伝播型ベクター：39）。さらに協力研究者である長谷川らは、感染に必要な膜タンパク（F タンパク）の遺伝子をゲノムより除去し、トランスに供給するシステムを構築し、感染粒子を産生しない「非伝播型センダイウイルス」というベクター用のウイルスの作製に成功した（F 遺伝子欠損非伝播型ベクター：23）。

このベクター構築過程は、(1) 細胞内においてゲノム RNA-タンパク複合体 (RNP) を形成させる過程、(2) RNP を F タンパク発現細胞へ導入し、ベクター粒子を回収する増幅過程、に分けられており、相同組み換えがほとんどないことも影響して、野生型ウイルスの混入は全く認められていない。これは英国のベクター生産委託企業 (BioReliance 社) で行った GMP 生産 3 回のテストランサンプルにおいて全て同様の結果であった。

今回の臨床研究に用いるベクターは、この非伝播型センダイウイルスベクターにヒト FGF-2 を搭載したものであり、BioReliance 社により GMP 生産基準を満たすことを保証されたロットを用いる。同社におけるベクター生産の技術移転は既に終了しており、上述のように既に GMP 生産ラインでの複数ロットのベクター生産を行った実績を持つ。

具体的には、以下の手順でベクター (SeV/dF-hFGF2) 生産を行う。

1) 細胞内において自律複製可能なレプリコンである RNP を形成させる過程

LLC-MK₂ 細胞をペトリ皿で培養後、ソラレン及び UV で不活化した T7 発現ワクシニアウイルス (PLWUV-VTF7-3) を感染させる。血清を含まない MEM 培地で細胞を 2 回洗浄した後、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 cDNA のテンプレートプラスミド

(pSeV¹⁸-hFGF2/ΔF) 及び 4 種の構造蛋白 NP, P, L 及び F を発現する pGEM プラスミド (pGEM-NP, pGEM-P, pGEM-L, 及び pGEM-F) を DNA-SuperFect (QUIAGEN) を用いて細胞に導入する。この細胞を 24 時間培養して培養上清を取り除き、血清を含まない MEM 培地 (トリプシンを含む) に懸濁された F 蛋白質発現細胞 (LLC-MK₂/F7/Ad) 懸濁液を重層する。さらに 48 時間培養後、これらの細胞と上清を回収する。

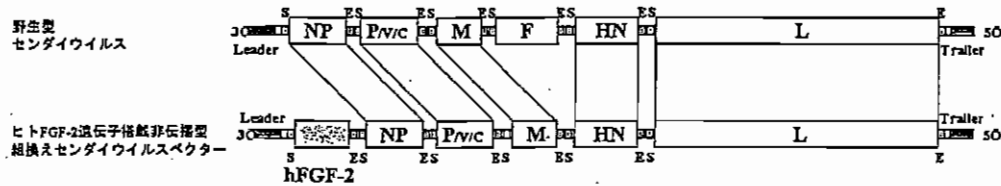
2) RNP を F 蛋白質発現細胞へ導入し、ベクター粒子を増幅する過程

前述の細胞ペレットを Opti-MEM に懸濁し、凍結融解した後に、上記の F 蛋白質発現細胞

(LLC-MK₂/F7/Ad) に添加してトリプシンを含み血清を含まない MEM 培地で培養する。1 日後に同じ培地に交換し、培養を継続する。経時的にベクターの生産を確認する。

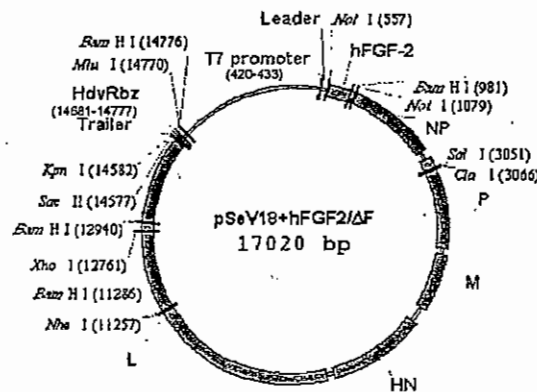
④ 使用するベクター (担体) の構造

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) は、野生型センダイウイルスのゲノムから F 遺伝子を欠失し、血管新生のための治療用遺伝子であるヒト FGF-2 遺伝子を搭載して作製されている。センダイウイルスゲノムの両端にはリーダーとトレーラーと呼ばれる約 50 塩基からなる非翻訳領域があり、複製と転写はリーダー配列から起動される。センダイウイルス由来 RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (P 及び UL) のセンダイウイルスゲノム上での結合場所は NP 蛋白質の 3' 端にしかなく (Leader)、ここに結合した RNA ポリメラーゼが 3' 端から 5' 端に向けて鋳型上を動いていく過程でそれぞれの遺伝子の両端にある独自の転写開始 (S) と集結配列 (E) を認識し、開始と停止を繰返しながら mRNA が合成される。この繰返しの過程で RNA ポリメラーゼのゲノムからの脱落が低いながらも起こり、このために 5' 端に向かうに従って mRNA 合成量が減衰する極性効果がある。従って最も高く遺伝子を発現させるためには、最も 3' 端にある NP 遺伝子の翻訳領域の直前に挿入すれば良いことになる。実際に、本遺伝子治療臨床研究で使用される SeV/dF-hFGF2 において、ヒト FGF-2 遺伝子はこの位置に挿入されている。



図上: SeV/dF-hFGF2 のゲノム構造

図下: ベクターテンプレートの制限酵素地図



組換えセンダイウイルスベクターを構築するためには、cDNA から感染性ウイルスを回収することが必要である。そのために、センダイウイルスゲノムの cDNA を、T7 プロモーターとデルタ型肝炎リボザイム (Rbz) の間に挿入し、不活化ワクチニアウイルスで供給した T7 ポリメラーゼで正確な全長 RNA を合成するシステムを構築している。SeV/dF-hFGF2 について、ベクター粒子を回収するために使用するプラスミド (ベクターテンプレート) の制限酵素切断地図を上記に示した。557 位及び 1079 位の NotI の切断部位があるが、その部位にヒト FGF-2 遺伝子を転写集結配列 (E) 及び次の NP 遺伝子の転写開始 (S) 配列と共に挿入している。

⑤ 使用するベクター (担体) の生物学的特徴

本ベクターの基本骨格となるマイナス本鎖 RNA ウイルスであるセンダイウイルス (SeV) は、パラ