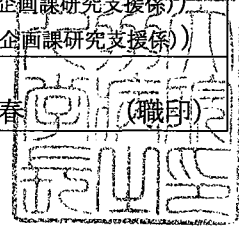


# 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

平成 22 年 9 月 29 日

厚生労働大臣 殿

実施施設	所在地	郵便番号 812-8582 福岡市東区馬出 3 丁目 1-1
	名称	九州大学病院 電話番号 092-642-5047 (戦略企画課研究支援係) FAX 番号 092-642-5064 (戦略企画課研究支援係)
	代表者 役職名・氏名	九州大学病院 病院長 久保 千春 (職印)



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実実施計画に対する意見を求めます。

## 記


遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
神経栄養因子（ヒト色素上皮因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護遺伝子治療臨床研究	九州大学病院 眼科・科長 九州大学大学院医学研究院 眼科学 教授 石橋 達朗

## 遺伝子治療臨床研究実施計画概要書

22. 9. 29

平成 年 月 日 (申請年月日)

研究の名称	神経栄養因子（ヒト色素上皮由来因子：hPEDF）遺伝子搭載第3世代組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターの網膜下投与による網膜色素変性に対する視細胞保護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 5年間

総括責任者	所属部局 の所在地	福岡県福岡市東区馬出3丁目-1-1	
	所属機関・ 部局・職	九州大学病院・眼科・科長 九州大学大学院医学研究院・眼科学・教授	
	氏 名	石橋 達朗 (いしばし たつろう)	
実施の場所	所 在 地	福岡県福岡市東区馬出3丁目-1-1	
	名 称	九州大学病院 眼科病棟（南棟11階）	
	連 絡 先	Tel: 092-642-5648, Fax: 092-642-5663	
総括責任者以外の研究者	氏 名	所属機関・部局・職	役 割
	池田 康博	九州大学病院・眼科・助教	副総括責任者：臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進
	米満 吉和	九州大学大学院薬学研究院・客員教授	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
	久富 智朗	九州大学大学院医学研究院・眼科学・助教	臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進
	宮崎 勝徳	九州大学病院・眼科・助教	臨床研究の実施、臨床分野からの研究計画の推進
	望月 泰敬	九州大学病院・眼科・助教	研究実施協力
	園田 康平	九州大学大学院医学研究院・眼科学・准教授	研究実施協力
吉田 久美	九州大学大学院薬学研究院・客員助教	研究実施協力	

外部協力者	飛松 省三	九州大学大学院医学研究院・臨床神経生理学・教授	網膜機能評価と外部評価
	長谷川 護	ディナベック株式会社・代表取締役社長	ベクター学に関する基礎的助言
	上田 泰次	ディナベック株式会社・取締役	ベクター学に関する基礎的助言
	村田 敏規	信州大学医学部・眼科学・教授	研究協力および外部評価
	後藤 純信	国際医療福祉大学・リハビリテーション学部・准教授	研究協力および外部評価
	矢部 武士	北里大学・北里生命科学研究所・専任講師	研究協力および外部評価

審査委員会が研究計画の実施を 適当と認める理由	<p>九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会では、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書 第2版案および遺伝子治療臨床研究説明・同意書 第2版案を慎重に審査した。</p> <p>その結果、平成20年10月3日に医学研究院等倫理委員会で承認された「遺伝子治療臨床研究実施計画書」第1版（平成20年7月15日）から、第2版への改訂が、組織体制の変更、臨床研究薬製造に関する情報の更新、安全性に関する新規の情報などが適切に反映されていると判断した。</p> <p>以上から、九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会は、提出された遺伝子治療臨床研究実施計画書は適切であると判断し、改訂した遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書を所轄官庁へ提出することを平成22年8月17日付で承認した。</p>	
	審査委員会の長の職名	氏名
	九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会・委員長 九州大学大学院医学研究院腫瘍制御学分野・教授	片野 光男



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>遺伝性疾患である網膜色素変性 (Retinitis Pigmentosa: RP) は、難治性かつ成人の失明の原因となる主要な疾患であり、進行すると視機能を高度に障害し、患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) を著しく低下させる。視覚障害が及ぼす日常生活障害を数量化すると、最大の障害である死を 1.0 と仮定した場合、失明の障害度の相対値は 0.624 で日常生活に大きな影響を与えるとされている。現在までに種々の治療法が試みられているものの、未だに有効な治療法は確立されていない。従って、RP 患者に対する日常診察において、生活指導など患者の現有視力を有効に利用するための情報提供などといった care が中心となっているのが現状である。</p> <p>本臨床研究は、未だに有効な治療法が確立されていない RP 患者の片眼を対象として、神経栄養因子であるヒト色素上皮由来因子 (hPEDF) 遺伝子を搭載した組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクター (SIV-hPEDF) を網膜下投与することに対する、安全性 (主要エンドポイント) を明らかにすることを目的とする。</p> <p>SIV-hPEDF ベクターは、局所麻酔 (球後麻酔またはテノン嚢下麻酔) 下に、硝子体手術により硝子体を切除した後、網膜下注射針を用いて網膜下に注入する。</p>	
対象疾患及びその選定理由	<p>(1) 対象疾患に対する現時点での知見</p> <p>① 網膜色素変性の臨床的特徴</p> <p>網膜色素変性は、“視細胞と網膜色素上皮細胞の機能を原発性、びまん性に傷害する遺伝性かつ進行性の疾患群”と定義されている。すなわち、視細胞や網膜色素上皮細胞に特異的に発現している遺伝子の異常により、若年期に発症して緩徐に進行し、中年ないし老年で高度な視力障害に至る疾患の総称である。頻度としては、我が国では 3,400~8,000 人に 1 人、世界で約 150 万人が罹患しているとされており、遺伝性疾患としては比較的頻度が高い。我が国における成人の失明原因の上位に位置しており、当科において定期受診している患者 (約 200 名) のうち、社会的失明率は約 40% である。</p> <p>本疾患における遺伝子異常の候補遺伝子はロドプシンをはじめとして 40 種類以上報告されているが、これらの遺伝子異常が認められる頻度は 20% 以下に止まっており、大部分が未知の遺伝子異常であるとされている。遺伝形式は、常染色体優性遺伝、常染色体劣性遺伝、伴性劣性遺伝、ふたつの遺伝子異常によって発症する二遺伝子性遺伝など様々で、遺伝形式がはっきりしないもの (孤発) も約 50% 存在するとされている。</p> <p>自覚症状としては、夜盲が初発症状であることが多く、視機能の低下は一般に緩徐であり数十年という長い経過をたどるが、進行すると周辺部視野障害・視力低下へとつながり、最終的に失明に至ることもまれではない。眼の異常に初めて気付いた時期は平均 26 歳前後であり、全体の 60% が 30 歳未満であるとの報告がある。</p> <p>臨床検査所見は以下に示すとおりである。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 中心視力に関しては、症例の病型・進行度により影響を受けるが末期まで比較的保たれることが多い</li> <li>2) 地図状暗点、輪状暗点、徐々に拡大して最終的には中心のみ残存する (求心性視野狭窄) という経過が多い</li> <li>3) 眼底所見としては、骨小体状の色素沈着と網膜動脈の狭小化が典型的所見</li> <li>4) 網膜電図 (ERG) は診断に際して最も鋭敏な情報を提供する。網膜色素変性ではその眼底所見に比較して ERG 所見が高度に障害されているのを特</li> </ol>	

徴とし、a波、b波の振幅が低下ないし消失している

## ② 網膜色素変性に対する現行の治療法

現在、この網膜色素変性に対する有効性が明確にされた治療法はないが、次のような治療法が試みられている。

1) Helenien (アダプチノール)：アダプチノールは、我が国では以前から頻用されている内服薬で、暗順応改善カルテノイドとして網膜でエステル分解を受け、キサントフィルに変換して作用するとされているが、効能に関する臨床上の直接的エビデンスはない。

2) ビタミン A 大量療法：科学的な統計処理により唯一治療効果が報告されているビタミン A 大量療法 (15,000 単位/日) は、長期投与によりフリッカーERG の低下を防ぐとされている。一方で、この結果を否定する報告も多数あり、その副作用 (肝障害、骨折の増加など) からすべての患者に適応となる治療法ではない。

3) カルシウム拮抗剤：疾患モデルマウス (retinal degeneration <rd> mouse) において、カルシウム拮抗剤 (D-シス-ジルチアゼム) が視細胞変性を防止し、網膜電図の改善に役立ったとの報告があるが、その臨床的な効果についてはこれまでに報告がなく、今後の報告が待たれるところである。

その他にも臨床的に試みられている薬物治療はあるが、現在までのところ、いずれの治療法においても明らかな臨床的治療効果の報告はない。

従って、生活指導など患者の現有視力を有効に利用するための情報提供が重要である。医師の立場からは QOL の維持を目的として、患者への障害の告知と受容から始まり、視力の維持・合併症の早期発見、必要により補装具の紹介・処方、特定疾患の認定とそれによるサービスの情報提供、診断書 (身体障害者手帳・障害年金) の交付、リハビリテーションの紹介などがあり、患者の QOL を高めるための総合的な支援が求められている。すなわち、日常診療においては care が中心となっているのが現状である。

## ③ 現在開発中の新しい治療法

### 1) 遺伝子治療

RP は難治性の遺伝性疾患であることから、RP 疾患モデルを用いた遺伝子治療の有効性は我々の研究を含め、数多く報告されている。特に、レーバー先天盲のモデルと考えられる RPE65 遺伝子の異常で網膜変性を示す犬が、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子治療により、障害物を避けるように歩けるようになったとする報告は、将来の網膜色素変性に対する遺伝子治療の可能性を示した研究であり、その成果を基に 2007 年より英国において同様の遺伝子治療臨床研究が開始されている。また、PEDF 遺伝子を搭載した組換えアデノウイルスベクターの硝子体内投与による加齢黄斑変性に対する遺伝子治療の臨床研究は既に米国において施行されており、眼科領域の難治性疾患に対する遺伝子治療は臨床的評価を受ける段階となっている。

### 2) 他家細胞移植

眼内は免疫学的に寛容であることから、拒絶反応が起こりにくいとされている。そこで胎児網膜やアイバンクの眼球から得られた視細胞をはじめとする網膜細胞の他家細胞移植が注目されるようになった。これまでに胎児網膜細胞移植は、RP に対し 20 例以上に施行されているが、1 例を除いて明らかな治療効果は認められていない。治療効果が認められたとされる 1 例においても、詳細なメカニズムが明らかとなっておらず、今後の動向が注目されている。

### 3) 人工視覚

RP では視細胞が消失するが、この光信号を電気信号に変換するという役割をもつ視細胞に代わる工学的な装置を用いた視覚を人工視覚といい、1990

年頃より精力的に研究が進められるようになった。一般的には、シート状の多点電極を網膜上もしくは網膜下に設置し、電極ごとに直接網膜内の残存神経細胞を電気刺激することによって文字や形を患者に認識させようとするものである。これまでに、米国において試験的に数人の患者に使用されている。我が国でも 2001 年より、新しい網膜刺激方式を用いた人工視覚システムの研究開発を行うプロジェクト（独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構）が進行中である。現時点で開発が始まったばかりの方法であり、症例数も少ないことから、今後の研究の進展が待たれる。

#### 4) 網膜再生

幹細胞 (stem cell) より、網膜を構成する神経細胞、特に視細胞を作り出すという研究は、10 数年前より盛んに行われている。眼球に存在する内在性の幹細胞もしくは、網膜外に存在する幹細胞（胚性幹細胞、神経幹細胞など）から視細胞を再生させ、患者の網膜内へ移植するという治療法は、ドナー細胞の生着効率の問題やドナー細胞と宿主の残存神経細胞とのシナプス形成など、現時点ではクリアしなくてはならない問題点が多く、臨床応用までには時間を要するであろうと予想されている。

我々は以上の背景をもとに、「より効果が高く、より安全な視細胞保護遺伝子治療法の開発」を目指し、種々の治療遺伝子（神経栄養因子）を検討した結果、病態モデル動物を用いた動物実験では PEDF の治療効果が高いことを見出した。さらに、PEDF は網膜色素上皮細胞より産生される神経栄養因子であり眼内に比較的豊富に存在するため、生理的かつ安全である可能性が高いことが予想された。

また慢性疾患である網膜色素変性に対応し、長期間安定した治療効果を引き出すために、独自に開発した組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (SIVagm) ベクターを使用する。既に本ベクターはマウス、ラット、サル網膜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。また、本臨床研究で用いるヒト PEDF 遺伝子を搭載した SIV ベクター (SIV-hPEDF) の安全性については非ヒト型霊長類 (サル) において急性毒性試験を実施、終了しており、少なくともこれらの動物においては急性期の重篤な有害事象・副作用が検出されないことを確認した。

### (2) 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の薬物療法などにより明らかな治療効果が示されておらず、他に有効性が証明されている治療手段が存在しない。

#### ② SIV および神経栄養因子を用いた遺伝子治療を選択した理由

##### 1) SIV ベクターを選択した理由

本研究において対象とする RP は前述のように様々な遺伝子異常により生じる疾患群であり、視細胞の変性を抑制することが治療の主眼となる。本疾患における視細胞変性は数年から数十年の経過で緩徐に進行するため、長期の治療効果、即ち長期にわたる遺伝子発現を成し得るベクターが必須である。一方、眼球は高度に機能分化した臓器であり、遺伝子導入した細胞を移植する方法（いわゆる ex vivo 法）では、現在の技術では必ずしも確実な細胞の生着は得られない。従ってベクターを直接注入して安定な遺伝子発現を得る（いわゆる in vivo 法）ことが可能なベクターの選択が必須となる。

長期遺伝子発現が可能なことが証明されているベクターにはレトロウイルスベクター、AAV ベクター、レンチウイルスベクターがあるが、レトロウイルスベクターは in vivo 法での遺伝子導入効率は極めて低く、本疾患の治療を目的とした場合には適さない。AAV は網膜に対する遺伝子治療用として有望なベクターと考えられているが、血中での安定性が高いため、骨格

筋へ局所投与されたベクターが精液に検出されたとする報告もあり、長期の安全性については確立していない。現在開発が進んでいるレンチウイルスベクターの多くはヒト免疫不全ウイルス (HIV) を基本骨格にしたものである。現行で最も進んでいる HIV ベクターは、long terminal repeat (LTR) 配列の持つプロモータ活性を完全に除去し (self inactivating : SIN 化)、さらに第3世代化されているため複製可能なウイルスの出現 (RCL) の危険性は理論的に極めて低いと考えられている。しかしながら、基本骨格となる HIV そのものの病原性と野生型 HIV との相同組換えを起こし自己増殖能を獲得する危険性が懸念されている。

本臨床研究で使用する SIV ベクターは、その構造と製造過程は最も進んだ第3世代 HIV ベクターと同等のものである上、野生型 HIV と相同性を有する配列が削除されており、HIV ベクターと比較しても安全性が高いと考えられる。また我々の前臨床試験において、SIV ベクターはラット、マウス、サルにおいて、in vivo 法により長期の安定した遺伝子発現が可能であることを証明していることから、この SIV ベクターを選択した。

## 2) 神経栄養因子：色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor: PEDF) を治療用遺伝子に選択した理由

遺伝子治療では、A) 正常な遺伝子を導入することにより変異または欠損した遺伝子を置換または補充すること、B) 機能的な遺伝子を導入することにより機能を付加または転換すること、が可能である。眼組織への遺伝子導入の特性として、レンチウイルスベクターを用いた場合、主として網膜色素上皮細胞への遺伝子導入は確実に実施可能であるが、視細胞への安定した遺伝子導入は一般的に困難であることが、我々を含め複数のグループから確認されている。

本研究において対象とする RP は前述のように様々な遺伝子異常により生じる疾患群であり、また視細胞の変性を抑制することが治療の主眼となる。この疾患に対して遺伝子治療を選択した場合、正常な遺伝子を置換・補充するという方法は、被験者ごとにゲノム解析を要するだけでなく、各遺伝子異常に応じて多種類のベクターを用意する必要がある。またこれらを実施しても既知の遺伝子異常は全患者中の 20%以下しかカバーできていないため、未知の遺伝子異常により発症する RP に対しては、対応出来ない。従って、我々は神経細胞のアポトーシス死を抑制する効果のある神経栄養因子を用いた遺伝子治療を選択した。

視細胞に対するアポトーシス死の抑制効果を示す神経栄養因子はこれまでに複数報告されているが、その中で PEDF は眼内に豊富に存在する内因性因子であり、さらに血管新生を抑制する効果を併せ持つことから、眼組織内で過剰に産生させても比較的安全である可能性が高いと考えられる。我々の施行したカニクイザルを用いた安全性試験においても、その過剰発現によりサル網膜をはじめとする局所への影響は観察されなかった。また、本臨床研究に使用される遺伝子はヒト由来のものであり、欧米において加齢黄斑変性の遺伝子治療のために眼内への投与 (硝子体内投与) 実績のあるものである。本遺伝子のヒト生体内投与に関わる重大な副作用はこれまで報告されていない。

hPEDF に関して、組換えタンパクの大量投与による臨床研究は現在までに報告はないが、一般に、組換えタンパクは生体内での半減期は短く、構造的に不安定であることが知られている。本研究にて対象とする網膜色素変性は前述のように慢性の経過をたどるため、hPEDF のような神経栄養因子を用いた場合に有効な治療効果を得るためには、長期間の安定した局所濃度を維持することが必要であると考えられる。従って、高濃度の組換えタンパクを頻回に直接投与 (硝子体内投与や網膜下投与) するよりも、組換えタンパクを少なくとも年単位で持続的に発現させることができる SIV ベクターを用いた遺伝子治療の方が望ましいと予想される。

	<p>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 hPEDF 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。</p> <p>以上の背景から神経栄養因子 hPEDF を用いた遺伝子治療を選択した。</p>
<p>遺伝子の種類及びその導入方法</p>	<p>(1) ヒトに導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>① ヒトに導入する遺伝子の構造と性質</p> <p>実際にヒトに投与するベクター (SIV-hPEDF) 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 PEDF 蛋白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 PEDF cDNA の塩基配列 (No. AF400442) と 100%一致することが、塩基配列解析で確認されている。</p> <pre> atgcaggccctgggtgctactcctctgcattggagccctcctcgggcacagcagctgccagaacctgccagccc cccgaggagggtctcccagaccccgacagcacagggcgctggaggaggaggatcctttcttcaaa gtccccgtgaacaagctggcagcggctgtctcaacttcggctatgacctgtaccgggtgcgatccagcatgagc cccacgaccaacgtgctcctgtctcctcctcagtggtggccacggccctctcggccctctcgtgggagcggag cagcgaacagaatccatcattcaccgggctctctactatgactgatcagcagcccagacatccatggtacctata aggagctccttgacacggctactgccccagaagaacctcaagagtgcctcccggatcgtctttgagaagaagc trgcataaaatccagctttgtggcacctctggaaaagtcataatgggaccaggcccagagtcctgacgggcaacc ctcgttgacactgcaagagatcaacaactgggtgcaggcgcagatgaaaggaagctgccaggtccacaaa ggaaattcccgatgagatcagcattctcctctcgggtggcgcactcaaggggcagtgggtaacaaagttga ctccagaaagacttcctcagagattctacttgatgaagagaggaccgtgaggggtcccatgatgctggacc ctaaggctgttttacgctatggcttgattcagatctcagctgcaagattgccagctgccctgaccggaagcatg agtatcatcttctcctgccccgaaagtaccagaattgaccttgatagaggagagcctcacctccaggttcattc atgacatagaccgagaactgaagaccgtgcaggcggctcctcactgtccccaagctgaagctgagttacgaaggc gaagtccaagctccctgcaggagatgaagctgcaatcctgtttgattcaccagactttagcaagatcacaggcaa acctcaagctgactcaggtggaacaccgggctggctttgagtgaacaggatggggcgggaaccaccccc agcccagggtgcagcctgcccactcacttcccgtggactatcaccttaaccagccttcatctctgactgag ggacacagacacaggggcccttctctcattggcaagattctggacccaggggccctaa </pre> <p>本塩基配列はレンチ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。</p> <p>② 導入遺伝子からの生成物の構造及びその生物活性</p> <p>上記遺伝子により発現されたヒト PEDF タンパクのアミノ酸配列を以下に示す。</p> <pre> MQALVLLLCIGALLGHSSCQNPASPPEEGSPDPDSTGALVEEEDPFFKVP VNKLA AAVSNFGYDLYRVRSSMSPTTNVLLSPLSVATALSALS LGAEQR TESIIHRALYYDLISSPDIHGTYKELLDVTAPQKNLKSASRIVFEKRLRIK SSFVAPLEKSYGTRPRVLTGNPRLDLQEINN WVQAQMKGKLARSTKEI PDEISILLGVAHFKGQWVTKFDSRKTSLDFYLD EERTVRVPMMSDP KAVLRYGLDSDLCKIAQLPLTGSM SIIFFLPLKVTQNLT LIEESLTSEFIH DIDRELKTVQAVLTVPKL KLSYEGEVTKSLQEMKLQSLF DSPDFSKITGK </pre>



PIKLTQVEHRAGFEWNEDGAGTTPSPGLQPAHLTFPLDYHLNQPFIIVLR  
DTDTGALLFIGKILDPRGP

ヒト PEDF タンパクは 418 個のアミノ酸からなる、糖鎖修飾を受けた分子量 46,342Da の一本鎖ポリペプチドである。構造上 serin protease inhibitor (serpin) super family に属し、プロテアーゼ感受性ループ構造を有するが、プロテアーゼ阻害活性はないことが報告されている。

PEDF の代表的な生物活性は、神経親和性である。これまで種々の神経細胞に対して、分化誘導、及び傷害による神経アポトーシスを抑制する作用を持つことが培養細胞のみならず、動物個体においても報告されている。その機序に関しては培養未熟小脳顆粒細胞を用いた検討があり、転写因子 NF $\kappa$ B の活性化が関与し、また抗アポトーシス遺伝子である Bcl-2、Bcl-x や、神経栄養因子である NGF、BDNF の発現を誘導することが報告されている。一方、同じく培養未熟小脳顆粒細胞を対象としたマイクロアレイによる検討では、PEDF 添加により種々の神経栄養因子 (NGF, Neurotrophin-3, GDNF) の発現を誘導するが、中和抗体を用いた解析で誘導された神経栄養因子は PEDF の神経保護効果に影響しないことが報告され、保護効果は PEDF の直接の作用であることが示唆されている。さらに近年 PEDF は強力な血管新生抑制効果を有することが報告された。種々の血管新生モデル、腫瘍血管新生を抑制する現象が多数報告されており、その機序はレセプターが未だ明らかでないことから詳細に解明されていないが、(1)PEDF が血管内皮細胞における FasL の発現を誘導し、さらに新生過程にある血管内皮細胞では Fas が高発現していることから、Fas/FasL を介した内皮細胞のアポトーシスが血管新生を抑制する可能性、(2)細胞外でのリン酸化が関与する可能性、また(3)細胞外基質との結合が関与する可能性、などが考えられている。眼内血管新生は、視覚に必須である眼組織の透明性を損なうことから、神経保護及び血管新生抑制効果の両面を併せ持つこの因子は、眼局所で発現させるのに最適な因子と考えられる。

また PEDF はヒト胎児網膜色素上皮細胞の培養上清から分離・精製された因子であり、眼内局所において比較的豊富に存在する。PEDF の高発現時における生体への毒性は明らかではないが、眼内での過剰発現による毒性は理論的に低いと考えられ、事実実験動物を用いた前臨床試験 (マウス、ラット、サル) においても、PEDF に起因すると考えられる明らかな毒性は確認されていない。

#### (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、組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクター以外の核酸 (DNA、RNA 共に) は使用しない。

#### (3) 標的細胞とした細胞の由来ならびに当該細胞を標的とした理由

本臨床研究計画では、SIV ベクターの網膜下投与の際に主に遺伝子が導入されることがマウス、ラット、サルによる実験で明らかになっている網膜色素上皮細胞を標的とする。以下 (4) で示す遺伝子導入法で導入操作を行った場合、その他の細胞へ遺伝子が導入されることはまれであることを、マウス、ラット、サルによる実験で明らかになっている。また本臨床研究計画では、治療遺伝子として分泌タンパクである hPEDF を発現する遺伝子を使用する。hPEDF は遺伝子導入細胞より分泌後、細胞外マトリックスに沈着することにより、その生理作用を発揮すると考えられること、また元来眼内に豊富に存在するタンパクであるため、仮に他の細胞への導入や過剰発現に至っても毒性を示さないため、この遺伝子導入法と当該細胞を標的とした。

#### (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ならびに導入標的細胞

### 1) SIV ベクターの基本的性質

本臨床研究で用いるレンチウイルスベクターは「アフリカミドリサル由来サル免疫不全ウイルス SIVagmTYO1 株」を基本骨格として開発されたベクターである。

本ベクターが従来のベクターと比較して有利な点は、1) 基本骨格である SIVagm は、自然宿主であるアフルカミドリサルにも免疫不全症状を起こさず、汎用されている HIV ベクターと比較してより臨床的安全性が高いと予想されること、2) 非分裂細胞に導入可能であり、長期安定した遺伝子発現が可能であること、である。

前者のヒトへの安全性については、①ウイルス構築過程には不要であるが、ウイルス増殖に必要な数種類の遺伝子をベクター再構成系から排除することで、相同組換えの危険性を現行の技術レベルで最小にすることも成功している（第3世代レンチウイルスベクター）こと、②万一相同組み換えによる自己複製能を獲得する replication competent lentivirus が混入した場合を仮定しても、元来野生型ウイルスに自然宿主への病原性がないこと、さらに③野生型 HIV と相同性の高い配列が削除されていることで、病原性を持つ replication competent な HIV とのキメラウイルス出現の可能性が低いことから、従来の HIV を骨格としたレンチウイルスベクターより理論的な安全性が高いと判断される。また後者の遺伝子導入特性については、本導入法では通常は非分裂細胞である網膜色素上皮細胞を標的としていること、さらに数十年という非常に長い経過を示す慢性疾患を対象としていることから、この遺伝子治療に適した特性と捉えることができる。

### 2) 遺伝子導入方法の理論的根拠

眼内への遺伝子導入法としては、主に硝子体内投与、及び網膜下投与の2つが報告されている。

我々の用いている SIV ベクターを用いた場合、硝子体内投与では高用量を用いても一部の神経節細胞に導入できるが、その効率は比較的 low、治療効果を示すには不十分と考えられた（未発表データ）。

一方網膜下投与では、網膜色素上皮細胞（RPE）に比較的特異的かつ高効率に導入が可能であり、小動物（ラット）において少なくとも1年間、大動物（サル）においても少なくとも3年間の安定した遺伝子発現を確認している。また網膜色素上皮細胞は視細胞に隣接して存在するため、変性・アポトーシス死を起こす視細胞を保護するために、網膜色素上皮細胞に遺伝子を導入し分泌型蛋白を発現させることで、広範な視細胞を標的にすることが理論上可能であり、実際にこれまでの小動物における効能試験で有効な治療効果を認めている。

以上の背景から、本臨床研究において用いるベクターは安全性に優れていること、さらに網膜下投与による網膜色素上皮細胞を標的細胞とする遺伝子導入法により優れた遺伝子発現特性を示すことから、本ベクターと本導入方法を選定した。

## ② 遺伝子導入方法の概略

1) 術前日より抗生物質を点滴静注する。術後3日まで点滴を継続する。抗生剤の点眼は術前日より開始し、術後も継続して行う。また手術操作等による眼内非特異炎症予防の目的で、術翌日よりステロイド剤の点眼を行う。

2) 術当日、九州大学病院北棟3階分子・細胞調製センター内細胞保存ユニットにて  $-80^{\circ}\text{C}$  にて凍結保管してある SIV-hPEDF 溶液を封入しているバイアルを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を溶解する。希釈液として、アルコン社より医療用として市販されているオキシグルタチオン灌流液（ビーエスエスプラス®、以下 BSS）を用い最適に希釈する（治療低用量： $2.5 \times 10^7$  TU/ml、治療高用量： $2.5 \times 10^8$  TU/ml）。

3) 希釈した SIV-hPEDF 溶液を専用のキャリアバック内に厳重に封入して、

保冷下で九州大学病院南棟3階手術部へ搬入する。

4) 手術部にて局所麻酔(球後麻酔またはテノン嚢下麻酔)下に、硝子体手術により硝子体を切除後、SIV-hPEDF液を37Gもしくは41Gの網膜下注射針(ドルク社)を用いて網膜下に注入する。注入部位は眼底所見に基づき、原則、黄斑を回避した網膜に注入(原則4カ所、1カ所あたり50 $\mu$ l、合計液量200 $\mu$ l)する。但し強い網膜癒着のためベクター液注入が困難な場合は、必要に応じて適宜減ずる。注入部裂孔は眼内レーザー等により確実に閉鎖し、硝子体腔へのベクター散布ならびに術後の網膜剥離を予防する。白内障を合併する患者には、同時に超音波乳化吸引術+眼内レンズ挿入術を併用して施行する。なお、ベクター液濃度はベクター力価漸増式に2段階(治療低用量5例、治療高用量15例)に設定している。

5) ベクター投与後、第一種使用規程に基づいたベクターの拡散防止措置を取りつつ、被験者を速やかに遺伝子治療室(北棟11階遺伝子治療室:1181号室および1182号室)へ搬送・隔離する。原則として同室における7日間の管理を行い、血液中および尿中にベクターゲノムが検出されないことを確認の上隔離を解除、一般病棟(南棟11階眼科病棟)へ転棟する。7日目のサンプルにてベクターゲノムが検出された場合、陰性化するまで適宜隔離期間を延長する。

### ③ 使用するベクター(担体)の作製方法

SIV-hPEDFの作成には複数のプラスミドをセルバンク化した培養ヒト腎臓線維芽細胞由来株293T細胞に同時に導入し、細胞上清に放出されるベクター粒子を回収し濃縮する。マスターセルバンクの品質管理試験項目は、1) 無菌試験、2) マイコプラズマ否定試験(PCR法)、3) マイコプラズマ否定試験(培養法)、4) 細胞の同定試験、5) ウイルス存在否定in vitro試験、6) ウイルス存在否定in vivo試験、7) レトロウイルス否定試験、8) 腫瘍原性試験、9) HBV否定試験、10) HCV否定試験、11) HIV否定試験、12) SIV否定試験、13) アデノウイルス否定試験。

具体的には、1) ベクター粒子に取り込まれるベクターゲノムRNAを合成する遺伝子導入プラスミド、2) *gag*、*pol*のウイルス構成タンパク質を発現させるパッケージングプラスミド、3) 制御タンパク質であるRevを発現するRev発現プラスミド、さらに4) ウイルス外被タンパク質を発現させるVSV-Gプラスミドの4種のプラスミドを用いる。遺伝子導入プラスミドは5'LTRのU3領域をCMVのプロモーター配列と置換しており、*tat*非依存的なゲノムRNAの転写を可能にしている。パッケージングプラスミドはプロモーター活性の高いCAGプロモーターを用い*gag*、*pol*の発現を誘導する。また、後述するRev応答領域(RRE)の挿入により発現を高めている。Rev発現プラスミド、VSV-Gプラスミドは共にCMVプロモーターを用い、それぞれRevとVSV-Gを発現する。これらのプラスミドを一定の比率でヒト腎臓線維芽細胞由来株293Tに遺伝子導入を行う。プラスミド導入後ウイルスベクターを含む培養上清を回収・濾過し、濃縮を行う。濃縮後のベクター力価は遺伝子導入プラスミド中の遺伝子配列を標的にしたリアルタイムRT-PCRにより粒子力価(viral particle: Vp)を測定する。抗ヒトPEDF抗体を用いて免疫組織化学的検出によるfunctional titerの算出(transduction unit: TU)も併せて行う。

### ④ 使用するベクター(担体)の構造

本臨床研究で使用するSIVベクター(SIV-hPEDF)はエンベロープ型のウイルスベクターであり、ヒト水疱性口内炎ウイルス(Vesicular Stomatitis Virus: VSV)エンベロープタンパク質VSV-Gによるシュードタイプ化を施すことにより、多種の細胞への感染を可能としている。構造タンパク質としてSIVagm由来のGag(group-specific antigen)タンパク質および逆転写酵素、

	<p>Pol を含み、さらにベクターゲノム RNA を包含している。ベクターゲノム RNA は、5'端と 3'端にそれぞれ LTR(Long Terminal Repeat)を持つ単鎖 RNA である。前述のように遺伝子導入プラスミドの 5'LTR は、LTR 内の U3 領域を CMV プロモーター配列と置換しており、この部分により <i>tat</i> 非依存的に転写が開始されるため、プロモーター直下の R および U5 領域のみを持つ LTR となる。また、3'LTR は、U3 領域を欠失させているためにやはり U3 領域を欠失した R および U5 領域の LTR となっている。5'LTR 下流には SIV のパッケージングシグナル <math>\psi</math>、Rev との作用により転写産物の核外移行を亢進する Rev 応答領域 (Rev-response element: RRE)、遺伝子の導入効率を上昇させる central polypurine tract (cPPT)配列 (130 塩基長) を有し、CMV プロモーターとその直下に搭載遺伝子 PEDF が挿入されている。その下流には PEDF mRNA の安定性を高めることにより導入遺伝子の発現効率を高める約 600 塩基長ウッドチャック肝炎ウイルスの post-transcriptional regulatory element (WPRE) 配列が挿入されている。</p> <p>本ベクターによって導入される遺伝子はヒト PEDF のみであり、ウイルス由来の他の配列から翻訳される産物はない。本ベクターは自己不活性 (Self inactivated: SIN) 化しているため標的細胞に感染、遺伝子導入が起こる際には U3 領域を欠失させることにより不活化した 3'LTR が複製して 5'LTR と置換されて宿主細胞のゲノムに挿入されるため、この LTR からの転写は理論上ないと考えられ、また同時に内部の CMV プロモーターの活性が亢進されているため、安定した強い遺伝子発現が可能であるが、3'LTR の R 配列中にある poly A 配列 (AATAAA) により CMV プロモーターからの転写は理論上停止する。</p> <p><b>⑤ 使用するベクター(担体)の生物学的特徴</b></p> <p>本ベクターはアフリカミドリザルを宿主とするサル免疫不全ウイルス (SIVagm)の株である TYO-1 に由来する。分類学上、本ウイルスはレトロウイルス科レンチウイルス属に属し、HIV-1, HIV-2 等とともに霊長類レンチウイルスグループを形成する。HIV 類と異なり、自然宿主に対し病原性を有さず、遺伝学的にも、宿主に病原性を持つ HIV や SIVcmp と大きく隔絶されていることが明らかになっている。したがって、本ベクターと HIV 間において相同組み換えが起こる可能性も理論的に低いことが予想される。この SIVagmTYO1 ゲノム cDNA のサイズは 9 kbp であり、ベクター化に際し、不要な遺伝子を除去した。即ち、<i>vif</i>, <i>vpr</i>, <i>tat</i>, <i>env</i>, <i>nef</i> を欠失し、パッケージングに必要な <i>gag</i>, <i>pol</i>, <i>rev</i> は分離したプラスミド上に搭載している。従って実際にベクター (担体) のゲノム RNA に相補的なテンプレート DNA 配列は、80%以上が取り除かれている。</p> <p>本ベクターは前述したように SIN 化しており、標的細胞ゲノムに挿入後の 5'LTR は不活化されるため、LTR によるプロモーター活性は消失しており、挿入部位の遺伝子を非特異的に活性化する危険性は原理的にない。また、遺伝子導入プラスミド、パッケージングプラスミド、Rev 発現プラスミド、VSVG プラスミドにそれぞれ分離してあるいわゆる第3世代ベクターであるため相同組み換え等により、自立複製ウイルスの出現の確率は理論的に極めて低いと考えられている。</p> <p>SIV ベクター自体は他ウイルスを基本骨格としたレンチウイルスベクターと同様、静止期にある細胞に遺伝子導入が可能であることが複数の細胞を用いて示されている。造血幹細胞や、霊長類胚性幹細胞 (ES) 細胞に対して遺伝子導入し、安定した長期の外来遺伝子発現が確認されている。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p>(1) 遺伝子導入方法の安全性</p> <p>① 遺伝子導入に用いるウイルスベクター(担体)の純度</p> <p>GMP ベクターの生産、精製、供給は Vector Gene Technology 社 (中華人民共和国・北京市) により行われる。同社で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、これまで多数の遺伝子治療臨床研</p>

究に使われており、十分な実績を有する。GMP 生産ラインによる SIV-hPEDF 生産のテストランを実施後、実生産を行い、最終生産物が GMP 基準に合致することを確認する。SIV-hPEDF の品質管理試験の項目は、1) 粒子力価測定 (Vp)、2) 機能力価測定 (TU)、3) PCR 法による hPEDF 遺伝子の確認、4) SDS-PAGE によるタンパク質分析、5) タンパク質濃度測定、6) 微生物限度試験、7) 無菌試験、8) マイコプラズマ否定試験 (PCR 法)、9) マイコプラズマ否定試験 (培養法)、10) ウイルス混入否定試験、11) 異常毒性試験、12) 電子顕微鏡検査、13) エンドトキシン濃度測定、14) 細胞由来 DNA 濃度測定、15) BSA 濃度測定、16) Benzonase 濃度測定、17) 増殖性レンチウイルス (RCL) 否定試験、18) in vitro 遺伝子発現、19) hPEDF タンパク質濃度測定、20) E1A, E1B, SV40 確認、21) 充填量確認、22) pH 測定、23) 目視による外観検査。

#### ② 患者に投与する物質の純度及びその安全性

患者に投与する物質は、GMP 基準に合致したベクターを希釈液で希釈したものを使用する。希釈液としては、BSS を使用する。凍結状態の SIV-hPEDF 溶液の融解、バイアルの開封並びに SIV-hPEDF 溶液の希釈及び分注操作は、P2 レベルの実験室内の安全キャビネット内で行う。

#### ③ 増殖性ウイルス出現の可能性

本臨床研究に使用する組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターは、ウイルス固有のゲノムシーケンスをほとんど排除した第 3 世代と呼ばれるもので (ウイルスのゲノム RNA から 80.6% を欠失している)、作製されたベクター内には導入遺伝子のみ取り込まれるようになっており、エンベロープタンパク質や gag、pol 等の遺伝子を持ち込まないようになっている。従って、相同組換えにより自己複製能をもつウイルス (RCLs: replication competent lentiviruses) が生じる可能性は理論的に低く、生産されたベクター溶液中に混入する可能性はほとんどないと考えられる。

また、外界に存在するレトロウイルスとの相同組換えによる、RCLs の発生についても、HIV と相同性の高い配列が削除されていることから HIV との相同組換えの確率は HIV ベクターよりも低いと予想され、HIV ベクターよりも安全面での優位性があると考えられる。

#### 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

当初、第 2 世代 (本臨床研究で使用するベクターは第 3 世代、制御タンパク質である Rev を発現する遺伝子が搭載されている) 組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルス (SIV) ベクターを使用した研究では、レポーター遺伝子 (核移行シグナル付加大腸菌 lacZ 遺伝子、及び EGFP 遺伝子) を搭載した高濃度 ( $2.5 \times 10^8$  TU/ml, 約 5  $\mu$ l) のベクター (SIV-nls-lacZ、SIV-EGFP) をラット網膜下へ投与することで、術後 3 ヶ月前後に一部の個体でベクター投与部位において網膜構造の破壊 (網膜変性) が生じるという組織学的所見を得た。

原因を特定するために詳細な検討を加え以下の結果を得ている。1) 培養ヒト網膜色素上皮由来細胞を含めた複数の細胞において、第 2 世代ならびに第 3 世代の SIV ベクターの感染実験においても明確な細胞傷害性を認められなかった (未発表データ)、2) 第 2 世代のヒト PEDF、ヒト FGF-2 を搭載したベクターにおいては、同量の高濃度ベクターの網膜下投与により同様の組織学的所見は得られなかった (未公表データ)、3) 第 3 世代の SIV ベ

クターを用いたラット 51 眼の検討では、BSS 群、外来遺伝子を発現しない SIV ベクター (empty-SIV) 群ならびに SIV-hPEDF 群では、低濃度ならびに高濃度ともに、明らかな網膜構造の破壊の所見を認めなかった。一方、レポーター遺伝子群 (SIV-nls-lacZ もしくは SIV-EGFP) では、低濃度で 10 眼中 2 眼、高濃度で 10 眼中 3 眼で網膜変性の所見が観察された (未公表データ)、4) カニクイザルを用いた SIV-hPEDF (第 3 世代) に関する安全性試験 (添付資料 1 参照) において、最大濃度投与群 ( $1.0 \times 10^9$  TU/ml, 20-50  $\mu$ l) で投与後 90 日の時点で網膜組織の変性など重篤な副作用は認められなかった、5) カニクイザルを用いた SIV-hPEDF (第 3 世代) に関する長期安全性試験において、高濃度投与群 ( $2.5 \times 10^8$  TU/ml, 20-50  $\mu$ l) において、投与後 2 年の時点で検眼鏡的に網膜変性の所見は認められなかった。

以上の結果から、明らかな原因は同定できないものの、第 2 世代に比べ頻度は低い、レポーター遺伝子を発現させた眼球において網膜変性が生じることが示された。レポーター遺伝子産物自身の免疫原性と炎症惹起作用が他施設から報告されており、今回観察された所見もレポーター遺伝子産物に対する炎症反応が関与している可能性が考えられるが、今後はカニクイザルを用いた長期安全性試験の個体を注意深く経過観察し、ベクター投与そのものによる網膜変性の可能性の有無を検討していく必要がある。

#### ⑤ 体内の標的細胞以外への遺伝子導入の可能性

本臨床研究に使用する組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターは、そのエンベロープとしてヒト水疱性口内炎ウイルス (VSV) の G 蛋白をもつ。VSV-G は脂質への結合と細胞膜への融合により細胞内へと侵入するため、VSV-G をエンベロープにもつ組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクターは幅広い哺乳動物細胞へ感染可能である。そのため、網膜下へ投与された場合においても、血行や周辺組織への漏出により、網膜色素上皮細胞以外の細胞への遺伝子導入される可能性は否定出来ない。

これを明らかにするため、カニクイザルを用いた安全性試験にて、RT-PCR 法による生体内分布 (biodistribution) を検討した。最大濃度 ( $1.0 \times 10^9$  TU/ml, 20-50  $\mu$ l) までの網膜下投与 (SIV-hPEDF) において、少なくとも血液、尿中には、全経過 (術後 1, 8, 30, 90 日) を通じてベクターの遺伝子配列は確認されておらず、全身散布の可能性は低いと考えられる。

#### ⑥ 患者以外のヒトに遺伝子が導入される可能性

上述のごとく、本ベクターは VSV-G 蛋白によりシュードパッケージングされているため、多種の細胞へ感染可能である。従って一定量の漏出が生じれば、患者以外のヒトへの遺伝子導入の可能性は否定出来ない。

本臨床研究においては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、第一種使用規程に則り、厳重に管理され陰圧で制御される遺伝子治療室にて被験者を管理する (サルを用いた安全性試験成績では、投与直後から投与後 3 ヶ月の経過全てにおいて、血液ならびに尿中にベクターの遺伝子配列は検出されていないため、1 週間の管理期間で十分であると考えられる)。

実際の治療においては、投与当日、1 日目、3 日目、7 日目に血液・尿よりベクター由来の核酸配列が検出されないことを確認 (RT-PCR 法) した後、陰性の場合にのみ一般病棟へ移送する。

### ⑦ 染色体内へ遺伝子が組み込まれる場合の問題点

フランスで施行されたレトロウイルスベクターを用いた X 連鎖重症複合免疫不全症 (XSCID) に対する臨床研究において、治療を施した患者 10 名のうち 4 名に T 細胞性白血病が発症し、その後の英国における同疾患に対する臨床研究において、1 名に T 細胞性白血病が発症したと最近報告された。フランスの 3 例と英国の 1 例では、白血病の原因は造血幹細胞の増殖に関与する *LMO2* 遺伝子の近傍へのプロウイルス挿入が確認されており、フランスの 1 例では、リンパ球の癌遺伝子 (*CCND2*) の近傍への挿入が確認されている。一方、ドイツで施行されたレトロウイルスベクターを用いた慢性肉芽腫症に対する臨床研究においても、治療を施した患者 2 名にベクターが組み込まれた顆粒球の異常増殖 (骨髄異形成症候群: MDS) が確認された。このように、レトロウイルスベクターを用いて造血幹細胞への遺伝子導入を必要とする臨床研究では、細胞の増殖活性を制御する遺伝子近傍へのプロウイルスの挿入により、細胞増殖が活性化されることによる合併症が報告されている。レトロウイルスベクターと同様に、レンチウイルスベクターは宿主ゲノムに組み込まれるため、ウイルスゲノムの LTR (long terminal repeat) 挿入による宿主染色体の過剰発現やプロウイルスゲノム挿入による insertional mutagenesis が生じる可能性がある。本臨床研究で使用する組換えレンチウイルスベクターは、5' LTR ならびに 3' LTR の U3、U5 領域を一部欠失させることによりその転写活性を排除できており、SIN (self-inactivation) 化されたベクターである。従って、プロウイルス組み込みに起因する宿主染色体由来遺伝子の非特異的発現の可能性は理論的に低いと予想される。また、insertional mutagenesis により必要な遺伝子発現を抑制する可能性が考えられるが、理論上可能性は低く、小動物 (マウス、ラット) およびサルを用いた実験でもがんの発生など、明らかな異常を認めなかった。

本ベクターによりヒト網膜色素上皮細胞株へ遺伝子導入し、プロウイルスの宿主染色体挿入部位を 747 クローンについて検討したところ、特定のホットスポットは検出されなかった。さらに、これまでの他の細胞で検討された HIV と同様、蛋白質をコードする遺伝子内部へ組み込まれる傾向 (488 クローン: 約 65%) があつた。また、がんに関与する遺伝子中、蛋白コード領域遺伝子内への組み込みは 31 クローン (約 4.1%) に認められたが、蛋白の構造に影響を与えるエクソン部位への遺伝子挿入は 2 クローンのみに見られ (約 0.27%)、この傾向はその他の遺伝子に対する組み込み (イントロン 94%、エクソン 6%) と同様であつた。

### ⑧ がん原性の有無

発現させるヒト PEDF は内在性のタンパク質であり、元来眼球に一定量存在すること、また欧米においてアデノウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究に使用された経験のある治療遺伝子であり、この試験でも悪性腫瘍の発生は報告されていない。

上記のごとく、染色体への SIV プロウイルスの組み込みに伴う宿主がん遺伝子の過剰発現や宿主がん抑制遺伝子の発現抑制による発がんの危険性については、HIV と同等程度の可能性は否定出来ない。これまでのマウス、ラットを用いた実験において、全経過を通じて悪性新生物の発生を認めず、カニクイザルを用いた長期安全性試験においても、少なくとも遺伝子導入 2 年後までの悪性新生物の発生は確認されていない。また対象臓器は異なるが、これまで欧米で使用されている AAV や HIV による臨床研究においてもがん原性は確認されていない。

以上から、本臨床研究に伴う発がんの可能性は比較的低いと推察される。

### (2) 遺伝子産物の安全性

PEDF はヒト胎児網膜色素上皮細胞の培養上清から分離・精製された因子

	<p>であり、眼内局所において比較的豊富に存在する。PEDFの高発現時における生体への毒性は明らかではないが、眼内での過剰発現による毒性は非常に低いと考えられ、動物実験においても明らかな毒性は全症例で確認されていない。</p> <p>さらに、米国において施行されているAdPEDFの硝子体内投与の臨床研究においても、ヒトPEDFの過剰発現による毒性は示されていない。</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>これまでに、網膜色素変性(RP)に対し臨床的に明らかに有効な治療法の報告はなく、日常診療においては、生活指導など患者の現有視力を有効に利用するための情報提供などといったcareが中心となっているのが現状である。</p> <p>前臨床効能試験成績より考察すると、本臨床研究計画はRPにおける視細胞変性の進行(視機能の低下)を有意に遅延させることが期待でき、cureを目指した治療法となる可能性がある。</p> <p>また、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、ベクターの相同組換えによるRCLs発生の可能性が理論的に極めて低いこと、安全性試験により全身へのウイルス散布が検出されていないことから、発癌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。</p> <p>九州大学病院眼科は、RPに関する永年の豊富な診療経験と優れた診断技術を有し、ベクター投与に際して必要となる硝子体手術に関しても豊富な経験をもつスタッフを擁している。さらに、本臨床研究の対象となる患者も九州を中心に全国から集まっており、系統立てた診療とデータ管理体制が整っている。既に九州大学病院眼科における網膜色素変性専門外来では、200名以上の患者をフォローしており、そのほとんどの患者において1年以上の継続した視機能および全身状態に関する綿密なデータを集積している。</p> <p>遺伝子治療臨床研究においては、既に厚生科学審議会より実施承認を得た臨床研究が進められており、カルタヘナ関連法、個人情報保護法を含め、本臨床研究の実施に必要な学内・院内のシステムは全て整っている。九州大学病院北棟11階には遺伝子治療専用病室(無菌病棟内遺伝子治療室)を既に設置している。</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>
<p>実施計画</p>	<p>(1) 遺伝子治療臨床研究を含む全体の治療計画</p> <p><b>【本臨床研究の実施に際し設置される委員会】</b></p> <p>本遺伝子治療臨床研究においては、選定患者の適応、臨床研究の安全性を客観的に判定するため、九州大学病院内に九州大学病院先進医療適応評価委員会を設置する。</p> <p>この委員会は両性よりなる学内外の専門家より構成され、本臨床研究に関与する医師他は含まれない。本委員会においては、本臨床研究に関与する研究者は症例の提示以外の委員会会議への参加は行わないが、有害事象発現時の状況の説明など、委員会が必要と認めた場合には、総括責任者を含め本臨床研究に関与する医師の参加を要請することができる。いずれの場合も、症例の適応評価判定やステージアップ判定など決定事項の合議の際には、臨床研究に関係する研究者は退席させる。また以下の委員会の委員は、必要に応じて患者の容態の診察や診療録などの直接閲覧する権限を有する。また委員会は必要に応じて、疾患専門委員など、委員以外の外部の専門家を招聘し、その意見を聴くことにより判定の参考にすることができる。</p> <p>委員会の運営については、別途作成した手順書に従って行う。</p> <p>各種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</p>



署名または記名捺印を受けた議事録を作成し、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。特にステージアップ判定、有害事象・重大事態等発生時の因果関係判定、ならびに臨床研究全般の安全性評価総合判定については、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議事録を作成し、九州大学病院長へ提出した後、その写しを九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、総括責任者および所轄官庁へ提出する。

・ 九州大学病院先進医療適応評価委員会：

〔役割1〕 治療前適応評価

本臨床研究の候補として登録された患者の治療前検査が問題なく実施されたか検討する。治療前検査の実施に問題が無い場合、そのデータを参考に、患者の病状が選定基準に合致するか、そして除外項目に抵触しないかを検討することにより、本臨床研究の対象患者として適当か否かを判定する。

〔役割2〕 ステージアップ適応評価

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急性期の安全性が確認された後、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議事録を作成し、九州大学病院長へ提出する。またその写しを九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、総括責任者および所轄官庁へ提出する。

〔役割3〕 有害事象・重大事態等発生時の対応

有害事象・重大事態等の発現に際し、総括責任者ならびに分担研究者・その他の協力者より状況の報告と臨床データの提示を求め、本臨床研究薬との因果関係、臨床研究の続行の可否について判定する。

〔役割4〕 臨床研究全般の安全性評価総合判定

最後の被験者投与後2年間実施し、全症例の2年目のデータをもって九州大学病院先進医療適応評価委員会にて遠隔期の安全性を判定する。本委員会では最終報告書を九州大学病院長へ提出し、またその写しを九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、総括責任者および所轄官庁へ提出する。以上をもって本臨床研究の終了とする。

(注) 本臨床研究終了後、染色体組込型ウイルスベクターに関する米国FDAの推奨(2006年11月発行: Guidance for Industry; Gene Therapy Clinical Trials- observing participants for delayed adverse events)に則り、九州大学病院眼科網膜色素変性再来において被験者のフォローアップを最低年1回、終生行う。フォローアップ期間中に生じた被験者に関する新たな知見(有害事象を含む)については、九州大学病院眼科科長が速やかに報告書を作成し、九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会および所轄官庁へ報告する。また本臨床研究の被験者が死亡した場合、原則的に投与眼球を含めた剖検を依頼するものとするが、被験者あるいはその家族が同意しない場合は、これを理由として臨床研究への被験者登録の条件としない。

**【本臨床研究の実施手順】**

**〔患者選定、登録から治療前検査〕**

本遺伝子治療臨床研究の適応が予測される患者については、九州大学病院にて患者ならびに家族(あるいは親族)に対し文書によるインフォームド・コンセント(第1回目)を行い、同意が得られた場合に限り、本臨床研究へエンロール(患者登録)し治療前検査を開始する。

**〔患者適応評価から治療実施〕**

治療前検査にて後述する選択基準に合致、さらに除外基準に抵触しないことが明らかになった場合、九州大学病院内に設置されている九州大学病院先進医療適応評価委員会にて適応を評価する。

2度にわたる十分なインフォームド・コンセントにより、被験者ならびに家族（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被験者の適応は、治療前検査の結果を踏まえ、九州大学病院先進医療適応評価委員会により判定され、その結果を踏まえ第2回目の同意取得が成される。

1) 術前日より抗生物質を点滴静注する。術後3日まで点滴を継続する。抗生剤の点眼は術前日より開始し、術後も継続して行う。また手術操作等による眼内非特異炎症予防の目的で、術翌日よりステロイド剤の点眼を行う。

2) 術当日、九州大学病院北棟3階分子・細胞調製センター内細胞保存ユニットに $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保管してあるSIV-hPEDF溶液を封入しているバイアルを同施設内安全キャビネット内へ移動、溶液を溶解する。希釈溶媒であるBSSにて最適に希釈する（治療低用量： $2.5 \times 10^7$  TU/ml、治療高用量： $2.5 \times 10^8$  TU/ml）。

3) 希釈したSIV-hPEDF溶液を専用のキャリアバック内に厳重に封入して、保冷下で九州大学病院南棟3階手術部へ搬入する。

4) 手術部にて局所麻酔（球後麻酔またはテノン嚢下麻酔）下に、硝子体手術により硝子体を切除後、SIV-hPEDF液を37Gもしくは41Gの網膜下注射針（ドルク社）を用いて網膜下に注入する。注入部位は眼底所見に基づき、原則、黄斑を回避した網膜に注入（原則4カ所、1カ所あたり $50\ \mu\text{l}$ 、合計液量 $200\ \mu\text{l}$ ）する。但し強い網膜癒着のためベクター液注入が困難な場合は、必要に応じて適宜減ずる。注入部裂孔は眼内レーザー等により確実に閉鎖し、硝子体腔へのベクター散布ならびに術後の網膜剥離を予防する。白内障を合併する患者には、同時に超音波乳化吸引術+眼内レンズ挿入術を併用して施行する。なお、ベクター液濃度はベクター力価漸増式に2段階（治療低用量5例、治療高用量15例）設定し、第1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急性期の安全性が確認された後、第2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議事録を作成し、九州大学病院長へ提出する。またその写しを九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、総括責任者および所轄官庁へ提出する。

5) ベクター投与後、第一種使用規程に基づいたベクターの拡散防止措置を取りつつ、被験者を速やかに遺伝子治療室（北棟11階遺伝子治療室：1181号室および1182号室）へ搬送・隔離する。原則として同室における7日間の管理を行い、血液中および尿中にベクターゲノムが検出されないことを確認の上隔離を解除、一般病棟（南棟11階眼科病棟）へ転棟する。7日目のサンプルにてベクターゲノムが検出された場合、陰性化するまで適宜隔離期間を延長する。

6) 別紙1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（視力、眼圧、前眼部細隙灯検査、および眼底検査などの眼科的検査、バイタルサイン、呼吸機能検査、心機能検査、腎機能検査、肝機能検査、一般血液・血清検査、尿検査、ベクターゲノムコピー数測定、ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体価など）を行う。

## (2) 被験者の選定基準及び除外基準

選定基準：以下のすべての条件を満たす患者の片眼を対象とする。対象眼は、視力・視野により総合的に判定し、視機能の低い非優位眼とする。

1) 厚生労働省特定疾患治療研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮に関する調査研究班の定める診断基準に従い、2名以上の眼科専門医によって網膜

色素変性と診断された患者（ゲノム診断は原則として行わない）  
2）成人（満40歳以上）  
3）九州大学病院眼科において、視野検査、および網膜電図が定期的に施行されており、それらのデータが被験者登録予定日より逆算して1年以上記録・保管されている患者

候補対象患者は治療前検査データを基に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にて適応を評価する。

#### 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) HIV 抗体陽性の患者（注）  
（既感染の有無について事前に治療前検査として本検査を実施することを説明）
- 2) 対側眼が失明している患者
- 3) 網膜色素変性による黄斑部疾患を合併する患者
- 4) 緑内障を合併している患者
- 5) 眼底検査（蛍光眼底造影検査、スキャニングレーザー眼底撮影なども含む）にて、網膜もしくは網膜下に網膜色素変性によらない病変
- 6) 重篤なアレルギーを有する、あるいは既往のある患者
- 7) 慢性人工透析を受けている患者
- 8) 重症の心機能障害、心不全を有する患者
- 9) 重篤な肝機能障害、肝硬変を有する患者
- 10) 活動性の炎症性疾患を有する患者
- 11) 最近6ヶ月以内に脳出血、脳梗塞などの既往のある患者
- 12) 血液疾患を有する患者
- 13) アルコール依存症、薬物依存症患者
- 14) 妊娠中の女性、妊娠が疑われる女性、あるいは授乳中の女性患者（避妊指導を行う）
- 15) 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相当と見なした患者

（注）HIV 既感染者は、本臨床研究で使用する SIV ベクターとの相同組換えにより自己増殖能を有するウイルス（replication competent lentivirus: RCL）が出現する可能性が、低頻度ながら否定出来ないため、その既感染の有無に関するチェックを必須とする。

#### (3) 被験者の同意の取得方法

網膜色素変性に対して現時点で有効な治療法がないこと、本臨床研究の実施に同意しない場合であっても何ら不利益は受けないこと、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、本臨床研究により起こりうる副作用、他の開発中の治療法、個人情報保護の保護、等に関して十分な説明を被験者本人及び家族（あるいは親族）に対して行い、その十分な理解を得た上で自由な意思に基づいて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。

同意の取得は患者登録時、および全身検索が終了し、九州大学病院先進医療適応評価委員会が適応有と判定した後の、計2度行う。

また、同意に関連し得る新たな重要な情報を入手した場合は、その情報を被験者及び家族（あるいは親族）に伝え、継続して参加するか否かについて被験者の意思を確認する。

#### (4) 実施期間及び目標症例数

研究実施期間：承認時より 60 ヶ月

各症例の研究実施期間：遺伝子導入後 24 ヶ月

(本臨床研究の安全性は全症例への投与終了後、24 ヶ月の観察を以て判定される)

追跡調査期間：臨床研究終了後、最低年 1 回の外来受診を終生実施する  
本臨床研究終了後、染色体組込型ウイルスベクターに関する米国 FDA の推奨 (2006 年 11 月発行：Guidance for Industry; Gene Therapy Clinical Trials- observing participants for delayed adverse events) に則り、九州大学病院眼科において被験者のフォローアップを最低年 1 回、終生行う。フォローアップ期間中に生じた被験者に関する新たな知見 (有害事象を含む) については、九州大学病院眼科科長が速やかに報告書を作成し、九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、および所轄官庁へ報告する。また本臨床研究の被験者が死亡した場合、原則的に投与眼球を含めた剖検を依頼するものとするが、被験者あるいはその家族が同意しない場合は、これを理由として臨床研究への被験者登録の条件としない。

目標症例数：20 例 (2 段階：治療低用量 5 例、治療高用量 15 例)

#### (5) 遺伝子治療臨床研究の実施方法

##### ① 対照群の設定方法

本研究計画に用いるベクターは世界的に使用例がないことを鑑み、安全性の評価を主眼とした最大使用量までの 2 段階の用量漸増式とし、対照群は置かない。但し本臨床研究は片眼のみを対象としているため、非投与眼の所見を便宜上の対照とする。

治療低用量群において 5 名の投与が終了し、5 例目の投与が終了して 28 日間までの時点で、九州大学病院内に設置され、院内外の委員からなる九州大学病院先進医療適応評価委員会を開催、治療低用量群 5 名の患者の 28 日までの全ての臨床データをもとに安全性 (急性期) を評価する。本委員会で安全性に問題がないと判断された場合、総括責任者は、委員会結果報告書及び参加委員全員の署名又は記名捺印を受けた議事録の送付を受けて、治療高用量群の症例エントリーを開始する。

##### ② 遺伝子導入方法

局所麻酔 (球後麻酔またはテノン嚢下麻酔) 下に、硝子体手術により硝子体を切除後、SIV-hPEDF 液を 37G もしくは 41G の網膜下注射針 (ドルク社) を用いて網膜下に注入する。注入部位は眼底所見に基づき、原則、黄斑を回避した網膜に注入 (原則 4 カ所、1 カ所あたり 50  $\mu$ l、合計液量 200  $\mu$ l) する。但し強い網膜癒着のためベクター液注入が困難な場合は、適宜減ずる。注入部裂孔は眼内レーザー等により確実に閉鎖し、硝子体腔へのベクター散布ならびに術後の網膜剥離を予防する。白内障を合併する患者には、同時に超音波乳化吸引術+眼内レンズ挿入術を併用して施行する。なお、ベクター液濃度はベクター力価漸増式に 2 段階 (治療低用量 5 例、治療高用量 15 例) 設定する。

##### ③ 前処置及び併用療法の有無

本臨床研究の対象は既存の外科手術を含めた治療法が無効であること

が自明である患者のみとする。

被験者の不利益を最小限にすること、本臨床研究が安全性評価を主眼にすることを考慮し、併用薬剤に関しては抗ウイルス剤を除き、特に制限しない。

抗ウイルス剤は患者登録から投与後 28 日後の検査終了後まで有害事象の処置を除き使用しない。

併用薬剤には以下のものが挙げられるが、これに限るものではない。

- 1) 亜硝酸剤
- 2) 降圧剤
- 3) 血小板機能抑制剤
- 4) 抗凝固剤、血栓溶解剤
- 5) 血管拡張剤
- 6) 消炎鎮痛剤、消炎酵素剤
- 7) ステロイド
- 8) 抗生物質
- 9) 抗高脂血症剤
- 10) 蛋白分解酵素阻害剤
- 11) 抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤
- 12) その他

被験者には、ベクター投与後最低 12 ヶ月の避妊をするよう指導する。

#### ④ 臨床検査項目及び観察項目

本臨床研究における安全性の判定、有害事象の予見のために、以下の各種検査を実施する。なお検査実施時期については、別紙に記載する。

但し、病状によっては設定した時期以外にも実施されることがある。

##### 1) 眼科的検査所見：

###### (1) 視力・視野検査

視力は、万国式試視力表（ランドルト環）を用いて測定し、log MAR 視力にて表す。視野は、Goldmann 視野計、ハンフリー自動視野計もしくはそれに準ずる視野計を用いた視野を測定する。また、厚生労働省特定疾患治療研究事業、網膜脈絡膜・視神経萎縮に関する調査研究班の定める重症度分類を行う。

###### (2) 眼底検査

散瞳剤を用いて散瞳して後極部ならびに周辺部網膜を詳細に観察し、網膜変性部を記録する。また、視神経ならびに黄斑部を含む後極部の眼底写真を記録・保存する。

##### 2) 病状に対する検査

以下の検査を、効果判定の参考のために、予め設定した時期に実施する。

但し、病状によっては設定した時期以外にも実施されることがある。

###### (1) 眼圧検査

Goldmann 眼圧計、もしくはそれに準ずる眼圧計を用いて測定する。

###### (2) 細隙灯検査

###### (3) 蛍光眼底造影検査（FA、IA）

###### (4) 網膜電図（ERG）、ならびに多局所網膜電図（multifocal ERG）

###### (5) 光学的干渉断層計（OCT）

###### (6) 暗順応曲線

##### <安全性評価のための検査>

###### (1) 症状に関する問診：アレルギーの有無など

###### (2) バイタルサイン：体重、体温、血圧（収縮期／拡張期）、脈拍

###### (3) 呼吸機能検査：胸部 X 線（正、横）

###### (4) 腎機能検査：BUN、クレアチニン、尿蛋白、尿潜血

###### (5) 肝機能検査：アルブミン、免疫グロブリン（IgG、IgA、IgM、IgE）、

総ビリルビン、直接ビリルビン、AST、ALT、アルカリフォスファターゼ、LDH、 $\gamma$ -GTP

(6) 血液・凝固系：赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、白血球数、白血球分画、血小板数、PT、APTT、フィブリノーゲン

(7) 炎症マーカー：CRP

(8) 血液電解質：Na、K、Cl、Ca

(9) 悪性腫瘍スクリーニング検査

a) 頭部・胸部・腹部-CT

b) 血清 PSA-ACT (男性のみ)

c) 便潜血

d) 直腸診

e) 上部消化管内視鏡

f) 子宮頸部細胞診 (女性のみ)

(10) 妊娠検査 (女性のみ、必要な場合)：尿中 HCG

(11) 血清サイトカイン定量 (ELISA 法)：

IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$

(12) 全血中ならびに尿中 SIV-hPEDF 由来核酸配列の検出 (RT-PCR 法) 血液および尿より採取した RNA を鋳型に逆転写を行い、生成された cDNA に対して以下のプライマーを用いて PCR を行い、SIV-hPEDF のパッケージングシグナル ( $\Psi$ ) 領域を検出する。

(フォワードプライマー: CGGAGGGCTTAAAAAGTCTGTTC,

リバースプライマー: ATAGGGCTTGAAACATGGGTACT)

(13) 血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体価 (ELISA 法)

(14) 前房水採取 (27G 針による前房水穿刺: 同意が取れた被験者のみ)：ヒト PEDF 蛋白測定 (ELISA 法)

(15) 病理解剖

遺伝子導入後の死亡例で、家族あるいは親族の承諾が取れた症例全てにおいて病理解剖 (剖検) を行う。通常の全身解剖に加え、遺伝子導入眼を摘出し、PCR 法による SIV-hPEDF 由来核酸の検出 (全身分布)、眼内におけるヒト PEDF 濃度の測定、ならびに病理組織学的検討を行う。

## ⑤ 予想される副作用及びその対処方法

### 1) 網膜下投与の操作に伴う、可能性がある副作用

(1) 一般的事項 (投与眼周囲の痛み・腫脹)

→ (対処法) 非ステロイド系消炎・鎮痛剤の投与等、適切な対処を行う。

(2) 細菌性眼内炎

→ (対処法) 抗生物質の投与等、適切な対処を行う。炎症が高度の場合は硝子体手術を施行する場合もある。

(3) 網膜・脈絡膜出血、硝子体出血

→ (対処法) 止血剤、血管強化剤の投与。硝子体出血が遷延する場合は硝子体手術による洗浄を施行する。

(4) 網膜裂孔および網膜剥離

→ (対処法) 網膜剥離の原因となる裂孔周囲にレーザー光凝固を施行する。光凝固により網膜剥離の進行が防止できない場合は手術 (硝子体手術、もしくは強膜内陥術) を施行する。

(5) 増殖硝子体網膜症

→ (対処法) 硝子体手術を施行する。

### 2) ベクター (組換えアフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスベクター) に関して起こりえる副作用

(1) 発がんの可能性

本ベクターは細胞へ遺伝子を導入した後、核内で逆転写酵素により DNA へ変換される。変換された DNA は LTR (long terminal repeat) の働きにより宿主細胞のゲノム DNA に組み込まれる。この組み込みにより、遺伝子挿入変異誘発 (insertional mutagenesis) を生じる可能性がある。少なくとも動物実験では確認されていないが、この機序による発がんを惹起する危険性は否定できない。

→ (対処法) 遺伝子治療後、臨床研究期間内だけでなく臨床研究終了後も、外来にて定期的に悪性腫瘍に関するスクリーニングを行う。

#### (2) SIRS (systemic inflammatory response syndrome)

他のウイルスベクターで報告されているのと同様、生体へ投与された後、軽度ではあるが、自然免疫系の賦活化による眼内炎症性サイトカインの誘導、獲得免疫の誘導による抗体産生と細胞傷害性 T 細胞の誘導がマウス、サルなどで確認されており、これらが患者の病状へ悪影響を及ぼす可能性は否定できない。

→ (対処法) 血清中サイトカイン、血中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体価、血中・尿中アフリカミドリザル由来サル免疫不全ウイルスゲノムコピー数、を予め設定した時期 (別紙 1) に測定し、被験者へ悪影響を及ぼす危険性の予見を行う。

#### (3) 眼圧上昇

サルにおける安全性試験 (急性毒性試験) の 1 個体において、術後 3 ヶ月での持続した眼圧上昇が観察されている。ベクター投与との因果関係は明らかではないが、眼圧上昇により、患者の視機能へ悪影響を及ぼす可能性は否定できない。

→ (対処法) 眼圧測定、隅角鏡検査を定期的に施行し、患者への悪影響を及ぼす危険性の予見を行う。眼圧上昇に対しては、緑内障治療薬点眼など適切な処置を行う。

#### 3) ヒト色素上皮由来因子 (PEDF) の過剰発現に伴い、予想される副作用

本来、PEDF は網膜色素上皮細胞より恒常的に分泌されているタンパクであり、眼内には比較的少量に存在するため、眼局所においては過剰発現に対する安全域は広いことが予想される。また、その生理活性は神経保護効果と病的血管新生に対する抑制効果であるため比較的 안전한タンパクであると考えられ、眼内の環境を悪化させる可能性は低いと考えられる。さらに、安全性試験における SIV-hPEDF 投与眼に肉眼的ならびに光学顕微鏡的に病的な変化を認めなかったことから、眼局所への影響は少ないと考えられる。全身への影響は現時点では予測不能であるが、安全性試験では重篤な副作用は観察されていない。

さらに、米国において施行されている AdPEDF の硝子体内投与の臨床研究においても、ヒト PEDF の過剰発現による毒性は示されていない。

#### 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

以下の各項目について集計し、本臨床研究の安全性については九州大学病院先進医療評価委員会が総合的判定を行う。

判定時期は全症例の投与が終了し、全症例の観察期間が 24 ヶ月を終了、24 ヶ月目までの観察データ全ての仮固定が終了した時点で、総括責任者が九州大学病院院長ならびに九州大学病院先進医療評価委員会へ判定依頼を行う。依頼を受けた九州大学病院先進医療評価委員会は判定作業を行う。判定作業終了後、委員会は判定結果について、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議事録を作成し、九州大学病院院長へ提出する。また、その写しを九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、総括責任者および所轄官庁へ提出する。

安全性に関する観察・検査項目・日程の詳細は別紙の通りである。

なお、本臨床研究の安全性判定は投与後 24 ヶ月までのものを使用するが、本研究で用いるウイルスベクターが世界で初めてのヒトへの投与となることを鑑み、臨床研究終了後も終生、九州大学病院眼科外来にてフォローアップを行う。

## 1) 安全性に関する判定に必要な検査項目

- < 1 > 有害事象
- < 2 > 臨床症状：アレルギー（発疹、呼吸困難など）の発現の有無など。
- < 3 > バイタルサイン：体重、体温、血圧、脈拍
- < 4 > 眼科的検査
  - (1) 視力・視野検査
  - (2) 眼底検査
  - (3) 眼圧検査
  - (4) 細隙灯検査
  - (5) 蛍光眼底造影検査 (FA、IA)
  - (6) 網膜電図 (ERG)、ならびに多局所網膜電図 (multifocal ERG)
  - (7) 光学的干渉断層計 (OCT)
  - (8) 暗順応曲線
- < 5 > 各種検査
  - (1) 呼吸機能検査
  - (2) 腎機能検査
  - (3) 肝機能検査
  - (4) 血液・凝固系
  - (5) 炎症マーカー
  - (6) 血液電解質
  - (7) 悪性腫瘍検査
  - (8) 妊娠検査（女性のみ、必要な場合）
  - (9) 血清サイトカイン定量 (ELISA 法)
  - (10) 全血中ならびに尿中 SIV-hPEDF 由来核酸配列の検出 (RT-PCR 法)
  - (11) 血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体価 (ELISA 法)
  - (12) 前房水採取 (27G 針による前房水穿刺：同意が取れた患者のみ)
  - (13) 病理解剖

## 2) 臨床研究の中止判定基準

以下の条件のいずれかを満たす事象が生じた時、総括責任者は分担研究者と合議の上、本臨床研究の中止を決定することができる。その場合は中止の理由を九州大学病院長ならびに九州大学病院先進医療評価委員会へ書面により 7 労働日以内に報告しなければならない。

< 1 > 臨床研究の開始の後に、被験者が除外項目に抵触する虚偽の申告をしていたことが明らかになった場合。

< 2 > 被験者の症状が変化し、本臨床研究の継続が困難であると判断された場合、以下に検査項目あるいは臨床症状において中止の基準になる代表的な項目を挙げるが、中止判定の基準はこれに限るものではない。また数値はあくまで参考値であり、病状を判定する基準値ではない。

1. 高度の貧血 (Hb<7 g/dl)
2. 高度の白血球減少 (WBC <2,000/ $\mu$ l)
3. 高度の血小板減少 (Plt<30,000/ $\mu$ l)
4. DIC を示唆する所見 (Fbn の減少など)
5. 高度の肝機能傷害 (ALT, AST>100U/L)
6. 高度の腎機能傷害 (Cr>3.0 mg/dl)
7. 高度の肺機能低下 (PaO<sub>2</sub><50 mmHg など)
8. 心不全の徴候



9. その他、生命維持に関わる危険性があると考えられる副作用  
<3>重篤<sup>注)</sup>な有害事象や副作用が確認された時

1) 重大事態等：下記のいずれかに該当する場合は、「重大事態等」として取り扱う。

i) 被験者が死亡した場合

ii) 重篤<sup>注)</sup>な副作用が発生した場合

iii) 本臨床研究の実施に影響を及ぼす可能性のある知見（国内外を問わない）

を入手した場合

注) 重篤の定義

1) 死亡

2) 死亡につながる恐れのある事象

3) 入院または入院期間の延長が必要とされる事象

4) 永続的もしくは重大な機能障害・機能不全を呈した事象

5) 先天異常・出生異常

6) その他医学的に重要な事象

「死亡」、「死亡につながる恐れ」または「入院」には至らなくとも、被験者を危険にさらしたり、上記のような結果に至らぬように内科的または外科的処置を必要とした場合には、適切な医学的判断に基づいて、重篤な事象と判断する。

<4>その他、総括責任者ならびに分担研究者が中止すべきと判断した時。

#### ⑦ 重篤な有害事象が発現した場合の措置

臨床研究との因果関係の有無に関わらず、重篤な有害事象が発現した場合は、適切な処置を行うとともに、九州大学病院先進医療適応評価委員会の規程、内規及び、重大事態発生時の流れに従い九州大学病院長、九州大学病院先進医療評価委員会、九州大学病院遺伝子治療臨床研究倫理審査委員会、九州大学病院高度先端医療センターならびに所轄官庁へ速やかな報告を行う。

#### ⑧ 症例記録に関する記録用紙等の様式

専用の記録用紙を2部用意し、1部はカルテと一緒に保管、1部は九州大学病院高度先端医療センターに研究終了後少なくとも5年間は厳重に保管する。

症例記録記載内容については、カルテと照合しデータの品質管理を行う。

コメント、有害事象に関する判断事項については、症例記録に記載された事項を原データとして取り扱う。

#### ⑨ 記録の保存及び成績公表の方法

本人および家族（あるいは親族）の同意のもとに学術集会、学術雑誌、およびマスコミへの公表を行う。その際はプライバシーには十分に配慮し、本人の氏名を含め個人情報特定できない形での公表を行う。

記録の保管は、九州大学病院長が指名した保管責任者が行い、少なくとも臨床研究終了後5年間保存する。

保管責任者：所属 九州大学病院高度先端医療センター

職種 センター長・教授 氏名 中西洋一

#### (6) 本臨床研究における個人情報保護

##### ① 個人情報保護に関する責務

国立大学法人九州大学（以下、本学という）は、独立法人等の保有する個人情報の保護に関する法律、独立法人等の保有する個人情報の適切な管理のための措置に関する指針に基づき、国立大学法人九州大学が保有する個人情

報の管理について九州大学個人情報管理規程に必要な事項を定めている。本学の総長は文部科学大臣により任命され、本学の個人情報保護体制の最高責任者である。総長は本学の個人情報保護の管理体制として個人情報総括保護管理者を置き、個人情報総括保護管理者の下に個人情報保護管理者、個人情報保護担当者を置き、個人情報保護管理の徹底を行っている。個人情報総括保護管理者は、総長により指名され、総務担当理事が任命をうけている。九州大学病院においては、九州大学病院長、病院事務部管理課長はそれぞれが個人情報総括保護管理者により個人情報保護管理者として指名をうけており、九州大学病院長、病院事務部管理課長は九州大学個人情報管理規程、九州大学病院個人情報保護規程に従い組織的に個人情報保護に対する措置を図っている。保護管理者である九州大学病院長、病院事務部管理課長はこれらの規程に従い、本臨床研究に関する個人情報保護に関する措置に関し、適正な実施を確保するために必要があると認めるときは、本臨床研究の総括責任者に対して、適宜必要な措置をとることができる。

## ② 個人情報の取得と利用に関する制限

### 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

九州大学病院は診療・教育機関として、臨床医学の発展と次世代を担う医療人の育成という社会的な使命の実現に向けて、一般的な診療行為・教育に関する以下に挙げる目的に限り、患者様の個人情報を使用する。この使用に関しては、個人情報の保護の法律に基づいた九州大学個人情報管理規程、九州大学病院個人情報保護規程や研究活動の実施に関する法令や倫理指針等を遵守した上で取り扱われる。また、九州大学病院を受診する患者様には「患者様の個人情報の保護に関するお知らせ」を用いて九州大学病院で使用する個人情報の使用目的について理解と協力を求めている。

#### (1) 九州大学病院での利用

- ・被験者が受ける医療サービス
- ・医療保険事務
- ・被験者に関係する管理運営業務

(入退院等の病棟管理、会計・経理、医療事故の報告、医療サービスの向上)

- ・医療サービスや業務の維持・改善のための基礎資料

#### (2) 九州大学病院および九州大学での医学教育における利用

- ・医学・歯学・薬学・保健学系の教育（ベッドサイドティーチングなど病院内での診療等に関わる医学教育に限る）
- ・教職員の研修（研修医や新任看護師等への病院内研修、及び医療サービス等、前項（1）に関わる病院事務系職員の研修等に限る）
- ・研究活動（遺伝子治療臨床研究を含め、実施に関する法令や倫理指針、関係団体等のガイドライン等が定められている場合は、それを遵守する）

#### (3) 他の事業者等への情報提供

- ・他の病院、診療所、助産所、薬局、訪問看護ステーション、介護サービス事業者等との医療サービス等に関する連携
- ・他の医療機関等からの医療サービス等に関する照会への回答
- ・被験者の診療等にあたり外部の医師等の意見・助言を求める場合
- ・検体検査業務の委託その他業務委託
- ・被験者の家族等への診療に関わる説明
- ・医療保険事務（保険事務の委託、審査支払機関への提出）
- ・審査支払機関または保険者からの照会への回答
- ・関係法令等に基づく届出および報告書
- ・関係法令に基づいて事業者等からの委託を受けて健康診断を行った場合の事業者等へのその結果の通知
- ・医師賠償責任保険等に関わる医療に関する専門の団体、保険会社等へ

の相談又は届出等

- ・医療上の安全に関わる行政機関又は医療に関する専門の団体等への届出等
- ・医学・歯学・薬学・保健学系の教育研究機関への提出
- ・他の医療機関等との医学の発展を目的とした共同研究活動
- ・外部監査機関への情報提供

## 2) その他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

上記の診療・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に加え、本臨床研究の遂行における個人情報の利用・取扱いについては、総括責任者はあらかじめ被験者の個人情報の利用目的を公表している場合を除き、速やかに、その利用目的を被験者等に通知し、又は公表しなければならない。

本臨床研究で扱う被験者の診療記録をはじめとする個人情報は、主として病状経過観察、本臨床研究の緊急事態発生のための連絡など、被験者の生命を守るために用いる。その他特別の目的で使用する場合は、事前に被験者および家族（あるいは親族）に再度説明し了解を得てから使用する。

また、本臨床研究の成果検討時や医療向上のためなどを目的に試験成績などを公表・公開する場合は、個人を特定できない形すなわち個人情報を保護して公開する。これらのことは、被験者及び家族（あるいは親族）への同意説明文書中に記載し、被験者へ個人情報の保護及び使用目的について通知し同意を得る計画とした。

被験者及び家族（あるいは親族）の同意取得は、自由意思によるものであり、臨床研究に参加しない場合であっても被験者に不利益はない。このことは医学研究を行ううえで大切な倫理であるため、本臨床研究では、これらのことを同意説明文書に記載し、被験者及び家族（あるいは親族）へ通知している。

総括責任者は利用目的の達成に必要な範囲内において、個人情報を正確かつ最新の内容に保つよう努めなければならない。

### ③ 個人情報保護に関する安全管理措置

九州大学病院長は九州大学個人情報管理規程、九州大学病院個人情報保護規程に従い、個人情報保護に関して、組織的に安全管理措置を実施し、個人情報の漏洩、滅失又は棄損の防止に対する措置を講じている。一方で個人情報の漏洩等に関わる新しい犯罪手法などが急速な勢いで多様化していることを鑑み、本臨床研究では規程等の柔軟な運用を以て、個別に適切な対応を行う。

さらに本臨床研究では、死者に関する個人情報が死者の人としての尊厳や遺族の感情及び遺伝情報が血縁者と共通していることに鑑み、生存する個人と同様に死者に関する個人情報についても同様の管理下で取り扱う。

### ④ 第三者提供の制限

総括責任者は、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九で掲げる内容に従い、あらかじめ被験者等の同意を得ないで個人情報を第三者に提供してはならない。本臨床研究では、第三者への個人情報の提供は予定していない。また、第三者への個人情報の提供を行う場合は、適切な目的であることを確認し、遺伝子治療臨床研究の指針第六章第九に従い、その旨被験者等へ通知する。

### ⑤ 個人情報の開示、訂正、利用停止等

総括責任者は、保有する個人情報に関し、次に掲げる事項について、被験者等の知りうる状態にしなければならない。

#### 1) 臨床研究実施機関の名称

	<p>2) 個人情報の利用目的  3) 個人情報の開示、訂正、利用停止等に関する手続き  4) 苦情の申出先</p> <p>本臨床研究においては、1)、2)、4) について、同意説明文書に明記した。また、3) については、それらの手続きができることを同意説明文書に明記し、その申し出に応じて、手続きの詳細を九州大学個人情報開示等取扱規程に従い被験者及び家族（あるいは親族）に説明する。</p> <p>総括責任者は被験者等から当該被験者が識別される保有する個人情報についての開示、訂正、利用停止等について、九州大学個人情報開示など取扱規程に従い求めがあった場合は、遅滞なく必要な対応を行うほか、対応結果について被験者等に通知しなければならない。</p> <p>さらに、九州大学病院で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。</p> <p>[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  F A X：092-642-5155</p>
備 考	

検査項目一覧表

検査項目①②	検査者 青島	検査取得日	入院(治療中)		外来(治療後)	
			入院(治療中)	外来(治療後)		
検査者 青島	検査取得日	検査取得日	検査取得日	検査取得日	検査取得日	検査取得日
理病歴・既往症の問診	問診取得日	問診取得日	問診取得日	問診取得日	問診取得日	問診取得日
前処置・後処置	前処置	後処置	前処置	後処置	前処置	後処置
病状に対する検査	病状に対する検査	病状に対する検査	病状に対する検査	病状に対する検査	病状に対する検査	病状に対する検査
QOL	QOL	QOL	QOL	QOL	QOL	QOL
バイタルサイン	バイタルサイン	バイタルサイン	バイタルサイン	バイタルサイン	バイタルサイン	バイタルサイン
呼吸機能検査	呼吸機能検査	呼吸機能検査	呼吸機能検査	呼吸機能検査	呼吸機能検査	呼吸機能検査
心機能検査	心機能検査	心機能検査	心機能検査	心機能検査	心機能検査	心機能検査
腎機能検査	腎機能検査	腎機能検査	腎機能検査	腎機能検査	腎機能検査	腎機能検査
肝機能検査	肝機能検査	肝機能検査	肝機能検査	肝機能検査	肝機能検査	肝機能検査
血液・凝固系	血液・凝固系	血液・凝固系	血液・凝固系	血液・凝固系	血液・凝固系	血液・凝固系
腫瘍マーカー	腫瘍マーカー	腫瘍マーカー	腫瘍マーカー	腫瘍マーカー	腫瘍マーカー	腫瘍マーカー
臓器機能検査	臓器機能検査	臓器機能検査	臓器機能検査	臓器機能検査	臓器機能検査	臓器機能検査
血液電解質	血液電解質	血液電解質	血液電解質	血液電解質	血液電解質	血液電解質
尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査	尿性腫瘍スクリーニング検査
経膈検査	経膈検査	経膈検査	経膈検査	経膈検査	経膈検査	経膈検査
ウイルス検査	ウイルス検査	ウイルス検査	ウイルス検査	ウイルス検査	ウイルス検査	ウイルス検査
血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量	血清サイトカイン定量
SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)	SVI-HPED/由来核酸配列の検出 (RT-PCR法)
血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)	血清中抗ヒト水疱性口内炎ウイルス抗体 (ELISA法)
前房水採取	前房水採取	前房水採取	前房水採取	前房水採取	前房水採取	前房水採取

\*\*：ALP、γ-GTPは必須ではない。

①：一次スクリーニング②：検査開始前に実施する。③：その期間内は毎日実施する。④：その期間内は毎日実施する。⑤：アルブミンの増減(問診)は除く。