

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)<sub>121</sub>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)測定の不安定性、
- 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
<p>病態メカニズム: 労作誘発性の虚血</p> <p>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</p>	<p>病態メカニズム: 安静時持続性の虚血</p> <p>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)</p>

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に対する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; TcPO<sub>2</sub>)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、米国では完全治療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-H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、被験薬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、バージン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の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)、 $TcPO_2$ 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。NV1PGF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 $TcPO_2$ 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が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(thromboangitis 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期(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、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治療を検討。 c) 末梢血管外科専門医が血行再建不能と判断した場合, 血管新生治療の適応。
3. Fontaine分類Ⅲ, Ⅳ度(CLI:安静時疼痛, 潰瘍, 壊疽奇例)の場合 a) Limb salvageのため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, 血管新生治療の適応。

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, 元素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能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の優れた治療効能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<sup>10)</sup>, 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段階の用量漸増式第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

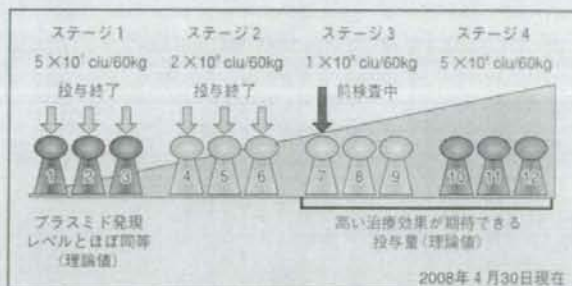


図2  
 九州大学病院にて実施されているヒトFGF-2遺伝子を発現する組換えセンダイウイルスベクター(rSeV/dF-hFGF2, 開発コードDVC1-0101)による第I・IIa相遺伝子治療臨床研究のデザイン(SeVAT trial)  
 世界で初めて使用されるウイルスベクターであることを考慮し、理論的至適投与量の100分の1より、4段階でdose upするオープンラベル方式で実施されている。

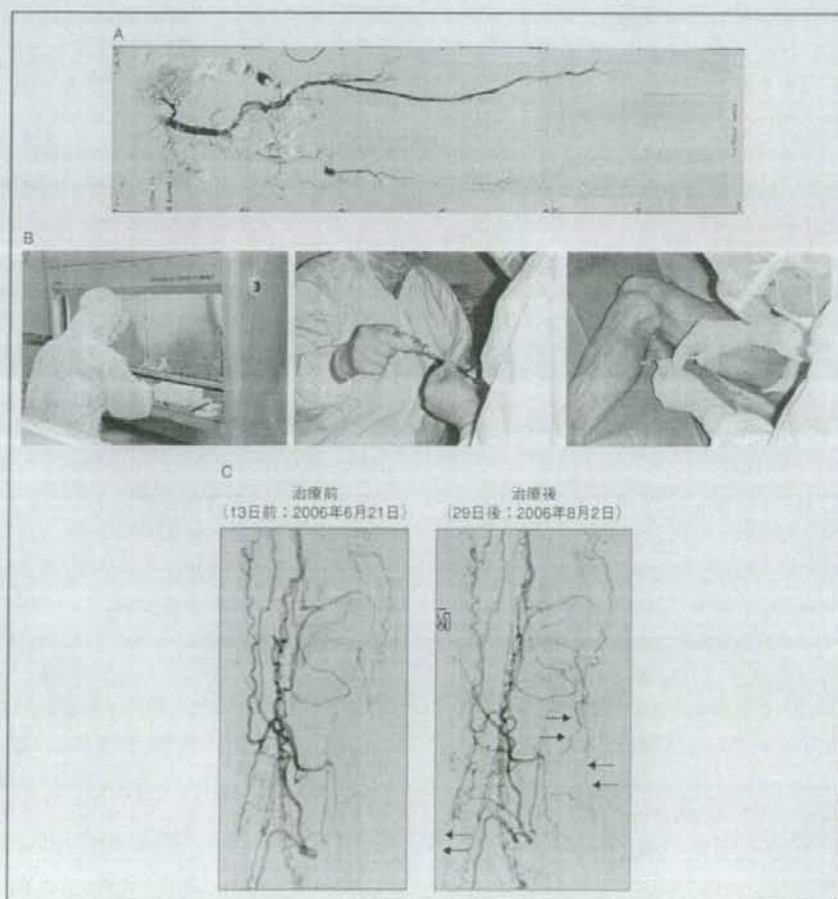


図3 投与第1例目(症例登録番号102)  
 A: 1A-DSA所見(治療前)。  
 B: ベクター投与当日のベクター調整風景(左)、投与準備(中)、投与風景(右)。  
 C: 治療前後(左: 治療前、右: 治療後1ヵ月)における血管造影所見。治療前には造影されなかった側副血行路が観察される(矢印)。

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1・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ヵ月目に治療肢趾切断)

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にて肺癌が検出され、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肢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動脈波が検出され、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ブラボ対照試験を行い、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) Musaki 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**: H1173-H1182, 2003
- 5) Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada N, et al: Essential role of PDGFR  $\alpha$ /p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo; role of PDGFR  $\alpha$ /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