

第13回科学技術部会	資料
平成15年 2月27日	1

九州大学医学部附属病院の
遺伝子治療臨床研究実施計画申請書

大

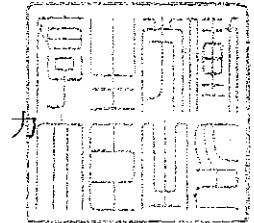


厚生労働省発科第0206001号
平成15年 2月 6日

厚生科学審議会会長

寺田 雅昭 殿

厚生労働大臣 坂口 力



諮 問 書

下記の遺伝子治療臨床研究実施計画について、その医療上の有用性及び倫理性に関し、厚生労働省設置法（平成11年7月16日法律第97号）第8条第1項第1号イ及び遺伝子治療臨床研究に関する指針（平成14年3月27日文部科学省・厚生労働省告示第1号）の規定に基づき、貴会の意見を求めます。

記

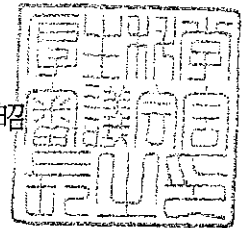
平成14年10月28日に九州大学医学部附属病院長から提出された「血管新生因子（線維芽細胞増殖因子：FGF-2）遺伝子搭載非伝播型組換えセンダイウイルスベクターによる慢性重症虚血肢（閉塞性動脈硬化症、パージャーマ病）に対する血管新生遺伝子治療臨床研究」計画

厚 科 審 第 3 号
平成15年 2月 6日



科学技術部会
部会長 寺田 雅昭 殿

厚生科学審議会会長
寺 田 雅 昭



遺伝子治療臨床研究実施計画について（付議）

標記について、平成15年2月6日付け厚生労働省発科第0206001号をもって厚生労働大臣より諮問があったので、厚生科学審議会運営規定第3条の規定に基づき、貴部会において審議方願いたい。

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 (職印)

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

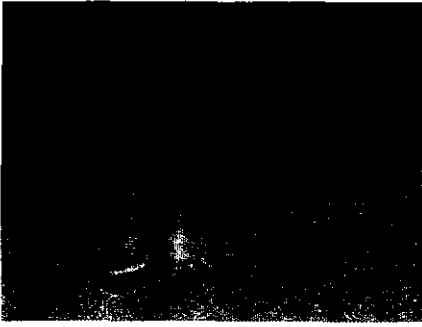
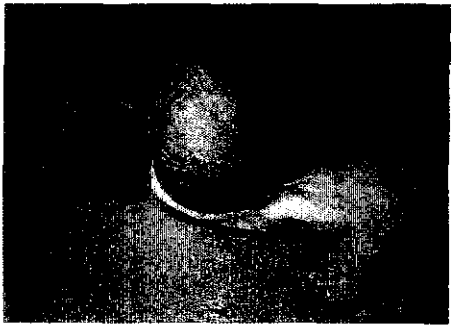
別紙様式第1の別添

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、パージャヤー病)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	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、臨床研究の評価と総括、生体材料の病理組織学的評価
	竹下 彰	九州大学医学部附属病院・循環器内科・教授	副総括責任者、臨床研究の評価と総括
	伊東 啓行 江頭 健輔 米満 吉和	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	臨床研究の実施 臨床研究の実施 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		

<p>研究の目的</p>	<p>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。</p> <p>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（センドラ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。</p> <p>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。</p>
--------------	--

<p>対象疾患 及び その選定理由</p>	<p><u>1) 対象疾患</u></p> <p>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。</p> <p>(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。</p> <p>(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。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> <p>Fontaine IV度の虚血性壊死 同一患者の下腿切断術後</p> <p><u>2) 対象疾患の選定理由</u></p> <p>閉塞性動脈硬化症などによる重症虚血肢は、患者の生活（QOL）を大幅に制限し長期臥床を強いることにより、下肢のみならず全身状態ひいては生命予後の悪化に加え、長期療養による医療経済の圧迫の原因となっている。</p> <p>最近の手術・薬物療法の進歩により、虚血肢の予後は向上したものの、膝窩動脈以下へのバイパス手術成績は5年開存率40%程度と、今なお十分な成績は得られていない。さらに、末梢側の病変が強くバイパス術の適応にならない場合や他臓器における動脈硬化進行のため全身状態が不良で耐術し得ない場合も多く、やむを得ず肢切断に至る症例も数多く存在する。また肢切断に至った症例の生命予後は極めて不良である。</p>
---------------------------	---

対象疾患 及び
その選定理由
(続き)

重症虚血肢 (Fontaine III-IV) 治療に関する多施設試験成績

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ールを開始した。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)

```
atggcagccgggagcatcaccacgctgcccgccttgcggaggatggcggc
agcggcgccctcccgcccggccacttcaaggacccaageggctgtactgca
aaaacgggggcttcttctgcatccaccccgacggccgagttgacggggt
ccgggagaagagcgaccctcacatcaagctacaacttcaagcagaagagaga
ggagttgtgtctatcaaggagtggtgtgtaaccgttacctggctatgaaggaa
gatggaagattactggcttctaaatgtgttacggatgagtggttttttgaacg
attggaatctaataactacaataacttaccggtaaggaaatacaccagttggtat
gtggcactgaaacgaactgggcagtataaacttggatccaaaacaggacctg
ggcagaaagetatacttttttccaatgtctgctaagagctga
```

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
FLRIHPDGRVDGVREKSDPHIKLQLOAEERGVVSIKQVC
ANRYLAMKEDGRLLASKCVTDECFFFERLESNNYNTYRS
RKYTSWYVALKRTGQYKLGSKTGPQKAILFLPMSAKS
```

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)。

<p>遺伝子の種類及びその導入方法 (続き)</p>	<p>また、我々はFGF-2は同様にHGFも誘導し、血管新生に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Circ Res, revised)。</p> <p>FGF-2は細胞外に放出された後、ヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合し安定化される。我々はさらに生体内でのFGF-2の安定化にヒアルロン酸も重要であることを明らかにした (J Immunol 2002)。FGF-2の遊離にはFGF-BPやCYR61が関与し、遊離FGF-2が生理作用を発現すると考えられている (Oncogene 1997、1998、Nature Med 1997)。</p> <p><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了承を得た後、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 (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)。 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。</p>
<p>安全性についての評価</p>	<p><u>1) 遺伝子導入方法の安全性</u></p> <p>(1) ベクターの純度と安全性： GMPグレードのベクターの生産、精製、供給はBioReliance社により行われる。同社が生産したウイルスベクター (レトロウイルス、アデノウイルスを含む) は、これまで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。</p> <p>(2) 増殖ウイルス出現の可能性 非伝播型センダイウイルスベクターは感染に必要なF蛋白を欠損しており、理論的に感染性粒子は放出しない。これは培養細胞レベルの実験で明らかにされている (J Virol 2000)。またセンダイウイルスは野生型と相同組み換えを起こすことは、理論的にないと考えられている。</p>

安全性について
の評価
(続き)

(3) 組換えセンダイウイルスベクターの細胞傷害性

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

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

カニクイサルを用いた予備安全性試験 (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 cfu/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。