

抄録 18

難治性血管炎に関する調査研究班

大型血管炎臨床分科会報告

「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」

東京医科大学外科学第二講座（血管外科）

重松 宏

（抄録）

慢性閉塞性動脈疾患に対する新しい治療手段として、細胞移植や遺伝子治療を用いた血管新生療法の開発が進められている。本邦では大阪大学で実施された肝細胞増殖因子（HGF）の遺伝子プラスミドを用いた、第Ⅲ相臨床試験（治験）が実施された。Buerger病を対象とした臨床試験は本研究会を中心に open trial で行われ、10 例中 7 例で潰瘍の縮小、安静時疼痛の改善がみられた。

一方、閉塞性動脈硬化症に対しては、全国 57 施設の多施設共同治験としてプラセボ対照二重盲検比較試験が実施された。対象は血行再建術の適応が困難でかつ既存の内科的治療が無効な FontaineⅢ度あるいはⅣ度の重症虚血肢を有する閉塞性動脈硬化症患者であった。治験実施計画書の基準に適合した被験者を AMG0001 群あるいはプラセボ群に 2 : 1 にランダム化した。治験薬は下肢の虚血部位に対し 4 週間の間隔をあけて 2 回筋肉内投与し、その後 8 週間観察した（治療期間：12 週間）。有効性を検証するための主要エンドポイントは、安静時疼痛あるいは虚血性潰瘍の改善の有無とし、12 週後における改善率を両群間で比較した。有効性の評価は 40 例（実薬群：27 例、プラセボ群：13 例）を対象として行った。主要エンドポイントである安静時疼痛あるいは虚血性潰瘍の改善率は、実薬群：70.4% に対し、プラセボ群：30.8% であり、統計的有意差をもって実薬群の優越性が検証された ($p=0.014$)。また、安全性においては、実薬群に臨床上許容できない有害事象は認められなかった。

これらの結果から、虚血肢に対する HGF 遺伝子プラスミドを用いた血管新生療法の有用性が、プラセボ対照無作為化二重盲検比較試験により明らかとなった。

抄録 19

「末梢閉塞性動脈疾患に対する血管新生療法の経験」

東京医科大学外科学第二講座（血管外科）

重松 宏、渡部 芳子

（抄録）

当科では、これまでに慢性虚血肢に対する血管新生療法を、2方法で施行した。

1. GCSF を併用した自家末梢血 CD34 陽性細胞治療（Buerger 病 2 例）

GCSF(グラン $400 \mu\text{g}/\text{m}^2 \text{ day}$) 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 ($\geq 30/\mu\text{L}$) した後、アフエレーシスで細胞を採取。患部に筋肉注射した。

2. 肝細胞増殖因子（HGF）プラスミド治療（Buerger 病 2 例、ASO 1 例）

治療薬を生理食塩水で希釈し、1 部位あたり 0.5ml ずつ 8 部位に筋肉内注射した。

結果：いずれも血管撮影の変化は有意でなかったが、潰瘍ないし間歇性跛行は改善し、症例によっては API も改善した。

難治性血管炎に対する血管再生治療の報告

浅原孝之

東海大学医学部・再生医療科学

先端医療センター研究所/理研発生再生総合研究所・幹細胞医療応用チーム

成体幹細胞研究が進む中、血管内皮前駆細胞 endothelial progenitor cell が末梢血液中に存在し、重症虚血部位の血管形成に関与することが判明した。この機序は、胎児期のみが存在するとされた血管発生 (Vasculogenesis)、つまり血管内皮前駆細胞が未分化のままその場所にたどり着き、増殖、分化することで血管を構築する過程、に一致し、これまで考えられてきた成体の血管形成、既存隣接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管新生 Angiogenesis とは異なる概念が生まれた。この血管内皮前駆細胞の研究は医療応用に大きな可能性を秘めている。血管内皮前駆細胞の生物学的基礎研究の発展と共に、虚血部位の血管新生療法や動脈硬化部位の血管内皮再生療法や、増殖させた血管内皮前駆細胞を応用する前臨床研究が、トランスレーショナルリサーチとして展開されてきた。

この成果を得て、先端医療センターおよび東海大学では 2003 年 11 月よりバージャー病を含む慢性重症虚血下肢に対する自家末梢血血管内皮前駆細胞移植による血管再生治療を開始している。試験デザインは、単盲検下での用量漸増試験である。対象は、Fontaine 分類Ⅲ度以上かつ Rutherford 分類Ⅱ度Ⅳ群以上を示し、血管形成術・バイパス手術の適応がない患者である。フィルグラスチム ($10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) の 5 日間投与後、アフエレーシスを実施し末梢血幹細胞 (単核球) を採取、CD34 陽性細胞を分離し、腰椎麻酔下に下腿 40 箇所 (腓腹筋 30 箇所、趾間部 4 箇所、足底部内側筋 6 箇所) に筋肉内移植する。現在先端医療センターで 17 例の患者 (閉塞性動脈硬化症 5 例、バージャー病 12 例) 東海大学で 4 例の患者さんに試験治療を実施した。試験治療期間中、重篤な有害事象の発生はなく安全に実施できている。試験治療により自覚症状や潰瘍の改善は全例において認められている。

抄録 2 1

バージャー病に関する最新知見と今後の動向

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 血管・応用外科学分野¹⁾

つくば血管センター、バージャー病研究所²⁾

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野³⁾

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 血管病先進制御学分野⁴⁾

井上芳徳¹⁾、岩井武尚²⁾、和泉雄一³⁾、梅田 誠³⁾、地引政利⁴⁾

これまで、①バージャー病において歯周病の重症例が多く、*P. gingivalis* などの IgG 抗体価が有意に上昇していること、②歯周病細菌 DNA が PCR 法にて動脈に高率に検出されることを報告してきた。さらに 1) 歯周病との関連性、遺伝学的要因検討、2) *P. gingivalis* 静注モデルでの血小板凝集と血栓形成、3) 加齢による内皮細胞の変化と *P. gingivalis* 感染に対する変化を検討した。

バージャー病(BD 群)における CD14 の-260>C 多型および HLA-DP,-DR 多型を検討した。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 群に有意に高かった ($P=0.008$, OR=1.87)。上記の任意の 2 因子を持つ場合、1 因子のみよりさらにリスクが高かった。

多血小板血漿に *P. gingivalis* を加えると、大部分が血小板凝集塊に囲まれ、さらに一部は血小板内に取り込まれた。*P. gingivalis* 持続静注モデルでは、下腿動脈に相当する部位のみで血栓形成が認められた。放射線照射による加齢内皮細胞では *P. gingivalis* の感染率が有意に上昇していた。*P. gingivalis* は、コチニン 250、2,500ng/ml の濃度下で発育が有意に促進されていた。

バージャー病症例では歯周病細菌に対する IgG 抗体価が高いことより、今後、IgG 抗体価と DRB1*1501 や DPB1*0501 の HLA アリルとの関連を検討する。*P. gingivalis* による血小板凝集は個人差があり、バージャー病と対照群では差が大きいと推定され、血小板凝集能、歯周病重症度、IgG 抗体価、HLA アリルの関連性を検討する。

治療抵抗性 PAD に対する先進併用療法：マゴットセラピー，高気圧酸素療法 (HBO)，自己骨髄細胞筋肉内投与による血管新生療法を併用した新治療

¹ 日本医科大学付属病院第 1 内科，再生医療科

² 日本医科大学付属病院形成外科・美容外科

³ 日本医科大学付属病院高気圧酸素治療部

宮本正章¹、高木 元¹、太良修平¹、安武正弘¹、高野仁司¹、川中秀和¹、
高木郁代¹、水野博司²、松田範子³、秋丸琥甫³、徳永 昭³、水野杏一¹

現行の治療法では治癒しない（治療抵抗性）最重症の末梢動脈疾患(PAD)治療に新手法を取り入れ良好な成績を収めている。全 43 例中 FontaineⅣ症例が 88.4%を占め、前医より患肢大切断か治療法がないと診断された症例である。糖尿病，ASO，バージャー病，PSS 等膠原病による難治性壊疽・潰瘍症例では、虚血症状に加え、すでに多剤耐性菌による感染が成立しており、1) 感染制御，2) 創傷治癒促進，3) 血流増加の 3 点を同時に治療せねば，True End Point である自立歩行による退院を達成する事は不可能であると考え。そのため我々は，マゴットセラピー（医療用無菌ウジ治療），自己骨髄細胞筋肉内投与による血管新生療法（先進医療承認），HBO を組み合わせて治療を実施している。

又，その予後指標として経皮酸素分圧測定(TcPO₂)の有用性を報告している。この結果，経過観察 2 年間で，大切断 4 例，他病死 3 例，手指症例を除いた足症例 36 例中 32 例（88.9%）が救肢に成功し，自立歩行で退院した。なお手指症例を入れた全体有効率は，90%であった。

末梢性血管疾患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

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上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。

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
平成 19 年度 総括・分担研究報告書

発行 平成 20 年 3 月 31 日

厚生労働省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

主任研究者 尾崎 承一

聖マリアンナ医科大学リウマチ・膠原病・アレルギー内科
神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1
電話 044-977-8111 (代表)

印刷 株式会社創栄企画
川崎市宮前区菅生 2-16-1 聖マリアンナ医科大学構内