

末梢動脈疾患に対する新しい遺伝子治療薬

— コラテジェン —

三宅 隆 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

key words : 末梢動脈疾患, 肝細胞増殖因子, 遺伝子治療, 血管新生療法, コラテジェン

要 旨

閉塞性動脈硬化症やバージャー病に代表される末梢動脈疾患のなかで、安静時疼痛や潰瘍に進行した重症虚血肢は治療に難渋することがある。各種治療を組み合わせても効果が不十分な場合も多く、下肢切断術に至った場合のQOLの低下と不良な生命予後は大きな問題となっている。末梢動脈疾患に対する新しいアプローチとして、肝細胞増殖因子をターゲットにした遺伝子治療による治療的血管新生療法の研究が進められ、第3相臨床試験で高い有効性が報告された。この研究で開発された遺伝子治療薬コラテジェンは、閉塞性動脈硬化症とバージャー病における潰瘍治療薬として承認され、臨床での使用が開始されている。コラテジェンは腎疾患や透析症例にも投与が可能であり、従来の方法では治療困難な重症虚血肢に対する新たな治療法として期待されている。

はじめに

末梢動脈疾患は動脈の狭窄や閉塞による四肢の循環障害によって間欠性は行、安静時疼痛、潰瘍、壊疽をきたす疾患であり、本邦では動脈硬化に起因する閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans; ASO) と血管の炎症によるバージャー病 (thromboangiitis obliterans; TAO) が大部分を占める。外科的なバイパス術に加え、血管内治療も広く行われるようになり良好な成績が報告されている。また、薬物療法の開発も積極的に進められている。しかし、血行再建術の困難な

症例や薬物療法に反応しない虚血肢では、病状の進行により切断術が選択され、それらの症例の低い生命予後が臨床上の大きな問題となっている¹⁾。今回、末梢動脈疾患に対する新たな治療法として、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) を発現させる遺伝子治療薬コラテジェンが本邦で承認された。これはHGFを組み込んだプラスミドを虚血部位に筋肉内投与することにより、分泌されたHGFが血管新生を誘導し、組織血流量を増加させる治療法である。本稿では、HGF 遺伝子治療の概要を説明する。

1 透析療法に合併した末梢動脈疾患

慢性動脈閉塞症のリスクとしては、喫煙や高脂血症などが一般的に認識されている。これらのリスクは他の動脈硬化性疾患のリスクと同じであり、閉塞性動脈硬化症は心血管病変を合併していることが多い。そのため、非罹患者に比べ生命予後が不良であることが臨床上の問題となっている。治療の第一選択はインターベンションやバイパス手術などの血行再建術であり、良好な血流再開が得られた場合には劇的な症状の改善が得られる。しかし、透析治療を受けている症例では、広範囲に広がる病巣、高度な血管の石灰化そして下腿動脈閉塞の合併が多いことから血行再建の適応がない症例も多く、薬物療法だけでは十分な効果が得られないことも多い。一方、透析治療を受けている症例では慢性動脈閉塞症の発症が有意に多いことが報告されており、リスクの一つと考えられている。これらのことから、多くの透析施設で治療に難渋する重症虚血肢の

管理が行われている。

2 遺伝子治療による血管新生療法

これまでの基礎研究から、さまざまな細胞で細胞増殖を誘導する多くの増殖因子が発見された。これらの因子は主に細胞表面にある受容体への結合によって細胞内シグナルを活性化し、産生された多くの因子により機能を発揮する。この受容体は特定の細胞だけでなく、多くの種類の細胞に発現しており、複数の臓器で多彩な作用を示すことが明らかになった。機能解析の結果から、いくつかの増殖因子が血管新生作用を有することが明らかになり、虚血肢治療に対する新しいアプローチとして、増殖因子の投与による治療的血管新生療法の概念が提唱された²⁾。もともとヒト虚血部位には側副血行路の発達などで、虚血状態のダメージを軽減する機能が存在している。治療的血管新生療法はこの現象を積極的に後押しすることができ、有効な組織血液還流の改善が期待される。その効果による重症虚血肢の安静時疼痛や潰瘍の治療は、下肢切断を回避することが可能ではないかと考えられた。

これまで検討された増殖因子の中で臨床研究まで進んだものは、血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor; VEGF)、線維芽細胞増殖因子 (Fibroblast growth factors; FGF)、HGF であり、それぞれのサブタイプで研究が進められている。ターゲット増殖因子の組み換え型蛋白質を投与する治療法も有効と考えられるが、臨床応用にはいくつかの問題点があげられている。虚血肢に有効濃度まで蛋白質を到達させるには長期間にわたる全身投与が必要になる。そのため大量の薬剤使用による高コストと副作用の懸念が考えられる。特に悪性腫瘍や網膜症などは血管新生によって発症・進展をきたす可能性が高く、高濃度の血中増殖因子の維持は病態進展につながる可能性が高

い。これらのリスクを回避する方法として、遺伝子治療による局所療法が考案された。目的遺伝子を組み込んだプラスミドやウイルスベクターを虚血肢に直接投与し、局所で産生・分泌された増殖因子が血管新生を誘導する方法である。この方法は、少量の投与で比較的長期間の増殖因子の発現を得ることができる。そのため、全身への影響を抑え、ベクターの選択・改良によって遺伝子発現期間と発現量をコントロールした局所療法が可能となる。

これまで末梢動脈疾患に対して、血管新生の誘導を目的とした遺伝子治療による臨床研究がいくつか報告されている。もっとも最初に発表された論文は VEGF を使った研究で、VEGF165 プラスミドの筋肉注射により重症虚血肢の組織血流量の改善を報告した³⁾。同様にアデノウイルスベクターを使った VEGF121 の遺伝子治療でも有効性が確認されたが、第 2 相試験では有効性が確認されなかった⁴⁾。FGF-1 プラスミドの筋肉内投与の研究も積極的に行われ、525 症例を対象とした第 3 相試験まで進んだが、有効性は確認されなかった⁵⁾。虚血状態の多様性のためか、大規模試験で有効性を確認することは困難である。しかし、新たな遺伝子治療のターゲットとして HGF による血管新生療法の開発も進められていた (表 1)。

3 肝細胞増殖因子

HGF は 69 kD の α 鎖と 34 kD の β 鎖がジスルフィド結合しているヘテロ 2 量体で、肝細胞の特異的な増殖因子として分離・精製された。その後の研究で、HGF は腎尿管上皮や血管内皮細胞などの多くの細胞を増殖する機能を持つことが明らかになった。HGF の特異的受容体は c-Met で、生体内のさまざまな細胞に発現しており、血管系では血管内皮細胞や平滑筋細胞に発現が認められている。活性化された c-Met は細

表 1 主な第 2~3 相臨床試験

増殖因子	ベクター	投与方法	症例数	主要評価項目の改善	文献
VEGF165	Naked pDNA	im	6	あり	3
165	Adenovirus plasmid/liposome	IA (PTA 後)	54	なし	14
165	Naked pDNA	im	54	なし	15
121	Naked pDNA	im	105	なし	4
FGF-1	Naked pDNA	im	525	なし	5

pDNA : Plasmid DNA, im : intra-muscular injection, IA : intra-arterial injection, PTA : Percutaneous transluminal angioplasty

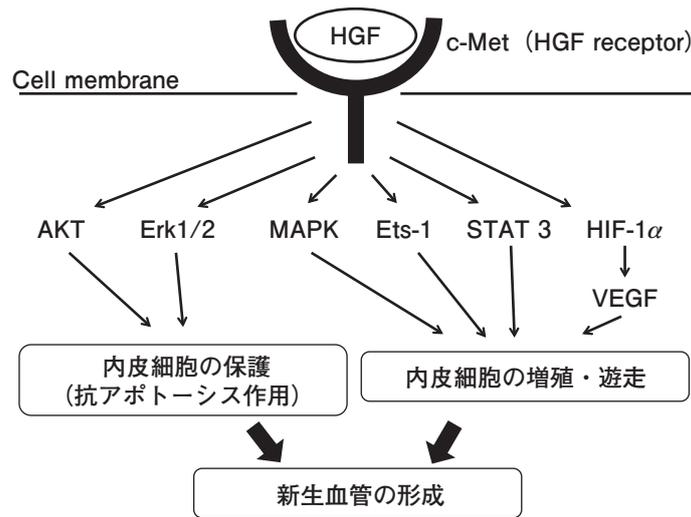


図1 HGFの作用機序

HGFは血管内皮細胞膜の特異的受容体c-Metに結合して、様々な細胞内シグナルと転写因子を活性化させる。これらの活性化により内皮細胞の増殖・保護作用を獲得し、新生血管を誘導する。MAPK：Mitogen-activated Protein Kinase, Erk：Extracellular Signal-regulated Kinase, Ets-1：E26 Transformation-specific Sequence-1, STAT：Signal Transducer and Activator of Transcription, HIF：Hypoxia-inducible Factor

胞増殖や細胞死などを制御するセリン・スレオニンキナーゼMAPK, AKTなどの細胞内シグナルを活性化させ、血管新生, 抗アポトーシス, 抗線維化, 抗炎症などの多彩な作用を示す⁶⁾。さらに遺伝子発現を制御する転写因子Ets-1やSTAT3も活性化することで血管新生を誘導するサイトカインの分泌を亢進して血管新生を増強する。また、HGFはVEGFの産生・分泌を促すことができ、虚血で誘導される転写因子HIF-1 α を介する経路と報告されている。これらの総合的な効果でHGFは血管内皮細胞の増殖促進・保護作用により強い血管新生作用を示すと考えられている(図1)。

HGF, VEGF, bFGFを比較検討した細胞実験では、3者とも血管内皮細胞の増殖を著明に促進するが、HGFの血管内皮細胞の増殖能はVEGFやbFGFより強力であった。血管平滑筋細胞に対しては、bFGFのみが細胞増殖を誘導し、他の2者には増殖能は見られなかった。一方、平滑筋細胞の遊走能はHGFのみで認められた。また、平滑筋細胞において、bFGFは炎症を制御する転写因子を活性化し、下流の炎症性サイトカインの遺伝子発現を亢進させるが、HGFとVEGFにはこの反応は見られなかった。これらのことから、HGF, VEGF, FGFの血管新生の誘導方法は異なり、HGFは炎症反応を惹起することなく血管新生を誘導することができる。また、血管新生に必要な平滑筋細胞の過剰な増殖を引き起こすことなく、安定した新生

血管を形成していると考えられる。これらのことは、HGFによる血管新生療法の利点となっている⁷⁾。

4 HGF プラスミド：コラテジェン

HGF プラスミドであるコラテジェンはpVAX1 プラスミドベクターにヒトHGFをコードしたDNAが組み込まれている⁸⁾。下肢虚血モデルを使った動物実験では、虚血病巣付近の筋肉内投与によってHGF濃度は7日目にピークを迎え、毛細血管の増加や血流改善が容量依存性に確認されている。また、この効果は糖尿病モデルでも見られている。筋肉内に投与されたコラテジェンは60日後には筋肉内で測定感度以下になる。全身の影響では、投与後1日目に脾臓、心臓、肺、骨髄、肝臓、すい臓、腎臓、副腎、脳で確認され、4日目には脾臓のみになり、7日目には投与部以外の臓器で測定感度以下となった。また、コラテジェンはヒト血漿中で速やかに分解され、半減期は1分以下である。HGF プラスミドの検出はPCR法で行ったため、各臓器で検出されるHGFはプラスミドの断片化されたものかもしれない。重要なポイントとして、血中HGF濃度は実験期間を通じて測定限度以下であり、全身への影響は少ないと考えられている。

5 HGF プラスミドを使った臨床研究

HGF プラスミドによるヒト下肢虚血肢に対する治

表2 HGF プラスミドを使った臨床試験

研究デザイン	対象疾患	症例数	主要評価項目	主な結果	文献
Phase 1/2 (Open label)	ASO TAO	HGF : 22	安全性 有効性 (潰瘍など)	安全性, 有効性を 確認	9
Phase 2 (DBT)	ASO	HGF : 78 Plasebo : 26	安全性 組織循環	安全性に問題なし TcPO ₂ の上昇	10
Phase 2 (DBT)	ASO	HGF : 21 Plasebo : 6	安全性 TBI 安静時疼痛の軽減	安全性に問題なし TBI の上昇 有効	11
Phase 3 (DBT)	ASO	HGF : 29 Plasebo : 15	潰瘍の縮小 安静時疼痛の軽減	有効 有意差なし	12
Phase 3 (Open label)	TAO	HGF : 10	潰瘍の縮小	有効	13

DBT : double-blind trial, TcPO₂ : transcutaneous oxygen tension (経皮酸素分圧), TBI : toe brachial index (足趾上腕血圧比)

療法の検討は、日本とアメリカで5つの臨床研究として行われ、全207症例が対象となった⁹⁻¹³⁾(表2)。第1/2相試験は安静時疼痛、潰瘍・壊疽をきたしたASOとTAOの22症例を対象として日本で行われた。続いて、第2相試験は米国で行われ、ASOを対象に104症例と27症例の2回の試験が実施された。これらの第1相と2相の試験で、HGFプラスミド(コラテジェン)の安全性が確認され、潰瘍の縮小、安静時疼痛の軽減に加え、経皮酸素分圧および足趾上腕血圧比の上昇などの有効性が確認された。

第1, 2相試験の結果を受け、第3相試験である無作為化二重盲検比較対照試験が日本で行われた。血行再建術の適応がなく従来の治療法に反応しない重症虚血肢のASOが対象で、サンプルサイズは120例の予定で開始され、40症例が終了した時点で中間解析を行うプロトコルである。治療法は0.5mgのHGFプラスミドを8カ所(計4mg)に超音波ガイドで筋肉内投与し、4週後に2回目の投与を行う。一次エンドポイントは治療開始後12週目の潰瘍の縮小率と安静時疼痛の軽減率で、フォローアップは最大15カ月まで行っている。中間解析はHGFプラスミド群27例、プラセボ群13例で行い、エンドポイントの2つを合わせた有効性の評価では、HGFプラスミド群70.4%(19/27)、プラセボ群30.8%(4/13)の有効率で、HGFプラスミド群で有意に高い改善を認めた。エンドポイント別にみると、潰瘍縮小の有効率は、HGFプラスミド群100%(11/11)、プラセボ群40%(2/5)と、HGFプラスミド群が有意に高い結果であった。安静時疼痛の改善はHGFプラスミド群50%(8/16)、プラセボ群25%(2/8)で、HGFプラスミド群で高

い改善率を示したが、有意な差ではなかった。これは少ないサンプルサイズが原因と考えられている。副作用としては注入部の疼痛が認められたが、治療に関連した重大な副作用は見られていない。

バージャー病でも同様のプロトコルで臨床試験が行われたが、リクルートできる症例数が少ないため非盲検試験で行われている。対象は潰瘍を有するバージャー病で、既存の治療法が効果なく、血行再建術の適応もない症例である。一次エンドポイントは潰瘍病変の縮小である。投与量、投与法はASOと同じだが、8週目に潰瘍の縮小が15%未満と判定された症例では、3回目の投与を行った。12週目の評価では、66.7%(6/9)で潰瘍が縮小し、高い有効性を示している。また、潰瘍の完全閉鎖が得られた症例は5例であり、この内で15カ月後の評価が得られた3例は潰瘍消失が持続しており、長期間にわたる効果が示されている。

副作用に関しては、HGFは強力な血管新生作用を持つことから、糖尿病性網膜症などの血管増殖性疾患への影響が危惧された。特に糖尿病性網膜症や悪性腫瘍などではHGFや受容体c-Metが治療ターゲットとして研究されており、既往のある症例では注意が必要である。HGFプラスミド投与によって血中HGF濃度が変化しないことから影響は少ないと考えられているが、試験中に悪性腫瘍を認めた事例があり、既存の悪性腫瘍を進展させる可能性は否定できない。一方、HGFプラスミド注入部での血管系の腫瘍や近傍の悪性腫瘍に影響を与える可能性はある。しかし、これまでの動物および臨床研究では、HGFプラスミドの投与によってこのような重篤な副作用は見られていない。また、抗HGF抗体の産生などの免疫反応の惹起も確

認められていない。新しいタイプの治療法のため、副作用の評価が今後も重要である。

6 コラテジェンの使用について

コラテジェンは、1バイアル中に4 mgのHGFプラスミドを含有している。適応、投与法は臨床試験と同じで、血行再建術の施行が困難で標準薬物療法の効果が不十分なPADの潰瘍が適応となる。投与法は超音波ガイド下に1回0.5 mgを8カ所の虚血部位に筋肉内投与し、4週間隔で2回行う。ただし効果が不十分な場合は、3回目の投与も可能である。実施できる施設に制限があり、重症虚血肢の治療経験が豊富な医師のもと、複数の診療科が連携して創傷管理をしている施設となっている。残念ながら重度腎疾患を有する症例は臨床研究で除外されていた。しかし、透析療法中の症例にも適応はあり、治療効果は期待できる。また、HGFプラスミドは血中で速やかに分解され核酸断片となるので、透析療法への影響も少ないと考えられる。

おわりに

血行再建の適応がなく、既存の薬物療法の効果が不十分なASOとTAOの潰瘍形成に対して、新たなアプローチとして遺伝子治療が可能になった。いくつかの条件のある限られた承認であり、今後の追跡調査が必要であるが、コラテジェンの使用により重症虚血肢の下肢切断が回避できる多くの症例があると考えられ、効果的な治療法がなかった疾患への新規治療法として大きな医療貢献が得られると期待されている。

利益相反：臨床遺伝子治療学は寄附講座であり、森下はアンジェス株式会社の顧問を務めている。

文 献

- 1) Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, et al. : Inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II). *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2007; 33 : S1-70.
- 2) Melillo G, Scoccianti M, Kovessi I, et al. : Gene therapy for collateral vessel development. *Cardiovasc Res* 1997; 35 : 480-489.
- 3) Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, et al. : Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor : preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; 28 : 964-973.

- 4) Rajagopalan S, Mohler ER, Lederman RJ, et al. : Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease : a phase II randomized, doubleblind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation* 2003; 108 : 1933-1938.
- 5) Belch J, Hiatt WR, Baumgartner I, et al. : Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death : a randomized placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia. *Lancet* 2011; 377 : 1929-1937.
- 6) Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, et al. : Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors : additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. *J Hypertens* 1996; 14 : 1067-1072.
- 7) Kaga T, Kawano H, Sakaguchi M, et al. : Hepatocyte growth factor stimulated angiogenesis without inflammation : differential actions between hepatocyte growth factor, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Vascul Pharmacol* 2012; 57 : 3-9.
- 8) Suda H, Murakami A, Kaga T, et al. : Beperminogene plasmid for the treatment of critical limb ischemia. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014; 12 : 1145-1156.
- 9) Morishita R, Makino H, Aoki M, et al. : Phase I/IIa clinical trial of therapeutic angiogenesis using hepatocyte growth factor gene transfer to treat critical limb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31 : 713-720.
- 10) Powell RJ, Simons M, Mendelsohn FO, et al. : Results of a double-blind, placebo controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 2008; 118 : 58-65.
- 11) Powell RJ, Goodney P, Mendelsohn FO, et al. : Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration : results of the HGF-0205 trial. *J Vasc Surg* 2010; 52 : 1525-1530.
- 12) 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 : 1152-1161.
- 13) Shigematsu H, Yasuda K, Iwai T, et al. : Transfection of human HGF plasmid DNA improves limb salvage in Buerger's disease patient with critical limb ischemia. *Int Angiol* 2011; 30 : 140-149.
- 14) Mäkinen K, Manninen H, Hedman M, et al. : Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery : a randomized, placebo-controlled, double-blinded phase II study. *Mol*

- Ther 2002; 6 : 127-133.
- 15) Kusumanto YH, van Weel V, Mulder NH, et al. : Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia : a double-blind randomized trial. Hum Gene Ther 2006; 17 : 683-691.