

1. 末梢動脈 HGF遺伝子導入による血管新生療法

牧野 寛史¹ 森下 竜一²

要　旨：遺伝子導入を用いた血管新生療法は、閉塞性末梢動脈疾患に対する新しい治療として期待されている。VEGFやFGFと同じく血管新生作用を持つHGFもまた遺伝子治療に応用された。閉塞性末梢動脈疾患に対するHGF遺伝子治療の臨床応用として、日本ではオープンラベル試験が、また米国では第2相にあたる二重盲検試験が施行され、一部有用性を示すデータが報告されている。現在日本では無作為二重盲検法による第3相試験が進行中である。

(Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 187-193)

Key words: gene therapy, angiogenesis, hepatocyte growth factor: HGF

はじめに

肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)は肝細胞に特異的な増殖因子として見出されたのが最初であるが、その後血管新生作用、血管内皮細胞増殖・保護作用、神経細胞保護作用などもあることが報告され、これらの効果を治療に応用する試みが行われている。冠動脈疾患(coronary artery disease: CAD), 閉塞性末梢動脈疾患(peripheral arterial disease: PAD), 脳神経疾患などにおいて、傷害血管、傷害神経の再生への効果が期待されている。PADに対してはHGF遺伝子治療を用いた血管新生療法として臨床応用された。本稿では、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)の分子生物学的特性、効果、およびPADへの臨床応用について概説する。

肝細胞増殖因子

HGFは1984年に成熟ラット初代培養幹細胞に対する増殖因子として肝再生中のラット血液より部分精製された。HGFは既知遺伝子とは性質の異なる新しい増殖因子であり、肝障害や腎障害などに伴って障害臓器や肺などの間葉系細胞で産生され、オートクライイン・パ

ラクライイン機構によって障害臓器に提供される。

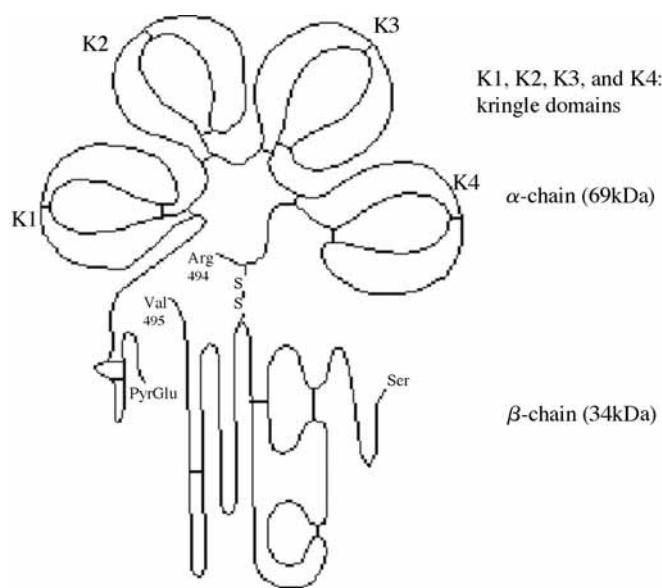
1989年にヒトHGFのクローニング作製がなされ、HGFがクリンギル構造を持つ新規蛋白質であることが示された。HGFは分子量69kDaのα鎖と34kDaのβ鎖からなるヘテロ二量体である。α鎖にはhairpin-loop構造と4個のクリンギルドメイン(K1, K2, K3およびK4)と呼ばれる特徴的構造があり、その各ドメイン内には3個のジスルフィド結合がある(Fig. 1)。北欧の菓子kringleの形と似ておりこの名がついた。他にクリンギルドメインを持つ蛋白質としてプロトロンビン、プラスミノーゲン、t-PA、アポリポプロテイン(a)などがある。また、ヒトのHGFの遺伝子座は第7染色体長腕(7q11.2-21)に存在している。

発見当初は肝細胞に特異的な増殖因子として考えられ、hepatocyte growth factorと名付けられたが、その後、肺胞上皮細胞、腎尿管上皮細胞、皮膚ケラチノサイト、胃粘膜上皮細胞など肝細胞以外の多くの細胞の増殖を促進することが判明した。正常細胞においては上皮系細胞の多くはHGFの標的細胞であり、また、間葉系由来の細胞のなかでも軟骨細胞、血管内皮細胞、筋衛星細胞などいくつかの細胞が標的細胞となることが明らかになった。HGFは別名、細胞分散因子(scatter factor: SF)とも呼ばれている。循環器疾患を中

¹大阪大学大学院医学系研究科老年・腎臓内科学講座

²大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学講座

2007年4月24日受理

**Figure 1** Structure of HGF protein.

Based on Morishita R, Nakamura S, Hayashi S et al: Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. J Atheroscler Thromb, 1998, **4**: 128–134, and Conway K, Price P, Harding KG et al: The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. Wound Repair Regen, 2006, **14**: 2–10.

心とした検討でもHGFには血管内皮細胞の増殖作用があり、内皮再生療法、血管新生療法などの遺伝子治療への適用が期待されている。

HGF受容体c-Metの構造と機能

HGFの特異的受容体であるc-Metは生体内に広く分布しており、肝臓、腎臓、乳腺、血球では単球やマクロファージ、脳内ではマイクログリアにその発現が認められる。c-Metは分子量50kDaの α 鎖と145kDaの β 鎖からなるヘテロ二量体である。 α 鎖は細胞外に存在するが、 β 鎖は細胞外、膜貫通、細胞内の各ドメインを含んでいる。その機能においては β 鎖が中心的な役割を果たしている(Fig. 2)。すなわち、チロシンキナーゼ領域は β 鎖の細胞内ドメインにありc-Metの必須機能を担い、システインに富んだ領域は β 鎖の細胞外ドメインに存在しHGFとの結合に関与している。HGFがc-Metに結合すると、c-Metの二量体形成、さらにチロシン残基の自己リン酸化が起こる。この部位はmultifunctional docking siteと呼ばれ、結合するシグナル分子としてPI-3-K(phosphatidylinositol-3-kinase), PLC- γ (phospholipase C- γ), Grb-2などのSH2ドメインを含んだ分子であると報告されている。

HGFの細胞増殖作用

HGFは遊走因子(motogen), 細胞増殖(分裂)促進因子(mitogen), 形態形成因子(morphogen)などのさまざまな作用を持つ因子でもある。これらの作用に関するシグナル物質として、mitogen-activated protein kinase(MAP kinase: MAPK)との関係が指摘されている。前述したように、HGFはc-Metのmultifunctional docking siteをリン酸化させるが、ここにGrb-2が結合することが細胞増殖や管腔形成の誘導において必須と考えられている。Grb-2は、SOSを介しアダプター分子として、受容体チロシンキナーゼからRasへのシグナル伝達を行う。Rasはいくつかのシグナル分子にそのシグナルを伝達していくが、このなかで最も解析されているのがRaf-1である。Raf-1はさらにMAPキナーゼキナーゼ(MEK)を活性化することによりMAP kinaseカスケードを活性化し、より下流へとシグナルを伝達する。一方、HGFはJA kinaseを介さずに直接STAT signal transducer and activator of transcription (STAT3)がc-Metに結合することによりSTAT3をチロシンリン酸化するという報告もある¹⁾。

血管内皮細胞においてHGF受容体であるc-Metが発現しており、HGFが内皮細胞に対して細胞増殖作用を呈することが見出された²⁾。さらに、血管内皮細胞において、HGFはMAPKの活性化を介して、DNA合成およ

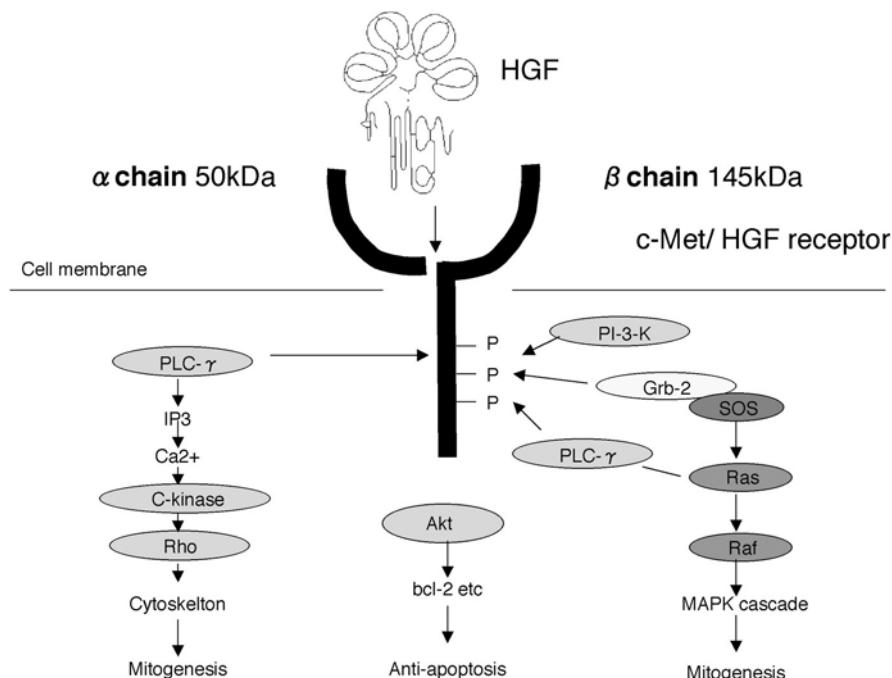


Figure 2 Structure and functions of HGF receptor c-Met.

び癌遺伝子のc-fosの転写を亢進していた。また、STAT3のリン酸化の検討では、チロシン部位のリン酸化は他の細胞に比べて著明でなかったものの、serine部位のリン酸化を認め、これはERK(extracellular signal-related kinase)のリン酸化を介していることが分かった³⁾。つまり、HGFは血管内皮細胞において、ERKおよびSTAT3などを介してさまざまな分子の発現を亢進することにより、細胞増殖能を有することが明らかとなつた。

疾患への応用、遺伝子導入

当初は増殖因子の組換え型蛋白質(recombinant protein)を用いた治療の可能性が模索され、動物実験で効果が証明されたが、その後の臨床研究では大きな成果を得られなかった。しかし遺伝子導入の技術が向上して、より局所への遺伝子導入が可能になり、血管新生因子を使用した遺伝子治療の可能性が再検討されるようになってきた。そもそも組換え型蛋白質は半減期が短く、有効組織濃度に到達させるためには大量かつ連続投与が必要であるが、同時に全身の副作用となるべく低減するためには投与量を抑えなければならない

という相反する2つの面がある。しかし、遺伝子を用いる場合にはより少量の投与で局所に持続的な蛋白発現をもたらすことが期待でき、かつ全身への影響も少なくなる。また、組換え型蛋白質は非常に高価で大量生産が困難であり経済面でも劣る。このように遺伝子治療のほうが安全性、有効性、医療経済等の面から優れると考えられている。

遺伝子導入法は、外来遺伝子を標的細胞内に取り込ませ特定の遺伝子を一定期間過剰に発現させる方法である。標的細胞への外来遺伝子の取り込み率である導入効率が治療の成否を左右する。遺伝子のベクターとして代表的なものはウイルスベクターであるが、これは細胞にウイルスが感染し宿主に核酸を取り込ませる現象を利用したものである。作製が簡便であること、非分裂細胞にも導入できること、外来遺伝子の発現が一過性であること等の条件が要求され、レトロウイルスベクター、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、センダイウイルスなどが検討してきた。今後解決すべき点としては、ウイルスベクターの増殖能や宿主への細胞毒性の完全除去などがある。ベクターを用いない手法としてnaked plasmid DNAやliposome-plasmid複合

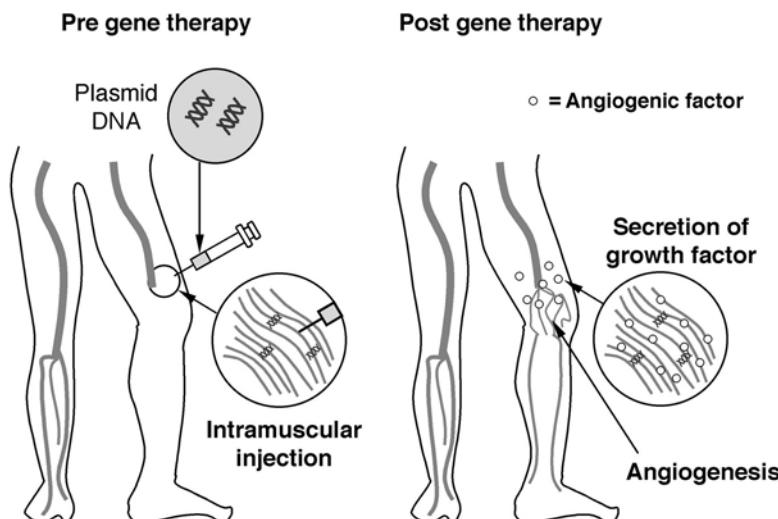


Figure 3 Intramuscular injection of naked plasmid DNA.
Low transfection efficiency of naked plasmid will be compensated by paracrine effects of secreted HGF gene product.

体の投与がある。これらは導入効率と発現持続期間ではウイルス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。またnaked plasmid DNAは導入効率は低いものの、血管新生療法では筋肉注射という簡便な手技で遺伝子導入が可能であり十分な効果をあげることができた⁴⁾。筋肉注射で導入した場合、筋肉がgene reservoirとして働き、かつ導入された細胞から分泌された増殖因子蛋白質が周囲に効果を及ぼすと考えられる（Fig. 3）。naked plasmid DNAの導入効率が低い理由として、細胞膜の通過性が低いこと、細胞内導入後ライソゾームによる分解などが考えられている。そこで細胞膜の通過性を克服するdelivery systemとして導入時に超音波を併用する手法⁵⁾やelectroporationを用いた導入法⁶⁾が提案され動物実験で有効性が報告されている。

血管新生療法への応用

CADやPADなどの虚血性疾患の治療は、内科的薬物療法の進歩や外科的血行再建術の発展により著しく改善されたが、統計上の救命率が向上する一方、高齢かつ複雑な重症血管病変を有する場合では症例数が増加傾向にある。このように既存の内科的・外科的治療での症状改善を望めない患者では、多くの場合保存的治療で対応せざるを得ず、従来の治療戦略とは一線を画した新たな非侵襲的治療法の開発が望まれてきた。近

年これらの虚血性疾患に対する新たな治療法として遺伝子治療を用いた血管新生療法(therapeutic angiogenesis)が期待されている。すでに欧米では血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor: VEGF)遺伝子や線維芽細胞増殖因子(basic-fibroblast growth factor: b-FGF)遺伝子を用いた遺伝子治療が臨床応用され、その有効性が報告されつつある。HGFもまた血管新生効果を持ち、動物の虚血モデルにおいて血管新生効果が確認されたことを受けて、PADを対象とした臨床応用も開始された。

HGFには内皮細胞増殖作用、血管新生作用があり、さらにその増殖作用は内皮細胞に特異的であるため、VEGFと同じく動脈硬化性疾患への治療効果が期待できる。また前述のごとく、HGFには内皮細胞保護効果もある。同様の効果は他の内皮細胞増殖因子であるVEGFにもあるが、VEGFがこのような内皮細胞障害時に発現が上昇するのと対照的にHGFはその発現が低下している⁷⁾。VEGFはhypoxia responsible element(HRE)を転写部位に持つため虚血時にその発現が上昇するが、HGFは低酸素刺激によるc-AMPの発現低下あるいはTGF-bの発現上昇により発現が低下すると考えられる。実際、HGFがその転写部位にc-AMP responsible element, TGF-b inhibitory elementを持つことは既知である。また虚血心筋では組織内HGFが減少している一方

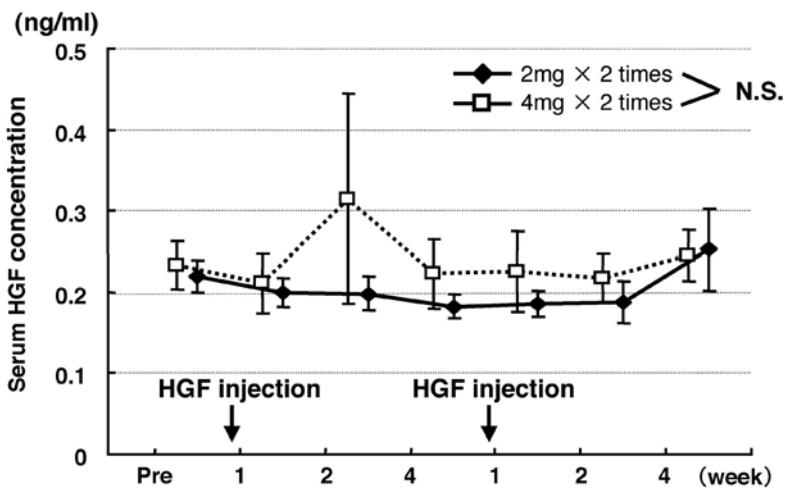


Figure 4 Changes in serum HGF protein.

でHGFの受容体c-Metの発現は上昇していた⁸。これらのこととは、虚血、高血糖、高血圧など内皮機能障害の病態において、局所ではHGFの需要が高いのに反して供給されるHGFは欠乏していることを示唆している。VEGFが追加療法であるのに対してHGFは補充療法ということができ、HGFが血管新生療法のツールとしてより有用性が期待できる。実際HGFの血管新生作用は虚血性心疾患に対しても有用であった。ラット冠動脈結紮モデル⁹において、またブタ心筋梗塞モデルへのHGF遺伝子導入で血管新生を認めている。

HGFを用いた血管新生療法の臨床研究

(1) 国内での臨床研究TREAT-HGF

日本では大阪大学において2001年より、HGF遺伝子を用いた末梢血管疾患に対する遺伝子治療の臨床研究が開始された(TREAT-HGF)¹⁰。4週間の内科的治療に抵抗性の閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans: ASO)またはバージャー病(thromboangiitis obliterans: TAO)患者に対して、超音波ガイド下にHGF遺伝子を2mg×2回(低用量グループ)または4mg×2回(高用量グループ)、2週間の間隔をあけて筋肉内に注射した。ASO 14例、TAO 8例の計22例に適用し、Fontaineステージ別にはIIb度7例、III度4例、IV度11例である。安全性におけるHGF遺伝子治療の特徴は、治療中に血中HGF濃度が変化しないことである(Fig.4)。HGFは投与局所で消費されやすいため、また前述の通りASO患

者では虚血組織局所でのHGF濃度が低下しているため、補充療法の意味合いが濃いためであろうと推測される。血中HGF濃度が上昇しないことから全身性に与える影響が少ないと考えられる。

末梢血流を足関節/上肢血圧比(ankle brachial pressure index: ABPI)で、安静時疼痛はVAS(visual analogue scale: 最大の痛みを10cmとして痛みの程度を患者自身がマークする方法)で、さらに虚血性潰瘍を持つ症例は最大潰瘍の長径サイズを計測し、臨床症状の改善度の評価を行った。投与終了後2ヶ月時点で初期効果判定を行い、ABPI、疼痛スケールVAS、潰瘍サイズの各項目ともに改善が認められた。これらの効果は投与後1年経過しても悪化することがなかった。個々の症例につき、ABPIが0.1以上の改善、疼痛スケールVASが2cm以上の改善、潰瘍の長径25%以上の改善が得られた症例数の推移はTable 1の通りであった。投与後2ヶ月の時点ではABPI、VAS、潰瘍の改善がそれぞれ60%程度の症例にみられ、またこれら臨床項目改善症例数の率は2年間のフォローアップ期間中も悪化することがなかった。これらの臨床効果はVEGF遺伝子治療とほぼ同等である。全くの無効例は3例であったが、悪化した症例はなかった。

一方、安全性評価については、臨床研究実施者とは独立した組織である評価委員会を設置し、同組織にて臨床研究期間中に発生したすべての有害事象についてHGF遺伝子投与との因果関係を検討した。2年経過後

Table 1 Changes in efficacy ratio on TREAT-HGF/stage1, 2

	2 months	6 months	12 months	24 months
ABI (Elevation > 0.1)	11/17 (65%)	12/15 (80%)	10/13 (77%)	10/13 (77%)
Pain (VAS) (Reduction > 2 cm)	8/13 (62%)	9/10 (90%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)
Ulcer size (Reduction > 25%)	7/11 (64%)	8/10 (80%)	8/9 (89%)	8/9 (89%)

VAS: visual analogue scale

までに関して因果関係の検討が終了したが、この段階で遺伝子投与との因果関係のある重篤有害事象は認められなかった。またVEGF遺伝子の臨床応用では浮腫の副作用が頻繁にみられたが、HGF遺伝子治療では浮腫は観察されなかった。内皮細胞はFlkなどのVEGF受容体を有するためVEGF刺激により内皮細胞の増殖・遊走が起こるが、平滑筋細胞は刺激を受けず血管の裏打ちがないため、血球系細胞が循環内に漏出し、ヒスタミンやロイコトリエンなどを放出し浮腫を形成するものと考えられている。一方、HGF受容体c-Metは平滑筋細胞上にもあり、基底膜を内皮細胞と共有する周皮細胞(pericyte)の遊走を促進するため、内皮細胞増殖とともに周皮細胞が遊走し、血管の裏打ちは最初から形成され、浮腫が発生しにくいのではないかと推測される。最近、周皮細胞遊走を促進するアンジオポエチンをVEGF遺伝子治療に併用すると浮腫発生をみないとする報告が発表されている¹¹⁾。有効性に関する評価について本研究における問題点は、偽薬(プラセボ)対照群を設置していないため厳密な有効性の判定が困難なことである。

(2)米国での臨床試験HGF-STAT

2006年6月に米国において、HGF遺伝子治療薬の第2相臨床試験(以下、HGF-STAT試験)のデータが発表された。HGF-STAT試験は、代替療法のない重症下肢虚血を有する104名を対象として実施され、HGF遺伝子の高用量12mg(4.0mg×3回)、中用量8mg(4.0mg×2回)、低用量1.2mg(0.4mg×3回)とプラセボの4群間の比較を行った。有効性については不適格症例を除く93症例、安全性については全104症例で評価を行った。有効性に関しては全体解析では統計学的有意差には至らなか

かった。だが、血行動態の改善を測定する主な評価項目であるTcPO₂(経皮酸素分压)の層別解析[投与前の変動が大きい症例(15mmHg以上)を除外]では、高用量群でプラセボ群と比較して統計学的に有意な改善を示した。また、投与6ヶ月後の時点でもTcPO₂が30mmHgを超えた症例は、プラセボ群39%，低用量群57%，中用量群67%，高用量群80%だった。臨床症状の改善を測定する主な評価項目である虚血性潰瘍については、統計学的有意差を示すに至らなかったが、HGF遺伝子投与群においてプラセボ群と比較して改善する傾向がみられ有効性が示唆された。安全性に関しては、プラセボ群、低用量群、中用量群、高用量群の各群間において違いは認めなかった。以上のように現時点では、HGF-STAT試験においてはHGF遺伝子の投与により重症下肢虚血患者の血行動態が改善する可能性が示されている。一方、HGF遺伝子投与による忍容性は良好で安全性上の問題はみられなかった。

現在、国内でHGF遺伝子治療薬のASOを対象とする第3相臨床試験(多施設での無作為二重盲検試験)が行われていたが、2007年1月に有効性評価に必要な症例数まで症例登録数が達した。日米を問わず安全性および有効性評価の結果が早期の承認申請につながり、多くの患者にとって有効な治療法となることが期待される。

今後の展望、課題

遊走、細胞増殖、形態形成、細胞死抑制などの効果を持つHGFにはさまざまな疾患への応用の可能性がある。いずれの場合も遺伝子導入により局所での持続効果発現を得ることが共通している。実用化に向けての最大の課題は局所へ効率的かつ安全に遺伝子導入する

ことであろう。また、効率性の面では現在のnaked plasmid、ベクターともに不十分である。そして、動物実験で侵襲的な投与経路を用いた場合も、実用化するには安全な投与法の検討が必須である。今後さらに安全性と効率性の高いdrug delivery systemの開発が期待される。

文 献

- 1)Boccaccio C, Andò M, Tamagnone L et al: Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*, 1998, **391**: 285–288.
- 2)Nakamura Y, Morishita R, Higaki J et al: Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens*, 1996, **14**: 1067–1072.
- 3)Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K et al: Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3 and AKT in endothelial cells. *Hypertension*, 2001, **37**: 581–586.
- 4)Wolff JA, Malone RW, Williams P et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, **247**: 1465–1468.
- 5)Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K et al: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, 2002, **9**: 372–380.
- 6)Hartikka J, Sukhu L, Buchner C et al: Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther*, 2001, **4**: 407–415.
- 7)Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y et al: Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes*, 1997, **46**: 138–142.
- 8)Ueda H, Sawa Y, Matsumoto K et al: Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *Ann Thorac Surg*, 1999, **67**: 1726–1731.
- 9)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, etc. *Gene Ther*, 2000, **7**: 417–427.
- 10)Morishita R, Aoki M, Hashiya N et al: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension*, 2004, **44**: 203–209.
- 11)Thurston G: Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat*, 2002, **200**: 575–580.

Progress and Prospects of Therapeutic Angiogenesis Using HGF Plasmid Gene Therapy for Peripheral Arterial Disease

Hirofumi Makino¹ and Ryuichi Morishita²

¹Department of Geriatric Medicine and Nephrology, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

²Department of Clinical Gene Therapy, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Key words: gene therapy, angiogenesis, hepatocyte growth factor: HGF

As therapeutic angiogenesis gene therapy has emerged as a promising strategy for the treatment of PAD, our research revealed that HGF has the potent angiogenic activity in animal studies. Thus, we planned a prospective open-labeled trial of gene therapy in 22 patients with PAD by intramuscular injection of HGF. In addition, a randomized placebo-controlled phase II trial was conducted in USA, and 104 patients with critical limb ischemia were randomized and received HGF plasmid or placebo. Some results of these two trials were favorable and encouraging. A randomized placebo-controlled phase III trial is currently underway in Japan. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 187–193)