

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

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

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

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

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

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

Table 3 血管新生療法としてたん白質を用いた臨床試験

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

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

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

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

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

6. 遺伝子治療を用いた血管新生療法の現状

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

7. 遺伝子治療を用いた臨床研究

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

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

Table 4 血管新生療法として遺伝子治療を用いた臨床試験

増殖因子	試験の種類	試験のタイプ	N	デリバリー	結果	文献
VEGF	単独療法	フェーズI	5	プラスミド (VEGF ₁₆₅), IM	安全, 心筋灌流の改善	116
	単独療法	フェーズI	20	プラスミド (VEGF ₁₆₅), IM	安全, 症状の改善	117
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズI	13	プラスミド (VEGF ₁₆₅), IM	安全, 心筋灌流の改善	118
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズII, DBR,	80	プラスミド (VEGF ₁₆₅), IM	局所壁運動の改善	125
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズI	6	プラスミド (VEGF-2), IM	安全, 実行可能	119
	単独療法 NOVA ガイド	フェーズI/II, DBR, 投与量 決定, プラセボコントロール	29	プラスミド (VEGF-2), IM	安全, 狭心症のクラススの低下	120, 121
	CAGB 補助療法/単独療法	フェーズI	21	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁), IM	耐性	122
	単独療法	フェーズI	67	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁), IM	EIT, CCS 狭心症基準の改善	123
	血管形成術およびステント 挿入 KAT 試験に付随 して実施	フェーズII, DBR	103	アデノウイルス (VEGF ₁₂₁) ある いはプラスミドドリポソーム (VEGF ₁₆₅), 局所 IC	安全, 臨床的再狭窄率に おける違い無し, Ad-VEGF グループにおける心筋灌流の改善	124
	単独療法 AGENT 1 および2試験	フェーズI DBR, 漸増用量, プラセボコントロール	131	アデノウイルス (FGF-4), IC	安全, 副作用無し, EIT, 灌流改善の 傾向	127, 128
HGF	単独療法	フェーズI, OL (末梢動脈障害)	6	プラスミド, IM	安全, 虚血性潰瘍の縮小, 安静時疼痛 の減少, ABPI の改善	129

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

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

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

以上に述べた試験の中には VEGF₁₂₁ 及び VE-

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

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

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

8. 細胞治療を用いた血管新生療法の概要

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

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

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

9. 細胞治療を用いた臨床研究

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

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

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

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

Table 5 血管新生療法として細胞を用いた臨床試験

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

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

球、B細胞及び造血前駆細胞のサブポピュレーションの割合と一致した。

他の研究においては、急性心筋梗塞5~29日後、冠動脈ステントの留置部位にBM-MNC ($78 \pm 41 \times 10^6$ 個/患者)が冠動脈内投与された。BM-MNCは平均してCD34⁺~0.6%、CD117⁺~1.7%、CD133⁺~0.6%の細胞から構成されていた。6箇月後、処置を受けた20人の患者を磁気共鳴により評価すると、非無作為コントロールグループと比較して局所及び広範囲において左心室機能の有意な改善がみられた¹⁴⁰⁾。

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

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

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

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

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

10. 血管新生療法の問題点と今後の展望

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

10.1 現在の評価項目を再検討する必要がある

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

10.2 従来検討されていなかった血管新生促進因子を用いる

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

10.3 複数の血管新生促進因子を用いる

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

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

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

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

10.4 他の増殖因子をアップレギュレートする因子を用いる

最近、*in vivo*においてアデノウイルスベクター

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

10.5 共通の経路を標的とする

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

10.6 持続的なデリバリーが可能な方法を用いてたん白質を投与する

血管新生療法を効果的に行うには、デリバリーの

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10.8 増殖因子によりプライミングを行った幹細胞を用いる

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

10.9 移植効率を促進させる遺伝子を導入した幹細胞を用いる

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

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

10.10 内在性前駆細胞を強制動員する

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

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

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

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

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

10.11 生体に備わっている抗血管新生機構を 阻害する

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

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

10.12 遺伝子治療において遺伝子をどこに デリバリーするか

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

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

10.13 遺伝子治療においてどのような遺伝子 導入ベクターを選択するか

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

導入効率が顕著に改善できるという報告もある²¹⁶⁾。

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

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

10.14 遺伝子治療において治療薬をどれだけ

デリバリーするか

たん白質治療薬と同様に遺伝子治療のアプローチ

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

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

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

では筋肉の炎症性細胞及び障害筋細胞が自ら増殖因子を供給するようになる。その注射針の瘻痕の大きさはマウスでは左心室筋肉の1/8であるが、ヒトでは左心室筋肉のわずか1/200にしかすぎない。

10.15 血管新生増殖因子たん白質を用いた治療におけるリスクと何か

VEGFによる透過性の増加のような特異的な有害作用と、腫瘍の成長、糖尿病性網膜症の悪化、アテローム性動脈硬化のような血管新生に直接関連した有害作用は区別できる²²⁰⁾。VEGFの血管透過性を促進する活性は、ヒスタミンに比べて50000倍以上高い。他の可能性も除外できないが、この効果は内皮開窓の誘導によると考えられる¹⁶⁹⁾。

腫瘍成長と糖尿病性網膜症は血管新生と血管新生促進因子により起こることが多くの研究で示されている^{221),222)}。しかし、投与した増殖因子により腫瘍成長及び網膜症の悪化が実際に促進されるという知見はほとんどない。顕性腫瘍及び糖尿病性網膜症の患者は臨床試験において除外されており、また血管新生促進因子のたん白質あるいは遺伝子治療を現在受けている1000人以上の患者において、この二つの疾患の合併症の患者は見つかっていない。一方、VEGFの動脈硬化促進作用がアテローム性動脈硬化の前臨床モデルで試験されている。VEGFを投与するとプラークの形成が促進されるが²²³⁾、flt-1をブロックすると動脈硬化の形成が低下する⁵²⁾。これと一致して、TNP40あるいはエンドスタチンのような一般的な血管新生阻害剤により実験的アテローム性動脈硬化症が低下する²²⁴⁾。しかし、VEGF遺伝子治療の臨床試験ではVEGFの動脈硬化の形成促進作用を裏づけることができなかった¹²⁴⁾。同様に、アテローム性動脈硬化症の大動物モデルでは、FGF-2を冠動脈ステント移植しても作用が示されなかった²²⁵⁾。このような統一的な見解が得られない状況においては、血管新生促進作用を有する増殖因子による動脈硬化促進作用と臨床との関連の有無については判断できない。したがって、将来の臨床試験ではアテローム性動脈硬化症の進行を第一に注意する必要がある。

10.16 遺伝子治療におけるリスクとは何か

遺伝子治療の有害作用はデリバリーのプロセス及びベクターあるいは遺伝子産物そのものにより起き得る。遺伝子治療の最終目標の一つは選択肢のない

患者に適した治療法を提供することである。遺伝子治療ベクターのデリバリーは可能な限り非侵襲的でリスクが低い必要がある。したがって、外科的アプローチ及び長期間にわたる灌流の繰り返しは心筋の血管新生において臨床上適切なデリバリー戦略とは言いがたい。ウイルス及び非ウイルスを用いた遺伝子デリバリーでは*in vivo*投与の場合有害効果が起き得る可能性はより高くなる。高投与量の裸のDNAは壊死と炎症を起こすとの報告がある²²⁶⁾。ほとんどのウイルスは免疫反応を惹起し、その結果として一過性の体温上昇から敗血症ショックまで一連の臨床症状が起きる。宿主染色体にベクターが組み込まれる場合はガン遺伝子の活性化、正常な遺伝子発現の妨害、宿主染色体の変異促進が起きる可能性がある¹¹²⁾。

特に小動物を用いた侵襲的なアプローチでは、処置そのものにより心臓における血管新生が大きく影響を受け、血管新生分子の特異的な有害作用が見かけ上観察されない可能性がある。したがって、小動物を用いた試験結果から血管新生分子の大動物及びヒトにおける有害作用を予測することは困難である。また、小動物を用いた研究ではその後のフォローアップの期間は非常に短い。血管新生遺伝子治療では導入組織における過剰血管成長、いわゆる血管腫あるいは糸球体硬化形成が懸念される²²⁷⁾。しかし、過剰に成長した血管は消滅し、正常な血管が再構築される²²⁸⁾。遺伝子治療により増殖因子を標的組織以外にも発現させた場合、他の組織に対して腫瘍の成長促進、網膜症、関節炎のような有害作用が起きる可能性があるが、このような有害作用は組織特異的なプロモーターあるいは低酸素状態の条件で発現が促進されるようなベクターを用いることにより克服できる可能性もある。臨床上看られるVEGFの有害作用は血管透過性の亢進と浮腫であるが、そのことに起因する心膜液貯留という有害作用は用量が多すぎる場合に起きることが最近になって示された²¹⁴⁾。結局、可能性のある有害作用について総合的に評価するためには、大動物を用いた最適投与量及びベクターと遺伝子のそれぞれの組み合わせにおいてデリバリーの戦略を決める必要がある。

おわりに

血管新生療法に対するたん白質、遺伝子及び細胞

を用いたアプローチは、動物モデル及び初期の非盲検試験において良好な結果が得られた。そのため大規模二重盲検プラセボコントロール試験におけるポジティブな結果が大いに期待されたが、現在までのところ適切な規模の二重盲検試験において有効性を示す段階までは達していない。しかし、少なくとも血管新生療法の安全性については最近の臨床試験において大きな問題がないことが示されつつある。たん白質製剤による治療及び遺伝子治療において今後改良すべき主な点としては、適切な増殖因子やその組合せをたん白質あるいは遺伝子として標的組織に効率良く持続的にデリバリーすること、あるいは標的組織に対してのみ活性を示す医薬品を用いた体系的な治療を行うことなどが考えられる。細胞治療の場合は、最適な細胞の選択からデリバリーの方法、患者の選択、作用機構の解明などが今後改良すべき点と考えられる。一方、血管の再構成及び幹細胞の動員といった可能性のある治療標的の解明に血管発生、血管新生、動脈形成という血管新生“vasculogenesis”の概念が有効となっている。このような観点において、臨床評価あるいは特にこれに関連する基礎研究の成果を評価する際には、血管発生、血管新生、動脈形成を有効性の評価に織り込む必要がある。また、治療方法の選択については、基礎的な前臨床のデータに基づいて妥当性が示されていることが必要不可欠である。このように克服すべき課題は多いが、近い将来においてこの領域における研究が大きく進歩し、虚血性心臓病の新しい治療法が出現することを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は厚生科学研究費補助金医薬品リスク評価研究事業（H17-医薬-015）として実施されたものである。

文 献

- 1) American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statics-2003 Update. American Heart Association.
- 2) Lowe, H. C., Oesterle, S. N., He, K. L., Macneill, B. D., Burkhoff, D.: *J Interv Cardiol*, **17**(2), 87-91 (2004).
- 3) Mukherjee, D., Comella, K., Bhatt, D. L., Roe, M. T., Patel, V., Ellis, S. G.: *Am Heart J*, **142**(1), 72-4 (2001).
- 4) Waltenberger, J., Lange, J., Kranz, A.: *Circulation*, **102**(2), 185-90 (2000).
- 5) Van Belle, E., Rivard, A., Chen, D., Silver, M., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F., Batters, C., Isner, J. M.: *Circulation*, **96**(8), 2667-74 (1997).
- 6) Nakae, I., Fujita, M., Miwa, K., Hasegawa, K., Kihara, Y., Nohara, R., Miyamoto, S., Ueda, K., Tamaki, S., Sasayama, S.: *Heart Vessels*, **15**(4), 176-80 (2000).
- 7) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **9**(6), 653-60 (2003).
- 8) Folkman, J.: *Nat Med*, **1**(1), 27-31 (1995).
- 9) Flamme, I., Risau, W.: *Development*, **116**(2), 435-9 (1992).
- 10) Shi, Q., Rafii, S., Wu, M. H., Wijelath, E. S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L. R., Moore, M. A., Storb, R. F., Hammond, W. P.: *Blood*, **92**(2), 362-7 (1998).
- 11) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witztzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J. M.: *Science*, **275**(5302), 964-7 (1997).
- 12) Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., Isner, J. M.: *Circ Res*, **85**(3), 221-8 (1999).
- 13) Asahara, T., Kawamoto, A.: *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**(3), C572-9 (2004).
- 14) Luttun, A., Carmeliet, P.: *Cardiovasc Res*, **58**(2), 378-89 (2003).
- 15) Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H., Rafii, S.: *Circ Res*, **88**(2), 167-74 (2001).
- 16) Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueno, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y., Imaizumi, T.: *Circulation*, **103**(23), 2776-9 (2001).
- 17) Ziegelhoeffer, T., Fernandez, B., Kostin, S., Heil, M., Voswinckel, R., Helisch, A., Schaper, W.: *Circ Res*, **94**(2), 230-8 (2004).
- 18) Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., Hicklin, D. J., Witte, L., Moore, M. A., Rafii, S.: *Blood*, **95**(3), 952-8 (2000).
- 19) Jackson, K. A., Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K.

- K., Goodell, M. A.: *J Clin Invest*, **107**(11), 1395-402 (2001).
- 20) Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., Verfaillie, C. M.: *Nature*, **418**(6893), 41-9 (2002).
- 21) Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H., Verfaillie, C. M.: *J Clin Invest*, **109**(3), 337-46 (2002).
- 22) Carmeliet, P.: *Nat Med*, **6**(4), 389-95 (2000).
- 23) Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(12), 5510-4 (1995).
- 24) Bruick, R. K., McKnight, S. L.: *Science*, **294**(5545), 1337-40 (2001).
- 25) Forsythe, J. A., Jiang, B. H., Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., Semenza, G. L.: *Mol Cell Biol*, **16**(9), 4604-13 (1996).
- 26) Yamakawa, M., Liu, L. X., Date, T., Belanger, A. J., Vincent, K. A., Akita, G. Y., Kuriyama, T., Cheng, S. H., Gregory, R. J., Jiang, C.: *Circ Res*, **93**(7), 664-73 (2003).
- 27) Kelly, B. D., Hackett, S. F., Hirota, K., Oshima, Y., Cai, Z., Berg-Dixon, S., Rowan, A., Yan, Z., Campochiaro, P. A., Semenza, G. L.: *Circ Res*, **93**(11), 1074-81 (2003).
- 28) Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J.: *Nat Med*, **9**(6), 677-84 (2003).
- 29) Semenza, G. L.: *J Appl Physiol*, **88**(4), 1474-80 (2000).
- 30) Zhou, J., Schmid, T., Brune, B.: *Mol Biol Cell*, **14**(6), 2216-25 (2003).
- 31) Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzner, E., Fandrey, J., Jelkmann, W.: *Blood*, **94**(5), 1561-7 (1999).
- 32) Jung, Y. J., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Neckers, L.: *Faseb J*, **17**(14), 2115-7 (2003).
- 33) Gao, Y., Lecker, S., Post, M. J., Hietaranta, A. J., Li, J., Volk, R., Li, M., Sato, K., Saluja, A. K., Steer, M. L., Goldberg, A. L., Simons, M.: *J Clin Invest*, **106**(3), 439-48 (2000).
- 34) Isner, J. M., Kalka, C., Kawamoto, A., Asahara, T.: *Ann N Y Acad Sci*, **953**, 75-84 (2001).
- 35) Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S. E.: *Circ Res*, **94**(5), 678-85 (2004).
- 36) de Muinck, E. D., Simons, M.: *J Mol Cell Cardiol*, **36**(1), 25-32 (2004).
- 37) Helisch, A., Schaper, W.: *Microcirculation*, **10**(1), 83-97 (2003).
- 38) Schaper, W., Scholz, D.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**(7), 1143-51 (2003).
- 39) Kondoh, K., Koyama, H., Miyata, T., Takato, T., Hamada, H., Shigematsu, H.: *Cardiovasc Res*, **61**(1), 132-42 (2004).
- 40) Heil, M., Schaper, W.: *Circ Res*, **95**(5), 449-58 (2004).
- 41) Babiak, A., Schumm, A. M., Wangler, C., Loukas, M., Wu, J., Dombrowski, S., Matuschek, C., Kotzerke, J., Dehio, C., Waltenberger, J.: *Cardiovasc Res*, **61**(4), 789-95 (2004).
- 42) Lawson, N. D., Weinstein, B. M.: *Nat Rev Genet*, **3**(9), 674-82 (2002).
- 43) Ferrara, N., Gerber, H. P., LeCouter, J.: *Nat Med*, **9**(6), 669-76 (2003).
- 44) Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodyavsky, I., Keshet, E., Neufeld, G.: *J Biol Chem*, **272**(11), 7151-8 (1997).
- 45) Veikkola, T., Alitalo, K.: *Semin Cancer Biol*, **9**(3), 211-20 (1999).
- 46) Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Gruchala, M., Heikura, T., Puranen, A., Kettunen, M. I., Kholova, I., Kauppinen, R. A., Achen, M. G., Stacker, S. A., Alitalo, K., Yla-Herttuala, S.: *Circ Res*, **92**(10), 1098-106 (2003).
- 47) Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L.: *Sci STKE*, **2001**(112), RE21 (2001).
- 48) Zachary, I., Glick, G.: *Cardiovasc Res*, **49**(3), 568-81 (2001).
- 49) Ishida, A., Murray, J., Saito, Y., Kanthou, C., Benzakour, O., Shibuya, M., Wijelath, E. S.: *J Cell Physiol*, **188**(3), 359-68 (2001).
- 50) Poole, T. J., Finkelstein, E. B., Cox, C. M.: *Dev Dyn*, **220**(1), 1-17 (2001).
- 51) Lohela, M., Saaristo, A., Veikkola, T., Alitalo, K.: *Thromb Haemost*, **90**(2), 167-84 (2003).
- 52) Lutun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J. A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Compennolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J. M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H. F., Hicklin, D. J., Carmeliet, P.: *Nat Med*, **8**(8),

- 831-40 (2002).
- 53) Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., Shima, D. T.: *Nat Med*, **5**(5), 495-502 (1999).
 - 54) Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L., Schuh, A. C.: *Nature*, **376**(6535), 62-6 (1995).
 - 55) Fong, G. H., Zhang, L., Bryce, D. M., Peng, J.: *Development*, **126**(13), 3015-25 (1999).
 - 56) Dumont, D. J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., Alitalo, K.: *Science*, **282**(5390), 946-9 (1998).
 - 57) Auguste, P., Javerzat, S., Bikfalvi, A.: *Cell Tissue Res*, **314**(1), 157-66 (2003).
 - 58) Ornitz, D. M., Itoh, N.: *Genome Biol*, **2**(3), REVIEWS3005 (2001).
 - 59) Horowitz, A., Tkachenko, E., Simons, M.: *J Cell Biol*, **157**(4), 715-25 (2002).
 - 60) Powers, C. J., McLeskey, S. W., Wellstein, A.: *Endocr Relat Cancer*, **7**(3), 165-97 (2000).
 - 61) Khurana, R., Simons, M.: *Trends Cardiovasc Med*, **13**(3), 116-22 (2003).
 - 62) Rissanen, T. T., Markkanen, J. E., Arve, K., Rutanen, J., Kettunen, M. I., Vajanto, I., Jauhiainen, S., Cashion, L., Gruchala, M., Narvanen, O., Taipale, P., Kauppinen, R. A., Rubanyi, G. M., Yla-Herttuala, S.: *Faseb J*, **17**(1), 100-2 (2003).
 - 63) Bergsten, E., Uutela, M., Li, X., Pietras, K., Ostman, A., Heldin, C. H., Alitalo, K., Eriksson, U.: *Nat Cell Biol*, **3**(5), 512-6 (2001).
 - 64) Hirschi, K. K., Rohovsky, S. A., Beck, L. H., Smith, S. R., D'Amore, P. A.: *Circ Res*, **84**(3), 298-305 (1999).
 - 65) Cao, R., Brakenhielm, E., Pawliuk, R., Warfaro, D., Post, M. J., Wahlberg, E., Leboulch, P., Cao, Y.: *Nat Med*, **9**(5), 604-13 (2003).
 - 66) Martins, R. N., Chleboun, J. O., Sellers, P., Sleigh, M., Muir, J.: *Growth Factors*, **10**(4), 299-306 (1994).
 - 67) Lafleur, M. A., Handsley, M. M., Knauper, V., Murphy, G., Edwards, D. R.: *J Cell Sci*, **115**(Pt 17), 3427-38 (2002).
 - 68) Huang, S. P., Wu, M. S., Shun, C. T., Wang, H. P., Lin, M. T., Kuo, M. L., Lin, J. T.: *J Biomed Sci*, **11**(4), 517-27 (2004).
 - 69) Salcedo, R., Ponce, M. L., Young, H. A., Wasserman, K., Ward, J. M., Kleinman, H. K., Oppenheim, J. J., Murphy, W. J.: *Blood*, **96**(1), 34-40 (2000).
 - 70) Kollet, O., Shvitiel, S., Chen, Y. Q., Suriawinata, J., Thung, S. N., Dabeva, M. D., Kahn, J., Spiegel, A., Dar, A., Samira, S., Goichberg, P., Kalinkovich, A., Arenzana-Seisdedos, F., Nagler, A., Hardan, I., Revel, M., Shafritz, D. A., Lapidot, T.: *J Clin Invest*, **112**(2), 160-9 (2003).
 - 71) Grafte-Faure, S., Leveque, C., Ketata, E., Jean, P., Vasse, M., Soria, C., Vannier, J. P.: *Cytokine*, **12**(1), 1-7 (2000).
 - 72) Detmar, M., Brown, L. F., Schon, M. P., Elicker, B. M., Velasco, P., Richard, L., Fukumura, D., Monsky, W., Claffey, K. P., Jain, R. K.: *J Invest Dermatol*, **111**(1), 1-6 (1998).
 - 73) Min, J. K., Lee, Y. M., Kim, J. H., Kim, Y. M., Kim, S. W., Lee, S. Y., Gho, Y. S., Oh, G. T., Kwon, Y. G.: *Circ Res*, **96**(3), 300-7 (2005).
 - 74) Buschmann, I., Heil, M., Jost, M., Schaper, W.: *Microcirculation*, **10**(3-4), 371-9 (2003).
 - 75) Lobov, I. B., Brooks, P. C., Lang, R. A.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(17), 11205-10 (2002).
 - 76) Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., Yancopoulos, G. D.: *Nat Med*, **6**(4), 460-3 (2000).
 - 77) Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Sato, T. N., Yancopoulos, G. D.: *Cell*, **87**(7), 1171-80 (1996).
 - 78) Gamble, J. R., Drew, J., Trezise, L., Underwood, A., Parsons, M., Kasminkas, L., Rudge, J., Yancopoulos, G., Vadas, M. A.: *Circ Res*, **87**(7), 603-7 (2000).
 - 79) Hanahan, D.: *Science*, **277**(5322), 48-50 (1997).
 - 80) Chae, J. K., Kim, I., Lim, S. T., Chung, M. J., Kim, W. H., Kim, H. G., Ko, J. K., Koh, G. Y.: *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**(12), 2573-8 (2000).
 - 81) Siddiqui, A. J., Blomberg, P., Wardell, E., Hellgren, I., Eskandarpour, M., Islam, K. B.,

- Syven, C.: *Biochem Biophys Res Commun*, **310**(3), 1002-9 (2003).
- 82) Shyu, K. G., Manor, O., Magner, M., Yancopoulos, G. D., Isner, J. M.: *Circulation*, **98**(19), 2081-7 (1998).
- 83) Goumans, M. J., Zwijsen, A., van Rooijen, M. A., Huylebroeck, D., Roelen, B. A., Mummery, C. L.: *Development*, **126**(16), 3473-83 (1999).
- 84) Lee, E. W., Michalkiewicz, M., Kitlinska, J., Kalezic, I., Switalska, H., Yoo, P., Sangkharat, A., Ji, H., Li, L., Michalkiewicz, T., Ljubisavljevic, M., Johansson, H., Grant, D. S., Zukowska, Z.: *J Clin Invest*, **111**(12), 1853-62 (2003).
- 85) Emanuelli, C., Salis, M. B., Pinna, A., Graiani, G., Manni, L., Madeddu, P.: *Circulation*, **106**(17), 2257-62 (2002).
- 86) Schultz, A., Lavie, L., Hochberg, I., Beyar, R., Stone, T., Skorecki, K., Lavie, P., Roguin, A., Levy, A. P.: *Circulation*, **100**(5), 547-52 (1999).
- 87) Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., Branellec, D., Semenza, G. L., Isner, J. M.: *J Biol Chem*, **275**(38), 29643-7 (2000).
- 88) Morishita, R., Nakamura, S., Hayashi, S., Taniyama, Y., Moriguchi, A., Nagano, T., Taiji, M., Noguchi, H., Takeshita, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., Ogihara, T.: *Hypertension*, **33**(6), 1379-84 (1999).
- 89) Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furukawa, Y., Sasayama, S.: *Circulation*, **95**(11), 2552-8 (1997).
- 90) Nakano, N., Morishita, R., Moriguchi, A., Nakamura, Y., Hayashi, S. I., Aoki, M., Kida, I., Matsumoto, K., Nakamura, T., Higaki, J., Ogihara, T.: *Hypertension*, **32**(3), 444-51 (1998).
- 91) Onimaru, M., Yonemitsu, Y., Tanii, M., Nakagawa, K., Masaki, I., Okano, S., Ishibashi, H., Shirasuna, K., Hasegawa, M., Sueishi, K.: *Circ Res*, **91**(10), 923-30 (2002).
- 92) Seko, Y., Fukuda, S., Nagai, R.: *Clin Sci (Lond)*, **106**(5), 439-42 (2004).
- 93) Edelberg, J. M., Lee, S. H., Kaur, M., Tang, L., Feirt, N. M., McCabe, S., Bramwell, O., Wong, S. C., Hong, M. K.: *Circulation*, **105**(5), 608-13 (2002).
- 94) Simons, M., Ware, J. A.: *Nat Rev Drug Discov*, **2**(11), 863-71 (2003).
- 95) Couffinhal, T., Silver, M., Kearney, M., Sullivan, A., Witzensichler, B., Magner, M., Annex, B., Peters, K., Isner, J. M.: *Circulation*, **99**(24), 3188-98 (1999).
- 96) Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R., Itin, A., Fishman, G. I., Carmeliet, P., Goelman, G., Keshet, E.: *Embo J*, **21**(8), 1939-47 (2002).
- 97) Schumacher, B., Pecher, P., von Specht, B. U., Stegmann, T.: *Circulation*, **97**(7), 645-50 (1998).
- 98) Laham, R. J., Sellke, F. W., Edelman, E. R., Pearlman, J. D., Ware, J. A., Brown, D. L., Gold, J. P., Simons, M.: *Circulation*, **100**(18), 1865-71 (1999).
- 99) Ruel, M., Laham, R. J., Parker, J. A., Post, M. J., Ware, J. A., Simons, M., Sellke, F. W.: *J Thorac Cardiovasc Surg*, **124**(1), 28-34 (2002).
- 100) Unger, E. F., Goncalves, L., Epstein, S. E., Chew, E. Y., Trapnell, C. B., Cannon, R. O., 3rd, Quyyumi, A. A.: *Am J Cardiol*, **85**(12), 1414-9 (2000).
- 101) Laham, R. J., Chronos, N. A., Pike, M., Leimbach, M. E., Udelson, J. E., Pearlman, J. D., Pettigrew, R. I., Whitehouse, M. J., Yoshizawa, C., Simons, M.: *J Am Coll Cardiol*, **36**(7), 2132-9 (2000).
- 102) Udelson, J. E., Dilsizian, V., Laham, R. J., Chronos, N., Vansant, J., Blais, M., Galt, J. R., Pike, M., Yoshizawa, C., Simons, M.: *Circulation*, **102**(14), 1605-10 (2000).
- 103) Simons, M., Annex, B. H., Laham, R. J., Kleiman, N., Henry, T., Dauerman, H., Udelson, J. E., Gervino, E. V., Pike, M., Whitehouse, M. J., Moon, T., Chronos, N. A.: *Circulation*, **105**(7), 788-93 (2002).
- 104) Rana, J. S., Mannam, A., Donnell-Fink, L., Gervino, E. V., Sellke, F. W., Laham, R. J.: *Am J Cardiol*, **95**(12), 1456-9 (2005).
- 105) Hendel, R. C., Henry, T. D., Rocha-Singh, K., Isner, J. M., Kereiakes, D. J., Giordano, F. J., Simons, M., Bonow, R. O.: *Circulation*, **101**(2), 118-21 (2000).
- 106) Henry, T. D., Rocha-Singh, K., Isner, J. M., Kereiakes, D. J., Giordano, F. J., Simons, M., Losordo, D. W., Hendel, R. C., Bonow, R. O., Eppler, S. M., Zioncheck, T. F., Holmgren,

- E. B., McCluskey, E. R.: *Am Heart J*, **142**(5), 872-80 (2001).
- 107) Henry, T. D., Annex, B. H., McKendall, G. R., Azrin, M. A., Lopez, J. J., Giordano, F. J., Shah, P. K., Willerson, J. T., Benza, R. L., Berman, D. S., Gibson, C. M., Bajamonde, A., Rundle, A. C., Fine, J., McCluskey, E. R.: *Circulation*, **107**(10), 1359-65 (2003).
- 108) Seiler, C., Pohl, T., Wustmann, K., Hutter, D., Nicolet, P. A., Windecker, S., Eberli, F. R., Meier, B.: *Circulation*, **104**(17), 2012-7 (2001).
- 109) Kang, H. J., Kim, H. S., Zhang, S. Y., Park, K. W., Cho, H. J., Koo, B. K., Kim, Y. J., Soo Lee, D., Sohn, D. W., Han, K. S., Oh, B. H., Lee, M. M., Park, Y. B.: *Lancet*, **363**(9411), 751-6 (2004).
- 110) Matsubara, H.: *Lancet*, **363**(9411), 746-7 (2004).
- 111) van Royen, N., Schirmer, S. H., Atasever, B., Behrens, C. Y., Ubbink, D., Buschmann, E. E., Voskuil, M., Bot, P., Hofer, I., Schlingemann, R. O., Biemond, B. J., Tijssen, J. G., Bode, C., Schaper, W., Oskam, J., Legemate, D. A., Piek, J. J., Buschmann, I.: *Circulation*, **112**(7), 1040-6 (2005).
- 112) Yla-Herttuala, S., Alitalo, K.: *Nat Med*, **9**(6), 694-701 (2003).
- 113) Simons, M., Post, M. J.: *Therapeutic angiogenesis*. Lippincott, New York (2002).
- 114) Wright, M. J., Wightman, L. M., Latchman, D. S., Marber, M. S.: *Gene Ther*, **8**(24), 1833-9 (2001).
- 115) Wright, M. J., Wightman, L. M., Lilley, C., de Alwis, M., Hart, S. L., Miller, A., Coffin, R. S., Thrasher, A., Latchman, D. S., Marber, M. S.: *Basic Res Cardiol*, **96**(3), 227-36 (2001).
- 116) Losordo, D. W., Vale, P. R., Symes, J. F., Dunnington, C. H., Esakof, D. D., Maysky, M., Ashare, A. B., Lathi, K., Isner, J. M.: *Circulation*, **98**(25), 2800-4 (1998).
- 117) Symes, J. F., Losordo, D. W., Vale, P. R., Lathi, K. G., Esakof, D. D., Mayskiy, M., Isner, J. M.: *Ann Thorac Surg*, **68**(3), 830-6; discussion 836-7 (1999).
- 118) Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., Maysky, M., Esakof, D. D., Symes, J. F., Isner, J. M.: *Circulation*, **102**(9), 965-74 (2000).
- 119) Vale, P. R., Losordo, D. W., Milliken, C. E., McDonald, M. C., Gravelin, L. M., Curry, C. M., Esakof, D. D., Maysky, M., Symes, J. F., Isner, J. M.: *Circulation*, **103**(17), 2138-43 (2001).
- 120) Losordo, D. W., Vale, P. R., Hendel, R. C., Milliken, C. E., Fortuin, F. D., Cummings, N., Schatz, R. A., Asahara, T., Isner, J. M., Kuntz, R. E.: *Circulation*, **105**(17), 2012-8 (2002).
- 121) Fortuin, F. D., Vale, P., Losordo, D. W., Symes, J., DeLaria, G. A., Tyner, J. J., Schaer, G. L., March, R., Snell, R. J., Henry, T. D., Van Camp, J., Lopez, J. J., Richenbacher, W., Isner, J. M., Schatz, R. A.: *Am J Cardiol*, **92**(4), 436-9 (2003).
- 122) Rosengart, T. K., Lee, L. Y., Patel, S. R., Sanborn, T. A., Parikh, M., Bergman, G. W., Hachamovitch, R., Szulc, M., Kligfield, P. D., Okin, P. M., Hahn, R. T., Devereux, R. B., Post, M. R., Hackett, N. R., Foster, T., Grasso, T. M., Lesser, M. L., Isom, O. W., Crystal, R. G.: *Circulation*, **100**(5), 468-74 (1999).
- 123) Stewart, D. J., Hilton, J. D., Arnold, J. M., Gregoire, J., Rivard, A., Archer, S. L., Charbonneau, F., Cohen, E., Curtis, M., Buller, C. E., Mendelsohn, F. O., Dib, N., Page, P., Ducas, J., Plante, S., Sullivan, J., Macko, J., Rasmussen, C., Kessler, P. D., Rasmussen, H. S.: *Gene Ther*, 1-9 (2006).
- 124) Hedman, M., Hartikainen, J., Syvanne, M., Stjernvall, J., Hedman, A., Kivela, A., Vaninen, E., Mussalo, H., Kauppila, E., Simula, S., Narvanen, O., Rantala, A., Peuhkurinen, K., Nieminen, M. S., Laakso, M., Yla-Herttuala, S.: *Circulation*, **107**(21), 2677-83 (2003).
- 125) Kastrup, J., Jorgensen, E., Ruck, A., Tagil, K., Glogar, D., Ruzylo, W., Botker, H. E., Dudek, D., Drvota, V., Hesse, B., Thuesen, L., Blomberg, P., Gyongyosi, M., Sylven, C.: *J Am Coll Cardiol*, **45**(7), 982-8 (2005).
- 126) Kalka, C., Tehrani, H., Laudenberg, B., Vale, P. R., Isner, J. M., Asahara, T., Symes, J. F.: *Ann Thorac Surg*, **70**(3), 829-34 (2000).
- 127) Grines, C. L., Watkins, M. W., Helmer, G., Penny, W., Brinker, J., Marmur, J. D., West, A., Rade, J. J., Marrott, P., Hammond, H. K.,