

Figure 1 Design of JPAD-SeVAT trial.
JPAD-SeVAT: Japan PAD trial for SeV-mediated Angiogenic Therapy at Kyushu University Hospital

れ、高用量ではrSeV/dFの最大のパフォーマンスが発揮できると期待される。将来的に製剤開発を前提にしていることから、本臨床研究は外部contract research organization(CRO)のデータマネージメントによる新 good clinical practice(GCP)準拠試験として実施されており、第三者委員会による厳密な適応決定を実施していることから、複数回の血行再建術の結果、他に治療法がない症例が選択される傾向にある。被験者の正式なリクルートは2006年4月より開始されている。

(3) 症例提示

CROによりデータ仮固定が終了した第1例目の症例を提示する(FIG. 2A, 1カ月目まで)。

症例(登録番号102)は59歳男性で、右のCLIであり安静時疼痛が存在するが、虚血性潰瘍なし。3度のバイパス手術が実施されているが、いずれも閉塞しており、遺伝子治療の適応評価のため紹介となった。血管造影上、右総腸骨動脈高位より腸骨-大腿動脈全長が閉塞し、右下肢の血流は腰動脈からの側副血行路により唯一開存する深大腿動脈を経由して下肢を栄養。右膝窩動脈も閉塞しており、側副血行路により右腓骨動脈の末梢1/2のみ開存が認められる(FIG. 2B)。血管造影上はさらなる血行再建も不可能ではないと考えられたが、4度目の閉塞の可能性が高く、バイパス閉塞時には下肢切断に至る可能性も高いため、遺伝子治療の適応とされた。2006年7月4日に投与が実施された(FIG. 2C)。

投与後の経過は順調であり、重篤な有害事象の発生は認めていない。データ仮固定が終了している1カ月後のデータでは、最大歩行距離は約50%改善し、血管造影上、新たに描出される血管を認める(FIG. 3)など、最低用量にも関わらず10種の評価項目中4項目で改善が得られている。

ただし現時点ではまだ症例がわずかであり、観察期間も短いため、特に安全性に留意しつつ慎重かつ速やかに臨床研究を進めていく計画である。

おわりに

初期にセンセーショナルに喧伝された血管新生療法は、臨床評価を受けることにより、その問題点も明らかになってきた。しかしそれは、ようやく地に足を付けた評価が始まったということであり、今後次第にその効果と限界、そして明確な適応が明らかになってくるものと考えられる。

特にCLIは、血行再建不能例に関しては悪性腫瘍と同等な死亡率を示すことから、米国では「un-met medical needs」として捉えられている。その意味からも血管新生療法への期待は大きい。蛋白治療、遺伝子治療だけでなく細胞移植療法も、この観点から厳密なプラセボ対照試験を行い、臨床現場での意味づけを明確にすることによって、初めてその真価が明らかになるであろう。

最近TASC IIが発表されたが、今後の改訂において、血管新生療法がエビデンスレベルAのfirst line治療とし

Case 102	59 yo, male
Diagnosis : Arteriosclerosis Obliterans of Rt. Lower extremity - Fontaine III, Rutherford II-4	
History : IC has been conscious since 1998. He underwent bypass surgery 3 times; however, all grafts were obstructed, and followed as an outpatient with medication. Recently, he feel rest pain, and therefore, admitted to Kyushu University Hospital to be involved as a possible candidate of SeVAT trial.	
Past history : 1999 Aorto-rt. Femoro- popliteal (BK) bypass 2000 Rt. Femoro- popliteal (BK) bypass 2002 Rt. Femoro- peroneal bypass Smoking : 30/day, 40 yrs (already seccessed) Hypertension	



Figure 2 Case report of the first patient (Case 102) for SeVAT trail.
A: Summary of clinical history
B: Angiogram (pretreatment)
C: Panels indicating vector preparation (left), preparation for injection (middle), injection procedures (right).

A | B
— |
C |

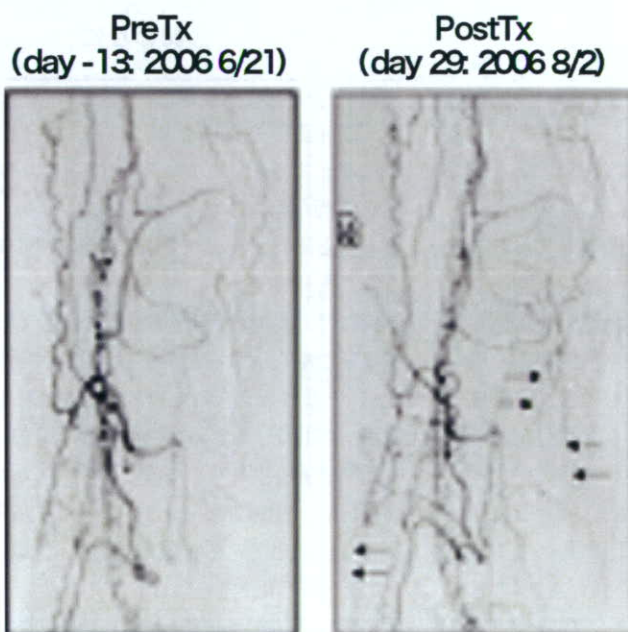


Figure 3 Angiograms pre- and post-treatment by SeV/dF-hFGF2. Arrows indicate newly visible blood vessels.

て認知される日が来るのは、そう遠くないかもしれない。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani 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.
- 4) 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**: H173-H182.
- 5) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada N et al: Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis *in vivo*: role of PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res*, 2004, **94**: 1186-1194.
- 6) Tani 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 米満吉和：血管新生因子：bFGF/FGF-2塩基性線維芽細胞増殖因子。脈管学，2006，**46**：297-304.
- 10) 藤井孝明，米満吉和：遺伝子治療bFGF/FGF-2による血管新生因子の階層的発現制御機構。Angiology Frontier，2006，**5**：19-24.

Cytokine-induced Angiogenesis as a Therapeutic for PAD: Current Status and Future Directions

Yoshikazu Yonemitsu,^{1,2} Hiroyuki Ito,³ Hiroyuki Inoguchi,³ Toshihiro Onohara,³ and Yoshihiko Maehara³

¹Department of Gene Therapy, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²Operating Unit for Clinical Trials for Gene Therapy, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Key words: peripheral arterial diseases, intermittent claudication, critical limb ischemia, angiogenesis, recombinant Sendai virus

Therapeutic angiogenesis has been an attractive option to treat patients with intractable peripheral arterial diseases (PAD). A number of clinical studies have been performed, yet limited outcomes have been reported in phase II multicenter, placebo-controlled studies, even though phase I studies showed promising results. We summarize the current status of the clinical studies for cytokine-induced therapeutic angiogenesis, and discuss what needs to be addressed for success in this field. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 491-497)

血管の再生

血管再生医学の夜明け: 近づく実用化

編著

森下 竜一

大阪大学臨床遺伝子治療学教授

真興交易株式会社医書出版部

第 3 章

血管新生增殖因子

1

線維芽細胞増殖因子

血管新生 (angiogenesis) とは、既存の血管から新たな血管網が形成される一連の病態生理学的現象である。成体において血管新生は、生理的には胎盤形成期と創傷治癒過程でのみ観察される。一方、個体発生期において認められる血島 (blood island) から原始血管叢 (primary vascular plexus) の形成には血管形成 (vasculogenesis) というプロセス、血管構成細胞の血管芽嚢嚢へ の取り込みによる構造的な形成 (arteriogenesis) の形成プロセスにおいて、後期になると「発芽血管新生 (sprouting angiogenesis)」ならびに「陥入血管新生 (invasusceptive angiogenesis)」という形態の血管新生過程が観察され、以後間葉系細胞 (主に線維芽細胞、周皮細胞、血管平滑筋細胞など) を介したりモザイク過程を経て、やがて動脈、毛細血管、リンパ管系へと高次分化を遂げる。

これらの血管構成細胞の発生、分化、そしてリモデリング過程には、数多くの血管新生因子群 (angiogenic growth factors) が関与することが知られており、個体発生期において個々の血管新生因子は、その発現時期 (時間的制御) として発現部位 (空間的制御) において、その発現が厳密に制御されている。したがって、そのいずれかが破壊すれば血管構形成の破綻を招くことは容易に想像できる。

線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) は、最も早く発見された血管新生作用をもつ分子であり、他の血管新生因子と異なり間葉系細胞にも多様な作用を誘発する。

本節では、この FGFファミリーとそのシグナル系の概略を解説し、特に

FGF-2/FGF (広義性 FGF) における各体内での血管新生作用のメカニズムについて述べる。

1. FGFファミリーの概略

1) 遺伝学的特徴

2007年現在、25種類のFGFが発見されている (既述にはヒト FGF-19はマウス FGF-15のオルソログとらえられている)。最近発見された2種を除いた23種のヒトFGFの進化系統樹は図1aのごとくであり、遺伝子進化的には7つのサブファミリーに分類される¹⁾。一方、これまで発見されている4種のFGF受容体 (FGFR1-4) は、遺伝学的にすべて同一系統の進化を選んだと考えられている。

2) シグナル伝達系

FGFRは細胞質内にチロシンキナーゼドメインをもつ典型的増殖因子受容体であり、²⁾ 量体形成により双方がシグナルを伝達される³⁾。リガンドであるFGFならびにその受容体、そして相互の結合様式はヘパリンを要する点など類似している (図1b)⁴⁾。

リガンドと受容体の組み合わせによりやややや作用の違いはあるものの、

FGFRのシグナルは、1) Ras/Raf/MAPK系による転写促進、2) PI3K/Akt系による抗アポトーシス作用、3) 蛋白リノベーゼやシキナーゼ (PKC) を介した細胞骨格構築変化の3種に大別される (図2a)。これに加え、われわれは最近 FGF-2/FGFR1系が PDGFR-AA (血小板由来増殖因子A鎖ホモダイマー) を介して、間接的に間葉系細胞における bFGF-2の血管新生作用に必須であることを明らかにした⁵⁾。これについては後述する。

FGFのシグナル伝達系と相互作用するシグナル系として、Wnt/*Frizzled*/

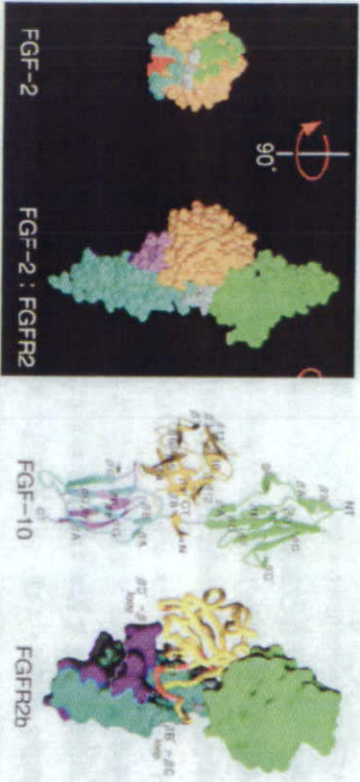
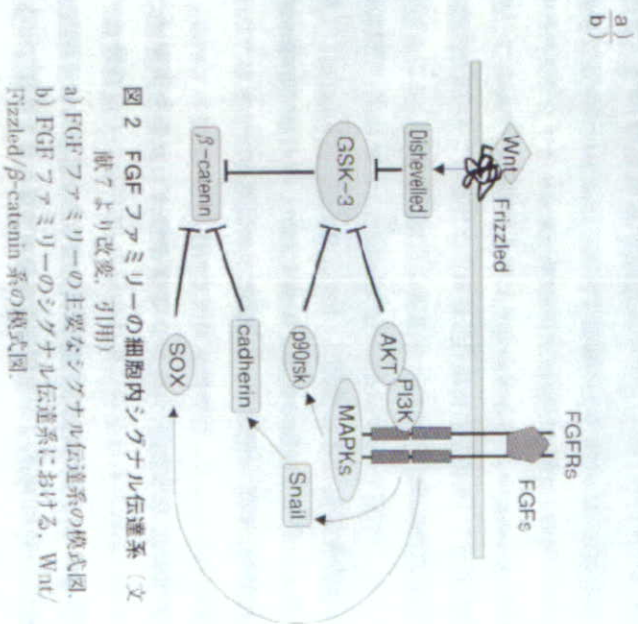
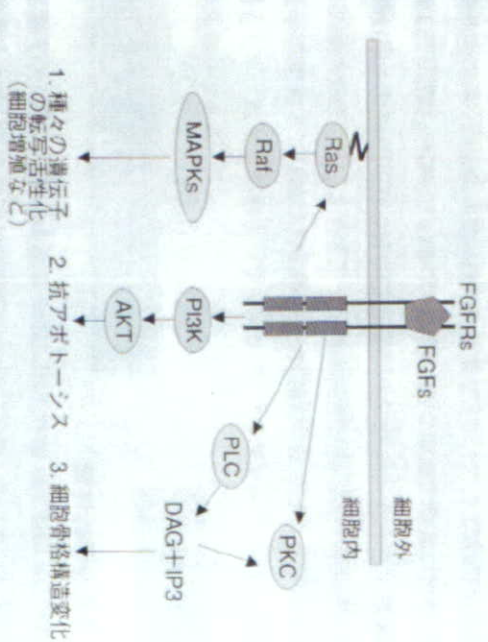


図1 FGFファミリーの分化と立体構造 (リカンク/受容体)
a) FGFファミリーの遺伝学的進化系統樹 (FGF-23までを記載) (文献2より引用). b) FGF-2/FGFR2と FGF-10/FGFR2bの結合様式の結晶構造 (左: 文献4, 右: 文献5より引用).



β -catenin系が注目されている。Wnt/Frizzled/ β -catenin系シグナルはがんの増殖・進展に重要であることが明らかになってきているが、最近では幹細胞の分化に重要であることも明らかになってきている。FGFシグナル系は種々のレベルで、特にGSK-3、 β -cateninをターゲットとしてWnt/Frizzled/ β -catenin系を制御することから(図3b), 細胞分化においても重要な分子群である。

2. FGF-2の特徴

1) 分子生物学的特徴

ヒトFGF-2蛋白は151個のアミノ酸からなる等電点蛋白、分子量18kDの一本鎖ポリペプチドで、ヘパリンへの結合能力があり、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、そのメカニズムははたらく不明であったが、ナリウム/カリウムATPアーゼの α subunitに結合することによる能動輸送であることが確認された。したがってFGF-2の細胞外分泌は、ウロパイン/インジキシンなどにより阻害に阻害される。

2) FGF-2の生体における作用

FGF-2は何々の間葉系細胞の増殖を促進するか、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、管芽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、動物個体組織での作用も確認されている。

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。われわれ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¹⁾。FGF-2の遊離にはFGF-BPやYFR61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²⁾。FGF-2の高発現時における生体への作用は十分に明らかではないが、

ヒト冠状動脈内への大量の蛋白投与の結果によると、一時的な蛋白尿、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³⁾。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血管と軟骨異常症のみであった⁴⁾。さらにFGF-2蛋白質製剤は、現在、科研製薬から骨髄治療剤として市販されており(フイブラスト「スズレー」)、すでに人体への多数の投与実績がある。

3. FGF-2を用いた血管再生療法

血管新生因子蛋白あるいは遊離因子による血管再生療法は、血管の狭窄あるいは閉塞に際して組織あるいは臓器の虚血性障害に対して、血管新生因子の局所投与を増加させることにより局所に新しい代償的血管を形成させ、側副血管路の獲得により虚血組織への血流を回復し、虚血状態から救済することを目的とするものである(いわゆるtherapeutic angiogenesis: 治療的血管新生、血管新生療法)。対象となる疾患は、虚血性心疾患、下肢閉塞性動脈硬化症が挙げられる。実験的虚血性心疾患モデルや下肢虚血モデルに対する血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)、FGF-2、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などの血管新生因子蛋白療法、遠隔投与治療の有効性は、枚挙にいとまかないほど多数報告されており、すでに多くのマウスモデルは世界中で臨床的評価が開始されている。

1) 血管再生療法における重要な視点: 「機能的」血管新生と「病的」

血管新生

よく誤解されることであるが、虚血臓器を救済するための重要なポイントは、「血流に富みすぎる血管新生をいかに効果よく誘導するか」であり、「血管径の増加→血流の増加」という知能的な議論は必ずしも正しくない。実際、

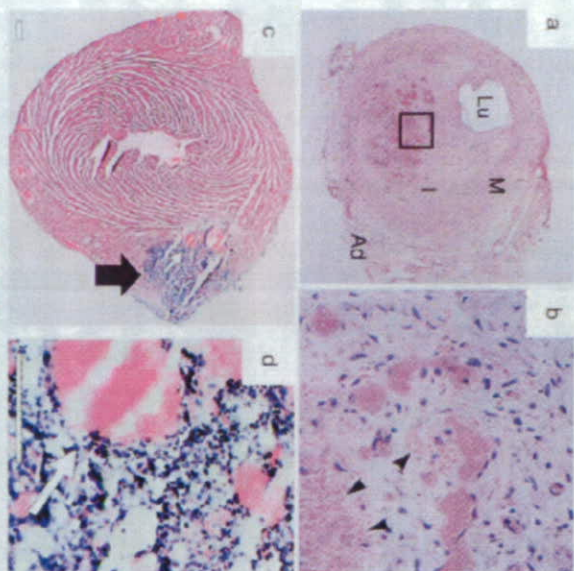


図3 VEGF遺伝子導入により惹起される異常構造をとる血管網
 aとb. ウサギ頸動脈にヒトVEGF165遺伝子を導入し、4週後に観察された異常血管網(文献15より改変、引用)。a) 高度な内腔肥厚内に、血管腫様の構造をとる接細胞血管網が形成されている。Lu: 血管内腔, M: 中膜, I: 肥厚内腔, Ad: 外膜(×40)。b) aの閉み部分の強拡大。血管腫様の構造の周辺に多量の赤血球の漏出を認める(矢印)(×160)。cとd. ヲウズ心筋へヒトVEGF遺伝子を導入した線維芽細胞を移植した際に認められた異常血管網(Lee RJ, et al: Circulation 102:898-901, 2000より改変、引用)。スケールバー=300 μm。c) 左心室壁に形成された血管腫(矢印)。d) 血管腫の強拡大。

外来性に血管新生因子を投与した際、正常の生体では通常みられない血管腫のような複雑な血管網を形成することがある。このような現象は最初BanaiらがFGF-1で報告し¹⁹⁾、VEGFについてはわれわれが最初に報告した¹⁰⁾。

このような奇妙な微小血管増生には必ずといっていいほど赤血球の漏出を伴っている(図3)。これは血管壁の構築がカールズになっていることを示唆しており、例えば腫瘍血管新生や糖尿病網膜症において病理学的によくみられ

る構造である。形態学的には、高頻度に周皮細胞の脱落や巨血などが認められ、明らかに通常の血管の形態とは異なる。これらの血管新生因子の過剰発現は少なくとも「生理的な血管を導く」とはいえず、さらに生理的な血流を十分伴うか否かについても議論が残る¹⁰⁾。

そのため、われわれは10数年来、このような血管の形成を「病的血管新生: pathological angiogenesis」と呼び、生理的な血管を導き生理的な血流を伴う「機能的血管新生: physiological/functional angiogenesis」と区別している(最近、病的血管新生という用語を、疾患に伴って発生してくる新生血管を指している研究者が散見されるが、これは定義からすると正しくない)。

2) FGF-2による機能的血管新生過程の多段階的・階層的制御

われわれはこれまで、機能的血管新生を誘導するには、代表的血管新生因子であるVEGFは血管新生に必須であるものの、発現レベルは低値に抑えられるべきであること¹⁷⁾、同様にHGFも必須であること¹⁸⁾を明らかにしてきた。しかもこれらの内因性血管新生因子は、FGF-2の下流で機能することを証明した^{11,16)}。

①PDGF-AA/PDGF α /p70S6Kオートクライシグナル系

このFGF-2依存性VEGF/HGF誘導メカニズムを検討した結果、PDGF-AA/PDGF α /p70S6Kシグナル系が重要であることを見出した¹⁰⁾。重要なことは、特にこのPDGF-AA/PDGF α /p70S6Kシステムは血管内皮細胞ではなく、血管平滑筋/周皮細胞/線維芽細胞において必須であることは注目に値する。つまりこれら間葉系細胞から分泌されるVEGF、HGFという血管新生因子の発現制御が、PDGF-AAという血管内皮細胞に作用しない増殖因子で厳密に制御されているわけである。これまで、PDGF-AAは増殖因子であるにもかかわらず平滑筋細胞への増殖・遊走活性はほとんどなく、その生物学的機能についての位置づけは不明であったが、われわれの研究により「血管新生因子の発現制御システム」としての機能が浮かび上がった。

12 血管内皮細胞 (VEGF-C/VEGFR3) と周皮細胞 (PDGF-BB/PDGFRβ) に
よるパラクラインシグナル系

FGF-2はリンパ管新生因子である VEGF-C を誘導し、血管新生のみならずリンパ管新生を誘導することが報告されている¹⁰⁾。一方 VEGF-C の受容体である VEGFR3/PLT α 1 の活性化中は、微小血管の破壊、出血をきたすことも報告されているが¹¹⁾、VEGFR3 の血管新生における機能は不明である。われわれの重症下肢虚血マウスモデルでは、VEGF、HGF、PDGF-AAA が FGF-2 投与 1 日目をピークに発現が増強するが、VEGF-C とその受容体 VEGFR3 は血流回復が済んだ後になる 7 日目がピークとなる。したがって発現時期を考慮すれば、VEGF-C は血管新生の成熟期に関与する可能性が示唆される。

われわれは赤細胞マタリ ニックを経て、VEGF-C の発現増強と期を一にして肉芽細胞の PDGF-BB の発現が増強されること、VEGFR3 の中和抗体である AFL-1 の投与により PDGF-BB の発現が低下、さらに AFL-1 および PDGF-BB の中和抗体投与により、FGF-2 の改変効果は消失することをいい出した (投稿中)。すなわち、FGF-2/PDGFR-AAA/VEGF-HGF システムは血管新生初期、FGF-2/VEGF-C/PDGFR-BB システムは血管新生後期に機能し、機能的血管新生を担っていることが明らかになった。

13 FGF-2 が間葉系細胞で活性化する NF- κ B および PKC：炎症性ケモカイン MCP-1 の機能

われわれは最近、車鼠マウスマモデルの遊走、浸潤を抑制する炎症性ケモカインである MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) が FGF-2 依存性血管新生に関与することを見出した¹²⁾。MCP-1 のもつ重要な機能として、最も強力な「arteriogenesis」誘導因子であることが明らかになっている。MCP-1 は腫瘍壊死因子 (TNF- α) などの炎症性サイトカイン (proinflammatory cytokine) によって、血管内皮細胞、周皮細胞などの間葉系細胞、平滑筋などの多様な細胞より分泌されることは広く知られてい

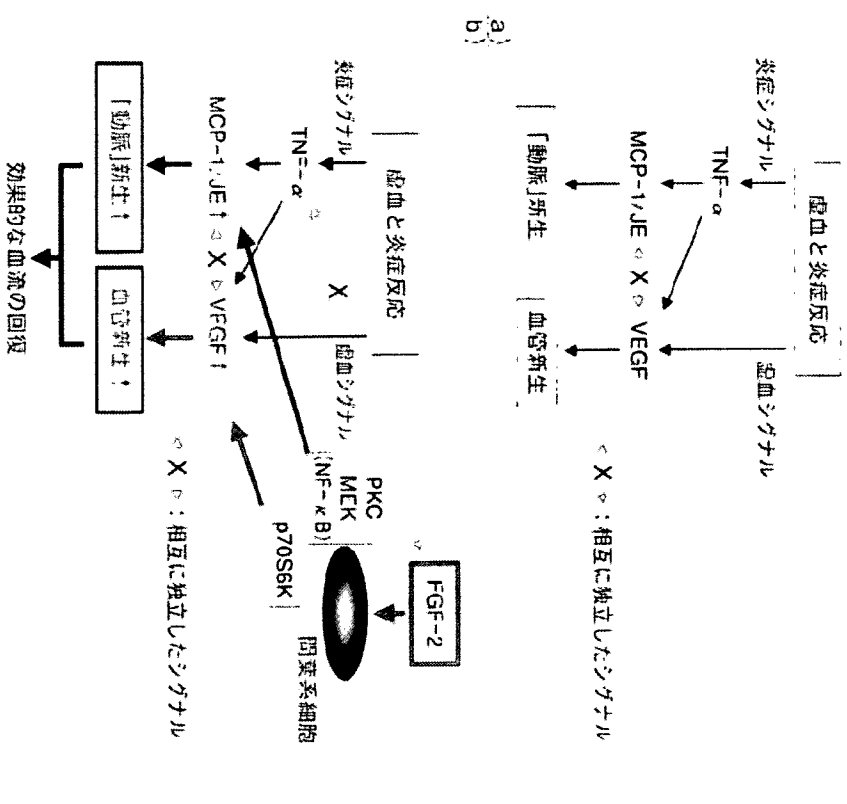


図 4 虚血時における適応性血流増加/FGF-2 依存性血管新生と、その際に誘導される MCP-1 (炎症性シグナル/arteriogenesis「動脈新生」) と VEGF (血管新生) の役割
a) 適応性血流増加における MCP-1 と VEGF の役割。虚血により VEGF が誘導される。一方、炎症反応による TNF- α の誘導を介し、MCP-1 と VEGF がさらに誘導を受ける。両者は互いの発現には影響せず、独立して「動脈、新生と血管新生を誘導することにより、適応性の血流回復に寄与する。b) FGF-2 依存性血流回復においては、間葉系細胞がマターゲットとなり、それぞれ独立したシグナル系を介して MCP-1、VEGF の発現を増強する。この結果、より効率のよい血流回復が得られる。

るが、今回われわれは、FGF-2依存性MCP-1発現は間葉系細胞のみに限定して認められ、FGF-2は血管内皮細胞や単球からのMCP-1発現を誘導していることを明らかにした。FGF-2依存性MCP-1発現はEにPRC、MIEK、NF- κ B経路が関与しており、p70S6Kを利用するFGF-2依存性VEGF発現シグナルとは完全に独立している(図4)。

以上から、FGF-2は間葉系細胞を利用してMCP-1(arteriogenesis)およびVEGF(angiogenesis)の両シグナルを独立して作用させることにより、灌流効果の高い機能性血管構築に有用であると考えられる。

4. 血管新生を治療へ応用するために

以上、治療的血管新生において内因性の血管新生因子がいかに重要であるかを示す例を、FGF-2を中心に紹介してきた。これらから想定されることは、機能的な血管新生の誘導には複数の血管新生因子の協調的運動が重要であり、それらのバランスが崩れることにより病的血管新生を誘導するという仮説である。さらに各血管新生因子は、おのおのが血管新生過程の重要なパートを担っており、それらの何れかが活性低下すると血管新生因子による治療効果に歪みか出でくると考えられる。逆にテラスミド程度の弱い発現でVEGFが実験的に血流回復効果を認める理由として、他の内因性血管新生因子とのバランスが大きく崩れていないためであると考えられる。このバランスとは、薬を含まれば薬量上であり、この血管新生の「発現量」が血管新生の重要な決定因子であると考えられる。このことは、例えばVEGFの場合、2対のうち一方のレベルを破壊するだけで腫瘍死になることから容易に類推される。

以上から、治療的血管新生において発現レベルの増強は必ずしも治療効果に反映しないことが想定され、事実VEGFの場合、逆に副作用として虚血状態を増悪することが示された。われわれのスクリーニングによる、現時点

でこれら血管新生因子群の発現をバランスよく乱せできるのはFGF-2のみである。

ソックアットしても発生や血管系の構築にほとんど影響を及ぼさないFGF-2に、なぜこのような多機能性が備わっているのかについては、いまだ明らかではない。これまでわれわれが明らかにしてきたFGF-2の機能は、まさに創傷治癒に必須なプロセスであり、病理学総論における「炎症・修復反応」に関与する分子群である。想像をたくましくすれば、FGF-2は創傷治癒を効果的に促進するために生体が有しているシグナルなわけかもしれない。

血管新生過程とその病態への関与についてはいまだ不明な点が多く、また病的血管新生の分子メカニズムについてもいまだ十分に明確にはなっていない。これまでに得られた知見を総合すると、病的血管新生の発生には、おそらくは各種血管新生因子のアンバランスな発現が重要なのであろう。今後FGF-2による機能的血管新生と内因性諸因子群の関わりについて、その発現が明らかになってくると思われる。それらの情報が明らかになってくれば、より安全かつ効果的な治療的血管新生療法が可能になるのではないだろうか。

(末滿 吉和)

文 献

- 1) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386: 671-674, 1997
- 2) Itoh N, Ornitz DM. Evolution of the Tgfb and Fgffr gene families. *Trends Genet* 20: 563-569, 2004
- 3) Ikeno H, Gunn M, Dell K, et al. A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 267: 1470-1476, 1992
- 4) Pechnikov AN, Hubbard SR, Shlessinger J, et al. Crystal structures of two FGF-EGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell* 101: 413-421, 2000

- 5) Yeh BK, Igarashi M, Elisavkova AV, et al: Structural basis by which alternative splicing confers specificity in fibroblast growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2266-2271, 2003
- 6) Tsunsumi N, Yonezawa Y, Shikada Y, et al: Essential role of PDGFR α /p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR α /p70S6K during angiogenesis. *Circ Res* 94: 1186-1194, 2004
- 7) Bailey L, Ambrosetti D, Marescalet A, et al: Mechanisms underlying differential responses to bFGF signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 16: 233-247, 2005
- 8) Florjanczyk RZ, Anchin J, Baird A: The inhibition of fibroblast growth factor-2 export by cardenolides imparts a novel function for the catalytic subunit of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 273: 544-551, 1998
- 9) 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: 430-437, 2002
- 10) Kuriz A, Wang HL, Darwiche N, et al: Expression of a binding protein for bFGF is associated with epithelial development and skin carcinogenesis. *Oncogene* 14: 2671-2681, 1997
- 11) Czabarko J, Linde (Toopman ED, Aligner A, et al: A secreted bFGF-binding protein can serve as the oncogenic switch in human cancer. *Nat Med* 3: 1137-1140, 1997
- 12) Latham RJ, Chronos NA, Pike AC, et al: Intracortical basic fibroblast growth factor (bFGF-2) in patients with severe ischemic heart disease: results of a phase I open-label dose escalation study. *J Am Coll Cardiol* 36: 2132-2139, 2000
- 13) Coffin JD, Florjanczyk RZ, Neumann J, et al: Abnormal bone growth and selective transcriptional regulation in basic fibroblast growth factor (bFGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell* 6: 1861-1873, 1995
- 14) Banni S, Jahnisch MT, Cassells W, et al: Effects of acidic fibroblast growth factor on normal and ischemic myocardium. *Circ Res* 60: 76-85, 1991
- 15) Yonezawa Y, Kaneda Y, Morishita R, et al: Characterization of in vitro gene transfer into the arterial wall mediated by the Sendai virus liposomes: an effective tool for the in vivo study of arterial diseases. *Lab Invest* 75: 313-324, 1996
- 16) Carmeliet P: VEGF gene therapy: stimulate or angiogenesis or angioma genesis? *Nat Med* 6: 1102-1103, 2000
- 17) Masaki I, Yonezawa 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
- 18) Onimaru M, Yonezawa Y, Tamii 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* 91: 923-930, 2002
- 19) Kubo H, Cio R, Brakenhahn Z, et al: Blockade of vascular endothelial growth factor receptor 3 signaling inhibits fibroblast growth factor-2-induced lymphangiogenesis in mouse cornea. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 8868-8873, 2002
- 20) Kubo H, Fujitawa T, Jussila L, et al: Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 96: 516-523, 2000
- 21) Fujii T, Yonemitsu Y, Tamii M, et al: Non endothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for bFGF-2-mediated therapeutic neovascularization-critical role of the inflammatory arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2183-2189, 2006
- 22) Carmeliet P, Ferrera A, Breier G, et al: Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380: 435-439, 1996

遺伝子治療臨床研究実施計画の 変更報告及び重大事態報告について

(変更報告)

- 九州大学病院 P1
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

- 筑波大学附属病院 P15
課題名：同種造血幹細胞移植後の再発白血病に対するヘルペスウイルス・チミジン
キナーゼ導入ドナーTリンパ球輸注療法の臨床研究

(重大事態等報告)

- 九州大学病院 P40
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

別紙様式第2

遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書

平成19年7月23日

厚生労働大臣 殿
(文部科学大臣)

実施施設	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 (電話番号: 092-642-5466(消化器・総合外科医局) (FAX番号: 092-642-5482(消化器・総合外科医局))
	代表者 役職名・氏名	九州大学病院病院長・ 水田祥代 (職印)

下記の遺伝子治療臨床研究について、別添のとおり実施計画を変更したことを報告します。

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、パージャール病)に対する血管新生遺伝子治療臨床研究	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 前原 喜彦

別紙様式第2の別添

遺伝子治療臨床研究実施計画変更報告書

受付番号	(初回申請年月日)
	平成 14 年 10 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、パージャージャー病）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 18 年 1 月 31 日（承認日）から 平成 21 年 1 月 31 日（36ヶ月間）まで

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、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
	砂川 賢二	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
	伊東 啓行	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	九州大学大学院医学研究院・循環器内科学 ・准教授	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・特任教員 ・教授	ベクターの設計、構築、管理、基礎分野からの研究計画の推進
協力研究者	(九州大学病院) 本田 浩（放射線科・教授） 井口 博之（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）、 鬼丸満穂（病理病態学・助手）、高野壮史（大学院生）、 吉田久美（大学院生）、 (外部研究協力者) 永井美之（理化学研究所感染症研究ネットワークセンター長・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） 長谷川護（ディナベック株式会社・代表取締役社長）		

<p>研究の目的</p>	<p>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進行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（主要エンドポイント）、2）臨床効果を示すと考えられる投与量を決定する（副次エンドポイント）ことを目的とする。</p>		
<p>対象疾患</p>	<p>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（血管拡張剤および／または抗血小板剤）で改善が見られない患者、かつ40歳以上の症例。</p>		
<p>変更時期</p>	<p>九州大学遺伝子治療臨床研究審査専門委員会により平成19年7月11日に審議（書面会議）され、審議結果が同7月20日付で九州大学医学研究院等倫理委員会委員長へ報告された。 九州大学医学研究院等倫理委員会は平成19年7月23日に計画改訂案が審議・承認され、同日付で総括責任者へ審議結果が通知された。 本改訂は同日（平成19年7月23日）以降、同意取得を実施された被験者に適応される。</p>		
<p>変更内容</p>	<p>実施計画書における事項</p>	<p>変更前</p>	<p>変更後</p>
	<p>(1) 人事異動に伴う変更</p>	<p>別紙1「新旧対照表」のとおり</p>	<p>別紙1「新旧対照表」のとおり</p>
	<p>(2) 語句の統一、整備</p>	<p>別紙1「新旧対照表」のとおり</p>	<p>別紙1「新旧対照表」のとおり</p>
	<p>(3) 検査スケジュールの変更</p>	<p>別紙1「新旧対照表」、別紙2「検査内容変更概要」および別紙3「検査項目一覧表」のとおり</p>	<p>別紙1「新旧対照表」、別紙2「検査内容変更概要」および別紙3「検査項目一覧表」のとおり</p>
	<p>(4) 除外項目改訂</p>	<p>別紙1「新旧対照表」および別紙4「除外項目改訂について」のとおり</p>	<p>別紙1「新旧対照表」および別紙4「除外項目改訂について」のとおり</p>
<p>変更理由</p>	<p>(1) 人事異動に伴う変更 発令された人事異動を踏まえ、適切に変更した。</p> <p>(2) 語句の統一、整備 実施計画書に数カ所の誤記、不一致な表現があったため、訂正・統一を図った。</p> <p>(3) 検査スケジュール変更 スクリーニング検査を被験者の利便性と侵襲の最小化に配慮して柔軟に実施できるように一部変更した。今回の検査スケジュール変更は軽微なものであり、変更に伴う科学的・倫理的問題は生じない。</p>		

	<p>(4) 除外項目改訂： 改訂内容は血管新生療法臨床試験における最新の知見を取り入れ、より基準を明確化したものであり、また今般の除外基準改訂により従来の基準と比較して緩和された部分はないことから、科学的・倫理的に問題はない適切な改訂であると判断した。</p>
今後の研究計画	新たな実施計画書及び検査スケジュールに従い臨床研究を実施する。
これまでの研究結果及び研究結果の公表状況	<p>1. これまでの研究結果 平成 18 年 4 月 1 日より被験者登録を開始した。ステージ 1 では登録番号 101-105 (102 は 101 の再登録であるため、計 4 名) の登録が実施され、102、103、105 の 3 例が先進医療適応評価委員会にて適格と判断され、臨床研究薬投与が実施された。3 例目 (登録番号 105) の投与日より 28 日目までの臨床経過と各種データが CRO により仮固定され、提出された症例報告書をもとに、平成 19 年 6 月 26 日に先進医療適応評価委員会による安全性評価に基づくステージアップ可否判定が行われた。</p> <p>仮固定時までには 3 例に認知された有害事象は計 24 件 (うち重篤な有害事象 1 件：登録番号 103) であった。重篤な有害事象 1 件を除く 23 件はいずれも軽度のものであり、臨床研究薬投与との因果関係が積極的に疑われるものは無いと判断された。登録番号 103 に見られた重篤な有害事象 (患肢下腿切断) に関する各種データも再度検討され、臨床研究薬との因果関係は必ずしも否定はできないが、医学的・科学的な観点から総合的に考察して、その可能性は低いと考えられることが再確認された。</p> <p>以上から先進医療適応評価委員会は、本臨床研究におけるステージ 1 レベルの臨床研究薬投与量は耐容量であり、ステージ 2 へのステージアップは可能であると判断し、九州大学病院長他、関係部署へ報告がなされた。</p> <p>2. 公表状況 以下の学術集会にて、第 1 ステージの経過報告 (有害事象の発生状況等) が行われた。</p> <p>1) 第 23 回 日本 DDS 学会学術集会 (熊本) ワークショップ 2007. 6. 14-15. 2) 第 39 回 日本動脈硬化学会総会 (大阪) シンポジウム 2007. 7.13-14.</p>

(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. この報告書は、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には、その欄に「別紙 () のとおり」と記載し、別紙を添付すること。
5. 大学等にあつては、この報告書を厚生労働大臣のほか文部科学大臣にも提出すること。

別紙1. 実施計画書2版(平成18年6月27日)から3版への変更点に関する新旧対照表

旧頁(新頁)	旧実施計画書のタイトルなど	旧実施計画書の記載	改訂後の記載	修正理由
P1(P1)	①分担研究者	小野原俊博 九州大学病院・第2外科・講師	伊東 啓行 九州大学病院・第2外科・講師	異動
P1(P1)	②その他の研究協力者	九州大学病院・麻酔科・科長 教授 高橋成輔(麻酔への協力と外部評価)	削除	異動(定年退職)
P2(P2)	②その他の研究協力者	九州大学大学院医学研究科 大学院生(病理病態学) 藤井孝明(研究実施協力)	削除	異動
P7(P7) ならびに P26(P29)	5. 遺伝子治療臨床研究の対象疾患及びその選定理由 (3)当該遺伝子治療臨床研究の概要 (4)除外基準 9. 遺伝子治療臨床研究の実施計画 (2) 被験者の選定基準及び除外基準	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. 術前に担癌状態が証明されている、あるいは疑われる患者 3. 補尿病性網膜症患者 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, Cr<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及ぼすと考えられる患者、および本人ならびに家族(あるいは親族)の同意が得られない患者など、九州大学病院先進医療委員会が不適当と見なした患者	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. 虚血性潰瘍が皮下組織を越えて深部に達し、骨あるいは腱索が露出している患者 2. 喘息重積発作等、生命に関わる重篤なアレルギーを有する、あるいは既往のある患者 3. 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 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(NYHA class II-IV)を有する患者 6. 未治療の重症不安眠症(ベンゾジアゼピン系薬物療法により症状が安定している場合を除く) 7. 急性肝炎、亜急性肝炎、劇症肝炎等、進行性の肝機能障害を有する患者 8. 慢性肝炎等(臨床的に肝臓内科専門医から肝硬変と診断されている場合を除く)により、中等度以上の肝機能障害を有する患者 9. 具体的には以下の検査項目のいずれかを逸脱する患者 1) ASTあるいはALT値が、施設基準値の2.5倍以上 2) プロトロンビン時間14秒以内 3) 血清ビリルビン値が、施設基準値の2.0倍以上 4) ICG 15分滞留率 20%以内 10. 臨床的に肝臓内科専門医から肝硬変と診断されており、かつChild分類による重症度がB(中等度)あるいはC(重度)であると診断されている患者 11. 腎機能障害を有する患者(例:血清Cr>2.0 mg/dl, Cr<40ml/min) 12. 既往のあるいは治療を受けているものの炎症反応が依然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 13. 薬物誘発後慢性炎症性疾患(膠原病、慢性関節リウマチ、潰瘍性大腸炎など)を有する患者であり、かつクワシオホルリン等免疫抑制剤を投与されている患者、あるいは維持量としてステロイドを10 mg/dayを投与されている患者(但し、維持量として投与されているステロイド量が10 mg/day以下の場合、原則的に各疾患専門医の指導下に少なくとも5 mg/dayまで減量した上で、2週間以上の経過観察を実施し、炎症性疾患の増悪がないことを確認しなければならぬ) 14. 過去5年以内に悪性腫瘍の摘出手術を受けた患者 15. 最近6ヶ月以内に脳出血、脳梗塞などの既往のある患者 16. 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) 17. アルコール依存、薬物依存症患者 18. 妊娠中の女性、妊娠が疑われる女性、あるいは授乳中の女性患者 19. 免疫抑制療法を必要とする患者(臓器移植後等) 20. HIV抗体陽性患者 21. 血管新生療法に限らず、30日以内に他の治療や臨床研究に参加している患者 22. 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)の同意が得られない患者など、九州大学病院先進医療委員会が不適当と見なした患者	スチーグ11における先進医療適成評価委員会における協議、米国内専門家による意見、ならびに最新の欧米における血管新生療法を参考に改定

