

bFGF蛋白のピンポイントデリバリー法による血管再生療法

小山 博之^{1,2} 保坂 晃弘² 宮田 哲郎² 高戸 毅¹ 田畑 泰彦³

要 旨: 動脈硬化を原因とする慢性虚血性疾患に対する血管再生療法のゴールは、虚血部の血管床に血液を供給するための側副血行路を発達させることである。有効な側副血行路を形成させるためには、虚血部への血流供給源となる動脈(donor artery)と虚血部血管床とをつなぐ血管ネットワークを太く成熟したものへと発達(arteriogenesis)させる必要がある。これを実現するために必要な治療要件に関して考察するとともに、それに基づいて独自に開発した新しい血管再生療法を紹介する。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 589-594)

Key words: arteriogenesis, collateral circulation, basic fibroblast growth factor, ischemia, microspheres

はじめに

血管再生療法は、「血管新生」を誘導することにより組織血流を改善させる治療法であり、虚血性疾患の治療において従来の各種血行再建術に代わる次世代型治療法として注目を集めている。現在までさまざまなストラテジーの血管再生療法が発表されてきており、そのほとんどは「血管新生」を促す増殖因子(以下、血管新生因子)や細胞などを何らかの方法で治療ターゲットへデリバリーするというものである。デリバリーする血管新生因子としては血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)や塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor: bFGF)が有名であるが、その他の増殖因子などを用いたプロトコルも発表されている¹⁻⁴⁾。投与形態も蛋白を直接デリバリーするものや遺伝子を宿主細胞に導入してこれらの因子を作らせるもの、転写因子の活性化を介するものなどがある⁵⁾。また、細胞をデリバリーするプロトコルにおいても、血管の発生に関与する血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell: EPC)をできるだけ選別してデリバリーするものからEPC以外の細胞も多く含む骨髄単核細胞を用いるものなどがある^{6,7)}。一方、デリバリーの方法

においてもさまざまなものがあり、動脈注射や筋肉注射から静脈注射による全身的な投与などが考案されている⁸⁾。これらさまざまな治療ストラテジーは、「血管新生」という共通目標を有するものの、それぞれに異なったアプローチを採用しているため、その優劣を一元的に比較判断することは容易ではない。しかし、ターゲットとなる疾患の病態に基づいて、どのような「血管新生」をどの部位に誘導するべきかという「治療のゴール」を正確に把握することができれば、どのストラテジーが最も治療効果をあげられるかを類推することは可能であろう。本稿では、動脈硬化を原因とした慢性虚血肢や狭心症への治療を想定して、どのようなストラテジーの血管再生療法が適しているか筆者なりの考えを述べるとともに、その考えに基づいて考案した治療法についても紹介したい。

動脈硬化による慢性虚血に対する「治療のゴール」は何か

末梢組織への血行をつかさどる血管のうち動脈系のネットワークは、その機能により大きく二つのコンポネントに分けることができる。一つは、毛細血管や細動脈より成り、各組織の血管床を構成するコンポネントであり、もう一つはこの血管床へ血液を供給するための導管の役目を果たす動脈である。ある種の血管炎

¹東京大学医学部附属病院ティッシュ・エンジニアリング部

²東京大学医学部附属病院血管外科

³京都大学再生医科学研究所

2006年9月12日受理

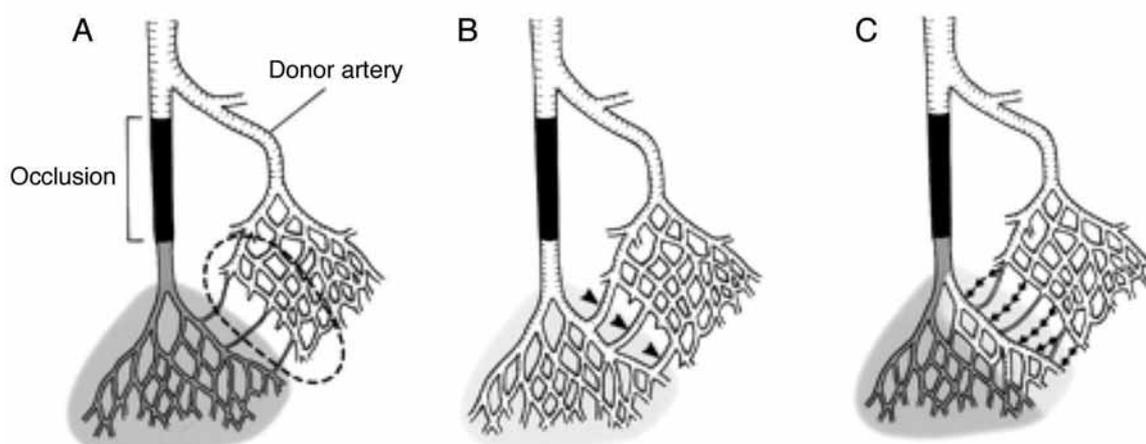


Figure 1 Delivery target of bFGF to develop functional collateral vessels.

A: Generally in ischemic tissue induced by atherosclerosis, certain volume of capillary bed remains preserved. Goal of angiogenic therapy is to develop collateral vessels connecting donor artery and capillary network in ischemic tissue. Then, therapeutic target should be distal extremities of donor artery (dotted circle).

B: If arteriogenesis is induced in small communicating vessels preexisting between donor artery and capillary network of ischemic tissue (arrowheads), blood perfusion in ischemic tissue can be effectively improved.

C: If angiogenesis is induced in distal portion of donor artery, newly formed vessels can extend toward ischemic tissue (arrows). Dark and bright shadow indicate ischemic tissue and tissue with improved blood perfusion, respectively.

©2004 American Heart Association, Inc. All rights reserved. Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T: Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation*, 2004, **110**: 3322–3328.

や糖尿病性細小血管症などでは、主に血管床を構成する血管に病変が生ずる。そして血管床が機能不全に陥った場合、虚血組織に対する血流を回復させるためには新たな血管床を再構築する必要がある。そのためには、血管新生機転のうち未分化な細胞が分化・増殖して新たな血管をつくるvasculogenesisや既存血管の内皮細胞が遊走・増殖して血管を伸延させるangiogenesisの誘導が有効となる。これに対して、動脈硬化における病変部位は、主に血管床へ血液を供給する導管の役目を果たす動脈であることが知られている⁹⁾(Fig. 1A)。すなわち、動脈硬化症例においては虚血組織の血管床は比較的保たれているため、虚血を改善するためにはこの血管床に対する新たな血流供給ルートである側副血行路を発達させる必要がある。

生体は元来、組織虚血に対する防御機構として、側副血行路を発達させるメカニズムを有している。たとえば、ある組織に対する栄養血管が閉塞した場合、その末梢の組織が壊死を免れるためには近傍のほかの動脈系からの血液の流入が不可欠であり、このような血液の流入ルートが側副血行路となる。通常、このような他の動脈系からの血流は虚血部の組織血流をすべて

まかなうには不足なことが多いため、このルートを強化して虚血部位への血流供給を増加させる機転が働く。この機転における主役を演じるのが、既存の血管の成熟・拡大を促すarteriogenesisと呼ばれるものであり、前述のvasculogenesisやangiogenesisと並ぶ「血管新生」のもう一つの形式である⁹⁾。そして、生体が元来もっているこのメカニズムが十分に機能し、虚血部位の組織血流を代償することができれば、治療の必要性はなくなる。臨床的に問題となる虚血肢や狭心症は、この代償作用が不十分なケースである。したがって、動脈硬化を原因とする虚血性疾患に対する血管再生療法の主要な「治療のゴール」は、発達不良の側副血行路に対してarteriogenesisを誘導して十分な機能をもった側副血行路に作りかえることにあるといえよう(Fig. 1B)。このとき、側副血行路の中核(上流)にある動脈は、側副血行の血流供給源となるわけであるから、十分なinflowをもつ動脈である必要があることはいうまでもなく、筆者らは、このような動脈のことをdonor arteryと呼称している^{10,11)}。一方、側副血行路の発達を目標とした場合、発達不良の既存の側副血行路を強化するという前述の考え方以外にも、donor arteryと虚血部血管

床との間をつなぐ新たな血管の形成を促すという治療コンセプトも成立しうるだろう。具体的には, donor arteryの末梢部にangiogenesisを誘導して動脈を伸延させて虚血部血管床に至らしめるという方法と, donor arteryと虚血部血管床との間にvasculogenesisを誘導して両者間のつながりを作るという方法である(Fig. 1C)。しかし, これら二つの方法による側副血行路は新たに形成された血管であるため, 当初は極めて細く幼弱な構造であることは否めず, 十分な送血能を備えた「機能する側副血行路」となるためには, 当然のことながらarteriogenesisの機転が加わる必要がある。以上より, arteriogenesisは, 動脈硬化による虚血性疾患に対する血管再生療法において必須の機転であるといえる。

「治療のゴール」に適合したストラテジーの条件

(1) 何をデリバリーすべきか

目指す血管再生療法はvasculogenesisやangiogenesisの誘導も重要であるが, それ以上に動脈の成熟や拡大を促す機転であるarteriogenesisの誘導が必須であることを述べた。血管は内皮細胞や平滑筋細胞, 線維芽細胞など多種類の細胞によって構成される。そのため, このarteriogenesisは, これら多種類の血管構成細胞がお互いに全体として調和をもって再構築される機転であり, そのメカニズムも極めて複雑で解明されていない部分も多い¹²⁾。多くの増殖因子や細胞が関与していると考えられており, arteriogenesisを効率よく誘導するためには, 複数の増殖因子や細胞群の投与が理想と思われる。しかし, 初めから複雑なデリバリーシステムを実現するのは現実的に大きな困難が伴うため, まずは単独のデリバリーで最も効果のあげられるものを用いるのが適切であろう。血管再生療法においてよく用いられてきた血管新生因子は, VEGFとbFGFであるが, 同じ血管新生因子でもその作用は大きく異なる。VEGFはその名前の通り血管内皮細胞に比較的特異的に作用する増殖因子であるためangiogenesisを強く誘導し, また骨髄からEPCなどを動員してvasculogenesisを促す作用も報告されている。これに対してbFGFは内皮細胞以外にも線維芽細胞や平滑筋細胞に対する増殖作用をもっており, arteriogenesisとangiogenesisの両者を誘導することが知られている¹³⁾。一方, 細胞でよく用いられているのはEPCやEPCを含んだ骨髄単核細胞である。これらはEPCそのものが材料となってvasculogenesis

を促すと考えられてきたが, 骨髄単核細胞においては, EPC以外の細胞からも各種の血管新生因子が放出され, それによる血管再生作用も存在することが明らかになってきている¹⁴⁾。以上より, 筆者は単独でデリバリーするものとしては, 現状ではbFGFが最も適切であると考えている。

(2) 蛋白質の直接デリバリーか遺伝子デリバリーか

血管新生因子をデリバリーする場合, 蛋白質を治療ターゲットへ直接デリバリーする方法と, 遺伝子を宿主の細胞に導入してその細胞に蛋白質を作らせることにより間接的にデリバリーする方法の二通りがある。両デリバリー法の最も重要な違いは, 治療ターゲットに実際にデリバリーされる増殖因子量の「ばらつき」の有無である。蛋白質の直接デリバリー法では, 患者の個体差や細胞のコンディションに関係なく, Xミリグラムの血管新生因子を投与したければ, 正確にXミリグラムを投与することが可能である。しかし, 遺伝子導入による方法では蛋白質にしてXミリグラムの血管新生因子を投与したいと考えても, それを正確に実現することは難しい。たとえば, 複数の異なった患者に全く同じ遺伝子導入治療を施したとしても, 各患者の細胞への遺伝子導入効率や遺伝子発現効率などが異なれば(全く同じということはありません), 患者によって異なった蛋白質量の血管新生因子がデリバリーされることとなる。このような現象は*in vitro*での遺伝子導入実験でもしばしばみられることで, 実験条件や細胞コンディションの微妙な違いによって数倍程度の遺伝子発現量のばらつきが生じるのは珍しくない。仮に, 各患者にデリバリーされた血管新生因子蛋白質の間に数倍程度のばらつきが生じてしまうようなことになれば, 治療として成立困難となる可能性が生じよう。虚血組織に対する側副血行路を発達させるためにはどのくらいの血管新生因子が必要かを検証した研究は少ないが, 必要十分な治療効果を担保するのに必要な血管新生因子の量(治療必要量)は存在するはずである。有効で安全な治療法の確立のためには, この必要量に裏付けられたデリバリーが求められるようになると思われるが, そのような場合, 現状では蛋白デリバリー法が遺伝子導入法に比べて有利といえるのではないだろうか。

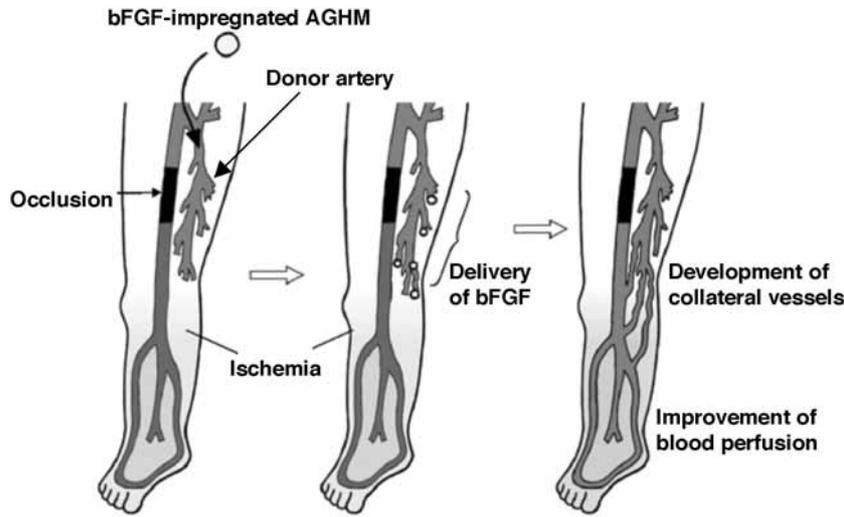


Figure 2 Pinpoint delivery of bFGF by using acidic gelatin hydrogel microspheres (AGHM). bFGF-impregnated AGHM (circle) are injected via donor artery. AGHM are trapped in distal portion of donor artery (target of delivery) and continuously release bFGF for 2 weeks.

(3) デリバリーの方法

次に、血管新生因子蛋白をデリバリーするとした場合、どのような方法でデリバリーするのが良いかについて考えてみたい。前述の通り、血管再生療法の主要なゴールは、donor artery末梢に連なる発達不良の側副血行路にarteriogenesisを誘導して十分な機能をもつ側副血行路に発達させることである。したがって、治療ターゲットはdonor artery末梢部にある小口径動脈ということになる。また、angiogenesisの機転によりdonor arteryから虚血部血管床に動脈を伸延させる場合でも、angiogenesisの舞台はdonor arteryの末梢部となるためターゲットは同じ部位となる。donor artery末梢部に血管新生因子をデリバリーするためには、donor arteryへの経動脈的な投与が最も理にかなっていることはいうまでもない。しかし、経動脈的に血管新生因子蛋白を投与(動脈注射)する方法には、デリバリー効率の観点でいくつかの問題点があることが知られている。その一つは、血管新生因子蛋白の*in vivo*における半減期の短さ(数分から数十分程度)によるものだ。目標とする側副血行路の発達のためには、治療濃度の血管新生因子が一定期間、ターゲット組織に作用する必要があると考えられるが、側副血行路の発達に要する期間(最低でも数週間)と比較して血管新生因子蛋白の半減期はあまりに短いといわざるをえない。この短所を補うため、複数回投与法を採用するプロトコルも発表されており、単回の投与と比べて優れた虚血改善効果をあげ

ているが、複数回の治療は操作が煩雑になるうえ、合併症の可能性や患者の負担を高める側面ももつ。もう一つの問題は、投与された血管新生因子蛋白のターゲット組織への分布効率が低いことである。イヌの心筋をターゲットとしたデリバリー実験では、bFGFを冠動脈内へ投与した場合で全投与量の3~5%、静脈注射で投与した場合で0.5%が心筋に分布することが示されている¹⁵⁾。bFGFは細胞外マトリックスに結合するため組織に対するある程度の親和性を保持しているはずであるが、この組織分布効率は決して良好とはいえないだろう。これに対して遺伝子導入による血管新生療法は、ターゲット組織(またはその周辺)に血管新生因子遺伝子を適切に導入できさえすれば、その組織に対して選択的かつ持続的に血管新生因子をデリバリーすることが可能である。最近、血管再生療法においても遺伝子導入による方法が注目されているのは、これらのメリットが、デリバリー量の「ばらつき」によるデメリットを凌駕するとみなされているためと思われる。しかし、血管新生因子蛋白の経動脈的投与方法においても、選択的かつ持続的デリバリーが可能となる工夫ができれば、これに勝るものはないはずである。

bFGF蛋白の ピンポイントデリバリー法 (Fig. 2)

以上の考察より、筆者らはbFGF蛋白をdonor arteryの末梢へ選択的かつ持続的にデリバリーする治療法が血

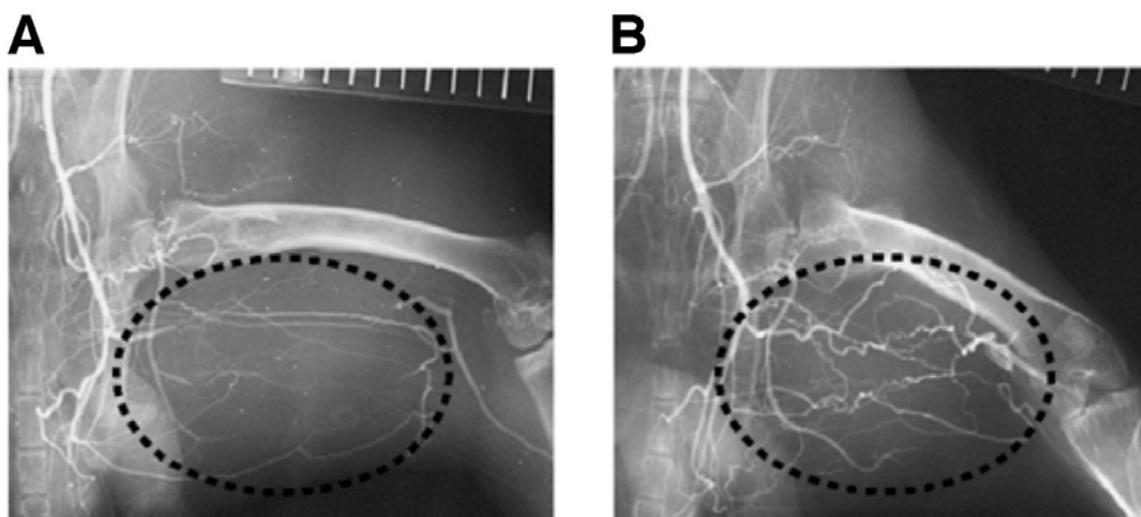


Figure 3 Selective internal iliac arteriograms 28 days after AGHM (acidic gelatin hydrogel microspheres) administration in rabbit model of hind limb ischemia. AGHM (3 mg) were treated with phosphate-buffered saline (A) or 100 µg bFGF (B).

管再生療法として適切と考えた。このような治療法を実現するためには、部位選択性に優れかつ持続的なデリバリーを可能とする蛋白のデリバリーシステムが必要となるわけであるが、そこで注目したのが、田畑らによって開発された酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子 (acidic gelatin hydrogel microspheres: AGHM) によるドラッグデリバリーシステムである¹⁶⁾。酸性ゼラチンハイドロゲルは、bFGF蛋白を結合させて生体内に入れると数週間(調節可能)にわたり持続的にbFGFを徐放する性能をもつ。またこの微粒子のサイズをある特定のレンジに調整することにより、細動脈レベル以下の小口径部位に血流障害を来すことなく特異的にトラップさせることもできる¹⁰⁾。したがって、bFGF蛋白を結合させた適切なサイズのAGHMを、donor arteryに動注すれば、その末梢部位(すなわち治療ターゲット)に選択的に分布し、そこで一定期間(2週間に設定) bFGFを持続的にデリバリーすることができるので、目標とする治療法の条件をほぼ満たすことになる。実際、ウサギ虚血肢モデルを用いた評価では高い虚血改善効果と安全性を認めることができたため(Fig. 3)、現在、東京大学医学部倫理委員会の承認のもと虚血肢の治療を目的とした臨床試験を実施中である。

おわりに

動脈硬化を原因とする慢性虚血性疾患に対する血管

再生療法に関して筆者の考えるところを述べるとともに、それに基づいて開発した「bFGF蛋白のピンポイントデリバリー法」を紹介した。臨床試験に関しては、症例数の蓄積が少ないため、いまだ結果を発表する段階には至っていないが、現在のところ深刻な有害事象の発生はなく順調に進行中である。

文 献

- 1) 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.
- 2) Unger EF, Banai S, Shou M et al: Basic fibroblast growth factor enhances myocardial collateral flow in a canine model. *Am J Physiol*, 1994, **266** (4 Pt 2): H1588–1595.
- 3) Sellke FW, Li J, Stamler A et al: Angiogenesis induced by acidic fibroblast growth factor as an alternative method of revascularization for chronic myocardial ischemia. *Surgery*, 1996, **120**: 182–188.
- 4) 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.
- 5) Vincent KA, Shyu KG, Luo Y et al: Angiogenesis is induced in a rabbit model of hindlimb ischemia by naked DNA encoding an HIF-1 α /VP16 hybrid transcription

- factor. *Circulation*, 2000, **102**: 2255–2261.
- 6) Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 1997, **275**: 964–967.
- 7) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 8) 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**: 314–324.
- 9) van Royen N, Piek JJ, Buschmann I et al: Stimulation of arteriogenesis; a new concept for the treatment of arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res*, 2001, **49**: 543–553.
- 10) Hosaka A, Koyama H, Kushibiki T et al: Gelatin hydrogel microspheres enable pinpoint delivery of basic fibroblast growth factor for the development of functional collateral vessels. *Circulation*, 2004, **110**: 3322–3328.
- 11) Ohara N, Koyama H, Miyata T et al: Adenovirus-mediated *ex vivo* gene transfer of basic fibroblast growth factor promotes collateral development in a rabbit model of hind limb ischemia. *Gene Ther*, 2001, **8**: 837–845.
- 12) Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, **6**: 389–395.
- 13) Deindl E, Hoefler IE, Fernandez B et al: Involvement of the fibroblast growth factor system in adaptive and chemokine-induced arteriogenesis. *Circ Res*, 2003, **92**: 561–568.
- 14) Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al: Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, **104**: 1046–1052.
- 15) Lazarous DF, Shou M, Stiber JA et al: Pharmacodynamics of basic fibroblast growth factor: route of administration determines myocardial and systemic distribution. *Cardiovasc Res*, 1997, **36**: 78–85.
- 16) Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S et al: Bone regeneration by basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials*, 1998, **19**: 807–815.

Pinpoint Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Development of Functional Collateral Vessels

Hiroyuki Koyama,^{1,2} Akihiro Hosaka,² Tetsuro Miyata,² Tsuyoshi Takato,¹ and Yasuhiko Tabata³

¹Division of Tissue Engineering, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

²Department of Vascular Surgery, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

³Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University, Kyoto, Japan

Key words: arteriogenesis, collateral circulation, basic fibroblast growth factor, ischemia, microspheres

Development of collateral vessels is a crucial goal of therapeutic angiogenesis for the treatment of chronic ischemic diseases caused by atherosclerosis. Development of functional collateral vessels requires arteriogenesis, a process of vascular enlargement and maturation, to be induced in small vascular channel connecting donor artery and capillary network in ischemic tissue. This article summarizes therapeutic requisites for achieving the development of functional collateral vessels, and presents a novel therapeutic strategy, in which basic fibroblast growth factor was continuously delivered to distal part of the donor artery by using acidic gelatin hydrogel microspheres (AGHM) as carrier material.

(*J Jpn Coll Angiol*, 2006, **46**: 589–594)