

O, Samejima K, Sakan H, Terada M, Harada K, Akai Y, Shiiki H, Nose M, Saito Y.: Elevated levels of fractalkine expression and accumulation of CD16+ monocytes in glomeruli of active lupus nephritis. Am J Kidney Dis. 50: 47-58, 2007.

学会発表

1. Komori H, Soga Y, Sawasaki T, Endo Y, Nose M.: Autoantibody-proteomics in autoimmune disease-prone recombinant inbred strains of mice using a novel high-throughput detection system. 5th International Congress on Autoimmunity, Nov. 29- Dec. 3, 2006, Sorrento, Italy
2. Lu LM, Nakatani K, Terada M, Miyazaki T, Arita N, Zhan MC, Furukawa H, Ono M, Hiai H, Nose M. Dominant resistant loci to

lupus nephritis involving CD59a in a wild type mice-derived inbred strain MSM/Ms. 5th International Congress on Autoimmunity, Nov. 29- Dec. 3, 2006, Sorrento, Italy

3. 宮崎龍彦、田中ゆき、小森浩章、小野栄夫、能勢真人.: オステオポンチン蛋白多型による接着因子結合アフィニティの差異に関する解析、第 96 回日本病理学会総会、大阪、2007.3.13-15

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図 1 GST-Tag 融合合成タンパク質とリアク
タントとする capture ELISA system の原理

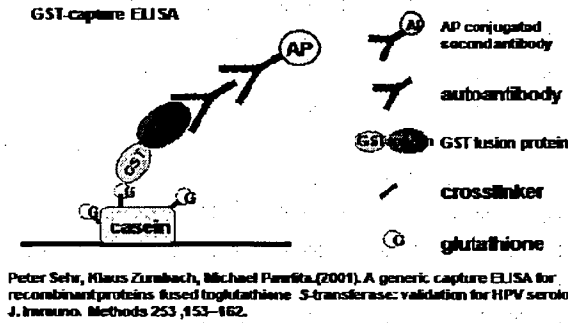


図 2 AlphaScreen 法による解析結果

AlphaScreen法による測定結果が腎血管炎病態と相関する合成蛋白質

Sperman's test $p < 0.05$

a) 5ヵ月齢腎血管炎と5ヵ月齢血清による結果

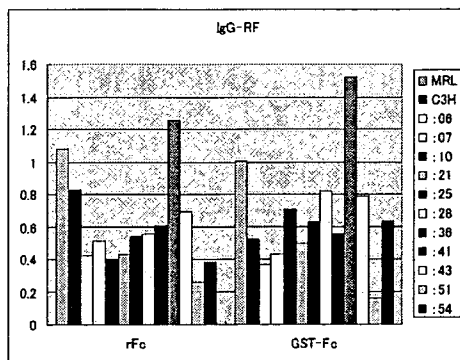
系統	MX106	MX107	MX110	MX111	MX112	MX124	MX125	MX126	MX127	MX128	MX129	MX130	MX131	MX132	MX133	MX134	MX135	MX136	MX137	MX138	MX139	MX140	MFR	
腎血管炎スコア(5ヵ月齢)	1.25	0.21	0.81	0.11	0.05	0.15	0.11	0.25	0.11	0.81	0.09	0	0	0.02	0	0	0.02	0	0.02	0	0.12	0	1.25	
protein 1	80	0	0	0	0	0	0	0	0	80	180	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	180	600	
protein 2	350	0	180	0	0	0	0	0	0	600	600	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400	
protein 3	300	80	250	100	180	0	80	0	300	450	50	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	300
protein 4	0	0	180	80	0	0	200	0	0	100	80	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	180
protein 5	80	0	180	850	80	80	550	0	300	80	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400
protein 6	80	0	180	850	0	450	0	300	80	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400
5ヵ月齢 早血清	protein 1	350	0	180	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	400

b) 5ヵ月齢腎血管炎と3ヵ月齢血清による結果

系統	MX106	MX107	MX110	MX111	MX124	MX125	MX126	MX127	MX128	MX129	MX130	MX131	MX132	MX133	MX134	MX135	MX136	MX137	MX138	MX139	MX140	MFR	
腎血管炎スコア(5ヵ月齢)	1.25	0.21	0.81	0.05	0.15	0.11	0.25	0.11	0.81	0.09	0	0	0.02	0	0	0	0	0.02	0	0.12	0	1.25	
protein 8	0	0	0	0	0	0	0	0	150	50	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 9	300	300	500	100	250	180	200	0	350	200	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 10	850	500	200	350	250	550	300	0	450	500	50	50	500	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 11	150	100	180	180	80	0	180	200	350	300	50	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 12	0	0	0	0	0	0	0	0	250	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 13	350	250	300	200	250	0	50	300	150	350	100	150	150	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 14	400	350	250	150	250	150	180	400	150	500	100	50	250	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 15	350	480	250	100	400	50	200	250	250	300	100	150	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 16	50	0	50	0	0	0	0	0	100	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
protein 17	350	150	200	200	100	150	400	200	250	250	100	100	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

■ 測定値700以上
■ 測定値201-699
■ 測定値1-200
■ 測定値0以下

図 3 capture ELISA system と recombinant protein を用いた ELISA 法の結果



GST-Tag 融合合成タンパク質をRFリアクタントとした capture ELISA system は従来の recombinant Fc を抗原として用いた系との間で測定結果に大きな差は認められなかった。このシステムは、今後、新たなタンパク質に対する自己抗体を簡便かつ迅速に定量する上で非常に有用な方法であると考えられる。

【大型血管炎の臨床研究分科会】

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

難治性血管炎に関する調査研究班

大型血管炎の臨床研究分科会 研究報告書

慢性閉塞性動脈疾患による重症虚血肢に対する血管新生療法

分科会長 重松 宏 東京医科大学外科学第二講座主任教授

研究要旨

慢性閉塞性動脈疾患による重症虚血肢に対する HGF プラスミドを用いた血管新生療法により、Buerger 病に対する一般臨床試験成績では、虚血性潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が 10 例中 7 例に認められて一定の有用性が示され、閉塞性動脈硬化症については、プラセボ対照無作為化二重盲検比較試験により潰瘍例では 100%の縮小効果を認め、安静時痛と併せた治療成績で、統計的に有意な有効性が示された。血中 HGF 濃度や安全性についても、特記すべき病的意義のある上昇や有害事象を認めなかった。

A. 研究目的

重症虚血肢に対する HGF プラスミド (AMG0001, アンジェス MG (株))を用いた臨床試験は、閉塞性動脈硬化症についてはプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験を、Buerger 病については一般臨床試験で行われてきた。Buerger 病について追跡 9 ヶ月までの治療成績および閉塞性動脈硬化症に対する成績を検討した。

B. 研究方法

Buerger 病については、その診断基準に基づいて確定診断された Buerger 病による動脈病変のため、虚血性潰瘍を有している 20 歳以上 85 歳未満のもので、既存の内科的治療や処置を 4 週間以上（観察期間）行っても投与対象肢の症状の改善が認められないものを、また閉塞性動脈硬化症については、Fontaine3 度および 4 度の肢虚血症状で、観察期間における足関節部の上肢血圧比(ABPI)が 0.6 以下、足

関節血圧の平均値が 70mmHg 未満、血行再建術が困難なもので、既存の内科的治療や処置を 4 週間以上行っても肢虚血症状の改善が認められないものを対象とした。

AMG0001 を 2.5mg/mL, 1.85mL/バイアル含有する注射剤を生理食塩水で希釈し、投与対象肢の虚血部位に対して 1 部位あたり 0.5mg ずつ 8 部位（合計 4mg）に筋肉内投与した。投与は 4 週間の間隔をあけて 2 回行い、治療期 8 週後において改善傾向が認められない場合には、さらに 3 回目の投与を実施した。施注方法は一定の手順を定めて行った。

虚血性潰瘍は長径と短径を計測して、 $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$ で、安静時疼痛は VAS スケールを用いて評価した。

足関節部の ABPI および足趾動脈圧比 (TPI) を計測した。血管造影は IADSA

を基本とし、MRA または CTA で代用することも可とした。

その他の血流動態の観察法として、皮膚灌流圧やアイソトープ検査、TcPO₂などは可能な場合に実施することとした。

胸部レントゲンや胸腹部 CT、頭部 MRI、上部消化管内視鏡、直腸診、マンモグラフィ、子宮頸部細胞診などを行って悪性腫瘍の存在を否定した。

参加施設は、Buerger 病については昨年度報告した 8 施設、閉塞性動脈硬化症については 57 施設であった。

(倫理面への配慮)

患者本人から文書による同意書を得た。

C. 研究結果

1. Buerger 病の 9 ヶ月追跡成績

被験者の背景や潰瘍・安静時痛の推移、血中 HGF 濃度、安全性については既に昨年度報告した。

対象となっていた 10 例中 1 例は経過観察中に強皮症を発症したため除外し、9 例に 9 ヶ月の追跡成績が得られた。24 週時点で 7 例中 5 例は潰瘍が治癒、9 ヶ月時点では 4 例中 3 例が治癒、全体として 9 例中 3 例に小切断、1 例に大切断が行われた。追跡期間中に発現した有害事象としては、喉頭癌が 1 例、直腸結腸ポリープと消化管運動障害が各 1 例有り、因果関係が否定されなかった。

2. 閉塞性動脈硬化症の成績

1) 対象

373 例がスクリーニング対象となったがエントリー不可のものが 252 例有り 121 例に同意が得られたが、投与前観察期間中に 77 例が不適格となり中止、44 例に治験薬投与が行われた。エントリー

不可の主な理由は、透析患者や癌の既往のあること、潰瘍部の骨の露出や壊死、他臓器の障害などであり、観察期に不適格となった理由は、悪性腫瘍の既往や合併、重篤な合併症の存在、血行再建可能例、閉塞性動脈硬化症の改善や悪化、等によるものであった。

44 例中 43 例が本登録されたが、原疾患の悪化や有害事象の発生などのために 2 例が治験薬を投与せず、41 例が中間解析の対象となった。治療開始後に他疾患が明らかとなった 1 例を除く 40 例が有効性の対象となった。治験薬投与例が 27 例、プラセボ群が 13 例であった。

2) 患者背景

男女比は 27:13、年齢は 65 歳以上が 40 例中 35 例、診療区分は入院が 18 例、外来が 22 例で、罹病期間は 5 年未満のものが 80% を占めた。喫煙歴のないものは 20% に過ぎなかった。患者背景に HGF 投与群とプラセボ群の間で有意差は無かった。また、安静時疼痛の程度や潰瘍の大きさ、ABPI、TPI、QOL 指標などに差はみられなかった。

3) 治療成績

12 週間における改善の有無をみると、安静時痛は HGF 群で 50% に対しプラセボ群では 25%、潰瘍例では HGF 群 100% に対しプラセボ群で 40%、この二つを合併した結果、HGF 群とプラセボ群の間で改善率は 38.7% の差があり、検定結果で $P=0.014$ と高度に有意な差がみられた(図 1)。

ABPI の変化量は両群ともに 0.1 程度の上昇がみられたが有意な差は無かった。

Fontaine 分類の変化は HGF 群では、3

度の 16 例中 2 例が Fontaine 2b へ、4 度の 11 例中 3 例が 3 度へ、1 例が 2b へ改善した。プラセボ群では、3 度の 8 例中 1 例が 2a へ、4 度の 5 例中 1 例が 2b に改善したのみであった。

SF-36 による QOL 評価では、HGF 群では全項目について数値の改善が認められ、プラセボ群との間で「身体の痛み」と「心の健康」の項目で有意な差が認められた。

切断率については、HGF 群ではみられず、プラセボ群で 1 例に小切断が行われた。

4) 安全性

血清中の HGF 濃度について、遺伝子導入による上昇はみられず、一部の症例で原疾患の悪化や肺炎、小脳梗塞などにより内因性 HGF の上昇によると考えられるものがみられた。

重篤な有害事象として、HGF 群で前立腺癌と膀胱穿孔がみられたが、いずれも発現時期から治験薬との関連は低いと考えられている。

D. 考察

HGF プラスミドを用いた虚血肢治療は、閉塞性動脈硬化症や Buerger 病を対象に行われ、Buerger 病については、7 例に潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が認められており、一般臨床試験ではあるが、一定の有用性が示されている。閉塞性動脈硬化症については、潰瘍例の 100% に改善がみられ、安静時痛と併せた有効性判定で統計的にきわめて有意な差がみられ、その有用性が高く評価され、中間解析の結果で、倫理委員会から治験の中止が勧告された。虚血肢や虚血心を対象とした血管新生療法は、骨髄細胞や末梢血幹細

胞などを用いる細胞療法と並んで、種々のベクターを用いた遺伝子治療が試みられているが、プラセボ対照無作為化二重盲検比較試験により有効性が明らかとなったものは世界的に初めてと考えられる。今後は他の治療法との比較対照や併用療法などの検討が必要となろう。

E. 結論

HGF プラスミドを用いた慢性閉塞性動脈疾患による重症虚血肢治療で、Buerger 病については一定の有用性が示され、閉塞性動脈硬化症については、プラセボ対照無作為化二重盲検比較試験により統計的に明らかな有効性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Plenary Session II: Clinical results of the phase III study to evaluate AMG0001 (naked plasmid DNA encoding hepatocyte growth factor) in patients with Buerger's disease.

Asian Chapter Congress of the International Union of Angiology 2007, Taipei, Taiwan, Sept. 7th, 2007.

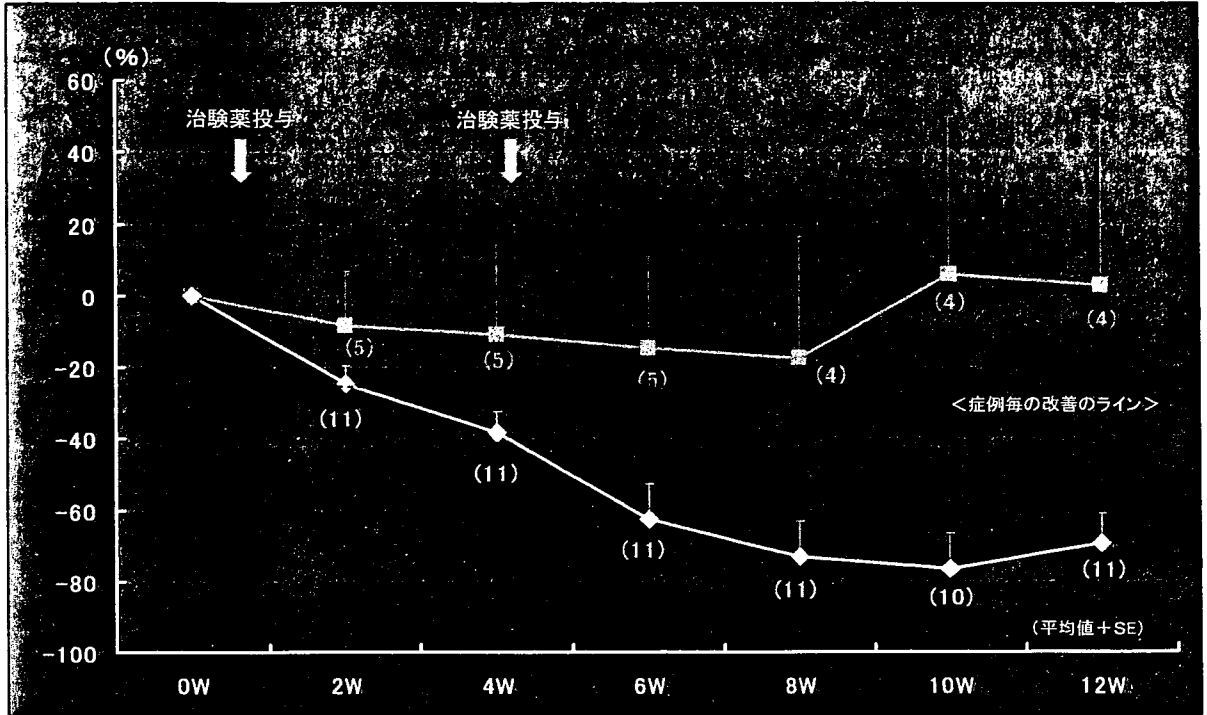
シンポジウム：血管再生医学のトピックス：HGF プラスミドの重症虚血肢に対する第 III 相試験成績、第 48 回日本脈管学会総会、10 月 26 日、松本

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし

(図1) 潰瘍の大きさの推移

上: プラセボ、下: HGF 群



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

難治性血管炎に関する調査研究

分担研究者：浅原 孝之 東海大学医学部基盤診療学系 再生医療科学 教授

研究要旨

難治性血管炎を含めた下肢虚血性疾患に対する血管再生療法のトランスレーショナル研究を展開している。パーチャー病及び閉塞性動脈硬化症による重症慢性下肢虚血を対象にした、自家血管内皮前駆細胞移植の第I・II相臨床試験を計画した。下肢虚血に対する試験計画は、東海大学と先端医療センター・神戸市立中央市民病院の倫理委員会で実施の承認を得て、2003年11月から移植治療が開始されている。現時点で重篤な有害事象は発生せず、自他覚所見の改善が得られており、データ解析中である。

分担研究者：浅原 孝之

所属機関名：東海大学医学部基盤診療学系再生医療科学

職名：教授

A：研究目的

パーチャー病及び閉塞性動脈硬化症による重症慢性下肢虚血に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）移植の臨床的有用性を明らかにする。

B：研究方法

上記の細胞移植治療に関する第I・II相試験を計画し、施行する。科学的に臨床試験を施行するため、独立したデータセンター、登録センターと共同で研究を進める。

* 倫理面への配慮

上記の臨床試験は、東海大学および先端医療センター再生医療審査委員会・神戸市立中央市民病院倫理委員会から実施の承認を得た後に、被験者から同意を得て開始される。

C：研究結果

重症慢性下肢虚血患者に対する上記臨床試験は、上記の手続きを経て開始された。顆粒球コロニー刺激因子製剤の投与により末梢血に動員された骨髄単核球細胞をアフエーシスで採取し、磁気細胞分離により単核球から分離された血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）を虚血下肢の筋肉内に移植している。現在までに21例の患者に対する移植が安全に行われ、自他覚所見の著明な改善が得られている。最後の患者を、6ヶ月まで経過観察中である

D：考察

臨床試験の開始に先立って、豊富な基礎研究データの準備が重要であることは言うまでもないが、患者の倫理面に配慮し、移植治療を安全かつ有効に施行するためには、綿密に臨床試験を計画し、詳細な臨床試験プロトコルを作成することが重要である。今回、GCP規準臨床試験に準拠したプロトコルを作成することにより、臨床試験を安全にかつ科学的で、再現性の期待できる形で開始することができた。

E：結論

重症慢性下肢虚血患者に対する自家血管内皮前駆細胞（CD34陽性細胞）移植に関する第I・II相臨床試験を進展させた。

F：研究発表1. 論文発表

1. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, Itoh R, Iwaguro H, Eguchi M, Iwami Y, Tanaka R, Nakagawa Y, Sugimoto A, Ninomiya S, Hayashi S, Kato S, Asahara T. Estrogen-Mediated Endothelial Progenitor Cell Biology and Kinetics For Physiological Postnatal Vasculogenesis. *Circ Res.* 2007 Sep 14;101(6):598-606
2. Sugimoto A, Masuda H, Eguchi M, Iwaguro H, Tana be T, Asahara T. Nicotine Enlivenment of Blood Flow Recovery Following Endothelial Progenitor Cell Transplantation into Ischemic Hindlimb. *Stem Cells Dev.* 2007 Aug; 16(4):649-656.
3. Iwasaki H, Fukushima K, Kawamoto A, Umetani K, Oyamada A, Hayashi S, Matsumoto T, Ishikawa M, Shibata T, Nishimura H, Hirai H, Mifune Y, Horii M, Sugimura K, Suehiro S, Asahara T. Synchrotron Radiation Coronary Microangiography for Morphometric and Physiological Evaluation of Myocardial Neovascularization Induced by Endothelial Progenitor Cell Transplantation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun; 27(6):1326-1333
4. Asahara T. Cell therapy and gene therapy using endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(180):181-194
5. Kawamoto A, Asahara T. Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007 Oct 1; 70(4): 477-484.

2. 学会発表

AHA Scientific Sessions 2007 Symposium, "Vascular Progenitor Cells and Cell Growth "Endothelial Progenitor Cells for Ischemic Diseases"

G：知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他
- 特記すべき事なし

バージャー病における遺伝子多型と歯周病菌感染に関する研究

分担研究者 東京医科歯科大学 血管・応用外科 井上芳徳講師

研究要旨

バージャー病(BD 群)における遺伝子多型と歯周病菌感染を検討した。BD 群では口腔内の歯周病菌感染が 100%と高率であり、歯周病菌に対する IgG 抗体価が健常者と比較して有意に上昇していた。歯周病菌 DNA が閉塞動脈から高頻度に検出された。BD 群には DRB1*1501 陽性者 (34.4% vs. 13.2%, OR=3.44) および DPB1*0501 陽性者(79.4% vs. 55.1%, OR=3.14)の頻度が有意に高かった。CD14 多型は、TT 遺伝子型頻度が BD 群に有意に高いことが明らかになった。BD 感受性の高い遺伝子多型が明らかとなり、歯周病菌感染の関与が示唆された。

A. 研究目的

バージャー病症例における遺伝子多型の関与を検討すると共に、歯周病菌感染の状態を健常者と比較し、本疾患との関連性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

歯周病専門医が歯周炎を評価し、また唾液中の歯周病菌 DNA、血清抗体価を測定した。閉塞した動脈壁中の歯周病菌 DNA を検索した。バージャー病と健常者を対象に、HLA-DPB1, DRB1, B と、CD14 多型を検討した。

(倫理面への配慮)

学内の倫理委員会に研究内容を呈示し、許可を得た上で、全員に書面を用いて説明し同意を得た場合のみ実施した。

C. 研究結果

BD 群では口腔内の歯周病菌感染が 100%と高率であり、歯周病菌に対する IgG 抗体価が健常者と比較して有意に上昇していた。歯周病菌 DNA が閉塞動脈から高頻度に検出された。BD 群には DRB1*1501 陽性者、DPB1*0501 陽性者の頻度が有意に高かった。CD14 多型は、TT 遺伝子型頻度が BD 群に有意に高かった。

D. 考察

DRB1*1501, DPB1*0501, CD14 TT の因子を有する症例に、歯周病菌感染が発生することにより本症発症の危険性が高くなることと、口腔内感染とくに歯周炎の治療が本症の発症や増悪を抑制しうる可能性がある。

E. 結論

遺伝子多型が本疾患に対する感受性に相乗的に関与しており、本疾患と歯周病菌感染との関連性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Iwai T, Inoue Y, Umeda M, et al. Oral bacteria in the occluded arteries of patients with Buerger disease. *J Vasc Surg*: 2005. 42. 107-15

Chen YW, Iwai T, Umeda M, et al. Elevated IgG titers to periodontal pathogens related to Buerger disease. *Int J Cardiol*. 2007; 122: 79-81

Chen Z, Takahashi M, Naruse T, et al. Synergistic contribution of CD14 and HLA loci in the susceptibility to Buerger disease. *Hum Gnt*. 2007; 122. 367-372

2. 学会発表

Chen Y, Umeda M, Huang Y, et al. Elevated serum IgG antibody levels to Periodontal pathogens in patients with Buerger disease. The 34th Annual meeting of Japanese society for vascular surgery.. Tokyo, 2006.5.11.

Li X, Iwai T, Nakamura H, et al. Interaction of Porphyromonas gingivalis with human platelets and neutrophils: ultrastructural observations. The 52nd Annual congress of the Japan section. Tokyo, 2006.6.3

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得, 2. 実用新案登録, 3. その他特にありません。

虚血肢に対する GCSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞ならびに
HGF プラスミドを用いた血管新生療法の治療成績

分担研究者 重松 宏 東京医科大学外科学第二講座主任教授
渡部 芳子 東京医科大学血管外科

研究要旨

Buerger 病ないし閉塞性動脈硬化症(ASO)による重症虚血肢に対し HGF プラスミドを用いた臨床治験を各 1 例、および Buerger 病に対し GCSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞を用いた一般臨床試験を 2 例行い、全例で虚血性潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が認められ、いずれも改善効果が示された。両者とも安全性について、特記すべき病的意義のある有害事象を認めなかった。

A. 研究目的

虚血肢に対する血管新生療法である HGF プラスミド(AMG0001, アンジェス MG (株))を用いた臨床治験は、閉塞性動脈硬化症についてプラセボ対照無作為化二重盲検比較試験が、Buerger 病について一般臨床試験が行われ、当科で各 1 例ずつを施行した。また Buerger 病について、GCSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞移植治療を行った。これらの治療成績を検討した。

B. 研究方法

1. HGF プラスミド

Buerger 病ないし ASO と診断されたもので、これらによる動脈病変のため虚血性潰瘍を有し 85 歳未満で、既存の内科的治療や処置を 4 週間以上（観察期間）行っても投与対象肢の症状の改善が認められないものを対象とした。

AMG0001 を 2.5mg/mL, 1.85mL/バイア

ル含有する注射剤を生理食塩水で希釈し、投与対象肢の虚血部位に対して 1 部位あたり 0.5mg ずつ 8 部位（合計 4mg）に筋肉内投与した。投与は 4 週間の間隔をあけて 2 回行い、治療期 8 週間において改善傾向が認められない場合には、さらに 3 回目の投与を実施した。施注方法は一定の手順を定めて行った。

虚血性潰瘍は長径と短径を計測して、 $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$ で、安静時疼痛は VAS スケールを用いて評価した。

足関節部の上肢血圧比(ABPI)および足趾動脈圧比(TPI)を計測した。血管造影は IADSA を基本とし、MRA または CTA で代用することも可とした。

その他の血流動態の観察法として、皮膚灌流圧やアイソトープ検査、 $TcPO_2$ などは可能な場合に実施することとした。

胸部レントゲンや胸腹部 CT、頭部 MRI、上部消化管内視鏡、直腸診、マンモグラフィ、子宮頸部細胞診などを行って悪

性腫瘍の存在を否定した。

2. G-CSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞

閉塞性動脈硬化症または Buerger 病と診断され、Fontaine 分類Ⅲ度以上で他の薬物療法および外科治療による改善が得られないものを対象とした。全身精査を行い、G-CSF による有害の可能性（自己免疫疾患、脾機能亢進症、重度の虚血性心疾患、脳血管疾患、血栓症の既往）、血管新生による有害の可能性（悪性腫瘍、糖尿病性網膜症の増殖期）および妊婦は除外した。

G-CSF(グラン 400 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ day) 皮下注射を 4~6 日間行い、末梢血白血球および CD34 陽性細胞数が十分増加 ($\geq 30/\mu\text{L}$) した時点でアフエレーシスによる細胞採取を施行した。処理量は血液循環量の 2 倍程度とし、採取する CD34 陽性細胞数は 107 以上を目標とした。採取液を患部に数カ所に分けて筋肉注射した。

虚血性潰瘍は長径と短径で、安静時疼痛は VAS スケールを用いて評価した。治療前後で足関節部の上肢血圧比(ABPI) および IADSA を施行した。

(倫理面への配慮)

両試験とも、患者本人から文書による同意書を得た。

C. 研究結果

症例 1(HGF)

56 歳男性、Buerger 病。FontaineⅣ度（潰瘍）。右腓腹筋に投与した。2 回の投与のみで右第 4 趾 10x10mm の潰瘍は治癒が得られた（図 1）。VAS は 80mm から 0 へ改善した。また上腕足関節収縮期血圧比 (ABI) の改善を認めた（図 2）。IADSA

の変化は有意でなかった。治療後に良性大腸ポリープの出現が認められ、健康を脅かすものではなかったが、関連性を否定できず経過観察を続けている。

症例 2(HGF)

72 歳男性、閉塞性動脈硬化症。左第 5 趾切断術後。FontaineⅣ度（潰瘍）。左大腿から足底までの筋群に投与した。2 回の投与のみで潰瘍径は 10x10mm から 4x3mm に縮小した。VAS は 30mm、ABI は 0.30 からともに変化はなかった。IADSA の変化は有意でなかった。安全性上問題となる変化はなかった。

症例 3(CD34 陽性細胞)

38 歳男性、Buerger 病。右全足趾切断術後。FontaineⅣ度（潰瘍）。右足底に投与した。足趾切断端 15x10mm の潰瘍は治癒を得、VAS は 50mm から 0 へ改善した。ABI は 0.48 から 0.95 へと上昇した。IADSA の変化は有意でなかった。安全性上問題となる変化はなかった。

症例 4(CD34 陽性細胞)

39 歳男性、Buerger 病。FontaineⅢ度。右腓腹筋に投与した。VAS は 60mm から 0 へ改善した。ABI は 0.64 から 0.71 で変化はなく IADSA の変化も有意でなかった。安全性上問題となる変化はなかった。

D. 考察

HGF プラスミドを用いた虚血肢治療は、閉塞性動脈硬化症や Buerger 病を対象に行われ、本年中にその成果が明らかにされると考えられる。Buerger 病については、7 例に潰瘍の縮小や安静時疼痛の改善が認められており、一般臨床試験ではあるが、一定の有用性が示されている。虚血肢や虚血心を対象とした血管新生療法は、

骨髄細胞や末梢血幹細胞などを用いる細胞療法と並んで、種々のベクターを用いた遺伝子治療が試みられており、今後はこれらの治療法との比較対照などの検討が必要となろう。

E. 結論

HGF プラスミドを用いた Buerger 病および閉塞性動脈硬化症による虚血肢治療で、ともに改善効果が示された。また、GCSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞をもちいた Buerger 病の2治療例でも改善効果が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

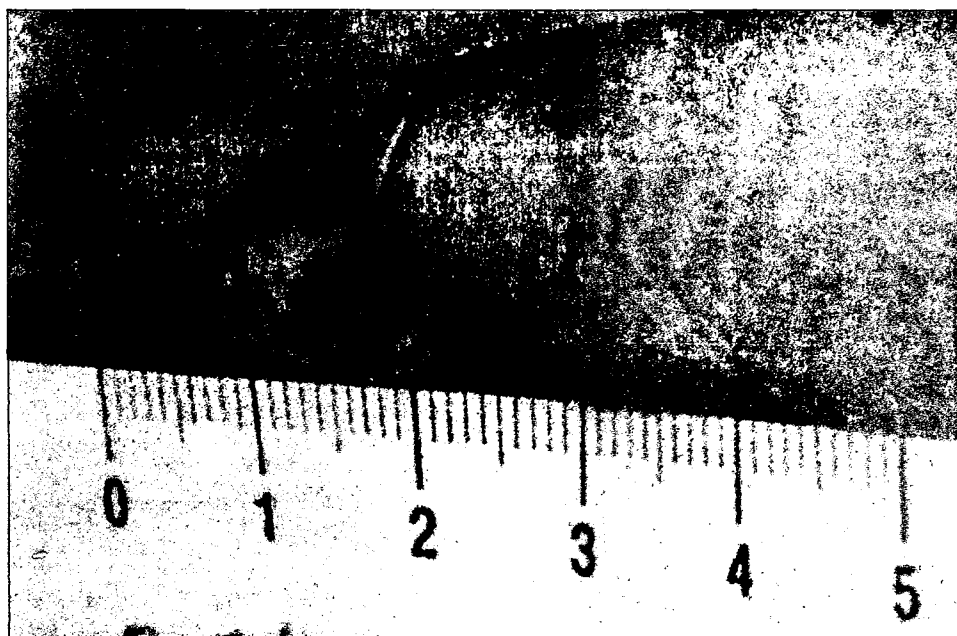
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

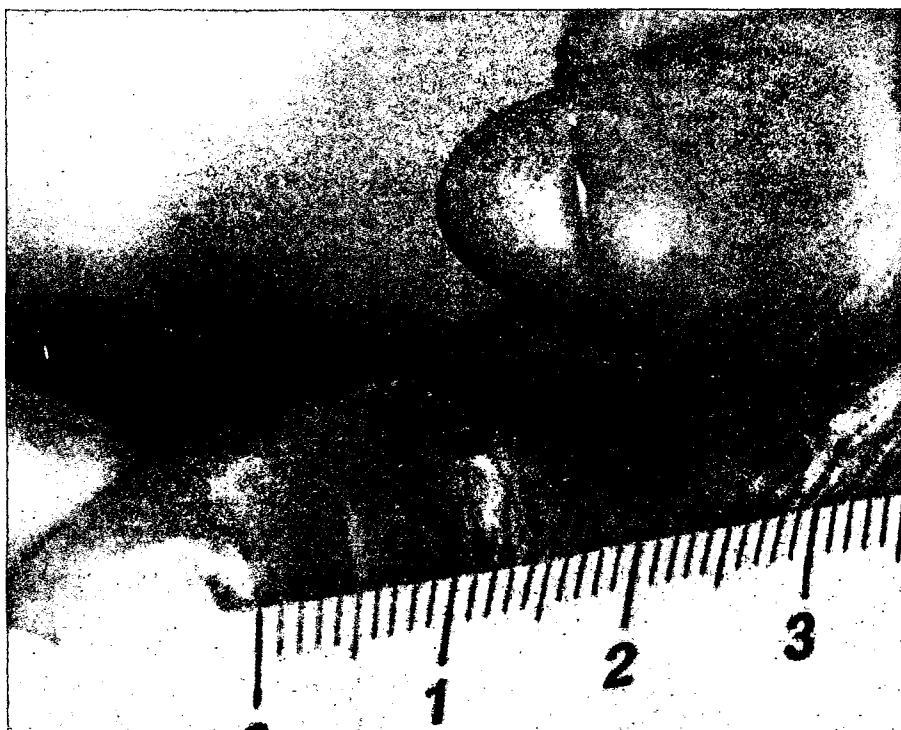
該当するものなし

(図1) 潰瘍の治癒

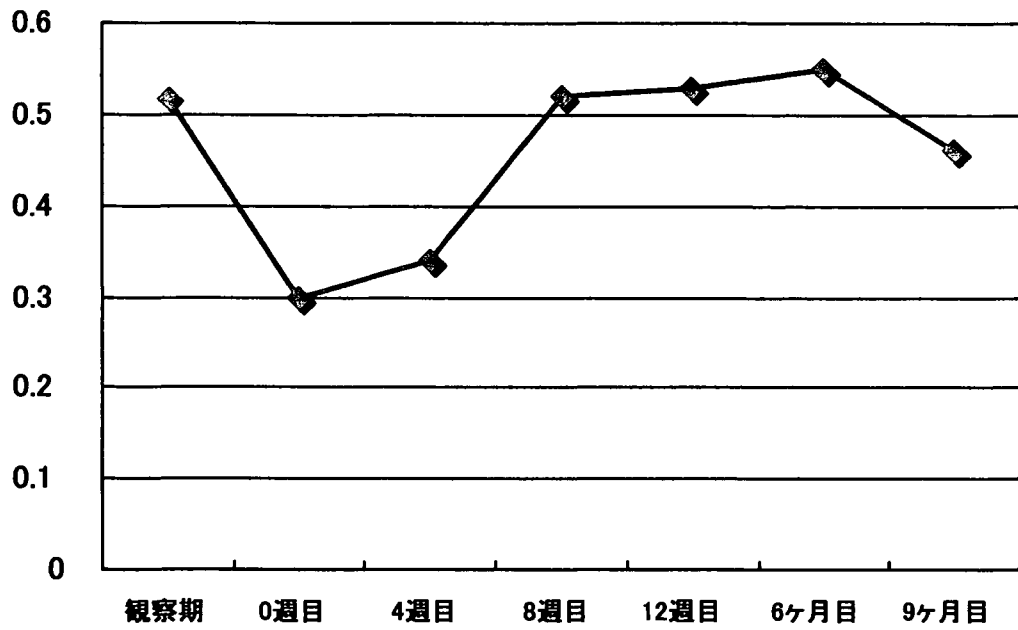
a) 治療前



b) 治療後



(図2) ABIの推移



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

治療抵抗性末梢動脈疾患(PAD)に対する先進併用療法

—自己骨髄幹細胞血管新生療法, マゴットセラピー, 高気圧酸素療法(HBO)併用療法—

分担研究者 宮本 正章 日本医科大学大学院器官機能病態内科学 准教授

研究要旨: 現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない(no optional patients)重症難治性虚血肢 (バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, 膠原病等難治性血管炎) 46例, 重症冠動脈性疾患 (狭心症, 虚血性心筋症) 10例に対して自己骨髄幹細胞による血管新生療法を施行し, その有効性及び安全性を示した. また術前予後予測因子として 100%O₂ 吸入下経皮酸素分圧測定(TcPO₂)測定により 30mmHg 以下症例の予後不良を報告し, これらを改善するため自己骨髄幹細胞血管新生療法, マゴットセラピー, 高気圧酸素療法(HBO)併用先進療法を開発し, 前医で患肢大切断或いは治療法がないと診断された症例の 59例中 51例 (86.4%) で, 患肢大切断を回避し, 自立歩行で退院した. また, 大きな副作用も認められなかった. これらの複合的治療法は, limb salvage のための新しい戦略となりうると考えられた.

A. 研究目的

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない(no optional patients)治療抵抗性虚血下肢 (バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, 膠原病等難治性血管炎) に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法及びマゴットセラピー, 高気圧酸素療法(HBO)併用先進療法の有効性, 安全性を証明する.

B. 研究方法

全身麻酔下に腹臥位にて両側腸骨より骨髄細胞液 500 ml を採取した. 500 μ l 及び 200 μ l の フィルター後, 血液分離装置 AS TEC 204 を使用して, 骨髄単核球と血小板の細胞層を採取し, 最終収量は, 60-80 ml

に濃縮された. 直ちに 24-27G シリンジで虚血下肢及び debridement, マゴットセラピー後の潰瘍・壊疽周辺に筋注した.

(倫理面への配慮)

日本医科大学付属病院倫理委員会及び日本医科大学倫理委員会の承認を受け, その適応に関しては各科 (6 診療科代表者 8 人) よりなる血管再生療法適応評価委員会において 1 症例毎の適応を選択した.

C. 研究結果

Fontaine 分類では, 94.9%がIV度 (56/59 例) を占め, 糖尿病は 74.6% (44 /59 例) が合併していた. 視覚的アナログ (visual analog scale : VAS) にて定量的に検討し

たが、術前 78.3 ± 16.3 (mm) に対して術後 4 週で 12.1 ± 9.6 (mm) と著明に低下していた ($p < 0.0001$)。ABI は、術前 0.54 ± 0.20 から術後 4 週で 0.79 ± 0.24 ($p = 0.001$) と改善した。術前歩行可能で測定可能であった症例での treadmill test における無痛歩行時間は、術前 122 ± 42 秒から術後 4 週で 491 ± 73 秒と大幅に改善した。 ($p = 0.028$)

D. 考察

本療法の結果、全例で疼痛が除去或いは軽減されたが、59 例中 8 例では、術後 2 年以内に患肢大切断を余儀なくされた (全て壊死性筋膜炎、骨髄炎が原因であった)。

本治療法の有効性を評価するため、客観的でしかも定量化可能な評価法は難しい。PAD 患者 9 人 (潰瘍症例 8 例) を用いて患者を BMI 後下肢切断に至った群 (group A, $n=3$) と、切断を回避出来た群 (group N, $n=6$) の 2 群に分類した。術前と術後 4 週に ankle-brachial index (ABI), 経皮酸素分圧 (TcPO₂) 及び TcTF シンチグラフィを用いた血流評価を行い 2 群間で比較した。術前と比較した術後 4 週の変化は ABI と Tc-TF では 2 群間で有意な差を認めなかった: ABI (group A) $0.3 \pm 0.4 \rightarrow 0.4 \pm 0.3$, (group N) $0.5 \pm 0.3 \rightarrow 0.5 \pm 0.1$, NS; Tc-TF (group A) $0.4 \pm 0.2 \rightarrow 0.7 \pm 0.2$, (group N) $0.8 \pm 0.2 \rightarrow 1.0 \pm 0.3$, NS。一方、TcPO₂ は group N で有意に増加 ($23.2 \pm 7.9 \rightarrow 40.3 \pm 10.8$ torr) したが、group A では有意に低下 ($12.7 \pm 15.3 \rightarrow 7.7 \pm 9.9$ torr, $p < 0.05$) した。BMI 術前と比較した術後 4 週における TCP02 の変化は重症

PAD 患者における下肢切断の予後予測因子として有用な検査法と考えられた。

E. 結論

現行のいかなる内科的及び外科的治療法でも治癒しない治療抵抗性虚血下肢 (バージャー病, ASO, 糖尿病潰瘍・壊疽, 膠原病等難治性血管炎) に対する自己骨髄幹細胞移植による血管再生療法及びマゴットセラピー, 高気圧酸素療法 (HBO) (併用先進療法) を 59 例実施し, その有効性及び安全性を示した。 ^{99m}Tc-tetrofosmine (TF) perfusion scintigraphy 等による種々の評価法により, 4 週後良好な血流増加を証明し (平均 15%), 疼痛の消失, 緩和, QOL の著明な改善をもたらした。本治療法は, limb salvage のための新しい戦略となりうると考えられた。

F. 健康危険情報

本療法の副作用に関連して, 2 例で筋注部位の局所的炎症 (発赤, 腫脹, 軽度熱感) があったが, 7 日以内に発赤は全て消失した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Gen Takagi, Masaaki Miyamoto, Masahiro Yasutake et al, A novel therapy using control-released basic fibroblast growth factor in Patients with peripheral artery disease : Comparison with bone marrow mononuclear Cell implantation. Circulation Supplement II 114 II-446, 2006
- 2) Takayuki Aimoto, Eiji Uchida, Akira

Matsushita et al,
Controlled release of basic fibroblast growth factor promotes healing of the pancreatico jejunal anastomosis: A novel approach toward zero pancreatic fistula. Surgery 142,734-740, 2007

3) Masayuki Arakawa, Masahiro Yasutake, Masaaki Miyamoto, et al : Transduction of anti-cell death protein FNK protects isolated rat hearts from myocardial infarction induced by ischemia /reperfusion. Life Science, 80 2076- 2084, 2007

4) Shuhei Tara, Masaaki Miyamoto, Sadamitsu Asoh, et al. Transduction of the anti-apoptotic PTD-FNK protein improves the efficiency of transplantation of bone marrow mononuclear cells. J of Molecular and Cellular Cardiology 42,489-497, 2007

5) Takagi Ikuyo, Nejima Jun, Takagi Gen, et al. Chronic Direct Stimulation of Adenylyl Cyclase Induces Cardiac Desensitization to Catecholamine and Beta-Adrenergic Receptor Downregulation in Rabbits J Cardiovasc Pharmacol 48,223-229, 2006.

2. 学会発表

1) 宮本正章, 高木 元, 太良修平, 他. 膠原病による難治性潰瘍に対する再生医療を応用した集学的治療—血管新生からマゴットセラピーまで- 第19回日本アレルギー学会春季臨床大会 横浜 2007. 4 シンポジウム10 膠原病治療の現状と評価

2) 宮本正章, 水野博司, 多川政弘, 他 難治性末梢動脈閉塞性疾患 (PAD) に

対する総合的治療戦略—血管新生療法からマゴットセラピーまで-第32回日本足の外科学会学術集会 長崎 2007. 6 アフタヌーンセミナー (1)

3) 宮本正章, 安武正弘, 高木 元, 他 血管再生医療を応用した難治性PADに対する総合的治療戦略—自己骨髄血管新生療法からマゴットセラピーまで- 第11回心筋・血管新生療法研究会 東京 2007. 7

4) 宮本正章, 水野博司, 多川政弘, 他 重症PADに対する総合的治療戦略—血管新生療法からマゴットセラピーまで- 第23回日本医工学治療学会学術大会 シンポジウム 末梢動脈疾患PADのすべて 集学的治療の実際 大阪 2007. 2

5) 宮本正章, 水野博司, 多川政弘, 他 重症難治性PADに対する総合的治療戦略—血管新生療法からマゴットセラピーまで-第71回日本循環器病学会総会学術集会 教育講演 神戸 2007. 3

6) 相本隆幸, 内田英二, 田尻 孝, 他 生体修復材料を用いた膵消化管吻合術基礎的研究: 再生医療による新しい手技 第19回日本肝胆膵外科学会学術集会 ミニワークショップ 2 移植・再生医療 横浜 2007. 6

H. 知的財産権の出願・登録状況
2007 特許出願, 商標登録出願
マゴットバッグ

1. 実用新案登録
なし

2. その他
なし

難治性血管炎に関する研究:

大型血管炎の臨床研究、および難治性潰瘍に対する局所分子治療法の開発

分担研究者 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客員教授

研究要旨

肝細胞増殖因子(HGF)遺伝子治療臨床研究では初期効果が2年後まで維持され良好な長期成績が示された。HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子の共導入による血流増加作用、創傷治癒促進作用が小形動物で確認できた。また血管新生因子として新たにクローニングした抗菌ペプチド AG30 は抗菌作用、血管新生作用を持つことが判明した。

A. 研究目的

末梢性血管疾患治療において、大循環改善と局所治療の総合的ケアを目指し、遺伝子導入による血管新生療法と局所難治性潰瘍に対する分子治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

(1)HGF 遺伝子治療臨床研究(TREAT -HGF)の長期予後を解析した。

(2)HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子の創傷治癒促進・皮弁生着率に及ぼす影響を検討した。

(3)血管新生因子として新たにクローニングした抗菌ペプチド AG30 の潰瘍治療効果について検討した。

C. 研究結果

(1)TREAT-HGF の2年間の長期追跡調査では臨床安全性に問題ないことが示された。遺伝子投与後2ヶ月で得られた初期効果は2年後にも維持されており、良好な長期成績が得られた。

(2)ステロイド投与によるラット創傷治癒遅延モデルにおいて、無針注射器シマジェットによるHGF 遺伝子とPGIS 遺伝子の共導入は、局所血流の改善と上皮再生促進を誘導し、創傷治癒促進効果が確認できた。また、ラット皮弁モデルにおいてシマジェットによる同遺伝子の共導入を行ったところ、皮弁生着率が有意に改善した。さらに糖尿病ラット(創傷治癒遅延モデル)を用いた検討でも遺伝子導入により有意に生着率の改善が認められた。

(3)血管新生因子として新たにクローニングしたAG30は30個のアミノ酸から成るペプチドであり、その構造から抗菌ペプチドであることが判明し、血管新生能を持つ他の抗菌ペプチドと共通性が見られた。マウスの皮下にマトリゲルに封入したAG-30を投与したところ、対照群に比し著明な血管新生が確認された。

D. 考察

TREAT-HGF では初期効果、長期成績とも良好であったが、非プラセボ試験のため有効性評価は不可能であることが問題である。無作為二重盲検試験での評価が必要である。

HGF・PGIS 遺伝子の血流増加作用、創傷治癒促進作用が小形動物で確認できたが、今後臨床応用に向けて大型動物での安全性有効性評価の必要がある。

抗菌ペプチド AG30 は抗菌作用、血管新生作用を持つことが判明した。構造をアレンジすることによりこれらの作用を調節することも可能であり、今後動物実験で十分な創傷治癒促進効果が得られる至的構造を検討していく。

E. 結論

HGF 遺伝子・PGIS 遺伝子・抗菌ペプチド AG30 の難治性潰瘍に対する有用性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1)Nakagawa A, Makino H, Aoki M, Miyake T, Shiraya S, Nakamura T, Ogihara T, Kimata Y, Morishita R.

Improvement of survival of skin flaps by combined gene transfer of hepatocyte growth factor and prostacyclin synthase.

J Gene Med. 2007 Sep 28

2. 学会発表

国内

(1)Nakagami H, Nishikawa T, morishita R, Tabata Y, TomonoK, Ogihara T, Kaneda Y

Functional analysis of novel antimicropeptide, AG(Angiogenic Peptide)-30, with angiogenic

property, toward clinical application.
第 71 回日本循環器学会学術集会
2007 年 3 月 15 日 神戸

(2)Aoki M, Morishita R.
Clinical Trials of Human Gene Therapy for
Peripheral Arterial Disease Using Hepatocyte
Growth Factor Gene Transfer
第 71 回日本循環器学会学術集会
2007 年 3 月 17 日 神戸

(3)森下竜一
Clinical Trials of HGF(Hepatocyte Groeth
Factor) gene therapy in peripheral arterial
disease(PAD).
第 13 回遺伝子治療学会
2007 年 6 月 30 日 愛知がんセンター

(4)森下竜一
遺伝子診療のイノベーション
第 14 回日本遺伝子診療学会
2007 年 7 月 27 日 愛媛看護研修センター

(5)森下竜一
脈管学におけるトランスレーショナルリサー
チ
第 48 回日本脈管学会総会
2007 年 10 月 26 日

(6)中神啓徳
次世代血管新生療法に向けての試み
第 48 回日本脈管学会総会

2007 年 10 月 26 日

国外

(1)Nakagawa A, Aoki M, Miyake T, Shiraya
S, Nakamura T, Ogihara T, Kimata Y,
Morishita R.

Improvement od survival of skin flaps by
combined gene transfer of hepatocyte growth
factor and prostacyclin synthase.

American Society of Gene Therapy 10th
Annual Meeting

2007 年 5 月 30 日-6 月 3 日 Seattle USA

(2)Nishikawa T, Nakagami H, Maeda A,
Tabata Y, Tamai K, Kaneda Y

Development of high throughout functional
screening of cardiovascular therapeutic genes
using HVJ-E vector and identification of a
novel angiogenic peptide, AG30.

American Society of Gene Therapy 10th
Annual Meeting

2007 年 5 月 30 日-6 月 3 日 Seattle USA

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし