

# 閉塞性動脈硬化症に対する血管再生遺伝子治療

森下竜一

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学講座

key words : HGF, 血管新生, 遺伝子治療, ASO, 潰瘍

## はじめに

アデノシンデアミナーゼ欠損症などの先天性疾患の治療として始まった遺伝子治療は、多因子疾患である循環器疾患や癌にも広がってきている。最近では、食生活の欧米化・社会の高齢化とともに増加しつつある動脈硬化を基礎とする虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症に対しても応用されている。

優れた薬剤やカテーテル・ステントなどの手術デバイスによる治療が発達したが、依然として既存の治療法では十分な治療成績をあげていない。たとえば、閉塞性動脈硬化症の重症患者においては下肢切断を余儀無くされる患者も多い。このような虚血性

疾患は、慢性透析患者ではより深刻で、外科的なバイパス手術や血管拡張術などの適応となる患者は非透析患者より少なく、実質上経過観察しかないような状況である。

## 1 血管再生療法とは

近年、このような閉塞血管に対する画期的な治療戦略として、血管再生による治療が提唱された。動脈硬化や血栓などにより虚血状態に陥った組織において生理的な血管新生は認められる（側副血行路の発達）が、一般的に不十分である。したがって、このような病態においては血管新生促進が側副血行路の形成につながり、治療となりうるものが考えられる。

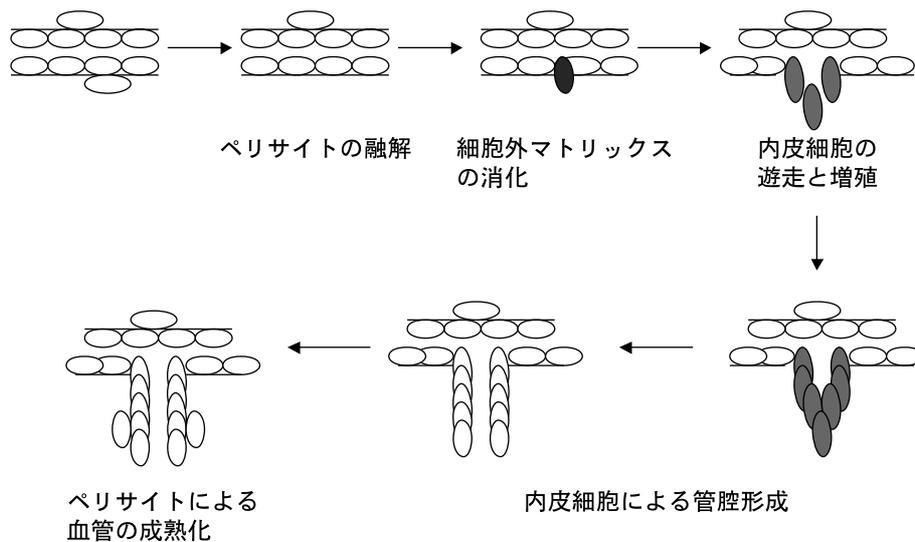


図1 成熟個体の血管新生

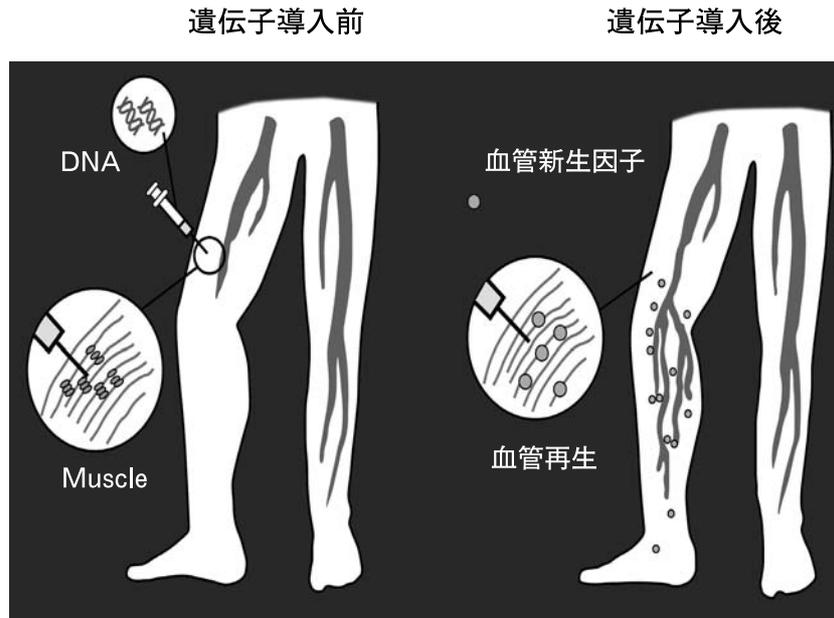


図2 筋肉内への遺伝子導入による血管再生

血管新生にはプロテアーゼによる基底膜や間質マトリックスの消化，血管内皮細胞の遊走・増殖，さらに内皮細胞間の再接着と管腔形成というステップが必要であるが，その中でも内皮細胞の増殖にかかわる因子はきわめて重要な役割を果たしている（図1）。

近年の分子生物学の進歩は，VEGF（血管内皮増殖因子）などの血管新生因子の存在を明らかにし，これらを用いた治療の可能性を示した（治療的血管新生）．1994年より米国ではVEGF遺伝子を用いた慢性閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療が始まっており，良好な効果をあげている（図2）．血管新生活性を有する増殖因子としては，VEGFだけでなく，FGF（fibroblast growth factor）やHGF（hepatocyte growth factor）などが報告されている．

## 2 血管再生療法は確立された治療法か

血管再生療法には，血管新生因子の蛋白や遺伝子を利用した治療法だけでなく，骨髄由来細胞を利用した細胞治療による血管新生療法もすでに実施されている．しかし，現時点では科学的に証明された血管再生療法は後述のわれわれの行っているHGF遺伝子を用いた治療法を含め，まだない．残念ながら，プラセボを用いた二重盲検試験で有効性が示された血管再生療法はいまだなく，確立されたエビデンスを持っているとはいえない．しかし，今後遺伝子と細胞治療の併用など多くの血管新生療法が考案され，着実に日常臨床への

応用が進むであろう．

血管新生療法が現実のものになるためには，まだまだ基礎的検討が必要である．特に，①血管新生の分子機構，②再生医療を支える技術開発，この2点は今後重要である（図3）．血管新生療法の開発のためには，何故，どのように血管が形成・新生されるか，どのような因子（増殖因子や転写因子）が関与しているか，これらの基礎的疑問に答える必要がある．

一方，再生医療を支える技術は，飛躍的な進歩がここ数年おきている．遺伝子導入技術としては，日常臨床で使用に耐えうる導入効率の高いベクターの開発がかなり視野に入ってきている．また，DDS（drug delivery system）に関してもターゲティングの面から進歩が著しい．さらに，ナノテクノロジーとの融合により，より有効なベクターやDDS技術の進展が期待される．

これからの血管新生療法は，これら基盤技術と細胞治療・遺伝子治療の融合により，日常臨床で画期的な治療になることは間違いない．血管新生療法において重要なことは，副作用の減少と有効性の向上である．したがって，図3に示すように骨髄細胞のような crude（雑多）なものから，より pure（純化された）な治療方法へと変遷していくことが望ましい．予想されたこととはいえ，2004年にはタフツ大学のグループより，骨髄細胞の心臓への導入により予期せず石灰化が報告され，純化された細胞を使う重要性が明らかになって

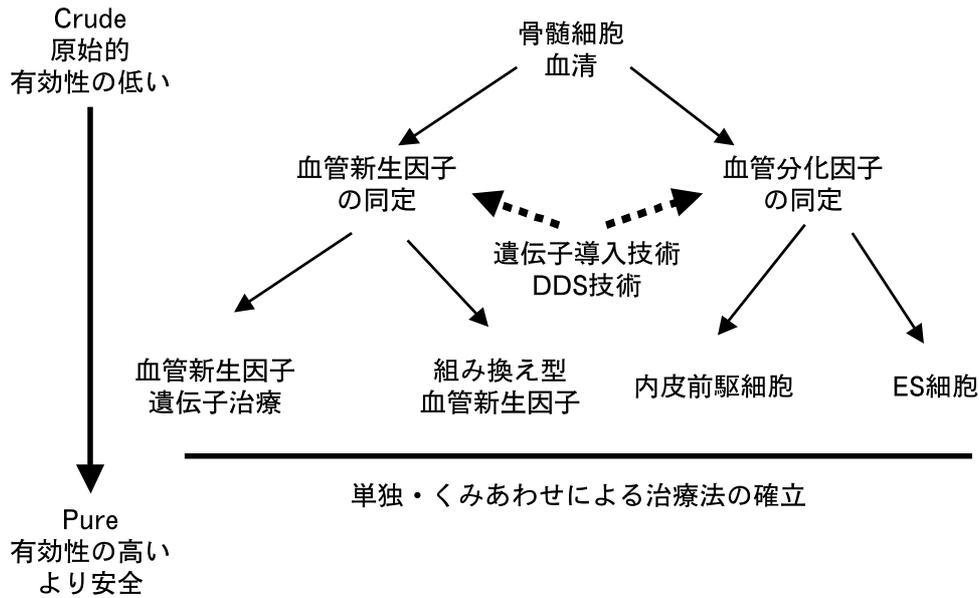


図3 今後の血管新生療法の研究の流れ

きた。単に臨床効果だけではなく、サイエンスの面から、合理的で有効性の高いエビデンスに基づいた血管新生療法の応用が重要である。

### 3 血管再生遺伝子を用いた遺伝子治療の実際

前述したように遺伝子を用いた血管再生による閉塞性動脈硬化症の治療は、米国・ヨーロッパでは広く実施されている。わが国でも、2001年6月より国内で発見されたHGF遺伝子を用いた閉塞性動脈硬化症と、ビュルガー病患者に対する遺伝子治療臨床研究がわれわれの施設で開始されている。われわれは安静時疼痛や虚血性潰瘍を有し（Fonatine III/IV）、ほかの治療法のない22人の患者の下肢に1カ月ごとに、2もしくは4mgのHGFのnaked plasmidを筋注した（図4）。

有効性（改善度）に関して、改善度を検討する評価項目として上下肢血圧比（ABI）・安静時疼痛スケール（VAS）・虚血性潰瘍のサイズ・歩行可能距離の延長を評価した。ABIの0.1以上の上昇は測定可能症例17症例中11症例（64.7%）に認められた。VASの1cm以上の改善は、13症例中12例（92.3%）、2cm以上の改善は、安静時疼痛を有する13症例中8症例（61.5%）に認められている。虚血性潰瘍の25%以上の縮小は、潰瘍を有する11症例中7症例（63.6%）に認められた。歩行可能距離の25%以上の改善は、間欠性跛行を有する7症例中6症例（85.7%）に認められた（図5、表1）。

以上より、本研究の初期成績では、安全性に概ね問

題なく、期待以上の良好な改善度が確認できた。現在実用化のためのプラセボ群を設定した試験（フェーズ3）を全国の施設で実施しており、安全性と有効性を評価している（問い合わせは、大阪大学臨床遺伝子治療学山田愛子まで）。ほかに治療法のない安静時疼痛・虚血性潰瘍を有する患者を対象にしている。

一方で、VEGF遺伝子治療では60%の患者に見られたと報告されている投与部位の浮腫は認められなかった。現在までの成績では、VEGF遺伝子治療より有効性が高く、安全性に優れる可能性が示されつつある。VEGFとの違いについてはまだ詳細は検討中であるが、図6、7に示すように、HGFの血管新生作用が血管内皮細胞増殖・遊走作用のみならず血管平滑筋細胞の遊走作用にも依存しており、早い血管の成熟を促すためであろうと考えている。

再生された血管の長期予後については、1年間までの全例のフォロー・アップではABIのさらなる増加や潰瘍の改善をみた患者も確認できている。一方で、悪化を認めた患者はなく、治療後少なくとも1年で不変、もしくは、さらなる改善が見られたことより、ある程度の期間は血管が維持されていると考えられる。

本治療法の確立により下肢切断を余儀なくされている患者を減らすことが期待される。透析症例に関しては、本試験では対象となっており、数名の患者が参加している。現在の印象では特に透析患者で有効性が低いとは考えていない。投与部位や回数の増加などの工夫は必要かもしれないが、安全に実施できることから



図4 HGF 遺伝子治療臨床研究



図5 第3症例における6カ月後の潰瘍

表1 HGF 遺伝子を用いた治療による改善率

	ABI Pre 0.6以下	VAS		潰瘍		最大歩行距離	
		>1 cm	>2 cm	全潰瘍	最大潰瘍	>25%	>50%
第1ステージ							
2 mg	100% (5/5)	83.3% (5/6)	66.7% (4/6)	72.7% (8/11)	75.0% (3/4)	—	—
第2ステージ							
2 mg	40% (2/5)	100% (4/4)	75.0% (3/4)	72.7% (8/11)	50.0% (2/4)	66.7% (2/3)	66.7% (2/3)
4 mg	57.1% (4/7)	100% (3/3)	33.3% (1/3)	66.7% (2/3)	66.7% (2/3)	100% (4/4)	75.0% (3/4)
total	64.7% (11/17)	92.3% (12/13)	61.5% (8/13)	72.0% (18/25)	63.6% (7/11)	85.7% (6/7)	71.4% (5/7)

遺伝子投与直前と最終治療投与8週後との比較  
症例数：22

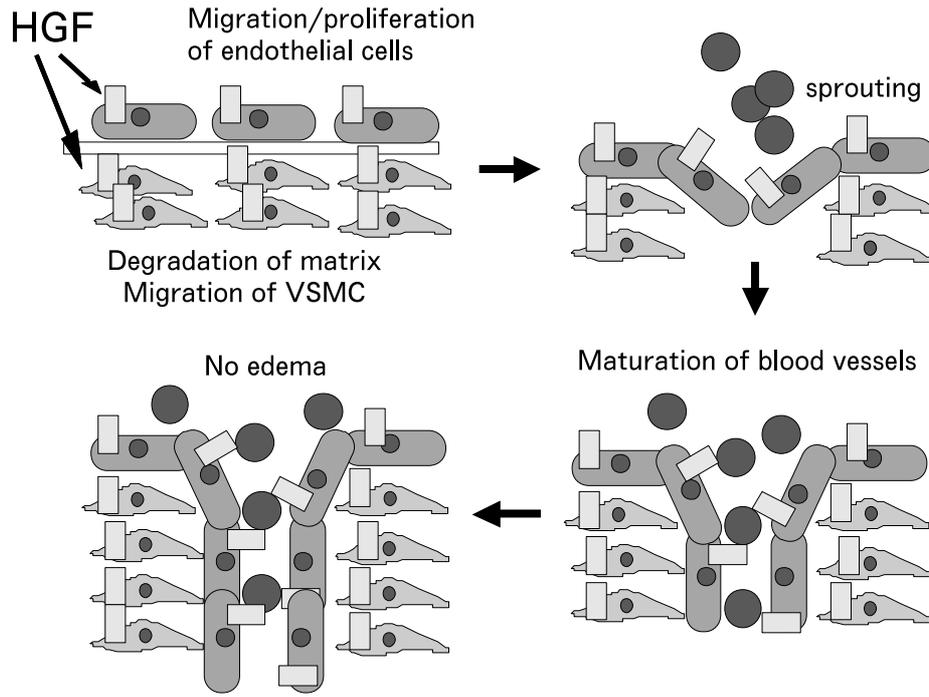


図6 HGFによる血管新生と血管成熟の促進

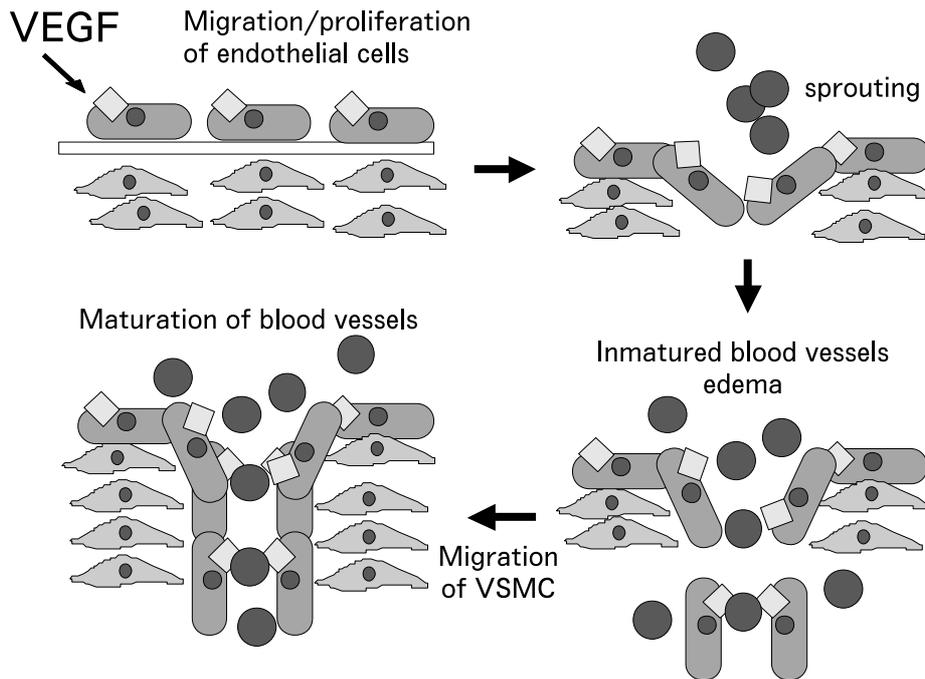


図7 VEGFによる未熟な血管新生

将来的には外科的治療が実施しにくい透析患者での新しい治療法になることが期待される。

#### 4 血管再生遺伝子医薬の実用化にむけて

動脈硬化疾患における遺伝子治療の戦略は、基本的には有用外来遺伝子の導入である。遺伝子治療は、組み換え蛋白の増殖因子を直接投与する方法に比較し、

1回の局所投与にて長期間、全身性の副作用を出すことなく局所に治療効果をもたらすことができるという利点がある。また、血管は比較的アクセスが容易である点も医薬品に適している。

遺伝子の導入方法として、ウイルスベクターを用いるものとそうでないものに大別される。ウイルスベクターを用いる方法は、ヒトではアデノウイルスが多く

用いられている。利点として、遺伝子の細胞への取り込み効率が比較的良く、長期発現が期待できるが、欠点として発熱など炎症反応、肝機能異常の惹起などの副作用を有し、反復投与が困難であるなど、安全性が確立されていない。

ウイルスベクターを用いない方法には、われわれのように裸 (naked) のプラスミドを直接投与する方法、プラスミドを脂質で封入して投与する方法、センダイウイルスなどウイルスの成分と脂質を混合するハイブリッドベクターを用いる方法がある。いずれも、ウイルスベクターよりも安全であるが、導入効率は若干劣る。現段階では、プラスミドでの投与が最も安全で操作性が高いなど、医薬品に適した条件を満たしていると考えられている。血管新生を目的として VEGF や HGF などの分泌蛋白を局所で発現させるためには、プラスミドだけで十分であると考えている。

投与の経路も様々で、最も簡単な方法は筋肉内に遺伝子を投与し、遺伝子が導入された細胞から蛋白を分泌させ、血管新生などの効果をきたす方法である。血管に直接投与する方法として、血管内からはハイドロゲルで覆ったカテーテルや、極小の注射針がついたカテーテルを用いる方法があるが、いずれも導入率は高くなく、今後の改良が必要である。

## 5 虚血性心疾患に対する血管再生遺伝子治療

同様の血管再生作用は、狭心症や心不全治療に有効であることは当然推測される。Isner らは、VEGF 遺伝子を用いて狭心症に対する遺伝子治療を行い、その効果は劇的であった。対象患者は 5 例、それぞれ PTCA あるいは CABG、あるいは両方の治療歴があるが、全員が狭心症による重度の生活障害を持ち、もはや PTCA あるいは CABG の適応外の患者である。

彼らは VEGF 遺伝子 500 ug を MIDCAB にて心筋に直接注入し、血管新生による虚血の改善を検討した。VEGF 遺伝子導入により、狭心痛に対して服用するニトログリセリンの数量は各患者において劇的に減少し (遺伝子治療前: 53.9+10.0 tab/week, 遺伝子治療後: 9.8+6.9 tab/week,  $P<0.03$ )、血管造影においても各患者で著明な血管新生を認めた。また、SPECT (a dobutamine single photon emission computed tomography) にて正常血流領域の拡大、欠損部位の減少を認め、虚血性心疾患に対するこの治療の有用性

を示している。

また、昨年アデノウイルスベクターで FGF 4 遺伝子を冠動脈内より投与した臨床試験の結果が報告された。FGF 4 遺伝子の単回投与により、プラセボと比較して、トレッドミル運動耐用能試験で 2 倍以上の延長を 3 カ月時点で示したことが明らかにされた。耐用能の延長は、心臓グラフとの 6 カ月の時点とほぼ同等であり、ほかの既存の内科的治療法では無効であったことから、遺伝子治療の優位性を示すものとして注目された。

われわれも、HGF 遺伝子による心不全治療の可能性を明らかにした。まずラットの心筋梗塞のモデルを作成し、直接心臓の壁に HGF プラスミド DNA を導入した。その結果、HGF 遺伝子の導入は血管新生を促進し、血流を改善することを明らかにした。また、ブタ心筋梗塞モデルに HGF プラスミドをカテーテルについた針で導入し、やはり血管新生と血流改善を明らかにした。すでに、狭心症患者に対する遺伝子治療を 2004 年にアメリカでフェーズ 1 を開始した。

## 6 血管再生治療の問題点

実用化に向けては表 2 にみられるような課題がある。

### 1) 血管新生の客観的評価

血管再生療法に対する最大の批判は、血管造影で明らかな血管再生像が確認しにくいことによる。血管再生の遺伝子治療では、造影上血管陰影の増強という形で認められるが、定量評価ができないという問題があげられる。

骨髄細胞を用いた場合は、多くの施設から造影では変化がないと報告されており、造影上描出困難な最小血管が中心ではないかといわれている。今後、微小血

表 2 血管再生療法の限界と今後の課題

1. 血管新生の客観的評価
造影 (DSA, MRI など)/ABI/TcPO <sub>2</sub> など
2. 臨床試験のデザイン
プラセボ, 観察期間, 用量, エンドポイント
3. 副作用 (短期+長期)
イベント, 再狭窄, ACS, がん, 網膜症
4. 臨床的適応の決定
Fontaine IIb~IV, リスクファクターなど
5. 長期効果, 長期予後
6. 併用療法 (薬物, 外科的手法)

管の造影を可能とするより高出力な造影機器を用いるか、定量化を可能にするソフトの開発が必要である。

一方、現在信頼しうる評価としては、むしろ機能的な面から ABI や TcPO<sub>2</sub> を使用すべきだと考えられる。逆に、これらの指標で改善がなければ、血管再生による効果とは判断できない。

## 2) 臨床試験のデザイン

前述したように血管再生治療は、プラセボとの二重盲検試験がまだ行われておらず、二重盲検試験で証明されるまでは本当の意味での有効性は不明である。特に、観察期間を設置しない場合、入院による高度な介護などにより自然経過で改善する症例も多く存在しており、有効性の評価ができない。また、多くの再生療法で容量依存性が認められておらず、最適容量が不明などの問題点がある。最終的に有効性を判定するエンドポイントをなにごとに設定するかも重要である。

## 3) 副作用

元々血管再生療法に関しては、がんの増大や網膜症の悪化などが懸念されていた。現状ではこのような報告例はないが、G-CSF を用いた治療で再狭窄の増加

が報告されたり、米国ではプラーク破綻による心筋梗塞の発症などが報告されており、慎重な経過観察が必要である。骨髄細胞を用いた治療で、骨髄穿刺による重大な事故の発生も指摘されており、本当にリスク・ベネフィットがあるか、実施前に十分検討する必要がある。

## 4) 臨床的適応

現在対象となっている疾患では、Fontaine 分類 IIb～IVまでが含まれている。それぞれのグレードでの有効性は明らかになっておらず、治療法によっても異なるかもしれない。臨床的に最適なグレードを選択する必要がある。

そのほかにも、長期的予後や実際に死亡率が減少するかなどの課題、また、どの併用量がベストかなどの議論も今後必要になる。骨髄治療では、遺伝子治療が国の認定が必要で詳細なプロトコルが必須であるのに対し、施設内倫理委員会で可能なため、十分に問題点が検討されていないケースも耳にする。今後、標準治療として血管再生療法を認めさせるには、科学的に有効性と安全性を検討することが必須である。