

pression was really functional (please see the supplemental materials, available online at <http://atvb.ahajournals.org>). A monoclonal antibody against murine monocytes/macrophages, BM8, rarely labeled cells in adductor muscles of untreated control mice. In contrast, apparent infiltration of BM8-positive cells was found in ischemic muscles of mice treated with SeV-luciferase, a finding enhanced by the gene transfer of FGF-2.

We also performed immunohistochemistry for the  $\alpha$ SMA to determine whether the upregulated mMCP-1/JE expression was arteriogenic<sup>6</sup> (please see the supplemental materials). Apparent increase of number of vessels circumvented by  $\alpha$ SMA was evident in ischemic adductor muscles of mice treated with SeV-luciferase compared with those with untreated mice, a finding enhanced by the gene transfer of FGF-2. Quantitative analysis confirmed these results, indicating that both adaptation to tissue ischemia and FGF-2 provide arteriogenic signals.

### MCP-1/CCR2 Is Essential for the Adaptive and FGF-2-Mediated Recovery of Blood Flow in Murine Ischemic Limbs

To assess the biological role of the upregulated expression of mMCP-1/JE after induced ischemia, preinjection of either a plasmid expressing the dominant negative mutant of MCP-1 (7ND MCP-1)<sup>15</sup> or a control gene (luciferase) was performed 2 days before operation (day -2). This procedure was then followed by induced ischemia and SeV-mediated gene transfer of mFGF-2 or of luciferase. As shown in Figure 2a, 7ND MCP-1 gene transfer diminished both adaptive and FGF-2-mediated recovery of blood flow, indicating that mMCP-1/JE may play a significant role in both conditions.

For further assessment, we examined the role of endogenous expression of mMCP-1/JE in both models of murine autoamputation (balb/c *nu/nu*) for FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis<sup>12-14</sup> using 7ND MCP-1 as well as CCR2-deficient mice, assessing their role for adaptive angiogenesis.<sup>9</sup>

As shown in Figure 2b, balb/c *nu/nu* mice pretreated with SeV-luciferase frequently lost their hind limb irrespective of the injected plasmids. In contrast, SeV-mFGF2 significantly rescued the ischemia-induced autoamputation in mice pretreated with plasmid-luciferase, a finding representative of our previous studies.<sup>12-14</sup> This therapeutic effect was completely abrogated by 7ND MCP-1 gene transfer, indicating the essential role of endogenous mMCP-1/JE in the FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis.

In the case of the CCR2<sup>+/+</sup> C57BL/6 to 129/svjae hybrid strain, induced severe ischemia did not result in autoamputation of hindlimbs, a similar finding to that seen in the C57BL/6 strain.<sup>12-14</sup> CCR2-deficient mice of the same genetic background, however, occasionally lost their limbs at  $\approx$ 40% (Figure 2b), indicating the impaired tolerance against severe limb ischemia in CCR2<sup>-/-</sup> mice. SeV-mediated gene transfer significantly but partially restored the limb survival of CCR2<sup>-/-</sup> mice.

These findings were clear evidence of the essential role of endogenous expression of mMCP-1/JE in both adaptive

recovery of blood flow and FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis in mouse models of limb ischemia.

### FGF-2 Targets NEMCs To Stimulate MCP-1

To assess the source of the MCP-1 expression in vivo, we firstly performed immunohistochemistry against same tissue samples tested in Figure 1b and 1c in use of a goat anti-mouse MCP-1/JE polyclonal antibody. Comparable staining in serial sections using anti-PECAM-1 (for endothelial cells), anti- $\alpha$ -smooth muscle cell actin (for smooth muscle cells), BM8 (for monocytes/macrophages), and vimentin (for fibroblasts), suggested that these cells were expressing mMCP-1/JE; however, no clear difference of cell sources between muscles treated with control vector and SeV-mFGF2 (data not shown).

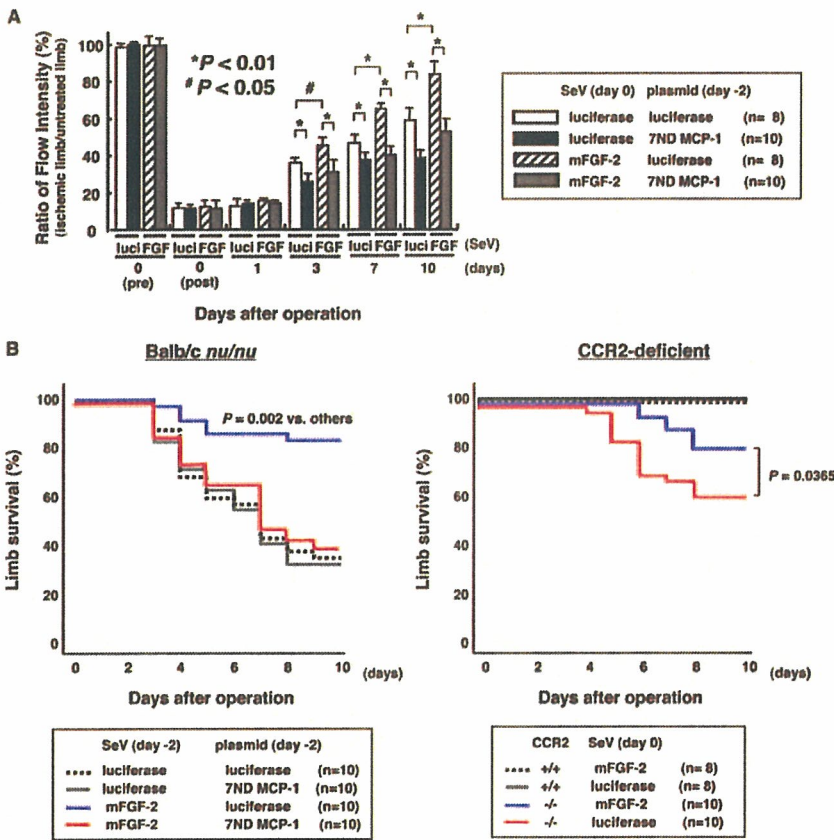
We next examined the induction of MCP-1 via FGF-2 using cultured human cells, including NEMCs (MRC5 and HSMC), monocyte/macrophage lineage cells (THP-1), and endothelial cells (HUVEC and HPAEC) in vitro (please see the supplemental materials). RT-PCR analyses confirmed that these cells expressed a typical high-affinity receptor for FGF-2, FGFR1 (data not shown). A typical proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , which is known as a strong inducer of MCP-1,<sup>19</sup> but not angiogenic polypeptides including VEGF, placental growth factor (PlGF), and FGF-2, stimulated MCP-1 in the culture medium of HUVEC, HPAEC, or THP-1. In contrast, similar upregulated expression of MCP-1 was seen not only under TNF- $\alpha$  but also FGF-2 in NEMCs, a finding that was confirmed by the mRNA level evaluated by quantitative real-time PCR (data not shown). To exclude the possibility of species-specific induction of MCP-1, we further assessed TNF- $\alpha$  and FGF-2-dependent induction of mMCP-1/JE using murine NEMCs (NIH3T3) and peritoneal macrophages (M $\phi$ ). FGF-2-mediated induction of mMCP-1/JE was seen only in NIH3T3 cells, indicating that FGF-2 may target NEMCs to stimulate the expression and secretion of MCP-1.

### FGF-2 Stimulates MCP-1 Expression via PKC, MEK, and NF- $\kappa$ B-Related Pathways, Similar to Those Associated With TNF- $\alpha$ , but not via Hypoxia

Considering the in vivo situation of surgically induced hindlimb ischemia, hypoxia, proinflammatory signals, and exogenously overexpressed FGF-2 should be encountered as stimuli for mMCP-1/JE. To seek the possible mechanism, therefore, we next examined the effect of hypoxia on NEMCs to the expression of MCP-1 in vitro (please see the supplemental materials).

In case of MRC-5 cells, FGF-2-mediated upregulation of hMCP-1 was not affected even under hypoxic cultivation at 5% O<sub>2</sub>, a condition showing marked upregulation of VEGF in same-medium samples (data not shown). No significant change of hMCP-1 expression was found irrespective of FGF-2 or hypoxia, as expected in the case of HUVECs. Subsequent signal inhibition experiments revealed that PKC, classical MAPK (MEK), and NF- $\kappa$ B-related pathways were essential in stimulating hMCP-1 expression in both FGF-2 and TNF- $\alpha$  (please see the supplemental materials).





**Figure 2.** Biological role of endogenous mMCP-1/JE expression for adaptive and FGF-2-mediated neovascularization in hindlimb ischemia of C57BL/6 mice. The following results include all data from experiments repeated at least twice. # $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ . a, Impact of the blockade of endogenous mMCP-1/JE activity using 7ND MCP-1 (a dominant negative inhibitor for MCP-1) on the recovery of blood flow during adaptive and FGF-2-mediated therapeutic neovascularization in a limb-salvaging model (C57BL/6). Computer-assisted and laser Doppler-mediated quantitative analyses of blood flow in ischemic hindlimb (left), standardized by that of untreated (right) hindlimb, are shown. Plasmid-based gene transfer of 7ND MCP-1 abrogated both adaptive and FGF-2-mediated recovery of blood flow. b, Impact of 7ND MCP-1 on the limb prognosis of autoamputation model (balb/c nu/nu; left) or of genetic deficiency in the functional receptor for mMCP-1/JE (CCR2) (C57BL/6 to 129/svjae hybrid strain; right). These curves were obtained using Kaplan-Meier method, and data were analyzed using the log-rank test.

These findings were also tested *in vivo* using a murine hindlimb ischemia model in the C57BL/6 strain. Each inhibitor compound for the signal transduction pathway (bis-I for pan-PKC, bis-V as a negative control compound for bis-I, U0126 for MEK, and rapamycin for p70S6K) was intraperitoneally administered daily from the day before limb ischemia and SeV-mFGF2, and each thigh muscle on day 2 was subjected to ELISA to measure the expression level of mMCP-1/JE protein. All mice receiving ALLN, an inhibitor for NF- $\kappa$ B, died in the course of the experiment because of toxicity and were thus excluded. As shown in Figure 3a, only bis-I and U0126 significantly reduced the expression of mMCP-1/JE, indicating the significant contribution of PKC and MEK during FGF-2-mediated MCP-1 expression in ischemic hind limbs *in vivo*.

Next, we examined the possible link between FGF-2 and TNF- $\alpha$  for the induction of endogenous mMCP-1/JE in induced ischemia of hind limb of C57BL/6 mice. At the physiological condition, FGF-2 was suggested to be expressed by endothelial cells, smooth muscle cells, and interstitial cells, and be stored on basement membrane.<sup>20</sup> Induced ischemia resulted in a modest increase of endogenous FGF-2, probably because of the previously known mechanism including acidosis in endothelial cells,<sup>13,21</sup> and SeV-mediated gene transfer markedly elevated the local concentration of FGF-2 (Figure 3b, left). However, increase at the local level of FGF-2 did not contribute to TNF- $\alpha$  expression in the same samples, whereas ischemia itself strongly induced TNF- $\alpha$  (Figure 3b, right). These results strongly suggest that FGF-

2-mediated stimulation of mMCP-1/JE expression in ischemic hind limbs is an additive effect with proinflammatory signals including TNF- $\alpha$  using similar signal transduction pathways.

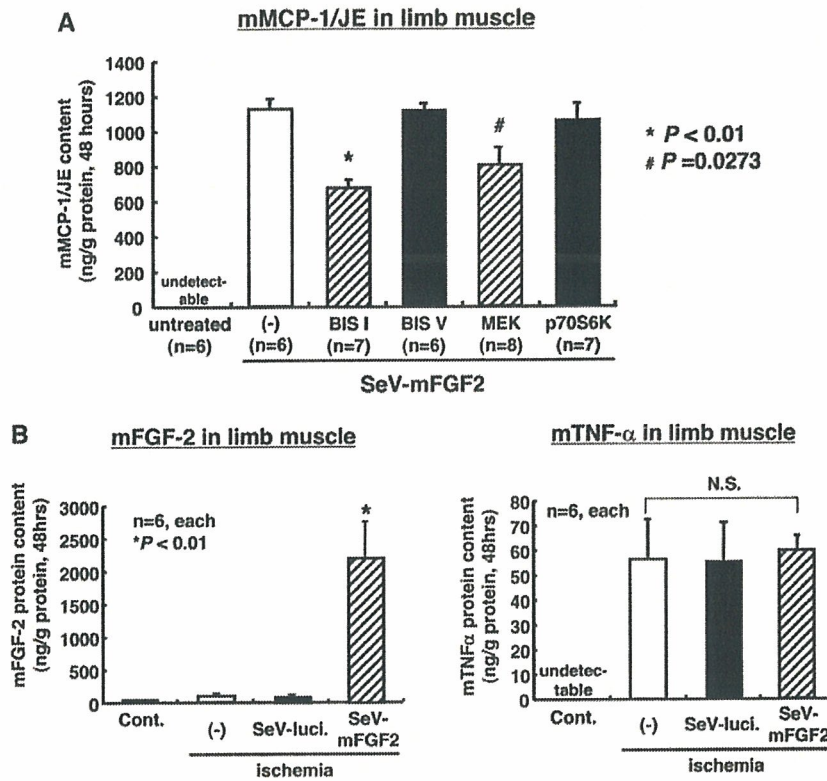
### Proinflammatory/Arteriogenic FGF-2/MCP-1 Pathway Is Independent of the Angiogenic Signal of FGF-2/VEGF

Finally, we investigated the possible direct link of MCP-1 and VEGF, which were suggested as stimulators of each other.<sup>22-24</sup> Our *in vitro* experiments showed that FGF-2 but not MCP-1 stimulated VEGF expression in human NEMCs, a finding that was not seen among the monocyte-lineage cell (THP-1) findings confirmed in murine cells (please see the supplemental materials).

Similar findings were also obtained *in vivo*. Neither the induced ischemia- nor the FGF-2 gene transfer-mediated upregulation of VEGF was affected by inhibition of endogenous mMCP-1/JE activity by sufficient amount of 7ND MCP-1 (Figure 4, left graph), which exhibited a significant biological effect as shown in Figures 1 and 2. Furthermore, both the induced ischemia- and FGF-2 gene transfer-mediated upregulation of mMCP-1/JE expression demonstrated no significant alteration by inhibition of endogenous VEGF activity by sufficient amount of anti-VEGF neutralizing antibody (Figure 4, right graph), which exhibited a significant biological effect in our previous studies.<sup>12-14</sup>

These results thus indicate that the FGF-2/MCP-1 axis for inflammatory/arteriogenic signaling is independent of the FGF-2/VEGF sequence for angiogenesis *in vitro* and *in vivo*.





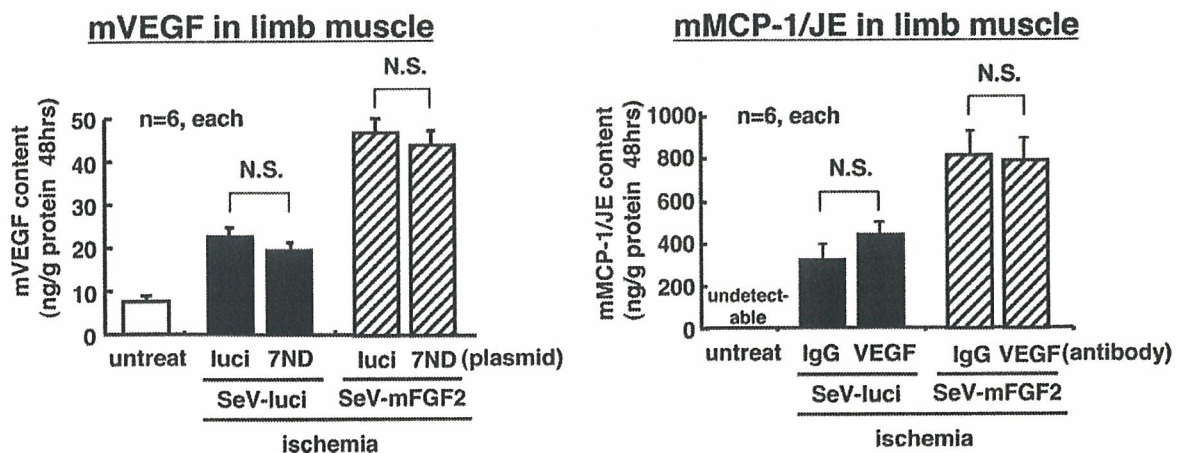
**Figure 3.** FGF-2-mediated upregulation of MCP-1 depends on PKC and MAPK, but is not sensitive to TNF-α. \*P<0.01 and #P<0.05. a, Effect of various inhibitors for intracellular signal transduction pathways on FGF-2-mediated mMCP-1/IE expression in vivo using the hindlimb ischemia model of C57BL/6. Each inhibitor compound (bis-I for pan-PKC, bis-V as a negative control for bis-I, U0126 for MEK, and rapamycin for p70S6K) was intraperitoneally administered daily from the day before induced limb ischemia and gene transfer, and each thigh muscle was subjected to ELISA on day 2. All mice receiving ALLN, an inhibitor for NF-κB, died in the course of the experiment and were thus excluded. b, mTNF-α expression was not affected by FGF-2 in the ischemic limb. Soon after surgery inducing hindlimb ischemia, SeV-mFGF2 or SeV-luciferase was injected intramuscularly. Two days later, limb muscles were subjected to ELISA.

**Discussion**

We here demonstrated the independence between the inflammatory/arteriogenic (MCP-1) and angiogenic (VEGF) pathways, both downstream signals of FGF-2, in a murine hindlimb ischemia model. Key observations obtained in the present study were as follows: (1) MCP-1 expression was strongly stimulated by FGF-2 gene transfer, and MCP-1/CCR2 played a critical biological role both in adaptive and FGF-2-mediated recovery of blood flow; (2) FGF-2 stimulated MCP-1 expression via NEMCs but not endothelial or

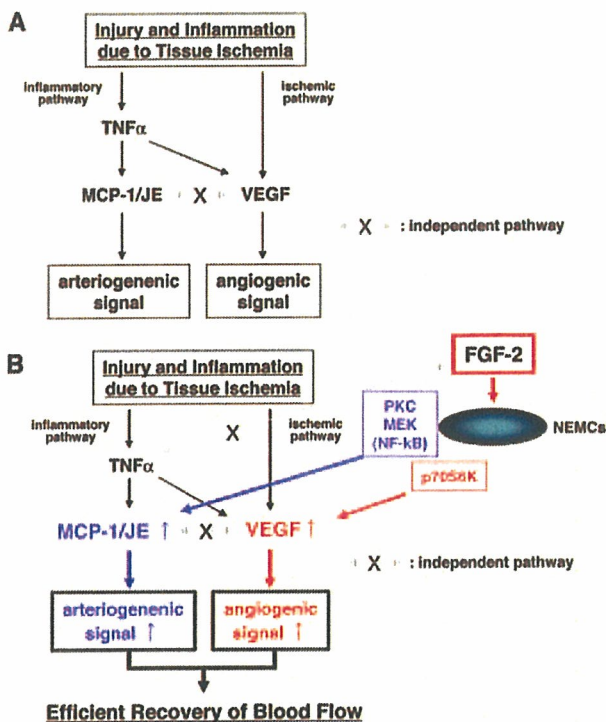
monocyte-lineage cells, in a hypoxia-independent manner; (3) FGF-2-mediated stimulation of MCP-1 was independent of a proinflammatory cytokine, ie, TNF-α, using similar signal transduction pathways, PKC-, MEK-, and probably NF-κB-dependent signaling; and (4) FGF-2/MCP-1 for the arteriogenic axis is independent of the FGF-2/VEGF sequence for angiogenic signaling.

These results are the first demonstration of the critical role of MCP-1/CCR2, an inflammatory/arteriogenic stream, for FGF-2-mediated neovascularization for blood perfusion in



**Figure 4.** Both inflammatory/arteriogenic (MCP-1) and angiogenic (VEGF) pathways are downstream of FGF-2 in vivo, but are independent of each other. Plasmid-based 7ND MCP-1 was intramuscularly injected 2 days before surgery, and surgical ischemia was induced on day 0. At that time, 10<sup>7</sup> pfu of SeV-luciferase or SeV-mFGF2 was intramuscularly injected. Two days later, limb muscles were subjected to ELISA. VEGF-neutralizing antibody was administered by intraperitoneal continuous release (r=28.6 μg/d) via peritoneal implantation of a disposable osmotic pump and an additional intravenous injection bolus (100 μg) soon after induced ischemia. \*P<0.01 and #P<0.05.





**Figure 5.** Schematic representation of the role of MCP-1 and NEMCs in adaptive and FGF-2-mediated neovascularization. **a**, The role of inflammatory/arteriogenic (MCP-1) and ischemia/angiogenic (VEGF) pathways during adaptive recovery of blood flow in limb ischemia is shown. Injury and inflammation attributable to tissue ischemia stimulate both inflammatory (TNF- $\alpha$ /MCP-1) and ischemic (VEGF) pathways. TNF- $\alpha$  but not MCP-1 also contributes VEGF expression resulting in an enhanced angiogenic pathway. **b**, The essential role of NEMCs during FGF-2-mediated therapeutic neovascularization is shown. FGF-2 stimulated MCP-1 expression via NEMCs but not other cells, via hypoxia-independent and PKC-, MEK-, and probably NF- $\kappa$ B-dependent signaling. This was independent of the proinflammatory cytokine, ie, TNF- $\alpha$ . In addition, FGF-2 targets NEMCs to induce VEGF via the p70S6K signal transduction pathway independent of FGF-2/MCP-1, as we demonstrated previously (ref. 13 and 14). Importantly, FGF-2/MCP-1 for the inflammatory/arteriogenic axis is independent of the FGF-2/VEGF sequence for the angiogenic signal. Simultaneous enhancement of the inflammatory/arteriogenic (MCP-1) and angiogenic (VEGF) pathways is essential to FGF-2-mediated recovery of blood flow.

ischemic tissue, and suggest the multiple functions and utility of FGF-2 overexpression for therapeutic angiogenesis, which is strictly regulated by NEMCs (the conceptual scheme is demonstrated in Figure 5a and 5b).

One important advance of the current study is to clarify the critical role of MCP-1 during adaptive and FGF-2-mediated recovery of tissue perfusion. As we previously reported, the limb-salvaging effect of FGF-2 was abolished by neutralization of endogenous VEGF activity,<sup>12</sup> as well as by inhibition of MCP-1/CCR2 signaling when using the dominant-negative inhibitor 7ND MCP-1 and CCR2-deficient mice, as shown in the present study. In addition, we here showed that MCP-1 was also necessary for spontaneous recovery of blood flow, assessed by LDPI, after induced hind limb ischemia. These results thus suggest that simultaneous enhancement of both

systems may be absolutely required for both adaptive and FGF-2-mediated recovery of blood flow in ischemic limbs.

On the other hand, whereas these results are clear evidence of the tight link between MCP-1 and VEGF during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis, we here also showed that the regulatory pathways for their expression by FGF-2 was completely different each other in vitro and in vivo. Together with our previous and current findings, PKC, MEK, and probably NF- $\kappa$ B are important for MCP-1 expression, while p70S6K is the critical regulator for VEGF,<sup>12-14</sup> as shown in Figure 5a and 5b. Because both are essential for the biological activity of FGF-2, either FGFR agonists or a compound that simultaneously stimulates these signal transduction pathways may be a highly effective drug for therapeutic angiogenesis.

It has previously been demonstrated that MCP-1 is expressed by various cell types, including fibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells, and monocytes/macrophages, in response to proinflammatory cytokines including interleukin (IL)-1 and TNF- $\alpha$ .<sup>25-27</sup> Findings corroborated by our current study. We are the first to demonstrate that FGF-2 induces MCP-1 only in NEMCs but not in other cell types, emphasizing the essential role of NEMCs during FGF-2-mediated therapeutic neovascularization; however, the complex angio-/arteriogenic network between NEMCs and monocytes/macrophages via MCP-1/FGF-2 has not been fully clarified. Interestingly, previous studies demonstrated that MCP-1-mediated collateral artery growth was associated with an increased expression of FGFR1,<sup>28</sup> and in turn, that FGF-2 promoted monocyte accumulation and angiogenesis in a rabbit model of limb ischemia.<sup>8</sup> These studies strongly suggest the positive feedback loop between NEMCs and monocytes/macrophages when using MCP-1 and FGF-2 for enhancing both arteriogenesis and angiogenesis.

Our current findings suggest that FGF-2 might mediate inflammatory responses via MCP-1 and VEGF at its downstream; however, some studies suggested that FGF-2 is an antiinflammatory factor. During the review process of this manuscript, an important study has been published, indicating that dermal administration of FGF-2 itself induced neither inflammatory nor vascular reactions at the local site, ie, vascular permeability and hyperemia; however, in turn, FGF-2 synergistically enhanced leukocyte/monocyte recruitment induced by proinflammatory cytokines.<sup>29</sup> Their findings are in accordance with our previous findings obtained in use of a rat model of adjuvant-induced arthritis,<sup>30</sup> and importantly, they also demonstrated that is suggested to be an adhesion molecule-dependent mechanism. These conflicting results might be explained as follows: transient increase of local concentrations of downstream players of FGF-2, namely MCP-1 and VEGF, may be beneficial, but prolonged upregulation of these can be deleterious, during wound repair and limb ischemia. This hypothesis can well explain the following paradoxical findings related to VEGF; plasmid-based transient expression of VEGF increased the blood flow in hindlimb ischemia model, as shown by several laboratories, although implantation of fibroblasts continuously expressing VEGF by retroviral vector induced tissue edema, inflammation and hemangiomas.<sup>31</sup> This may also be a case of MCP-1; because the prolonged expression of MCP-1 is a cause of an



experimental model of atherosclerosis,<sup>32</sup> although bolus administration of MCP-1 is beneficial for collateral development in limb ischemia.<sup>6</sup> Further study should be called for to investigate which parameter is the determinant of the biological effects of MCP-1 as well as VEGF.

In conclusion, we here demonstrated that FGF-2 targets NEMCs to stimulate expression of VEGF and MCP-1 via independent signal transduction pathways, resulting in an efficient limb-salvaging effect. Therefore, the MCP-1/CCR2 system, known as proinflammatory/arteriogenic pathway, plays a critical role in FGF-2-mediated therapeutic neovascularization.

### Acknowledgments

The authors thank Chie Arimatsu for her excellent assistance with the animal experiments.

### Sources of Funding

This work was supported in part by a Grant-in-Aid (to Y.Y., K.E., and K.S.) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology; by a Research Grant from Sankyo Life Science Foundation (to Y.Y.); by the Program for the Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO) (to Y.Y., K.E., M.H., and K.S., No. MF-21); and by a Grant for Translational Research from the Ministry of Health, Labor, and Welfare, Japan (to Y.Y.).

### Disclosures

Dr Yonemitsu is a member of Scientific Advisory Board of DनावेC Corporation.

### References

- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med*. 1995;1:27-31.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9:653-660.
- Matsushima K, Larsen CG, DuBois GC, Oppenheim JJ. Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med*. 1989;169:1485-1490.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90:909-928.
- Ikeda Y, Yonemitsu Y, Kataoka C, Kitamoto S, Yamaoka T, Nishida K, Takeshita A, Egashira K, Sueishi K. Anti-MCP-1 gene therapy attenuates pulmonary hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2021-H2028.
- Ito WD, Arras M, Winkler B, Scholz D, Schaper J, Schaper W. MCP-1 increased collateral and peripheral conductance after femoral artery occlusion. *Circ Res*. 1997;80:829-837.
- Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 2001;49:609-617.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *J Clin Invest*. 1998;101:40-50.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Pipp F, Kostin S, Martin S, Clauss M, Schaper W. Blood monocyte concentration is critical for enhancement of collateral artery growth. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H2411-H2419.
- Pipp F, Heil M, Issbrucker K, Ziegelhoeffer T, Martin S, van den Heuvel J, Weich H, Fernandez B, Golomb G, Carmeliet P, Schaper W, Clauss M. VEGFR-1-selective VEGF homologue PlGF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism. *Circ Res*. 2003;10:289-295.
- Heil M, Ziegelhoeffer T, Wangner S, Fernandez B, Helisch A, Martin S, Tribulova S, Kuziel WA, Bachmann G, Schaper W. Collateral artery growth (arteriogenesis) after experimental arterial occlusion is impaired in mice lacking CC-chemokine receptor-2. *Circ Res*. 2004;94:671-677.
- Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of VEGF165 but not of FGF-2. *Circ Res*. 2002;90:966-973.
- Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K. FGF-2 gene transfer can stimulate HGF expression, irrespective of hypoxia-mediated down regulation in ischemic limb. *Circ Res*. 2002;91:723-730.
- Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tani M, Okano S, Kaneko K, Hasegawa M, Hashizume M, Maehara Y, Sueishi K. Essential role of PDGF $\alpha$ -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR $\alpha$  during angiogenesis. *Circ Res*. 2004;94:1186-1194.
- Egashira K, Koyanagi K, Kitamoto S, Ni W, Kataoka C, Morishita R, Kaneda Y, Akiyama C, Nishida K, Sueishi K, Takeshita A. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular remodeling in rats. Blockade of MCP-1 activity following intramuscular transfer of a mutant gene inhibits vascular remodeling induced by chronic blockade of NO synthesis. *FASEB J*. 2000;14:1974-1988.
- Egashira K, Zhao Q, Kataoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, Nishida K, Inoue S, Katoh M, Ichiki T, Takeshita A. Importance of MCP-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circ Res*. 2002;90:1167-1172.
- Couffinhal T, Silver M, Zhang LP, Kearney M, Witzenzachler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998;152:1667-1679.
- Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000;105:1527-1536.
- Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol*. 1990;144:3034-3038.
- Floege J, Hudkins KL, Eitner F, Cui Y, Morrison RS, Schelling MA, Alpers CE. Localization of fibroblast growth factor-2 (basic FGF) and FGF receptor-1 in adult human kidney. *Kidney Int*. 1999;56:883-897.
- D'Arcangelo D, Facchiano F, Barlucchi LM, Melillo G, Illi B, Testolin L, Gaetano C, Capogrossi MC. Acidosis inhibits endothelial cell apoptosis and function and induces basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression. *Circ Res*. 2000;86:312-318.
- Hong KH, Ryu J, Han KH. MCP-1-induced angiogenesis is mediated by VEGF-A. *Blood*. 2005;105:1405-1407.
- Yamada M, Kim S, Egashira K, Takeya M, Ikeda T, Mimura O, Iwao H. Molecular mechanism and role of endothelial MCP-1 induction by VEGF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1996-2001.
- Marumo T, Schini-Kerth VB, Busse R. Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kB and induces MCP-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes*. 1999;48:1131-1137.
- Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human MCP-1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4678-4682.
- Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, Schaper W. Bone marrow-derived cells do not incorporate into adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004;94:230-238.
- Rong JX, Berman JW, Taubman MB, Fisher EA. Lysophosphatidylcholine stimulates MCP-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1617-1623.
- Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B, Barancik M, Heil M, Striskova M, Schaper W. Involvement of the FGF system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*. 2003;92:561-568.
- Zittermann SI, Issekutz AC. Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am J Pathol*. 2006;168:835-846.
- Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, Nakagawa K, Nakashima Y, Iwamoto Y, Nagai Y, Hasegawa M, Sueishi K. Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol*. 2002;168:450-457.
- Springer ML, Chen AS, Kraft PE, Bednarski M, Blau HM. VEGF gene delivery to muscle: potential role for vasculogenesis in adults. *Mol Cell*. 1998;2:549-558.
- Inoue S, Egashira K, Ni W, Kitamoto S, Usui M, Otani K, Ishibashi M, Hiasa K, Nishida K, Takeshita A. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy limits progression and destabilization of established atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2002;106:2700-2706.



# センダイウイルスによる遺伝子治療

米満 吉和・長谷川 護\*

千葉大学大学院医学研究院遺伝子治療学教授  
九州大学大学院医学研究院特任教授  
ディナベック株式会社代表取締役社長\*

## はじめに一次世代ベクターに要求される性能とは—

ヒトゲノムの概要がほぼ明らかとなった。今後ポストゲノム時代においては、疾患原因遺伝子のみならず疾患感受性遺伝子などのゲノム情報をもとにした創薬、治療技術開発の飛躍的な進展が期待されている。

このポストゲノム時代において、遺伝子治療はヒトゲノム解析で得られた知見をいち早く、直接的に治療に結びつけることが可能であるため、今後最も重要となる先端医療技術の1つであるといえる。しかしながら、1990年に米国国立衛生研究所 (NIH) において最初の遺伝子治療が実施され、現在に至るまで500以上の臨床プロトコルが実施されてきたにもかかわらず、十分に成果を挙げたという報告はごくわずかである。その最も大きな原因として、標的組織・細胞に対して治療効果を得るに十分な遺伝子導入効率を実現することができないこと、すなわち既存ベクターの性能が不十分であったことが挙げられる。この現状を打開するため、現在世界中で熾烈なベクター開発競争が行われている。

一方で、遺伝子治療の安全神話に

も陰りがみえつつある。1999年に米国ペンシルバニア大学でのアデノウイルスベクターによる死亡事故、2001年にはフランスでレトロウイルスベクターによるX連鎖重症複合免疫不全症 (x-severe combined immunodeficiency disease ; X-SCID) への遺伝子治療において、染色体へのベクター挿入が原因と考えられる白血病発症の副作用が報告され<sup>1)2)</sup>、安全性の面からも優れたベクターの開発が求められている。

これら「遺伝子導入効率の改善」と「より高い安全性の確保」は、現在の遺伝子治療技術開発における至上命題であるとともに両輪でもある。すなわち、ベクターの性能が一定であるならば、遺伝子導入効率を上昇させるためにベクター投与量を増量させなければならず、その結果としてベクターへの生体反応が増強、あるいは染色体傷害の頻度が上昇し、それがあるレベルに達すれば高サイトカイン血症 (systemic inflammatory response syndrome ; SIRS)・悪性腫瘍の発生頻度が上昇、そして最悪の場合、患者を死に至らしめる危険性が増大する。これらの現状を打開するためには、①卓越した遺伝子導入効率・発現効率が達成

可能であり、ベクター投与量ひいてはベクターへの生体反応を可能な限り引き下げることができること(つまり、ベクターあたりの遺伝子導入効率・発現効率を格段に引き上げる)、②染色体傷害を低減、可能ならば完全に回避することができることが次世代ベクターに要求されている。

われわれはこれまで、このような遺伝子治療の問題点を解決するために、全く新しい独自のベクターの開発に取り組んできた。なかでも、組換えセンダイウイルス (Recombinant Sendai Virus ; rSeV) ベクターは、この分野におけるわれわれの技術開発の中心となるベクターであり、その基盤特許がすでに米国で成立しているとともに多数の改変型ベクターの開発、多方面における疾患への用途を報告してきた<sup>2)12)</sup>。感染性粒子を放出しない第1世代ベクター (F遺伝子欠失型) については、すでに大量工業生産と医薬品の製造および品質管理に関する基準 (good manufacturing practice ; GMP) 生産が可能となっている。また、九州大学病院において下肢重症虚血肢に対する遺伝子治療ベクターとして新医薬品の臨床試験の実施の基準



(good clinical practice ; GCP)に準拠した臨床研究が進められており、現時点でいくつかの評価項目の改善を認めるとともに、ベクター投与に関連した重篤な有害事象は認められていない。さらに、より高い安全性の確保と生体反応を低減化したセンダイウイルス (Sendai Virus ; SeV) ベクター (第1.5, 2, 3 世代ベクター) や、抗腫瘍性を増強させた新世代ベクター (oncolytic SeV) の開発も進んでいる。

本稿では、このSeVベクターの特徴と新世代ベクターの開発状況、そして臨床応用の現状について、その概略を紹介する。

### SeVベクターの特徴

SeVはパラミクソウイルス科に属し、1本のマイナス鎖RNAをもつウイルスである。野生型SeVはその

生活環において、レトロウイルス、レンチウイルスなどと異なりDNAに変換されず、転写ならびにゲノムの複製は細胞質内で行われるため、宿主細胞の染色体に影響を及ぼすことなく遺伝子を発現できるという利点をもつ。また、SeVはそのウイルス表面に、ヘマグルチニン/ノイラミニダーゼ (hemagglutinin/neuraminidase ; HN) 蛋白質とF (膜融合) 蛋白質をもち (図1)、ほ乳動物細胞のほとんどの細胞膜上に存在するシアル酸とHN蛋白質を介して結合・分解する。F蛋白質は細胞膜のコレステロールを認識して膜融合を起こし、感染を成立させる。細胞質内に放出されたウイルスゲノムは、自らコードするRNAポリメラーゼ (L蛋白質) により、ウイルス蛋白質を作るメッセンジャーRNAの転写とゲノムの複製を細胞質内で行う。複製されたゲノムと蛋白質はリ

ボ核蛋白 (ribonucleoprotein ; RNP) complexを形成し、細胞表面で粒子形成と出芽が起きてウイルス粒子が細胞外へ放出される (図1)。このような生活環のため、既存ベクターと比べSeVには以下のようなさまざまな利点が挙げられる。

①細胞質RNAベクターとして、特に核内の染色体への傷害の危険性がなく、核内でDNAとして存在する既存のベクターとは違い安全性が高い。

②ほ乳動物のほとんどの細胞膜上に存在するシアル酸とHN蛋白質が結合するため、多くの細胞に感染可能であり、それは非分裂細胞においても同様で、多くの細胞種、組織に広く遺伝子が導入されることが期待される。

③SeVは細胞に感染すると直ちにゲノムの転写・複製を開始し、以後遺伝子発現は対数的に増加するため

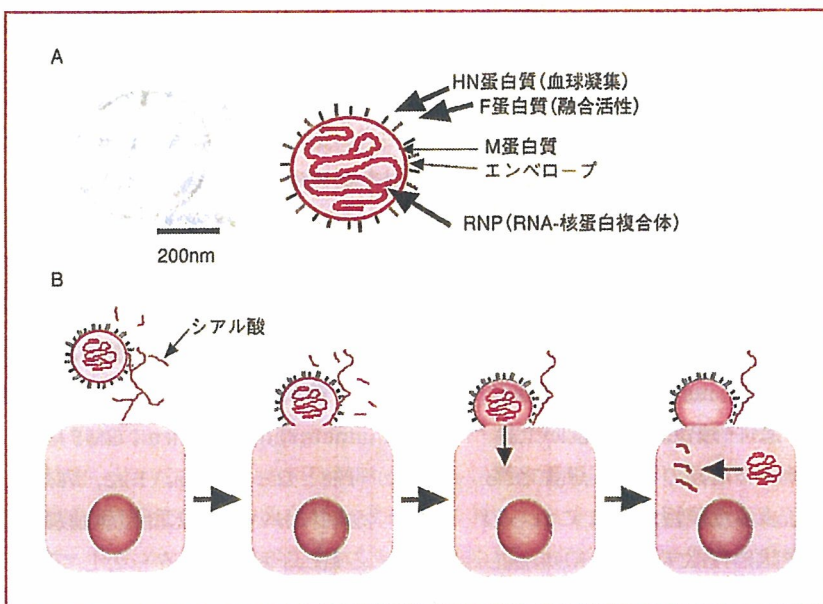


図1  
SeV粒子とその感染様式  
A : SeVの微細構造 (左 : 電子顕微鏡写真, 右 : 模式図)  
B : SeVの感染様式  
SeVはシアル酸とHN蛋白質を介して細胞と接着し、F蛋白質が細胞膜と融合し、ウイルスゲノムが細胞質内に侵入、転写が開始される。



既存のベクターと比較してきわめて高い遺伝子発現率が得られる。

④SeVはヒトへの病原性の報告がない。

このように、SeVは機能面・安全面からも既存のベクターと比較してきわめて有利な特徴をもっているといえる。

### SeVの基本骨格

ウイルス遺伝子は6つの主要遺伝子が3'-NP-P-M-F-HN-L-5'の順に並んでおり、その両端にはリーダーとトレーラーと呼ばれる構造がある。ゲノムの複製と転写はリーダー配列から起動される。主要遺伝子がコードする蛋白質のうち、ヌクレオカプシド蛋白質(NP)、RNAポリメラーゼを構成するP蛋白質とL蛋白質の3種類のウイルス由来蛋白質は、ウイルスのゲノムRNAとともに自律

複製可能なレプリコンであるRNP複合体を形成し、ゲノム転写・複製の鋳型となる。また、マトリックス蛋白質(M)はエンベロープの裏打ち蛋白質であり、ウイルス粒子のアセンブリーと出芽に関与している。2種類のエンベロープ蛋白質(HN, F)は、ウイルス粒子の感染細胞への接着および侵入に関与している。F蛋白質は感染性の決定に必須な蛋白質であり、非活性型の前駆蛋白質(F0)として合成され、トリプシン様プロテアーゼによりF1, F2に開裂・活性化され、HN蛋白質との相互作用により細胞膜との融合を引き起こす。これら構造蛋白質をコードする遺伝子を欠失することにより、伝播性を有さないSeVなどを構築することが可能であり、この技術を用いて改変型のウイルスを作製し、実際の臨床応用に用いることができる(図2)。

### SeVを基本骨格としたベクターの構築

#### 1. F欠失型SeV(第1世代ベクター：rSeV/dF)

SeVを遺伝子治療用ベクターとして用いるためには、ウイルス遺伝子をすべて含む発現ベクターでは体内での伝播が問題となるため、非伝播性にするのが必須である。そこでわれわれが着目したのが細胞との融合に関与するF蛋白質である。

F蛋白質は、先に述べたようにウイルス感染において重要な蛋白質であり、この蛋白質を完全に欠失させたウイルスは感染性を示さず、伝播性をもたない。F欠失型ベクターの構築は機能的RNPを作製し、F蛋白質を細胞膜表面に発現したパッケージング細胞株にトランスフェクションする2つのステップより構成される(図3)。

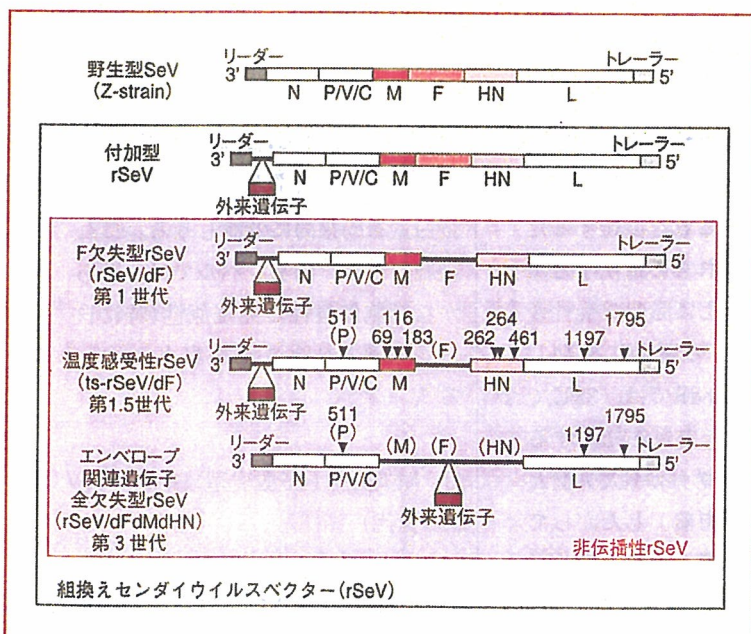


図2 SeVの野生型ゲノムと組換えベクターゲノムのデザイン(第2世代は省略)

SeVのゲノムは15.4kbの1本のマイナス鎖RNAより構成され、核蛋白質(N)、RNAポリメラーゼを構成するPおよびL蛋白質の3種類の蛋白質はゲノムRNAとともに複合体(RNP)を形成し、転写・複製の鋳型となる。外来遺伝子はその挿入位置がN遺伝子、つまり3'端に近いほどその導入細胞における発現量は高い。第1.5世代ベクターでは、HN, M, L遺伝子に数カ所の改変が施されており、37℃においてこれら遺伝子発現を失う。第3世代ベクターでは、エンベロープ関連遺伝子がすべて欠失されている。



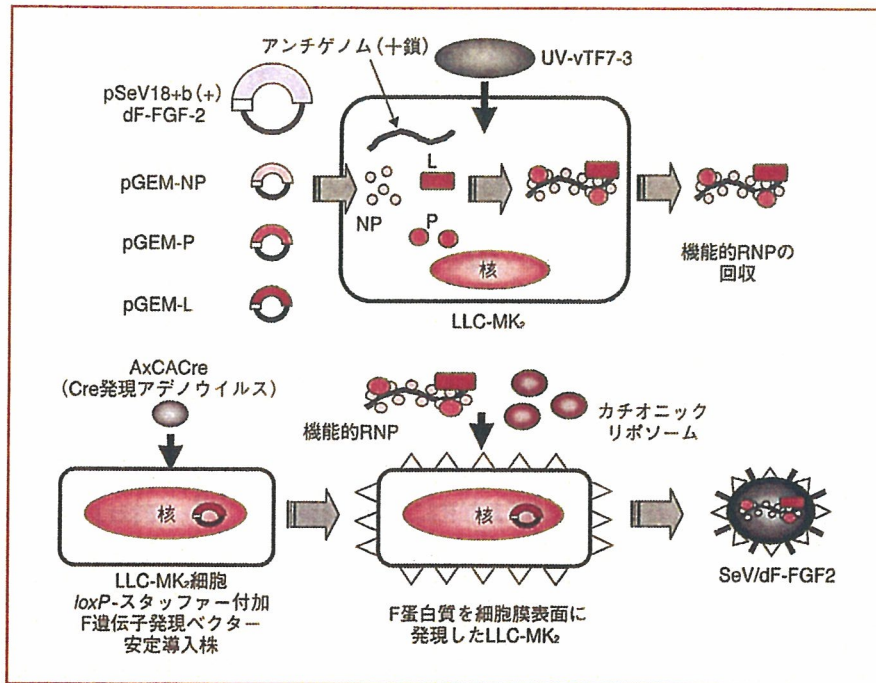


図3 rSeV/dFベクターの作製法(従来法)

T7RNAポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルス(UV-vTF7-3)をサル腎由来細胞株(LLC-MK<sub>2</sub>)に感染後、T7プロモーター支配下にNP, P, L蛋白質を発現するプラスミド、およびrSeV/dFのアンチゲノム(+鎖)を導入すると、導入細胞の細胞質でRNP形成され、機能的RNPの回収を行う。その後、F蛋白質を細胞膜表面に発現したLLC-MK<sub>2</sub>をヘルパー細胞とし、そこにカチオン性リポソームとともに機能的RNPを導入すると、F蛋白質を細胞膜表面にもち、F遺伝子を欠失したSeV/dFがウイルス粒子として放出される。現在は、アデノウイルスとワクシニアウイルスを使用しない方法なども確立されている。

第1世代ベクターは大量生産のバリデーションが終了し、ベクターのGMP生産もすでに可能であり、人体に投与可能なグレードが確保されている。すでにサルによる優良試験所基準(good laboratory practice; GLP)準拠安全性試験も終了しており、高い安全性が確保されている。

2. F欠失型・温度感受性変異導入型SeV(第1.5世代ベクター: ts-rSeV/dF)

F欠失型ベクターにより二次伝播は回避できるが、ベクターとして不

要な蛋白質であるM, NH蛋白質が残存し感染細胞で発現するため、これらが宿主反応や細胞傷害性に関与する可能性がある。これを回避するため、われわれはこれらの遺伝子とポリメラーゼであるLに温度感受性変異を導入したSeVの開発に成功した<sup>13)</sup>。このts-rSeV/dFでは、32℃で効率的にM, HN蛋白質が発現するため、ベクターの構築がF欠失型と同様に処理可能である。したがってベクター生産系は第1世代と全く同一のものを使用することができる。また患者に投与された場合、37℃付

近の体温に近い温度では、これらの遺伝子発現が大きく低下するため、免疫系のターゲットとなる異種蛋白量を効果的に低減しうる。実際、細胞レベル、動物レベルでは、明らかな細胞傷害性と免疫原性(特に自然免疫系)の低減が観察されている<sup>13)</sup>。

3. M欠失型(+F改変型)SeV(第2世代)

制限増殖型アデノウイルスベクターは、腫瘍細胞特異的に増殖し、その細胞殺傷効果を期待して開発が進



められているベクターである。その原型であるONYX-015の前期臨床試験では、一部の患者では著明な抗腫瘍効果が報告されているものの、全例で高頻度に発熱、悪寒などの感冒様症状を認めている<sup>14)</sup>。

アデノウイルスベクターが血中できわめて安定であることは多くの前臨床試験、臨床研究で明らかにされており、制限増殖型アデノウイルスベクターを投与された腫瘍から遠隔部位に存在する腫瘍にも効果があることが明らかになっている。これは効果の面からは重要な性質であり、遠隔転移巣のコントロールが可能となることを示唆するものの、原発巣で増殖したウイルスベクターが血中に散布されていることを示しており、ウイルス血症、およびそれに対するSIRSが引き起こされる危険性が高まる。このような二次粒子の放出を回避し、有効に遺伝子を標的腫瘍細胞局所に発現させるウイルスベクターの改変が必要であり、その目的のために開発されたのが第2世代

M欠失型SeVである<sup>15)</sup>。

M蛋白質はウイルス粒子形成や脂質細胞膜の結合に不可欠な蛋白質であり、M遺伝子を欠失するとウイルス粒子のアSEMBリー、ウイルス様粒子の出芽が不可能となる。実際、M遺伝子を欠失したウイルス(SeV/dM)を構築すると、そのウイルスが感染した細胞からはウイルス粒子の放出を認めず、感染した細胞は隣接した細胞と融合し、いわゆる細胞融合(シンチウム形成)をきたす。細胞融合した細胞は巨細胞化し、最終的には細胞のホメオスタシスの維持が困難となり細胞死に至る。

このSeV/dMに対しさらにF遺伝子改変を付加することにより、この現象をある特定のプロテアーゼ活性をもった細胞にのみ起こすことが可能となる。F改変型SeVはF0からF1、F2に開裂するプロテアーゼを、感染させたい細胞特有のプロテアーゼで開裂し、特定の細胞にのみ感染できるようにF遺伝子を改変させたウイルスベクターである。これは特に

高率にMMP(matrix metalloproteinase), uPA(urokinase-type plasminogen activator), tPA(tissue plasminogen activator)などの発現が認められる癌細胞などに遺伝子導入する際に有効であり、これらのプロテアーゼにより開裂(図4)し、目的とする癌細胞にのみ遺伝子を導入して治療することが可能である。

担瘤マウスへの治療実験では、腫瘍内にGFP遺伝子を搭載したSeV/dM(治療遺伝子は搭載していない)を投与することで、広範な腫瘍細胞死が認められた。今後、このような改変型ベクターを用いて、癌に対する遺伝子治療にも応用可能と考えられる。

#### 4. エンベロープ関連遺伝子(F, HN, M)全欠損型SeV(第3世代ベクター:rSeV/dFdMdHN)

図1, 2に示すように、エンベロープ関連蛋白(F, HN, M)は、ウイルス粒子構成と細胞への感染には必須であるが、一度感染した後の転

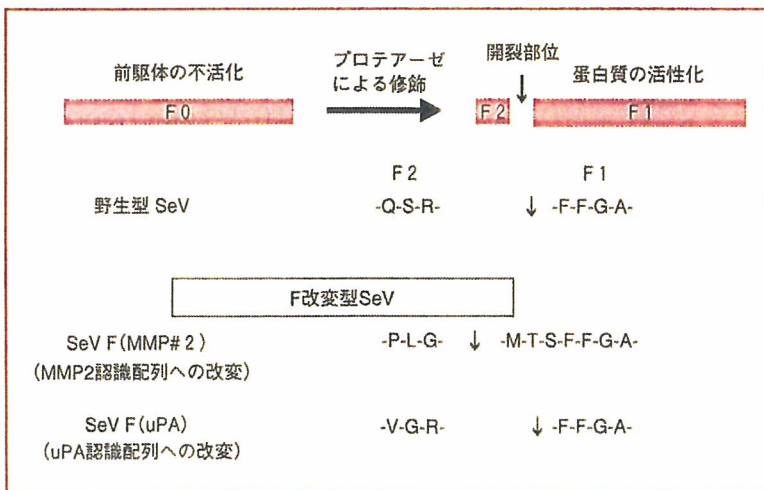


図4

#### F改変型SeVのデザイン

野生型SeVは、F0の開裂プロテアーゼとしてtrypsin様酵素を利用している。この認識部位を他のプロテアーゼで開裂するようにF遺伝子を改変することで、ベクターのトロピズムを変更させることが可能になる。



写ユニットとしてはRNPで十分である。したがって最も進化したベクターとしては、これらの遺伝子をゲノムから欠損させ、ベクター構築の際にトランスに供給するシステムの確立が必要であった。

われわれは10年の歳月を経てこのシステムの構築に成功し、エンベロープ関連遺伝子全欠損型SeV(第3世代ベクター: rSeV/dFdMdHN)が使用可能になった<sup>16)</sup>。このベクターの生体内直接投与により、宿主自然免疫系の活性化は大幅に低減し、マウス気道内投与における毒性も著減している<sup>17)</sup>。またそれに伴い、遺伝子発現の延長も観察されている。

## 5. 免疫原性の問題: 特に自然免疫系を中心に

### (1) プラスミドが安全であるという迷信

いつの頃からか、わが国では「プラスミドは安全、ウイルスベクターは危険性がある」という定着した既成概念がある。確かにこれまでに、大量のアデノウイルスベクター投与による死亡例(1例)が報告されており、また染色体組み込みによる白血病の発生が3例に報告されたが、これをもって「ウイルスベクターには危険性がある一方、プラスミドは安全である」とするならば、非科学的といわざるをえない。

たとえば、虚血肢遺伝子治療臨床研究にてプラスミドの使用が安全であることは、国内外の複数の施設から報告されている。使用されている量としては、一般に成人に対し8~16mgであり、米国食品医薬品局

(FDA)が推奨する体重あたりで計算すれば、この成人を60kgと仮定すると16mg DNA/60kg、つまり30gのマウスに換算すれば、8 μg DNA/30gとなる。しかし、通常虚血下肢に対する実験では、マウスにおいて50~100 μg DNA(血管新生因子遺伝子を発現する)/30gが投与されることが一般的であり、これはマウスにおいて危険性のない投与量であるため、ヒトにおいては、現実のmaximally tolerable doseよりはるかに少ない量が投与されていることになる。

一方、臨床研究において使用されているプラスミドはあくまで大腸菌由来CpG DNAであり、Toll-like receptor 9(TLR9)を介して強力に自然免疫系を活性化する<sup>18)</sup>。事実、プラスミドや合成DNAが、エンドトキシンショック様の反応を誘発することは、以前よりよく知られている。

実はこの自然免疫系の活性化は、遺伝子治療臨床試験においても観察されている。嚢胞性線維症の患者に40mgのプラスミドを経気道投与したところ、発熱、悪寒・戦慄と同時に、血清中炎症性サイトカイン濃度の上昇が観察されている<sup>19)</sup>。したがって、現在の血管新生遺伝子治療に使用されているプラスミド量は、少量であるがゆえに副作用を示していないだけであり、今後増量が必要になる場合には、このような自然免疫系の活性化に注意を払う必要がある。

### 治療効果

$$= (\text{ベクターあたりの導入効率}) \times (\text{投与ベクター量})$$

は、遺伝子治療における普遍的な演算公式である。投与ベクター量の増加に伴う自然免疫系の活性化を最小限にするためには、「ベクターあたりの導入効率」を飛躍的に増加させる必要がある。

### (2) rSeVに関する免疫原性とその逆利用

前述のとおり、rSeV/dFdMdHNの開発により、特に生体内における自然免疫系の活性化は大きく低減したものの、実はまだ問題が残されている。それは、「RNPにより細胞質内で転写を行う」というrSeVの基本的な性質に依存している。

最近の免疫学の進歩により、SeVおよび近縁ウイルスのゲノムを細胞質内で検知し、感染細胞を活性化するシステム(RIG-I他のRNAヘリカーゼファミリー)の存在が明らかになった<sup>20)-22)</sup>。事実、rSeV/dFdMdHNを樹状細胞(dendritic cell; DC)へ感染させると、rSeV/dF程ではないがDCの活性化を誘導する。また、SeVのゲノム認識に最も重要と考えられているRIG-Iのdominant negative変異体を発現するrSeV(rSeV/dF-RIG-IC)を感染させることにより、この反応が消失する(投稿中)。したがって、rSeVにより活性化する自然免疫系を完全に沈静化(silencing)させるには、rSeV/dFdMdHN + RIG-ICの使用が必須であることが明らかになった。

一方、rSeVのもつ免疫原性は遺



伝子治療においてマイナス要素ばかりではない。有効利用の方向性として、腫瘍などに対するワクチンとして使用することも可能である。事実最近われわれは、rSeVで活性化したDCは、既存法で最も効果が高いエンドトキシン(LPS)で活性化したDCよりも、さらに高い治療効果を示すことを明らかにした<sup>29)</sup>。ほかにも、rSeVはエイズワクチンとしても有効であることが明らかになっており、その効果は既存ワクチンを大きく凌駕することが証明されている<sup>20)</sup>。

## おわりに

SeVを基本骨格とした遺伝子治療ベクターの開発は、現在重症虚血肢に対して臨床的に評価される段階に入った。本ベクターは、その高い安全性と有効性を誇り、さらにその臨床応用の幅を広げるべく改変型ウイルスの開発を行っており、今後、多様な疾患に対する遺伝子治療において大いに役立つことが期待される。

SeVはわが国で開発され、基盤特許をはじめその知的所有権の多くもわが国が保有する、初めての本格的な高性能遺伝子治療用ベクターである。この“made in Japan”のベクターが、やがては各種の難治性疾患治療への国際的スタンダードに育て上げることができれば、この上ない喜びである。

## 文献

- 1) Kaiser J : Gene therapy, Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* **299** : 495, 2003
- 2) Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, et al : LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302** : 415-419, 2003
- 3) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, et al : Efficient gene transfer to airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* **18** : 970-973, 2000
- 4) Masaki I, Yonemitsu Y, Komori K, et al : Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer to vasculature ; a new class of efficient gene transfer vector to the vascular system. *FASEB J* **15** : 1294-1296, 2001
- 5) 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* **90** : 966-973, 2002
- 6) Yamashita A, Yonemitsu Y, Okano S, et al : Fibroblast growth factor-2 determines severity of joint disease in adjuvant-induced arthritis in rats. *J Immunol* **168** : 450-457, 2002
- 7) Ikeda Y, Yonemitsu Y, Sakamoto T, et al : Recombinant Sendai virus-mediated gene transfer into adult rat retinal tissue ; efficient gene transfer by brief exposure. *Exp Eye Res* **75** : 39-48, 2002
- 8) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M, et al : FGF-2 gene transfer can stimulate HGF expression irrespective of hypoxia-mediated down-regulation in ischemic limbs. *Circ Res* **91** : 923-930, 2002
- 9) Shoji F, Yonemitsu Y, Okano S, et al : Airway-directed gene transfer of interleukin-10 using recombinant Sendai virus effectively prevents post-transplant fibrous airway obliterans in mice. *Gene Ther* **10** : 213-218, 2003
- 10) Jin CH, Kusuhara K, Yonemitsu Y, et al : Recombinant Sendai virus provides a highly efficient gene transfer into human cord blood-derived hematopoietic stem cells. *Gene Ther* **10** : 272-280, 2003
- 11) Okano S, Yonemitsu Y, Nagata S, et al : Recombinant Sendai virus vectors for activated T-lymphocytes. *Gene Ther* **10** : 1381-1391, 2003
- 12) 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* **285** : H173-H182, 2003
- 13) Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, et al : Nontransmissible virus-like particle formation by F-deficient sendai virus is temperature sensitive and reduced by mutations in M and HN proteins. *J Virol* **77** : 3238-3246, 2003
- 14) Ries S, Korn WM : ONYX-015 ; mechanisms of action and clinical potential of a replication-selective adenovirus. *Br J Cancer* **86** : 5-11, 2002
- 15) Inoue M, Tokusumi Y, Ban H, et al : A new Sendai virus vector deficient in the matrix gene does not form virus particles and shows extensive cell-to-cell spreading. *J Virol* **77** : 6419-6429, 2003
- 16) Yoshizaki M, Hironaka T, Iwasaki H, et al : Naked Sendai virus vector lacking all of the envelope-related genes ; reduced cytopathogenicity and immunogenicity. *J Gene Med* **8** : 1151-1159, 2006
- 17) Tanaka S, et al : Impact of deletion of envelope-related genes of recombinant Sendai viruses on immune responses following pul-



- monary gene transfer of neonatal mice. *Gene Therapy* (accepted)
- 18) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** : 740-745, 2000
- 19) Alton EW, Stern M, Farley R, et al : Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis ; a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* **353** : 947-954, 1999
- 20) Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al : The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* **5** : 730-737, 2004
- 21) Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al : Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* **441** : 101-105, 2006
- 22) Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al : 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* **314** : 994-997, 2006
- 23) Shibata S, Okano S, Yonemitsu Y, et al : Induction of efficient antitumor immunity using dendritic cells activated by recombinant Sendai virus and its modulation by exogenous IFN- $\beta$  gene. *J Immunol* **177** : 3564-3576, 2006
- 24) Matano T, Kobayashi M, Igarashi H, et al : Cytotoxic T lymphocyte-based control of simian immunodeficiency virus replication in a preclinical AIDS vaccine trial. *J Exp Med* **199** : 1709-1718, 2004



## V. 追補:健康危険情報に関する参考資料(4件)

1. 被験薬 (SeV/dF-hFGF2 : コード DVC1-0101) の品質検査 (マイコプラズマ否定試験) に関する、BioReliance (BRL)社からの通知について (報告書: 添付資料は省略)
2. 安全性情報: 本遺伝子治療臨床研究に関して発生した有害事象一覧
3. 遺伝子治療臨床研究重大事態等報告書 (省庁様式別紙様式第5の別添)
4. 症例登録番号 103 切断肢に関する各種試験報告書



平成 18 年 12 月 11 日

別紙

臨床研究課題名

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

実施施設:九州大学病院

被験薬(SeV/dF-hFGF2:コード DVC1-0101)の品質検査(マイコプラズマ否定試験)  
に関する、BioReliance (BRL)社からの通知について

(報告書)

遺伝子治療臨床研究 総括責任者

九州大学病院 第2外科  
九州大学大学院医学研究院 消化器・総合外科学

教授 前原喜彦

遺伝子治療臨床研究 分担研究者

九州大学大学院医学研究院

特任教授 米満吉和



## 目次

### 1. 報告の概要

### 2. 経過と判断

### 3. まとめ

### 4. 添付資料

- 4-1) BRL 社 Alison Hiller 氏からの E-メール (2006 年 10 月 31 日付) (和訳付)
- 4-2) 米満特任教授からの質問に関する BRL 社の回答 (2006 年 11 月 3 日付) (和訳付)
- 4-3) BRL 社 Alison Hiller 氏から米満特任教授ならびにディナベック社 岩崎仁 動物実験室長に回答された、本被験薬生産に使用したマスターセルバンク、マスターウイルスバンク (製造委託：ディナベック株式会社、つくば市) に対するマイコプラズマ否定試験に関するコメント (2006 年 11 月 22 日付、岩崎氏からの解説付)
- 4-4) 本遺伝子治療臨床研究被験薬生産におけるマイコプラズマ否定試験関連文書
  - (4-4-1) 該当試験リスト (BRL 社より送付：九州大学委託分 2 試験)
    - (4-4-1') 被験薬および被験薬生産関連試料に関するマイコプラズマ否定試験一覧  
(九州大学にて作製)
  - (4-4-2) GMP 製造ロット (被験薬ロット：M0209.100911、実生産細胞ロット：M0204.100912) の品質検査証明書：確認年月日 2004 年 10 月 27 日付
  - (4-4-3) 試験報告書 (試験番号：J03YC52.102016)：送付年月日 2003 年 5 月 8 日付  
(試験委託：九州大学 米満吉和)
  - (4-4-4) 試験報告書 (試験番号：J03YC49.102018)：送付年月日 2003 年 4 月 16 日付  
(試験委託：九州大学 米満吉和)
  - (4-4-5) 試験報告書 (試験番号：J02YD92.102003)：送付年月日 2002 年 9 月 10 日付  
(試験委託：株式会社ディナベック研究所 [当時] 岩崎 仁)
  - (4-4-6) 試験報告書 (試験番号：J02YH15.102018)：送付年月日 2002 年 11 月 13 日付  
(試験委託：株式会社ディナベック研究所 [当時] 岩崎 仁)
  - (4-4-7) 試験報告書 (試験番号：J02YH16.102016)：送付年月日 2002 年 12 月 4 日付  
(試験委託：株式会社ディナベック研究所 [当時] 岩崎 仁)

(次ページへ続く)

- 4-5) 九州大学への通知書類 (2006年10月16日付) (和訳付)
- 4-6) BRL 社による見解報告書 (Position Statement) (2006年9月11日付) (和訳付)
- 4-7) BRL 社より米国 FDA へ提出された 8-Discipline (8D-0006) パッケージ書類
  - (4-7-1) カバーレター (2006年9月19日付) 3通  
(うち1通に和訳付、他は同一文面につき省略)
  - (4-7-2) 8D 計画概要書
  - (4-7-3) クライアントへの通知書類 (文案)
- 4-8) BRL に対する米国 FDA の回答書 (2006年10月10日付) (和訳付)
- 4-9) 九大病院に保存されている被験薬 GMP 製造ロット (ロット番号: M0209.100911) の追加試験報告書 (BRL からの通知受領後に実施した確認試験)  
(*Mycoplasma Peumoniae* 否定試験: PCR 法ならびに培養法、ディナベック株式会社にて実施)



## 1. 報告の概要

2006年1月31日付で厚生労働大臣より回答を得て、九州大学病院にて実施されている遺伝子治療臨床研究（課題名：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、総括責任者 前原喜彦）（以下、臨床研究）にて使用されている、被験薬（SeV/dF-hFGF2、コード：DVC1-0101）のGMP品質検査試験について、同被験薬の受託製造を実施した英国 BioReliance 社（以下 BRL 社）より2006年10月31日付にて電子メールにより通知があった。

同社からの通知の内容は、「九州大学から受託製造した被験薬（ロット番号 M0209.100911）およびその生産に使用した実生産細胞（ロット番号 M0204.100911）の品質検定試験のうち、実生産細胞に対して実施したマイコプラズマ否定試験（試験番号 J03YC49.102018 および J03YC52.102016）において、陽性コントロールとして使用した微生物が本来使用するべきマイコプラズマ（*Mycoplasma Pneumoniae*）ではなく、アコレプラズマ（*Acholeplasma Laidlawii*）であった。但しこれは、科学的また規制上の観点から受託生産物の安全性・信頼性を損なうものではない。」というものであった。

臨床研究の総括責任者ならびに分担研究者は、BRL 社から送付されてきた関係資料（米国 FDA からの本案件に関する公式見解を含む）を精査し、またいくつかの疑問点について BRL 社プロジェクトマネージャー Alison Hiller 氏へ質問と確認を行った。その結果、同社の見解報告書は妥当性があり、また米国 FDA も同意見であること、本被験薬生産に使用したマスター・セルバンク（ロット番号 M0009.100550）、マスター・ウイルスバンク（ロット番号 M0204.100747）にもマイコプラズマ否定試験が実施されているが、これらは本案件に該当しないことを確認した。さらに本件発覚後に実施された九州大学病院における被験薬（SeV/dF-hFGF2）と同一ロットの抽出サンプルに対するマイコプラズマ否定追加試験においてもマイコプラズマは検出されなかった。

以上から、今回の案件については被験薬（SeV/dF-hFGF2）の科学的、また規制上の観点から安全性・信頼性を損なうものではないため、総括責任者と分担研究者は臨床研究の継続に支障はないと判断した。

## 2. 経過と判断

### (1) 本臨床研究の経緯と進行状況

本臨床研究は、九州大学医学部倫理委員会（および諮問機関である同遺伝子治療臨床研究審査専門委員会）、厚生科学審議会科学技術部会（および同末梢性血管疾患遺伝子治療臨床研究作業委員会）にて審議、実施を承認された。

2001年8月17日付	九州大学医学部倫理委員会へ臨床研究実施計画を申請
2002年9月27日付	同倫理委員会、臨床研究実施計画を承認
2002年10月28日付	厚生労働省・文部科学省へ臨床研究実施計画を申請
2006年1月31日付	厚生労働大臣より臨床研究実施計画の承認が通知

厚生労働大臣の実施承認を受け、2006年4月より被験者のリクルートを開始。2006年12月1日現在、九州大学病院先進医療適応評価委員会にて適格と判断された症例は1例であり、同例は同7月4日に被験薬投与を受けた。本例は現在外来観察中であるが、特に重篤な有害事象の発現等は認めていない。

本臨床研究の経過については、2006年10月17日付で、開始後6ヶ月の中間報告を九州大学倫理委員会等に文書にて行った。被験者に重篤な有害事象が認められない場合は、厚生科学審議会に対し、臨床研究開始1年目の報告を2007年4月をメドに行う予定である。

### (2) 被験薬(SeV/dF-hFGF2、コード:DVC1-0101)のGMP生産の経緯

**(添付資料4-4:被験薬および被験薬生産関連試料に対して実施されたマイコプラズマ否定試験等関連書類を参照)**

九州大学病院の遺伝子治療臨床研究にて使用されている被験薬は、外部研究協力者である株式会社ディナベック研究所（当時：現ディナベック株式会社、茨城県つくば市）の委託により英国BioReliance社（以下BRL社）において生産されたマスターセルバンク（master cell bank: MCB）およびマスターウイルスバンク（master virus bank: MVB）の一部を使用し、九州大学の委託のもとに以下の経緯で生産された。

なお本被験薬生産には、細胞、シードウイルス共にワーキングバンクは作製されていない。

被験薬生産に使用されたMCB（ロット番号：M0009.100550）ならびにMVB（ロット番号：M0204.100747）は、2002年に英国BRL社にて製造され、それぞれ2002年6月27日、2002年10月19日に同社にて分注・保存された。その品質検査項目として、それぞれに対



してマイコプラズマ否定試験が英国 BRL にて実施され、陰性であることが報告されている。  
(詳細は添付資料 4-4-1'一覧表を参照)。

九州大学病院の臨床研究において使用されている被験薬生産は、これら MCB と MVB のそれぞれ一部を使用して 2002 年から 2003 年にかけて英国 BRL 社において実施され、最終生産物が被験薬として最終的に 2003 年 3 月 25 日に所定のバイアルに分注された(添付資料 4-4-2) (最終生産物ロット番号: M0209.100911)。またこれと同時に、最終生産物の生産に使用された実生産細胞も、品質検定試験用試料として保存された(実生産細胞ロット番号: M0204.100912) (添付資料 4-4-2)。

この最終生産物ならびに実生産細胞に対し、米国 FDA の定める GMP 規制に従った種々の検定が実施され(添付資料 4-4-2)、その結果、最終生産物の品質は同規制に準拠したものであることが確認された。これら検定試験では 2 種のマイコプラズマ否定試験が実生産細胞(ロット番号: M0204.100912) に対して実施されており(添付資料 4-4-1)、1 つはアガー寒天培養法(試験番号: J03YC52.102016、実施期間: 2003 年 4 月 3 日～5 月 6 日、添付資料 4-4-3)、もう 1 つは Vero 細胞を使用した蛍光 DNA 検出法(試験番号: J03YC49.102018、実施期間: 2003 年 4 月 8 日～4 月 14 日、添付資料 4-4-3)であった。

全品質検定試験に対し合格していることを確認の上、最終生産物が英国より空輸され、2004 年 3 月 27 日に九州大学病院に到着した。最終生産物は第一種使用規定に準拠し、九州大学病院外来棟 3 階セルプロセッシングルーム内専用ディープフリーザーに保存されている。本フリーザーは温度に異常が生じた場合に、複数の関係者へ通報されるシステムを採用しており、また臨床研究関係者が週に一度、異常の有無について確認を実施している。

本最終生産物(以下、統一して被験薬と標記)の品質検査証明書は、2004 年 10 月 27 日付け作製として、九州大学病院に送付されている(添付資料 4-4-2)。

### (3) 今回の BRL 社からの通知の受領、および報告書作成までの経緯

日本時間 2006 年 10 月 31 日、本被験薬に関し分担研究者米満吉和特任教授宛、BRL 社 Alison Hillier 氏から E-mail が送付されてきた(添付資料 4-1)。内容は、マイコプラズマ否定試験に使用する新しい陽性コントロールロットを作製する際、旧ロットのシークエンス確認検査を実施したところ、これが GLP レポートに記載しているマイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)ではなく、実際はアコレプラズマ(*Acholeplasma laidlawii*)であった、というものであった。本メールによれば、「2004 年 10 月 1 日から 2006 年 9 月 3 日に GLP レポートとしてまとめた 5 桁の試験プロトコール、ならびに 2003 年 4 月 1 日から 2006 年 9 月 3 日に GLP レポートとしてまとめた 6 桁の試験プロトコール(本被験薬を含む)に