

末梢性血管疾患に対する遺伝子治療臨床研究

青木 元邦 森下 竜一* 荻原 俊男

要旨: 近年、動脈硬化を基礎とする血管疾患に対する新しい治療法として遺伝子治療が注目されている。海外では早くよりVEGF遺伝子を中心に検討されているが、一方、われわれは内皮細胞増殖因子HGF遺伝子に注目し、末梢性血管疾患を対象として遺伝子治療臨床研究を実施している。安全性は許容範囲であると考えられ、また現在のところ、一定の改善度も得られている。今後、有効性を評価するためにコントロールを設置した研究が必須である。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2004; 44: 145-150)

Key words: HGF, PAD, Gene therapy, Angiogenesis, TREAT-HGF

はじめに

動脈硬化を基礎疾患とする血管疾患は食生活の欧米化・社会の高齢化とあいまって増加しつつある。また糖尿病は高血圧、高脂血症、喫煙と並んでリスクファクターのひとつであり、血管合併症の問題は避けて通れない。

大規模調査によれば60~70歳男性のうち3~6%が間歇性跛行症状をもっており、そのうち50~75%は無治療で経過観察可能であるが、年間1%は下肢切断の危機にさらされるといわれている¹⁾。慢性虚血肢の発生率は50~100/10万人/年である。近年のインターベンションや手術療法の進歩は著しいが、それにもかかわらず安静時疼痛や虚血性潰瘍を呈する重症虚血肢患者の20%は既存の療法に反応せず下肢切断を余儀なくされ、QOLを障害されている。さらに下肢切断にまで至る患者は元来高いリスクを抱えており生命予後も不良で、例えば膝下切断患者の場合の5年生存率は50%との報告がある。このような従来の治療に抵抗性あるいは適応外となる重症虚血肢患者に対する新しい治療法として、遺伝子導入を用いた血管新生療法が注目されている。

Therapeutic angiogenesis

近年の分子生物学の進歩により血管新生のメカニズ

ムの解明が進んできた。特にbasic fibroblast growth factor(b-FGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), hepatocyte growth factor(HGF)などの内皮細胞増殖因子の血管新生作用は当初より注目されており²⁻⁴⁾、それらの組み換えタンパクを用いた治療の可能性、さらに遺伝子導入の技術の向上とあいまって局所への遺伝子導入による治療の可能性が検討されてきた(therapeutic angiogenesis)。すでにアメリカではVEGF遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans; ASO)、虚血性心疾患に対する遺伝子治療が始まっており効果をあげている。血管新生を利用した遺伝子治療は循環器領域において明らかに新しい治療方法のひとつになりつつある。

血管新生にはプロテアーゼによる基底膜や間質のマトリックスの消化、血管内皮細胞の遊走、増殖、さらに内皮細胞間の再接着と管腔形成というステップが必要であるが、その中でも内皮細胞の増殖にかかわる因子は極めて重要な役割を果たしており、血管新生療法における主役である。血管新生活性を有する増殖因子としては、epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF) family, transforming growth factor(TGF)- α , VEGF, PDGF-BB, HGFなどが報告されている⁵⁻¹⁰⁾。これらの増殖因子が実際に生体内の血管新生惹起時にどの程度の割合で関与しているかは定かでないが、内皮細胞増殖作用の程度などから、b-FGF, VEGF, HGFが主として検討されている。

大阪大学大学院医学系研究科加齢医学講座

*同臨床遺伝子治療学講座

2004年5月21日受理

血管新生療法的手段：組み換えタンパクと遺伝子

組み換えタンパクと遺伝子のいずれを骨格筋に導入しても血管新生が起こることがわかっている。遺伝子投与は倫理面などにおいて多くの問題を含んでいるが、次の理由により、組み換えタンパク投与よりも遺伝子投与の方が有利であると考えられている。組み換えタンパクは非常に高価で大量生産が困難である。また、組み換えタンパクは半減期が短く有効組織濃度に到達させるために大量投与が必要である一方、血中濃度の上昇を抑え全身への副作用を最小限にしなければならず、投与量の設定が非常に難しい。他方、遺伝子投与では少ない投与で持続的にタンパクを局所分泌し、なおかつ全身への影響を少なくすることが可能である。局所に導入された遺伝子の発現期間は約2~3週間といわれており恒久的な副作用が出現することは考えにくく、むしろ遺伝子投与の方が安全であろう。このように遺伝子治療の方が安全性、有効性、医療経済の面から優れると考えられてきている。

遺伝子導入効率

遺伝子を用いた血管新生療法では、増殖因子をコードした外来遺伝子を細胞内に効率よく導入することが課題になってくる。現在、遺伝子の媒体(ベクター)として一般的なものはウイルスベクターである。ウイルスベクターはウイルスが宿主内にDNAやRNAを運搬する能力を利用して、標的の外来遺伝子をウイルス遺伝子に挿入し細胞内に導入しようというものである。動物における血管新生療法の実験ではアデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルスが用いられた。ベクターとなるウイルスは前処理によって非増殖性に加工するが、作成の段階で増殖能をもつものがわずかに含まれることがあり、これをなくすことが今後の重要課題になっている。また、ウイルスベクターそのものの免疫原性も問題のひとつである。以上のような理由で、ウイルスベクターは安全性の観点から臨床応用するには解決すべき点が多い。ベクターを用いない方法としてnaked plasmid DNAを直接投与する方法がある。導入効率と発現持続期間ではベクターに比べて劣るが、安全性の面では非常に有利である。

HGFを用いた遺伝子治療臨床研究

われわれは肝細胞増殖因子HGFに注目している。HGFは、肝細胞の最も強力な増殖因子として発見されたが、その後、各種臓器において臓器保護作用や再生作用、さらには各種の器官の発生にも大きくかかわっていることが明らかにされた、ユニークな増殖因子である。1980年代の後半に肝再生因子として発見されたHGFは、種々の肝障害や腎障害にともなって障害臓器および肺などの間葉系細胞において産生され、オートクライン・パラクライン・エンドクライン機構によって障害臓器に供給され、障害臓器の上皮系細胞に働き、再生を促すことが知られている。また臓器障害を軽度抑える保護作用、さらには上皮細胞間葉組織間における相互作用をもち、組織器官の恒常性維持に重要な役割を果たしている。当初、肝細胞増殖因子としてクローニングされたHGFには強力な内皮細胞増殖作用があることが明らかになった。他の内皮細胞増殖因子VEGF、b-FGFなどに比し強い増殖作用を呈し、従ってHGFはVEGF同様、血管新生作用があることが予想された。HGFはまた内皮細胞特異的な増殖因子であり、b-FGFとは異なり平滑筋細胞は増殖させないので、VEGF同様、その臨床応用が期待されている。

これまでに得られた基礎的データをもとに、2001年5月よりHGFを用いた閉塞性動脈硬化症あるいはパージャージャー病に対する遺伝子治療を実施している(Japan Trial to Treat Peripheral Arterial Disease by Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer; TREAT-HGF)。本研究ではnaked plasmid DNAの筋注を用いている(Fig. 1)。導入細胞は骨格筋細胞であり導入効率は決して高いとは言えないが、HGFが分泌タンパクであることを考慮すると、導入効率は低くてもある程度の局所濃度を上げることが可能である。ウイルスベクターなどを使用せずplasmid DNAを直接筋肉注射するという、安全かつ簡便な方法を用いており、骨格筋をgene reserverとして用いている。筋肉内に導入された遺伝子が発現すると増殖因子タンパクが分泌され周囲の細胞に血管新生効果を及ぼし、あらたな側副血行路が生じて虚血を改善させるのがねらいである。増殖因子タンパクを直接投与すると、半減期が短い場合頻回または持続的大量投与が必要となり、このため全身副作用が危惧されるが、遺伝子治療の場合、

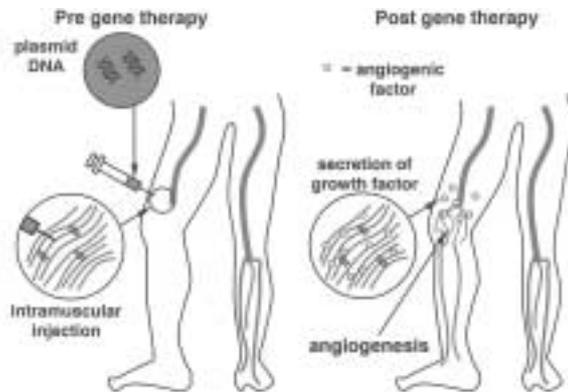


Figure 1 Intramuscular injection of naked plasmid DNA encoding human HGF cDNA. Naked plasmid DNA without any viral vector is injected into muscle of lower limbs. Since HGF is secreted protein, it will be able to increase the local HGF concentration even if the transfection efficiency is not so high.

導入後数週間は遺伝子が局所で少量持続発現するため、その間局所効果が持続的であり、なおかつ全身副作用が少ないと考えられ、安全面、効率面、医療経済面でメリットがあるものと期待される。

本臨床研究はコントロールを設置しない I/IIa に相当する試験である。したがって研究の第一目的は安全性の評価、第二目的としては効果の検討 (placebo 群がないため厳密な言及はできない)、そして第三目的としては至適容量の決定 (容量依存性の有無の検討) である。本臨床研究は第一ステージ (6 例) と第二ステージ (16 例) からなる。第一ステージでは Fontaine 分類 III 度以上の重症虚血肢に対して実施され、第二ステージでは Fontaine IIb にまで拡大している。Figs. 2, 3 に治療の流れを示す。遺伝子治療のガイドラインを遵守し、既存の治療法に抵抗性であることを示すため、1 カ月の観察期を設定し、内科的・外科的治療に反応しないことを確認している。第一ステージでは安全性を確保するために、0.5mg の少量投与を行い、急性のアレルギー反応など副作用が発現しないことを確認し、2 週間後に 2mg の本投与を実施する。1 箇所 0.5mg を 4 箇所に注射する。その 1 カ月後に同量の 2 回目投与を行う。最終遺伝子投与後 2 カ月で初期成績を判定し、2 年間の追跡調査を行う。第二ステージでは第一ステージの結果を考慮し、少量投与は実施せず、本投与から開始する。第二ステージでは容量設定は二群に分かれ、2mg の 2 回注射と 4mg の 2 回注射がそれぞれ 8 例ずつ実施された。

安全性については、遺伝子投与に起因すると考えられる重篤な有害事象は現在までに確認されず、臨床上

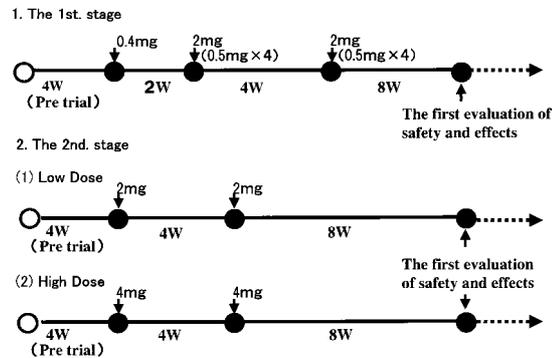


Figure 2 Clinical protocols of TREAT-HGF. This trial comprises two stages. 6 patients were arranged for the first stage. Both stages have an observation period of one month before gene injection. We have to ensure that they do not react to any conventional therapy in this period. As a safety precaution, we performed the 0.4 mg preliminary injection. After checking for allergies, 2 mg plasmid was administered. One month later, the same amount of plasmid was injected again. The main purpose of the 1st stage was to confirm the safety of HGF plasmid. Secondly, we evaluated the effectiveness of gene transfer. 16 patients are planned for the 2nd stage and we will investigate the effect of dose dependability by injecting different amount, low and high doses.

許容範囲であると考えられる。また安全性を示すデータとして血中 HGF 濃度が上昇しないこと (Fig. 4)、血中にリークする plasmid が速やかに消失することも確認できた。このことから遠隔臓器あるいは遠隔期における副作用発現の可能性は低いことが考えられる。本研究では対照群を設置していないため、有効性に言及するのは不可能であるが、改善度について Fig. 5 に示す。上下肢血圧比 (ABI) については最終遺伝子投与後 2 カ月

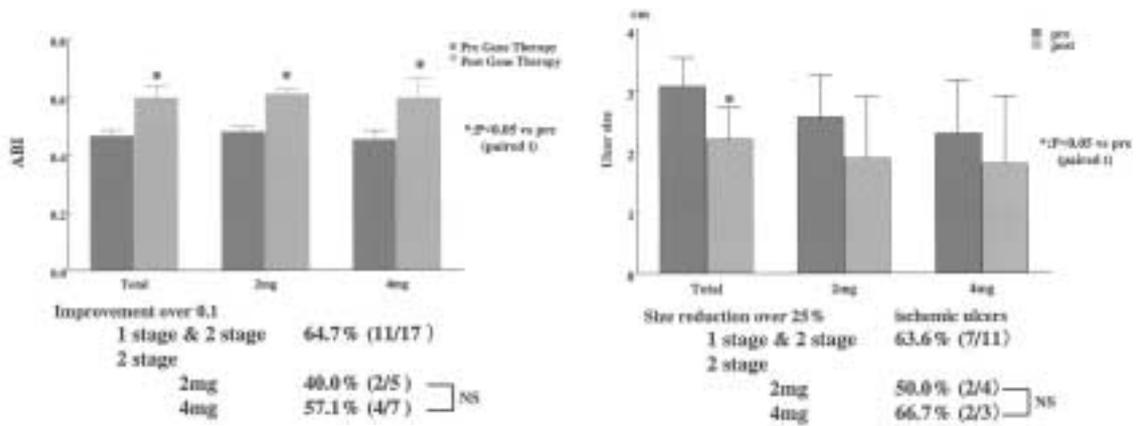


Figure 5
 a: Increase in ABI after trans-gene.
 b: Reduction in ischemic ulcer size after trans-gene.

a | b



Figure 6 Typical examples of improvement in ischemic ulcers.

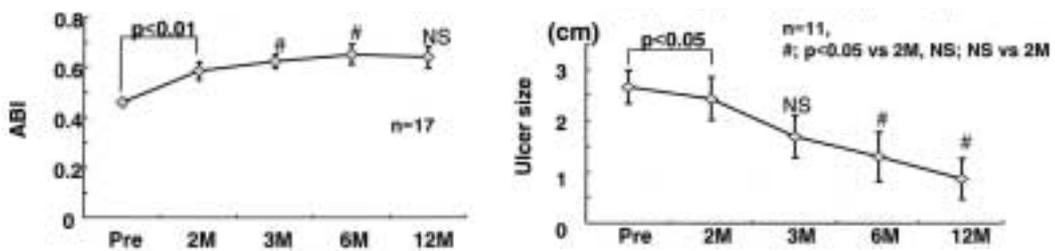


Figure 7
 a: Long-term effects of trans-gene on ABI.
 b: Long-term effects of trans-gene on the size of ischemic ulcers.

a | b

全性あるいはdeviceの開発を中心としたdelivery systemの検討が必要となってくる。

文 献

- 1) Dormandy JA, Rutherford RB: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. Trans Atlantic Inter-Society Consensus (TASC). *J Vasc Surg*, 2000, **31**: S1–S296.
- 2) Baffour R, Berman J, Garb JL et al: Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J Vasc Surg*, 1992, **16**: 181–191.
- 3) Pu LQ, Sniderman AD, Brassard R et al: Enhanced revascularization of the ischemia limb by angiogenic therapy. *Circulation*, 1993, **88**: 208–215.
- 4) Yanagisawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F et al: Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science*, 1992, **257**: 1401–1403.
- 5) Takeshita S, Zheng LP, Brogi E et al: Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 1994, **93**: 662–670.
- 6) Bauters C, Asahara T, Zheng LP et al: Site-specific therapeutic angiogenesis after systemic administration of vascular endothelial growth factor. *J Vasc Surg*, 1995, **21**: 314–325.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M et al: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther*, 2001, **8**: 181–189.
- 10) 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.

Clinical Gene Therapy for Peripheral Arterial Disease

Motokuni Aoki, Ryuichi Morishita,* and Toshio Ogihara

Department of Geriatric Medicine, Osaka University Medical School

*Division of Clinical Gene Therapy Science, Osaka University Medical School

Key words: HGF, PAD, Gene therapy, Angiogenesis, TREAT-HGF

The clinical consequences of peripheral arterial disease (PAD) include pain on walking (claudication), pain at rest and loss of tissue integrity in the distal ischemic limbs. Although development of beneficial drugs and intervention devices do contribute to the treatment of this disease, critical limb ischemia (CLI) is estimated to develop in 500 to 1,000 individuals per million per year. Therapeutic angiogenesis using angiogenic growth factors is expected to be a new treatment for patients with CLI. As hepatocyte growth factor (HGF) has potent angiogenic activity, we investigated the safety and efficiency of HGF plasmid DNA in patients with CLI as a prospective, open-labeled clinical trial. Intramuscular injection of naked HGF plasmid DNA was performed into ischemic limbs of CLI patients with PAD or Buerger disease graded as Fontaine IIb, III or IV who did not show an improvement of symptoms after 4 weeks of conventional therapy and hospitalization. The primary endpoints were safety and improvement of ischemic symptoms at 12 weeks after transfection. Severe complications and adverse effects caused by gene transfer were not detected in any patients. Although the present trials are conducted to demonstrate the safety of phase I/early phase IIa, the initial clinical outcome with HGF gene transfer seems to indicate usefulness as sole therapy for CLI.

(*J. Jpn. Coll. Angiol.*, 2004; **44**: 145–150)