

サイトカインによる末梢動脈閉塞性疾患に対する 血管新生療法：その現状と将来

米満 吉和^{1,2} 伊東 啓行³ 井口 博之³ 小野原俊博³ 前原 喜彦³

要旨：難治性末梢動脈閉塞性疾患(PAD)に対する新しい治療法として血管新生療法が注目され、国内外で臨床的評価が行われている。しかしながら、初期において有望な成績が示唆されていたにもかかわらず、多施設二重盲検による第II相試験では、多くのプロトコルが失敗に終わっている。本稿では、血管新生療法の現状と臨床試験の問題点、そしてわれわれが進めているまったく新しい組換えセンダイウイルスベクター(rSeV/dF)による臨床研究の現状を概括する。

(J Jpn Coll Angiol, 2007, 47: 491-497)

Key words: peripheral arterial diseases, intermittent claudication, critical limb ischemia, angiogenesis, recombinant Sendai virus

疾患の背景および現行の 治療的血管新生療法の問題点

(1) 疾患の特性

閉塞性動脈硬化症やバージャー病を代表とする末梢動脈閉塞性疾患(peripheral arterial disease: PAD)は、軽度な場合は、冷感やしびれ感(いわゆるFontaine I度)を、症状が進行するにつれ間歇性跛行(同II度, intermittent claudication: IC)を、さらには安静時疼痛(Fontaine III度)、潰瘍形成(同IV度)を呈するようになる。ICはQOLを著しく損なわない初期段階では保存的な薬物療法(シロスタゾールなど)、運動療法など、すでにエビデンスが蓄積された治療法が第一選択として行われる。さらに進行し、患者が歩行可能距離の短縮にQOLの低下を相当なレベルで感じる場合(一般に200m以下)には、血管内治療あるいは外科手術の適応となる。進行症例(Fontaine III・IV度, 重症虚血肢:critical limb ischemia: CLI)は、リスクファクターの除去、現行の薬物療法、外科的療法に反応せず、下肢切断を余儀なくされる場合が多い。下肢切断は患者のQOL(quality of life)を著し

く低下させるばかりでなく生命予後にも大きく関わり、下肢切断を行った患者の2年生存率は50%以下、特に透析患者では5年生存率は10%を下回ることが報告されており、したがって、これら重症のCLIに対し、下肢切断を回避(limb salvage)する治療法の確立が望まれている。

以上、PADの中でも積極的治療の対象となる病態は進行したICとCLIであることを述べたが、この両者は血行動態に基づく病態がまったく異なっている。両者は「虚血性疾患」としてよく混同されることがあるが、ICはあくまで相対的虚血であり、安静時には血流低下は存在するものの組織虚血ではない(虚血性の生体反応は見られない)。労作時に血液需要量が増加した場合に初めて組織虚血が誘発され、それが痛みとなって発現する。一方でCLIは絶対的虚血であり、安静時にも痛みを含む慢性的な虚血性反応が認められ、これがICとCLIの治療効果に対する臨床的評価を複雑なものにしている(Table 1)。

(2) 血管新生療法臨床的評価の現状

疾患の病態が虚血による組織障害である以上、治療の目指すところは虚血組織局所に有効な血流回復を誘

¹千葉大学大学院医学研究院遺伝子治療学

²九州大学大学院医学研究院遺伝子治療臨床研究準備室

³九州大学大学院医学研究院臨床医学部門消化器・総合外科学(第2外科)

2007年3月22日受理

Table 1 The current standard management of PAD

Claudication	CLI
Pathophysiology: ischemia, exercise-induced	Pathophysiology: ischemia, sustained at rest
Current management:	Current management:
1. Removal of risk factors - smoking secession, statins	1. Revascularization - most effective, bypass surgery, catheter intervention
2. Exercise	2. Amputation • No effective drug available • Loss of QOL, poor survival
3. Revascularization - most effective	
4. Cilostazol - evidence level A for IC	

導し、虚血状態を改善することにある。そのための治療戦略の一つとして、血管新生活性を有する細胞増殖因子を外来性に投与し積極的に血管新生を誘導することで血流回復、虚血改善を目指す。治療的血管新生療法「確立への模索が開始され、すでに約10年が経過しようとしている。

TASQ (TransAtlantic Inter-Society Consensus)より発行されている「Management of Peripheral Arterial Disease (PAD)」, 邦訳: 下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針(日本脈管学会編)によれば、特にCLIに対する有効性に関するエビデンスの確立した薬物療法はなく、また手術適応が限定されているため、治療的血管新生療法には多くの期待が寄せられている。治療的血管新生療法への初期の試みは血管新生因子蛋白を用いたものであり、数年後より血管新生因子を用いた遺伝子治療が開始、そして最近では骨髄単核球細胞や血管前駆細胞を比較的多く含むと考えられているCD34陽性細胞などによる細胞療法も試みられている。特に蛋白療法については、虚血性心疾患を含めすでに第II・III相試験の成績が公表されているが、初期試験では「安全かつ有効」とされてきた試験プロトコールが、後期相試験ではすべて「無効」と判定されている。遺伝子治療も同様で初期にはすべてのものが「安全かつ有効」とされてきたにもかかわらず、すでにVEGF (vascular endothelial growth factor)121やDe(developmentally regulated endothelial locus)1を用いた第II相試験では「無効」と判定されている。

このような初期試験と後期試験の成績の解離の原因

としていくつかの要因が考えられる。具体的には、対象となる病態の選択(ICか、CLIか?)、本疾患に特有の高いプラセボ効果、前治療や禁煙等の生活指導・歩行訓練などの有無、副次評価項目(いわゆる surrogate markers)測定不安定性、特にCLIについて、現行の主要評価項目の妥当性、など多くの因子が関与している。

以下に、これらの詳細について考察を試みる。

1) 対象となる病態の選択 (ICか、CLIか?)

すでに多くのエビデンスが蓄積されているように、ICに対して運動療法は有効であり、指導下で実施された運動療法により跛行誘発歩行距離・歩行可能距離は2倍以上になる。これは運動療法による運動耐容能と側副血行の増加によるものと考えられている。前述のごとくICの病態は相対虚血であり、したがって理論的に考えて、通常虚血状態ではない下肢に対して血管新生療法により血管数を増やすことが可能であったとしても、増加した血管が機能的にも維持されるか否かについては疑問が残る。また新しく血管が再生されたとして、そちらにドミナントに血流が流れてしまい、本来必要とされる部分の血流がスチールされる可能性も否定できない。前述したいわゆるnegative trialでは、対象がすべてICであることから、この考察は妥当性があるかもしれない。

一方でCLIでは絶対的に血流が足りない状態であるため、わずかに血管が再生したとしても、その結果がダイレクトに治療効果として結びつきやすいのではな

いかと理論的に考えられる。CLIに関して第II相試験結果が報告されているのは、Sanofi-Aventis社による欧州でのNV1-FGF(ヒトFGF-1を発現するプラスミドベクター)による遺伝子治療、ならびにAnGes MG社による米国でのTREAT-HGF(ヒトHGFを発現するプラスミドベクター)による遺伝子治療の2件である。前者ではCLIの客観的臨床評価に最も重要な、「下肢切断率の低下」が得られており、後者では下肢切断率、潰瘍治癒率などでは有意ではないものの、皮膚血行動態を示すsurrogate markerの一つであるtcPO₂で用量依存性の改善が得られている。これらの第II相試験結果から予測しても、血管新生療法の効能を評価する対象という観点からは、CLIのほうがより適していると考えられる。

2) 本疾患に特有の高いプラセボ効果

PADに対する薬剤の有効性判定で最も困難を伴うのは、いかにしてプラセボ効果を凌駕するかという問題である。例えば、前述のDel-1による遺伝子治療でも、プラセボ群が歩行距離などの指標で35%程度の改善を示しており、被験薬はこれを超えることができていない。本疾患の臨床試験にプラセボ効果がつきものである以上、これを超える効果を示す薬剤・治療法の開発が必要である。

3) 前治療や禁煙等の生活指導・歩行訓練などの有無

PADの日常診療を行っている血管外科医はよく経験するが、慢性のFontaine IV度の患者の潰瘍は、禁煙などを含みリスクファクターの除去と入院・生活指導、投薬、そして運動療法等である程度改善することが知られており、特にこの傾向は若年者のバージャー病に強い。血管外科医からの血管新生療法への批判として、「distal bypassを含めて、これら前治療がしっかりと行われたうえで難治性となっているCLIで同様の効果が出ているならば認められるが、バージンケースで効果があったと言われても、一体血管新生療法の結果なのか、入院やそれによる禁煙の効果なのか判定できない」と述べられるゆえである。したがって、臨床的有効性評価を行うという観点からは、しっかりとしたプラセボ群をおき、これらの前治療に配慮した試験デザインを採用する必要がある。

4) 副次評価項目(いわゆるsurrogate marker)測定の不安定性と問題点

ICの基本病態「相対虚血かつ生存率」から判断し、現在のICに対する主要エンドポイントは跛行出現距離と最大歩行時間・距離であり、これはQOLの維持・向上を最大の目的としたものである。この測定法はすでに十分に確立しており、かつ試験担当施設間でのばらつきも少ないため、ICの臨床試験は比較的实施しやすい。

一方CLIの場合、基本的な臨床像が「死亡率・心血管イベント率の増加、下肢切断」であることから、欧米での主要エンドポイントは「心血管系イベント発生率の低下、肢切断の回避状態での生存率+肢切断回避率: amputation-free survival」が客観性・安定性の高いゴールドスタンダードである。しかし、これが血管新生療法によるベネフィットを検出できる感度を持つか否かについては、議論が残るところである(後述)。

以上の背景から、血管新生療法の基本コンセプトを間接的に示唆する副次エンドポイント(パラメータ)として、血行動態の変化に関するパラメータ(ankle-brachial index: ABI, tcPO₂など)が使用されている。しかし、これらのパラメータの改善が、治療のベネフィットと繋がるか否か、については、今なお否定的見解が多数を占める。これは例えば抗悪性腫瘍剤の臨床評価と同等の問題をはらんでおり、「腫瘍が小さくなる」というパラメータが「生存率が延長する」というベネフィットに必ずしも寄与しないのと同様、「多少の血行の改善」が「心血管イベント発生率の低下と肢切断率の低下」に必ずしも寄与しないのは明らかである。

また血行動態パラメータは、施設間におけるデータのばらつきが大きいことも、重大な問題である。NV1-FGFの第I相試験ではABIの有意な上昇が観察されていたが、第II相試験ではプラセボと有意差が得られなかったことなどは、その代表的な例である。一方で、大阪大学で実施されたTREAT-HGFの成績ではtcPO₂の変動が大きく、一定の傾向は見られなかったにもかかわらず、米国での第I相試験では30mmHgという基準値を超える症例数が用量依存性に得られていることから考察しても、これら血行動態検査に十分な経験を持つ施設を集めて試験を行うことの重要性が示唆される。

5) 特にCLIについて、現行の主要評価項目の妥当性

前述のごとく、CLIに関する欧米での主要エンドポ

Table 2 Regulatory process of SeVAT trial at Kyushu University Hospital

IRB Processing (1 yr & 1 mo)		
2001	8/17	Clinical study plan has been submitted to IRB
2002	9/26	Approved by IRB
Processing in MHLW (3 yrs & 3 mo)		
2002	8/17	Clinical study plan has been submitted to MHLW
2003	2/17	1st Review and Hearing
	3/25	Revision suggested
	9/26	Revised study plan has been submitted to MHLW
2004	3/15	2nd revision suggested
	6/15	Revised study plan has been submitted to MHLW
	6/17	2nd Review and Hearing
	6/30	Revision suggested
	10/18	Revised study plan has been submitted to MHLW
2005	2/7	3rd Review and Hearing
	2/15	Review board: 'review has been almost completed' Revised study plan has been submitted to MHLW
	6/15	Revision suggested
	10/12	Review board: 'application has been approved'
2006	1/31	Official letter for approval from Minister of MHLW

IRB: institutional review board, MHLW: Ministry for Health, Labor, and Welfare

イントは「心血管系イベント発生率の低下、肢切断の回避状態での生存率+肢切断回避率：amputation-free survival」が客観性・安定性の高いゴールドスタンダードである。しかし、これが血管新生療法によるベネフィットを検出できる感度を持つか否か、については議論が残るところである。

これまで薬剤の試験では、CLIに対するプロトコールはすべて失敗に終わっている。しかし現行の血行再建に関しても、成功事例では有効であることは間違いないが、失敗例における肢切断率は60%を超えるため、その適応には厳密である必要がある。その意味からも血管新生療法の要求性は高いため、今後の進展が望まれる。

ヒトFGF-2遺伝子発現非伝搬型組換え センダイウイルスベクターによる 遺伝子治療臨床研究

(1) 本臨床研究に至る経緯

このような研究の歴史は、虚血性疾患に対する血管新生療法の確立の困難さを示している。しかしながら、われわれは戦略の限界を示唆するものであるとは考えて

いない。特に蛋白療法、遺伝子治療の場合、外来性に投与される細胞増殖因子は、もともと内因性に存在するものがほとんどで、元来半減期が短い血管新生因子について、焼け石に水程度の外来性因子を投与しても有効性につながりにくいことは容易に想像がつく。つまり内因性レベルと比較した有効域の決定は極めて大切な検討項目であるにもかかわらず、現行の治療的血管新生療法においてその基礎データを踏まえて行われているものはほとんどない。さらに、用いる治療因子の科学的必然性にも乏しい。したがって、治療的血管新生療法の確立を目指した研究はいまだ発展途上である。その戦略の妥当性は多くの動物実験において世界中が確認している以上、今後、有効性を

示すレベルに至る可能性を十分秘めていると考える。

以上の背景のもと、われわれは「圧倒的な治療効果を示す血管新生療法の確立」を目指し、独自に開発を進めている非伝搬型組換えセンダイウイルスベクター (recombinant Sendai virus: rSeV/dF) による遺伝子治療臨床研究を立案、治療遺伝子としてヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (hFGF-2) との組合せが既存法と比較して最も高い治療効果を示すことを明らかにし、施設倫理委員会の承認後、厚生科学審議会へ実施申請書を提出した。rSeV/dF-hFGF2の優れた治療効果とその分子メカニズムに関する基礎研究の成果は他に譲るが¹⁻¹⁰⁾、合計4年半の経過を経て、本臨床研究プロトコールが正式に大臣承認を得た(2006年1月31日付、Table 2)

(2) 本臨床研究の内容

本臨床研究は、世界初の遺伝子治療ベクターを用いた臨床研究であることを鑑み、抗癌剤と同様のオープンラベル、4段階の用量漸増式第I・IIa相試験として計画されている (Fig. 1)。動物実験の結果から推測して、最低用量はプラスミドレベルの発現と同等と考えら

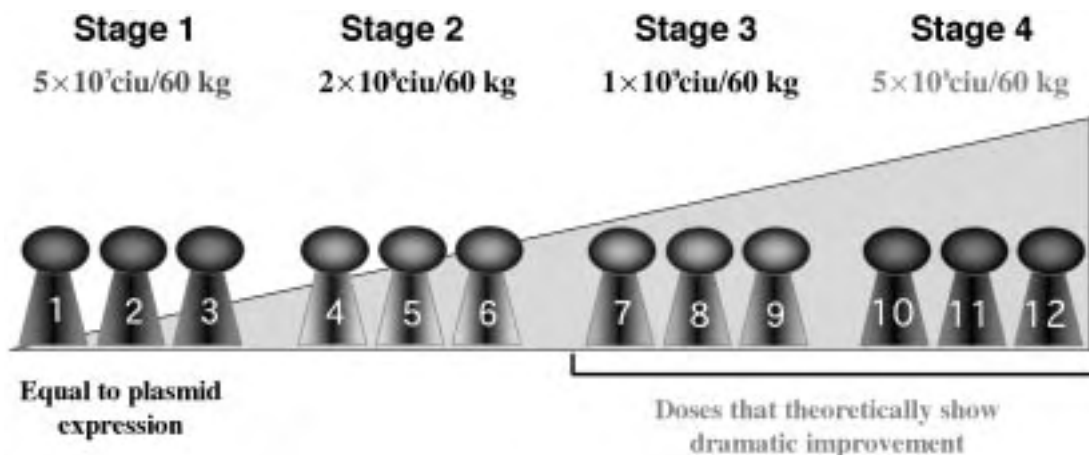


Figure 1 Design of JPAD-SeVAT trial.

JPAD-SeVAT: Japan PAD trial for SeV-mediated Angiogenic Therapy at Kyushu University Hospital

れ、高用量ではrSeV/dFの最大のパフォーマンスが発揮できると期待される。将来的に製剤開発を前提にしていることから、本臨床研究は外部contract research organization(CRO)のデータマネージメントによる新 good clinical practice(GCP)準拠試験として実施されており、第三者委員会による厳密な適応決定を実施していることから、複数回の血行再建術の結果、他に治療法がない症例が選択される傾向にある。被験者の正式なリクルートは2006年4月より開始されている。

(3) 症例提示

CROによりデータ仮固定が終了した第1例目の症例を提示する(Fig. 2A, 1カ月目まで)。

症例(登録番号102)は59歳男性で、右のCLIであり安静時疼痛が存在するが、虚血性潰瘍なし。3度のバイパス手術が実施されているが、いずれも閉塞しており、遺伝子治療の適応評価のため紹介となった。血管造影上、右総腸骨動脈高位より腸骨 - 大腿動脈全長が閉塞し、右下肢の血流は腰動脈からの側副血行路により唯一開存する深大腿動脈を経由して下肢を栄養。右膝窩動脈も閉塞しており、側副血行路により右腓骨動脈の末梢1/2のみ開存が認められる(Fig. 2B)。血管造影上はさらなる血行再建も不可能ではないと考えられたが、4度目の閉塞の可能性が高く、バイパス閉塞時には下肢切断に至る可能性も高いため、遺伝子治療の適応とされた。2006年7月4日に投与が実施された(Fig. 2C)。

投与後の経過は順調であり、重篤な有害事象の発生は認めていない。データ仮固定が終了している1カ月後のデータでは、最大歩行距離は約50%改善し、血管造影上、新たに描出される血管を認める(Fig. 3)など、最低用量にも関わらず10種の評価項目中4項目で改善が得られている。

ただし現時点ではまだ症例がわずかであり、観察期間も短いため、特に安全性に留意しつつ慎重かつ速やかに臨床研究を進めていく計画である。

おわりに

初期にセンセーショナルに喧伝された血管新生療法は、臨床評価を受けることにより、その問題点も明らかになってきた。しかしそれは、ようやく地に足を付けた評価が始まったということであり、今後次第にその効果と限界、そして明確な適応が明らかになってくるものと考えられる。

特にCLIは、血行再建不能例に関しては悪性腫瘍と同等な死亡率を示すことから、米国では「un-met medical needs」として捉えられている。その意味からも血管新生療法への期待は大きい。蛋白治療、遺伝子治療だけでなく細胞移植療法も、この観点から厳密なプラセボ対照試験を行い、臨床現場での意味づけを明確にすることによって、初めてその真価が明らかになるであろう。

最近TASC IIが発表されたが、今後の改訂において、血管新生療法がエビデンスレベルAのfirst line治療とし

Case 102 59 yo, male

Diagnosis : Arteriosclerosis Obliterans of Rt. Lower extremity
 - Fontaine III, Rutherford II-4

History : IC has been conscious since 1998.
 He underwent bypass surgery 3 times; however, all grafts were obstructed,
 and followed as an outpatient with medication.
 Recently, he feel rest pain, and therefore, admitted to Kyushu University.
 Hospital to be involved as a possible candidate of SeVAT trial.

Past history :
 1999 Aorto-rt. Femoro- popliteal (BK) bypass
 2000 Rt. Femoro- popliteal (BK) bypass
 2002 Rt. Femoro- peroneal bypass
 Smoking : 30/day, 40 yrs (already secessed)
 Hypertension



Figure 2 Case report of the first patient (Case 102) for SeVAT trail.

A: Summary of clinical history
 B: Angiogram (pretreatment)
 C: Panels indicating vector preparation (left), preparation for injection (middle), injection procedures (right).

A | B
 C |

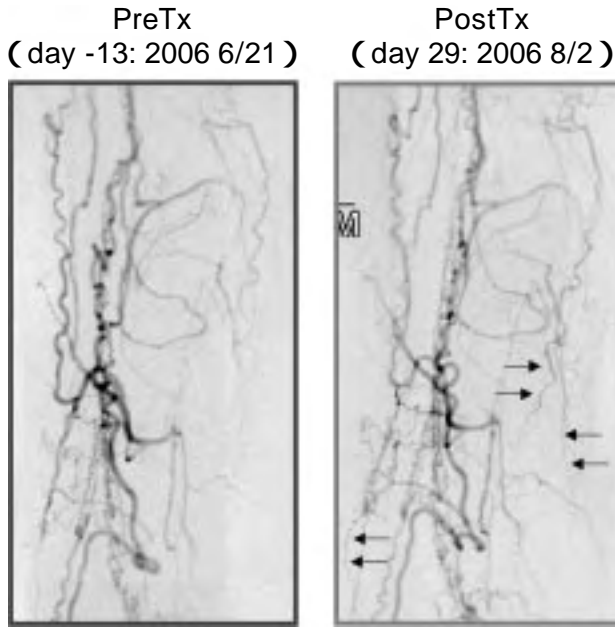


Figure 3 Angiograms pre- and post-treatment by SeV/dF-hFGF2. Arrows indicate newly visible blood vessels.

て認知される日が来るのは、そう遠くないかもしれない。

文 献

- 1) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S et al: Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**: 970–973.
- 2) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A et al: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*, 2002, **90**: 966–973.
- 3) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tanii M et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res*, 2002, **91**: 923–930.
- 4) Shoji T, Yonemitsu Y, Komori K et al: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates endothelial dysfunction and inhibits intimal hyperplasia of vein grafts in poor runoff limbs of rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **285**: H173–H182.
- 5) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada N et al: Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis *in vivo*: role of PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res*, 2004, **94**: 1186–1194.
- 6) Tanii M, Yonemitsu Y, Fujii T et al: Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circ Res*, 2006, **98**: 55–62.
- 7) Kaneko K, Yonemitsu Y, Fujii T et al: A free radical scavenger but not FGF-2-mediated angiogenic therapy rescues myoneuropathic metabolic syndrome in severe hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, **290**: H1484–1492.
- 8) Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M et al: Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**: 2483–2489.
- 9) 米満吉和：血管新生因子：bFGF/FGF-2塩基性線維芽細胞増殖因子。脈管学，2006，**46**：297–304。
- 10) 藤井孝明，米満吉和：遺伝子治療bFGF/FGF-2による血管新生因子の階層的発現制御機構。Angiology Frontier，2006，**5**：19–24。

Cytokine-induced Angiogenesis as a Therapeutic for PAD: Current Status and Future Directions

Yoshikazu Yonemitsu,^{1,2} Hiroyuki Ito,³ Hiroyuki Inoguchi,³ Toshihiro Onohara,³ and Yoshihiko Maehara³

¹Department of Gene Therapy, Chiba University Graduate School of Medicine, Chiba, Japan

²Operating Unit for Clinical Trials for Gene Therapy, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

³Department of Surgery and Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Key words: peripheral arterial diseases, intermittent claudication, critical limb ischemia, angiogenesis, recombinant Sendai virus

Therapeutic angiogenesis has been an attractive option to treat patients with intractable peripheral arterial diseases (PAD). A number of clinical studies have been performed, yet limited outcomes have been reported in phase II multicenter, placebo-controlled studies, even though phase I studies showed promising results. We summarize the current status of the clinical studies for cytokine-induced therapeutic angiogenesis, and discuss what needs to be addressed for success in this field. (J Jpn Coll Angiol, 2007, **47**: 491–497)