

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

橋本 拓弥^{1,2} 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：肢虚血患者を対象とし、酸性ゼラチンハイドロゲルを用いた bFGF の選択的徐放投与による血管新生治療の第 I 相試験を行った。8 肢 8 症例 (ASO 5 肢, TAO 3 肢; 重症虚血 5 肢, 跛行 3 肢) が bFGF 蛋白 100 μg の経動脈投与を受け、6 カ月以上にわたり副作用と治療効果について評価された。重篤な副作用は認められず、症状に関しても、一時的なものも含めると、すべての症例で安静時痛や跛行の改善を認めた。本治療法の安全性、忍容性を確認することができた。

(J Jpn Coll Angiol, 2010, 50: 315-322)

Key words: basic fibroblast growth factor (bFGF), peripheral arterial disease, therapeutic angiogenesis, microsphere

序 言

わが国でも、動脈硬化性疾患の母数増加に伴い、閉塞性動脈硬化症 (ASO) などによる重症虚血肢患者が増えている。手術あるいは血管内治療による血行再建が困難な No option の患者も増加していくことは確実であり、今後ますます大きな臨床上の問題となっていくものと考えられる。

血管新生療法は、おもにこのような患者を対象として、血管新生を誘導することにより、細く未成熟な側副血行路を太く機能的な構造に育て、慢性虚血部位に対する血行を改善すべく開発されてきた治療法であり、自家細胞移植と、血管新生を促す因子の遺伝子導入もしくは蛋白投与に大別される。とくに半減期が短い蛋白投与による治療では、効率的なドラッグ・デリバリー・システム (DDS) が必須だと考える。

われわれは、ASO あるいは Buerger 病 (TAO) による重症虚血肢および間欠跛行肢患者を対象として、酸性ゼラチンハイドロゲル微粒子 (acidic gelatin hydrogel microspheres; AGHM) 動注による bFGF (basic fibroblast growth

factor) 蛋白のピンポイントデリバリー法を用いた臨床試験を行った¹⁾。治療法開発の経緯と第 I 相試験の結果、今後の展望について報告したい。

背 景

AGHM は、田畑らにより開発された DDS で、bFGF 蛋白を結合させて生体に投与した場合、数週間にわたり bFGF を徐放する性能をもち、その生体内での分解曲線が明らかにされている^{2,3)}。ゼラチンの重合度により、およそ 2 週間にわたり bFGF を持続的にデリバリーするように調節可能であり、平均直径 29 μm の球形の微粒子に調製した場合、経動脈投与により、ターゲットとなる発育不良の側副血行路に選択的に分布する (Fig. 1)。

本治療法の治療効果と安全性の評価は、まずウサギ慢性虚血肢モデルを用いて検証された。日本白色ウサギ (体重 3.0~3.5 kg) の左下肢大腿動脈を全長にわたり切除し、28 日間経過させることにより慢性虚血を作成した。このモデルで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、同側の内腸骨動脈となる。この左内腸骨動脈に、100 μg の bFGF を結合させた 3 mg の AGHM の浮遊液を注射した。微粒子動注の安全性については投与前後の下腿動脈圧測定と色素微

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

2009 年 8 月 5 日受付 2010 年 1 月 9 日受理

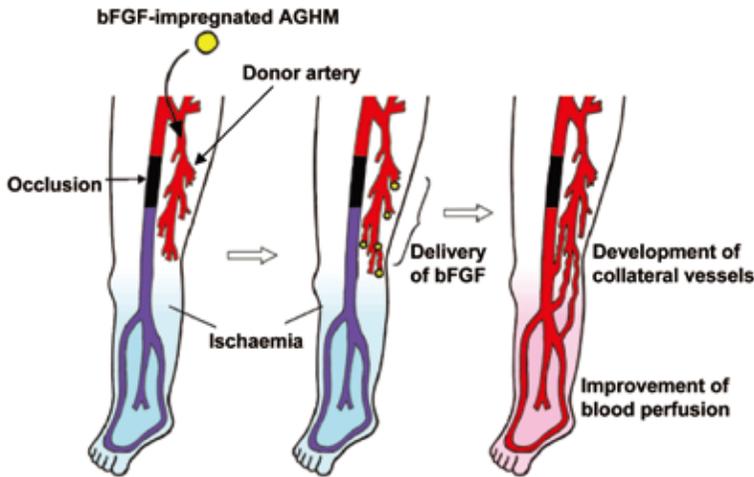


Figure 1 Selective delivery of bFGF using acidic gelatin hydrogel microspheres (AGHM). bFGF-impregnated AGHM (yellow circles) injected via the donor artery. Based on our preclinical results, AGHM are expected to be trapped in the distal portion of the donor artery (target of delivery) and to continuously release bFGF for 2 weeks. Reprinted from Eur J Vasc Endovasc Surg, 38, Hashimoto, Selective and Sustained Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) for Treatment of Peripheral Arterial Disease: Results of a Phase I Trial, 71-75, 2009, with permission from Elsevier.

粒子を用いた区域血流測定で評価し、肢の虚血増悪を惹起することはなかった。また、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⁴⁾。

対象と方法

動物モデルによる良好な結果を受け、東京大学医学部倫理委員会の承認のもと、安全性を評価する第 I 相試験を行った。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、ASO または TAO を原因疾患とした Fontaine 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、ASO による Fontaine 分類 II 度症例を適応とした(**Table 1**)。適応除外条件については、これまで報告されている血管新生療法とほぼ同様であり^{5,6)}、活動性の糖尿病性網膜症や悪性疾患の除外をとくに慎重に行った(**Table 1**)。治療は、患者本人へ十分な説明を行い、同意書を取得した後、入院して実施された。

具体的には、血管造影室において血圧・心電図モニター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 donor artery にカテー

テル先端を進め、そこから bFGF を結合させた AGHM の浮遊液 10 ml 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(**Table 2**)。治療後急性期の安全性を評価するため、投与後最低 3 日間入院として、局所・全身の臨床症状の観察と経時的な血圧測定、血液検査、尿検査を施行した(**Table 3**)。ELISA 法による血中 bFGF 濃度の測定に際しては、ヘパリンの存在で bFGF 濃度が影響を受ける可能性があるため、投与時のヘパリンの使用量は最小限とした。また観察期間にヘパリン治療を併用した症例はなかった。長期的な安全性の評価としては、治療後 6 カ月と 1 年に増殖性網膜症と悪性腫瘍のスクリーニングを行った(**Table 4**)。また、虚血肢の状態と症状の改善に関する評価は 6 カ月間にわたり経時的に行われ、安静時の足関節上腕血圧比(上肢の場合は罹患肢/非罹患肢の血圧比)、トレッドミルテスト(跛行症例)、経皮酸素分圧測定(TcPO₂)、皮膚灌流圧測定(SPP, 重症虚血症例)、血管造影, SF-36, WIQ(跛行症例)が用いられた(**Table 5**)。

結 果

2004 年から 2008 年の 4 年間に初回治療を受けフォローアップを終了した 8 肢 8 症例が評価の対象となった。内訳としては、重症虚血肢 5 症例のうち ASO が 2 例、TAO が 3 例で、間欠跛行肢は 3 症例であった。また、下肢虚血が 5 症例、上肢虚血が 3 症例であった(**Table 6**)。

Table 1 Inclusion and exclusion criteria for enrollment

| |
|---|
| · Inclusion Criteria for Enrollment |
| –Non-reconstructible CLI patients (Fontaine III and IV) due to ASO or TAO |
| –IC patients (Fontaine II) due to infra-inguinal ASO |
| · Exclusion Criteria |
| –Malignancy within 5 years |
| –Proliferative retinopathy |
| –Alcohol or drug abuse within 3 month |
| –Allergy to AGHMs |
| –Severe coronary or cerebrovascular disease |

Table 2 Protocol for administration of bFGF-impregnated AGHM

| |
|---|
| 1. Intravenous line making |
| 2. Blood pressure, SpO ₂ , and EKG monitoring in angiography suite |
| 3. Insetion of 4 Fr sheath via the femoral artery under local anesthesia |
| 4. Digital subtraction angiography |
| 5. Insertion of 4 Fr straight catheter into the deep femoral artery |
| 6. Confirmation of catheter tip by small dose of contrast medium |
| 7. Manual slow infusion of bFGF-impregnated AGHM suspension (10 ml) |
| 8. Removal of the catheter and the sheath. Hemostasis by manual compression |

Table 3 Assessment plan for acute side-effects

| | Baseline | Day 0 | Day 1 | Day 3 | Day 7 |
|-------------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|
| Renal function | | | | | |
| Urinalysis | ● | ● | ● | | |
| Blood tests (BUN, Cre) | ● | ● | ● | ● | ● |
| Liver function | | | | | |
| Blood tests (AST, ALT) | ● | ● | ● | ● | ● |
| Respiratory status | | | | | |
| SpO ₂ monitoring | ● | | | | |
| Temporary hypotensive effect | | | | | |
| Blood pressure monitoring | ● | | | | |
| Allergy to AGHM | | | | | |
| Intradermal testing of AGHM | ● | | | | |
| Emboli due to lodging of AGHM | | | | | |
| Blood tests (CK, LDH) | ● | ● | ● | ● | ● |

Table 4 Assessment plan for retinopathy and malignancy

| | Baseline | 6 months | 1 year |
|----------------------------------|----------|----------|--------|
| Screening for retinopathy | | | |
| Funduscopy | ● | ● | ● |
| Screening for malignancy | | | |
| Chest X-ray | ● | ● | ● |
| Urine cytodiagnosis | ● | ● | ● |
| Upper gastrointestinal endoscopy | ● | | |
| Fecal occult blood test | ● | | |
| Rectal examination | ● | | |
| Breast examination (female) | ● | | |
| Tumor marker tests* | ● | ● | ● |

*Tumor marker tests includes CEA, CA19-9, AFP, CA125, SCC, and PSA (for males).

Table 5 Evaluation protocol for ischemic condition

| | Baseline | 1 month | 3 months | 6 months |
|--------------------------------|----------|---------|----------|----------|
| Objective tests | | | | |
| ABPI or pressure index for ASO | ● | ● | ● | ● |
| Treadmill study for IC | ● | ● | ● | ● |
| TcPO ₂ | ● | ● | ● | ● |
| SPP for CLI | ● | ● | ● | ● |
| Angiography | ● | ● | | ● |
| Subjective tests | | | | |
| SF-36 | ● | ● | ● | ● |
| WIQ for IC | ● | ● | ● | ● |

ABPI, ankle-brachial pressure index; IC, intermittent claudication; TcPO₂, transcutaneous PO₂; SPP, skin perfusion pressure; CLI, critical limb ischaemia; SF-36, short form-36; WIQ, walking impairment questionnaire

まず安全性に関して、治療後の副作用を評価するプロトコルは、報告されているものとしては bFGF による腎機能障害と血管拡張作用による一過性の血圧低下^{5,6)}、可能性のあるものとしては AGHM による塞栓・血栓の形成を念頭において作成していた。血圧低下に関しては、2 例において治療直後数分から 20 mmHg 程度の低下が認められたが、いずれも 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 上昇を認めたものが 2 例あった。一方、当試験においては、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。また、1 年以上のフォローアップで、治療後に悪性疾患や増殖性網膜症の発生はなかった。ELISA 法で各時点の bFGF 濃度を測定したが、治療当日に低濃度(最大 24 ng/ml)検出されるのみで、その後は検出限界の 10 ng/ml 以下であった。

臨床症状の観察においては Table 6 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。また、6 カ月を超えるフォローアップ期間中に肢切断に至った症例はなかった。

治療前の重症度別に具体的な経過をみていくと、Fontaine 分類 IV 度であった 4 症例のうち 1 症例(ASO)のみ、難治性であった潰瘍が完全に治癒した(症例 2, Fig. 2)。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 3 年半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潰瘍の再燃はない。残りの 3 症例は治療後 6 カ月の時点で潰瘍の縮小もしくは壊死部の乾燥を得たが、うち 1 例(TAO)では、壊死部の一過性の感染を経験している(症例 3)。この症例ではその後治療後 6 カ月で壊死部が乾燥し、3 年のフォローアップで安静時痛の再燃はない。症例 1(ASO)は、治療直後から手指のチアノーゼと疼痛が改善し、その後も温感が持続したが、手背の潰瘍自体は軽度の縮小に留まっていたため、6 カ月後に 2 回目の治療を受けた。その 1 カ月後に疼痛がなくなり、最終的には 4 年後に潰瘍が消失してその後の再燃を認めていない。症例 4(TAO)では治療後 6 カ月で手指壊死部が乾燥し、疼痛も軽快した。1 年後に新たに足趾壊死を生じたため、下肢についても同治療を行い、2 回目の治療後 1 カ月の時点では疼痛の改善を認めていたが、残念ながらその後ロストフォローとなっている。

安静時痛を呈していた 4 症例(Fontaine 分類 III・IV 度)では、1 例で治療後 4 カ月に完全に疼痛が消失し、その後 2 年以上再燃を認めていない。残り 3 例も 6 カ月の時点でかなりの疼痛改善を認めた。

また、Fontaine 分類 II 度の症例は、3 症例すべてで 3 カ月後の最大歩行時間と跛行出現時間が延長し(Table 1)、うち 1 例(ASO)では、300 m の下腿間欠跛行が完全に消失した(症例 7)。ただし、症例 6(ASO による浅大腿動脈閉

Table 6 Clinical and Laboratory Findings Before and 6 Months After Intra-arterial Administration of bFGF-impregnated AGHM

| Case | Age, sex | Study type | Vascular disease | Affected limb | Signs and symptoms | Changes in signs and symptoms | Pressure index [†] | tcPO ₂ /control | SPP/sBP | Treadmill study (min) |
|------|----------|------------|------------------|---------------|----------------------------|---|-----------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|
| 1 | 61M | CLI | ASO | Upper | Ulcer, rest pain | Ulcer slightly diminished in size, and rest pain markedly improved* | +0.07 | +1.0 (+6.8%) | +16.0 (+358.1%) | - |
| 2 | 72M | CLI | ASO | Lower | Ulcer, bone necrosis | Ulcer healed by good granulation | -0.04 | +38.6 (+55.1%) | -10.0 (-32.9%) | - |
| 3 | 36M | CLI | TAO | Upper | Finger gangrene, rest pain | Gangrene worsened transiently, but rest pain markedly improved [§] | - | -27.9 (-28.5%) | +5.3 (+11.4) | - |
| 4 | 51M | CLI | TAO | Upper | Finger gangrene, rest pain | Gangrene became dry, and rest pain markedly improved | - | +88.3 (+110.2%) | -6.0 (-16.3%) | - |
| 5 | 39M | CLI | TAO | Lower | Rest pain | Rest pain disappeared | - | +48.2 (+87.1%) | -6.3 (-19.1%) | - |
| 6 | 84F | IC | ASO | Lower | IC (200 m) | Walking distance improved to 500 m at 1 month, but stenotic lesion newly appeared at another site | -0.15 | -4.1 (-4.2%) | - | MWT +0.60 COT +0.70 |
| 7 | 67M | IC | ASO | Lower | IC (300 m) | IC disappeared at 3 months | -0.07 | +7.2 (+5.4%) | - | MWT >+11.08 COT >+18.68 |
| 8 | 81F | IC | ASO | Lower | IC (100 m) | IC markedly improved at 6 months | -0.03 | +27.6 (+32.6%) | - | MWT +5.90 COT +7.20 |

*Case 1 underwent repeated treatment 6 months later. The ulcer had completely healed at 4 years after the first treatment. [§]Case 3 suffered transient worsening of gangrene because of infection in the affected finger. [†]Pressure index indicates resting ankle-brachial pressure index (ABPI) or the ratio of systolic blood pressure of the affected / non-affected upper arm. M, male; F, female; CLI, critical limb ischemia; IC, intermittent claudication; ASO, arteriosclerosis obliterans; TAO, thromboangiitis obliterans (Buerger's disease); tcPO₂, transcutaneous oxygen pressure; SPP, skin perfusion pressure; MWT, maximum walking time; COT, claudication onset time. Reprinted from Eur J Vasc Endovasc Surg. 38, Hashimoto, Selective and Sustained Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) for Treatment of Peripheral Arterial Disease: Results of a Phase I Trial, 71-75, 2009, with permission from Elsevier.



Figure 2 Ulcer healing process in case No. 2. 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. Black arrow indicates ulcer lesion. The ulcer of the 4th toe with osteomyelitis was healed and dry 5 months after treatment. The white arrow in the lower column indicates the infected phalanx proximalis, which was discharged from the ulcer before 5 months after treatment.

塞)では、6カ月後に同側大腿深動脈に新たな狭窄病変が出現したため、大腿・膝窩動脈バイパスを施行している。

6カ月後のtcPO₂に関しては8症例中6症例で改善していたが、足関節上腕血圧比、SPP、質問紙によるQOL評価でははっきりした傾向を認めず、今回は対象疾患と重症度が多岐にわたること、症例数が少ないことから、いずれも統計学的な検討まで至っていない。血管造影検査に関しては、側副路の発達を思わせる所見も散見されたが(Fig. 3)、定量的評価項目としての使用は控えた。

考 察

以上より、今回実施した治療条件(投与用量：bFGF 100 µg + AGHM 3 mg)では、8症例において、軽度の一過性血圧低下とCPK上昇をそれぞれ2症例に認めたも

の、臨床試験の継続を妨げるような有害事象の発生はなく、ウサギモデルと同量の投与量で試験を開始したことを考慮すれば治療効果に関しても良好な反応が得られた。また、治療後の血中bFGF濃度の上昇は軽微に留まり、徐放によるデリバリーが、腎機能障害に代表されるbFGFの全身性副作用を回避するうえで役立っている可能性が十分考えられた。現在われわれは、本臨床試験の次の段階として、キャリアであるAGHMの用量は3 mgに据え置き、bFGFの用量のみを増量する、第I-II相のDose escalation trialを計画中である。

なお、この論文の要旨は、2009年に雑誌「European Journal of Vascular and Endovascular Surgery」にて発表済みである(文献1)。

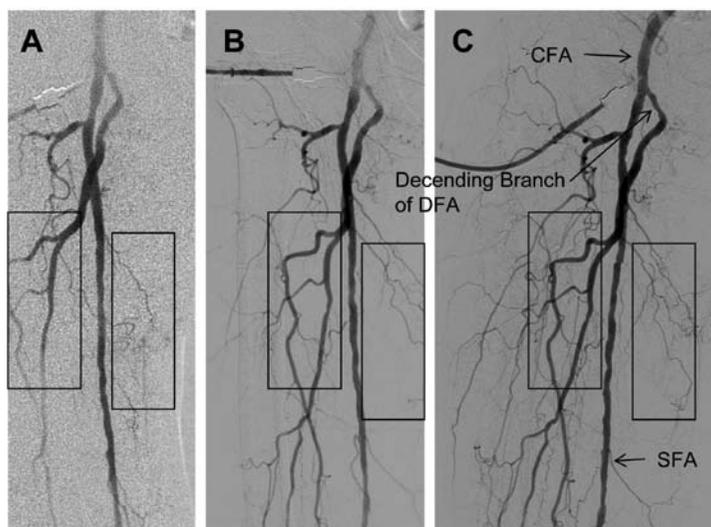


Figure 3 CT angiography before treatment shows occlusion of the right distal superficial femoral artery in case No. 8. Angiographic findings are shown in the comparison between before (A), 1 month (B), and 6 months (C) after treatment. There appears to be progressive growth of collateral vessels from the deep femoral artery that serves as a donor artery (the area enclosed by two boxes). Rt, right; CFA, common femoral artery; DFA, deep femoral artery; SFA, superficial femoral artery.

文 献

- 1) Hashimoto T, Koyama H, Miyata T et al: Selective and sustained delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) for treatment of peripheral arterial disease: results of a phase I trial. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009, **38**: 71–75.
- 2) Tabata Y, Hijikata S, Muniruzzaman M et al: Neovascularization effect of biodegradable gelatin microspheres incorporating basic fibroblast growth factor. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1999, **10**: 79–94.
- 3) Tabata Y, Ikada Y: Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities. *Biomaterials*, 1999, **20**: 2169–2175.
- 4) 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.
- 5) Lazarous DF, Unger EF, Epstein SE et al: Basic fibroblast growth factor in patients with intermittent claudication: results of a phase I trial. *J Am Coll Cardiol*, 2000, **36**: 1239–1244.
- 6) 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.

Selective and Sustained Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) for Treatment of Peripheral Arterial Disease: Results of a Phase I Trial

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

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

²Division of Vascular Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

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

Key words: basic fibroblast growth factor (bFGF), peripheral arterial disease, therapeutic angiogenesis, microsphere

The aim of this study was to evaluate the safety of selective and sustained delivery of basic fibroblast growth factor (bFGF) using acidic gelatin hydrogel microspheres (AGHM) for the treatment of peripheral arterial disease (PAD). We conducted a nonrandomized and uncontrolled trial involving prospective observation of 8 patients (8 limbs) with PAD - 5 limbs with arteriosclerosis obliterans and 3 limbs with thromboangiitis obliterans, 5 limbs (3 arms and 2 legs) with critical limb ischemia (CLI) and 3 limbs with intermittent claudication (IC), followed up for 6 months or more. AGHM suspension containing 100 µg bFGF was infused into the artery of the affected limb. Besides evaluation of safety and changes in symptoms, resting ankle-brachial pressure index measurement and transcutaneous PO₂ (tcPO₂), angiography was conducted at baseline and then at various time points. Skin perfusion pressure as an index of CLI and claudication distance as an index of IC were also used to assess clinical improvement and limb perfusion. No serious adverse events were observed. All cases showed improvement in symptoms, although this was temporary in some patients. Selective delivery of bFGF using AGHM was suggested to be safe and well-tolerated in patients with PAD. (J Jpn Coll Angiol, 2010, **50**: 315–322)