

## 生体吸収性材料からのbFGF徐放システムによる血管新生

新井 善雄<sup>1</sup> 丸井 晃<sup>1</sup> 田畑 泰彦<sup>2</sup> 米田 正始<sup>1</sup>

**要旨:** 遺伝材料を用いない増殖因子徐放システムとして、われわれはゼラチンハイドロゲルを用い、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放による虚血性心疾患、下肢虚血、胸骨治癒などに対する動物実験を行い、その有効性と安全性を確認した。このたび、虚血胸骨再生と重症下肢虚血に対する血管新生療法がすでに開始され、重症虚血性心疾患に対してbFGFと右胃大網動脈を用いたバイオCABGも近く開始される予定である。(Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 145-150)

Key words: basic fibroblast growth factor (bFGF), gelatin hydrogel, therapeutic angiogenesis, Bio-CABG

### はじめに

血管新生を促進する増殖因子の存在が明らかとなつて以来、血管内皮増殖因子(VEGF)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などによる虚血組織への治療的血管新生の可能性が示唆された。そのなかでも、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)には血管新生angiogenesisおよび動脈形成arteriogenesis(小動脈レベルの血管拡張、リモデリング)を促進する特色を持つことが知られている。

しかしながら、いずれの増殖因子も生物学的活性がきわめて短く、局所で一定期間有効な濃度を保つ(増殖因子の徐放化)には困難な側面があった。そこで、血管新生因子の徐放化を目的として、遺伝子治療や細胞移植治療などが試みられており、遺伝子治療や細胞移植治療は有効な手段であることを示唆する報告も数多くされている<sup>1-3)</sup>。しかしながら、ウイルスやプラスミドなどの遺伝材料には短期、長期的な安全性も含め、いまだ多くの課題が残されている。また、細胞移植は自己細胞を利用する点で安全性は優れているものの、十分な細胞数を確保するためには採取時に大きな侵襲を伴い、さらに、分離細胞種や移植細胞数についても十分なコンセンサスは得られていない。

われわれは遺伝子治療や細胞移植治療とは別のアプローチとして、Tabataらの開発した生体吸収性材料であるゼラチンを血管新生因子徐放システムに応用した<sup>4-15)</sup>。

### ゼラチンハイドロゲルからの徐放システム

徐放担体であるゼラチンは、血漿増量剤、外科用材料、薬物添加剤などとしての長い臨床実績を持ち、生体安全性が十分に裏付けされている。

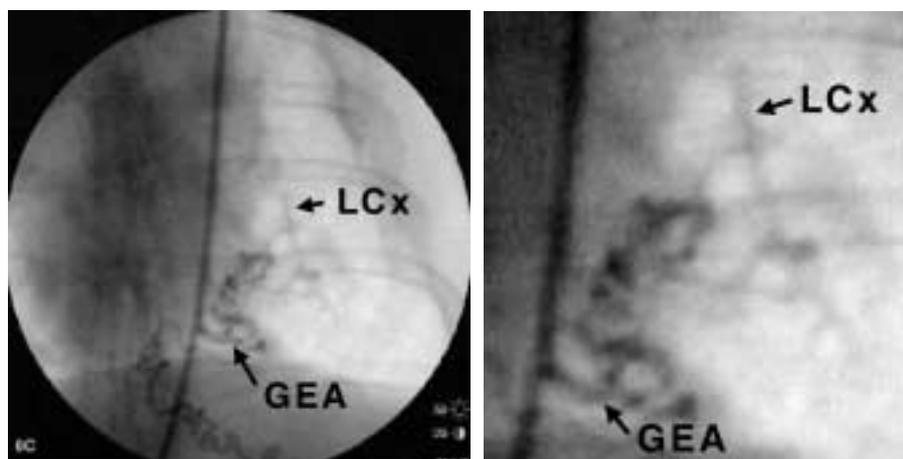
bFGF含有ゼラチンハイドロゲルの調製は、まず中性領域で分子全体が負電荷を持つ酸性ゼラチンを化学架橋して水不可溶のゼラチンハイドロゲルを作製し、これにbFGF溶液を加え室温で1時間静置する(含浸)。bFGF分子とゼラチン分子とは、主にクーロン力で結びつき、bFGFは活性を保ったままゼラチンハイドロゲル内に包含されている。ゼラチンハイドロゲルが加水分解されるにしたがい、bFGFが生体内に徐放されることとなる。bFGFの徐放期間はハイドロゲルの分解期間を決める含水率により決めることができ、含水率を変えることで徐放期間を数日から数週間にわたり、自由に調節可能である。さらに、投与形態も粒子状、シート状、ディスク状など、投与対象に応じて自由にできる利点もある。

このbFGFゼラチン徐放体による血管新生療法は、これまでに試みられた治療法に比して、安全性の高いゼラチンを局所使用することにより、ウイルスやプラ

<sup>1</sup>京都大学大学院医学研究科心臓血管外科

<sup>2</sup>京都大学再生医科学研究所

2005年2月21日受理



**Figure 1** Left circumflex coronary artery (LCx) was enhanced by the rabbit gastroepiploic artery (GEA) after undergoing “Bio-CABG”. The communication between the GEA and LCx was observed through the collateral arteries.

スミドなどの遺伝子材料なしにbFGF徐放の局所治療効果を発揮できる， 骨髄採取など，手技自体による侵襲がない， 局所使用でありbFGF血中濃度の上昇を認めず，全身の副作用がごく軽微と考えられる， 手技が簡便である，のような利点を有している。

### bFGF徐放化ゼラチンによる血管新生

- すでに，臨床試験が開始されている，もしくは倫理委員会に承認され，準備を進めている治療 -

#### (1) 虚血性心疾患に対するbFGF

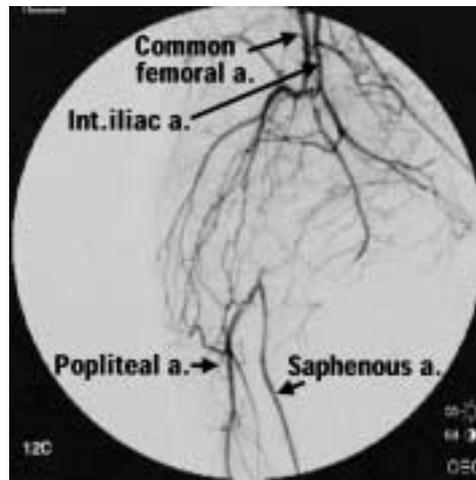
ラット慢性心筋梗塞モデルで梗塞部および梗塞周辺部にbFGF(100 $\mu$ g)徐放化ゼラチンハイドロゲル粒子を心筋内投与したところ，治療群ではコントロール群に比し，有意な心拡大の抑制と心収縮力の改善が見られた。また，治療群では組織学的に梗塞周辺部の豊富な血管新生を認め，<sup>201</sup>Tl血流シンチグラフィーにおいても同部位の血流改善所見を認めた<sup>6)</sup>。同様の実験をブタ慢性心筋梗塞モデルにて行ったところ，梗塞部心筋厚が保たれ拡大が抑制されており，心収縮力の改善も認められた<sup>7)</sup>。術後4週目の冠動脈造影では結紮した冠動脈の末梢が側副血行路を介して造影された。

#### (2) バイオCABG - bFGF徐放化による旧コンセプトの復活 -

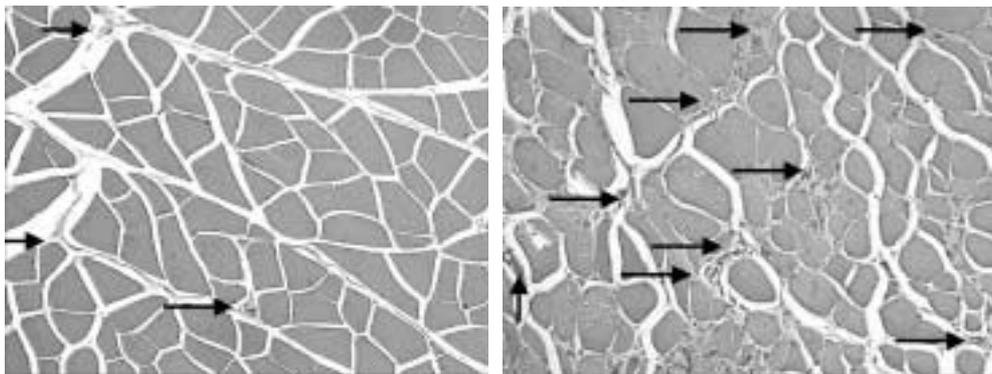
1934年にBeckらは，心外膜との癒着により，心膜よ

り心筋への側副血行路の作成実験を報告した。側副血行路を利用した虚血改善策のより一層効果的な方法として有頸組織を用いる工夫がなされ，1936年にO'Shaughnessyらは，心筋梗塞の治療として心筋梗塞部を大網で覆い側副血行路を発達させる“omentopexy”という手技を用いた。1950年にはVinebergとMillerがomentopexyを改良し，内胸動脈を大網に植え込み梗塞周囲部を覆う方法を試みた。しかし，ともに冠動脈と大網グラフトとの間の交通形成に長時間を要したため，臨床的に満足のいく結果は得られなかった。

われわれはbFGFにより，その交通形成を促進する方法を試みた<sup>8)</sup>。アメロイドコンストリクターを用い，ウサギの鈍縁枝領域の慢性心筋虚血モデルを作製し，虚血領域にbFGF(100 $\mu$ g)徐放化ゼラチンシートを塗布し，その上から胃大網動脈(gastroepiploic artery: GEA)ごと大網で覆ったところ，大網のみを巻きつけた群に比較して，同部位の豊富な血管新生と胃大網動脈から側副血管を介しての鈍縁枝への血流の流入を認めた(Fig. 1)。また，胃大網動脈からの選択的造影にて冠動脈鈍縁枝との交通を確認した。組織学的にも豊富な新生血管を認め，カラーマイクロスフィアでも有意な血流量改善所見を得た。心機能に関しては心エコーのみならず，Cine MRIでも改善が確認された。この手法は，従来，手術適応と考えられなかった微小な血管に対しても生物学的にバイパス吻合を作製すること(バイオCABG)を可能とする点，およびドナー血管を外周健



**Figure 2** Digital subtraction angiography of the rabbit femoral artery. Marked development in collateral vessels formation to the distal popliteal artery was observed.



**Figure 3** Representative microscopic views of mid calf muscle. (A) Control, (B) bFGF incorporated gelatin hydrogel treatment. Arterioles were scarcely observed in (A), while more arterioles were evident in the (B).  
 A: Gelatin hydrogel alone.  
 B: 100  $\mu$ g of gelatin hydrogel bFGF.

常臓器から得られる点において優れた方法である。

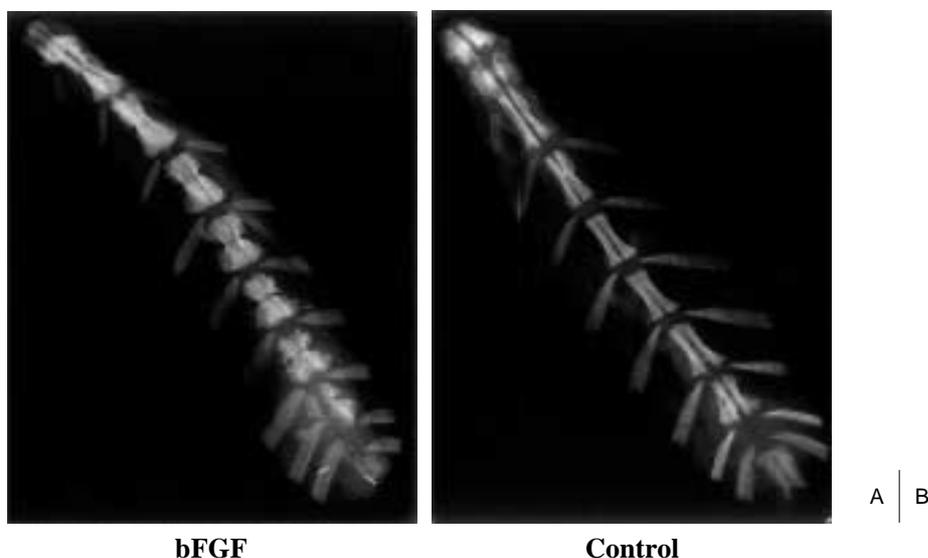
以上のバイオCABGは、すでに京都大学医学部の倫理委員会の承認を得ており、臨床試験が近く開始される予定である。

### (3)重症下肢閉塞性動脈疾患に対する血管新生療法

日本白色ウサギ右大腿動脈を結紮切離し、下肢虚血モデルを作製した。その2週間後に、無治療コントロール群、ゼラチンハイドロゲル粒子投与群、bFGF (100 $\mu$ g)徐放化ゼラチンハイドロゲル粒子投与群に無作為に分けた。なお、bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲ

ル粒子の投与は複数箇所の大腿部筋肉内単回注射投与のみとした。投与4週後にレーザードップラー血流計での血流改善効果を認め、血管造影像においても膝窩以下の末梢動脈への側副血行路の明らかな増加を認めた (Fig. 2)。また、組織像でも有意な血管新生を認め、血管密度も有意に増加していた (Fig. 3)。さらに、bFGF投与群において、bFGF、VEGFの血中濃度を測定したが、上昇は認めなかった<sup>9,10)</sup>。なお、同様な効果はストレプトゾトシン誘導糖尿病ラット、アポロテインEノックアウト高脂血症マウスでも確認された。

すでに、慢性閉塞性動脈硬化症、パージャー病、糖



**Figure 4** Sternal bone radiograph. Sternal healing was seen in the bFGF group (A). Sternal dehiscence was observed in the control group (B).

尿病性下肢壊疽患者を対象に、2005年2月より第I-II相臨床試験が開始されており、今後の結果が待たれる。

#### (4) bFGF徐放化ゼラチンシートによる胸骨再生

開心術に伴う合併症のなかで前縦隔洞炎はきわめて重篤な術後合併症である。その原因のひとつに、手術に伴う胸骨虚血が関与するといわれており、特に高齢、糖尿病合併例などの易感染性状態にあり、かつ、両側の内胸動脈を使用した場合に、そのリスクが高まることが知られている。また、胸骨治癒の促進は感染予防のみならず、早期退院、早期社会復帰につながり、社会的・経済的メリットも大きいと思われる。したがって、前縦隔洞炎予防、胸骨再生目的にbFGFを用いた研究を行った。

ラットにストレプトゾチン誘導し、糖尿病モデルを作製した。胸骨正中切開後に両側内胸動脈を結紮切離し、胸骨虚血モデルとした。胸骨下にbFGF徐放化ゼラチンシートを置き、胸骨創閉鎖した。bFGF治療群では胸骨周囲の血流改善と、それに伴う胸骨再生効果が得られた<sup>11)</sup>。また、前縦隔洞炎の発生頻度も低下させた(Fig. 4)。イヌにおいても同様の実験を行い、その有効性が確認されている<sup>12)</sup>。すでに、2004年11月より第I-II相臨床試験が開始されており、今後の結果が待たれる。

#### 近い将来臨床応用が期待されるbFGF治療

##### (1) 拡張型心筋症に対するbFGF

拡張型心筋症は心筋内微小循環の虚血が関与するとされているおり、微小循環を改善することで病態の進行を抑制し、しいては予後を改善することが期待される。われわれは自己免疫性心筋炎後拡張型心筋症ラットモデルを作製し、研究を行った。左室をbFGF徐放化ゼラチンシートで覆ったところ、心臓の線維化は影響を受けず、左室自由壁の組織血流増加と左室収縮力の改善を認めた<sup>14)</sup>。

##### (2) 肺高血圧症に対するbFGF

bFGFは血管内皮細胞のアポトーシスを抑制するといわれている。また、肺高血圧症は肺血管内皮障害と平滑筋細胞の増殖が関与している。そこで、モノクローリン誘導肺高血圧ラットモデルにおいて、bFGFを隔週ごとに静脈内注射投与を行ったところ、肺高血圧の進行と右室心筋の肥大が抑制された。現在、治療モデルでの評価と、より効果的な投与法を検討している。

##### (3) 感染予防としてのbFGF

ライン感染(カテーテル感染)は重篤な合併症とな

ることがある。とりわけ、補助人工心臓 (left ventricular assist device: LVAD) を必要とするような重症患者ではライン感染合併の頻度が高く、ひとたび感染が起これば致命的な結果を招くこととなる。現状での抗生剤を用いた感染予防も臓器障害をはじめとする多くの副作用や菌交代現象を招き、十分ではない。感染の多くは刺入部より始まるとされており、われわれはこの部位に組織再生と血管新生作用を有するbFGFを用いた感染予防の研究を行っている。

マウス背中下の皮下にダクロン人工血管断片を埋め込み、同部位にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) を投与し、ライン感染モデルを作製した。

同モデルに対し無治療コントロール群、ゼラチンシート埋め込み群、bFGF (50 $\mu$ g) 投与群、bFGF (50 $\mu$ g) 徐放化シート投与群の4群に分け、比較検討したところ、他群に比較しbFGF (50 $\mu$ g) 徐放化シート投与群において有意にダクロン周囲への組織再生と血管新生所見を認め、MRSAのグラフト内移行を阻止し得た<sup>14)</sup>。以上の結果をもとに、感染予防としてのbFGFの応用を目指し更なる検討を行っている。

### おわりに

再生医療は新たな治療戦略としての大きな期待を背負い、世界中でさまざまな手法による臨床応用が開始され、その有効性が報告されている。その一方で、臨床の現場では動物実験とは相反する結果も報告されており、現状では十分なエビデンスやコンセンサスは得られていない。

生体吸収性ゼラチンハイドロゲルによるbFGFの徐放化は、従来の再生療法の欠点を補う新たな可能性を秘めている。また、単独療法としてのみならず、従来の内科的・外科的治療、さらには他の先進医療とも併用することで、その効果を十分発揮することが期待され、心臓血管外科領域においてきわめて有望な治療手段のひとつとなり得ると考えられる。

今後は、長期的な治療効果、適切な治療時期、対象病態の選択などを含め、厳正なる大規模臨床試験により検証されなければならないが、引き続き臨床・基礎研究が密接に連携をとることで、従来の治療法との位置づけが明確にされ、新たな治療手段として成熟していくことが期待される。

### 文 献

- 1) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with crinical limb ischemia. *Circulation*, 1998, **97**: 1114–1123.
- 2) Ruel M, Laham RJ, Parker JA et al: Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2002, **124**: 28–34.
- 3) Laham RJ, Rezaee M, Post M et al: Intracoronary and intravenous administration of basic fibroblast growth factor: Myocardial and tissue distribution. *Drug Metab Dispos*, 1999, **27**: 821–826.
- 4) Tabata Y, Hijikata S, Ikada Y: Enhanced vascularization and tissue granulation by basic fibroblast growth factor impregnated in gelatin hydrogels. *J Control Release*, 1994, **31**: 189–199.
- 5) Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M et al: Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999, **10**: 79–94
- 6) Wakura A, Fujita M, Kataoka K et al: Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels*, 2003, **18**: 93–99.
- 7) Sakakibara Y, Tambara K, Sakaguchi G et al: Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2003, **24**: 105–111.
- 8) Ueyama K, Bing G, Tabata Y et al: Development of biologic coronary artery bypass grafting in a rabbit model: Revival of a classic concept with modern biotechnology. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, **127**: 1608–1615.
- 9) Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K et al: Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *J Artif Organs*, 2004, **7**: 58–61.
- 10) Marui A, Kanematsu A, Yamahara K et al: Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg*, 2005, **41**: 82–90.
- 11) Wakura A, Tabata Y, Tamura N et al: Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances healing of devascularized sternum in diabetic rats. *Circulation*, 2001, **104**: I325–I329.
- 12) Wakura A, Tabata Y, Nishimura K et al: Basic fibroblast

- growth factor may improve devascularized sternal healing. *Ann Thorac Surg* 2000, **70**: 824–828.
- 13) Tambara K, Horii T, Sakakibara Y et al: Epicardial administration of control-released basic fibroblast growth factor induces angiogenesis and improves left ventricular function in dilated cardiomyopathy. *Circulation*, 2003, **108**: IV399.
- 14) Hirose K, Marui A, Arai Y et al: A new method of preventing catheter-related MRSA infection by angiogenesis effects of control-released bFGF. *Circulation*, 2004, **110**: III596.

## Therapeutic Angiogenesis with the Sustained Release System of Basic Fibroblast Growth Factor

Yoshio Arai,<sup>1</sup> Akira Marui,<sup>1</sup> Yasuhiko Tabata,<sup>2</sup> and Masashi Komeda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Surgery, Kyoto University Graduate School of Medicine, Kyoto, Japan

<sup>2</sup>Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan

---

**Key words:** basic fibroblast growth factor (bFGF), gelatin hydrogel, therapeutic angiogenesis, Bio-CABG

Recently we have developed a new sustained release system of basic fibroblast growth factor (bFGF) using gelatin hydrogel as a carrier biomaterial. We examined the effect of topical sustained release of bFGF on blood flow recovery and tissue regeneration in various animal models of cardiovascular areas. These results revealed effectiveness and safety of this therapy. Clinical trials of sternal wound healing for open heart surgery and therapeutic angiogenesis for severe hind limb ischemia are under way. In addition, “Bio-CABG,” a combined therapy of bFGF and omentum for severe ischemic heart disease, will start its clinical trial in the near future. (*J Jpn Coll Angiol*, 2005, **45**: 145–150)