末梢性血管障害の遺伝子治療

森下　竜一

はじめに

アデノシン-デアミナーゼ欠損症などの先天性疾患の治療として始まった遺伝子治療は，多因子疾患である循環器疾患や癌にも広がってきている。最近では，食生活の欧米化・社会の高齢化と共に増加しつつある動脈硬化を基礎とする虚血性心疾患，閉塞性動脈硬化症に対しても応用されている。閉塞性動脈硬化症の重症患者においては下肢切断を余儀なくされる患者も多い。このような虚血性疾患は，糖尿病患者や慢性透析患者ではより深刻で，外科的なバイパス手術や血管拡張術などの適応になる患者は少なく，実質上経過観察しかないような状況である。

血管再生療法の可能性

近年，このような閉塞血管に対する画期的な治療戦略として，血管再生による治療が提唱された(**図1**)。近年の分子生物学の進歩は，VEGF(血管内皮増殖因子)などの血管新生因子の存在を明らかにし，これらを用いた治療の可能性を示した(治療的血管新生)。1994年より米国ではVEGF遺伝子を用いた慢性閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療が始まっており，良好な効果をあげている[1~3]。血管新生活性を有する増殖因子としては，VEGFだけでなく，FGF(fibroblast growth factor)やHGF(hepatocyte growth factor)[4~6]などが報告されている。

わが国でも，国内で発見されたHGF遺伝子を用いた2001年6月より閉塞性動脈硬化症とビュルガー病患者に対する遺伝子治療臨床研究が我々の施設で開始されている。我々は安静時疼痛や虚血性潰瘍を有し(Fontaine III/IV)，他の治療法のない患者の下肢に1ヶ月ごとに2mgのHGFのnaked plasmidを筋注した(**図2**)。血管造影でHGF遺伝子投与部位に一致した有意な血管陰影の増強が確認される(**図3**)一方，0.1以上のABI(ankle brachial pressure index)改善(5人中5人：Efficacy rate = 100%)，もしくは疼痛の改善においてVAS(visual analog scale)スケールで1cm以上の改善を認めている(6人中5人：Efficacy rate = 83%)(**図4**)。また，潰瘍も25%以上改善を示した患者は，4人中3人であった(**図5**)。全11個の虚血性潰瘍のうち，25%以上の縮小を認めたのは8個(73%)であった。一方で，VEGF遺伝子治療では60%の患者にみられたと報告されている投与部位の浮腫は認められなかった。現在までの成績では，VEGF遺伝子治療より有効性が高く，安全性に優れる可能性が示されつつある。

再生された血管の長期予後についてはまだ世界的にも報告は十分でないが，ステージ1の患者での6ヶ月でのデータではよりABIの増加や潰瘍の改善をみた患者も確認できた(**図6**)。一方で，悪化を認めた患者はなく，治療後少なくとも6ヶ月では不変，もしくは，さらなる改善がみられたことより，ある程度の期間は血管が維持されていると考えられる。2002年2月より高用量のHGF遺伝子の投与も設定されたステージ2の16人の患者に対する治療も始まっている。HGF遺伝子による閉塞性動脈硬化症の治療は，来年には医薬品化に向けたマルチセンター試験が実施される予定であり，今後の結果が期待される。

より強力な血管新生療法の開発には，2つの考え方がある。一つは，大量の血管新生因子を投与することであるが，効果は確実に増強されるが，一方で副作用の可能性が高まる。もう一つの考え方は，内皮細胞の増殖作用とは異なるメカニズムで血管新生を増強させることである。我々はプロスタサイクリン合成酵素に注目した。マウス下肢虚血モデルでのプロスタサイク

大阪大学大学院医学系研究科遺伝子治療学講座

2003年1月8日受理　(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 75-80)

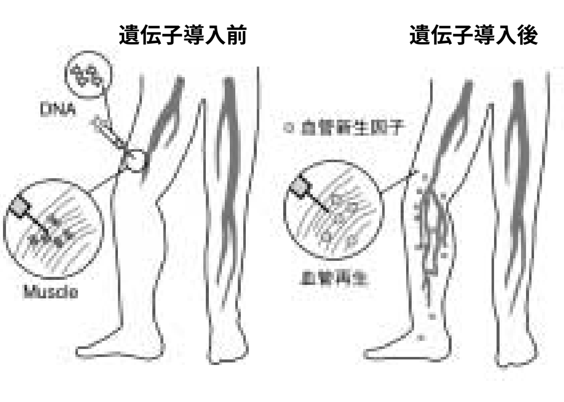

図 1　筋肉内への遺伝子導入による血管再生

図 2　HGF遺伝子治療臨床研究

図 3　第 5 症例における血管造影

＜VEGF＞

対　象：	15例	
有効性：	ABI	67%（10/15例）
	安静時疼痛	47%（7/15例）
安全性：	浮腫	60%（9/15例）

＜HGF＞

対　象：	6 例	
有効性：	ABI	100%（5/5例）
	安静時疼痛	83%（5/6例）
	潰瘍	75%（3/4例）
安全性：	浮腫	0%（0/6例）

図 4　VEGFとHGFのフェーズ I/IIa成績の比較

リン合成酵素遺伝子プラスミドの単独導入では下肢血流量の改善は弱かったが，HGFとプロスタサイクリン合成酵素遺伝子を併用した群ではHGF単独投与群よりも著明な血流改善効果がみられた。また，4 週後虚血部位（プラスミド投与部位）の筋肉を採取し，アルカリフォスファターゼ染色を行って測定した毛細血管密度も，HGF単独投与群に比較し，プロスタサイクリン合成酵素とHGF遺伝子の併用群は有意に増加していた（**図 7**）[7]。プロスタサイクリン合成酵素遺伝子とHGF遺伝子の併用が血管新生を促進する効果は，ウサギ下肢虚血モデルにおいても血管造影で確認された。また，HGFと同様にVEGFとプロスタサイクリン合成酵素遺伝子の併用群では，VEGF単独投与群より著明な血流改善効果がみられた。このことは，プロスタサイクリン合成酵素が作り出すPGI2が血管を拡張させ，血小板凝集を抑制する作用がもつため，血管新生因子と併用することで血管新生が促進されることを示している（**図 8**）。PGI2が血管を拡張させることで，血管新生増殖因子と血液が血管のすみずみにまで行き届き，より効果的に血管に作用したことが一因ではないかと推測している。

虚血性・糖尿病神経症の遺伝子治療

このような末梢での血管新生療法は，現在糖尿病で最

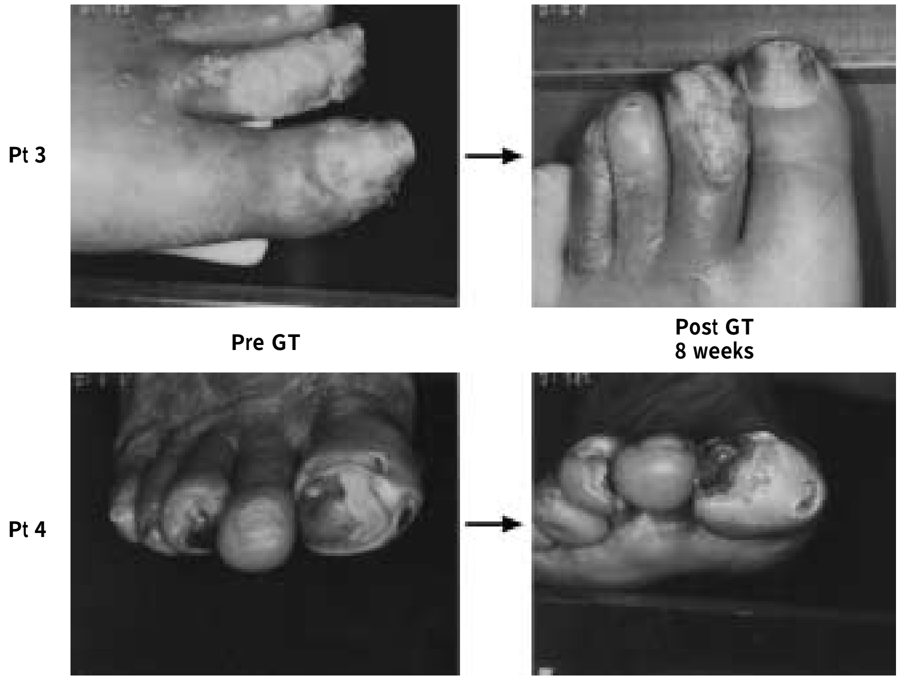

図 5　遺伝子治療 2 ヶ月後の潰瘍

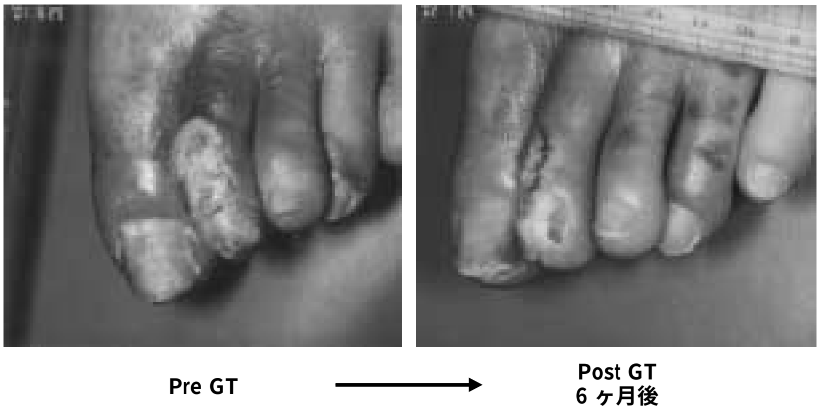

図 6　第 3 症例における 6 ヶ月後の潰瘍

も合併頻度の高い糖尿病性神経症に対する臨床応用が進んでいる。アイデアは，簡単で，末梢神経周囲の相対的血流低下により脱髄が起こることが，神経症の原因として指摘されているため，神経周囲の血管新生促進により神経症の改善が認められないかというものである。糖尿病ラットを用いて，既にタフツ大学のグループは，VEGF遺伝子導入が感覚及び運動神経伝道速度を改善することを既に報告している[8]。さらに，彼らは糖尿病患者において臨床試験（フェーズIIa）を開始し，6 ヶ月後には神経症状が改善したことを明らかにした。振動覚の閾値が改善することに加え，運動神経伝導速度の改善が認められるなど，神経症状全般の改善が報告されている。HGFに関しても，最近我々は糖尿病と閉塞性動脈硬化症の合併モデルでプロスタサイクリン合成酵素遺伝子との共導入で運動神経伝導速度が改善することを明らかにした[7]。現在，タフツ大学ではフェーズIIbの試験が行われ

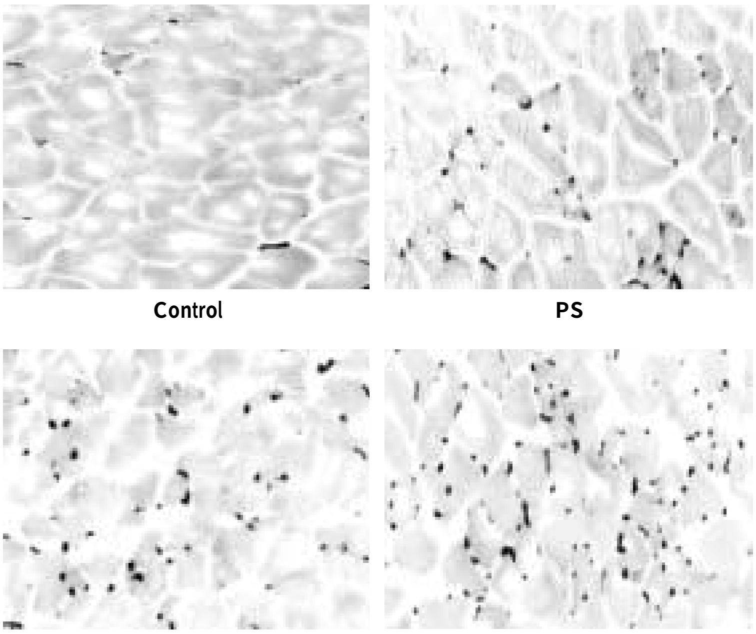

図 7

ており，今後の進展が期待される。

虚血性心疾患に対する血管再生遺伝子治療

同様の血管再生作用は，狭心症や心不全治療に有効であることは当然推測される。Isnerらは，VEGF遺伝子を用いて狭心症に対する遺伝子治療も行い，その効果も劇的であった。対象患者は5例，それぞれPTCAあるいはCABGあるいは両方の治療歴があるが，全員が狭心症による重度の生活障害をもち，もはやPTCAあるいはCABGの適応外の患者である。彼らはVEGF遺伝子500μgをMIDCABにて心筋に直接注入し，血管新生による虚血の改善を検討した。VEGF遺伝子導入により，狭心痛に対して服用するニトログリセリンの数量は各患者において劇的に減少し（遺伝子治療前：53.9+10.0tab/week，遺伝子治療後：9.8+6.9tab/week, P<0.03），血管造影においても各患者で著明な血管新生を認めた。また，SPECTにて正常血流領域の拡大，欠損部位の減少を認め，虚血性心疾患に対するこの治療の有用性を示している[9]。

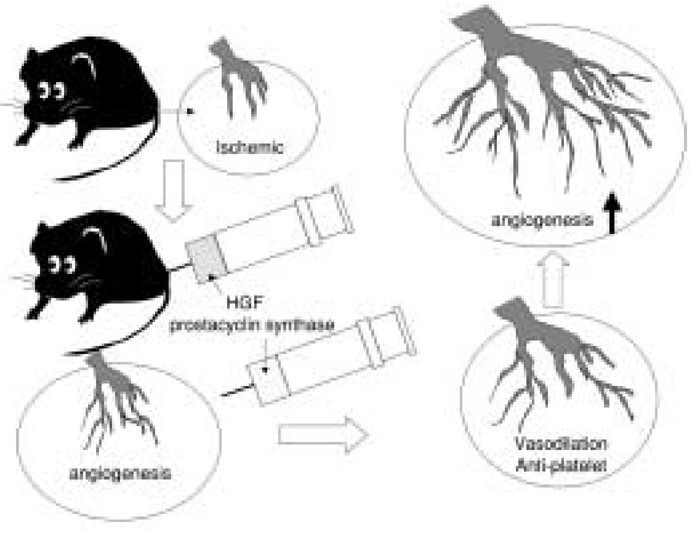

図 8

また，昨年アデノウイルスベクターでFGF4遺伝子を冠動脈内より投与した臨床試験の結果が報告された[10]。FGF4 遺伝子の単回投与によりプラセボと比較してトレッドミル運動耐用能試験で 2 倍以上の延長を 3 ヶ月時点で示したことが明らかにされた。耐用能の延長

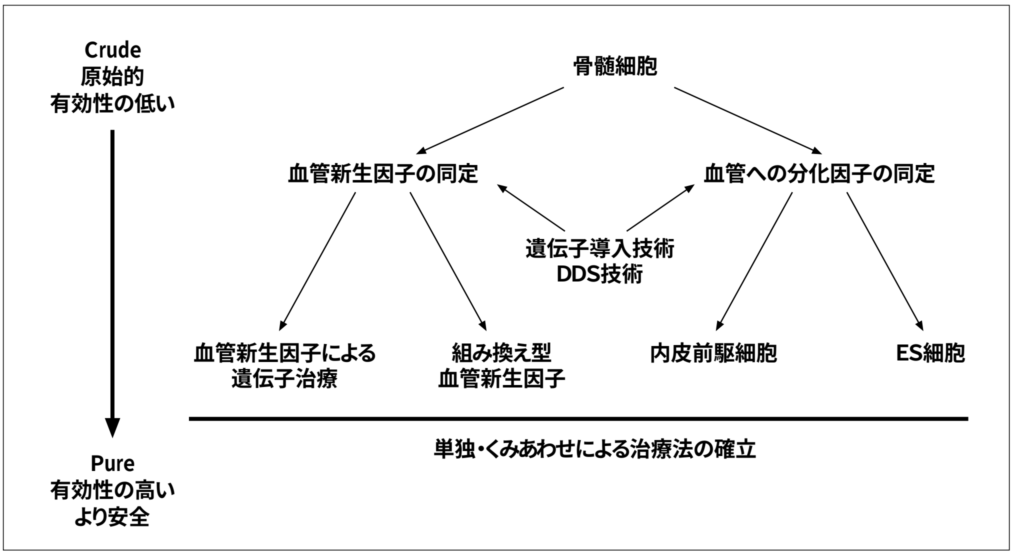

図 9

は，心臓グラフとの６ヶ月の時点とほぼ同等であり，他の既存の内科的治療法では無効であったことから，遺伝子治療の優位性を示すものとして注目された。FGF４遺伝子の臨床治験は，昨年末より米国・欧州で1000人を対象とするフェーズIIb・III に入っており，2003年の上市が予定されている。

我々も，HGF遺伝子による心不全治療の可能性を明らかにした。まずラットの心筋梗塞のモデルを作成し，直接心臓の壁にHGFプラスミドDNAを導入した[11)]。その結果，HGF遺伝子の導入は血管新生を促進し，血流を改善することを明らかにした。また，ブタ心筋梗塞モデルにHGFプラスミドをカテーテルについた針で導入し，やはり血管新生と血流改善を明らかにした。既に，心筋梗塞・狭心症患者に対する遺伝子治療臨床研究を大阪大学遺伝子治療臨床研究審査委員会に2001年１月に申請している。

血管新生遺伝子医薬の実現のためには

ウイルスベクターの安全性が未だ確立していない現状では，ウイルスを用いた遺伝子投与は実際の臨床においては使用しにくいため，プラスミドの形でも遺伝子を導入しうる筋肉は，現段階でもっとも遺伝子医薬に適していると考えられる。VEGFやHGFは分泌蛋白であるので，すべての細胞に遺伝子が導入される必要がなく，部分的に導入されるだけでも局所濃度を上げることが可能である。また，保存に関しても常温で可能で，長期保管に適しており，当面プラスミドDNAを中心に遺伝子医薬品の開発が進むと考えられる。低侵襲の血管新生遺伝子薬は，手術不適例が多いなど待機的な治療が行われていた高齢者の重症虚血下肢患者に福音をもたらすと考えられる。

しかし，血管新生療法が現実のものになるためには，まだまだ基礎的検討が必要である。特に，1)血管新生の分子機構と 2)再生医療を支える技術開発，この２点は今後最も重要である。血管新生療法の開発のためには，何故，どのように血管が形成・新生されるか，どのような因子(増殖因子や転写因子)が関与しているか，これらの基礎的疑問に答える必要がある。血管新生の分子機構が明らかになってきたが，まだまだ疑問点も多く，今後の研究が期待される。一方，再生医療を支える技術は，飛躍的な進歩がここ数年おきている。遺伝子導入技術としては，日常臨床で使用に耐えうる導入効率の高いHVJ-Eベクターなどの開発が視野に入ってきている。これからの血管新生療法は，これら基盤技術と細胞治療・遺伝子治療の融合により，日常臨床で画期的な治療になることは，間違いない。血管新生療法において，重要なことは副作用の減少と有効性の向上である。従って，**図９**に示すように骨髄細胞のようなcrude(雑多)なものから，よりpure(純化された)な治療方法へと変遷していくであろう。単に臨床

効果だけではなく，サイエンスの面から，合理的で有効性の高いエビデンスに基づいた血管新生療法の応用が重要である。そして，脳血管疾患など動脈硬化の関与する多くの難病の治療薬となることが望まれる。

文　献

1) Isner JM, Baumgartner I, Rauh G et al: Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. J Vasc Surg, 1998, **28**: 964-973.

2) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation, 1998, **97**: 1114-1123.

3) Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A et al: Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. Ann Intern Med, 2000, **132**: 880-884.

4) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M et al: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hind limb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. Gene Ther, 2001, **8**: 181-189.

5) Taniyama Y, Morishita R, Hiraoka K et al: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat diabetic hind limb ischemia model: molecular mechanisms of delayed angiogenesis in diabetes. Circulation, 2001, **104**: 2344-2350.

6) Morishita R, Sakaki M, Yamamoto K et al: Impairment of collateral formation in Lp(a) transgenic mice: therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene. Circulation, 2002, **105**: 1491-1496.

7) Koike H, Morishita R, Iguchi S et al: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by co-transfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. The FASEB Journal (in press).

8) Schratzberger P, Walter DH, Rittig K et al: Reversal of experimental diabetic neuropathy by VEGF gene transfer. J Clin Invest, 2001, **107**: 1083-1092.

9) Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. Circulation, 1998, **98**: 2800-2804.

10) Grines CL, Watkins MW, Helmer G et al: Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. Circulation, 2002, **105**: 1291-1297.

11) Aoki M, Morishita R, Taniyama Y et al: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. Gene Ther, 2000, **7**: 417-427.

Gene Therapy for Peripheral Vascular Disease

Ryuichi Morishita

Division of Gene Therapy Science, Osaka University Medical School, Osaka, Japan

HGF is a mesenchyme-derived pleiotropic factor that regulates the growth, motility, and morphogenesis of various types of cells, and is thus considered a humoral mediator of epithelial-mesenchymal interactions responsible for morphogenic tissue interactions during embryonic development and organogenesis. Although HGF was originally identified as a potent mitogen for hepatocytes, it has also been identified as one of the angiogenic growth factors. Interestingly, the presence of its specific receptor, c-met, is observed in vascular cells and cardiac myocytes. In addition the mitogenic action of HGF on human endothelial cells was the most potent, among growth factors. Recent studies have demonstrated the potential application of HGF in treating cardiovascular disease such as peripheral vascular disease, myocardial infarction, cerebrovascular disease, and restenosis after angioplasty. In this review, we discuss a potential therapeutic strategy using HGF in cardiovascular disease.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003, **43**: 75-80)