

慢性重症虚血肢に対する FGF2 遺伝子搭載センダイウイルスベクターを用いた新規血管新生遺伝子治療臨床研究：中間報告

伊東 啓行¹ 米満 吉和² 井口 博之¹ 福永 亮大¹ 高井 真紀¹
 岩佐 憲臣¹ 本間 健一¹ 吉田 久美³ 居石 克夫³ 前原 喜彦¹

要 旨：血管新生因子 FGF2 遺伝子搭載組換えセンダイウイルスベクターの基礎研究での高い救肢効果をふまえ、血行再建困難な重症虚血肢に対する血管新生遺伝子治療の臨床研究を開始した。対象は第三者委員会で判定された適格症例で、オープンラベル、第 I・IIa 相に相当する 4 ステージ (3 例 / ステージ) の用量漸増試験である。本ベクター投与は世界初であり、本研究では安全性を主眼に効能評価する。本稿ではこれまでの途中経過について報告する。(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 309-314)

Key words: peripheral arterial disease, critical limb ischemia, angiogenesis, gene therapy, Sendai virus

序 言

閉塞性動脈硬化症をはじめとする末梢動脈閉塞性疾患 (peripheral arterial disease; PAD) は全身性動脈硬化の 1 部分症状であり、良性疾患でありながら、その生命予後は良好とは言えないことはよく知られている。とくに Fontaine 臨床病期の III 度 (安静時疼痛)、IV 度 (虚血性潰瘍、壊疽) に分類される重症虚血肢は間歇性跛行に比してさらに生命予後が不良である。2007 年初めに改訂された PAD 診療指針である TASC-II においては、重症虚血肢症例が肢切断に至ると QOL が著しく損なわれるのみでなく、2 年後には 30% 以上が死亡すると記載された¹⁾。

重症虚血肢において肢切断を回避する (limb salvage) ことは QOL の維持のみならず、生命予後の改善のためにも非常に重要である。そのためには血管内治療や動脈バイパス術による血行再建が不可欠であることは言うまでもない。しかしながら、今日糖尿病患者や慢性維持透析患者などにおける重症虚血肢症例などでは末梢 runoff がきわめて不良であったり、高度な動脈石灰化のために血管内治療、バイパス術がともに困難であることがしばしば

みられる。また、下腿動脈以下へのバイパス材料として不可欠な自家静脈の性状が不良である症例も血行再建術が困難となる。このような症例に対する limb salvage はきわめて困難であり、今日有効な治療法が存在しないのが現状である。

われわれはこのように血行再建術が困難な症例を救肢するための「圧倒的な治療効能を示す血管新生療法の確立」を目指し、遺伝子導入効率が非常に高い非伝播型組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus; rSeV/dF)²⁾ にヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (hFGF2) 遺伝子を搭載し、これを虚血肢筋肉内に注射することで血管新生を惹起させる血管新生療法の基礎研究を重ねてきた³⁻⁹⁾。この血管新生療法 (rSeV/dF-hFGF2) の基礎研究における優れた治療効果をふまえて、これを臨床現場にフィードバックすべく臨床研究を計画し、厚生労働省へ申請、4 年半の審議を経て、2006 年 1 月にプロトコルが正式に大臣承認を得た。ここでは本臨床試験の中間報告について述べる。

対 象

本臨床研究の対象は Fontaine III 度、IV 度の重症虚血肢である閉塞性動脈硬化症、あるいはバージャー病で、40

¹九州大学大学院消化器・総合外科 (第 2 外科)

²千葉大学大学院医学研究院遺伝子治療学

³九州大学大学院病理病態学

2009 年 3 月 30 日受付 2009 年 9 月 9 日受理

Table 1 Inclusion and exclusion criteria for the clinical trial of angiogenic gene therapy with rSeV/df-hFGF2 for critically ischemic limbs

Inclusion Criteria	
Patients are enrolled in the study if they meet all of the following criteria:	
1.	Clinically stable CLI defined as rest pain and/or ischemic ulcer (Fontaine III or IV, Rutherford II-4 or III-5) without any clinical benefit by standard medication at least 2 weeks
2.	Arteriosclerosis Obliterans or Thromboangitis Obliterans (Buerger's disease)
3.	No option for standard bypass surgery or angioplasty
4.	Males and females ≥ 40 years of age
5.	Signed informed consent
Exclusion Criteria	
Patients may not be enrolled in the study if they meet any of the following criteria:	
1.	Suspect findings of malignant neoplasm by PET, tumor markers, CT scan, fiberoptic examination or have a history of neoplasm within the last 5 years
2.	Have proliferative retinopathy, recent (within 6 months) retinal vein occlusion, macular degeneration with choroidal neovascularization, macular edema on fundus evaluation, or intraocular surgery within 3 months
3.	Have hemodialysis due to endstage renal disease (ESRD) or have an abnormal renal function (serum Cr > 2.0 mg/dl or CCr < 40 ml/min)
4.	NYHA Class II, III, or IV heart failure or have symptomatic arrhythmias or advanced atrioventricular block without successful control by pacemaker or drugs
5.	Have moderate to severe chronic liver dysfunction without clinically determined liver cirrhosis, or have clinically determined moderate to severe liver cirrhosis categorized to Child B or C
6.	Have clinical evidence of systemic infection or active inflammatory diseases or have a severe hematopoietic disorders (severe anemia, aplastic anemia, etc)
7.	Have a history of myocardial infarction or stroke within last 6 months
8.	Others who are not appropriate to be included into the study as determined by the independent committee

歳以上であり、自家静脈や人工血管を用いた血行再建術、あるいは血管内治療の適応がない患者である (Table 1)。

担癌患者、重症心不全、肝不全などが除外基準として規定されているが、今回の臨床研究では維持透析/慢性腎不全患者、糖尿病性増殖性網膜症患者も、安全性を担保するために除外された。

方 法

本臨床研究は SeV が世界で初めて遺伝子治療ベクターとして人体に投与されることを鑑み、臨床的効果よりも安全性の確認に主眼がおかれている。そのため、抗がん剤の場合と同様のオープンラベル、4段階(各ステージ3例)の用量漸増式、第 I・IIa 相試験としてデザインされている。動物実験において最大の効果を示した投与量 (5×10^9 ciu/60 kg) を最終第 4 ステージに設定し、第 1 ステージでは、前臨床試験成績よりプラスミドレベルの発現と同等と考えられる 5×10^7 ciu/60 kg (最大投与量の 1/100) を投与量とした (Fig. 1)。

本臨床研究は将来的に製剤開発を目標としているため、

外部 contract research organization (CRO) のデータマネジメントによる新 good clinical practice (GCP) 準拠試験として実施されている。各ステージにおいて 3 症例の投与を行うが、各症例の投与に際しては、第三者委員会の審査による厳密な適応決定を必要とする。また、各ステージにおいて最終投与日より 1 カ月までの臨床データを CRO が固定し、そのデータをもって第三者委員会が安全性を判定したうえでステージアップが承認される。

各症例は投与前の虚血肢の評価に加えて、眼底検査、全身 CT 検査、PET-CT、内視鏡検査等によって除外規定に抵触しないことを確認した後、適応評価委員会にて承認を得る。患者は投与前日より遺伝子治療室に入室し、硬膜外麻酔チューブを挿入する。治療当日、遺伝子治療室にて硬膜外麻酔下に虚血肢の 30 箇所につき 1 箇所あたり 0.5 ml のベクター溶液を筋肉内に注射する。注射部位は血管造影所見に応じ、下腿病変中心であれば下腿のみ、腸骨・大腿動脈を含む広汎な病変であれば大腿部も加えてなど、症例によって適宜選択した。第 1 種規定 (カルタヘナ関連法) に準拠するため、患者はベクター投与

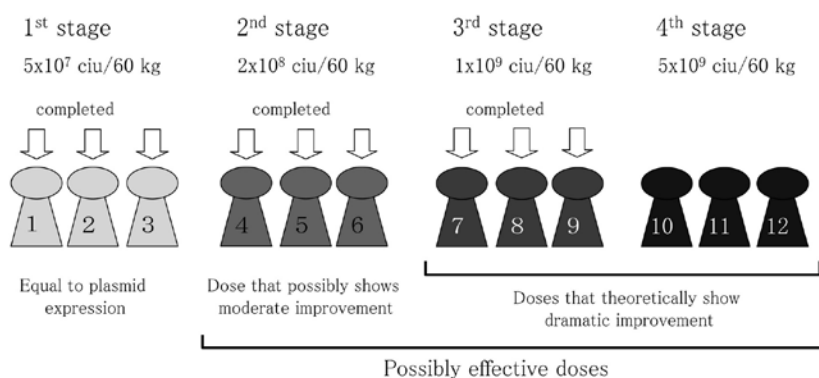


Figure 1 Study design of the clinical trial of angiogenic gene therapy with rSeV/dF-hFGF2 for critically ischemic limbs.

後1週間遺伝子治療室内に隔離され、血液中、排泄物中にウイルスゲノムが存在しないことを確認した後に一般病室に転室となり、通常、投与後2週間で退院となる。

投与1, 3, 6, 12カ月後に臨床症状, 血管造影に加えて, ankle brachial pressure index (ABI), toe pressure index (TPI), レーザードップラーによる組織血流, サーモグラフィ, 歩行可能な症例ではトレッドミル(傾斜12%, 速度2.4 km/h)等の評価を行うが, その間に発生したあらゆる事象は有害事象としてCROによりデータ管理される。

本臨床研究は, 1) rSeV/dF-hFGF2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 ciu/60 kg, 2×10^8 ciu/60 kg, 1×10^9 ciu/60 kg, 5×10^9 ciu/60 kgと増加したとき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。本稿においては2009年3月時点における第3ステージ終了時点での経過報告にとどめるが, 本臨床試験に関する最終的な安全性, 有効性に関しては最終第4ステージ第3例目(本臨床試験の最終症例)投与終了後6カ月時点における全12症例のCRO固定データをもって第三者委員会によって判定される。

結 果

これまでに第3ステージまで9例の投与が終了した。第1ステージ3例(Fontaine III度1例, IV度2例)に 5×10^7 ciu/60 kg, 第2ステージ3例(Fontaine III度3例)に 2×10^8 ciu/60 kg, 第3ステージ3例(Fontaine III度3例)に 1×10^9 ciu/60 kgのベクター投与を行った。Table 2にこれ

までの9症例のサマリーを示す。観察期間は6カ月~33カ月(平均14カ月)である。

(1)安全性に関して

第3ステージまでの投与量(1×10^9 ciu/60 kg)において, 投与薬剤または治療に関連した有害事象は認められなかった。

これまでに認められた有害事象は, 原疾患の進行と考えられた下腿, 足趾切断以外ではすべてグレード1以下(Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.010による¹⁰⁾)であり, 臨床研究の進行に影響を与える問題点は認められていない。多くの症例で投与直後より一過性の白血球増多・好中球分画の増多(CRP上昇を伴わない)を認めたが, 3日以内に正常範囲へ復した。

Vector shedding 検査において, 第3ステージの1例に一過性(投与後1, 3日のみ)にベクター配列が全血中に確認されたが, その他すべての症例, 検体(血液, 尿)においては陰性であった。したがって, これまでの9症例全例において投与後1週間に隔離解除可能であった。

(2)有効性に関して(Table 2)

極少用量である第1ステージにおいては2例で原疾患の進行による下腿切断, 足趾切断を要した。

第2ステージ以降の6例における有効性評価について述べる。6例全例で少なくとも一過性の安静時疼痛の消失が得られ, 1例を除き観察期間を通して無痛状態が維持された。トレッドミル負荷試験における最大歩行距離に関しては投与前より片麻痺のために歩行不能であった1例を除き, 5例中4例で改善が得られた。うち2例で

Table 2 Summary of the clinical trial of angiogenic gene therapy with rSeV/dF-hFGF2 for critically ischemic limbs

Stage - Case	Age/Sex (y.o.)/(M, F)	Clinical stage (Fontaine/Rutherford)	Outcome/ *SAE	Clinical stage/6M post Tx (Fontaine/ [†] Rutherford)
1-1	59/M	III/ II-4	Improved walking distance	III/II-4
1-2	74/M	IV/III-5	[‡] Below knee amputation (day15)	-
1-3	66/M	IV/III-5	Release of rest pain (transient) - recurrent disease [‡] Minor amputation (3 months) + Distal bypass with composite graft	-
2-1	65/F	III/II-4	Release of rest pain Improved walking distance Improved skin temperature Newly observed digital pulse wave	IIa/I-2 (0-1 at 4-5M)
2-2	58/M	III/II-4	Release of rest pain Improved walking distance	IIb/I-2
2-3	76/F	III/II-4	Release of rest pain Improved walking distance Newly observed digital pulse wave	IIb/I-3 (I-2 at 2M)
3-1	58/M	III/II-4	Release of rest pain Improved walking distance Newly observed digital pulse wave	IIa/I-2
3-2	82/M	III/II-4	Release of rest pain Improved skin temperature	IIb/I-3
3-3	83/M	III/II-4	Release of rest pain (transient) Newly observed digital pulse wave - recurrent disease	III/II-4 (I-2 at 1M)

*SAE, severe adverse event

[†]Rutherford I-2= incomplete treadmill with post ankle pressure > 50 mmHg, I-3= incomplete treadmill with post ankle pressure < 50 mmHg

は 200 m 以上への歩行距離改善がみられた。

また、第 2 ステージ以降の 6 例のうち、投与前には趾尖脈波が検出不能であった 4 例中 3 例において検出が可能となった。

考 察

重症虚血肢は患肢の予後が不良なばかりでなく、生命予後も不良な病態であり、血行再建術以外にはエビデンスの確立した有効な薬物治療が存在しない。一方で TASC-II によれば重症虚血肢のうち、初期治療として血行再建術が可能である症例は約半数にすぎず、約 4 分の 1 の症例は初期治療として大切断に至っている¹⁾。このような状況を打開する治療法として治療的血管新生療法に対する期待は非常に大きなものである。

これまでも血管新生因子タンパク¹¹⁾、それに引き続いて血管新生因子遺伝子¹²⁾、さらには骨髄単核球細胞や、血管内皮前駆細胞を多く含むと考えられている CD34 陽性細胞を用いた細胞療法¹³⁾などによる血管新生

療法が試みられてきた。タンパク療法や遺伝子治療では多くのプロトコールにおいて初期試験では安全かつ有効とされてきたが、後期試験においてはいずれにおいても有意な有効性を証明することができなかった。これにはこれらの治療にはプラセボ効果が高く、例えば跛行距離などに関してはプラセボを用いた場合であっても改善効果がみられることや、さらにとくに、細胞療法の場合プラセボコントロールによる 2 重盲検試験は倫理的にも困難であり、有効性の証明が難しいことが考えられる。一方で重症虚血肢ではプラセボ効果は少ないと思われるが、主たるエンドポイントとなるべき救肢率において現在の血管新生療法の効果が有意なアドバンテージをもたらすことができる程度のものかどうかとも関与していると思われる¹⁴⁾。

そのような背景のもと、血行再建術の效果に匹敵するような「圧倒的な治療効果を示す血管新生療法の確立」を目指して rSeV/dF による遺伝子治療臨床研究を立案した。われわれが独自に開発を進めている rSeV/dF は遺伝子導

入効率が非常に高く、また細胞に感染する際には、転写ならびにゲノム複製、タンパク合成が細胞質内で自前のRNAポリメラーゼを利用して行われるため、宿主細胞の染色体と相互作用しないという特徴を有する²⁾。センダイウイルスはマウスに肺炎を引き起こすウイルスであるがヒトには病原性の報告がなく、安全性の面でも優れていると考えられる。このrSeV/dFに基礎動物実験において、他の血管新生因子であるVEGFやHGFなどと比較して最も血管新生効果、虚血肢救済効果が優れていたhFGF2遺伝子を搭載し、これまで臨床研究を進めてきた。

本臨床研究の主要エンドポイントである安全性、副次エンドポイントである有効性に関する最終判断は第三者委員会にゆだねられる。そのため、本稿では現状における客観的な事実のみから考察するにとどめ、他の血管新生療法遺伝子治療や細胞療法などの安全性、有効性の比較評価はできないことをはじめにお断りさせていただく。

安全性評価に関しては現在のところ、ベクター、血管新生因子に関連すると明らかに考えられる有害事象を認めていない。第1ステージにて発生した下腿、足趾切断症例は原疾患の進行によるものと考えられるが、これらの症例はいずれも投与前より虚血性潰瘍を伴っていた症例であったが、投与されたベクター、血管新生因子による影響は否定的であった。その後投与量を増加させた第3ステージまでにおいては1例を除いて血液中、尿中にもベクター配列の出現を認めなかった。またFGF2も局所でのみ発現され、血液中濃度を増加させないことも確認されている³⁾。現時点では安全性に関しての大きな問題点は指摘できないと思われる。

有効性に関しては、低投与量の第1ステージで原疾患の進行の結果、下腿、足趾の切断に至った症例が2例にみられたが、第2ステージ以降の6例全例で少なくとも一過性の安静時疼痛の改善がみられた。第1ステージでの投与量はプラスミドによる発現と同レベルであり、最終ステージの100分の1に相当する。虚血性潰瘍が存在するような症例において、このレベルの投与量では十分に病状をコントロールするには不足であると思われる。

安静時疼痛の改善に加えてトレッドミル試験における跛行距離の延長もみられている。今回の対象症例は重症虚血肢であるため全例で施行できる検査ではなく、あくまでも補助的評価項目であり、またトレッドミル試験においてプラセボ効果が多くみられることはよく指摘されることではある。しかし、投与後1年以上を経過した症

例においても一旦延長した歩行距離が短縮する傾向は今のところみられていない。

第2ステージ以降の症例において投与前には検出できなかった趾尖脈波が一過性にでも検出可能となった症例を6例中3例に認め、これは血管新生効果の一端である可能性も考えられる。

第3ステージまでの9症例に関してはこれまで明らかな有害事象はなく、また、本血管新生療法による有効性を示唆する所見も得られており、今後、最終目標投与量となる第4ステージ3例までを終了し、客観的に評価を行う予定であり、とくに安全性には十分に留意して本臨床研究を進めていく予定である。

おわりに

現在進行中のrSeV/dF-hFGF2血管新生療法臨床研究についてこれまでの中間報告を行った。今後最終ステージまでの投与を終了後に第三者委員会によって安全性、有効性の判定がなされるため、本稿ではあくまでも客観的な結果についてのみ述べた。本臨床研究による有効性が示されれば、最終目標であるrSeV/dF-hFGF2の製剤化に向けて対象症例を拡げ、とくに慢性維持透析症例を含む次期臨床研究を計画したいと考えている。

文 献

- 1) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA et al: TASC II, Inter-Society Consensus for the Management of PAD. *J Vasc Surg*, 2007, **45** (Suppl S): S1A-S67A.
- 2) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S et al: Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 970-973.
- 3) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A et al: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*, 2002, **90**: 966-973.
- 4) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res*, 2002, **91**: 923-930.
- 5) Shoji T, Yonemitsu Y, Komori K et al: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates endothelial dysfunction and inhibits intimal hyperplasia of vein grafts in poor runoff limbs of rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **285**:

- HI73–HI82.
- 6) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada N et al: Essential role of PDGFR -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR during angiogenesis. *Circ Res*, 2004, **94**: 1186–1194.
 - 7) Tanii M, Yonemitsu Y, Fujii T et al: Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circ Res*, 2006, **98**: 55–62.
 - 8) Kaneko K, Yonemitsu Y, Fujii T et al: A free radical scavenger but not FGF-2-mediated angiogenic therapy rescues myoneuropathic metabolic syndrome in severe hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**: H1484–1492.
 - 9) Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M et al: Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**: 2483–2489.
 - 10) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) ver 3.0, 2003, National Cancer Institute.
 - 11) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD et al: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomized trial. *Lancet*, 2002, **359**: 2053–2058.
 - 12) Rajagopalan S, Mohler ER 3rd, Lederman RJ et al: Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease: a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*, 2003, **108**: 1933–1938.
 - 13) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 2002, **360**: 427–435.
 - 14) 米満吉和, 伊東啓行, 井口博之 他: サイトカインによる末梢動脈閉塞性疾患に対する血管新生療法: その現状と未来. *脈管学*, 2007, **47**: 491–497.

The Clinical Trial of Newly Developed Angiogenic Gene Therapy with FGF-2 Gene Mounted Sendai Virus Vector for Critically Ischemic Limbs: Preliminary Report

Hiroyuki Itoh,¹ Yoshikazu Yonemitsu,² Hiroyuki Inoguchi,¹ Ryota Fukunaga,¹ Maki Takai,¹ Kazuomi Iwasa,¹ Kenichi Honma,¹ Kumi Yoshida,³ Katsuo Sueishi,³ and Yoshihiko Maehara¹

¹Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

²Department of Gene Therapy, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

³Division of Pathophysiological and Experimental Pathology, Department of Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Key words: peripheral arterial disease, critical limb ischemia, angiogenesis, gene therapy, Sendai virus

Based on the superior effect of rSeV/dF-hFGF2 for limb salvage found in laboratory research, a clinical trial of gene therapy for critically ischemic limbs with no options of revascularization has been carried out. This clinical trial, an open-label and four-stage (three cases/stage) trial, is a dose escalation study for patients with critical limb ischemia approved by an independent research committee. In this trial, the primary end point is the safety of SeV, because this is the first trial of SeV administration in human beings. In this report, the preliminary results of the study are summarized.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2010, **50**: 309–314)