

【2. 口頭発表】

1. Yoshikazu Yonemitsu
Invited Speaker: 'New Anticancer Technologies based on Recombinant Sendai Virus'
LSAC2008 Cancer Prevention and Control, Beijing, PR China 2008. 4.2-3.
2. 米満吉和
シンポジウム7：センダイウイルス-温故知新-
指定講演：「ウイルスベクターとしてのセンダイウイルス」
第55回 日本実験動物学会総会（仙台）2008. 5.15-17.
3. 米満吉和
シンポジウム：心血管領域における再生医療
指定講演：「遺伝子治療による血管再生」
第17回 日本心血管インターベンション学会（名古屋）2008. 7.3-5.
4. Yoshikazu Yonemitsu
Invited Lecture: 'New Anti-Cancer Technologies based on Recombinant Sendai Viruses'
Seminar in Hangzhou AllTrust Life Science Research Co.Ltd. (Hangzhou) 2008. 7.18.
5. Yoshikazu Yonemitsu
Invited Lecture: 'Sendai Virus As A Multi-BioDevice'
11th. Liposome Research Days Conference: YOKOHAMA SYMPOSIA 2008. 7.19-22.
6. 米満吉和
Keynote Lecture 「機能的血管再生に関与するサイトカインネットワーク」
第12回 Molecular Cardiovascular Conference 2008.9.5-7. (小樽、北海道)
7. 米満吉和
教育講演 「末梢動脈閉塞性疾患に対する遺伝子治療：その現状と将来」
第56回 日本心臓病学会総会 2008.9.8-10. (東京)
8. 米満吉和
市民公開講座：指定講演「慢性動脈閉塞症に対する夢の遺伝子治療」
市民公開講座「足の血管が詰まる病気は大変だ！」
(厚生科学研究推進事業 研究成果普及啓発事業) 2009.1.10. (福岡)
9. 米満吉和
特別講演 「国産バイオプラットフォーム技術によるトランスレーショナルリサーチの
推進」
眼科分子生物学研究会 2009.1.31. (福岡)
11. 米満吉和
講演「国産新規ウイルスベクターを用いた重症虚血肢に対する新 GCP 準拠遺伝子治療
臨床研究」
トランスレーショナル研究成果発表会 2009.2.24. (東京)
12. 米満吉和
特別講演 「センダイウイルス組換え技術を基盤としたバイオ医薬品開発戦略 - update」
福岡循環器セミナー 2009.3.9. (福岡)

【3. 出版物】

< 著書 >

1. Ueda Y, Kinoh H, Hasegawa M, Yonemitsu Y.
Sendai Virus for Cancer Therapeutics.
Ed. by Hicks BW, Methods in Molecular Biology: Viral Applications of the GFP:
Humana Press. U.S.A. 2008. (in press)
2. 米満吉和
(単行本)『血管の再生～血管再生医学の夜明け：近づく実用化』(森下竜一 編)
第3章 血管新生増殖因子 i) 線維芽細胞増殖因子 (FGF)
真興交易株式会社医書出版部 pp76-89, 2008
3. 米満吉和
(単行本) 遺伝子医学 MOOK 第13号 (田畑泰彦 編)
『臨床再生誘導治療 2009：患者までとどいている再生誘導治療～
バイオマテリアル、生体シグナル因子、細胞を利用した患者のための
再生医療の現状』
第2章 生体シグナル因子の利用 2. 遺伝子 2) 末梢血管
メディカルドゥ社, 2008 (印刷中)

Book Editor

1. Edited by Suzuki S and Yonemitsu Y.
Recent Advances in Neurogenesis, Neuroregeneration and Neuroprotection.
RESEARCH SIGNPOST (publishing)

IV. 研究成果の刊行物・別冊

本研究と最も密接に関係する以下の論文を抜粋する

1. Fujii T, Onimaru M, Yonemitsu Y, Kuwano H, Sueishi K.
Statins restore blood flow of ischemic limb in diabetic microangiopathy via upregulation of eNOS/NO, but not via PDGF-BB expression.
Am J Physiol, Heart Circ Physiol 294:H2785-H2791, 2008.
2. 米満吉和、伊東啓行、福永亮太、吉田久美、井口博之、前原喜彦
重症虚血肢に対する血管新生治療の役割
Angiology Frontier 7:47-54, 2008.

Statins restore ischemic limb blood flow in diabetic microangiopathy via eNOS/NO upregulation but not via PDGF-BB expression

Takaaki Fujii,^{1,3} Mitsuho Onimaru,¹ Yoshikazu Yonemitsu,² Hiroyuki Kuwano,³ and Katsuo Sueishi¹

¹Division of Pathophysiological and Experimental Pathology, Department of Pathology, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, Fukuoka; ²Department of Gene Therapy, Graduate School of Medicine, Chiba University, Chiba; and ³Department of General Surgical Science, Graduate School of Medicine, Gunma University, Gunma, Japan

Submitted 12 February 2008; accepted in final form 11 April 2008

Fujii T, Onimaru M, Yonemitsu Y, Kuwano H, Sueishi K. Statins restore ischemic limb blood flow in diabetic microangiopathy via eNOS/NO upregulation but not via PDGF-BB expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2785–H2791, 2008. First published April 25, 2008; doi:10.1152/ajpheart.00149.2008.—3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitors, or statins, have pleiotropic effects and can protect the vasculature in a manner independent of their lipid-lowering effect. The effectiveness of statins in reducing the risk of coronary events has been shown even in patients with diabetes, and their effects on diabetic complications have been reported. Using a model of severe hindlimb ischemia in streptozotocin-induced diabetic mice (STZ-DM), we investigated the effects and mechanisms of statin therapy in diabetic angiopathy in ischemic hindlimbs. As a result, STZ-DM mice frequently lost their hindlimbs after induced ischemia, whereas non-DM mice did not. Supplementation with statins significantly prevented autoamputation. We previously showed that diabetic vascular complications are caused by impaired expression of PDGF-BB, but statin therapy did not enhance PDGF-BB expression. Statins helped enhance endogenous endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) expression. Furthermore, the inhibition of NO synthesis by the administration of *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester impaired the ability of statins to prevent STZ-DM mouse limb autoamputation, indicating that the therapeutic effect of statins in hindlimb ischemia in STZ-DM mice occurs via the eNOS/NO pathway. A combination therapy of statins and PDGF-BB gene supplementation was more effective for diabetic angiopathy than either therapy alone. In conclusion, these findings indicate that statin therapy might be useful for preventing intractable diabetic foot disease in patients with diabetic angiopathy.

endothelial nitric oxide synthase; nitric oxide; platelet-derived growth factor-BB; diabetes mellitus

DIABETES MELLITUS (DM) is characterized by a chronic state of hyperglycemia and is increasing to epidemic proportions throughout the world. The morbidity and mortality associated with diabetes is primarily due to macro- and microangiopathy occurring in multiple organs (2, 20). The diabetic foot is an intractable disease categorized by DM-related vascular complications, and patients with it have a much higher risk of gangrene and the need for consequent amputation of the lower extremities (20). Collateral vessel development is insufficient to compensate with the reduced blood flow through occluded arteries in patients with peripheral vascular disease, especially DM (10). Furthermore, surgical and catheter interventions are usually difficult to treat limb ischemia of DM patients with DM, because vascular diseases are located in small vessels.

3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase inhibitors or statins are potent inhibitors of cholesterol biosynthesis that have become more widely used in greater numbers of patients with hypercholesterolemia (13, 31). Furthermore, recent studies suggest that statins have pleiotropic effects in a manner independent of their lipid-lowering effect and can protect the vasculature (8, 27, 29). Several trials have demonstrated the beneficial effects of statins in lowering cardiovascular-related morbidity and mortality in patients with coronary artery disease. The effectiveness of statins in reducing the risk of coronary events has been established in patients with and without diabetes, and it has been suggested that patients with diabetes benefit more than patients without in both primary and secondary prevention (6).

Recent studies have also revealed the modulatory effects of statins in diabetic microangiopathy (7). The effectiveness of statins appears to involve restoring or improving endothelial function through the attenuation of high glucose-induced or diabetes-induced oxidative stress, thereby increasing the bioavailability of nitric oxide (NO) or inhibiting inflammatory responses (7).

On the other hand, using a model of severe hindlimb ischemia in streptozotocin-induced diabetic mice (STZ-DM), we previously showed that the diabetic foot is a disease involving the disturbance of PDGF-BB expression but not of the disturbance of the responses of angiogenic factors (32). Screening of angiogenesis-related factors revealed that the expression of PDGF-BB was impaired in STZ-DM mice at baseline as well as over a time course after limb ischemia. Increased expression of PDGF-BB prevented autoamputation in the STZ-DM mice (32).

In this study, we investigated the effect of and the mechanism underlying statin therapy in hindlimb ischemia under chronic hyperglycemia using STZ-DM. We here demonstrate that statins show significant therapeutic effects in hindlimb ischemia in STZ-DM mice via the endothelial NO synthase (eNOS)/NO pathway but not via PDGF-BB expression. Our results suggest that statin therapy would be useful for preventing intractable diabetic foot disease in patients with diabetic angiopathy.

MATERIALS AND METHODS

Cells and reagents. Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) were purchased from Kurabo, Tokyo, Japan. Two intracellular signal inhibitors were used as previously described (11, 12).

Address for reprint requests and other correspondence: T. Fujii, Div. of Pathophysiological and Experimental Pathology, Dept. of Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu Univ., 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

23, 32, 33); bis-I (a PKC inhibitor) and its inactive control, bis-V (100 nmol/l, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan).

Animals. Male C57BL/6J (7 wk old) were purchased from KBT Oriental (Charles River Grade, Tosu, Saga, Japan). All animal experiments were performed according to approved protocols and in accordance with recommendations for the proper care and use of laboratory animals by the Committee for Animals, Recombinant DNA, and Experiments Using Infectious Pathogens at Kyushu University, and according to Japanese government Law No. 105 and Notification No. 6. Experimental diabetes was induced in mice by daily intravenous injection of STZ in citrate buffer (1.5 mg/body) for 5 days (days -5 to 0) for the Type 1 diabetic model. As for Type 2 diabetic models, 10-wk-old male *ob/ob* (C57BL/6J-*Lep^{ob}/Lep^{ob}*) mice (4) and normal control homozygous (+/+) mice (KBT Oriental) were also used to confirm eNOS and PDGF-BB expression. For statin therapy, pravastatin and pitavastatin (0.2 mg/g body wt; injected volume, 0.02 ml/g body wt) were administered by intraperitoneal injection during days 14 to 28. To inhibit NO synthesis, *N^ω*-nitro-L-arginine methyl ester (1 mg/ml in drinking water; Sigma) was orally administered during days 14 to 28.

Murine severe hindlimb ischemia. Details of the surgical treatment and evaluation of limb prognosis have been described previously (11, 12, 18, 23, 32, 33); specifically, the excision of both the left femoral artery and vein and their branches from the inguinal ligament up to and including the saphenous-popliteal bifurcation was performed.

Gene transfer vectors. The plasmid-based gene of human PDGF-BB was prepared as previously described (32). Human full-length cDNA of PDGF-B (GenBank: No. BC029822) was amplified by PCR using specific primers (forward: 5'-AAGGTACCATGAATCGCTGCTGGCGCTC-3' and reverse: 5'-TTCTCGAGCTAGGCTCCAAGGGTCTCCTC-3') and subcloned into a TA cloning vector (Invitrogen, San Diego, CA). The whole sequence was then determined using the CEQ 2000 Sequence Detection System (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The amplicon was transferred to the *KpnI-XhoI* sites of the mammalian expression vector pCEP4 (Invitrogen).

ELISA. The protein contents in the limb muscles and culture medium were determined using Quantikine Immunoassay systems for human eNOS (available for both humans and mice; R&D Systems, Minneapolis, MN), murine PDGF-BB (R&D Systems) and human PDGF-BB (specific for humans; R&D Systems) according to the manufacturer's instructions, as previously described (11, 12, 18, 23, 32, 33).

Biochemical analysis. Serum levels of LDL cholesterol and advanced glycation end product (AGE) were measured in serum samples when all animals were euthanized. Concentrations of LDL cholesterol and AGE were determined by an automatic analyzer (Research Testing Department, SRL, Hachiohji-shi, Tokyo, Japan).

Laser-Doppler perfusion images. Measurements of the ischemic (left)/normal (right) limb blood flow ratio were made using a laser-Doppler perfusion image (LDPI) analyzer (Moor Instruments, Devon, UK) as previously described (11, 12, 18, 23, 32, 33). To minimize data variability due to ambient light and temperature, the LDPI index

was expressed as the ratio of the left (ischemic) to the right (nonischemic) limb blood flow.

Statistical analysis. All data except for those of limb survival were expressed as means \pm SE and were analyzed by one-way ANOVA with Fisher adjustment. For the survival analysis, the survival rate expressed by the limb salvage score was analyzed using Kaplan-Meier's method (11, 18, 23, 32, 33). The statistical significance of the survival experiments was determined using the log-rank test. $P < 0.05$ was considered statistically significant in all analyses.

RESULTS

Effects of statins on serum glucose, LDL cholesterol, and AGE in DM mice. Serum levels of glucose, LDL cholesterol (LDL), and AGE were measured in serum samples of a relevant model for Type 1 diabetes, STZ-DM mice, and a well-accepted model of Type 2 diabetes, namely *ob/ob* mice that are leptin-deficient C57BL/6 (4). Serum concentrations of glucose, LDL, and AGE were increased in the DM mice. Statin treatment did not affect the increases in glucose and AGE, whereas the increased LDL concentration was relatively decreased (Table 1). In the following experiments, STZ-DM mice were used after we confirmed a significant upregulation of the serum glucose.

Therapeutic effects of statins in hindlimb ischemia in STZ-DM mice. The STZ-DM mice frequently lost their hindlimbs at various levels after surgically induced severe limb ischemia, although the non-DM mice did not. Quantitative analysis of the degree of autoamputation using the limb salvage score (11, 18, 23, 32, 33) demonstrated impaired limb survival in the STZ-DM mice. Administration of statins (pravastatin and pitavastatin) by intraperitoneal injection daily on days 14 to 38 resulted in the significant prevention of autoamputation in the STZ-DM mice (Fig. 1), indicating that the statin therapy effectively restored tolerance against hindlimb ischemia in STZ-DM mice.

eNOS/NO is important for the therapeutic effects of statins, but endogenous PDGF-BB expression is not. We previously showed that the diabetic foot is a disease involving the disturbance of PDGF-BB expression (32). To explain the mechanism underlying the therapeutic effect of statins on the tolerance of limb ischemia in STZ-DM mice, we measured the expression of murine (m)PDGF-BB protein in thigh muscles of STZ-DM. Downregulated expression of PDGF-BB was evident in both the STZ-DM, and statin therapy did not influence the impaired expression of PDGF-BB (Fig. 2A). In addition, the expression of mPDGF-BB protein was not influenced by statin therapy

Table 1. Serum LDL cholesterol, AGE, and glucose concentration are significantly increased in C57BL/6J strain-based 10-week-old Type 1 (STZ-DM) and Type 2 (*Lep^{ob}/Lep^{ob}*: *ob/ob*) mice

| | Non-DM | STZ-DM (Type1) | | | <i>ob/ob</i> (Type2) | | |
|------------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|
| | | Nontreatment | PRA | PTA | Nontreatment | PRA | PTA |
| <i>n</i> | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 | 6 |
| Glucose, mg/dl | 113 \pm 4.2 | 621 \pm 6.6* | 622 \pm 17.9* | 598 \pm 14.2* | 213 \pm 4.8* | 205 \pm 6.6* | 198 \pm 9.3* |
| LDL cholesterol, mg/dl | 11.0 \pm 0.47 | 31.5 \pm 2.77* | 25.2 \pm 2.59* | 24.9 \pm 3.87* | 24.4 \pm 0.20* | 17.3 \pm 0.65* | 16.5 \pm 0.96* |
| AGE, mU/ml | 1.0 \pm 0.12 | 1.6 \pm 0.17* | 1.7 \pm 0.23* | 1.8 \pm 0.14* | 1.6 \pm 0.15* | 1.6 \pm 0.34* | 1.8 \pm 0.27* |

Data are means \pm SE; *n*, animals/group. These increased glucose and advanced glycation end product (AGE) levels were not influenced by treatment with statins, whereas the increased LDL concentration was relatively decreased by statins administration. STZ-DM, streptozotocin-induced diabetes mice; PRA, pravastatin, hydrophilic statin; PTA, pitavastatin, lipophilic statin; * $P < 0.01$ vs. non-DM.

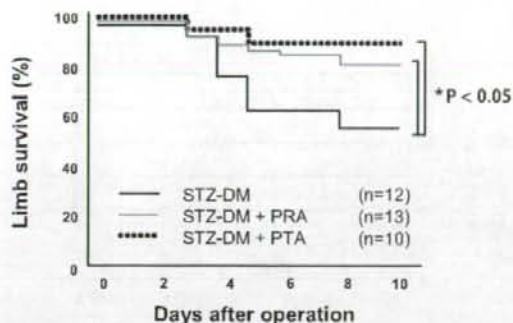


Fig. 1. Limb prognosis curve according to the limb salvage score in streptozotocin-induced diabetes (STZ-DM) C57/BL6 mice. These curves were obtained using Kaplan-Meier's method, and data were analyzed using the log-rank test. Administration of statins, pravastatin (PRA, hydrophilic statin) or pitavastatin (PTA, lipophilic statin), by daily intraperitoneal injection on days 14 to 38, resulted in the significant prevention of autoamputation in the STZ-DM mice ($n =$ animals/group).

even in *ob/ob* mice, a model of Type 2 diabetes. To confirm the modulatory effect of statins on PDGF-BB expression, we examined the induction of PDGF-BB via statins using cultured HUVECs. As shown in Fig. 2B, the statins did not stimulate the

production or secretion of PDGF-BB in the culture medium of HUVECs. These results suggest that the effectiveness of statins in hindlimb ischemia in DM mice may be independent of the endogenous expression of PDGF-BB.

We previously reported that PDGF-B gene expression was downregulated in the limb muscles of STZ-DM mice among the factors tested (VEGF-A and -C, hepatocyte growth factor, FGF-2, PDGF-A and -B, and angiotensin-1 and -2), as well as their receptors (tie-2, flk-1, fibroblast growth factor receptor 1, flt-4, and platelet-derived growth factor receptor-A and -B) (32). Recent important studies indicated that statins activated and upregulated the expression of endogenous eNOS, which has angiogenic potency (1, 21). We next investigated the expression of eNOS and whether or not eNOS/NO is important for the ability of statins to prevent the impairment of limb survival. Statin therapy significantly restored or increased the expression of eNOS in thigh muscles of both STZ-DM and *ob/ob* DM mice (Fig. 3A). As in previous studies (17, 19, 22, 24, 34), statin stimuli induced the upregulation of endogenous eNOS in the lysate of the cultured cells (HUVECs). Furthermore, the daily oral administration of *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester, an inhibitor of NO synthesis, prevented the autoamputation rate for ischemic limb amputation of STZ-DM mice (Fig. 4), indicating that the therapeutic effect of statins on

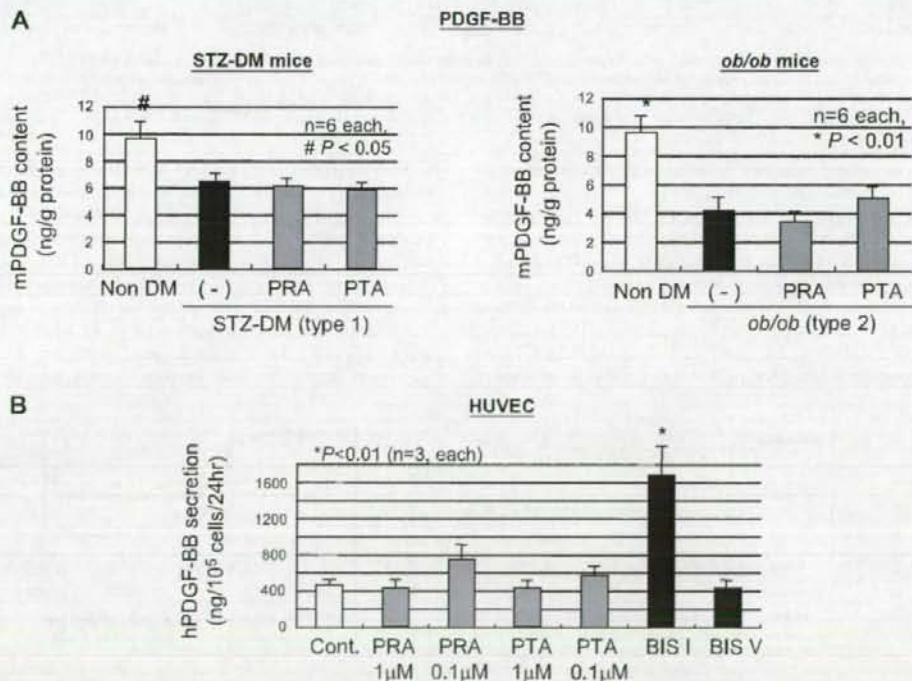


Fig. 2. A: comparison of protein expression of murine PDGF-BB in the thigh muscles of non-DM or DM mice assessed by ELISA. Impaired expression of murine PDGF-BB (mPDGF-BB) protein in C57BL/6J strain-based 10-wk-old Type 1 (STZ-DM; left) and Type 2 (*Lep^{ob}/Lep^{ob}*; *ob/ob*; right) mice was not restored by statin treatment ($n = 6$ animals/group). * $P < 0.01$; # $P < 0.05$ vs. non-DM. B: statins did not contribute to the PDGF-BB expression in human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs). Twenty-four hours after preincubation with 5% FBS, HUVECs were stimulated with statins (0.1 or 1 mM, respectively). Twenty-four hours later, the culture medium was subjected to ELISA. BIS-I, PKC inhibitor; BIS-V, PKC inhibitor control compound; Cont, control; hPDGF-BB, human PDGF-BB. * $P < 0.01$.

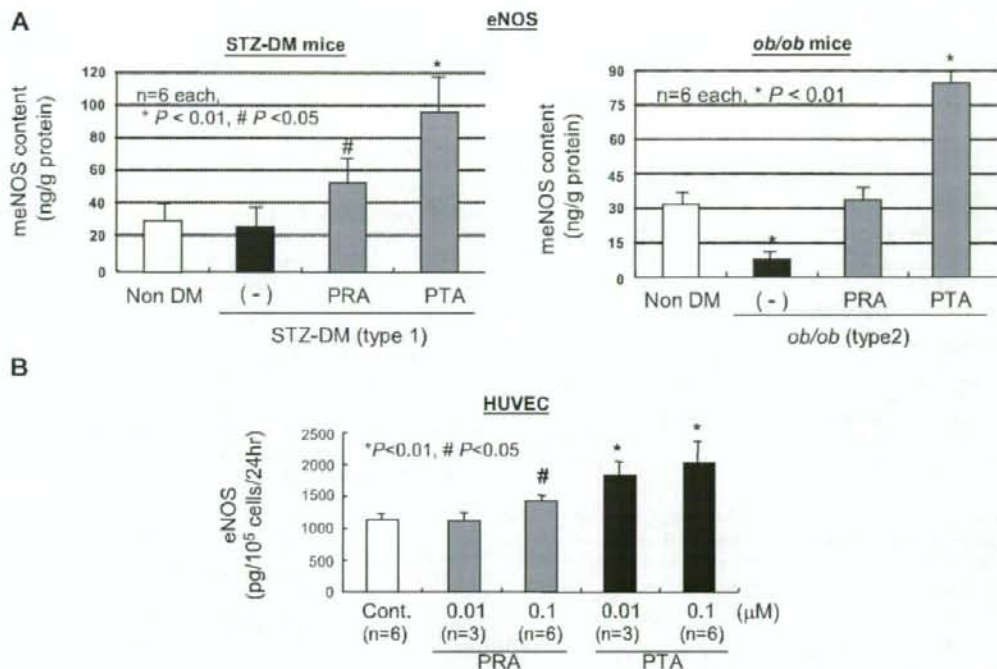


Fig. 3. A: endothelial nitric oxide (NO) synthase (eNOS) protein expression in the thigh muscles of non-DM or DM mice assessed by ELISA. Statin therapy significantly restored or increased the expression of eNOS in both STZ-DM (right) and *ob/ob* (left) DM mice ($n = 6$ animals/group). * $P < 0.01$; # $P < 0.05$ vs. non-DM. B: eNOS expression was increased by statin stimulation in HUVECs. Twenty-four hours after preincubation with 5% FBS, HUVECs were stimulated with statins (0.01 or 0.1 mM, respectively). Twenty-four hours later, the lysate of the cultured HUVECs was subjected to ELISA. * $P < 0.01$; # $P < 0.05$.

tolerance against limb ischemia in the diabetic foot might occur at least partly via the eNOS/NO pathway.

Combination therapy of statins and PDGF-BB gene supplementation for diabetic angiopathy. These results may suggest that the therapeutic effect of statins occurs via eNOS/NO but not via PDGF-BB expression in diabetic vascular dysfunction. As a final assessment, to confirm whether or not statin therapy is independent of the endogenous expression of PDGF-BB, we administered a combination therapy of statins and PDGF-BB gene supplementation and found that this combination is more

effective for diabetic angiopathy than either treatment alone. A supplementation study on the plasmid-based intramuscular gene transfer of human PDGF-B (pCEP4-hPDGFB) was previously described (32). In the present study we assessed the recovery of blood flow evaluated by LDPI, because the PDGF-B gene transfer resulted in the complete prevention of autoamputation in STZ-DM mice. As shown in Fig. 5, both statin therapy and the preinjection of pCEP4-hPDGFB significantly improved the disturbed blood perfusion in STZ-DM mice; furthermore, the combination therapy had an effect on

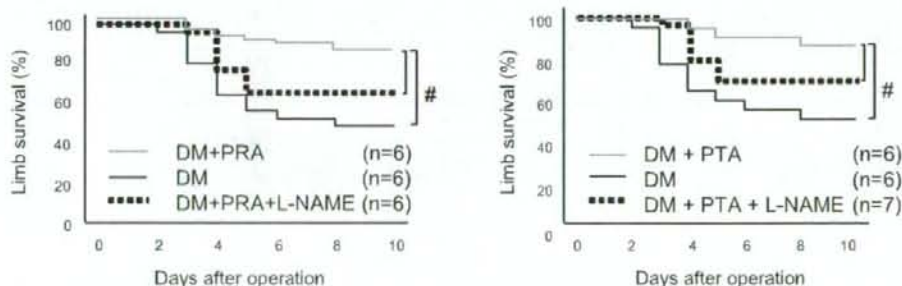


Fig. 4. Limb prognosis curve according to the limb salvage score after the daily oral administration of *N*^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of NO synthesis in STZ-DM mice. These curves were obtained using Kaplan-Meier's method, and the data were analyzed using the log-rank test. Administration of L-NAME prevented the therapeutic effect for ischemic limb autoamputation in STZ-DM mice by treatment with either statin: PRA (left) and PTA (right). # $P < 0.05$ vs. others.

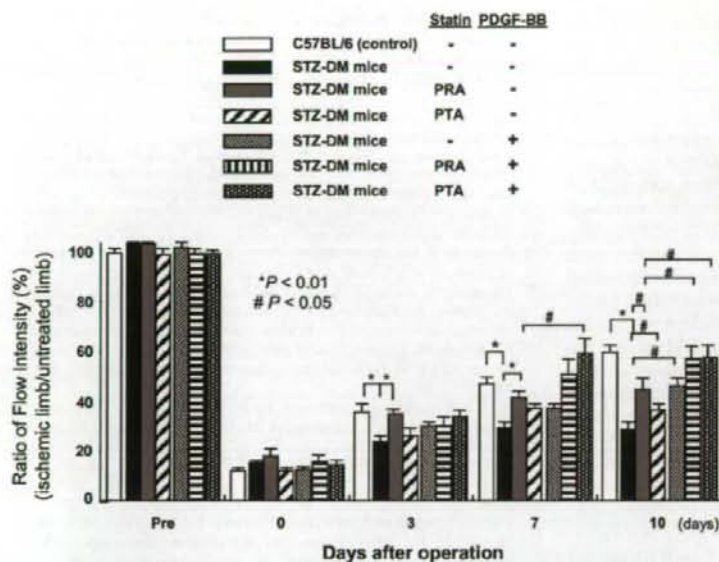


Fig. 5. Effects of statin therapy and/or plasmid-based PDGF-B gene transfer on recovery of blood flow in ischemic limbs of STZ-DM mice. Administration of PRA or PTA by daily intraperitoneal injection on days 14 to 38 significantly prevented autoamputation in the STZ-DM mice. pCEP4-hPDGF-B and control plasmid (pCEP4-empty) were injected into the thigh muscle 2 days before induced limb ischemia. After assessment of blood flow before or after ischemic operation, recovery of blood flow was assessed by laser-Doppler perfusion imaging at each time point. Data were standardized by data related to the untreated right limb and expressed as the ratio of flow intensity (in %). * $P < 0.01$; # $P < 0.05$.

diabetic angiopathy that was superior to that by either therapy alone, indicating that the statin therapy might work independently from PDGF-BB expression and that the combination therapy was sufficient to restore the tolerance against hindlimb ischemia in STZ-DM mice.

DISCUSSION

The key observations made in this study are summarized as follows: 1) the administration of statin was effective for preventing autoamputation of the ischemic limb of STZ-DM mice; 2) statin therapy could not restore the disturbed expression of PDGF-BB in DM mice, suggesting that the effect of statins is independent of PDGF-BB expression; 3) statins could restore or increase eNOS expression in the limb of DM mice; 4) supplementation with the NO inhibitor inhibited the ability of statins to prevent autoamputation, indicating that the therapeutic effect of statins in hindlimb ischemia in STZ-DM mice might occur via the eNOS/NO pathway; and 5) the combination therapy of statins and PDGF-BB supplementation was more effective than either therapy alone. These findings suggest that the statin therapy is effective against the formation of hyperglycemia-related vascular complications, and they imply that statin therapy improves limb survival and perfusion via a mechanism involving eNOS/NO pathway in Type 1 DM, and probably in Type 2 DM microangiopathy.

Over the last several years, it has been already demonstrated that statin treatment improved and promoted angiogenesis in a hindlimb ischemia of non-DM mouse model (16, 26). In the case of DM mouse model, we previously demonstrated that the disturbed tolerance against severe limb ischemia under hyperglycemia was due to the disturbance of PDGF-BB expression and not to the angiogenic responses and that the supplementation of PDGF-B gene expression was sufficient to prevent autoamputation due to limb ischemia in STZ-DM mice (32). The reduction of PDGF-BB expression, which was not dependent

on the level of hyperglycemia (32), was critical to inducing functional and morphological vascular change, which is the dissociation of pericytes from the capillaries in muscles of STZ-DM mice, indicating that impaired PDGF-BB expression disturbed vessel maturation. In the present study, statin administration did not influence PDGF-BB expression, which is concerned with vessel maturation. We postulated that the mechanism underlying the therapeutic effect of statins might be due to improved endothelial function because of the lower PDGF-BB expression. Many diabetic vascular complications involve endothelial cell dysfunction characterized by reduced NO-dependent phenomena, including vasodilation and protection against leucocyte-endothelial interactions. Several studies have shown that hyperglycemia impairs NO production and have demonstrated impaired endothelium-dependent vasorelaxation in diabetic humans and in experimental diabetic animals (5, 14, 15, 30). A hallmark of endothelial dysfunction is reduced bioavailability of NO, which could be caused by reduced expression of eNOS, impairment of eNOS activation, or increased inactivation of NO by oxidative stress. Upregulation of the activity or expression of eNOS is considered to be effective in diabetic angiopathy, and statins can increase eNOS expression and activation in addition to their lipid-lowering effect (8, 17, 19, 22, 24, 27, 34). Furthermore, statins have also been reported to promote angiogenesis via eNOS (16, 26). In our current study, statin therapy was effective for preventing autoamputation of the ischemic limb under hyperglycemia at least partly via eNOS, and those previous reports essentially support our findings that statins could restore or increase the eNOS expression in the ischemic limb of DM mice.

In addition to eNOS/NO dependent pathway, it has been revealed that statins have additional effects of growing interest that include the ability to recruit endothelial progenitor cells (3, 8, 9) or activate the protein kinase Akt, which leads to angiogenesis and prevents apoptosis in endothelial cells (9,16). As

shown Fig. 4, our current findings indicate that the therapeutic effects of statins on tolerance against limb ischemia in the diabetic foot might occur at least partly via the eNOS/NO pathway. Therefore, there is a possibility that the clinical benefits of statin therapy might be caused partly by these NO-independent pathways; however, further extensive studies should be carried out to determine this hypothesis.

Although statins have the favorable effect of restoring blood flow in the ischemic limb of DM mice (16, 26), they prevented autoamputation of the ischemic limb of STZ-DM mice to some extent, but not completely. In turn, this result also suggests that the therapeutic effect of statins is due to improved endothelial function and is independent of the restoration of the impairment PDGF-BB expression, which was sufficient to prevent autoamputation due to limb ischemia in STZ-DM mice. Furthermore, the results of the combination therapy of statins and PDGF-BB supplementation confirmed that the favorable effect of statin therapy on the diabetic foot occurs by mechanisms other than the upregulation of PDGF-BB expression.

Some clinical trials have suggested that the vasculature effects of hydrophilic statins are similar in extent to those of lipophilic statins, but it is still controversial whether lipophilic or hydrophilic statins have more clinical benefits (23a, 25). An important advance of our current study was to determine that there are clearly differences between lipophilic and hydrophilic statins, although both types are beneficial to ischemic limbs under hyperglycemia. Limb survival was similar in mice receiving lipophilic and hydrophilic statins; however, eNOS expression was more upregulated by the administration of lipophilic statins than by that of hydrophilic statins (Fig. 3). Therefore, the present study indicates that clinically lipophilic statins may be more useful for ischemic diabetic foot.

In conclusion, we demonstrated that statin therapy restored the disturbed blood flow of severe limb ischemia under hyperglycemia by increasing eNOS/NO expression and not by increasing PDGF-BB expression and that the inhibition of NO reduced the ability of statins to prevent autoamputation due to limb ischemia in STZ-DM mice. Therefore, statin therapy is expected to be useful for preventing intractable diabetic foot disease in patients with diabetic angiopathy via eNOS/NO.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Chiie Arimatsu for assistance with the animal experiments.

GRANTS

This work was supported in part by a Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan grant-in-aid (to Y. Yonemitsu and K. Sueishi) and by the National Institute of Biomedical Innovation (Japan) Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences No. MF-21 (to Y. Yonemitsu and K. Sueishi).

REFERENCES

- Amano K, Matsubara H, Iba O, Okigaki M, Fujiyama S, Imada T, Kojima H, Nozawa Y, Kawashima S, Yokoyama M, Iwasaka T. Enhancement of ischemia-induced angiogenesis by eNOS overexpression. *Hypertension* 41: 156–162, 2003.
- Amos A, McCarty D, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2000. *Diabet Med* 14: S1–S85, 1997.
- Assmus B, Urbich C, Aicher A, Hofmann WK, Haendeler J, Rössig L, Spyridopoulos I, Zeiler AM, Dimmeler S. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res* 92: 1049–1055, 2003.
- Bailey CJ, Flatt PR, Atkins TW. Influence of genetic background and age on the expression of the obese hyperglycaemic syndrome in *Aston ob/ob* mice. *Int J Obes* 6: 11–21, 1982.
- Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, McAuley E, Archer DB. Constitutive nitric oxide synthase expression in retinal vascular endothelial cells is suppressed by high glucose and advanced glycation end products. *Diabetes* 47: 945–952, 1998.
- Costa J, Borges M, David C, Vaz Carneiro A. Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomized controlled trials. *BMJ* 332: 1115–1124, 2006.
- Danesh FR, Kanwar YS. Modulatory effects of HMG-CoA reductase inhibitors in diabetic microangiopathy. *FASEB J* 18: 805–815, 2004.
- Davignon J. Beneficial cardiovascular pleiotropic effects of statins. *Circulation* 109: II39–II43, 2004.
- Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rüthen H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiler AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108: 391–397, 2001.
- Feener EP, King GL. Vascular dysfunction in diabetes mellitus. *Lancet* 350: S19–S113, 1997.
- Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tani M, Nakano T, Egashira K, Takehara T, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. Nomenclature mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2483–2489, 2006.
- Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. VEGF function for upregulation of endogenous PIGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. *Atherosclerosis*. In press.
- Gaw A. A new reality: achieving cholesterol-lowering goals in clinical practice. *Atherosclerosis* 2: S5–S8, 2002.
- Guzik TJ, Mussa S, Gastaldi D, Sadowski J, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM. Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 105: 1656–1662, 2002.
- Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Forstermann U, Munnzel T. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 88: e14–e22, 2001.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 6: 1004–1010, 2000.
- Laufs U, Fata VL, Plutsky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129–1135, 1998.
- Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, Nakagawa K, Hou X, Nagai Y, Hasegawa M, Sugimachi K, Sueishi K. Gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of VEGF165 but not of FGF-2. *Circ Res* 90: 966–973, 2002.
- Mason RP, Walter MF, Jacob RF. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on endothelial function: role of microdomains and oxidative stress. *Circulation* 109: II34–II41, 2004.
- Meigs JB, Singer DE, Sullivan LM, Dukas KA, D'Agostino RB, Nathan DM, Wagner EH, Kaplan SH, Greenfield S. Metabolic control and prevalent cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): The NIDDM Patient Outcome Research Team. *Am J Med* 102: 38–47, 1997.
- Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101: 2567–2578, 1998.
- Ni W, Egashira K, Kataoka C, Kitamoto S, Koyanagi M, Inoue S, Takeshita A. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic actions of HMG-CoA reductase inhibitors in a rat model of chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Circ Res* 89: 415–421, 2001.
- Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani M, Nakagawa K, Masaki I, Okano S, Ishibashi H, Shirasuna K, Hasegawa M, Sueishi K. FGF-2 gene transfer can stimulate HGF expression, irrespective of hypoxia-mediated down regulation in ischemic limbs. *Circ Res* 91: 723–730, 2002.

- 23a Pitt B, Mancini GB, Ellis SG, Rosman HS, Park JS, McGovern ME. Pravastatin limitation of atherosclerosis in the coronary arteries (PLAC I): reduction in atherosclerosis progression and clinical events. PLAC I investigation. *J Am Coll Cardiol* 26: 1133-1139, 1995.
24. Rikitake Y, Liao JK. Rho GTPases, statins, and nitric oxide. *Circ Res* 97: 1232-1235, 2005.
25. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med* 335: 1001-1009, 1996.
26. Sata M, Nishimatsu H, Suzuki E, Sugiura S, Yoshizumi M, Ouchi Y, Hirata Y, Nagai R. Endothelial nitric oxide synthase is essential for the HMG-CoA reductase inhibitor cerivastatin to promote collateral growth in response to ischemia. *FASEB J* 15: 2530-2532, 2001.
27. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? *Circulation* 109: 1118-1126, 2004.
29. Sparrow CP, Burton CA, Hernandez M, Mundt S, Hassing H, Patel S, Rosa R, Hermanowski-Vosatka A, Wang PR, Zhang D, Peterson L, Detmers PA, Chao YS, Wright SD. Simvastatin has anti-inflammatory and antiatherosclerotic activities independent of plasma cholesterol lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 115-121, 2001.
30. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. *Diabetologia* 47: 1727-1734, 2004.
31. Stein E. The lower the better? Reviewing the evidence for more aggressive cholesterol reduction and goal attainment. *Atherosclerosis* 2: S19-S23, 2002.
32. Tani M, Yonemitsu Y, Fujii T, Shikada Y, Kohne R, Onimaru M, Okano S, Inoue M, Hasegawa M, Onohara T, Maehara Y, Sueishi K. Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the platelet-derived growth factor-BB/protein kinase C axis but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circ Res* 98: 55-62, 2006.
33. Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tani M, Okano S, Hasegawa M, Maehara Y, Hashizume M, Sueishi K. Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res* 94: 1186-1194, 2004.
34. Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 729-736, 2003.



重症虚血肢に対する 血管新生治療の役割

Role of therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia : current status and future directions

米満 吉和^{*1, *2} Yoshikazu Yonemitsu ・ 吉田 久美^{*3} Kumi Yoshida
 伊東 啓行^{*4} Hiroyuki Ito ・ 井口 博之^{*5} Hiroyuki Inoguchi
 福永 亮大^{*5} Ryota Fukunaga ・ 前原 喜彦^{*6} Yoshihiko Machara

千葉大学大学院医学研究院遺伝子治療学客員教授^{*1}
 九州大学大学院医学研究院遺伝子治療臨床研究準備室^{*2}/特任教授^{*2}
 九州大学大学院医学研究院臨床医学部門消化器・総合外科学(第2外科)^{*3}/講師^{*4}/教授^{*5}

Summary

近年、末梢動脈閉塞性疾患に対する蛋白や遺伝子を用いた血管新生療法が注目され、国内外で臨床的評価が行われている。しかし、初期において有望な成績が示唆されていたにもかかわらず、多施設二重盲検試験の多くが失敗に終わっている。一方で、骨髄や末梢血単核球を用いた細胞治療の研究は、その手軽さからわが国を中心に多くの施設で進められているものの、その臨床的評価は定まっていない。ところが、不適切な適応評価により本来標準的治療で救済できるにもかかわらず、血管新生療法を先行した結果肢切断に至ったのではないかと考えられる症例も目立ってきた。

本稿では、特に血管新生治療の臨床試験の問題点を明確にし、われわれが進めている臨床研究の位置付けを概括する。

Key words

- 重症虚血肢
- 血管新生療法
- センダイウイルスベクター
- FGF-2

1 疾患の背景および現行の 治療的血管新生療法の問題点

1. 疾患の特性

閉塞性動脈硬化症やBuerger病に代表される末梢動脈閉塞性疾患(peripheral arterial disease ; PAD)は、軽度な場合は冷感やしびれ感(Fontaine分類I度)を、症状が進行するにつれ間歇性跛行(intermittent claudication ; IC) (Fontaine分類II度)、さらには安静時疼痛(Fontaine分類III度)、潰瘍形成(Fontaine分類IV度)を呈するようになる。ICに対しては、生活の質(quality of life ; QOL)を著しく損なわない初期段階では保存的な薬物療法(シロスタゾールなど)や運動療法など、すでにエビデンスが蓄積された治療法が第一選択として行われる。さらにICが進行し、患者が歩行距離の短縮によりQOLの低下を相当なレベルで感じる場合(一般に200m以下)には、血管内治療あるいは外科手術の適応となる。一方で、進行症例(重症虚血肢(critical limb ischemia ; CLI) (Fontaine分類IIIおよびIV度)ではリスクファクターの除去や現行の薬物療法、外科的療法に反応せず、下肢切断を余儀なくされる場合が多い。下肢切断は患者のQOLを著しく低下させる

ばかりでなく生命予後にも大きく関わり、下肢切断を行った患者の2年生存率は50%以下、特に透析患者では5年生存率が10%を下回ることが報告されている。したがって、これら重症のCLIに対し、下肢切断を回避(limb salvage)する治療法の確立が望まれている。

以上、PADのなかでも積極的治療の対象となる病態は進行したICとCLIであることを述べたが、この両者は血行動態に基づく病態は全く異なっている。両者は「虚血性疾患」としてよく混同されることがあるが、ICはあくまで相対的虚血であり、安静時には血流低下は存在するものの組織虚血ではない(虚血性の生体反応はみられない)。言い換えれば、労作時に血液需要量が増加した場合に初めて組織虚血が誘発され、それが痛みとなって発現するのである。一方で、CLIは絶対的虚血であり、安静時にも痛みを含む慢性的な虚血性反応が認められ、これらがICとCLIの治療効果に対する臨床的評価を複雑なものにしている(図1)。

2. 血管新生療法との臨床的評価の現状と問題点

疾患の病態が虚血による組織障害である以上、治療の目指すところは虚血組織局所に有効な血流回復を誘導し、虚血状態を改善することにある。そのための治療戦略の1つとして、血管新生活性を有する細胞増殖因子を外来性に投与し、積極的に血管新生を誘導することで血流回復、虚血改善を目指す「治療的血管新生療法」の確立への模索が開始され、開始からすでに約10年が経過しようとしている。

TransAtrantc Inter-Society Consensus(TASC)より発行されている「Management of Peripheral Arterial Disease(PAD): TransAtrantc Inter-Society Consensus

(TASC)、邦訳:「下肢閉塞性動脈硬化症の診断・治療指針(日本脈管学会 編)」によれば、特にCLIに対する有効性に関するエビデンスの確立した薬物療法はなく、また手術適応が限定されているため、治療的血管新生療法には多くの期待が寄せられている。治療的血管新生療法への初期の試みは血管新生因子蛋白を用いたものであり、その数年後より血管新生因子を用いた遺伝子治療が開始され、そして最近では骨髄単核球細胞や血管前駆細胞を比較的多く含むと考えられているCD34陽性細胞などによる細胞療法も試みられている。特に、血管新生因子蛋白療法については虚血性心疾患を含めすでに第Ⅱ～Ⅲ相試験の成績が公表されているが、初期試験では「安全かつ有効」とされてきた試験プロトコルが、後期相試験ではすべて「無効」と判定されている。遺伝子治療も同様で、初期にはすべてのものが「安全かつ有効」とされてきたにもかかわらず、すでに血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)₁₂₁やDel-1を用いた第Ⅱ相試験では「無効」と判定されている。

このような初期試験と後期試験の成績の違いの原因としていくつかの要因が考えられる。具体的には、

- ①対象となる病態の選択(ICかCLIか)。
- ②本疾患に特有の高いプラセボ効果。
- ③前治療や禁煙などの生活指導・歩行訓練などの有無。
- ④副次評価項目(surrogate markers)測定的不安定性。
- ⑤特にCLIについて、現行の主要評価項目の妥当性、など多くの因子が関与している。

| IC | CLI |
|--|--|
| 病態メカニズム: 労作誘発性の虚血 | 病態メカニズム: 安静時持続性の虚血 |
| 現行の標準治療: 1. リスクファクターの除去 —禁煙、スタチンなどの薬剤 2. 運動療法 3. 血行再建(バイパス術、血管形成術) —最も有効性が高い 4. シロスタゾール(プレタール)投与 —ICにおいてエビデンスレベルA | 現行の標準治療: 1. 血行再建(バイパス術、血管形成術) —最も有効性が高い 2. 切断術 —姑息的、全身合併症の予防 ・有効性を示す薬剤なし ・QOL低下、高い心血管系イベント発生率、 高い死亡率(悪性腫瘍と同等) |

図1
PADに対する現行の標準的治療

(1)対象となる病態の選択(ICかCLIか)

すでに多くのエビデンスが蓄積されているように、ICに対しての運動療法は有効であり、指導下で実施された運動療法により跛行誘発歩行距離・歩行可能距離は2倍以上になる。これは運動療法による運動耐容能と側副血行路の増加によるものと考えられている。前述のごとくICの病態は相対的虚血であるため、理論的に考えて通常虚血状態ではない下肢に対して血管新生療法により血管数を増やすことが可能であったとしても、増加した血管が機能的にも維持されるか否かについては疑問が残る。また、新しく血管が再生されたとして、そちらにドミナントに血流が流れてしまい、本来必要とされる部分の血流がスチールされる可能性も否定できない。前述したいわゆるnegative trialでは、対象がすべてIC患者であることから、この考察は妥当性があるかもしれない。

一方、CLIでは絶対的に血流が不足している状態であるため、わずかに血管が再生したとすると、その結果が直接的に治療効果として結びつきやすいのではないかと理論的に考えられる。CLIに関して第II相試験結果が報告されているのは、Sanofi-Aventis社による欧州でのNV1FGF(ヒト線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor; FGF)-1を発現するプラスミドベクター)による遺伝子治療、ならびにAnGes MG社による米国でのTREAT-HGF(ヒト肝細胞増殖因子(hepatocyte growth factor; HGF)を発現するプラスミドベクター)による遺伝子治療の2件である。前者では、CLIの客観的臨床評価に最も重要な下肢切断率の低下が得られており、後者では下肢切断率、潰瘍治癒率などは有意でないものの、皮膚血行動態を示すsurrogate markerの1つである経皮酸素分圧(transcutaneous oxygen pressure; TcPO₂)で用量依存性の改善が得られている。これらの第II相試験結果から予測しても、血管新生療法の効能を評価する対象という観点からは、CLIのほうがより適していると考えられる。

最近日本で実施されたTREAT-HGFの第III相試験では、安静時疼痛あるいは潰瘍の改善率(潰瘍面積の25%以上の縮小を改善の基準とする)において有意にプラセボ群を上回り、有効と判定されたことが発表され

た(<http://www.anges-mg.com/news/pdf/070614.pdf>)。これは、血管新生療法のPOC(proof of concept)が証明された最初の例として重要であるが、米国では完全治癒をもって有効と判断するため、米国の治験における成績が待たれるところである。

(2)本疾患に特有の高いプラセボ効果

PADに対する薬剤の有効性判定で最も困難を伴うのは、いかにしてプラセボ効果を凌駕するかという問題である。たとえば、前述のDel-1による遺伝子治療でも、プラセボ群が歩行距離などの指標で35%程度の改善を示しており、被験者はこれを超えることができていない。本疾患の臨床試験にはプラセボ効果がつきものである以上、これを超える効果を示す薬剤・治療法の開発が必要である。

(3)前治療や禁煙などの生活指導・歩行訓練などの有無

PADの日常診療を行っている血管外科医はよく経験するが、慢性のFontaine分類IV度の患者の潰瘍は、禁煙などを含むリスクファクターの除去と入院・生活指導、投薬、そして運動療法などによりある程度改善することが知られており、特にこの傾向は若年者のBuerger病に強い。これは、血管外科医からの血管新生療法への批判として、「distal bypassを含めて、これら前治療がしっかりと行われたうえで難治性となっているCLIでも同様の効果が出ているならば認められるが、バージケースで効果があったといわれても、一体血管新生療法の結果なのか、入院やそれによる禁煙の効果なのか判定できない」と述べられるゆえんである。したがって、臨床的有効性の評価を行うという観点からは、しっかりとしたプラセボ群を設定し、これらの前治療に配慮した試験デザインを採用する必要がある。

(4)副次評価項目(surrogate markers)測定の不安定性と問題点

ICの基本病態(相対的虚血かつ生存率)から判断し、現在のICに対する主要エンドポイントは跛行出現距離と最大歩行時間・距離であり、これはQOLの維持・向上を最大の目的としたものである。この測定法はすでに十分に確立されており、かつ試験担当施設間でほぼばらつきも少ないため、ICの臨床試験は比較的实施しやすい。

一方CLIの場合、基本的な臨床像が「死亡率・心血管系イベント発生率の増加、下肢切断」であることから、欧米での主要エンドポイントは「心血管系イベント発生率の低下、肢切断の回避状態での生存率+肢切断回避率(amputation-free survival)」が客観性・安定性の高いゴールドスタンダードである。しかし、これが血管新生療法によるベネフィットを検出できる感度をもつかどうかについては議論が残るところである(後述)。

以上の背景から、血管新生療法の基本コンセプトを間接的に示唆する副次エンドポイント(パラメータ)として、血行動態の変化に関するパラメータ(足関節上腕血圧比(ankle-brachial index; ABI), TcPO₂など)が使用されている。しかし、これらのパラメータの改善が治療によるベネフィットにつながるかどうかについては、現在でも否定的な見解が多数を占める。これは、たとえば抗悪性腫瘍薬の臨床評価と同等の問題をはらんでおり、「腫瘍が小さくなる」というパラメータが「生存率が延長する」というベネフィットに必ずしも寄与しないのと同様に、「多少の血行の改善」が「心血管系イベント発生率の低下と肢切断率の低下」に必ずしも寄与しないのは明らかである。

また、血行動態パラメータは施設間におけるデータのばらつきが大きいことも重大な問題である。NVIIGFの第Ⅰ相試験ではABIの有意な上昇が観察されていたが、第Ⅱ相試験ではプラセボ群と有意差が得られなかったことなどがその代表的な例である。一方で、大阪大学で実施されたTREAT-HGFの成績ではTcPO₂の変動が大きく一定の傾向はみられなかったにもかかわらず、米国での第Ⅱ相試験では30mmHgという基準値を超える症例数が用量依存性に得られていることから考察しても、これら血行動態検査に十分な経験をもつ施設を集めて試験を行うことの重要性が示唆される。

(5)特にCLIについて、現行の主要評価項目の妥当性

前述したように、CLIに関する欧米での主要エンドポイントは「心血管系イベント発生率の低下、肢切断の回避状態での生存率+肢切断回避率(amputation-free survival)」が客観性・安定性の高いゴールドスタンダードである。しかし、これが血管新生療法による

ベネフィットを検出できる感度をもつかどうかについては議論が残るところである。

これまでの薬剤の試験では、CLIに対する試験はすべて失敗に終わっている。しかし現行の血行再建に関しても、成功事例では有効であることは間違いないが失敗例における肢切断率は60%を超えるため、その適応には厳密である必要がある。その意味からも血管新生療法の要求性は高いため、今後の進展が望まれる。

3. 血管新生療法における症例選択と適応の問題点

近年、特に骨髄や末梢血由来の単核球・幹細胞による血管新生療法の普及に伴い、多くの施設が血管新生療法を試みるようになってきた。しかし、この方法はあくまでも評価が定まっていない方法であることを認識し、既存の標準的治療により得られる患者のベネフィットを阻害しないように注意するべきであるが、最近の学会での発表ではこれらに配慮がなされていない場合が少なくない。つまり、この分野へ参入する医師は、その適応を明確にする努力を怠ってはならない。

まずわれわれの経験によると、Buerger病(閉塞性血栓性血管炎(thromboangiitis obliterans; TAO))については無治療症例が血管新生療法の適応になる場合はない。これは入院・生活管理、禁煙、集中的な薬剤投与などにより、多くの症例で改善あるいは完全寛解に至ることが多いためである。通常では、これのみでも以後外来にてFontaine分類Ⅱa度(間歇性跛行は存在するが、歩行可能距離200m以上)で中壮年期をまっとうする症例が少なくなく、この場合外科治療や血管内治療を含む積極的な治療の必要性は乏しい。無論、これらの既存の治療を実施しても抵抗性の場合は、血管新生療法を考慮することになる。

閉塞性動脈硬化症(arteriosclerosis obliterans; ASO)の場合については、現時点における血管新生治療を考慮すべきタイミングを表1にまとめた。現時点では血管新生療法の安全性はほぼ確立された段階であるが、その効果については十分なエビデンスは蓄積されていないため、血行再建術(バイパス術、血管内治療)において十分に期待される患者のベネフィットを阻害しない治療計画を立てる必要がある。一方、膝窩部以下への血行再建については、その治療成績は施設間の格差

表1 現時点における血管新生療法を考慮すべきタイミング

| |
|--|
| 1. Fontaine分類I度, IIa度(最大歩行距離200m以上)には適応なし。 原則薬物療法, 運動療法のみ。 |
| 2. Fontaine分類IIb度(IC:最大歩行距離200m未満)の場合 |
| a) 遠隔期成績が良好な定型的血行再建術が可能な場合, 患者の希望に応じて原則血行再建術の適応。 |
| b) 血行再建術は可能であるが, 良好な遠隔期成績が期待できない場合(例: distal bypass, 非解剖学的バイパス, 末梢動脈血管内治療など), 十分な経験をもつ末梢血管外科専門医へコンサルト。場合によっては血管新生療法を検討。 |
| c) 末梢血管外科専門医が血行再建不能と判断した場合, 血管新生療法の適応。 |
| 3. Fontaine分類III, IV度(CLI:安静時疼痛, 潰瘍, 壊疽症例)の場合 |
| a) Limb salvageのための血行再建術の絶対適応(あらゆる種類の血行再建術を考慮)。 血行再建の可否については, 十分な経験をもつ末梢血管外科専門医へコンサルトが必要。 |
| b) 十分な経験をもつ末梢血管外科専門医が血行再建不能と判断した場合, 血管新生療法の適応。 |

が大きいこと, またその遠隔期成績について症例の蓄積が十分とはいえないことを考慮し, それぞれの施設における判断に委ねざるをえない。ただし, この場合も少なくとも血管外科専門医へのコンサルトをないがしろにすれば患者の得るベネフィットを阻害する危険性があるため, 注意が必要である。

2 ヒトFGF-2遺伝子発現非伝搬型組換えセンダイウイルスベクターによる遺伝子治療臨床研究

1. 本臨床研究に至る経緯

前述のような研究の歴史は, 虚血性疾患に対する血管新生療法の確立の困難さを示している。しかしながら, われわれは戦略の限界を示唆するものであるとは考えていない。特に蛋白療法, 遺伝子治療の場合, 外来性に投与される細胞増殖因子はもともと内因性に存在するものがほとんどで, 元来半減期が短い血管新生因子について焼け石に水程度の外来性因子を投与しても, 有効性につながりにくいことは容易に想像がつく。つまり, 内因性レベルと比較した外来性因子投与の有効性の決定はきわめて大切な検討項目であるにもかかわらず, 現行の治療的血管新生療法においてその基礎データを踏まえて行われているものはほとんどない。さらに, 用いる治療因子の科学的必然性にも乏しい。したがって, 治療的血管新生療法の確立を目指した研究はいまだ発展途上である。その戦略の妥当性は多くの動物実験において世界中が確認している以上, 今後

有効性を示すレベルに至る可能性を十分に秘めていると考える。

以上の背景のもと, われわれは圧倒的な治療効果を示す血管新生療法の確立を目指し, 独自に開発を進めている非伝搬型組換えセンダイウイルスベクター(rSeV/dF)による遺伝子治療臨床研究を立案, 治療遺伝子としてヒト塩基性線維芽細胞増殖因子(human basic fibroblast growth factor-2; hFGF-2)との組合せ(rSeV/dF-hFGF2)が既存法と比較して最も高い治療効果を示すことを明らかにし, 施設倫理委員会の承認後, 厚生科学審議会へ実施申請書を提出した。rSeV/dF-hFGF2の優れた治療効果とその分子メカニズムに関する基礎研究の成果は別項に譲るが¹⁰⁾, 合計4年半の経過を経て, 本臨床研究のプロトコルが正式に大臣承認を得た(2006年1月31日付)。

2. 本臨床研究の内容

本臨床研究は, 世界初の遺伝子治療ベクターを用いた臨床研究であることを鑑み, 抗癌薬と同様のオープンラベル, 4段階の用量漸増第I・IIa相試験として計画されている(図2)。動物実験の結果から推測して, 最低用量はプラスミドレベルの発現と同等と考えられ, 高用量ではrSeV/dFの最大のパフォーマンスが発揮できると期待される。将来的に製剤開発を前提にしていることから, 本臨床研究は外部医薬品開発業務受託機関(contract research organization; CRO)のデータマネジメントによる新しい医薬品の臨床試験の実施の基準(good clinical practice; GCP)準拠試験とし

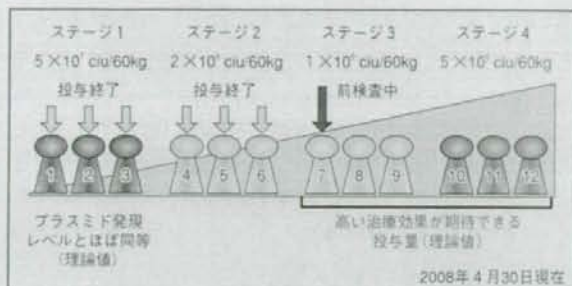


図2

九州大学病院にて実施されているヒトFGF-2遺伝子を発現する組換えセンダイウイルスベクター(rSeV/dF-hFGF2, 開発コードDVC1-0101)による第I・IIa相遺伝子治療臨床研究のデザイン(SeVAT trial)

世界で初めて使用されるウイルスベクターであることを考慮し、理論的到達投与量の100分の1より、4段階でdose upするオープンラベル方式で実施されている。

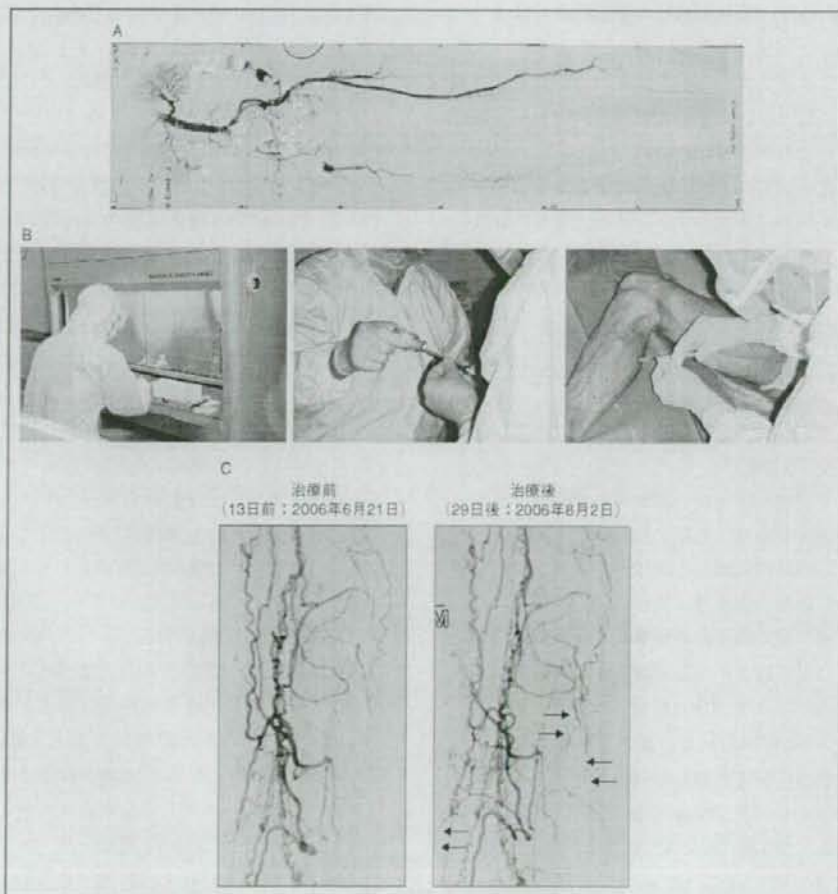


図3 投与第1例目(症例登録番号102)

A: IA-DISA所見(治療前)

B: バクテリア投与当日のバクテリア調整風景(左)、投与準備(中)、投与風景(右)

C: 治療前後(左: 治療前, 右: 治療後1ヶ月)における血管造影所見。治療前には造影されなかった側副血行路が観察される(矢印)

表2 九州大学病院におけるヒトFGF-2遺伝子を発現する相換えセンダイウイルスベクター(rSeV/dF-hFGF2, 開発コードDVC1-0101)による第I・IIa相遺伝子治療臨床研究の進行状況(2008年4月23日現在)

| ステージ1 | 登録日 | 投与日 | 状況 | 経過・転帰 |
|-------|-------------|--|--|------------------|
| 症例101 | 2006年4月21日 | アルコール性軽度肝障害のフォローアップ後、症例102として再登録 | | |
| 症例102 | 2006年6月11日 | 2006年7月4日 | 観察期間終了(6ヵ月) | 生存・19ヵ月経過・改善維持 |
| 症例103 | 2006年12月13日 | 2007年1月9日 | 観察期間終了(6ヵ月) | 生存(15日目に治療肢下腿切断) |
| 症例104 | 2007年1月24日 | | 症例103の有害事象のため一旦登録解除、以後症状悪化 6月13日某大学にて骨髄細胞移植治療を施行するも無効。7月3日下腿切断。 | |
| 症例105 | 2007年3月30日 | 2007年5月15日 | 観察期間終了(6ヵ月) | 生存(3ヵ月目に治療肢下腿切断) |
| ステージ2 | 登録日 | 投与日 | 状況 | 経過・転帰 |
| 症例201 | 2007年10月22日 | 2006年11月6日 | 5ヵ月経過 | 生存・改善維持 |
| 症例202 | 2007年11月12日 | 12月4日に投与を予定するも、PET、CTにて腫瘍が検出され、不適格症例として登録解除。 | | |
| 症例203 | 2007年11月26日 | 2008年1月22日 | 2ヵ月経過 | 生存 |
| 症例204 | 2008年2月8日 | 2008年3月11日 | 1ヵ月経過 | 生存 |

て実施されており、第三者委員会による厳密な適応決定を実施していることから、複数回の血行再建術の結果、ほかに治療法がない症例が選択される傾向にある。被験者の正式なリクルートは2006年4月より開始されている。

3. 症例提示

CROによりデータ仮固定が終了した第1例目の症例を提示する(観察期間6ヵ月)。

症例(登録番号102)は59歳男性で、右のCLIであり安静時疼痛が存在するが、虚血性潰瘍なし。3度のバイパス手術が実施されているがいずれも閉塞しており、遺伝子治療の適応評価のため紹介となった。血管造影上、右総腸骨動脈高位より腸骨-大腿動脈全長が閉塞し、右下肢の血流は腰動脈からの側副血行路により唯一開存する深大動脈を経由して下肢を栄養。右膝窩動脈も閉塞しており、側副血行路により右腓骨動脈の末梢2分の1のみに開存が認められる(図3A)。血管造影上はさらなる血行再建も不可能ではないと考えられたが、4度目の閉塞の可能性が高く、バイパス閉塞時には下腿切断に至る可能性も高いため、遺伝子治療の適応とされ、2006年7月4日に投与が実施された(図3B)。

投与後の経過は順調であり、重篤な有害事象の発生は認めていない。観察期間終了時(投与後6ヵ月)のデータでは、最大歩行距離は約2倍へ改善し、血管造影上新たに描出される血管を認めている(図3C)。

本臨床研究はすでに6例への投与を完了し、ステージ2への投与を終了した。これまでステージ1において1例で大切断(下腿部)、さらに1例で趾切断(第3-5趾)に至り、厚生科学審議会へ報告がなされている(表2)。死亡例はなく、またベクター投与に直接起因すると考えられる有害事象は認められず、2008年4月25日に開催された院内の第三者委員会(先進医療適応評価委員会;ステージアップ判定委員会)において、ステージ3へのdose upが正式に承認された(図2)。本臨床研究の経過については、随時専用ホームページに掲載し、情報公開に努めている(<http://www.gt.med.kyushu-u.ac.jp/>)。

本臨床研究では定型的血行再建不能である重症例が適応となっているため、被験者のリクルートが容易でなかったが、最近紹介数が急増している。増量したステージ2より2例で治療前に平坦であった趾尖脈波が検出され、同時に趾尖部の動脈圧計測も可能になるなどの所見が得られている。また、5ヵ月を経過した症例では、治療前には70m程度であった歩行距離もト

レッドミルを完遂することが可能になるなど、改善を示唆するデータを得つつある。今後も慎重に症例を重ねていく予定である。

おわりに

初期にセンセーショナルに宣伝された血管新生療法は、臨床評価を受けることによりその問題点も明らかになってきた。しかしそれは、ようやく地に足を付けた評価が始まったということであり、今後次第にその効果と限界、そして明確な適応が明らかになってくるものと考えられる。

特にCLIは、血行再建不能例に関しては悪性腫瘍と同等な死亡率を示すことから、米国では「unmet medical needs」として捉えられている。その意味からも血管新生療法への期待は大きい。蛋白、遺伝子治療だけでなく細胞移植療法も、この観点から厳密なプラセボ対照試験を行い、臨床現場での意味付けを明確にすることによって、初めてその真価が明らかになるであろう。

最近TASC IIが発表されたが、今後の改訂において、血管新生療法がエビデンスレベルAのfirst line治療として認知される日がくるのはそう遠くないかもしれない。

文献

- 1) Yonemitsu Y, Kitson C, Ferrari S, et al: Efficient gene transfer to the airway epithelium using recombinant Sendai virus. *Nat Biotechnol* **18**: 970-973, 2000
- 2) Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, et al: Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia

Acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res* **90**: 966-973, 2002

- 3) Onimaru M, Yonemitsu Y, Tani M, et al: Fibroblast growth factor-2 gene transfer can stimulate hepatocyte growth factor expression irrespective of hypoxia-mediated downregulation in ischemic limbs. *Circ Res* **91**: 923-930, 2002
- 4) Shoji T, Yonemitsu Y, Komori K, et al: Intramuscular gene transfer of FGF-2 attenuates regenerative endothelial dysfunction and inhibits neointimal hyperplasia of autologous femoral vein grafts in poor runoff limbs of rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**: H173-H182, 2003
- 5) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada N, et al: Essential role of PDGFR α /p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo: role of PDGFR α /p70S6K during angiogenesis. *Circ Res* **94**: 1186-1191, 2004
- 6) Tani M, Yonemitsu Y, Shikada Y, et al: Diabetic microangiopathy in ischemic limb is a disease of disturbance of the PDGF-BB/PKC axis, but not of impaired expression of angiogenic factors. *Circ Res* **98**: 55-62, 2006
- 7) Kaneko K, Yonemitsu Y, Fujii T, et al: A free radical scavenger but not FGF-2-mediated angiogenic therapy rescues myonephropathic metabolic syndrome in severe hind limb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**: H1484-H1492, 2006
- 8) Fujii T, Yonemitsu Y, Tani M, et al: Non-endothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**: 2483-2489, 2006
- 9) 米満吉和: 血管新生因子: bFGF/FGF-2塩基性線維芽細胞増殖因子 脈管学 **46**: 297-304, 2006
- 10) 藤井孝明, 米満吉和: bFGF/FGF-2による血管新生因子の階層的発現制御機構. *Angiol Front* **5**: 19-24, 2006