

九州大学病院の遺伝子治療臨床研究 実施計画について

(右又は左下頁)

1. 遺伝子治療臨床研究実施計画申請書及び概要書P 1
(当初：平成14年10月28日)
2. 遺伝子治療臨床研究実施計画概要書P15
(最終：平成17年9月28日)
3. 遺伝子治療臨床研究実施計画書P31
4. 遺伝子治療臨床研究のための説明と同意書P78
5. 遺伝子治療臨床研究実施計画に関する審議の経緯P230

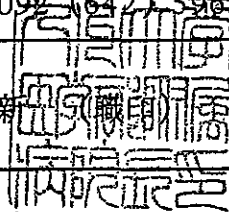
別紙様式第 1

遺伝子治療臨床研究実施計画 申請書

平成 14 年 10 月 28 日

厚生労働大臣殿

実施施設	所在地	福岡県福岡市東区馬出 3 丁目 1 - 1 (郵便番号 812-8582)
	名称	九州大学医学部附属病院 (電話番号 092 (642) 6064) (FAX 番号 092 (642) 5965)
	代表者 役職名・氏名	九州大学医学部附属病院長・名和田 新



下記の遺伝子治療臨床研究について、別添の実施計画に対する意見を求めます。

記

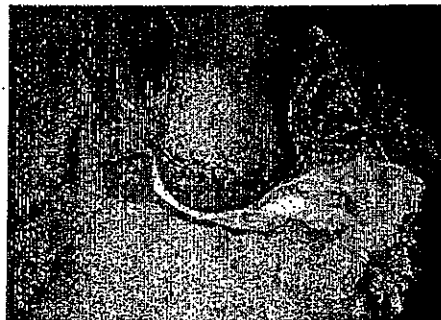
遺伝子治療臨床研究の課題名	総括責任者の所属・職・氏名
血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクターによる慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、バージャー病）に対する血管新生遺伝子治療臨床研究	九州大学医学部附属病院 第 2 外科・教授 前原 喜彦

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)	
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	
研究実施期間		平成 年 月 日(承認日) から18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	九州大学医学部附属病院 第2外科・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	九州大学医学部附属病院 第2外科病棟 ならびに 手術部	
	連絡先	福岡市東区馬出3丁目1-1 (電話番号092(642)6064)	
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 竹下 彰 伊東 啓行 江頭 健輔 米満 吉和	九州大学大学院医学研究院・病理病態学・教授 九州大学医学部附属病院・循環器内科・教授 九州大学医学部附属病院・第2外科・助手 九州大学医学部附属病院・循環器内科・講師 九州大学医学部附属病院・病理部・助手	副総括責任者、臨床研究の評価と総括、 <u>生体材料の病理組織学的評価</u> 副総括責任者、臨床研究の評価と総括 臨床研究の実施 <u>臨床研究の実施</u> ベクターの構築、設計、管理、基礎分野からの研究計画の推進
協力研究者		(九州大学医学部附属病院) 高橋成輔(麻酔科蘇生科・教授)、本田 浩(放射線科・教授) 岡野慎士(医員)、池田康博(医員)、福永亮大(医員) (九州大学大学院医学研究院) 柳 雄介(ウイルス学・教授)、中島 豊(病理病態学・講師) 中川和憲(病理病態学・講師)、鬼丸満穂(病理病態学・研究員)、 金 成豪(病理病態学・研究員)、谷井 貢(大学院生)、金子和裕(大学院生) 井口博之(大学院生)、佐田志穂子(病理病態学・支援研究員) (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(名古屋大学脈管外科教授)、今泉 勉(久留米大学第3内科・教授) 室原豊明(名古屋大学循環器内科・教授) 加藤 篤(国立感染症研究所・ムンプス感染研究部・室長) 長谷川護((株)ディナベック研究所・取締役研究所長) 岩崎 仁((株)ディナベック研究所・部長)	

審査委員会 が研究計画 の実施を適 当と認める 理由	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1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と認めた。 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と認めたため、所轄官庁に臨床研究実施計画を申請することを決定した。	
	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 病態修復内科学・教授	原田 実根 (印)
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	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大腸癌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。 我々は独自に開発した全く新しい組換えウイルスベクター（センダイウイルスベクター：SeV）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かつ安全であることを、動物実験で見い出した。 本研究計画では、1）ヒトにおけるSeV/dF-FGF2投与の安全性を明らかにし、2）効果を示すと考えられる投与量を決定することを目的とする。
対象疾患 及び その選定理由	<u>1) 対象疾患</u> 閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性動脈炎患者のうち、バイパス手術の適応のない、以下の患者を対象とする。 (1) Fontaine III度～IV度患者（安静時疼痛、虚血性潰瘍・壊死を有する）で、かつ40歳以上の症例。 (2) Fontaine II度（間歇性跛行）患者で、歩行制限（200 m以下）のため本人および家族が本臨床試験の実施を強く希望する患者。かつ40歳以上の症例。   Fontaine IV度の虚血性壊死 同一患者の下腿切断術後 <u>2) 対象疾患の選定理由</u> 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。

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

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%

Eur J Vasc Endovasc Surg 1997

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 (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施行されており、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ルを開始した。これらは新しい治療法として期待されているものの、プラスミドの遺伝子導入効率は極めて低いため、治療効果の限界が予想される。さらにはその低い遺伝子発現効率ゆえに、治療遺伝子の有効域、中毒域など臨床的に有益な情報が得られていないことは、これら臨床試験の技術的壁であることは明白である。

我々は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こと、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。

以上から、SeVによるFGF-2を用いた虚血肢への遺伝子治療が、最も効果的かつ安全性が高いことが期待されたため、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-FGF2) 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GenBank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)

```
atggcagccgggagcatcaccacgctgcccgccttggccgaggatggcggc
agcggcgccctcccgcccggccactcaaggaccccaagcggtgtactgca
aaaacgggggcttcttctctgcgcatccacccgacggccgagttgacgggt
ccgggagaagagcgacccctcacatcaagctacaactcaagcagaagagaga
ggagttgtgtctatcaaaggagtgtgtgtaaccgttacctggctatgaaggaa
gatggaagattactggcttctaaatgtgttacggatgagtggtttcttttgaacg
attggaatctaataactacaatacttaccggtaaggaaatacaccagttggtat
gtggcactgaaacgaactgggcagtataaacttgatccaaaacaggacctg
ggcagaaagctatactttttcttccaatgtctgctaagagctga
```

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。

```
MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGF
FLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVSISIKGVC
ANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRS
RKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS
```

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、他)。

遺伝子の種類及びその導入方法 (続き)	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, revised)。 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)。 <u>2) 遺伝子導入方法の概略</u> (ベクターの生産) 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-FGF2) 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。 (遺伝子導入方法) 2度にわたる十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに親族の文書による<u>了承</u>を得た後、以下の方法によって臨床試験を実施する。 1) 術前に手術室にて腰椎硬膜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を点滴静注する。以後3日間点滴を継続する (<u>ウイルスベクター投与による炎症性サイトカイン誘導抑制の目的のため</u>)。 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。
安全性についての評価	<u>1) 遺伝子導入方法の安全性</u> (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、これまで多数の遺伝子治療臨床試験に使われており、十分な実績を有する。 (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。

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予備安全性試験 (急性毒性試験: lacZ 遺伝子搭載非伝播型センダイウイルスベクターを使用: 安全性に関わる成績 [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°C、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に関与していることが推察される。

カニクイサルを用いた lacZ 遺伝子搭載ベクターによる安全性試験 (安全性に関わる成績 [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ことが示されていることから、本ベクターの水平感染能力は低いと考えられる。

安全性についての評価 (続き)	(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。 (7) 癌原性の有無 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、宿主癌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極めて低い。 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。
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	<u>本臨床試験研究計画は有効性が大いに期待できる上、ヒトに対し非病原性ウイルスを用いているため安全性が高い。さらには懸念される急性毒性が、少なくとも治療効果発現投与量においてアデノウイルスベクターより遥かに少ないことが証明されており、宿主染色体との相互作用をしないことから発癌の可能性や子孫への影響が極めて低い。</u> <u>それに加え、既にベクターのGMP生産技術の確立・ベクター供給体制の整備も既に終了しており、近日中に九州大学医学部附属病院内に遺伝子治療専用病室を設置する予定としている。</u>さらには九州大学医学部附属病院第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、本臨床試験の対象となる患者も多く診療している。 以上から本遺伝子治療臨床研究は十分に実施可能であると判断する。

実施計画	<u>1) 全体の治療計画</u> <u>十分なインフォームド・コンセントにより、患者ならびに親族の文書による2度にわたる了承を得た後、以下の方法によって臨床試験を実施する（添付資料2-1、2-2参照）。</u> 1) 術前に手術室にて腰椎硬膜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を点滴静注する。以後3日間点滴を継続する。 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、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。 3) <u>血液中のVEGF、HGF、FGF2濃度、逆転写PCRによる血液中の組み換えセンダイウイルスゲノムの検出を投与7日前、投与6時間後、1、2、4、7、14、28日後に行う。また血液中のサイトカインレベル（IL-1、-4、-6、-8、TNF、INF-gamma）を同様に測定する。</u> 4) 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、<u>逆転写PCR、ELISA法にて遺伝子発現、蛋白の定量を行う。</u> 5) <u>施術前、施術後3、12、24、36、48、60ヵ月後に血管造影、MR血管造影により側副血行路形成状態などを経時的に観察し、毎月非侵襲的診断法にて臨床症状や血流状態の経過を観察する。</u> <u>2) 被験者の選択基準および除外項目</u> 以下の条件を満たす患者を対象とする。 <u>(1) 閉塞性動脈硬化症あるいは血栓性閉塞性血管炎（Fontaine III度～IV度）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い、かつ40歳以上の症例。</u> <u>(2) 閉塞性動脈硬化症あるいは血栓性閉塞性血管炎（Fontaine II度）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、歩行制限のため本人および家族が本臨床試験の実施を強く希望する患者。かつ40歳以上の症例。</u> <u>候補対象患者は申請に関わる研究者と外部評価委員の一部で構成される、対象患者適応評価委員会にて決定される。</u>
-------------	--

実施計画 (続き)	<u>除外項目：</u> 以下に適合する患者は今回の臨床試験の対象としない。 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、ALT>50、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、CCr<40ml/min) 8) 活動性の炎症性疾患を有する患者 (活動期の膠原病、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎など) 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<10mg/ml、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、本臨床試験により不利益を受けると予測される患者、および 本人ならびに家族の<u>承諾</u>が得られない患者など、<u>適応症例評価委員会</u>が不適当と見なした患者 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下肢壊疽の患者は、本臨床試験からは当面除外する。但し<u>多臓器合併症</u>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。 <u>3) 被験者の同意の取得方法</u> 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、本臨床試験の理論的背景と動物実験成績、安全性に関する成績に関して十分な説明を患者本人ならびに<u>親族</u>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。 同意の取得は<u>入院前</u>、および全身検索の終了した<u>時点で</u>、計2度行なう。
----------------------	---

実施計画
(続き)

4) 実施期間および目標症例数

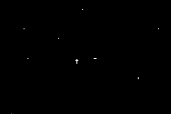
研究実施期間 承認時より 18ヶ月
目標症例数 12例

5) 実施方法

(1) 対象群の設定

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、安全性の検定を主眼とした最大使用量までの用量漸増式とし、対象群はおかない。

本臨床試験にて安全性が証明された場合に限り、別途対象群を設定した効果判定試験の申請を行なう。

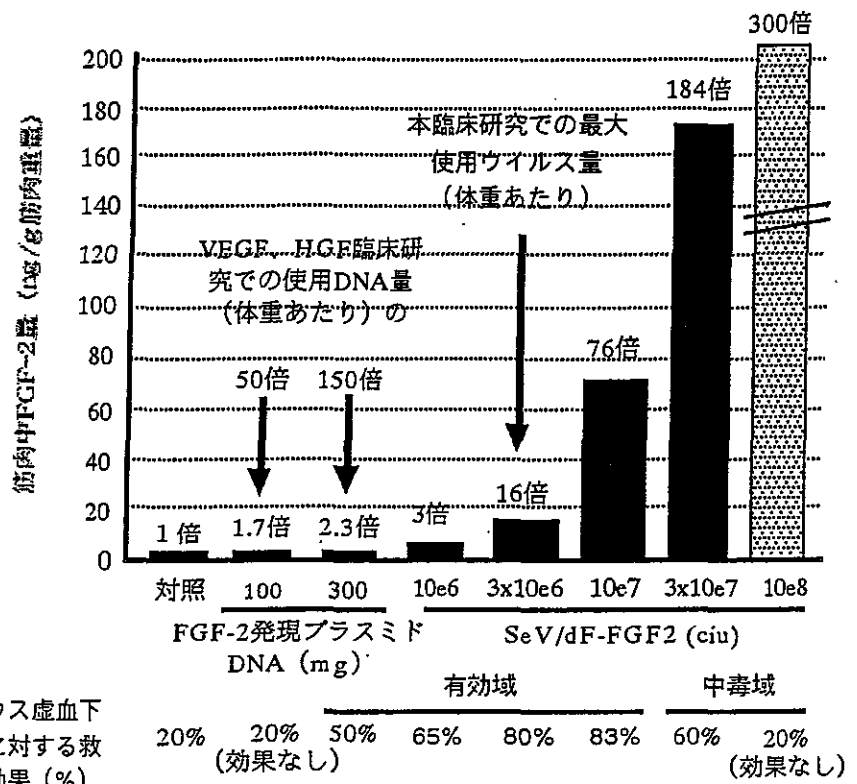
臨床試験実施方法		
用量漸増式安全性・効果判定試験 対象患者数 計12名 (ciu=活性組換えウイルス粒子数)		
患者番号		
第1ステージ		5x10 ⁷ ciu/ 60 kg =約3x10 ⁴ ciu/マウス に相当
患者番号		
第2ステージ		2x10 ⁸ ciu/ 60 kg =約1x10 ⁵ ciu/マウス に相当
患者番号		
第3ステージ		1x10 ⁹ ciu/ 60 kg =約5x10 ⁵ ciu/マウス に相当
患者番号		
第4ステージ		5x10 ⁹ ciu/ 60 kg =約3x10 ⁶ ciu/マウス に相当

(2) 遺伝子導入法

術前血管造影所見をもとに、20～30ヶ所をマーキングし、それぞれの部位にベクター液を虚血筋肉内に注入する。

注入操作に関わる疼痛などの苦痛を避けるため、術前日に硬膜外麻酔チューブを挿入し、持続硬膜外麻酔を行なう。

実施計画
(続き)



グラフ：マウス重症下肢虚血モデルにおける投与量依存的救肢効果
(効果域・中毒域判定試験、プラスミドとの比較試験)

(3) 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試験を主眼にすることを考慮し、併用薬剤に関しては特に制限しない。

(4) 臨床検査項目

外科手術に準じ綿密かつ詳細な術前、術後検査を行なう
(添付資料 2-2：臨床検査プロトコル参照)。

備 考	本臨床研究の研究実施デザイン、動物モデルによる前臨床効能試験、安全性試験は、 (1) 米国FDA発行 (1998年3月) 「Guidance for Industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy」 (2) 英国MCA (Medicines Control Agency) 発行 「Draft Guidance Notes on Quality and Preclinical Safety Issues for Clinical Trials with Gene Therapy Products」 を参考に、<u>計画あるいは実施されている。</u>
------------	--

(注意)

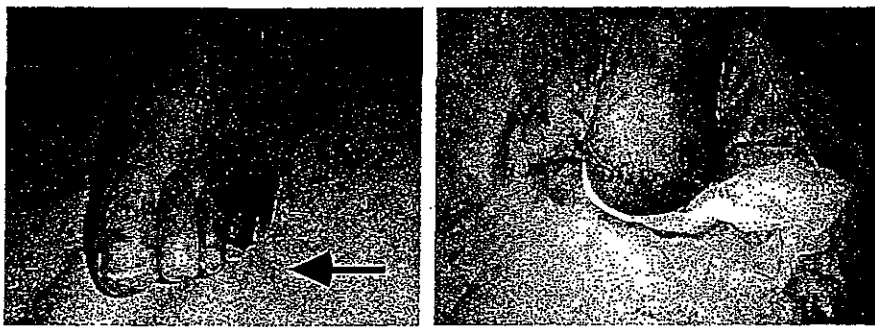
1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この申請書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は、墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙 () のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 備考欄には、「第4. その他」に掲げる各種指針への適合状況等、特記すべき事項について記載すること。
6. 大学等にあつては、この申請書の写しを文部科学大臣にも送付すること。

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			(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) (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)、 鬼丸満徳(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) (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) 長谷川諒(ディナベック株式会社・代表取締役社長)

審査委員会 が研究計画 の実施を適 当と認める 理由	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と認めた。 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と認めたため、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。 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。 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。	
	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	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。 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い出した。 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。
対象疾患 及び その選定理由	<u>1. 対象疾患</u> 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（Rutherford慢性虚血肢重症度分類III度 6群を除く）] 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。  Fontaine IV度の虚血性壊死 同一患者の下腿切断術後 <u>2. 対象疾患の選定理由</u> 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。 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。

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、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	<u>1. ヒトに導入するヒトFGF-2遺伝子の構造、性質、活性</u> (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) <pre>atggcagccgggagcatcaccacgtgcccg ccttgcccaggatggcggcag gcggcg ccttcccggccgacctcaaggaccccaagcggctgtactgcaaa aacgggggcttcttcctgcgcattccaccccgacggcggagttgacgggggtccg ggagaagagcgacctcacatcaagctacaacttcaagcagaagagagagga gttgtgtctatcaaaggagtgtgtgtaaccgttacctggctatgaaggagatg gaagattactggcttctaaatgtgttacggatgagtggtttttttgaacgattgg aatctaataactacaatactaccgggtcaaggaaatacaccagttggtatgtggc actgaaacgaactgggcagtataaacttgatccaaaacaggacctgggcaga aagctatactttttcttccaatgtctgctaagagctga</pre> 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。 <pre>MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFF LRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVSISIKGV CAN RYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRSRKY TSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQGKAILFLPMSAKS</pre> 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)。
-----------------------	--

遺伝子の種類 及びその導入 方法 (続き)	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)。 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)。 <u>2. 遺伝子導入方法の概略</u> (ベクターの生産) 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。 (遺伝子導入方法) 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<u>家族 (あるいは親族)</u> の文書による<u>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。 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。 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。</u>ベクター液はベクター力価漸増式に4段階 (5×10^7, 2×10^8, 1×10^9, 5×10^9 ciu/60 kg) 設定し、<u>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>
安全性につ いての評価	<u>1. 遺伝子導入方法の安全性</u> 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に使われており、十分な実績を有する。</u> 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次粒子は放出しない。</u>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。

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に関与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。

安全性についての評価 (続き)	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。 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。
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	<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> <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> 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。

実施計画

1. 全体の治療計画

〔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〔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）〕については、九州大学病院あるいは紹介病院において2週間の継続した薬物療法を施行。症状に変化がない場合、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、治療前検査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適応を評価する。

九州大学病院先進医療適応評価委員会で本臨床研究の適応と判断された場合、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2回目）を行う。同意が得られた場合に限り、以下の方法によって治療を実施する。

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℃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ヶ所、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～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確認できた後、次ステージを開始する。

実施計画 (続き)	5) <u>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、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。</u> 6) <u>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。</u> 7) <u>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。</u> 8) <u>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。</u> 2. <u>選定基準</u>：以下の条件を満たす患者を対象とする。 <u>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。</u> 3. <u>除外項目</u>： <u>以下に適合する患者は今回の臨床研究の対象としない。</u> 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>50U/L、ALT>50U/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>2.0mg/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
----------------------	--

実施計画
(続き)

- 1 1) 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)
- 1 2) アルコール依存、薬物依存症患者
- 1 3) 妊娠中の女性、あるいは妊娠が疑われる女性患者
- 1 4) 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。但し他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. 被験者の同意の取得方法

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に関して十分な説明を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自由な意思によっ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に伝え、継続して参加するかどうかについて被験者の意思を確認する。

5. 実施期間および目標症例数

研究実施期間 承認時より36ヶ月

各症例の研究実施期間: 遺伝子導入後6ヶ月

追跡調査期間: 遺伝子導入後60ヶ月

目標症例数 12例 (3例 x 4用量)

実施計画
(続き)

6. 実施方法

1) 対照群の設定

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、安全性の検定を主眼とした最大使用量までの用量漸増式とし、対照群はおかない。

本臨床試験にて安全性が証明された場合に限り、別途対照群を設定した効果判定試験の申請を行なう。

各ステージにおいて3名の患者への投与が終了し、最後の患者への投与から28日以上を経過した時点で、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、3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。

本委員会では安全性に問題がないと判断された場合、総括責任者は、本委員会の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および通知書の送付を受けて、次ステージの症例エントリーを開始する。

2) 遺伝子導入法

下肢の一方に術前血管造影所見をもとに、20-30カ所をマーキングし、それぞれの部位にベクター液を虚血筋肉内に注入する。投与部位は平均20-30カ所を想定しているが（浅大腿動脈～下腿3分枝を標準に想定）、下腿3分枝以下の閉塞症例も頻繁に見られるなど、症例により注入すべき範囲の個体差が大きいため、血管造影所見を参考に、1症例当たりのベクターカ価総量と1カ所当たりの投与量（0.5 mlとする）を一定とし、ベクター液の総投与容量は症例ごとに適宜増減する。

注入操作に関わる疼痛などの苦痛を避けるため、術前日に硬膜外麻酔チューブを挿入し、持続麻酔を行う。

3) 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試験を主眼にすることを考慮し、併用薬剤に関しては特に制限しない。

なお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。

実施計画
(続き)

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、効果の判定のために、以下の各種検査を実施する。検査実施時期については別紙6に記載するが、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。

効果判定、安全性評価はそれぞれ効果判定委員会、九州大学病院先進医療適応評価委員会が実施する。詳細の手続きと判定方法については、別途定める。

<効果判定に関する検査>

(1) 主観的評価：QOL調査^{注)}

注) QOLはNPO 健康医療評価研究機構の発行するSF-36 v2 (MOS Short-Form 36-Item Health Survey：振り返り期間過去1ヶ月、既に日本語版の標準化が終了しているもの)により、(1)身体機能、(2)日常役割機能(身体)、(3)日常役割機能(精神)、(4)全体的健康感、(5)社会生活機能、(6)体の痛み、(7)活力、(8)心の健康、の計8項目について評価する。

(2) 外表所見：

虚血性潰瘍は写真撮影する。部位・深さ・壊死の形状を記録する。潰瘍の大きさは、(長径)×(短径)で評価する。なお、趾間などの測定不能部位では、表面積を概算する。潰瘍の深さは下記の基準でスコア化する。

1＝表在欠損；2＝皮下組織に達する；3＝腱もしくは骨の露出；4＝腱もしくは骨の壊死

(3) 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。

- (i) 仰臥位でのABPI (ankle-brachial pressure index)
- (ii) 仰臥位でのTPI (toe pressure index)
- (iii) PVR (趾尖容積脈波)
- (iv) 仰臥位でのAP (ankle pressure)
- (v) サーモグラフィー
- (vi) レーザードップラー血流測定
- (vii) 血管造影 (IA-DSA)
- (viii) 疼痛の程度 (問診)
- (ix) トレッドミル運動負荷試験 (可能な場合)

実施計画
(続き)

＜安全性評価のための検査＞

- (i) 症状に関する問診：アレルギーの有無（例：発疹、呼吸困難感）など
- (ii) バイタルサイン：体重、体温、血圧（収縮期／拡張期）、脈拍
- (iii) 呼吸機能検査：胸部X線（正、横）
- (iv) 腎機能検査：BUN、クレアチニン、尿蛋白、尿潜血
- (v) 肝機能検査：アルブミン、免疫グロブリン（IgG、IgA、IgM、IgD、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、 γ -GTP
- (vi) 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、血小板凝集能、PT、APTT、FDP、プラスミノーゲンアクチベーター、アンチトロンビンIII、プロテインC活性、プロテインS活性、フィブリノーゲン
- (vii) 筋融解・炎症マーカー：CPK、CPKアイソザイム、CRP
- (viii) 糖尿病関連検査：眼底検査
- (ix) 血液電解質：Na、K、Cl、Ca
- (x) 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）
- (xi) 妊娠検査（女性のみ、必要な場合）：尿中HCG
- (xii) 血清サイトカイン定量（ELISA法）：IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ
- (xiii) SeV/dF-hFGF2ゲノムコピー数測定（定量的taqman-PCR法）：全血中SeV/dF-hFGF2ゲノムコピー数、尿中SeV/dF-hFGF2ゲノムコピー数
- (xiv) センダイウイルス価（トリ血球凝集法）：全血中センダイウイルス価、尿中センダイウイルス価
- (xv) 血清中抗センダイウイルス抗体価（ELISA法）
- (xvi) 血中血管新生因子蛋白量定量（ELISA法）
 - ヒトFGF-2（血清、血漿）、ヒトHGF（血清、血漿）、ヒトVEGF（血清、血漿）
- (xvii) 筋生検（ガンバイオプシーによる：同意が取れた患者のみ）、ヒトFGF-2蛋白測定（ELISA法）
- (xviii) 病理解剖

備	考	本臨床研究の研究実施デザイン、動物モデルによる前臨床 効能試験、安全性試験は、 (1) 米国FDA発行 (1998年3月) 「Guidance for Industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy」 (2) 英国MCA (Medicines Control Agency) 発行 「Draft Guidance Notes on Quality and Preclinical Safety Issues for Clinical Trials with Gene Therapy Products」 を参考に<u>実施された。</u> 本遺伝子治療臨床研究は、平成13年8月17日付で九州 大学医学部倫理委員会（以下、倫理委員会）ならびに九州大 学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会に申請され、慎重な審 議の上、平成14年9月27日付で承認されるに至り、同 10月28日付で所轄官庁へ申請された。 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（以下、作業委員会）が計3回（平成 15年2月17日、同16年6月17日、同17年2月7 日）開催され、照会事項・指示事項に対し、以下の経過で臨 床研究実施計画書の随時改訂が行われた。 <table><tr><td>平成15年</td><td>2月17日</td><td>作業委員会、第1回ヒアリング</td></tr><tr><td>同</td><td>3月25日</td><td>同委員会、照会事項送付</td></tr><tr><td>同</td><td>9月1日</td><td>倫理委員会、第1回改訂を承認</td></tr><tr><td>平成16年</td><td>6月17日</td><td>作業委員会、第2回ヒアリング</td></tr><tr><td>同</td><td>6月30日</td><td>同委員会、指示事項送付</td></tr><tr><td>同</td><td>10月12日</td><td>倫理委員会、第2回改訂を承認</td></tr><tr><td>平成17年</td><td>2月7日</td><td>作業委員会、第3回ヒアリング</td></tr><tr><td>同</td><td>2月28日</td><td>同委員会、照会事項送付</td></tr><tr><td>同</td><td>3月24日</td><td>倫理委員会、第3回改訂を承認</td></tr><tr><td>同</td><td>7月4日</td><td>倫理委員会、個人情報保護法施 行に伴う第3回改訂分の一部書 類整備を了承</td></tr></table>	平成15年	2月17日	作業委員会、第1回ヒアリング	同	3月25日	同委員会、照会事項送付	同	9月1日	倫理委員会、第1回改訂を承認	平成16年	6月17日	作業委員会、第2回ヒアリング	同	6月30日	同委員会、指示事項送付	同	10月12日	倫理委員会、第2回改訂を承認	平成17年	2月7日	作業委員会、第3回ヒアリング	同	2月28日	同委員会、照会事項送付	同	3月24日	倫理委員会、第3回改訂を承認	同	7月4日	倫理委員会、個人情報保護法施 行に伴う第3回改訂分の一部書 類整備を了承
平成15年	2月17日	作業委員会、第1回ヒアリング																														
同	3月25日	同委員会、照会事項送付																														
同	9月1日	倫理委員会、第1回改訂を承認																														
平成16年	6月17日	作業委員会、第2回ヒアリング																														
同	6月30日	同委員会、指示事項送付																														
同	10月12日	倫理委員会、第2回改訂を承認																														
平成17年	2月7日	作業委員会、第3回ヒアリング																														
同	2月28日	同委員会、照会事項送付																														
同	3月24日	倫理委員会、第3回改訂を承認																														
同	7月4日	倫理委員会、個人情報保護法施 行に伴う第3回改訂分の一部書 類整備を了承																														

備考 (続 き)	<u>本遺伝子治療臨床研究は、以下の法令／省令等を遵守して遂行される。</u> 1. <u>「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(文部科学省／厚生労働省／告示第二号、平成16年12月28日)</u> 2. <u>「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省告示第四百五十九号、平成16年12月28日)</u> 3. <u>「遺伝子組換え微生物の使用等による医薬品等の製造における拡散防止措置等について」(薬食発第0219011号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬食品局長通知、平成16年2月19日)</u> 4. <u>「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針について」(薬発第1062号、各都道府県知事あて厚生省薬務局長通知、平成7年11月15日)</u> 5. <u>「遺伝子治療用医薬品の品質及び安全性の確保に関する指針の改正について」(医薬発第329004号、各都道府県知事あて厚生労働省医薬局長通知、平成14年3月29日)</u> 6. <u>「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律」(平成15年法律第97号)</u>
---------------------	--

(注意)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格A列4番とすること。
2. この申請書は、正本1通及び副本2通を提出すること。
3. 字は、墨・インク等を用い、楷書ではっきり書くこと。
4. 記載欄に記載事項のすべてを記載できない時は、その欄に「別紙()のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 備考欄には、「第4. その他」に掲げる各種指針への適合状況等、特記すべき事項について記載すること。
6. 大学等にあっては、この申請書の写しを文部科学大臣にも送付すること。

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該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に強い 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) そのほか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、バージャー病)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こと、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ベ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）ウイルスベクター量を 5×10^7 c.i.u./60kg、 2×10^8 c.i.u./60kg、 1×10^9 c.i.u./60kg、 5×10^9 c.i.u./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力の低下と、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>

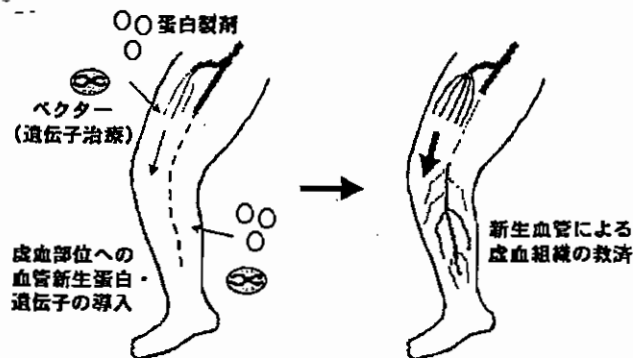
そこで近年注目されているのは、血管新生を促す増殖因子をタンパク、あるいは遺伝子として血管内、あるいは骨格筋へ投与することにより、側副血行を増加させるという新しい治療法 (治療的血管新生: Therapeutic Angiogenesis) である(5)。

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)。

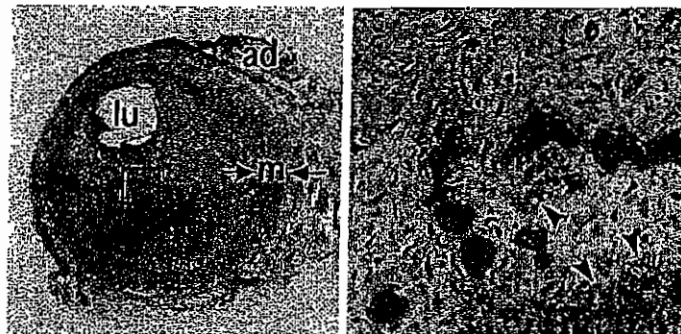
これら動物実験成績を受けて、現在欧米を中心に重症虚血肢 (Fontaine III、IV度) あるいは間歇性跛行肢 (Fontaine II) に対し、血管新生蛋白製剤あるいは血管新生遺伝子による臨床研究が進行しており、血管新生遺伝子治療に限定した場合、2004年7月1日現在、米国で52プロトコルが承認されている (虚血肢: 26、虚血性心疾患: 26、日本遺伝子治療学会 official journal、J Gene Medicine ホームページ - <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。

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)。

米国での無作為二重盲検試験 (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、クローニング 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℃ 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. 術前に拒絶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の手術療法、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（臨床研究あるいは治験段階）、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権利擁護

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)からの調査員や同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*                               /product="FGFB mRNA"
             gene            340..807
                               /gene="FGF2"
             CDS              340..807
                               /gene="FGF2"
                               /note="basic fibroblast growth factor"
                               /codon_start=1
                               /protein_id="AA52448.1"
                               /db_xref="GI:182563"
                               /db_xref="GDB:G00-119-910"
/translation="MAAGSITLPLALPEDGGSGAFPPGHFKDKPKRLYCKNGGFFLRH
PDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVVSIKGVCANRYLAMKEDGRLLASKCVTDEC
FFERLESNNYNTYRSRKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQKAILFLPMSAKS"
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 ggccggtctc cccaggcggc gtcgcggag acaaccatcc gtgaacccca ggtcccggtg
              121 cgccggctcg ccgcgcacca ggggcggcgg gacagaagag cggccgagcg gctcgaggct
              181 ggggggaccc ggcgcggcgc gcgctgccgg gcgggaggct gggggggcgg ggcggggcgg
              241 tgcccgagg cgggtcggag gccggggcgg gggccggggg acggcggtc cccgcgcggc
              301 tccagcggt cggggatccc ggccggggcc cgcaggacca tggcagcccg aagcatcacc
              361 acgctaccca ccttgcggga gcatgacggc agcggcggtt tccgaccccg ccacttcaag
              421 aaccccaaac gactgtactc caaaaacggg gacttcttcc tgcgcatcca ccccgacggc
              481 cgaattgacg gactcgggga gaaagacgac cctcacatca aactacaact tcaacgagaa
              541 gaaagacgag ttctgtctat caaaggaagt tctgctaacc qttacgtgac tatgaagaaa
              601 gatgaaagt tactggttc taaatgttt acggaatgag qtttctttt tgaacgattg
              661 gaatctaata actacaatac ttaccggtca aagaaatata caatttgata tctgacactg

```

721 aaacgaactg qccagatataa acttggatcc aaaacaggac ctggccagaa agctatactt
781 tttcttccaa tctctgctaa gagctgattt taatggccac atctaattctc atttcacatg
841 aaagaagaag tatatttttag aaatttggtta atgagagtaa aagaaaataa atgtgtaaag
901 ctcagtttgg ataattgggc aaacaatttt ttatccagta gtaaaatatg 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。

MAAGSITTLPALPEDGGSGAFPPGHHFKDKPKRLYCKNGGFFLRHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLQAEERGVSIGK
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 (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栄養症のみであった (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) 懸濁液を重ねる。さらに 48 時間培養後、これらの細胞と上清を回収する。

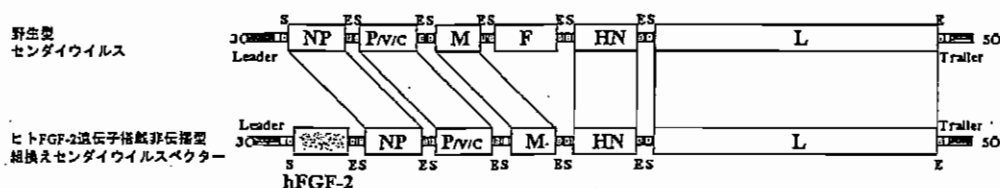
2) RNP を F 蛋白質発現細胞へ導入し、ベクター粒子を増幅する過程

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。

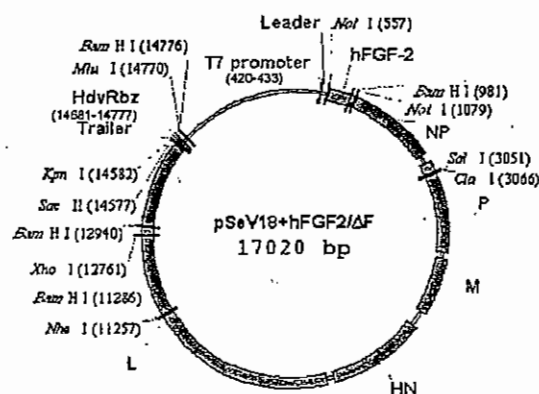
④ 使用するベクター (担体) の構造

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する 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