

血管新生療法の現状と展望

新見 伸吾*, 原島 瑞*, 日向 昌司*, 野間 誠司**,
川西 徹*, 早川 堯夫***

(受付:平成18年5月16日, 受理:平成18年8月30日)

State and Perspective of Therapeutic Angiogenesis

Shingo NIIMI*, Mizuho HARASHIMA*, Masashi HYUGA*, Seiji NOMA**,
Toru KAWANISHI* and Takao HAYAKAWA***

はじめに

血管系は我々の体の中で最も大きな組織であり、角膜と軟骨など一部の組織を除きすべての組織に存在する。そのため、多くの組織における血管の損傷は様々な疾患の原因となっている。実際、心臓や脳の大動脈あるいは中動脈におけるアテローム性動脈硬化症による閉塞が生じることで脳梗塞や心筋梗塞の原因となる。これらの疾患はいずれも血管の機能が失われ虚血となることで発症するもので、先進国に共通する致命的な疾患の一つとなっている。現在、その治療法の開発が重要な課題となっている。

虚血性疾患の一つである虚血性心臓病は、我が国において悪性新生物に次ぐ死亡原因となっている。西洋社会においても罹患率及び死亡率が高く、米国の場合その患者数は1000万人以上であり世界全体では数億人にも達する¹⁾。

虚血性心臓病の症状は、心筋の損傷がない労作性狭心症から、左心室において可逆的及び非可逆的な障害のある心筋虚血の段階、非可逆的な心筋障害の段

階、鬱血性心不全に至る壊死まで幅広い。その進行速度は主として動脈硬化性プラークの成長あるいは一過性の破裂に依存している。このような症状が進行すると慢性的な安定狭心症あるいは心筋梗塞を含む急性冠状動脈症候群になり、心外膜冠動脈において血流が障害される。その結果、冠動脈血液により酸素が必要量供給されない場合、心臓組織が虚血になり冠状動脈の灌流が心筋の酸素要求性に対応できなくなる。虚血組織に対して血液の供給を回復させるには、冠状動脈灌流を改善させる必要がある。その戦略として従来から用いられてきた治療法は、冠動脈バイパスあるいは冠動脈血管形成術のような外科的に障害が起きた心筋に対して血流を物理的に回復させる方法、亜硝酸や β -ブロッカーのような薬物を投与することで心筋の酸素要求性を低下させ灌流の供給/需要のバランスを回復させる方法などがある。

しかし、従来の治療法では改善されない症例は少なくなく、虚血性心臓病は増加の一途を辿っている。また、侵襲的な治療法では効果的な再血管形成が期

* 国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (〒158-8501)
Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, 1-18-1
Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

** 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都中央区日本橋小伝馬町 13-4 共同ビル 4 階
(〒103-0001)
The Japan Health Sciences Foundation, Kyodo Bldg. 4F, 13-4 Nihonbashi, Kodenma-cho, Chuo-ku,
Tokyo 103-0001, Japan

*** 独立行政法人医薬品医療機器総合機構 東京都千代田区霞ヶ関 3-3-2 新霞ヶ関ビル (〒100-0013)
Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, Shinkasumigaseki Bldg. 3-3-2 Kasumigaseki,
Chiyoda-ku, Tokyo 100-0013, Japan

待できない、いわゆる選択肢のない末期の冠状動脈疾患の患者の存在も無視できない^{2,3)}。これらの患者は一般的に高齢で、瀰漫性冠状動脈疾患、末梢小血管、高コレステロールレベル、糖尿病などの合併症を有していることが特徴で、このような状態では生体に本来備わっている虚血に対する血管新生及び動脈形成能そのものが低下している⁴⁻⁶⁾。したがって、このような状態の患者は、従来の血管再生術による治療が困難となる。今後、高齢化に伴いこのような症例が増加することが危惧される。冠状動脈アテローム性動脈硬化症もこのような症例の一つである。虚血性疾患の原因となる冠状動脈アテローム性動脈硬化症は、軽度の場合においては直に死に至らないものの鬱血性心不全を引き起こすことがあり、米国においては成人の約1%が基礎疾患により障害を受け、その数は毎年55万人の割合で増加している。その発症率は65歳以上では1000人当たり10人であるが、障害を受ける数は年齢の上昇に伴い増大することが予想される。多くの場合において大部分の心筋組織は生存しており、左心室の機能はほとんど障害されていない。しかし、侵襲的な治療法では血管は再形成されない³⁾。更に、鬱血性心不全により入院する患者数は1979年には37.7万人であったが、2000年には99.9万人(165%の増加)と年々増加しており問題となっている¹⁾。

このような疾患に対して、血管新生療法は既存の血管から新しい血管を再生させるものであり、罹患した動脈の機能を再建することが部分的ではあるが可能である。実際、血管新生療法に関する動物モデルを用いた研究及び前臨床試験では血管の成長促進(血管新生)は標的器官の灌流と機能を改善する上で効果的であることが示唆されている。

本稿では、これまで試みられてきた血管新生療法として、たん白質製剤を用いた療法、遺伝子治療、細胞治療を取り上げ、その現状及び今後の課題とともに、血管新生療法の戦略を立てる場合に基本となる血管成長の生物学的プロセスに関する最近の知見について概説する。

1. 血管新生“neovascularization”の生理的な概念

血管発生“vasculogenesis”, 狭義の血管新生“angiogenesis”, 動脈新生“arteriogenesis”は理論的

に異なったプロセスであり、これらのプロセスを経て広義の血管新生“neovascularization”が起きる⁷⁾。なお発生学の観点からは、広義の血管新生“neovascularization”は血管発生と狭義の血管新生“angiogenesis”に大別される。なお、特にことわらない限り本稿において血管新生と述べるときは狭義のものでangiogenesisを指す。

血管発生とは内皮前駆細胞“endothelial progenitor cell”(EPC)からの*in situ*における血管形成のプロセスである。また、血管は既存の血管から発芽するか、あるいはトータルとして血管新生に分類されるプロセスである。また、内皮及び造血幹細胞は共通の幹細胞である血管芽細胞に由来する⁸⁾。卵黄嚢において血管芽細胞は細胞集合体あるいは血島を形成し、それらの中心部に位置する造血幹細胞は血球系に、辺縁部に位置するEPCは内皮細胞にそれぞれ分化する。EPC及び血管芽細胞が末梢血から分離されてEPCが活発な血管新生部位の中に見出されるまでは¹⁰⁻¹²⁾、これらの細胞は胎児の発達のみに関与すると考えられていた。血管発生は狭義の血管新生とともに、成人組織における広義の血管新生に寄与すると考えられている^{13,14)}。また、組織虚血によりEPCが新生血管へ強制動員されて取り込まれるという知見がある^{15,16)}。しかし、EPCの新生血管への取り込みを否定する知見もあり¹⁷⁾、統一した見解は得られていない。EPCと造血幹細胞の表面マーカーはFlk-1, Tie-2, c-Kit, Sca-1, CD133, CD34のように同じものが多く、マーカーにより単純にEPCを規定することはできない。EPCにはVE-カドヘリンそしてAC133も発現する。AC133はEPCに特異的に発現するオーファンレセプターであり、EPCが成熟内皮細胞に分化すると発現は消失する¹⁸⁾。EPCの前駆細胞としては、造血幹細胞、サイドポピュレーションの細胞(CD34⁻, c-kit⁺, Sca-1⁺)¹⁹⁾及び多能性成人幹細胞あるいはmultipotent adult progenitor cell(MAPC)(CD34⁻, CD45⁻, c-Kit⁻, GlyA⁻)^{20,21)}のような骨髄由来幹/前駆細胞がある。

血管新生とは後毛細血管細静脈からの新しい毛細血管の発芽である。それには、内皮細胞の活性化、細胞外マトリックスの分解、増殖、遊走更には周皮細胞そして平滑筋細胞の強制動員に依存した新しい血管壁の安定化のプロセスが関与している²²⁾。血管

新生の促進は、生理的及び病的条件下において低酸素状態あるいは虚血により起こる。なお、虚血における生体の反応を Fig. 1 に示す。

転写活性化因子である“hypoxia-inducible factor 1” (HIF-1) は、恒常的に発現する HIF-1 β サブユニットと酸素により調節される HIF-1 α サブユニットのヘテロダイマーである^{23,24}。HIF-1 α は低酸素により起きる血管新生の促進において中心的な役割を果たしている。HIF-1 α は VEGF, Flt-1, neuropilin-1, “angiopoietin-1” (Ang-1), Ang-2, PDGF, “placental growth factor” (PlGF) のような各種血管新生メディエーターの発現を調節する^{25-28,29}。更に、HIF-1 α の Ang-1 及び Ang-2 に対する作用は細胞により異なり、活性化因子あるいは抑制因子として作用し、内皮細胞の増殖あるいは内皮細胞-平滑筋細胞の相互作用を調節する²⁷。HIF-1 α の活性化は TNF- α , IL-1³⁰⁻³², PR39³³ のような炎症性サイトカインにより誘導される。

内皮細胞の遊走及び増殖は毛細血管の管腔形成に必要であるが、これらの作用は“plasminogen activator” (PA)/プラスミン系のプロテアーゼ、MMP、ヘパリナーゼにより調節される。プラスミノゲンは様々な部位に存在する血漿たん白質であり、PAである u-PA 及び t-PA によりプラスミンに転換される。プラスミンは特定の“matrix metalloprotease” (MMP) により活性化され、ファイブロネクチン、ラミニン、プロテオグリカンのような細胞外マトリ

ックスたん白質を分解する。また、その分解は“tissue inhibitor of metalloprotease” (TIMP) 及び“plasminogen activator inhibitor-1” (PAI-1) により阻害される。

新しい血管の成熟には、PDGF, TGF- β , Ang-1 による未熟な内皮細胞ネットワークの安定化が関与していると考えられている。また、その安定化のプロセスには、周皮細胞/平滑筋細胞の増殖及び分化の促進、内皮管への強制動員及び内皮細胞の再プログラミングが含まれる。この期間において、動脈あるいは静脈のどちらかに分化するかの決定及びその発達も決まる場合がある。著しく障害された動脈が再形成されるためには血管が外側へ向かってリモデリングされる過程が必須である。そのプロセスは側副の形成あるいは動脈形成と必ずしも同一ではないが、基本的な機構は類似していると考えられている。一方では、EPC が血管新生と動脈形成の両方に関与するともいわれている^{34,35}。

動脈形成は成熟のプロセス、あるいは恐らく側副導管の *de novo* の成長のプロセスであり、有効に血流を運ぶことのできる血管を産生する^{36,37}。動脈形成の促進には、閉塞した動脈に近接した部位における剪断応力の増加、及びその後起きる血液由来の単核球細胞の蓄積が重要と考えられている。また、動脈形成の促進因子には CXC ケモカイン、FGF, PDGF, VEGF など数多くの増殖因子が関与している³⁷⁻⁴¹。動脈形成の重要な点は、側副の発達が

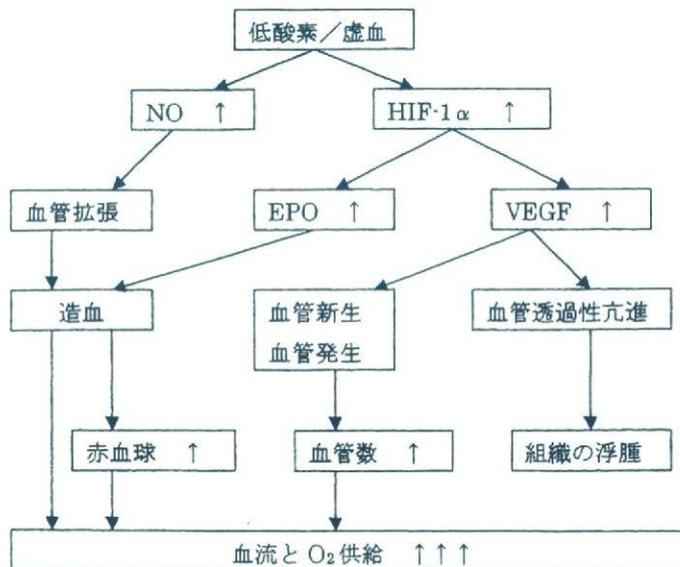


Fig. 1 虚血に対する組織の反応

血管新生と同様に漏れが生じている血管において *de novo* で起きるか、あるいは既存の血管が再構成されて肥大化により起こるかである。既存の側副の広さは種間において大きく異なり、関与するその他の因子について解明が不十分である。したがって、このような側副の発達プロセスが実際に起きているかどうかについてはよくわかっていない。げっ歯類の後肢虚血モデルでは既存血管が再構成される。既存の側副の数及び成長は遺伝的な因子に影響され、種内及び種間で変動すると考えられる³⁷⁾。

血管新生が開始された後、どのようなプロセスを経て動脈のネットワークが効率的に形成されるかについては不明の点が多い。例えば、血管新生が体系的に起こり、その結果として動脈及び静脈が形成されるプロセスに関する分子及び血流力学的な機構に関する研究は始まったばかりである。動脈-静脈を規定する因子に関する知見は、ゼブラフィッシュの研究がほとんどである。血液循環が始まる前の段階で、VEGF, Notch-Jagged, Ephrin が動脈-静脈を規定すると考えられる⁴²⁾。

2. 血管新生療法において有望な増殖因子

2.1 VEGF

VEGF ファミリーは現在研究が最も進んでいる血管新生促進因子であり、その中で典型的なものは VEGF-A である。少なくとも四種類のアイソフォームの VEGF-A が選択的スプライシングの結果として生成され、121 (VEGF₁₂₁), 165 (VEGF₁₆₅), 189 (VEGF₁₈₉) 及び 206 (VEGF₂₀₆) がある⁴³⁾。VEGF₁₄₅ のような他のアイソフォームも知られているが、その意義については不明である⁴⁴⁾。VEGF のアイソフォームにはヘパリン結合能における差異があり、また血管新生能も異なる。VEGF₁₆₅ と VEGF₁₂₁ はヘパリンには結合せず、血液循環中で検出される。しかし、VEGF₁₆₅ は VEGF₁₂₁ と異なり他の細胞表面受容体である neuropilin-1 に結合し、neuropilin 結合領域の欠損した VEGF₁₂₁ に比べて活性が高い⁴⁵⁾。VEGF₁₆₅ の血管新生能は VEGF₁₂₁ に比べてはるかに高い。一方、VEGF₁₈₉ と VEGF₂₀₆ はヘパリン硫酸に対する親和性が高いため、細胞あるいはマトリックスに結合したままの状態が存在する。VEGF ファミリーは他に VEGF-B (VEGF-3), VEGF-C (VEGF-2), VEGF-D,

VEGF-E 及び PlGF が知られている。VEGF-E はウイルスたん白質であり、そのホモログは哺乳類に存在しない。VEGF は三種類のいずれかあるいはすべての種類の VEGF 受容体チロシンキナーゼ、flt-1 (VEGFR-1), KDR/flk-1 (VEGFR-2), flt-3 (VEGFR-3) に異なった親和性で結合する。VEGFR-2 はその中でも血管新生のシグナルトランスダクションを最も強く活性化する。また、VEGFR-1 ほどではないが VEGFR-1 も PlGF 及び VEGF-1 が結合することにより同様に活性化し、VEGF-1 は VEGF ファミリーの中で骨格筋における血管新生及びリンパ管新生の最も強力な誘導因子である⁴⁶⁾。

VEGF は内皮細胞に対して血管新生促進を促進し、それには遊走促進、透過性促進、生存促進、PI-3K 及び間質性コラゲナーゼの生成促進などが関与している^{47,48)}。VEGF は平滑筋の遊走は促進するが、平滑筋細胞及び繊維芽細胞の増殖は促進しない⁴⁹⁾。VEGF は血管パターンの形成に至る血管芽細胞の成長及び形態形成を誘導する⁵⁰⁾。VEGFR-3 の役割については十分解明されていないが、リンパ管新生に関与していると考えられている⁵¹⁾。PlGF は後肢及び心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁵²⁾。

VEGF-A はその他に以下のような様々な血管新生促進作用を示す。①内皮細胞の培養において管状構造を誘導する。② *in vivo* マウスのマトリゲルラッグアッセイにおいて血管新生を誘導する。③内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周りあるいは中へのホーミングを促進することから、成人における血管発生も誘導する。④ラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する。

VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈ のノックアウトマウスは虚血系心筋を発症し、心筋血管新生障害による心臓病患のため、生後 14 日以内に死亡する⁵³⁾。VEGF₁₆₄, VEGF₁₈₈ の欠損により誘導される致死性のフェノタイプは、VEGF₁₄₅ と VEGF₁₂₀ が発現してもレスキューされない。三種類の VEGF 受容体のどれかを破壊すると胎生致死になる。最も顕著なフェノタイプは VEGFR-2 の欠損であり、血管形成が完全に障害される⁵⁴⁾。ホモ接合性 VEGFR-2 遺伝子欠損では血管の形成が不十分で、胎生 8.5 日で死ぬ⁵⁵⁾。

VEGFR-3の欠損では胎生9.5日後初期血管叢の再構成が障害され循環不全となる⁵⁶⁾。したがって、血管の初期における発達にはすべてのVEGFRが協調的に発現する必要がある。

2.2 FGF

FGFには酸性FGF (FGF-1) 及び塩基性FGF (FGF-2) だけでなく21種類の構造が関連したポリペプチド増殖因子が含まれる^{57,58)}。FGFはチロシンキナーゼファミリー細胞表面受容体及び非チロシンキナーゼ受容体syndecan-4に結合し、生物学的な作用を示す^{59,60)}。FGFはVEGFと同様に、内皮細胞の増殖、遊走及びPA及び間質性コラゲナーゼの生成を促進する⁶¹⁾。また、FGFはVEGFと異なり、中胚葉及び神経外胚葉由来のほとんどの細胞、例えば周皮細胞、繊維芽細胞、筋芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞の増殖を促進する⁶¹⁾。FGF-4は後肢虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁶²⁾。FGF-2は胎児及び培養系においてウズラの上皮の体節に作用し血管芽細胞への分化を誘導する⁶⁰⁾。

2.3 PDGF

PDGFはPDGF-AからDより構成されるファミリーのメンバーであり、VEGFと構造的に類似している⁶³⁾。その中でもPDGF-BBが最も作用が顕著であり、血管成長促進活性を示すと共に、周皮細胞による新しく形成された血管構造のコートイングを促進することにより、動脈形成を促進及び安定化する^{64,65)}。更に、PDGF-BBは側副を誘導する⁶⁶⁾。

2.4 その他の増殖因子

G-CSF, GM-CSF及びMCP-1は単核球の流入を促進することにより、動脈形成を促進する。HGF⁶⁷⁾、IL-6⁶⁸⁾、MCP-1⁶⁹⁾は内皮細胞培養系において管腔構造を誘導し、血管新生因子として作用すると考えられている。また、これら因子は*in vivo*マウスのマトリゲルプラグアッセイにおいて血管新生を誘導する⁶⁹⁾。HGF⁷⁰⁾及びIL-6⁷¹⁾は内皮前駆細胞の骨髄からの強制動員、そして初期の段階の血管の周囲あるいは中へのホーミングを促進し、成人における血管発生も誘導する。VEGFの過剰発現により炎症が誘導される⁷²⁾、HGFはその誘導を抑制する⁷³⁾。一般的に、血管新生促進作用を有する増殖因子はラット、マウス、ウサギの虚血後肢のような古典的な動脈形成モデルにおいて虚血側副の再構成を誘導する⁷⁴⁾。Ang-2のみが発現した状態では、

内皮細胞同士の結合が緩みアポトーシスが誘導されるが、VEGFの共存下では内皮細胞の生存に必要なシグナルが生じ、細胞の解離により増殖及び遊走が起きる⁷⁵⁾。一方、Ang-1は静止状態に発現するが、血管透過性の減少、内皮細胞の結合及び内皮細胞周囲の細胞の動員による血管安定化といった作用が示唆されている⁷⁶⁻⁷⁹⁾。Ang-1は静止状態をより安定化させることが示唆されているが、単独あるいはVEGFと組み合わせて過剰発現すると血管新生及び動脈形成を促進する^{80,81)}。Ang-1は後肢及び心筋虚血の動物モデルにおいて側副血管の成長を改善する⁸²⁾。TGF- β はマウス胎児の外側の中胚葉に作用し卵黄囊の血管発生を誘導する⁸³⁾。更に、“nerve growth factor” (NGF)、“neuropeptide Y” (NPY)をはじめとする様々な因子が虚血組織において新しい血管の成長を誘導することがみつまっている^{84,85)}。

なお、各因子が広義の血管新生“neovascularization”と狭義の血管新生“angiogenesis”のどの段階に作用するかについて、Table 1及び2にまとめて示す。

3. 内皮が増殖因子による血管新生促進に及ぼす影響

冠動脈疾患に対する動脈形成反応が弱い患者から取り出した単球は、低酸素刺激によるVEGFのアップレギュレーションが低下する⁸⁶⁾。同様に、高齢あるいは糖尿病ウサギの下肢において、低酸素刺激によるHIF-1 α たん白質の誘導、及びDNA結合能の増加が低下し、その結果、VEGFのアップレギュレーションが低下する⁸⁷⁾。血管新生の要求が高まる時期において、HGF/SFも不足する。閉塞性動脈の患者では低酸素の期間、血管におけるHGF産生はダウンレギュレーションされる⁸⁸⁾。同様にc-met受容体もダウンレギュレーションされる⁸⁹⁾。興味深いことに、低酸素の期間におけるHGFのダウンレギュレーションは抗TGF- β 抗体⁹⁰⁾及びFGF-2の遺伝子導入⁹¹⁾により抑制されることから、TGF- β 及びFGF-2はHGF産生においてそれぞれ抑制及び促進因子として作用することが示されている。対照的に、心筋梗塞の患者では、HGFは顕著に増加する⁹²⁾。高齢のレシピエントマウスに移植された心臓における血管新生反応は低下するが、その原因と

Table 1 増殖因子が血管新生“neovascularization”の各プロセスに及ぼす作用

	血管新生	動脈形成	血管発生
VEGF-A	+	+	+
FGF-2	+	+	+
HGF	+	+	?
MCP-1	+	+	?
TGF- β	+	+	+
GM-CSF	?	+	+
PDGF-BB	+	+	?

Table 2 増殖因子による血管新生の調節

血管新生のプロセス	血管新生のプロセスで生じる現象	血管新生のプロセスに関与する増殖因子
血管新生の開始	周皮細胞の脱離, 基底膜の分解	Hif1- α , VEGF, Ang-2
新しい血管の形成	内皮細胞の増殖と遊走	VEGF, FGF
組織の要求に対する適応	流れの不足あるいは増殖因子の存在による新しい血管の退縮	Ang-2
成熟	周皮細胞の結合, 基底膜の沈着	PDGF, Ang-1

して PDGF-AB の強制動員の低下との関連が考えられる⁹³⁾。したがって、PDGF-B あるいは A 鎖の補充により、病態が改善される可能性がある。これに関連し、動物を用いた血管新生療法において有効性が示されている研究のほとんどすべては、正常で若い動物が用いられている。一方、「はじめに」の項で述べたように、臨床試験では進行したアテローム性動脈硬化症の患者で主に高齢者が対象となる。年齢の上昇に伴い、増殖因子による治療効果が低下し、その結果、臨床試験が失敗する可能性も場合によっては否定できない⁹⁴⁾。この可能性は、ApoE^{-/-}マウスにおいて血管新生促進因子の効果があまりよくないという知見からも示唆されている⁹⁵⁾。

4. 血管新生増殖因子たん白質を用いた血管新生療法の概要

血管新生療法の最終目的は重篤な作用部位において血管新生増殖因子のレベルを増加させることであり、そのための様々なデリバリーの方法が考えられる。正攻法としては組換えたん白質を局所あるいは組織にデリバリーすることである。このようなたん白質は静脈、動脈内特に冠動脈内、心筋内、心膜内に対するアプローチを用いて投与できる。その場合、デリバリーのタイプにかかわらず、理論的に正確な

用量反応性に関するデータは入手可能である。たん白質治療の場合は細胞への遺伝子導入、ウイルスあるいはプラスミドの転写、目的遺伝子のたん白質への翻訳が必要ない。たん白質治療の最大の問題点に血管新生反応の誘導に要する期間において治療効果を示す有効な濃度を維持することが必要ということである。なお、その期間はケースバイケースで異なり一概に定めることはできない。たん白質が新しい血管の成長を直接促進させる場合、新しい血管の成長の開始だけでなく、新しく形成された血管を安定化し成熟させるためには持続的に存在することが必要となるので、必要な期間は数週間の場合もある⁹⁶⁾。他方、「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、GM-CSF, G-CSF, PlGF, MCP-1 は単核球の強制動員を介して血管の成長及び安定化を促進することから、その期間はさほど長くなくてもよいのかもしれない。

5. 血管新生増殖因子たん白質を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究としてたん白質治療が用いられている (Table 3)。FGF-1 (10 μ g/kg) についてはその安全性が冠動脈 CABG バイパスグラフト “coronary-artery bypass graft” を受けた三枝冠動脈疾患の 20 人の患者で最初に示

されている。患者に対し増殖因子が内胸動脈左冠動脈前下降枝“left anterior descending coronary artery” (LAD) 吻合の近くに心筋内投与された⁹⁷⁾。臨床効果の面からみると血管造影による評価で増殖因子を処置した患者ではコントロールの患者に比べ、毛細血管充満圧の増加が示唆されたが、その他には冠動脈の灌流あるいは心室機能の改善を示す証拠はなかった。FGF-2を用いた別のCAGB補助療法試験がCAGBを受けた24人の患者を対象に実施されている。これは、対象患者が、生存しているが虚血である心筋に対して、血液を供給する主な動脈の一つが技術的な理由によりバイパスできないと考えられたケースである。全投与量として10あるいは100 μg のFGF-2あるいはプラセボを含有する10個のヘパリンアルギン酸ビーズを無作為に投与した⁹⁸⁾。3箇月後、100 μg のFGF-2を投与した患者における虚血障害の程度は、プラセボに比較して顕著に減少した。このグループの患者は寛解したが、コントロールグループの7人の内の3人は狭心症が持続し、そのうち2人は更に血管再生治療が必要となった。3年後において、高濃度のFGF-2を投与したグループでは症状改善が続いた⁹⁹⁾。

冠動脈内 FGF-2 投与の安全性及び治療効果は二つの非盲検用量増加試験で試された^{100,101)}。いずれの場合でも、投与によると考えられる低血圧の所見はなく、FGF-2は高濃度まで安全であった。多くの患者において、磁気共鳴及び放射性映像により心筋灌流の改善を示す客観的な知見だけでなく症状の改善が示された¹⁰²⁾。

治療効果については337人の二重盲検フェーズII試験で試験された¹⁰³⁾。試験では、プラセボのコントロールに対し、冠動脈内へ3用量(0.3, 3及び30 $\mu\text{g}/\text{kg}$)のFGF-2を投与し比較が行われた。90日の追跡データによると、FGF-2投与患者において運動トレッドミル時間“excise treadmill time”(ETT)が若干改善された。同時に、カナダの心臓血管学会“Canadian Cardiovascular Society”(CCS)狭心症基準及びシアトル狭心症質問表“Seattle Angina Questionnaire”(SAQ)狭心症頻度基準による評価で有意な改善がみられた。磁気共鳴では虚血領域の全体的な改善はみられなかった。試験のサブグループの解析によると、症状、ETTの改善、磁気共鳴により測定される障害虚血域の低下により

示される改善度は、病状がより悪化した患者で最も顕著であった。そのような患者では、他の患者と比べて基準となる運動能が低い、基準となる症状の頻度が高い、放射性映像による灌流欠損の程度が大きいといった特徴がある。しかし、FGFが本当に治療効果を有するかどうかについては二重盲検試験を用いた検討が必要である。

二重盲検試験の重要な点は二重盲検プラセボを対照として単に症状の改善を示すだけでなく、増殖因子治療に対し症状の改善を示した患者の集団において、その全体像を評価することである。また、この患者群母集団におけるプラセボ効果の程度と有病率の評価も重要な点である。実際、二重盲検試験におけるプラセボでの反応との比較により、初めて有効性を評価することができる。先に示した試験では、多数のハイリスク患者で冠動脈内 FGF-2 投与の相対的な安全性のみが示されたといえる。これに関連し、冠動脈疾患の患者においてプラセボによる治療効果が2年間持続することを示し、二重盲検試験の重要性を指摘している報告もある¹⁰⁴⁾。

プラセボ反応の有病率と非盲検解析の危険性は、冠動脈内及び静脈内 VEGF-A₁₆₅ の臨床試験で十分に示されている。冠動脈内 (n=16) 及び静脈内 (n=14) に VEGF の投与を行った2つの小規模なフェーズII試験では、単光子放出コンピュータ断層撮影“single-photon emission computed tomography”(SPECT) イメージングにおいて期待できる結果だけでなく、運動能、症状(脳梗塞のクラスとして規定)において有意な改善を示すと判定された^{105,106)}。これらの試験に続き、虚血における VEGF を用いた血管新生“Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis”(VIVA)試験が178人の患者で無作為に行われた¹⁰⁷⁾。この試験では120日まで追跡を行い、治療のオプションがない患者に対して、プラセボ、低用量 VEGF₁₆₅ (17 ng/kg/min) あるいは高用量 VEGF₁₆₅ (50 ng/kg/min) を無作為に割り当てた。VEGF₁₆₅ のグループの患者に対して、0日目に冠動脈内に注射後、3, 6, 9日目に静脈灌流を行った。この試験ではこの母集団に対する VEGF の効果は全体として示されなかった。VEGF₁₆₅ を処置した患者はプラセボと比較して、ベースラインから60日までの主要なエンドポイントである ETT における有意な改善はな

Table 3 血管新生療法としてたん白質を用いた臨床試験

たん白質	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果	文献
FGF-1	フェーズ I OL	CABA 補助療法	20	IM 注射	安全, 投与部位における毛細血管紅潮	97
	フェーズ I/II DBR	CABA 補助療法	24	へパリン・アルギン酸	虚血域サイズの低下, 3年間効果持続	98, 99
	フェーズ I OL, 投与量決定、 ブラセボコントロール	単独療法	25	IC 注入	耐性、低血圧	100
FGF-2	フェーズ I OL, 投与量決定	単独療法	52	IC 注入	安全, 高投与量で低血圧, 狭心症および 心筋灌流の改善	101, 102
	フェーズ II DBR	単独療法, FIRST 試験	337	IC 注入	ETT あるいは SPECT において安全/無効, ブラセボと比較し症状の短期間改善	103
	フェーズ I OL	単独療法	15	IC 注入	低投与量で低血圧, SPECT による障害サイ ズの低下	106
VEGF-A ₁₆₆	フェーズ I OL	単独療法	14	IV 注入	安全, 明らかに効果無し	105
	フェーズ II DBR	単独療法 VIVA 試 験	178	IC + IV 投与	コントロールと比較し, ETT, 症状, SPECT における改善無し	107
	フェーズ I/II DBR	単独療法	21	IC + IV 注入 2週間 注入	GM-CSF グループにおいて側副フローイン デックス (流動指数) の改善	108
GM-CSF	フェーズ I/II DBR	単独療法 (間欠性 跛行)	40	皮下注射	明らかに効果無し	111

“intramuscular” (IM) (筋肉内), “open label” (OL) (非盲検), “double-blind randomized” (DBR) (無作為二重盲検), “intracoronary” (IC) (冠動脈内),
 “intravenous” (IV) (静脈内)

かった。120日までプラセボと比較したが、高投与量 VEGF₁₆₅ 処置患者において ETT が改善する傾向はなかった。同様に、処置後 60 日で、VEGF₁₆₅ 処置患者とコントロールの患者を比較すると、狭心症のクラスでベースラインからの改善に違いはなかった。一方で、120 日目に高投与量 VEGF₁₆₅ で処置した患者とプラセボと比較すると、統計的に有意な狭心症のクラスの改善があった。60 日目で行った心筋灌流の試験では、VEGF 処理の患者とプラセボ処理の患者の比較において有意な改善はなかった。

これまで述べた戦略とは多少異なった戦略が小規模の試験で進められている。すなわち、進行性冠動脈疾患 “coronary artery disease” (CAD) の患者に対して、最初 GM-CSF を冠動脈内に投与し、続いて 2 週間後に皮下投与を行い、その効果を調べるといものである¹⁰⁸⁾。その結果、GM-CSF 投与の患者において小さいが有意な側副動脈血流の増加が示されたが、生理食塩水で処置した患者では示されなかった。「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、GM-CSF の関連たん白質である G-CSF の薬効は骨髓幹細胞の遊離だけでなく、心臓における動脈狭窄の部位に対する単核球の強制動員の増加を介していると考えられているが⁷⁴⁾、本知見はこの考えと矛盾しない。しかし、最近の試験では CAD 患者におけるこれらサイトカインの安全性に関する懸念が提起されている^{109,110)}。なお、中度あるいは重度の間欠性跛行の患者に対して GM-CSF の皮下投与が二重盲検でプラセボのコントロールに対して行われたが、有効性は示されなかった¹¹¹⁾。

たん白質製剤としての増殖因子の安全性はこれまで重大な問題とはなっていなかった。実際、きわめてわずかな腫瘍の増殖促進、アテローム性動脈硬化症の促進、冠状動脈プラークの血管新生の促進を介した不安定なプラークの産生など、多くの危険性が理論的には存在するが、今まで試験で見つかったものは極めて少ない。今までに認められている有害作用としては、VEGF による深刻な低血圧及び浮腫¹⁰⁷⁾、そして非常に高濃度 (48 μg/kg 以上) の FGF-2 による中枢神経系の有害作用 (ありありとした夢、悪夢、情動不安)¹⁰¹⁾ がある。

6. 遺伝子治療を用いた血管新生療法の現状

現在たん白質治療に代わるものとしては遺伝子治療があげられる。遺伝子治療を用いた戦略は、たん白質治療の場合と基本的に同じである。遺伝子治療ではプラスミドあるいはウイルスを用いた遺伝子導入が主に用いられている。遺伝子治療は、最適な条件では標的組織に対してたん白質を長期間高濃度で発現することが理論的には可能である¹¹²⁾。したがって、たん白質を連日投与する場合に比べて安価で実際的である。また、VEGF のような場合は分泌たん白質であるのですべての細胞に導入する必要がない。したがって、その遺伝子を筋注によりデリバリーした場合、筋肉で得られる発現効率で局所のたん白質濃度を上げることが可能かもしれない。しかし、現在のプラスミドあるいはアデノウイルスを用いた遺伝子治療ではたん白質の発現の持続時間は 1~2 週間と短く、予想した程にはうまくいっていない。遺伝子治療技術の欠点としてはアデノウイルスたん白質に対して炎症反応が生じること、ベクターの投与量が同じでも患者が異なれば遺伝子発現レベルが異なるという点もある¹¹²⁾。たん白質の場合も同様であるが、遺伝子のデリバリーにおける問題点は、最適の投与ルートとは何かということである。遺伝子導入のアプローチの場合、局所濃度を効果的に得るためには、局所的にデリバリーできる技術が必要となる¹¹³⁾。これに関連し、アデノウイルスは内皮の障壁に対して不透過であること¹¹⁴⁾、血液循環において裸の DNA は速やかに分解されるだけでなく、血管内にプラスミド投与した場合その導入レベルは非常に低いことも知られている¹¹⁵⁾。

7. 遺伝子治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の臨床研究として遺伝子治療が用いられている (Table 4)。

フェーズ I の試験では、CMV プロモーター/エンハンサーにより VEGF₁₆₅ 遺伝子発現を促進し、小規模な左前開胸術を介して直接心筋に 125 μg あるいは 250 μg の量が投与され、プラスミドによりコードされる VEGF₁₆₅ の安全性及び有効性が評価された^{116,117)}。その結果、このようなアプローチは一般的に安全であり、手術できない冠動脈疾患の患者において血管造影法により側副陰影の増加を示す所見が得られ、症状も有意に改善された。更に、梗

Table 4 血管新生療法として遺伝子治療を用いた臨床試験

増殖因子	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果	文献
VEGF	単独療法	フェーズ I	5	プラスミド (VEGF ₁₆₆), IM	安全, 心筋灌流の改善	116
	単独療法	フェーズ I	20	プラスミド (VEGF ₁₆₆), IM	安全, 症状の改善	117
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	13	プラスミド (VEGF ₁₆₆), IM	安全, 心筋灌流の改善	118
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ II, DBR,	80	プラスミド (VEGF ₁₆₆), IM	局所運動の改善	125
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I	6	プラスミド (VEGF-2), IM	安全, 実行可能	119
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズ I/II, DBR, 投与量 決定, プラセボコントロール	29	プラスミド (VEGF-2), IM	安全, 狭心症のクラススの低下	120, 121
	CAGB 補助療法/単独療法	フェーズ I	21	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁), IM	耐性	122
	単独療法	フェーズ I	67	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁), IM	EIT, CCS 狭心症基準の改善	123
	血管形成術およびステント 挿入 KAT 試験に付随 して実施	フェーズ II, DBR	103	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) ある いはプラスミドドリポソーム (VEGF ₁₆₆), 局所 IC	安全, 臨床的再狭窄率に おける違い無し, Ad-VEGF グループにおける心筋灌流の改善	124
	単独療法 AGENT 1 および 2 試験	フェーズ I DBR, 漸増用量, プラセボコントロール	131	アデノウイルス (FGF-4), IC	安全, 副作用無し, EIT, 灌流改善の 傾向	127, 128
HGF	単独療法	フェーズ I, OL (末梢動脈障害)	6	プラスミド, IM	安全, 虚血性潰瘍の縮小, 安静時疼痛 の減少, ABPI の改善	129

塞, 虚血及び正常心筋を観察できる NOGA 左心室エレクトロメカニカルマッピングを用いて, 慢性心虚血の患者において VEGF₁₆₅ をコードする naked プラスミドの投与前後を比較すると, 良好な結果が得られた¹¹⁸⁾. 同様な結果がカテーテルを用いた心筋内投与でもみられた¹¹⁹⁻¹²¹⁾. しかし, このような有効性は二重盲検無作為試験ではまだ検証されていない.

アデノウイルスの VEGF₁₂₁ 遺伝子治療の有用性について, 侵襲的冠動脈バイパスの補助としてあるいは低侵襲開胸術を介した単独療法として試験された¹²²⁾. それは, 直接心筋へ注射することにより可逆的な虚血領域に投与された Ad_{CV} VEGF₁₂₁ のフェーズ I 臨床試験である. 患者は 100 μ L/投与, 10 箇所/患者及び 5 つの投与グループ (4×10^8 , $4 \times 10^{8.5}$, 4×10^9 , $4 \times 10^{9.5}$, 4×10^{10} pfu) のいずれかで処置された. その結果, アデノウイルス投与に由来する副作用は示されず, 灌流, 狭心症の程度, ETT 評価において改善が示唆された. REVASC ではオプションのない重篤な CAD の患者に対して Ad-VEGF₁₂₁ を投与し, プラセボの処置は行わないがその他について最大限の治療を行った患者と比較した. その結果, 1 mmST 低下に対する ETT は 26 週において処置グループで有意に低下した. また, CCS 狭心症基準も 12 週及び 26 週において処置グループで低下した¹²³⁾.

Ad-VEGF₁₆₅ 及び p1VEGF₁₆₅ リポソームの血管形成術後の再狭窄の予防及び心筋虚血の処理における安全性及び有効性が, “Kuppia Angiogenesis Trial” (KAT) で評価された¹²⁴⁾. 患者には灌流により Ad-VEGF₁₆₅ (2×10^{10} pfu) あるいは VEGF₁₆₅ プラスミド (2000 μ g DNA) が投与された. このフェーズ II 試験では遺伝子導入に由来する副作用や臨床的な再狭窄の割合にコントロールとの違いはなく, Ad-VEGF₁₆₅ を処置した患者において良好な心筋の灌流が示された. CAD を対象とした二重盲検フェーズ II 試験 Euroinjet-one trial では重症安定狭心症にカテーテルで VEGF₁₆₅ の naked plasmid を投与したが, 虚血改善効果の指標である症状, 運動耐容能, 心筋 SPECT いずれもプラセボと差を認めず, 虚血心筋領域局所の壁運動の改善が認められたのみであった¹²⁵⁾.

以上に述べた試験の中には VEGF₁₂₁ 及び VE-

GF₁₆₅ が治療上有益な効果ももたらす可能性を示唆するものもあるが, いずれも二重盲検では示されていない. 実際, 非盲検フェーズ I における有効性に関して肯定的な結果を, 二重盲検フェーズ II/III 試験の成績で示すのは容易ではない. なお, 血管新生が効率よくおきると判定するには, プラスミド投与後, プラスミド及び産生されるたん白質のデリバリーの有効性に関する詳細な薬物動態学解析が前提となる. このような状況において, VEGF₁₆₅ をコードする naked プラスミドの投与により血漿レベルにおける循環 EPC が増加するという知見は興味深い¹²⁶⁾.

同様な状況が以下の冠動脈内投与による Ad-FGF-4 遺伝子治療試験でも観察された. 二つのフェーズ I 血管新生遺伝子治療 “Angiogenic Gene therapy” (AGENT) で FGF-4 をコードするアデノウイルスをウイルス粒子として 3.3×10^8 から 10^{11} 個まで投与し, 安全性及び有効性が評価された. その結果, Ad-FGF-4 処置患者において機能的な改善 (ETT 評価, 心筋灌流) の傾向が示された^{127,128)}. しかし, 大規模二重盲検フェーズ試験を行った時, 狭心症の程度の改善の傾向が一時的に示されたのみで, 長期にわたる追跡調査では, コントロールの患者においても改善がみられたため, 結果的に, ETT 評価, 心筋灌流の改善効果は示されなかった¹⁰³⁾.

なお, コントロール群は設置されていないが, 末梢動脈障害の患者に HGF の naked plasmid を筋注により投与した. その結果, 投与 8 週後に行った初期効果判定では虚血性潰瘍の縮小, 安静時疼痛の減少, “ankle-brachial pressure index” (ABPI) の上昇などの所見が 60% 程度の症例で観察された¹²⁹⁾. 現在, フェーズ III 試験が行われており, その結果は来年報告される予定である.

8. 細胞治療を用いた血管新生療法の概要

「1. 血管新生 “neovascularization” の生理的な概念」の項で述べたように, EPC が血管新生に関与する可能性が示されたことから, 細胞治療を用いた血管新生療法の可能性についても検討が行われている. 以下にその可能性を支持する動物実験の結果を示す. ヒトの EPC を生体外で増殖させ, 虚血後肢の無胸腺ヌードマウス¹³⁰⁾ あるいは梗塞ヌードマウス¹³¹⁾ に投与すると, 新生血管に取り込まれて血流

と心筋の機能が回復する。骨髄由来の単核球細胞¹³²⁾あるいは Lin⁻, c-kit⁺ の細胞画分¹³³⁾ を虚血心筋に投与すると病態が改善する。濃縮したサイドポピュレーションの細胞を骨髄に移植すると、梗塞心筋に取り込まれて内皮細胞及び心筋細胞に分化する¹⁹⁾。採取したばかりの骨髄穿刺液を豚アメイロイドモデル¹³⁴⁾及び梗塞ラットモデル¹³⁵⁾にデリバリーすると、血管及び灌流が増加する。虚血後肢モデルマウスに骨髄細胞を移植すると、血管壁には取り込まれないが支持細胞として機能する¹⁷⁾。EPCはパラクラインの機構によっても血管形成及び組織再生を促進する可能性がある。血液を循環している細胞が心筋に強制動員されると、VEGF, MCP-1, FGF, Ang, IL-1 β , TNF- α , HGF, IGF-1, SDF-1のような血管新生促進因子が速やかに放出され、血管新生の促進^{132,134,136,137)}及びアポトーシスの阻害¹³⁸⁾が起きる。

骨髄由来細胞が虚血組織へ取り込まれる割合について検討が行われているが、その推定値は、内皮細胞の3%及び心筋細胞の0.02%が骨髄由来であるというもの¹⁹⁾から、内皮細胞及び心筋細胞の最大40%までが骨髄由来であるというもの¹³³⁾まで様々である。

9. 細胞治療を用いた臨床研究

心筋における血管新生療法の実験研究として細胞治療が用いられている (Table 5)。

最初の試験では重度の虚血心臓疾患の患者が冠動脈バイパス時に自家骨髄細胞の投与を受け、その後少なくとも1年追跡調査が行われた¹³⁹⁾。骨髄細胞を腸骨から採取し、バイパスされない虚血心筋に 5×10^7 から 1×10^8 個/部位 (平均 10 部位) の細胞が投与された。術後の試験では患者5人のうち3人で冠動脈灌流の改善が示された。別の研究では、バイパス手術時に、6人の患者に対して梗塞境界領域に沿って自家 AC133⁺ 骨髄細胞が 1.5×10^6 個投与された¹⁴⁰⁾。この手法による安全上の問題の発生はなく、また追跡調査では左心室の機能が4人の患者において、灌流は5人の患者においていずれも改善した。しかし、細胞治療は単独ではなく冠動脈バイパス移植に対する補助として実施されていることから、このようにコントロールグループがない条件では有効であると結論することは困難である。一方、自己

骨髄由来単核球細胞 “bone marrow-derived mononuclear cell” (BM-MNC) を用いた治療が心筋梗塞の患者10人で試験されている¹⁴¹⁾。フィコール濃度勾配により分離した BM-MNC (0.65% AC133⁺ 細胞と 2.1% CD34⁺ 細胞) が、急性心筋梗塞発症後5~9日後の患者に対して冠動脈血管造影の際に置いたバルーンカテーテルを介して投与された。標準治療のみ行った患者に比べて細胞治療のグループでは3箇月後梗塞部位は有意に減少し、1回拍出係数及び駆出分画率が向上した。更に、安定狭心症の患者の虚血心筋内に、NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に自家 BM-MNC を投与する試験が行われている¹⁴²⁾。投与を行った8症例で BM-MNC を構成するそれぞれ細胞の割合は、CD34⁺ 細胞 (0.9~8.9%)、CD3⁺ T 細胞 (2.3~12%)、CD11b⁺D15⁺ 顆粒球前駆細胞 (26.3~70.6%) と異なっていたが、3箇月の追跡調査では症状と心筋灌流の改善が示された。

他の2つの試験でも、慢性虚血心臓疾患の患者に対して NOGA マッピングを用いて経カテーテル的に骨髄由来細胞の心内膜 (心臓) への移植が行われた。まず、吸引ろ過したばかりの未分画自家骨髄由来細胞、2.4 mL ($32.6 \pm 27.5 \times 10^6$ 個/mL) が10人の患者に対し、12箇所の部位に投与された¹⁴³⁾。投与した細胞は平均して、多核白血球 74.6%、リンパ球 19.3%、単球 3.5%、巨核球 2.6% という構成であった。CD34⁺ 細胞は 2.6% で、そのうち 47.9% が CD45 を共発現していた。10人の患者すべてにおいて不整脈あるいは副作用はなく投与は成功であった。その内8人の患者は3箇月後狭心症スコアが改善された。また、20人の患者 (処置11人、コントロール9人) による盲検非無作為試験において、メカニカルな機能が低下した心筋領域に対して、NOGA マッピングを用いて経カテーテル的にフィコール濃度勾配により分離した BM-MNC ($25.5 \pm 6.3 \times 10^6$ 細胞/患者) の投与が行われている¹⁴⁴⁾。移植された細胞集団は、コロニー形成アッセイ (顆粒球-マクロファージコロニー形成単位) で評価したコロニー形成能で平均 $2.4\% \pm 1.33\%$ であり、CD45 低発現の CD34⁺ 造血前駆細胞から構成されていた。6箇月及び12箇月の追跡調査後、BM-MNC の心内膜への投与により持続的な治療効果が示され、心筋灌流と運動能力が改善された¹⁴⁵⁾。その効果は単核

Table 5 血管新生療法として細胞を用いた臨床試験

細胞のタイプ	試験の種類	試験のタイプ	患者数	デリバリー	結果	文献
自家未分画BM細胞	フェーズI	CAGB 虚血心筋補助	5	IM	安全	139
	フェーズI	選択の無い患者への単独治療	10	IM NOGA 法併用	実行可能	143
	フェーズI 無作為コントロールと標準的なMI治療との比較	単独治療 MI, ステントを用いたPCI	60	IC	安全 LV機能の改善	150
	フェーズI 非無作為コントロール	BOOST 試験				
自家BM由来単核球細胞 (フィコリンにより分画) CD133+, CD34+, CD45+, CD117+ その他の前駆細胞が混合された組成	フェーズI, MIの標準治療に対する比較	単独治療 MI, PTCA	20	IC	安全、改善	141
	フェーズI	単独治療 虚血心筋	8	IM NOGA 法併用	安全	142
	フェーズI OL非無作為コントロール	単独治療 虚血心筋	20	IM NOGA 法併用	安全、心筋灌流改善	144, 145
	フェーズI 非無作為コントロール	単独治療 MI, ステント血管形成術	20	IC	安全、改善	146
自家BM由来単核球細胞または循環血液由来前駆細胞 Ac133+BM細胞	フェーズI 非無作為コントロール	MI, ステント血管形成術 TOPCARE-AMI試験	59	IC	安全、前駆細胞グループとの間において差無し	147, 148
	フェーズI	CABG 補助	6	IM	安全	140
	パイロット試験	単独治療 (重篤な肢虚血)	29	IM	安全、安静時疼痛低下, 最大歩行距離改善, ABPI改善	153

“myocardial infarction” (MI) (心筋梗塞), “percutaneous coronary intervention” (PCI) (経皮冠動脈インターベンション), “percutaneous transluminal coronary angioplasty” (PTCA) (経皮経管冠動脈形成術), “left ventricular” (LV) (左心室)

球、B細胞及び造血前駆細胞のサブポピュレーションの割合と一致した。

他の研究においては、急性心筋梗塞5~29日後、冠動脈ステントの留置部位にBM-MNC ($78 \pm 41 \times 10^6$ 個/患者)が冠動脈内投与された。BM-MNCは平均してCD34⁺~0.6%、CD117⁺~1.7%、CD133⁺~0.6%の細胞から構成されていた。6箇月後、処置を受けた20人の患者を磁気共鳴により評価すると、非無作為コントロールグループと比較して局所及び広範囲において左心室機能の有意な改善がみられた¹⁴⁶⁾。

以上述べたすべての試験において、ある程度機能の改善がみられているが、サンプルサイズが非常に小さいことに加えて、盲検及び無作為の同時コントロールグループが無いことためその評価は困難であった。このように、これらの研究から結論できることは冠動脈内あるいは心筋内経路による細胞の投与は安全と思われるということである。

急性心筋梗塞における前駆細胞の移植と再生の促進“Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement”(TOPCARE-AMI)試験では、再灌流急性心筋梗塞の59人の患者にBM-MNCあるいは循環血液由来前駆細胞“circulating blood-derived progenitor cell”(CPC)が無作為に投与された^{147,148)}。CPCはヘテロな前駆細胞の集団であり、3日間の*ex vivo*培養後フェノタイプを調べたところ、Dilアセチル化LDLを取り込み、VEGFR-2, endoglin, von Willebrand factor, PECAM, VE-cadherinあるいはCD146といった典型的な内皮マーカーたん白質を発現することから、内皮のフェノタイプであることが示された。標準的な手法により分離されたBM-MNCはCD34及びCD45陽性であった。急性心筋梗塞4日後、患者にBM-MNCあるいはCPC(10 mL懸濁液)が投与された。BM-MNC及びCPCを灌流したグループと非無作為対応コントロールグループを比較して左心室血管造影法により評価すると、広範囲において駆出分画率が有意に改善されていた。また、機能的な改善と収縮末期容量の低下が磁気共鳴映像法により確認された¹⁴⁹⁾。1年の追跡調査後、BM-MNCあるいはCPCの灌流は安全であり、BM-MNCグループあるいはCPCグループで心筋の機能が改善され、両グループで差はなかった¹⁴⁸⁾。この研究は

将来に向けての大きなステップではあったが、盲検及び同時コントロールが無いことため有効性を評価するのは非常に困難であった。フェーズI臨床試験ST上昇型の梗塞の再生を促進するための骨髄移植“Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration”(BOOST)では、頸皮動脈インターベンション後、それぞれ30人の患者が冠動脈内自家骨髄細胞投与あるいは標準的な医療処置を受けた。骨髄細胞は採取後ゲラチン-ポリコハク酸塩濃度勾配沈降により128 mLから26 mLに濃縮した。総量として 24.6×10^8 個の細胞が得られ、その中には平均 9.5×10^6 個のCD34⁺細胞及び 3.6×10^6 個の造血コロニー形成細胞が含まれていた。骨髄細胞の投与6箇月後、左心室の心臓収縮機能が促進され、ステント再狭窄や向不整脈作用のような副作用は起きなかった¹⁵⁰⁾。18箇月の追跡調査後、骨髄細胞の投与により左心室分画の回復の促進を示唆する結果は示されたが、左心室の収縮機能を改善する結果は示されなかった¹⁵¹⁾。このように、細胞を用いた治療は有望ではあるが、その臨床試験の結果の解釈には注意を要する。公正な評価を行うには、適切な規模の無作為、二重盲検試験が必要である。

慢性虚血心臓疾患の患者における細胞治療の欠点は、患者自身の骨髄単核球細胞において血管形成能が低下することである¹⁵²⁾。患者(n=8)と健常人(n=8)から分離されたBM-MNCは同じ前駆細胞：CD34⁺/CD133⁺、CD49d⁺、CXCR4⁺から構成されるが、患者の細胞におけるコロニー形成能、SDF-1あるいはVEGFに対する遊走反応は健常人の細胞と比較すると有意に低い。患者からのBM-MNCを虚血後肢に投与した場合、健常人のコントロールからのBM-MNCと比較すると、血流の回復効果が低いことも示された。

コントロール群は設置されていないが、オプションのない虚血肢の患者に末梢血由来単核球細胞“peripheral blood mononuclear cell”(PB-MNC)を投与した結果、病態の改善に有効であった¹⁵³⁾。その効果は、虚血肢に残存する骨格筋細胞によるIL-1 β その他の血管新生促進因子の産生を、移植されたPB-MNCが促進することによる可能性を示唆する結果も得られた。

10. 血管新生療法の問題点と今後の展望

血管新生増殖因子のたん白質、及び遺伝子治療、細胞治療による血管新生療法の臨床試験の結果は先に示したように全体として期待とはほど遠いものであり、処置した患者においてプラセボを超える改善を、無作為二重盲検試験においてコンスタントに示すことができなかった。以下にその問題点と今後の展望について示す。

10.1 現在の評価項目を再検討する必要がある

現在までに満足すべき結果が得られていない原因としては、評価項目が適切でないかあるいは評価項目を判定する方法が不適切あるいは妥当ではない可能性が考えられる。これら臨床試験で用いられる放射線映像技術（例えば、タリウム、sestamibi）は空間分解能が低く、末期のCAD患者の心筋灌流における小さな変化を検出するには能力的に限界がある¹⁵⁴。更に、長期にわたり心筋虚血を測定する場合、その割合に大きなばらつき（50%までの変動）があるように思われる。そのため治療により向上する心筋の灌流を検出するという点において、シンチグラフ技術では限界があるのかもしれない¹⁵⁵。一方、高空間分解能を有した核磁気共鳴映像法“Magnetic Resonance Imaging”（MRI）は心筋灌流を定量化できる可能性があり¹⁵⁶、血管新生療法で処置した心臓領域内の灌流変化を検出する場合においてより適しているかもしれない^{154,157}。将来の研究において、概説した様々な新規治療法の有用性を評価する場合、処置前後における心筋灌流の評価には、MRIのようなより高感度の技術を用いることを考える必要がある。

10.2 従来検討されていなかった血管新生促進因子を用いる

現在臨床研究で検討されているたん白質、あるいは遺伝子はFGF、VEGF、GM-CSF、HGFと限られている。「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、PDGF、MCP-1、G-CSF、Ang-1、Ang-2、NGF、NPYなど様々な他の因子が血管新生促進作用を示し、その作用機構は必ずしも同じでないことから、このような因子の使用を試みることや次項で述べるようにこれらを含めた各種因子の組合せによる効果発現の可能性も検討する必要がある。これはたん白質による治療及び遺伝子治療において考慮すべきことである。

10.3 複数の血管新生促進因子を用いる

血管新生のプロセスは複雑で高度に秩序だった調節を受けていることから、末期の冠動脈性心臓病を治療する際、一種類の増殖因子では特効薬とはならない可能性がある。むしろ、CADの患者の治療において临床上の有用性をコンスタントに得るためには、複数の増殖因子を組み合わせた治療法が必要かもしれない。

増殖因子を組み合わせる戦略は、増殖因子の治療効果が相乗的であること、ある因子が血管形成の開始を促進するのに対し他の因子は血管の成熟を促進するといったように、それぞれの因子がお互いに機能を補えることから合理的といえる。例えば、*in vitro*において増殖因子の相乗性がFGF-2、VEGF-A、VEGF-Cで示されている¹⁵⁸。種々の動物モデルで、FGF-2はPDGF受容体をアップレギュレーションすることから、PDGF-BBとFGF-2は相乗的である⁶⁵。相乗性が治療効果を発揮する場合とは、相乗性が治療効果に限定されている場合か、あるいはどちらかの投与量を低下させることにより治療効果を低下させないでどちらかの副作用（例：FGFの形質転換作用あるいはVEGF-Aの過透過性のような副作用）を抑制させることができる場合である。しかし、このような増殖因子を組み合わせた臨床試験はまだ実施されていない。

その他の合理的なアプローチは、「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、VEGFあるいはFGF-2のような血管新生促進因子と、周皮細胞の強制動員を促進するAng-1、PDGF-BBのような成熟促進因子を組み合わせることである。周皮細胞は過透過性を抑制するだけでなく、未成熟な血管を安定化させる^{159,160}。このように機能がお互いに効率よく補える増殖因子の組み合わせとしては、Ang-1とVEGF-A⁶²及びPDGF-BBとFGF-2⁶⁵が考えられる。

一方、増殖因子を組み合わせると、治療戦略がより複雑になる。例えば、各因子の相対的な投与量、各因子の投与スケジュール、各因子のデリバリー方法などが問題点となり、これらをすべて満たす治療戦略を設定することは必ずしも容易ではない。

10.4 他の増殖因子をアップレギュレートする因子を用いる

最近、*in vivo*においてアデノウイルスベクター

を用いて Hif1- α を過剰発現すると、血管新生増殖因子が多数アップレギュレートされることが示されている²⁷⁾。しかし、増殖因子の作用は動物の種類により異なる場合があるので、ヒトへ適用する前に複数の動物種で試験する必要がある。これに関連し、内在性 Hif1- α の不活性化を阻害すると、虚血四肢における血管新生が促進される¹⁶¹⁾。このように、他の増殖因子をアップレギュレートできる因子を用いた戦略も有効かもしれない。

10.5 共通の経路を標的とする

増殖因子のシグナル伝達における共通の経路のなかで、NO の産生は治療の非常に有力な標的である。主に *in vitro* の知見から、VEGF, FGF, TGF- β による血管新生促進効果において NO の関与が示唆されている¹⁶²⁾。しかし、NOS 阻害剤、あるいは eNOS 及び iNOS ノックアウトマウスにおける *in vivo* の知見では、NO の関与について以下に示すように統一した結論が出ていない。最も説得力のある *in vivo* の知見は以下の Murohara らによる研究である¹⁶³⁾。ウサギ虚血後肢モデルにおいて NO 産生促進因子である L-arginine を食事に加えて与えると、血管新生が促進される。また、マウスの虚血後肢モデルにおいて、野生型のマウスに比べて eNOS 欠損マウスでは血管新生は阻害される。対照的に、血管新生の非外科的腸間膜ウインドーモデルでは、NO 合成の阻害剤である L-NAME を与えると FGF-2 による血管新生が促進される¹⁶⁴⁾。同様に、血管新生の腫瘍モデル、*in vivo* のマトリゲルモデルにおいて、NO を放出する NO ドナーである SNAP 及び SNAG を投与すると、FGF-2 による血管新生の誘導が阻害される¹⁶⁵⁾。これらの知見は、VEGF, FGF, Ang-1 を含む様々な増殖因子により誘導される血管新生において、NO がメディエーターとして作用することを示す数々の報告^{166,167)} と対照的である。このように、血管新生及び動脈新生における NO の役割については統一的な見解は得られていない。したがって、NO ドナーあるいは NOS 阻害剤がそれぞれ血管新生を促進あるいは抑制するかどうかについては、臨床的に試験されていないというのが現状である。

10.6 持続的なデリバリーが可能な方法を用いてたん白質を投与する

血管新生療法を効果的に行うには、デリバリーの

持続時間が重要な点である。血管新生促進因子のほとんどは内皮細胞の生存因子としても作用する。したがって、標的細胞における初期のアポトーシスを抑制するためには、単一増殖因子のデリバリーでは持続性を発揮させる必要があると考えられる¹⁶⁸⁾。一方、最近の研究によると増殖因子を組み合わせた場合は血管新生の初期に血管の安定性が決定されることから¹⁶⁹⁾、このような治療ではデリバリーは短期間のほうがよいことが示唆された。

一方、増殖因子を長時間デリバリーするために、各種のマトリックスが設計されている。VEGF₁₂₁ に血液凝固第 XIII 因子の基質となる配列を付加することによりフィブリンと共有結合をした状態で埋め込むと、MMP, プラスミンのような細胞に結合した酵素によりフィブリンが再構成される場合にのみ VEGF₁₂₁ が遊離される¹⁷⁰⁾。その結果、VEGF₁₂₁ が緩やかに放出され、新しい動脈及び静脈の分岐構造が効率よく局所的に形成される。更に、scaffold として poly (lactide-co-glycolide) を用いると、VEGF₁₆₅ と PDGF-BB が異なったキネティクスで効率よく同時にデリバリーされる¹⁷¹⁾。生体適合性があり放出が緩やかなポリマーをうまくステントの上にコートできれば、この領域は急速に進歩する可能性が高い。直接ではないがたん白質のデリバリーを持続させる他の手段は、プラスミド、複製欠損アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レンチウイルスを用いた遺伝子治療である¹⁷²⁾。持続的にデリバリーするため、たん白質をベースにした方法あるいは遺伝子治療のどちらを用いるかは、薬物動態、安全性、コストに基づいて最終的に決定することになる。

10.7 たん白質及び遺伝子をどのようにデリバリーするか、投与方法、投与経路の面から

心筋における治療的血管新生において多種多様なデリバリーの方法が導入されている。例えば、増殖因子をマウスの尾静脈を介してデリバリーする方法、大動物モデルにおいて最先端の高度な技術を用いて局所にデリバリーする方法などがある。多くのモデルでは開胸術のような侵襲的な手法が必要とされるが、それ自体で若く健康な動物において損傷を与えることになる。その結果、修復過程が始まり内在性の増殖因子が誘導される。更に重要な点は、別の治療を最も緊急に必要とする重病の患者には、遺伝子導入法の中でも非常に侵襲的でストレスの多い方法

は適していないということである。遺伝子導入ベクターは標準サイズの血管造影用カテーテルを用いて冠動脈に導入できる。冠動脈内投与のアプローチは比較的単純で特別な器具や医師に特別な訓練は必要なく、血管造影術と組み合わせると侵襲的な手法は必要ではない。通常、冠動脈内投与は内皮細胞へ遺伝子を導入する目的で用いられる。動物モデルで良好な治療効果が報告されているが、これまでの報告によるとヒトでの臨床効果は低い¹⁰⁷⁾。

たん白質のデリバリーに関しては、FGF-2の生体分布に関する多くの報告がある。FGF-2を静脈内あるいは冠動脈内に投与すると、心筋内（末梢動脈障害の場合は筋肉）そして心膜内へ選択的にデリバリーされた¹⁷³⁾。虚血領域に対してFGF-2を心筋内投与した場合は局所における濃度が特に高かった¹⁷⁴⁾。また、FGF-2の組織分布を動脈内あるいは静脈内投与で調べると、¹²⁵I標識したFGF-2のそれぞれ0.88%及び0.26%が心筋に見出された¹⁷⁵⁾。したがって、静脈内投与に比べて冠動脈内投与のほうが有効であることが示された。また、全体として心筋へのデリバリーが低い理由は、内皮がたん白質の障壁となっているからである。これはウイルス粒子のデリバリーにおいても同様である。この場合、虚血領域、境界領域そして流域にデリバリーすることが妥当と考えられるが、効力を比較した研究はほとんどない。多くの虚血後肢の研究から示されているように³⁷⁾、持続的な動脈内デリバリーが理想的なデリバリーと考えられる。しかし、このデリバリーは冠状動脈系では技術的に困難である。他のデリバリー法としては冠状静脈内への逆投与がある。この技術は、豚におけるFGF-2の単回投与では成功している¹⁷⁶⁾。また、豚においてバイオセンスガイダンスを用いる最適化された心筋内投与が、FGF-2の心筋を標的としたデリバリー、心筋における沈着及び保持、再循環の低下において有効であった¹⁷⁷⁾。しかしながら、これらの方法がヒトにおいて実施が可能であるかそして有効であるかについては臨床試験の結果を待たなければ判断できない。

遺伝子治療薬は血管周囲の組織にもデリバリーできる。心膜内のアプローチではベクターは心臓周囲の心膜内にデリバリーされる。心内膜及び心外膜に対する導入効率は良好であるが、側副への灌流では治療効果はみられていない。高濃度の治療用たん白質が

心嚢液で産生されるが、心筋を貫通することができず、成長している側副血管に到達できない。VEGF遺伝子治療薬は注射針付きのカテーテルを用いて効率良く局所へデリバリーできる¹⁷⁸⁾。また、VEGF遺伝子の発現により血管周囲において局所的にVEGFたん白質濃度が高くなると、血管の外膜で血管新生反応が起きるが、VEGFたん白質は血管壁を貫通できない¹⁷⁹⁾。なお、標的指向性を持たず試みとして、ウサギ肢虚血モデルにおいて、磁性DNAナノ粒子によるVEGF遺伝子のデリバリーが試みられ、血管新生及び動脈形成において有効性が示されている¹⁸⁰⁾。

心筋内遺伝子導入の場合はベクターを標的部位に直接デリバリーできる。心筋内への直接投与は、従来の外科的処置と組み合わせることにより行うことができる。侵襲的な外科的処置及び増殖因子の局所的なデリバリーができないような障害の程度が高い患者には、NOGA及びスチレットの注入カテーテルのような経皮的な技法を用いた心筋内への直接投与が適している^{181,182)}。また、このような技術を用いた遺伝子導入が臨床試験において治療効果及び副作用を及ぼす可能性については、大動物モデルで容易に評価できる。

なお、必要な標的遺伝子のデリバリーとしてEPCあるいは幹細胞をキャリアーとしても用いることができる¹⁸³⁾。

10.8 増殖因子によりプライミングを行った幹細胞を用いる

骨髄由来幹細胞は虚血組織における血管新生へ寄与する^{34,184)}。多能性造血幹細胞は、血管新生のプロセスに関与する内皮細胞に分化できる¹⁸⁵⁾。「2. 血管新生療法において有望な増殖因子」の項で述べたように、幹細胞から内皮細胞への分化は、様々な増殖因子により調節される。したがって、骨髄由来幹細胞を移植前にこれら増殖因子でプライミングを行うことにより内皮細胞への分化がより促進される可能性がある。

10.9 移植効率を促進させる遺伝子を導入した幹細胞を用いる

虚血誘導性 heme oxygenase-1 (HO-1) を遺伝子導入した mesenchymal stem cell (MSC) をマウス虚血心臓に移植すると、移植効率が向上する¹⁸⁶⁾。更に、左心室の再構成が抑制され、梗塞心臓の機能

改善が促進される。これに関しては、HO-1あるいはその副産物が移植効率の改善だけではなく、虚血心臓の形態及び機能の改善に直接関与しているとの指摘もある¹⁸⁷⁾。抗アポトーシス遺伝子であるAktを遺伝子導入したMSCをラット虚血心臓に移植すると、心臓の再構成が抑制されるとともに心臓の収縮と拡張機能が正常まで改善される¹⁸⁸⁾。更に、この細胞のコンディション培地は*in vitro*及び*in vivo*において虚血心臓の顕著な防御効果を示すことから¹⁸⁹⁾、Aktはパラクラインを介して作用するものと考えられる。VEGFを遺伝子導入したMSCを左冠状動脈閉塞ラット心臓に移植すると、移植効率が向上するとともに梗塞領域における各種機能が向上する¹⁹⁰⁾。HGFはラット心筋梗塞モデルにおいて移植された筋細胞の心筋梗塞組織への生着を促進する¹⁹¹⁾。

10.10 内在性前駆細胞を強制動員する

血管新生を促進することができる骨髄及び他の組織からの内在性前駆細胞を強制動員する治療アプローチは非常に魅力的であると考えられる。「8. 細胞治療を用いた血管新生療法の概要」においても若干ふれたが、以下にその可能性を支持する実験結果の詳細について述べる。サイトカイン(G-CSF, Ang-1, PIGF)及びケモカイン(SDF-1)は骨髄からEPCの動員及びその後の末梢循環における増加を促進する。なお、EPCレベルの上昇において、どの動員因子が最も強い作用を示すかについては明らかではない。動物モデルでアデノウイルスベクターを用いてSDF-1及びVEGFの遺伝子を静脈内に投与すると、造血前駆細胞及び循環EPCの強制動員が速やかに誘導された¹⁹²⁾。一方、Ang-1による前駆細胞の強制動員の誘導は、遅延性であり顕著でない¹⁹²⁾。しかし、VEGFとAng-1を組み合わせるとその効果は相乗的であり、循環中に前駆細胞がより長期にわたる上昇を示した¹⁹³⁾。更にそれに関連して、骨髄における毛細血管の増殖が増加すると共に、前駆細胞が脾臓へホーミングし脾臓が巨大化した。患者に対するVEGF遺伝子の導入により循環EPCが増加した^{117,126)}。なお、その条件では患者の安全性が確認されている。

他の候補としてはG-CSFとGM-CSFがあげられる。げっ歯類及び人間以外の霊長類における急性心筋梗塞モデルにおいて、心筋梗塞後にG-CSFを

投与すると、心臓の機能の改善、毛細血管密度の増加、心筋細胞死の低下が起きた^{194,195)}。しかし、心筋梗塞の患者において冠動脈ステントの存在でG-CSFを投与すると、ステント再狭窄が顕著に増加したため処置は中止された¹⁹⁹⁾。GM-CSFを毎日投与すると、ウサギ及びマウス角膜モデルにおいてEPCが動員され、虚血後肢の新血管形成が促進された¹⁹⁶⁾。ロムルチド(200 µg/kg/日)によりGM-CSFを誘導すると、梗塞ラットにおいて梗塞からの回復が遅延し梗塞が拡大した¹⁹⁷⁾。心筋梗塞の初期段階にGM-CSFを誘導すると、単核球の動員が促進され、梗塞部位における不適切なコラーゲン生成がおきた。したがって、GM-CSF投与の場合、不都合なタイミングで不適切な細胞が誘導されるという事態が懸念される¹⁹⁸⁾。GM-CSF治療の安全性についてはいくつかの研究で評価されている。冠動脈疾患の患者における小規模無作為二重盲検プラセボコントロールの冠動脈内GM-CSF投与の研究では安全性及び冠動脈側副血流の改善が示された¹⁹⁸⁾。

赤血球分化因子として知られる“Erythropoietin”(Epo)はEPCの動員を促進する^{199,200)}。Epoで処置したマウスでは骨髄及び末梢血液におけるEPCの数が増加し、側副の拡大が促進され、後肢虚血の場合には血流が改善された¹⁹⁹⁾。冠動脈心臓病の患者において、Epoの血清レベルは循環EPCあるいは骨髄前駆細胞の数と相関した¹⁹⁹⁾。

HMG-CoA還元酵素の阻害剤であるスタチンは、マウス²⁰¹⁾及び安定冠動脈疾患の患者²⁰²⁾においてEPCの動員及びその機能を促進した。スタチンによるEPCの分化の誘導はPI3-kinase/Aktを介している^{201,203)}。その他の可能性としては、EPCの増殖促進及び老化を低下させるサイクリンのアップレギュレーション等細胞周期に関わる遺伝子発現の調節が考えられる²⁰⁴⁾。同様に、エストロジェンはEPCのアポトーシスを抑制し、骨髄由来EPCの強制動員及び増殖を促進した^{205,206)}。エストロジェンの効果はeNOS^{-/-}マウスにおいて完全に消失したことから、eNOS依存性の機構が考えられる²⁰⁶⁾。VEGFによるEPCの強制動員の誘導もeNOS欠損マウスでは低下することから、eNOSは骨髄由来EPCの強制動員において必須の役割を果たしていると考えられる²⁰⁷⁾。

10.11 生体に備わっている抗血管新生機構を阻害する

血管新生が起きにくい虚血動物モデルあるいはヒト疾患組織と正常なものとの間で、増殖因子及び増殖因子受容体の発現に関するデータが少ないことを考えると、欠乏していると推測される因子を補充する治療戦略は必ずしも合理的ではないようにも考えられる。また、生体において増殖因子の発現が増加している状態において、それ以上あるいははるかに多い量の増殖因子を外から投与しても血管新生は促進されるのかという疑問も残る。多くの前臨床試験では、事実として VEGF 及び FGF を適切に投与すれば血管新生が促進されることが示されている¹⁷⁴⁾。しかし、正常をはるかに超えるレベルで増殖因子を投与すると、VEGF 及び FGF の場合は病的な血管形成が起きる可能性があり^{208,209)}、治療濃度域は狭いと考えられる。

したがって、本来生体に備わっている抗血管新生機構を阻害することに焦点をおいた治療も考える必要がある。例えば、睡眠により誘導される角膜の低酸素刺激では血管新生が起きない。これは角膜組織の様々な場所に発現している HIF-1 α のドミナントネガティブミュータントによると考えられる²¹⁰⁾。興味深いことに、このミュータントは低酸素症によっても調節される。HIF-1 α ミュータントのアンタゴニストにより角膜の低酸素刺激による血管新生反応の誘導が回復する。また、生体に存在する血管新生の阻害剤であるエンドスタチン^{92,211)}、トロンボスポンジン²¹²⁾は組織虚血の間アップレギュレートされる。興味深いことに、ヒト平滑筋腫セルラインである SK-LMS-1 細胞の担ガンモデルにおいて、HGF は部分的ではあるがトロンボスポンジン-1 のダウンレギュレーションを介して腫瘍における血管新生を誘導する²¹³⁾。このように、抗血管新生因子の作用を弱めることにより治療効果が改善する可能性がある。

10.12 遺伝子治療において遺伝子をどこにデリバリーするか

遺伝子治療における望ましい遺伝子のデリバリー部位は治療の最終目標及び増殖因子の性質により変わりうる。毛細血管の成長を意図する場合は梗塞先端部位が望ましい。健康な組織において、側副は開在冠動脈血管から冬眠心筋へと成長する。導入する部

位の微小環境及び産生される増殖因子の標的細胞も考慮に入れる必要がある²⁰⁹⁾。増殖因子は標的細胞において発現する受容体を介して機能を発揮することから、治療効果を得るには増殖因子と受容体の相互作用が必須である。ベクターあるいは産生されたたん白質は正常な基底膜をうまく貫通できない。多数の平滑筋層で覆われた内径が大きい血管の場合はなおさらである。したがって、動脈内皮に作用することを意図して増殖因子を用いる場合は、血管の管腔で作用できるようにする必要がある。血管系を囲む組織の構成細胞である周皮細胞に増殖因子を作用させる場合も同様である。増殖因子の可溶性によってもリガンドとしての増殖因子のバイオアベイラビリティが調節される。細胞表面のヘパリンプロテオグリカンに結合しやすい増殖因子は産生細胞の周辺にとどまる。一方、可溶性増殖因子は拡散し広範囲の組織をカバーする²¹⁴⁾。病的状態の微小環境では増殖因子のデリバリーの効率が悪い。一方、増殖因子をあまりにも広範囲に過剰発現した場合は重大な副作用が起きる。増殖因子を発現させる場合は、適切なデリバリー方法を用いると共に的確な組織のコンパートメントに対して行う必要がある。しかし、局所的に遺伝子導入する場合は導入されたコンパートメントの位置について詳細に調べることは事実上困難である。また、特定の細胞のみに発現させることも困難である。最近、遺伝子のデリバリーベクターを組織あるいは細胞に対して特異的にターゲティングする技術が発達しており、遺伝子導入の心筋特異性が改善している²¹⁵⁾。

10.13 遺伝子治療においてどのような遺伝子導入ベクターを選択するか

遺伝子治療においては遺伝子導入に用いるベクターの選択も重要なポイントである。急性心筋梗塞後の治療と慢性心筋虚血では遺伝子発現のタイムコースを変える必要がある。同様に、閉塞性動脈疾患の進行が緩やかな慢性虚血で酸素圧の低下がみられるような比較的健康的な心筋と、梗塞後に障害を受けた心筋とでは、形成される微小環境は異なる。増殖因子をコードする遺伝子は非ウイルスプラスミド構成体あるいはウイルスベクターを用いてデリバリーできる。プラスミドは安全であり作成も容易ではあるが、心筋における導入効率は非常に低いのが欠点である²¹⁴⁾。なお、リポソームを用いることによりその

導入効率が顕著に改善できるという報告もある²¹⁶⁾。

遺伝子治療を目的とした新しいウイルスが開発され、既存のベクターも改変により改善されていることから、ウイルスベクターが多く用いられるようになってきている。遺伝子治療における理想的なウイルスベクターとは、①導入効率が高い②毒性が低い③免疫原性が無い④長い遺伝子が挿入できる⑤標的とする細胞だけに遺伝子が発現できる⑥遺伝子発現が調節できるといった特徴を有している必要がある。しかし、このような特徴をすべて有するようなベクターはまだ開発されていない。遺伝子導入のベクターを臨床適用する場合は品質が最も重要な選択基準となる。心筋梗塞後において局所組織灌流のサルベージが起きるには、短時間高い効率で導入する必要がある。アデノウイルスは利用頻度が最も多く研究も進んでいる遺伝子導入ベクターの一つである。アデノウイルスの長所は、①導入効率が高い②導入遺伝子の発現能が比較的高い③高いタイターで産生できるという点である。正常の免疫系を有する大動物では導入遺伝子の発現が一過性で2-3週間続き、その期間内では毛細血管ネットワークの形成及び組織灌流が十分増加する。

側副血管の成長及び新生血管の動脈形成には数週間から数箇月までとより長い発現が必要である。このような長期間の発現にはエピゾームベクターあるいは宿主細胞染色体に組み込み可能なベクターを用いる。アデノ随伴ウイルス“Adeno-associated vector”(AAV)はアデノウイルスより導入効率は低い、筋肉組織に対して指向性を有し遺伝子発現は導入後1年間持続する²¹⁷⁾。AAVに導入できるDNAの長さは最大5 kbでありほとんどの増殖因子の遺伝子は導入可能である。しかし、場合によってはそれ以上の長さの遺伝子を導入する必要があり、この導入能力の低さが開発の妨げとなっている。レンチウイルスはもっと長い遺伝子が導入可能であり、静止期及び増殖期の細胞に導入できる。宿主染色体へ組み込まれるため安全性が懸念されるが、その解決法として数々の発現調節系が開発されている。また、心臓血管へのアプローチにおける欠点は導入効率とウイルス標品のタイターの低さである。

10.14 遺伝子治療において治療薬をどれだけ

デリバリーするか

たん白質治療薬と同様に遺伝子治療のアプローチ

の場合も治療濃度域がある。治療濃度域とは、最大限の治療効果と最小限の副作用の両方が得られる濃度域を指す。増殖因子を同じ量投与しても患者により作用発現の強さは変動するが、遺伝子治療の場合はそれに加えて導入効率及びたん白質産生レベルも患者によりかなり変動する。したがって、ウイルスデリバリーのアプローチでは最適量の増殖因子が産生されるウイルスの濃度及び投与した組織環境下における増殖因子の標的組織への分布がポイントとなる。

通常の場合、従来の薬理学的アプローチでは薬は様々な組織に分布される。遺伝子治療は治療たん白質を局所にデリバリーできるという利点があるが、それは逆に正確な投与量の算定、更にデリバリー自体も難しくなるという欠点にもなる。血流において最適となる薬の濃度を決めるのは比較的容易であるが、大動物において局所たん白質濃度が最適になるようなウイルス投与量を正確に決めるには通常よりはるかに多くの前臨床試験が必要である²⁰⁹⁾。治療効果は、①標的組織におけるウイルス溶液の拡散②導入効率③導入細胞におけるたん白質の発現レベル④増殖因子の溶解性など様々な因子により総合的に決定される。

前臨床遺伝子治療実験のほとんどはマウスモデルで行われている。マウスモデルは遺伝子導入及び遺伝子ノックアウト実験、増殖因子の作用の検討では非常に有用であるが、小動物で得られた実験結果を基にしてヒトの治療を行おうとする場合は十分注意する必要がある¹¹²⁾。実際、マウスにおけるウイルスの投与量、たん白質濃度の実験結果はヒトに対してそのまま外挿できない場合がある。例えば、マウス尾静脈への投与においてウイルス粒子として 1.0×10^{11} 個²¹⁸⁾及び容量として3 mL²¹⁹⁾用いる場合、その値をそのままヒトに外挿するとそれぞれ 1.0×10^{14} 個及び7 Lになる。また、小さな組織では増殖因子の効力及び正確な投与量を決定することは困難である。マウスでは数回の投与で心筋の全体に作用を及ぼすことは容易だが、マウスより数百倍大きい豚の心臓に同様な作用を及ぼすことははるかに難しい。筋肉内注入により起こる注射針の痕跡のようなものでもマウスではヒトと全体的に占める割合が異なる。例えば、28-Gの注射針では筋肉組織で約500 μm の幅の壊死した痕跡が起きる。そのような状態