

1. 末梢動脈

bFGF蛋白の経動脈的ピンポイントデリバリー法による血管新生療法 慢性虚血肢に対する臨床試験の中間報告

小山 博之^{1,2} 橋本 拓弥^{1,2} 宮田 哲郎² 安田 吉宏¹ 高戸 毅¹ 田畑 泰彦³

要 旨：慢性虚血肢に対する血管新生療法の治療目的は、虚血部位に十分量の血流を供給するための側副血行路を発達させることである。これを達成するための合理的な治療プロトコルとして、われわれは酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子をキャリア・マテリアルとして用いた「bFGF蛋白のピンポイントデリバリー法」を開発した。現在、慢性虚血肢を対象に同治療法による臨床試験を実施中であるが、すでに6カ月間のフォローアップ期間を終了した8症例の成績について報告する。(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 209-214)

Key words: chronic limb ischemia, collateral circulation, basic fibroblast growth factor

はじめに

血管新生療法は、「血管新生」を誘導することにより虚血組織の血流を改善させる治療法であり、慢性虚血肢の治療においてバイパス手術やインターベンションなど従来の方法に代わる新たな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新生療法が発表されてきているが、そのほとんどは血管新生を促す作用のある増殖因子や細胞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¹⁻³。デリバリーされる増殖因子としては、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)、肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor: HGF)などが有名であり、細胞としては骨髄や末梢血中の単核細胞が多く用いられている^{4,5}。デリバリーの経路や方法も筋肉注射や動脈注射、蛋白投与や遺伝子導入法などさまざまなアプローチが試みられている。しかし、どのようなストラテジーにせよ、優れた治療法となるため

には、誘導された血管新生が虚血組織の血行改善を効率よく達成できるようなものである必要がある。そのためには、原因疾患の病態生理に基づいて「どのような血管新生」を「どこを治療ターゲット」として誘導すればよいのかを正しく把握することが重要であろう。われわれは、主に閉塞性動脈硬化症を原因とした慢性虚血肢の治療を想定し、その病態生理に見合った合理的な治療プロトコルを考案した⁶。現在、同プロトコルによる臨床試験を実施中であり、その中間成績を報告したい。

「どのような血管新生」を「どこを治療ターゲット」にして誘導するか？

末梢組織における動脈ネットワークは、その機能により2つのコンポーネントに分けることができよう。一つは組織の末梢に毛細血管や細動脈として分布する血管床であり、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やや太い動脈である。ある種の血管炎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。これに対し閉塞性動脈硬化症では、導管の役目を果たすやや太い動脈が病変の主座となり、虚血組織内部における血管床自体

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

2007年5月11日受理

は比較的に保たれることが知られている。したがって、閉塞性動脈硬化症による組織虚血を改善させるためには、虚血組織内に保たれている血管床に対して新たな血流供給ルートとなる側副血行路を発達させる必要がある。

生体は虚血に対する防御メカニズムとして、側副血行路を発達させる機転を備えている。例えば、ある組織に対する栄養血管が閉塞した場合、その組織が壊死を免れるためには近傍の他の動脈系からの血液の分配が不可欠であり、このような血液の分配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。この機転において主役を演じるのが、既存の血管の成熟や拡大を促すarteriogenesisと呼ばれる血管新生の一形態である^{7,8)}。このメカニズムが十分に働き、虚血部位の組織血流を代償することができれば、虚血状態は解除され治療の必要性もなくなる。臨床的に問題となるのは、この代償作用が不十分なケースである。したがって、閉塞性動脈硬化症による慢性虚血肢に対する血管新生療法の治療ゴールは、発達不十分な側副血行路に対してarteriogenesisを強化して虚血を代償できるような側副血行路に作りかえることといえよう。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ので十分な血流のある動脈である必要があり、われわれはこれをdonor arteryと呼称している^{6,9)}。一方、側副血行路を発達させるためには、既存の側副血行路を強化する以外にも、新たな血管の形成を促す血管新生機転であるvasculogenesisやangiogenesisを誘導することによりdonor arteryと虚血部血管床との間をつなぐ新たなチャンネルを作ることも有効であろう。しかし、これら2つの機転によって形成される血管は当初は極めて細く幼弱な構造であるため、十分な送血能を備えた側副血行路となるためには、結局はarteriogenesisの機転が加わる必要がある。

bFGF蛋白の ピンポイントデリバリー法について

閉塞性動脈硬化症による慢性虚血肢に対する血管新生療法では、donor arteryと虚血組織血管床の間に存在する発達不十分な側副血行路に対して、arteriogenesisを

メーンとする血管新生機転を誘導することが重要であると述べた。われわれは、これを達成するための合理的治療法として「bFGF蛋白のピンポイントデリバリー法」を考案した。詳細に関しては文献6を参照していただきたいが、この治療法はarteriogenesisを誘導する増殖因子であるbFGFを、酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子を用いたドラッグデリバリーシステム(DDS)により、虚血肢にある発達不良の側副血行路に対してピンポイントでデリバリーするというものである。酸性ゼラチンハイドロゲルは、Tabataらにより開発されたDDSで、bFGF蛋白を結合させて生体内に入ると数週間(調節可能)にわたり持続的にbFGFを徐放する性能を持つ¹⁰⁾。これを平均直径29 μ mの球形の微粒子に調製してbFGF蛋白と結合させたものを、ターゲットとなる発育不良の側副血行路の中核にあるdonor arteryへ動脈注射することにより、同部位に選択的に分布させて一定期間(2週間に設定) bFGFを持続的にデリバリーさせることができる(Fig. 1)。

本治療法の治療効果と安全性の評価は、ウサギ慢性虚血肢モデル(3~3.5kgの日本白色ウサギを使用)を用いて検証された。ウサギの慢性虚血肢は、下肢(左側)の大腿動脈を全長にわたり切除した後、28日間経過させることにより作成した。このような状態において虚血に陥った肢に対して側副血行の血流供給源となる動脈(donor artery)は、同側(左側)の内腸骨動脈となる。この左内腸骨動脈に100 μ gのbFGFを3mgの酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子に結合させたものの浮遊液を注射したところ、微粒子動注による肢の虚血増悪を惹起することなく、動注28日後において有意な側副血行路の発達と虚血部位における血流の改善を認めた(Fig. 2)。

臨床試験の概要

動物モデルによる良好な評価結果を受け、東京大学医学部倫理委員会の承認のもと慢性虚血肢の治療を目的とした臨床試験を実施することとした。本臨床試験は「bFGF蛋白のピンポイントデリバリー法」を初めて臨床に応用する試みであるため、第I相臨床試験的な安全性の検証をメーンとしてデザインされ、試験群は治療群のみとした。また、対象となる病態に応じて、重症虚血肢を対象とする試験と間欠跛行肢を対象とする試験の2種類を設けた。重症虚血肢を対象とした試験は、閉塞性動脈硬化症またはピュルガー病を原因疾患としたFontain

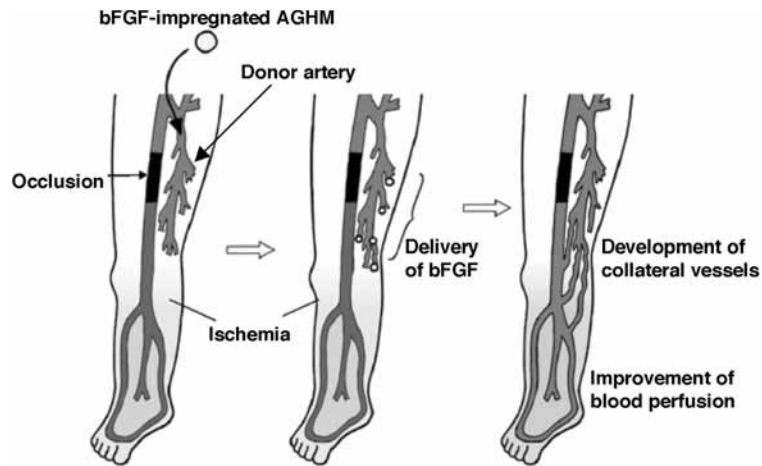


Figure 1 Pinpoint delivery of bFGF by using acidic gelatin hydrogen microspheres (AGHM). bFGF-impregnated AGHM (circle) are injected via donor artery. AGHM are trapped in distal portion of donor artery (target of delivery) and continuously release bFGF for 2 weeks.

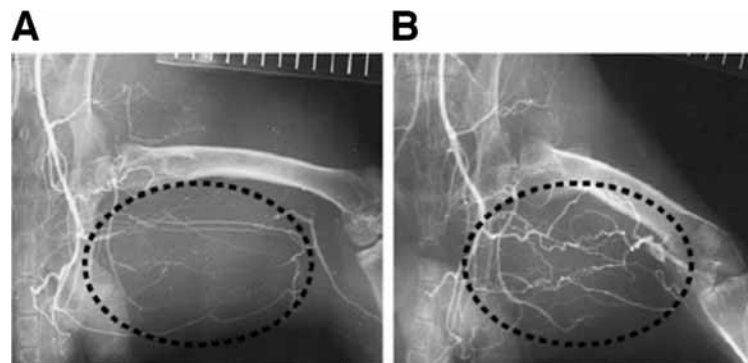


Figure 2 Selective internal iliac arteriograms 28 days after AGHM administration in rabbit model of hind limb ischemia. AGHM (3 mg) were treated with PBS (A) or 100 µg bFGF (B).

分類III度(安静時疼痛)およびIV度(潰瘍,壊死)を呈する症例で,従来の治療法での対処が困難なケースを適応とした。また間欠跛行肢を対象とした試験は,低侵襲治療としての血管新生療法の可能性を検証するべく,本来なら大腿-膝窩動脈バイパスの適応となるような閉塞性動脈硬化症によるFontain分類II度症例を適応とした。適応除外となる条件は,他施設における血管新生療法での除外条件とほぼ同様であり,活動性の糖尿病性網膜症や悪性疾患の除外を特に慎重に行った。

一方,本臨床試験のデザインにおいて最も難渋したのは,bFGF蛋白および酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子の投与量の決定であった。bFGF蛋白に関しては,すでに虚血肢に対する血管新生療法としてbFGF蛋白溶液

をそのままbolusで動注するという臨床試験が海外において実施されておりbolus動注法におけるヒトへの投与量の目安(30µg/kg)は存在した¹¹⁾。しかし,本プロトコルでの投与法は,同じbFGF蛋白とはいえ明らかに異なったデリバリーであるため,この目安を安易に準用すべきではないと考えた。また,酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子に至っては,同様のマテリアルを動注したという報告は少なく,目安にすべきデータすらないといった状況であった。このような事情から,安全性を第一に考慮して,まずは十分に低用量と考えられる用量(bFGF 100µg+酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子 3mg,これはウサギモデルでの投与量と同量)の投与からスタートし,慎重に安全性評価を施行しながら段階的に用量を増やして

いく以外に方法がないという結論に達した。

治療は、患者本人への十分な説明と同意書の取得の後、全例入院して実施された。具体的には、血管造影室において清潔操作下に大腿動脈または上腕動脈よりカテーテルを挿入し、側副血行路発達のために適した動脈 (donor artery) にカテ先を進め、そこからbFGFを結合させた酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子の浮遊液を緩徐に動注した。動注後はカテーテルを抜去し、通常のカテーテル検査後と同様の止血操作を行った。術後急性期の安全性を評価するため、治療終了後最低3日間は入院として、局所・全身の臨床症状の観察に加え、経時的に血圧測定、血液検査、尿検査を施行した。それ以後 (フォローアップ期間は6カ月) の安全性評価および治療効果判定 (Table 1) の諸検査は外来において実施した。

Table 1 Evaluations carried out before and after treatment (Before treatment and 1, 3, 6 months after treatment)

Physical examination
Symptomatic measures
QOL score (SF-36)
Walking impairment questionnaire score (WIQ)
Ankle-brachial indices
Angiographic information
Walking distance measured by a treadmill protocol (speed: 2.4 km/h, grade: 12%, time: 5 min)
Transcutaneous oximetry
Skin perfusion pressure
Air plethysmography
Near-infrared spectroscopy

現在までの臨床試験の成績

現在までにフォローアップの完了した8症例の概要をTable 2に提示した。重症虚血肢症例6例のうち閉塞性動脈硬化症が3例、ピュルガー病が3例で、間欠跛行肢症例は2例であった。また、下肢虚血が4例、上肢虚血が4例であった。

治療後の副作用としては、頻度の割合高そうなものとしてbFGFの血管拡張採用による一過性の血圧低下が、頻度は低いが可能性はあるものとして酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子による塞栓・血栓の形成やbFGFによる腎機能障害が考えられた。血圧低下に関しては、2例において治療直後数分から20mmHg程度の低下が認められた。いずれも、これ以上の低下はなく、5~10分程度の経過観察により元のレベルに復した。また、塞栓症を思わせる臨床所見を呈した症例はなかったが、治療翌朝 (約18時間後) に採取した血液検査において軽度のCPK上昇を認めた症例が2例あった。一方、血栓や腎機能障害を示唆する臨床症状や血液・尿検査所見は認められなかった。

治療効果に関しては、いまだ症例数が少ないため各検査データからは統計学的に有意性をもつエビデンスを得るには至っていない。しかし、臨床症状のみに注目するとTable 3のように全例において何らかの効果や改善が認められた。傾向としては、潰瘍や壊死などを完全に治癒させるほどの効果は難しいようであるが、疼痛に対する改善効果はかなり期待できるようである。治療前には長期にわたり疼痛のために安眠できなかったのが、治療後の疼痛緩和によりやっと安眠でき

Table 2 Patients' profiles

Case	Age & sex	Study type	Disease	Region	Symptom
1	61M	Critical ischemia	ASO	Back palm	Ulcer and severe rest pain
2 (case 1)	62M	Critical ischemia	ASO	Back palm	Ulcer
3	84F	Intermittent claudication	ASO	Calf	Intermittent claudication
4	72M	Critical ischemia	ASO	Toe	Ulcer and bone necrosis
5	67M	Intermittent claudication	ASO	Calf	Intermittent claudication
6	36M	Critical ischemia	TAO	Finger	Necrosis and severe rest pain
7	51M	Critical ischemia	TAO	Finger	Necrosis and severe rest pain
8	39M	Critical ischemia	TAO	Toe	Severe rest pain

Case 1 was treated again 6 months after follow-up (case 2).
ASO: arteriosclerosis obliterans, TAO: Buerger's disease

Table 3 Symptoms before and after treatment

Case	Before treatment	After treatment
1	Ulcer and severe rest pain	Ulcer slightly diminished, and severe rest pain markedly improved.
2 (case1)	Ulcer	Ulcer slightly diminished, but unhealed.
3	Intermittent claudication (200 m)	Walking distance improved to 500 m at 1 month, but new stenotic lesion appeared in other site.
4	Ulcer and bone necrosis	Ulcer was cured by good granulation.
5	Intermittent claudication (300 m)	Symptom almost disappeared.
6	Necrosis and severe rest pain	Necrosis remained unchanged, and severe rest pain markedly improved.
7	Necrosis and severe rest pain	Necrosis dried up, and severe rest pain markedly improved.
8	Severe rest pain	Symptom almost disappeared.

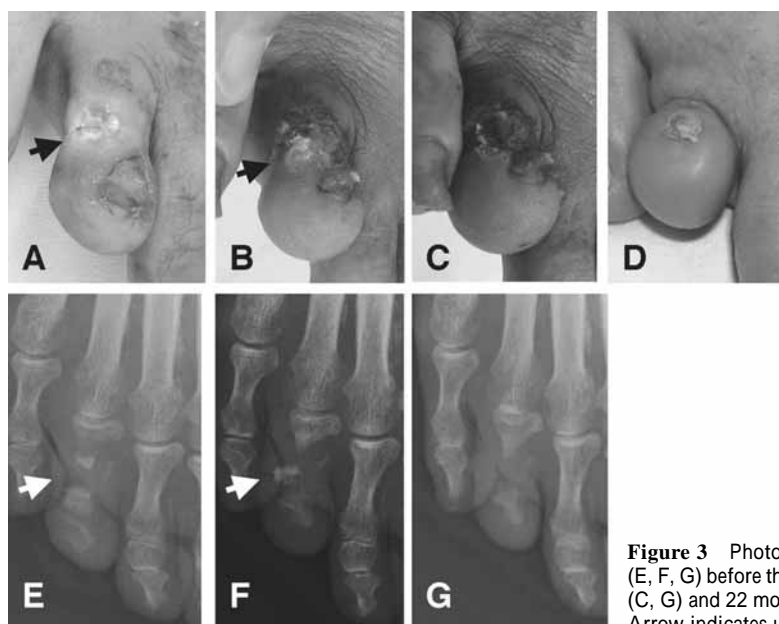


Figure 3 Photographs (A, B, C, D) and roentgenograms (E, F, G) before therapy (A, E) and 3 months (B, F), 5 months (C, G) and 22 months (D) after therapy. Arrow indicates ulcer lesion.

るようになったというケースもあった(症例 6, 7)。このようなケースに接すると臨床家としては本治療が有効であったと判断したくなるわけであるが、疼痛に対する改善効果は、あくまでも患者の主観的なものであり単に「プラセボ効果」である可能性は否定できない。一方で、難治性であった潰瘍が完全に治癒したケースもあった(症例 4, Fig. 3)。このケースでは足趾の虚血性潰瘍より同部の感染を併発し基節骨と中節骨が露出してその一部が腐骨となっていたが、治療後には感染巣にしたいに肉芽が盛り上がり、基節骨の一部と末節

骨を残した状態で最終的に治癒に至った。治癒後 1 年以上経過しているが、骨欠損のため趾の短縮を認めるものの感染の再燃はない。また、間欠跛行肢症例においては、治療前には 300m の下腿間欠跛行を呈していたのが、治療後 3 カ月でほぼ完全に症状が消失したケースもあった(症例 5)。

症例のまとめと今後の方針

以上より、実施した治療条件(投与用量: bFGF 100 μ g + 酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子 3mg)では、

現在までの8症例において臨床試験の継続を妨げるような有害事象の発生はなく、治療効果に関する感触もけって悪いものではなかった。安全性確保のため、投与用量がウサギモデルでの使用用量と同量で開始せざるを得なかったことを考慮すると、むしろ良好な結果ということもできるのではないだろうか。そのため現在われわれは、本臨床試験のnext stepとして、キャリアである酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子の用量は3mgに据え置いてbFGFの用量のみを増量した新たな臨床試験を計画中である。

文 献

- 1) 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**: H1588–H1595.
- 2) 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.
- 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) Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al: Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation*, 2001, **103**: 897–903.
- 5) Tateno K, Minamino T, Toko H et al: Critical roles of muscle-secreted angiogenic factors in therapeutic neovascularization. *Circ Res*, 2006, **98**: 1194–1202.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, **6**: 389–395.
- 9) 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.
- 10) Tabata Y, Yamada K, Miyamoto S et al: Bone regeneration of basic fibroblast growth factor complexed with biodegradable hydrogels. *Biomaterials*, 1998, **19**: 807–815.
- 11) Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD et al: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet*, 2002, **359**: 2053–2058.

Pinpoint Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor for the Treatment of Chronic Limb Ischemia

Hiroyuki Koyama,^{1,2} Takuya Hashimoto,^{1,2} Tetsuro Miyata,² Yoshihiro Yasuda,¹ 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: chronic limb ischemia, collateral circulation, basic fibroblast growth factor

Development of collateral vessels serves as therapeutic angiogenesis and is critical in treating chronic limb ischemia. To achieve this aim, we have developed a novel therapeutic strategy: we succeeded in delivering basic fibroblast growth factor effectively to a targeted site by using acidic gelatin hydrogel microspheres as carrier material. A clinical trial has been carried out to evaluate the safety and effectiveness of this strategy, and this article reports the progress of the trial. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 209–214)

Online publication June 8, 2007

脈管学 Vol. 47, 2007