

## 血管新生遺伝子治療の臨床応用の現況

中神 啓徳

**要 旨**：血管新生治療とは虚血部位局所に血管新生誘導分子を直接注入することで新しい血管を作成し、血流の改善を図ることにより虚血性疾患を治療するコンセプトである。われわれは血管新生を誘導する新しい分子として HGF (hepatocyte growth factor) に着目し、HGF 遺伝子プラスミド投与によりラットあるいはウサギでの虚血肢の血流改善および血管新生能亢進を見出した。さらに、臨床研究として従来の内科的治療に反応せず外科的治療が困難な 22 症例に対する安全性および有用性を見出した。

(J Jpn Coll Angiol, 2011, 51: 457-460)

**Key words**: angiogenesis, endothelial cells, VEGF, HGF

### はじめに

現状医療における難治性疾患に対しての新しい治療法のひとつとして遺伝子治療は期待されている。遺伝子治療の遂行のためにはそれぞれの病態の解明とそれに対する有効な治療用遺伝子が必要不可欠であり、医療の需要とその疾患の研究の成熟具合がうまくマッチングすることによって臨床応用への道が開け、トランスレーショナルリサーチが遂行されることとなる。遺伝子治療に関しては、従来、癌・先天性疾患に対する需要が大半であったが、徐々に増殖因子を用いた血管新生治療の臨床研究も遂行されるようになってきている<sup>1,2)</sup>。

### 血管新生遺伝子治療

米国タフツ大学の Isner らのグループが血管内皮増殖因子である VEGF (vascular endothelial growth factor) を虚血性疾患への遺伝子治療に用いて有効性を証明したことで、遺伝子治療をはじめとした高度先進医療の標的疾患として下肢および心臓での虚血性疾患がクローズアップされてきた。基礎的な検討から VEGF をはじめとした血管新生能を有する増殖因子は、細胞外マトリックスを分解しそこに内皮細胞を増殖・遊走させることで新しい血管を構築する能力を有することが明らかとなってきた。このような血管新生因子を用いて新しい血管を作ること

による虚血性疾患の治療法は therapeutic angiogenesis と呼ばれる (Fig. 1)。そこで、どのような形でこの VEGF などの増殖因子を虚血患部に効率的に投与するかに関して、遺伝子治療も含めたいくつかの検討がなされた。動物モデルでの検討において、ヒト組み替え型蛋白の投与方法として、動脈内への選択的投与、系静脈的全身投与、反復投与などでも虚血肢の血流を改善させる側副血行路の増加効果が認められているが、このような効果を得るには 100~1000 μg もの大量の蛋白が必要となり、腫瘍血管新生も促進することが知られていることから考慮すると癌の増殖などへの懸念あるいは糖尿病患者での網膜症の悪化が危惧される。したがって、安全性の観点からも遺伝子導入による局所での蛋白の過剰発現は望ましいと考えられる。遺伝子治療の試みとして、これらの遺伝子の投与により虚血部位での血流量の増加および血管陰影の増強などが確認されていたが、遺伝子を血管内投与しても血流不全のために患部への集積が悪いことや遺伝子発現効率向上のためにウイルスベクターを用いることでの安全性への懸念などがあった。しかし、Isner らはウイルスベクターを使用することなくプラスミドを筋肉内注射するという非常に簡便な方法で有効な治療成績を示し<sup>3,4)</sup>、さらにその後同様の手法で虚血性心疾患の治療も行いその有効性を示している<sup>5)</sup>。

その後、複数の施設でアデノウイルスを用いた VEGF

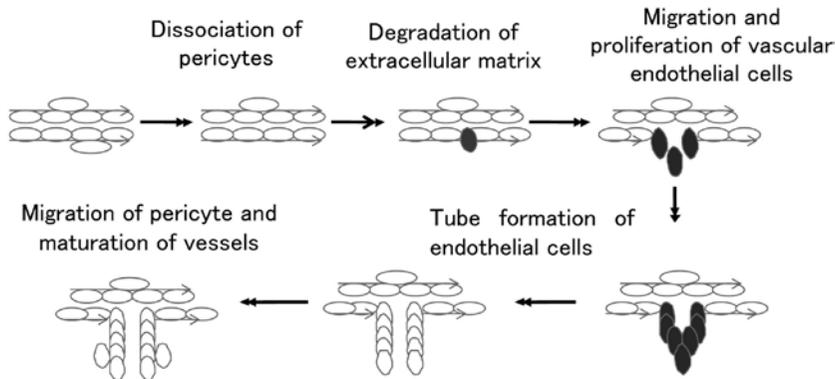


Figure 1 Scheme of angiogenesis and vascular maturation.

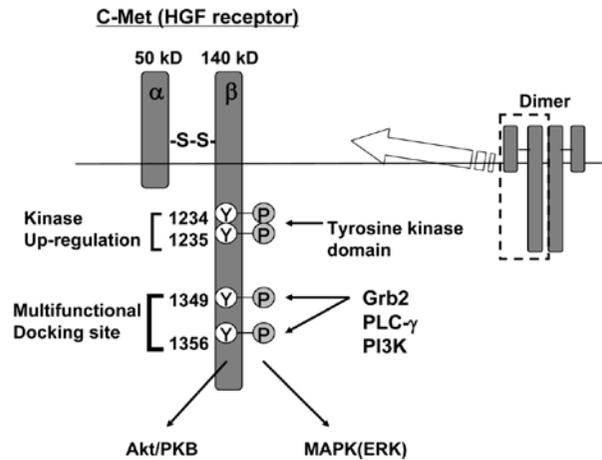
の筋肉内投与あるいは動脈内投与などの臨床試験が行われ、血流改善や運動耐用能の改善が認められている。しかし、VEGFの遺伝子治療臨床試験における共通した主な有害事象として浮腫が認められる。これは、VEGFが血管新生を促すとともに血管透過性を亢進させることから、ある意味避けられない合併症ともいえる。近年、これらのVEGFの欠点を補うために、Angiopoietin-1との併用治療<sup>6)</sup>あるいはHIF-1 $\alpha$ による治療、平滑筋にも増殖活性を有するFGF-2を用いた治療法<sup>7)</sup>などいくつかの動物モデルでの著効例が示されている。

本邦でもHGF(hepatocyte growth factor)を用いた同様のコンセプトの遺伝子治療が施行されている<sup>8)</sup>。HGFは血管内皮細胞に存在するc-met受容体に結合して、内皮細胞増殖活性および遊走活性を有することが明らかとなった。また、細胞内情報伝達系においても、VEGFと同様にmitogen activated phosphorylation kinase(MAPK)やAkt/protein kinase Bなどを活性化することから、血管新生作用を有することが強く示唆された<sup>9)</sup>。マウスあるいはウサギでの下肢虚血モデルの検討から、HGF遺伝子の局所投与により虚血肢の血流改善および血管新生能の亢進が認められた<sup>10)</sup>。われわれは上記と同様の疾患に対して倫理委員会の承認後「HGF遺伝子プラスミドを用いた末梢性血管疾患の治療のための遺伝子治療臨床研究」を行っている。従来の内科的治療に反応せず外科的治療が困難な症例に対して、2001年5月から開始し始めすでに予定症例数22症例に遺伝子投与が終了した。これは治験でのフェーズ1および2aに相当するものであり、現在のところ遺伝子投与に起因すると考えられる重篤な副作用の発現は認められなかった。臨床的改善度

は、「上下肢血圧比の上昇:64.7%、安静時疼痛の改善:61.5%、虚血性潰瘍の25%以上縮小:63.6%、最大歩行距離の改善:85.7%」であり、安全性(safety)および効力(effectiveness)が認められている<sup>6)</sup>。これらの結果に基づき、フェーズIIIの多施設臨床試験を実施した。この試験はダブルブラインドで行われ、HGF遺伝子と偽薬群とは2:1の割合で振り分けられ、4週間間隔で2度投与された(Fig. 2)。12週間後に、潰瘍のある患者は潰瘍のサイズ縮小の有無、潰瘍のない患者に対しては痛みの改善度で評価を行った結果、偽薬群では30.8%の改善(13例中4例)であるのに対して、HGF治療群では70.4%の改善(27例中19例)と有意に改善していた。とくに潰瘍のサイズの改善効果に対しては、偽薬群が40%(10例中4例)であるのに対して、HGF群は100%(11例中11例)と著明な改善を示した<sup>11)</sup>。以上の結果に基づき、現在HGFプラスミド遺伝子は医薬品として申請中である。

### 遺伝子治療における臨床研究の現状

現在世界で進行中の遺伝子治療の中で情報収集可能であった1644例のプロトコールについてのデータがThe Journal of Gene Medicineのweb siteで公開されている(<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>)。この集計によると、その6割以上にあたる1034例のプロトコールは米国であり、日本は全体の1.1%(18例)でアジア全体でも3.7%にすぎないのが現状である。ヨーロッパ全体では29%を占めるが、その半数近い12%(195例)はイギリス(United Kingdom)で施行されている。しかし、数年前は米国で8割を占めていたことから考えれば、ヨーロッパ



**Figure 2** Structure of c-Met and intracellular signaling of HGF (hepatocyte growth factor).

でのプロトコル数が相対的に増加していることがわかる。対象疾患は、最も多いのが癌(64.5%)であるが、次に多い疾患は心血管病(8.7%)となっている。数年前までは単一遺伝子疾患が第2位であったが、現在は8.2%と相対的に低下してきており、近年急増している感染症疾患(8%)と大差ない状況である。この感染症疾患はDNAワクチンの普及に伴って今後も増加する可能性があると考えられる。用いられているベクターは、レトロウイルスベクターの相対的な使用例は減っているが、依然としてウイルスベクターのアデノウイルスが24%、レトロウイルスが20.5%と多数を占め、非ウイルスベクターのnaked/plasmid DNAを用いる治療が18%、リポフェクションが6.5%を占めており、安全性に配慮したプロトコルの増加傾向がみられる。用いられている治療遺伝子であるが、以前から多く用いられている cytokine が全体の18.4%を占めているが、免疫療法によく用いられる antigen(抗原)が急増して20%を占めるに至っている。癌抑制遺伝子の tumor suppressor が10.5%、癌細胞死を誘導する目的で用いられる suicide(自殺遺伝子)が7.2%、と癌に関連した遺伝子の投与が多く認められた。一方で血管新生治療などに代表される増殖因子の使用も7.7%まで増加してきている。進行状況はフェーズIおよびフェーズI/IIがそれぞれ全体の60.5%、19%を占めており有効性を検討する大規模臨床研究のフェーズIIIはわずか3.5%にすぎないものの少しずつ増加傾向にはある。

つまり現状としては大半の遺伝子治療はまだ探索的な

フェーズにとどまっているもののフェーズIIIに進むものも増加傾向にあり、トランスレーショナルリサーチとして徐々に成熟してきていると感じられる。今後、新規遺伝子導入法の開発や新規疾患への応用などのブレイクスルーにより大きく発展することを期待したいと考える。

## 文 献

- 1) Marshall E: Gene therapy death prompts review of adenovirus vector. *Science* 1999; **286**: 2244-2245
- 2) Gansbacher B, European Society of Gene Therapy: Report of a second serious adverse event in a clinical trial of gene therapy for X-linked severe combined immune deficiency (X-SCID). Position of the European Society of Gene Therapy (ESGT). *J Gene Med* 2003; **5**: 261-262
- 3) Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, et al: Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; **97**: 1114-1123
- 4) 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
- 5) Losordo DW, Vale PR, Symes JF, et al: Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; **98**: 2800-2804
- 6) Yamauchi A, Ito Y, Morikawa M, et al: Pre-administration of angiopoietin-1 followed by VEGF induces functional and

- mature vascular formation in a rabbit ischemic model. *J Gene Med* 2003; **5**: 994–1004
- 7) 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
- 8) 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**: 203–229
- 9) 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
- 10) Taniyama Y, Morishita R, Aoki M, et al: Therapeutic angiogenesis induced by human hepatocyte growth factor gene in rat and rabbit hindlimb ischemia models: preclinical study for treatment of peripheral arterial disease. *Gene Ther* 2001; **8**: 181–189
- 11) Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, et al: Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia. *Gene Ther* 2010; **17**: 1152–61

## Recent Progress of Therapeutic Angiogenesis and Gene Therapy

Hironori Nakagami

Division of Vascular Medicine and Epigenetics, Osaka University United Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

**Key words:** angiogenesis, endothelial cells, VEGF, HGF

The concept of therapeutic angiogenesis is that an overexpressed angiogenic gene in an ischemic lesion may induce neovascularization and increase blood flow in order to improve care in ischemic diseases. We focused on the potential effect of HGF (hepatocyte growth factor) as a novel angiogenic molecule, and identified the improvement of blood flow and neovascularization by an HGF injection in a rat or rabbit ischemic model. Furthermore, we confirmed the safety and efficiency of HGF gene therapy for twenty-two patients in a human clinical trial. (*J Jpn Coll Angiol*, 2011, **51**: 457–460)