

血管再生医療の現状

伊藤孝仁

大阪大学大学院 医学系研究科 病態情報内科学

key words : 幹細胞, 再生医学, 血管新生, 遺伝子治療

要旨

透析患者にとって血管病変は切り離せない課題である。動脈硬化および血管石灰化による末梢動脈狭窄病変・冠動脈病変・脳血管病変はもちろんのこと、血液透析であれば動静脈シャント血管の狭窄や閉塞が深刻な問題となる。このような諸問題は、透析条件の改良や内科的対処のみでは必ずしも解決できておらず、新しい治療戦略の導入が望まれるところである。

本稿では、最近、急速に発展した再生医療が血管系へどのように応用されつつあるのかを概説する。一般的な治療法として定着する段階には至っていないものの、すでに臨床例に應用されているものは少なくない。腎臓学分野あるいは透析学分野からの臨床的ニーズを声として発信し、各分野における研究者に参入を促すことも必要な役割と考えるが、そういった観点から本稿が少しでも役立てば幸いである。

1 背景

血流を介した細胞環境の制御は、高等動物の生命活動において必須の命題である。胎盤形成を含めた個体発生時はもちろんのこと、すべての組織や臓器の成長・維持が健全に行われ、傷害時に元通りに修復されるためには、血流が維持されていなければならない。そもそも、拡散によって血管から酸素が到達できる距離はせいぜい 200~250 μm にしかすぎないのである¹⁾。

血管を積極的に再生しようという医学的方向づけの

原点は、1787 年にある。この年、外科医の John Hunter が、トナカイの角という成体組織において新たに血管が形成される現象を血管新生 (angiogenesis) として記載した。1970 年代になり、外科医 Judah Folkman が、血管新生抑制により悪性腫瘍を治療するという概念を提唱し、以後、血管新生抑制による治療学が先頭を切り、引き続いて 1990 年代に入り、血管新生による治療学が現実的な医療として認知されるようになった。この点で重要な契機となったのは、1984 年の Shing, Klagsbrun らによる bFGF の同定、1983 年の Dvorak による vascular permeability factor (VPF) の同定、1989 年の Ferrara, Plouet らによる vascular endothelial growth factor (VEGF) の同定である (VPF と VEGF は同一であることが判明)。

1997 年、Asahara らは、流血中に血管内皮前駆細胞が存在することを明らかにしたが、この発見も非常に大きな意義を持つ。近年では、こういった「再生医学」研究と医用工学の進展が結びつき、血管系の再生を標的あるいは前提にした医療戦略の開発が急速に進みつつある。

2 血管の発生・構成

血管は、内皮細胞と周細胞・血管平滑筋細胞によって構成され、複数のリガンド-受容体機構によって発生・リモデリングの制御を受けている (表 1)。これらの構成要素や制御機構の解析が進むことで、近年の

表1 血管新生を制御する分子群

内因性血管新生促進因子	内因性血管新生阻害因子
adrenomedullin	angioarrestin
angiogenin	angiostatic steroids
angiopoietin-1	angiostatin
cyr-16	antiangiogenic antithrombin III
del-1	canstatin
fibroblast growth factor:	cartilage-derived inhibitor
acidic (aFGF)	CD59 complement fragment
basic (bFGF)	endostatin
follistatin	fibronectin fragment
granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	gro-beta
hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor	heparinases
interleukin-3 (IL-3)	heparin hexasaccharide fragment
interleukin-8 (IL-8)	human chorionic gonadotropin
leptin	interferon $\alpha/\beta/\gamma$
midkine	interferon inducible protein
placental growth factor (PlGF)	interleukin-12 (IL-12)
platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF)	kringle 5
platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)	metalloproteinase inhibitors
pleiotrophin (PTN)	2-methoxyestradiol
progranulin	pigment epithelial-derived factor (PEDF)
thrombin	placental ribonuclease inhibitor
thymosin beta-4	plasminogen activator inhibitor
transforming growth factor-alpha (TGF- α)	platelet factor-4
transforming growth factor-beta (TGF- β)	prolactin 16-kd fragment
tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)	proliferin-related protein
vascular endothelial growth factor (VEGF)/vascular permeability factor (VPF)	retinoids
	thrombospondin-1v
	transforming growth factor-beta (TGF- β)
	tumstatin
	vasculostatin
	vasostatin

血管再生療法の基本コンセプトが構築されるに至った。

血管内皮細胞は、血管構成の基本単位として重要であるのみならず、脊椎動物の発生初期段階で造血幹細胞を生み出す原基としても必須である。血球系細胞（おそらく造血幹細胞を含む細胞）は、中腎近傍の背大動脈内皮に接した領域（aorta-gonad-mesonephros; AGM 領域）に血管内皮から出芽する細胞クラスターとして誕生する^{2, 3)}。すなわち、一連の研究により造血幹細胞と血管内皮前駆細胞は共通の幹細胞から生まれるという大変興味深い事実が明らかとなったわけである。並行してこの時期、生体における造血の場は骨髓であるが、末梢血中には骨髓由来の造血幹細胞とともに骨髓由来の血管内皮前駆細胞が存在しているという大変重要な発見が行われた⁴⁾。

造血幹細胞と内皮前駆細胞の区分においては、VEGF 受容体である Flk-1/KDR の発現の有無が重要であり、ES 細胞から内皮細胞を分化誘導させる過

程においても、Flk-1/KDR の発現が、血管内皮細胞への分化において初期の中心的イベントとなっている⁵⁾。VEGF は、分子量 20,000 程度のサブユニットが 2 量体を形成した増殖因子である。in vitro で bFGF 同様に血管内皮細胞の増殖を促進し、in vivo では、血管新生・リンパ管新生・血管透過性亢進などの作用を示す。1996 年に単離された angiopoietin-1 は、受容体 TIE2 を介して血管内皮細胞に作用するが、増殖因子としてではなく、内皮細胞の遊走促進・アポトーシス抑制などをもたらす^{6, 7)}。VEGF は、当然ながら、それ自体が血管再生医療において重要な位置を占める物質であるが、造血幹細胞が分泌する angiopoietin-1 も血管内皮細胞の遊走促進を介して血管新生を制御することが明らかになっており⁸⁾、後に述べる細胞治療において、その治療効果に貢献していると考えられている。

3 血管新生促進を目指した治療戦略 (therapeutic angiogenesis)

大きな血流量を要求しない条件下では、小さな径の血管による血液供給が存在すれば良いと考えられる。その視点から有用と考えられる代表的な戦略が、①血管再生因子の局所投与を行う、あるいは遺伝子導入を行う治療 (gene therapy)、②血管内皮前駆細胞による細胞治療 (cell therapy) の二つである。具体的には、ASO などの下肢動脈狭窄病変や冠動脈狭窄疾患に伴う心筋虚血が研究対象・治療対象となっている。

すでに述べたように血管新生の制御に関わる分子群は多彩であり (表 1)、したがって遺伝子治療の候補も多岐にわたる。リコンビナント蛋白質を作成・精製して投与する方法では、生体内での半減期がきわめて短いという問題や、輸送・保存に冷蔵ないし冷凍条件が必要という問題がある。その点、遺伝子治療は有利といえる。両者のアプローチ共に多くの臨床研究が行われている (表 2)。

リコンビナント FGF-2 の単回投与により、下肢の虚血による間歇性跛行が改善すると報告されている (TRAFFIC study)⁹⁾。FGF-1 では、リコンビナント蛋白質による虚血心筋の治療、naked plasmid による下肢虚血の治療が研究されている。また、基礎研究の成果に基づき¹⁰⁾、adenovirus vector を用いて VEGF₁₂₁ や FGF4 (bFGF) の遺伝子導入を冠動脈狭窄症例に行う大規模研究 (それぞれ REVASC trial, AGENT trial) も米国で行われ、少ない有害事象頻度の一方で、一定の有効性が認められている。AGENT trial は、すでに phase 3 試験が米国とヨーロッパで施行中である。

KGF-2/FGF10 (repifermin) による糖尿病性の難治性足潰瘍の治療有効性も認められており、phase 3 治験中となっている。VEGF を用いた遺伝子治療は、下肢動脈狭窄病変に対しても有効性が認められている¹¹⁾。HGF による血管新生作用も注目されており、本邦で臨床治験中である (TREAT-HGF trial)^{12, 13)}。しかしながら、これら血管新生因子の蛋白質投与あるいは遺伝子投与による治療方法の成績に関しては、複数の異なる施設で再現性が確認されて最終的な評価が得られるまでには、もう少し時間を要すると思われる。

新生血管の安定化には PDGF-BB を介した周細胞・平滑筋細胞の組み込みが必要であるが¹⁴⁾、PDGF 自体が血管新生因子でもある¹⁵⁾。例えば PDGF-BB の発現が減少している糖尿病性潰瘍病変にリコンビナント PDGF-BB (becaplermin) を用いると、治癒が促進する¹⁶⁾。becaplermin は 1997 年に FDA 認可が得られ、Regranex Gel 0.01% という商品名で 1998 年より発売され、糖尿病性潰瘍はもちろん他の原因による難治性潰瘍・褥瘡などで幅広く使用される血管新生薬となっている。この薬剤が普及した理由として重要な点は、本剤の使用により治癒率が高まっただけでなく、治癒までの期間が短縮されるとともに感染などの合併症が減少し、結果的に医療費が減少した点である。ある再生医療戦略が社会的に普及するためには、重要なポイントになると考えられる。

なお、正常な構築からなる血管の新生過程は複数分子の強調作業であるが、例えば PDGF-BB と VEGF の併用投与はそれぞれの単独よりも安定で成熟した血管を新生させる¹⁷⁾。したがって、複数分子を組み合わせたりコンビナント蛋白投与あるいは遺伝子導入によって治療効果が相乗的に増加することも当然期待され、

表 2 海外臨床研究中の増殖因子を用いた血管新生療法

増殖因子	蛋白治療	遺伝子治療	開発者	適応
FGF1	○		Fulda Medical Center	CAD
		○	GenCell/Aventis	PAD
FGF2	○		Chiron Corporation	PAD
FGF4		○	Shering AG	CAD, PAD
KGF-2/FGF10 (repifermin)	○		Human Genome Science	Wounds
TGF-β	○		Genzyme Surgical	Wounds
VEGF	○		Genentech	PAD
		○	Vascular Genetics Inc	CAD, PAD
		○	GenVec/Pfizer	CAD, PAD
PDGF-BB (becaplermin)	○		Chiron/Orho-McNeil	Wounds

CAD: 冠動脈疾患 PAD: 末梢動脈疾患 (ASO など) Wounds: 創傷

実際に検討が行われている¹⁸⁾。

血管再生をめざした細胞治療としては、患者の自家骨髄由来の細胞粗分画を局所に注入するという治療が試みられている。本邦で行われた TACT study では、患者自身の骨髄から採取した単核球を非常に多数の穿刺部位から下肢に接種するという方法が行われた。下肢血流と臨床症状の改善が認められている¹⁹⁾。同様に、骨髄由来細胞によって冠動脈病変による心筋梗塞の壊死巣縮小効果・心機能改善効果もたらされることも報告されている²⁰⁾。単核球により治療効果が得られるのであれば、G-CSF や GM-CSF の全身投与による mobilization (動員) が有効なのではないかと期待されるが、事実、治療効果あるいは側副血行路の増加が得られるという報告がある²¹⁾。最近では、末梢血より血管内皮前駆細胞を回収して治療応用する試みや、少量の前駆細胞を体外で増殖させてから投与する試みも行われている。このようなアプローチが実現すれば、骨髄液採取という患者の負担と合併症リスクが大幅に軽減し、治療方法としての普及も期待できるであろう。

リコンビナント蛋白質の投与や遺伝子治療、細胞治療では不足する部分を補うために、細胞を担体とした遺伝子治療 (cell-based gene therapy) という両者を組み合わせた戦略も試みられている。内皮前駆細胞や血球系細胞といった浮遊細胞以外にも、血管平滑筋細胞や分化した血管内皮細胞を担体として目的遺伝子を導入し、その後、局所に移植・生着させるという方向が考えられる。

4 医用工学技術を用いた血管再生医療

内在性の前駆細胞と液性因子の組み合わせ、あるいは外因性に投与した細胞による血管新生誘導といったアプローチを行う限り、ある程度以上のサイズの血管を再生することや、ある程度以上の圧に耐えうる血管を再生することは不可能である。そこで、足場 (scaffold) に細胞を埋め込んだ「血管前駆体」とも言える人工組織を作成し、移植する方法が研究されている。具体的には、ポリグリコール酸とポリ乳酸からなる生体適合性にすぐれた生分解性ポリマーなどを血管鋳型 (足場) とし、本人の静脈由来細胞懸濁液や骨髄単核球分画などを播種して植え込むことによって、「血管前駆体」とする。小児先天性心疾患の肺動脈として外科的に移植され、良好に機能している例が報告されて

おり、大変興味深い^{22, 23)}。今後の発展・普及が期待される。

ポリグリコール酸とポリ乳酸から構成されるポリマーは、組成比率を変えることにより、初期の強度や体内での吸収期間を人為的に操作することが可能である。報告例のような小児の場合では、ポリマー吸収後も生着して自己組織化した血管が、患児の成長にあわせて成長するところが、ゴアテックスなどの人工血管に比べて大きな長所となる。さらに、異物が残存しないために感染抵抗性にもすぐれる。

生分解性あるいは生体吸収性物質によるポリマーは、血管新生因子やその遺伝子の徐放基剤としても研究がすすんでおり、局所薬剤濃度の維持や遺伝子導入効率の向上に大変効果的である。また、温度依存性に疎水性が変化するポリマーシート上に細胞間接着の強固な細胞を培養すると、培養後に温度を変異させることのみで、1枚の細胞シートを回収することが可能である。蛋白分解酵素を使用せずに細胞を培養皿から回収するために、細胞間接着が保存される上に細胞自体のダメージがまったく生じない。この方法は再生角膜の作成に実際に利用されているが、今後は、血管のような脈管系へも応用されていくはずである。

5 胚性幹細胞 (ES 細胞) を用いた血管再生医療の可能性

ES 細胞から血管内皮細胞や血管平滑筋細胞を誘導樹立することも可能となりつつある⁵⁾。ヒト ES 細胞に関する倫理的コンセンサスの問題、組織抗原不適合による拒絶反応の問題、未分化細胞残存による奇形腫発生のリスクなど解決すべき課題は多いが、一つの研究的方向性として将来が期待されている分野である。特定個人の体細胞から核を取りだし、核移植によって遺伝情報が同一のヒトクローン細胞、そしてクローン胚を作成することも理論的には可能となっており、時の流れとともに医用材料として工業化される時代が来るかもしれない。

結 語

ここ数年、再生医療研究は、爆発的に進歩を遂げた。成体内に存在する幹細胞が同定されたこと、ヒト ES 細胞が樹立可能となったこと、の2点が大きな推進力となったことは間違いないが、それ以前の遺伝子治療

学の発展, さらにそれ以前の発癌メカニズムの研究に基づく各種増殖因子の同定・解明がその根底をささえているといえる。常に医療の発展を支えてきた医用工学技術がそれと呼応するように進歩をとげた今, もはや再生医療は実践的医療の一員である。

文 献

- 1) Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nat Med*, 1; 27, 1995.
- 2) Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, et al.: Intra-aortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development*, 125; 4575, 1998.
- 3) Nishikawa SI, Nishikawa S, Kawamoto H, et al.: In vitro generation of lymphohematopoietic cells from endothelial cells purified from murine embryos. *Immunity*, 8; 761, 1998.
- 4) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 257; 964, 1997.
- 5) Nishikawa SI, Nishikawa S, Hirashima M, et al.: Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1⁺VE-cadherin⁺ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. *Development*, 125; 1747, 1998.
- 6) Witzensbichler B, Maisonpierre PC, Jones P, et al.: Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial specific receptor tyrosine kinase TIE2. *J Biol Chem*, 273; 18514, 1998.
- 7) Kwak HJ, So JN, Lee SJ, et al.: Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *FEBS Lett*, 448; 249, 1999.
- 8) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, et al.: A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell*, 102; 199, 2000.
- 9) Lederman RJ, Tenaglia AN, Anderson RD, et al.: Design of the therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (TRAFFIC) trial. *Am J Cardiol*, 88; 192, 2001.
- 10) Grines C, Rubanyi GM, Kleiman NS, et al.: Angiogenic gene therapy with adenovirus 5 fibroblast growth factor-4 (Ad5FGF-4): a new option for the treatment of coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 92; 24N, 2003.
- 11) 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*, 97; 1114, 1998.
- 12) Belle EV, Witzensbichler B, Chen D, et al.: Potentiated angiogenic effect of scatter factor/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor: the case for paracrine amplification of angiogenesis. *Circulation*, 97; 381, 1998.
- 13) Morishita R, Nakamura S, Hayashi S, et al.: Therapeutic angiogenesis induced by human recombinant hepatocyte growth factor in rabbit hind limb ischemia model as "cytokine supplement therapy". *Hypertension*, 33; 1379, 1999.
- 14) Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, et al.: Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*, 277; 242, 1997.
- 15) Risau W, Drexler H, Mironov V, et al.: Platelet-derived growth factor is angiogenic in vivo. *Growth Factors*, 7; 261, 1992.
- 16) Nagai MK, Embil JM: Becaplermin: recombinant platelet-derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers. *Expert Opin Biol Ther*, 2; 211, 2002.
- 17) Richardson TP, Peters MC, Ennett AB, et al.: Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat Biotechnol*, 19; 1029, 2001.
- 18) Koike H, Morishita R, Iguchi S, et al.: Enhanced angiogenesis and improvement of neuropathy by cotransfection of human hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase gene. *FASEB J*, 17; 779, 2003.
- 19) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al.: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial. *Lancet*, 360; 427, 2002.
- 20) Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al.: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*, 7; 430, 2001.
- 21) Seiler C, Pohl T, Wustmann K, et al.: Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*, 104; 2012, 2001.
- 22) Shin'oka T, Imai Y, Ikada Y: Transplantation of a tissue-engineered pulmonary artery. *N Engl J Med*, 344; 532, 2001.
- 23) Matsumura G, Miyagawa-Tomita S, Shin'oka T, et al.: First evidence that bone marrow cells contribute to the construction of tissue-engineered vascular autografts in vivo. *Circulation*, 108; 1729, 2003.