

III-2-6-1. FGF (Fibroblast growth factor)

京都大学大学院医学研究科 心臓血管外科
江崎二郎、丸井晃、米田正始

1. FGF の基礎

Fibroblast growth factor (FGF)は、1974年にウシ脳下垂体から線維芽細胞を増殖させる因子として発見された。その後多くの類似物質が発見され、現在23種類の遺伝子からなるFGFファミリーを形成しており、全身のほとんどの組織に存在し、多様な生理作用を有していることが明らかとなった。FGFは胎児の個体発生や、生後の血管新生、骨形成、肺胞形成などにおいて重要な成長因子である。

FGFにはFGFR1からFGFR4の4種類の受容体が存在するが、それら受容体と結合するにはヘパラン硫酸プロテオグリカンやヘパリンを必要とする。またFGFRの異常は、頭蓋縫合早期癒合症や軟骨形成不全症などの原因となる。

FGF familyのうち、**basic FGF (bFGF, FGF-2)**は、血管新生、平滑筋細胞増殖、線維芽細胞増殖促進作用、細胞外マトリックス産生促進作用、間葉系細胞の増殖誘導、神経系細胞の分化、軟骨細胞増殖などの働きを持つ。中でも血管新生作用は、**血管新生 angiogenesis**のみならず**動脈形成 arteriogenesis**を促進する特色を持つ。またbFGFは、投与部位のVEGF、HGFなどの有効な血管新生サイトカインの発現を誘導し、さらにeNOS、MCP-1などを誘導するという報告もあり、理想的な血管新生因子である可能性がある。

bFGFは、さまざまな領域の再生医療において有効性が明らかにされている。例えば、**皮膚潰瘍**において、血管新生作用、線維芽細胞増殖作用、細胞外マトリックス作用などの結果として、肉芽の形成を促進する。現在褥創・皮膚潰瘍治療薬として、フィブラストスプレーの商品名で販売されており、臨床に応用されている。他に、**虚血性心疾患**や**下肢虚血**における血管新生、骨折治癒促進作用・海綿骨内骨形成促進作用¹⁻³、**顎骨**の再生⁴、**耳介軟骨**の再生⁵、**半月板**の再生⁵、**肺気腫**における血管新生・呼吸機能改善効果⁶、**末梢神経**の再生⁷、歯周病における**歯周組織**の再生⁸などが報告されている。

その中で、細胞移植とbFGFとの**併用療法**をはじめとして、心臓血管疾患領域におけるbFGFによる再生医療につき概説する。

2. 再生医療における細胞増殖因子の投与方法

一般的に細胞増殖因子は生体内での生理学的活性の持続時間が非常に短いという欠点があり、初期の再生医療では、細胞増殖因子を水溶液の形で全身大量投与し、一定の効果は認められたものの、発癌性などの副作用の問題が指摘されていた。副作用なくより効果的に薬剤の投与を行うためには、一定期間、組

織内濃度をあるレベル以上に維持すること（徐放）が必要であり、遺伝子治療などが試みられてきた。しかし、ウイルスやプラスミドなどの遺伝材料には短期・長期的な**安全性**や、**目的臓器以外での遺伝情報の発現**も含めて未だ多くの課題が残されている。また細胞移植治療も試みられてきたが、自己の細胞を利用しない限り**拒絶反応**や**倫理的な問題**が生じる他、十分な細胞数を確保するためには採取時に**大きな侵襲**や**リスク**を伴い、さらには**移植する細胞の種類や細胞数**についても十分なコンセンサスは得られていない。

このような状況から我々は遺伝材料も細胞も使わない第3の方法として田畑らの開発した**生体吸収性ゼラチンハイドロゲル**による蛋白徐放システム^{9, 10}に着目し、これを用いた増殖因子の徐放投与を中心に、**単独治療**あるいは**細胞移植や外科的治療法との併用療法**という形で重度の虚血性疾患や重症心不全に対する新たな治療法の開発に取り組んできた。

ゼラチンハイドロゲルは酸性ゼラチンを化学架橋して作製し、bFGF タンパクの生理活性を保ったまま静電気力により吸着し、これを生体内に投与するとゼラチンハイドロゲルが生体内で少しずつ酵素分解されるに従い、bFGF の効果が発現する。この方法の利点は、①ゼラチンは血漿増量剤、外科用材料、薬物添加剤などとしての長い**臨床使用実績**を持ち、生体内での**安全性**は十分に証明されていること、②ウイルスベクターやプラスミドなどの**遺伝材料を使用しない**こと、③骨髄採取のような**侵襲の大きな処置を必要としない**こと、④局所使用のためbFGF 血中濃度の上昇を認めず、**全身の副作用を伴わない**こと、⑤ハイドロゲルの含水率を変えることにより増殖因子の**徐放期間を自由に調節**できること、⑥増殖因子の**投与量が調節**できること、⑦**投与形態**（粒子状、シート状、ディスク状）を自由に**変化**できること、⑧操作手技が**簡便**であること、などがあげられる。

3. 細胞移植とbFGF との併用療法

①骨格筋芽細胞移植とbFGF の併用療法

骨格筋芽細胞移植の成否は、移植細胞数^{11, 12}、移植方法^{13, 14}が関係していると報告されている。また、細胞移植における問題点の一つは、移植された細胞のうちわずかしか生着していないことであり、臨床においては移植した細胞のうち1%未満しか生着していなかったと報告されている¹⁵。

我々はラット慢性心筋梗塞モデルに対して骨格筋芽細胞を大量に（ 5×10^7 個）移植することによって梗塞壁をほぼ完全に移植細胞で置換できることを確認しており（図1）¹¹、心筋になりうる細胞を何らかの手段を用いて大量に生着させることができれば心室壁を再生させられる可能性を示した。

bFGF は**骨格筋芽細胞の増殖を促進**し、その分化を抑制する働きを持っている^{16, 17}。この性質を利用し、われわれは、梗塞心に対して骨格筋芽細胞移植と同時

に bFGF 徐放シートを置いたところ、グラフト内外の**動脈形成を促進し、かつ細胞の生着率が約 3 倍**となった¹⁸。また、bFGF と同様のシステムによる**肝細胞増殖因子 HGF** 徐放投与との併用では細胞の**生着率が約 7 倍に向上**することを確認し¹⁹、細胞の生着率改善の手段として細胞増殖因子徐放投与の併用が有用であることを示した。

②心筋細胞移植と bFGF の併用療法

ラット慢性心筋梗塞モデルに対して**同種胎児心筋細胞**を梗塞巣に移植した実験では、治療後の左室拡大の抑制と心収縮力の軽度改善は認めたものの、細胞の生着率は低く移植細胞の直接的な心収縮力への貢献を示すには至らなかった。また、同じくラット慢性心筋梗塞モデルに対して左室形成術と同時に周辺部に心筋細胞移植を行った実験では、細胞移植群で術後の左室の再拡大を抑制できることが示された。しかし、やはり細胞の生着率は高くなく、細胞移植に伴う液性因子の作用が主体であった可能性がある。

心筋細胞は虚血に非常に弱く梗塞部への生着が非常に不良である。そこで我々は、ラット心筋梗塞モデルで、梗塞部および梗塞周辺部にあらかじめ徐放化 bFGF で**血管新生を誘導 (prevascularization)**し、1週間後にラット胎児心筋細胞の移植を行った。bFGF の前処置により、移植細胞の生着率が高まり、梗塞部およびその周辺部の血管新生を認め (図 2)、心エコー及び心臓カテーテル検査にて心機能の改善を認めた。²⁰。この手法は、**細胞移植全般に応用可能**であると思われる。

③間葉系幹細胞移植と bFGF の併用療法

ラットの冷凍凝固による心筋障害モデルに対して、bFGF を遺伝子導入された**間葉系幹細胞**を移植したところ、生着率が改善し、心筋への分化が促進されたと報告されており²¹、間葉系幹細胞移植においても bFGF の併用療法は有用であると考えられる。

4. 虚血性心疾患に対する bFGF

①心筋梗塞モデルに対する徐放化 bFGF

薬物治療が無効な虚血性心疾患に対する治療法としてカテーテルインターベンション (PCI) や冠動脈バイパス手術 (CABG) が行われているが、**冠動脈がびまん性に狭窄している症例や重症虚血性心筋症に対しては有効性に限界がある**。我々は虚血性心疾患に対する bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルの効果を確認した。ラット慢性心筋梗塞モデルで梗塞部および梗塞周辺部に bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル粒子 (100 μ g) を心筋内投与したところ、治療群ではコントロール群に比し**有意な心拡大の抑制と心収縮力の改善**が見られた。また治療群では組織学的に梗塞周辺部の豊富な血管新生を認め、これは ²⁰¹Tl 血流シンチグラフ

ィーにおける梗塞周辺部の血流改善所見と一致した²²。同様の実験をブタ慢性心筋梗塞モデルにて行ったところ、梗塞部心筋厚が保たれ、また拡大が抑制されており、心収縮力の改善も認められた²³。術後4週目の冠動脈造影では結紮した冠動脈の末梢が側副血行路を介して造影された。

②冠動脈バイパス術(CABG)とFGFの併用療法

臨床においてCABGとFGFとの併用療法の有効性も報告されている。CABGと同時に、前下行枝付近の心筋に直接FGF-1(0.01mg/kg)を注入したところ、3ヵ月後の血管造影検査においてコントロール群と比較しFGF-1投与群では豊富な血管新生を認められた²⁴。また、3年後の血管造影においてもコントロール群と比較しFGF-1投与群での血流の増加を認めており、また心機能の改善、NYHAの改善を認められた²⁵。

また、CABGとFGF-2の併用療法のrandomized, double-blind, placebo-controlled studyも行われており、CABGとbFGF併用の有効性が報告された。24症例をランダムに、徐放化bFGF10 μ g投与群、徐放化bFGF100 μ g投与群、コントロール群(vehicle投与)の3群(各8例ずつ)に分け、CABGと同時にバイパス不可能な領域の心外膜下に徐放化bFGFやvehicleを投与した。徐放化bFGF100 μ g投与群では、3ヵ月以内の胸痛の再発を認めず、負荷心筋シンチにおいてコントロール群と比較し有意に良好な虚血の改善を認められた²⁶。また平均32ヶ月のfollow upにおいて、コントロール群と比較しbFGF投与群は、胸痛再発が有意に少なく、負荷心筋シンチにおいて有意に良好な虚血の改善を認められた²⁷。

③徐放化bFGFと有茎大網被覆術との併用療法 - バイオCABG

腹腔内臓器である大網は豊富な血流をもち、また種々のサイトカインを放出することで知られている。実際1936年にO' Shaughnessyは心筋梗塞の治療として、心筋梗塞部を大網で覆い側副血行路を発達させる“omentopexy”という手技を用いた。その後内胸動脈を大網に植え込み梗塞周囲部を覆う方法が試みられたが、共に冠動脈と大網グラフトとの間の交通が形成されるのに長時間を要したため、臨床的に十分な結果が得られなかった。

我々はbFGFによりその交通形成を促進する方法を試みた^{28, 29}。ウサギの鈍縁枝を結紮した急性及び陳旧性心筋梗塞モデルを作製し、梗塞部にbFGF含有ゼラチンシート(100 μ g)を塗布し、その上から大網を胃大網動脈(gastroepiploic artery: GEA)ごと梗塞部に巻きつけたところ、大網のみを巻きつけた群に比して同部位の豊富な血管新生とGEAから側副血管を介して直接鈍縁枝に流入する血流が認められた。この手法は従来手術適応と考えられなかった微小な血管に

対しても**生物学的にバイパス吻合を作製すること(バイオ CABG)**を可能とする点、およびドナー血管を外部健常臓器から得られる点で非常に画期的であると考えられる。また徐放化 bFGF の CABG との併用においては、バイパス血管末梢の run-off を改善してグラフトの開存率を向上させる効果も期待される。

以上のような重症虚血性心疾患に対する徐放化 bFGF と有茎大網被覆術との併用療法は、京都大学附属病院にて臨床応用が開始され、すでに従来では治療不可能であった重症虚血部位での血管新生、機能改善効果を認めている。

5. 拡張型心筋症に対する bFGF

拡張型心筋症は、心筋細胞自体の傷害によって心拡大と収縮力低下が起こる病態を総称し、一般に**心臓移植**しか治療法がなく予後不良である。このうち虚血性心筋症（冠動脈のびまん性高度狭窄のために心筋が慢性的な虚血に陥って生じる）を除いた非虚血性心筋症では、心筋内微小循環の虚血が関与するとされているため、bFGF の血管新生効果が有効な可能性が考えられる。我々は自己免疫性心筋炎後拡張型心筋症ラットモデルを作製し bFGF 徐放化シートで左室表面を覆ったところ、心臓の線維化については影響を及ぼさなかったが、**左室自由壁の組織血流増加と左室収縮力の改善**を認めた。今後、心臓移植しか治療法が残されていない重症末期拡張型心筋症患者に応用することが期待される。

6. 肺高血圧症に対する bFGF

原発性肺高血圧症などの難治性肺高血圧疾患は、プロスタサイクリンの持続静脈内投与、ホスホジエステラーゼ阻害薬(シルデナフィル)やエンドセリン受容体拮抗薬(ボセンタン)などの経口薬が有効ではあるが、十分な治療効果が得られず、肺高血圧が進行し、**肺移植**以外の治療法がなくなるのが現状である。増殖因子による再生医療も今後の治療選択になりうると考えられる。そこで、我々は bFGF を、安全かつ効果的に投与できるように、気道内投与を行うことを考えた。bFGF の気道内投与を行うために、10 μm 大のゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。モノクロタリン誘導肺高血圧症ラットモデルにおいて bFGF の**気道内徐放投与**を行ったところ、肺高血圧の進行が抑制され生存率の大幅な向上が認められた。これには bFGF による血管新生効果が関与している可能性がある。また肺高血圧症治療モデルでも同様な効果が得られており、将来的にはナノメートルオーダーの粒子を作製して、エアロゾルスプレーのような使用法ができれば理想的と考えている。効果的な吸入薬が開発されれば患者の予後は飛躍的に向上すると期待される。

7. 虚血下肢に対する bFGF

ウサギ大腿動脈を結紮し**下肢虚血**モデルを作製し、bFGF (100 μg) 徐放化ゼラ

チンハイドロゲル粒子の大腿部筋肉内注射を行ったところ、投与 4 週後にレーザードップラー血流計での血流改善効果を認めた³⁰。また組織像でも有意な血管新生を認めた。同様な効果はストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットでも確認された。さらに bFGF と HGF の同時徐放を行ったところ、虚血組織の免疫染色において第 VIII 因子及び α SMA 陽性血管が増加しており、血管新生増強、血管成熟性促進効果が認められた³¹。

我々は京都大学附属病院において bFGF 徐放による虚血下肢疾患に対する第 I-II 相臨床試験を開始している。bFGF (200 μ g) 徐放化ゼラチンハイドロゲルを下腿部に筋肉内注射し、4 週間後、24 週後に評価を行っている。2006 年 12 月現在 7 症例を経験しており、**明らかな有害事象は認めておらず、臨床症状の改善、潰瘍の治癒などの有効性を認めている。局所効果の指標である bFGF の血中濃度の有意な上昇も認めていない。**また特筆すべきことは**投与法の簡便さ**であり、腰椎麻酔下に 1 症例平均 15 分程度しか必要としない。すなわち bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法は、投与が非常に簡便であり「時間的・空間的」局所治療が可能であることから、従来の血管新生療法より安全性・低侵襲性が期待できる点で非常に画期的であると考えられる。今後症例を重ね用量効果を含めた有効性を確認してゆく予定である。

8. 心臓手術後の bFGF の胸骨再生促進効果

心臓の手術は一般的に胸骨正中切開にて行うことが多いが、術後に**胸骨治癒遅延**や**胸骨骨髓炎**を合併することがあり、患者の苦痛や入院期間の長期化をきたす。また胸骨骨髓炎から前縦隔炎をきたすことがあり、一旦前縦隔炎になると、死亡率は高率である。冠動脈バイパス術後の内胸動脈の開存率は非常に良好であることから、最近両側内胸動脈の使用が多くなっているが、胸骨の栄養血管は内胸動脈であるために胸骨への血流低下をきたし、術後の胸骨治癒遅延や骨髓炎を引き起こす症例も認められる。また最近糖尿病患者の増加を認めているが、糖尿病は胸骨治癒遅延や骨髓炎のリスクを増大させている。

正常及び糖尿病ラットを用いて胸骨切開の後に両側内胸動脈を剥離したモデルを作製し、bFGF 含有ゼラチンハイドロゲルシートを内胸動脈剥離面に接着させたところ、術後 4 週間目のレーザードップラーフローメータによる血流測定で**有意な傍胸骨血流量の増加を認め、胸骨治癒促進効果**が見られた³²⁻³⁴。また犬を用いて胸骨切開後、両側内胸動脈を剥離し bFGF 含有シートを縫着したところ、同様に血流量の増加が見られた。さらには術後 4 週目のレントゲン写真の比較にて、bFGF シート群は完全な軟骨内骨化を認めたのに対して、対照群では一部にしか見られなかった³⁵。

以上の結果より bFGF は、胸骨治癒に対して促進する作用があり、安全性も確認できたため、京都大学附属病院において現在、倫理委員会の承認のもとに臨

床試験を開始し、すでに 2 症例を経験し、安全性も問題なく、胸骨治癒促進効果を確認している。

9. 感染予防と bFGF

心臓外科領域において移植へのブリッジにおける補助人工心臓などの**ライン感染予防**は非常に重要なテーマであり、患者の予後に大きく影響することは間違いない。人工物ライン感染の原因のひとつはライン刺入部からの細菌の混入である。われわれは bFGF の血管新生効果ならびに組織再生効果によりこれを予防すべく実験を行った。マウスの皮下にマイクロビーズであるダクロン繊維と bFGF を徐放するゼラチンを併せて植え込み、1 週間後その直上に重篤なライン感染の原因となるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を皮下接種した。その 48 時間後、ダクロン繊維および周囲組織を採取し、組織学的観察およびダクロン繊維中の MRSA 培養を行った。徐放化 bFGF 投与群では、対照群と比較して、周囲組織に血管新生が確認され、またダクロン繊維中の MRSA 数の有意な減少(約 10 分の 1)が見られた。さらに 7 日後には徐放化 bFGF 投与群にのみダクロンと筋繊維の間に豊富な肉芽組織と血管が形成された。³⁶ 以上より、血管新生によりダクロン繊維周囲に有効な**組織再生・血管新生**を起こし、細菌のダクロン繊維への侵入防御が可能であった。この技術はあらゆるライン感染予防に応用可能と考えられた。

10. おわりに

bFGF は、血管新生作用だけでなく細胞の増殖・分化に関与しており、単独療法としても細胞移植との併用療法としても有用な増殖因子である。投与方法の工夫により、今後更なる臨床応用が期待される。

1. Kawaguchi H, et al. Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology*. 1994;135:774-781.
2. Kato. Single local injection of recombinant fibroblast growth factor-2 stimulates healing of segmental bone defects in rabbits. *J Orthop Res*. 1998;16:654-659.
3. Kawaguchi H, et al. Acceleration of fracture healing in non-human primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:875-880.
4. 横矢重俊. bFGF 含浸ゼラチン粒子の顎骨欠損部骨再生に及ぼす影響. *日口科誌*. 2002;51:324-334.
5. Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, et al. Combined

- chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res A*. Sep 1 2005;74(3):408-418.
6. Morino S, Nakamura T, Toba T, et al. Fibroblast Growth Factor-2 Induces Recovery of Pulmonary Blood Flow in Canine Emphysema Models. *Chest*. August 1, 2005 2005;128(2):920-926.
 7. 高橋聖仁. 末梢神経の再生医療. *再生医療の実際*, 羊土社. 2003:168-177.
 8. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, et al. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res*. Feb 2003;38(1):97-103.
 9. Tabata Y, Ikada Y. Protein release from gelatin matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998;31(3):287-301.
 10. Tabata Y. Tissue regeneration based on growth factor release. *Tissue Eng*. 2003;9 Suppl 1:S5-15.
 11. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G, et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation*. Sep 9 2003;108 Suppl 1:II259-263.
 12. Pouzet B, Vilquin J-T, Hagege AA, et al. Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2001;71(3):844-851.
 13. Pouzet B, Vilquin J-T, Hagege AA, et al. Intramyocardial Transplantation of Autologous Myoblasts : Can Tissue Processing Be Optimized? *Circulation*. November 7, 2000 2000;102(90003):III-210-215.
 14. Smits PC, van Geuns RIM, Poldermans D ea. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:2063-2069.
 15. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A ea. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:879-888.
 16. Flanagan-Steet H, Hannon K, McAvoy MJ, et al. Loss of FGF receptor 1 signaling reduces skeletal muscle mass and disrupts myofiber organization in the developing limb. *Dev Biol*. Feb 1

- 2000;218(1):21-37.
17. Itoh N, Mima T, Mikawa T. Loss of fibroblast growth factor receptors is necessary for terminal differentiation of embryonic limb muscle. *Development*. January 1, 1996 1996;122(1):291-300.
 18. Tambara K, Tabata Y, Komeda M. Factors related to the efficacy of skeletal muscle cell transplantation and future approaches with control-released cell growth factors and minimally invasive surgery. *Int J Cardiol*. Jun 2004;95 Suppl 1:S13-15.
 19. Tambara K, Premaratne GU, Sakaguchi G, et al. Administration of control-released hepatocyte growth factor enhances the efficacy of skeletal myoblast transplantation in rat infarcted hearts by greatly increasing both quantity and quality of the graft. *Circulation*. Aug 30 2005;112(9 Suppl):I129-134.
 20. Sakakibara Y, Nishimura K, Tambara K, et al. Prevascularization with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor enhances the benefits of cardiomyocyte transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jul 2002;124(1):50-56.
 21. Song H, Kwon K, Lim S, et al. Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. *Mol Cells*. Jun 30 2005;19(3):402-407.
 22. Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, et al. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels*. May 2003;18(2):93-99.
 23. Sakakibara Y, Tambara K, Sakaguchi G, et al. Toward surgical angiogenesis using slow-released basic fibroblast growth factor. *Eur J Cardiothorac Surg*. Jul 2003;24(1):105-111; discussion 112.
 24. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, et al. Induction of Neoangiogenesis in Ischemic Myocardium by Human Growth Factors : First Clinical Results of a New Treatment of Coronary Heart Disease. *Circulation*. February 24, 1998 1998;97(7):645-650.
 25. Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2000;69(5):1414-1419.
 26. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER, et al. Local Perivascular Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery : Results of a Phase I Randomized, Double-Blind,

- Placebo-Controlled Trial. *Circulation*. November 2, 1999;100(18):1865-1871.
27. Ruel M, Laham RJ, Parker JA, et al. Long-term effects of surgical angiogenic therapy with fibroblast growth factor 2 protein. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jul 2002;124(1):28-34.
 28. Ueyama K, Bing G, Tabata Y, et al. Development of biologic coronary artery bypass grafting in a rabbit model: revival of a classic concept with modern biotechnology. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Jun 2004;127(6):1608-1615.
 29. Takaba K, Jiang C, Nemoto S, et al. A combination of omental flap and growth factor therapy induces arteriogenesis and increases myocardial perfusion in chronic myocardial ischemia: Evolving concept of biologic coronary artery bypass grafting. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2006;132(4):891-891.
 30. Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K, et al. Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *J Artif Organs*. 2004;7(2):58-61.
 31. Marui A, Kanematsu A, Yamahara K, et al. Simultaneous application of basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor to enhance the blood vessels formation. *J Vasc Surg*. Jan 2005;41(1):82-90.
 32. Iwakura A, Tabata Y, Nishimura K, et al. Basic fibroblast growth factor may improve devascularized sternal healing. *Ann Thorac Surg*. Sep 2000;70(3):824-828.
 33. Iwakura A, Tabata Y, Tamura N, et al. Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances healing of devascularized sternum in diabetic rats. *Circulation*. Sep 18 2001;104(12 Suppl 1):I325-329.
 34. Iwakura A, Tabata Y, Miyao M, et al. Novel method to enhance sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries with use of basic fibroblast growth factor. *Circulation*. Nov 7 2000;102(19 Suppl 3):III307-311.
 35. Iwakura A, Tabata Y, Koyama T, et al. Gelatin sheet incorporating basic fibroblast growth factor enhances sternal healing after harvesting bilateral internal thoracic arteries. *J Thorac Cardiovasc Surg*. Oct 2003;126(4):1113-1120.

36. Hirose K, Marui A, Arai Y, et al. Sustained-release vancomycin sheet may help to prevent prosthetic graft methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Journal of Vascular Surgery*. 2006;44(2):377-382.

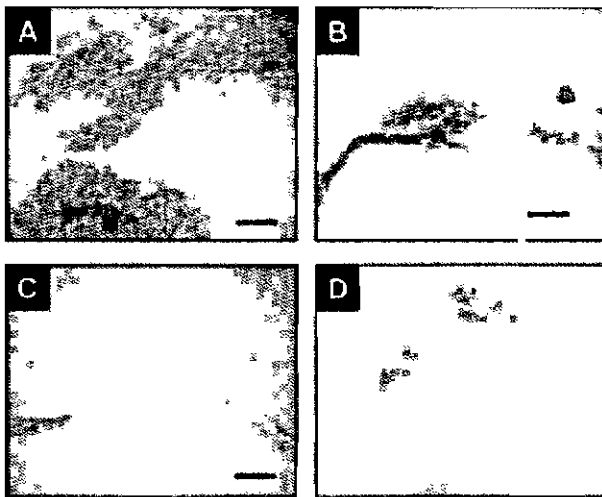


図1. 大量の骨格筋芽細胞移植による梗塞壁の置換

(A) 移植細胞数 5×10^7 個 (B) 5×10^6 個 (C) 5×10^5 個 (D) 5×10^4 個の低倍率像 (x10). 5×10^7 個移植群では梗塞壁のほぼ全層が移植された骨格筋芽細胞で置換されている。

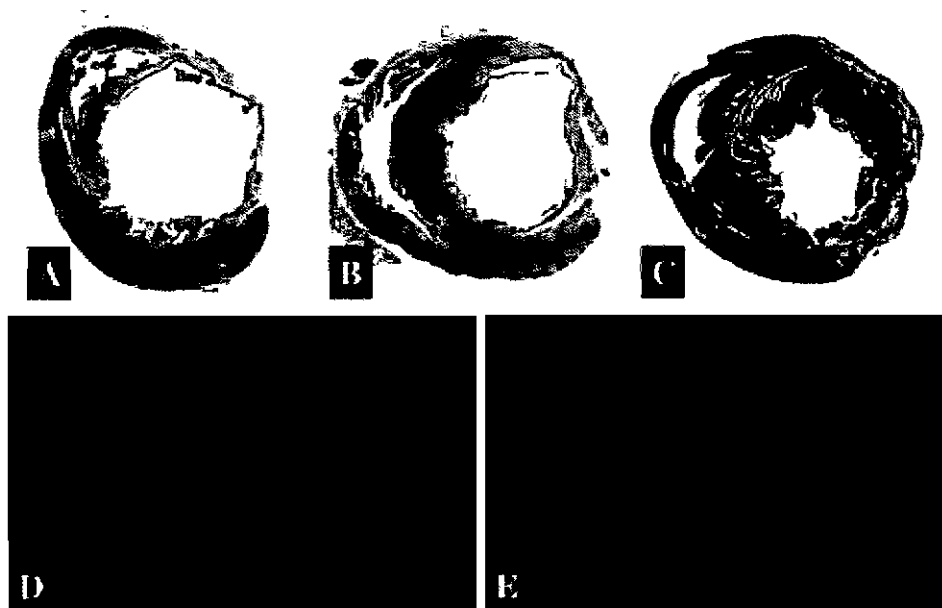


図2: 心筋芽細胞移植前の梗塞巣への bFGF 徐放による血管新生誘導 (prevascularization) の有効性

細胞移植 4 週後では、細胞移植のみの群ではほとんどの移植細胞は傍梗塞領域に観察されたのみであったが (D)、FGF による prevascularization の後に細胞移植をした群では、梗塞領域をふくむすべての瘢痕領域に移植細胞が観察され、さらに瘢痕部の中央にも観察された (E)。また多くの血管が移植組織中および周囲に認められた。左室梗塞壁は 細胞移植群、FGF 群 (B)、prevascularization+細胞移植群 (C) では壁厚を保っていたが、コントロール群 (A) では壁が薄剥化していた。

C: HE (hematoxylin and eosin) 染色 A-D, E: PKH26 蛍光染色

Ⅲ-2-6-2.

インスリン様増殖因子 (IGF-1) と骨髄間葉系幹細胞併用による心血管再生療法の可能性

国立循環器病センター研究所再生医療部
山原研一、永谷憲歳

はじめに

本稿では、インスリン様増殖因子 (insulin-like growth factor-1, 以下 IGF-1)、および IGF-1 の産生を誘導する成長ホルモン (growth hormone, 以下 GH) の循環器系における作用、心不全との関わり、更に、今後、新たな治療法として発展が期待されるその心血管再生治療応用に関し、我々がこれまでに検討を行っている骨髄間葉系幹細胞との併用移植による独自の知見も含め、概説する。

インスリン様増殖因子 (IGF-1) による循環器系での作用

IGF-1 は、IGF-1 の産生を誘導する成長ホルモン (以下 GH) と共に、以前から、心筋に対する増殖因子として、心肥大との関連で研究されてきた [1, 2]。IGF-1 は、肝臓、腎臓以外に、心筋細胞、血管内皮、血管平滑筋細胞において産生され [3, 4]、IGF-1 や GH に対する受容体もこれら細胞に認められることがわかっている [5-7]。このことから、循環器系に対して、GH による直接作用、あるいは、IGF-1 によるエンドクライン、オートクライン、パラクライン的な作用の存在が容易に想像される。しかしながら、これまで、IGF-1 を介した GH による循環器系への作用に関してよく研究されているものの、GH による直接的な循環器系への作用や、循環器系局所から分泌される IGF-1 による作用に関しては、未だはっきり分かっていないことが多い。

これまでの培養心筋細胞を用いた研究から、IGF-1 は蛋白合成を亢進させ [8]、肥大を誘導することが分かっている [1]。更に、GH による直接的な蛋白合成の亢進も確認されている [9, 10]。心筋収縮性に関しては、*in vitro* の系において IGF-1 による増強作用が報告されているものの [11, 12]、IGF-1 を介さない GH による直接的な心筋収縮性に対する効果に関しては、エビデンスがない。しかしながら、*in vivo* においては、IGF-1 を介した GH による心筋収縮性の増強や [13, 14]、ラット GH 欠損モデルにおける収縮性の減弱が指摘されている [15]。また、IGF-1 は培養心筋細胞においてアポトーシスを抑制することが知られているが [16]、これは、IGF-1 受容体を介した PI3 キナーゼ/Akt 系の活性化が関与している [17, 18]。また、筋肉特異的に IGF-1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは、アンジオテンシン II による Akt リン酸化の減少、あるいは、カスパーゼ 3 活性の低下が減弱しているとの報告がある [19]。

IGF-1 の血管系に対する作用に関しても、様々な報告がある。正常ラットに IGF-1 を静脈投与すると、数分以内に平均血圧の速やかな低下が認められる [20]。心不全患者においては、IGF-1 の静脈投与による心拍出量の増加と末梢血管抵抗の減少が約 2 時間持続し [21]、また、GH の静脈投与では、血中 IGF-1 濃度の持続的な上昇が認められる約 24 時間後に、同様の効果が確認されている。これらのことから、IGF-1 が、直接的な血管拡張作用を持つことが明らかとなった。このことは、IGF-1 ヘテロノックアウトマウスを用いた解析においても証明されている。このマウスにおいては、野生型に比べ血中 IGF-1 濃度は約 30% まで減少しており、血圧の上昇も認められた [22]。IGF-1 による血管拡張作用に関しては、血管内皮や平滑筋細胞からの NO 動員 [23, 24]、あるいは、血管平滑筋細胞における Na-K-ATPase の活性化 [25] が関与しているといわれている。

IGF-1 による心不全治療の可能性

臨床的には、GH 補充療法を行っていない GH 欠損症患者において、左室心筋重量および心拍出量の減少が認められる [26]。これらの症例では、GH 補充療法により心重量、壁厚共に増加し、心機能が改善することが明らかとなった [27]。このことから、GH や IGF-1 を用いた心不全の治療薬としての可能性に関する報告がなされるようになった。左冠状動脈結紮によるラット慢性心不全モデルにおいて、GH や IGF-1 の投与により、心拍出量や左室駆出率の増加が認められた [28]。また、GH 欠損症のない拡張型心筋症 [29, 30]、虚血性心筋症 [31] 患者において GH 投与を行った初期のスタディでは、左室駆出率・心拍出量の増加が認められたと報告されている。

しかしながら、最近の無作為化比較試験においては、心不全患者に対する GH の投与により、明らかな心機能改善効果が認められなかったとする報告がなされている [30, 32]。この原因として、重症心不全における GH/IGF-1 抵抗性の可能性が指摘されている他、治療期間が短いこと、患者数が少ないことなどが挙げられている。いずれにせよ、より大規模な無作為化比較試験により、GH 補充による心不全治療効果を検討する必要があると思われる。

IGF-1 補充療法に関しても、多くの研究がなされている。IGF-1 の前処置が、ラットの虚血再灌流モデルにおいて心筋のアポトーシスを抑制することが示されている [33]。IGF-1 を心臓特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスにおいては、心肥大を呈した [34]。また、このマウスを用いた心筋梗塞モデルにおいては、心室腔の拡大や心室壁の菲薄化が野生型に比べ軽減しており、虚血域周囲部の心筋細胞のアポトーシスも抑制されていることが明らかとなった [35]。イヌ心不全モデルにおいても IGF-1 の皮下注射によりアポトーシスが抑制され、心機能が改善することが認められており [36]、今後の臨床応用が期待される。

心不全に対する IGF-1 と間葉系幹細胞(MSC)を用いたハイブリッド治療の可能性

現在、虚血性心血管疾患の新たな治療として、自己骨髄あるいは末梢血由来単核球(mononuclear cells、以下 MNC)移植が臨床応用されている[37]。しかしながら、MNCに限らず、すべての心筋への細胞移植療法において言えることであるが、移植した細胞の大半は心筋に定着せず、アポトーシスに陥ることが知られており[38, 39]、そのことが、細胞移植治療効果の限界につながっていると考えられる。

我々は、骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells、以下 MSC)を用いた難治性心不全患者における新たな治療法の確立を目指し、心臓への MSC 移植の臨床応用研究を行っている。従来の MNC 移植による血管再生効果と我々の MSC 移植を、ラット下肢虚血モデルにおいて比較検討したところ、MNC と比べ MSC 移植群において有意な血管再生の促進を認めた[40]。我々の検討では、MSC は MNC と比較し、VEGF、HGF、IGF-1、アドレノメデュリンといった各種増殖因子を大量に分泌し、更には低酸素にも抵抗性であった[41]。即ち、MSC は各種増殖因子を分泌することで、パラクライン因子として移植組織の血管再生に作用するのみならず、オートクライン因子として、自身の生着性を高めている可能性が示唆された。

Mangi らは、MSC に Akt を遺伝子導入した後に細胞移植を行うことで、移植 MSC のアポトーシスを抑制させ、生着率を高めることで治療効果が増強されたと報告している[42]。我々は、循環ホルモンであるアドレノメデュリンと MSC や骨髄細胞を併用投与することで、移植細胞の生着率を上げ、治療効果を高めることに成功している[43, 44]。また、ラット心筋梗塞モデルを用いた検討から、IGF-1 と MSC を同時に心筋内に投与することで、移植細胞の生着率の向上が認められた。そのメカニズムとして、IGF-1 は、MSC における Akt や ERK1/2 の活性化を促すことから、これらによる抗アポトーシスおよび増殖作用が関与しているものと考えられた。このことから、細胞移植療法のみでは、効果不十分な症例に対しては、MSC と他の増殖因子との併用によるハイブリッド治療法の開発が有効であると思われる。

おわりに

IGF-1 の心不全治療応用の可能性に関し、我々が行っている MSC を用いた心血管再生療法との併用も含め、報告した。既存の骨髄 MNC と比較し、MSC は多くの血管新生因子、増殖因子を分泌することから、パラクライン的に移植組織再生に作用する。更に IGF-1 との併用により、投与 IGF-1 による心筋保護のみならず、移植 MSC に対する保護作用も期待され、相乗的な心血管再生効果をもたらすと考えられる。今後、更に研究を重ね、両者併用による有効性に関し、臨床

応用も含め評価していく。

参考文献

- [1] Ito, H.; Hiroe, M.; Hirata, Y.; Tsujino, M.; Adachi, S.; Shichiri, M.; Koike, A.; Nogami, A.; Marumo, F. *Circulation*, **1993**, *87*, 1715-1721.
- [2] Sacca, L.; Fazio, S. *Nat Med*, **1996**, *2*, 29-31.
- [3] D'Ercole, A.J.; Stiles, A.D.; Underwood, L.E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1984**, *81*, 935-939.
- [4] Delafontaine, P.; Bernstein, K.E.; Alexander, R.W. *Hypertension*, **1991**, *17*, 693-699.
- [5] Mathews, L.S.; Enberg, B.; Norstedt, G. *J Biol Chem*, **1989**, *264*, 9905-9910.
- [6] Isgaard, J.; Wahlander, H.; Adams, M.A.; Friberg, P. *Hypertension*, **1994**, *23*, 884-888.
- [7] Wickman, A.; Friberg, P.; Adams, M.A.; Matejka, G.L.; Brantsing, C.; Guron, G.; Isgaard, J. *Hypertension*, **1997**, *29*, 123-130.
- [8] Donath, M.Y.; Zapf, J.; Eppenberger-Eberhardt, M.; Froesch, E.R.; Eppenberger, H.M. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1994**, *91*, 1686-1690.
- [9] Fong, Y.; Rosenbaum, M.; Tracey, K.J.; Raman, G.; Hesse, D.G.; Matthews, D.E.; Leibel, R.L.; Gertner, J.M.; Fischman, D.A.; Lowry, S.F. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1989**, *86*, 3371-3374.
- [10] Lu, C.; Schwartzbauer, G.; Sperling, M.A.; Devaskar, S.U.; Thamocharan, S.; Robbins, P.D.; McTiernan, C.F.; Liu, J.L.; Jiang, J.; Frank, S.J.; Menon, R.K. *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 22892-22900.
- [11] Freestone, N.S.; Ribaric, S.; Mason, W.T. *Mol Cell Biochem*, **1996**, *163-164*, 223-229.
- [12] Cittadini, A.; Ishiguro, Y.; Stromer, H.; Spindler, M.; Moses, A.C.; Clark, R.; Douglas, P.S.; Ingwall, J.S.; Morgan, J.P. *Circ Res*, **1998**, *83*, 50-59.
- [13] Stromer, H.; Cittadini, A.; Douglas, P.S.; Morgan, J.P. *Circ Res*, **1996**, *79*, 227-236.
- [14] Tajima, M.; Weinberg, E.O.; Bartunek, J.; Jin, H.; Yang, R.; Paoni, N.F.; Lorell, B.H. *Circulation*, **1999**, *99*, 127-134.
- [15] Cittadini, A.; Stromer, H.; Vatner, D.E.; Grossman, J.D.; Katz, S.E.; Clark, R.; Morgan, J.P.; Douglas, P.S. *Endocrinology*, **1997**,

138, 5161-5169.

- [16] Wang, L.; Ma, W.; Markovich, R.; Chen, J.W.; Wang, P.H. *Circ Res*, **1998**, *83*, 516-522.
- [17] Kulik, G.; Klippel, A.; Weber, M.J. *Mol Cell Biol*, **1997**, *17*, 1595-1606.
- [18] Shiraishi, I.; Melendez, J.; Ahn, Y.; Skavdahl, M.; Murphy, E.; Welch, S.; Schaefer, E.; Walsh, K.; Rosenzweig, A.; Torella, D.; Nurzynska, D.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P.; Sussman, M.A. *Circ Res*, **2004**, *94*, 884-891.
- [19] Song, Y.H.; Li, Y.; Du, J.; Mitch, W.E.; Rosenthal, N.; Delafontaine, P. *J Clin Invest*, **2005**, *115*, 451-458.
- [20] Walsh, M.F.; Barazi, M.; Pete, G.; Muniyappa, R.; Dunbar, J.C.; Sowers, J.R. *Endocrinology*, **1996**, *137*, 1798-1803.
- [21] Donath, M.Y.; Sutsch, G.; Yan, X.W.; Piva, B.; Brunner, H.P.; Glatz, Y.; Zapf, J.; Follath, F.; Froesch, E.R.; Kiowski, W. *J Clin Endocrinol Metab*, **1998**, *83*, 3177-3183.
- [22] Lembo, G.; Rockman, H.A.; Hunter, J.J.; Steinmetz, H.; Koch, W.J.; Ma, L.; Prinz, M.P.; Ross, J.; Chien, K.R.; Powell-Braxton, L. *J Clin Invest*, **1996**, *98*, 2648-2655.
- [23] Tsukahara, H.; Gordienko, D.V.; Tonshoff, B.; Gelato, M.C.; Goligorsky, M.S. *Kidney Int*, **1994**, *45*, 598-604.
- [24] Muniyappa, R.; Walsh, M.F.; Rangi, J.S.; Zayas, R.M.; Standley, P.R.; Ram, J.L.; Sowers, J.R. *Life Sci*, **1997**, *61*, 925-931.
- [25] Standley, P.R.; Zhang, F.; Zayas, R.M.; Muniyappa, R.; Walsh, M.F.; Cragoe, E.; Sowers, J.R. *Am J Physiol*, **1997**, *273*, E113-E121.
- [26] Cittadini, A.; Cuocolo, A.; Merola, B.; Fazio, S.; Sabatini, D.; Nicolai, E.; Colao, A.; Longobardi, S.; Lombardi, G.; Sacca, L. *Am J Physiol*, **1994**, *267*, E219-E225.
- [27] Amato, G.; Carella, C.; Fazio, S.; La Montagna, G.; Cittadini, A.; Sabatini, D.; Marciano-Mone, C.; Sacca, L.; Bellastella, A. *J Clin Endocrinol Metab*, **1993**, *77*, 1671-1676.
- [28] Yang, R.; Bunting, S.; Gillett, N.; Clark, R.; Jin, H. *Circulation*, **1995**, *92*, 262-267.
- [29] Fazio, S.; Sabatini, D.; Capaldo, B.; Vigorito, C.; Giordano, A.; Guida, R.; Pardo, F.; Biondi, B.; Sacca, L. *N Engl J Med*, **1996**, *334*, 809-814.
- [30] Osterziel, K.J.; Strohm, O.; Schuler, J.; Friedrich, M.; Hanlein,

- D. ; Willenbrock, R. ; Anker, S.D. ; Poole-Wilson, P.A. ; Ranke, M.B. ; Dietz, R. *Lancet*, **1998**, *351*, 1233-1237.
- [31] Genth-Zotz, S. ; Zotz, R. ; Geil, S. ; Voigtlander, T. ; Meyer, J. ; Darius, H. *Circulation*, **1999**, *99*, 18-21.
- [32] Isgaard, J. ; Bergh, C.H. ; Caidahl, K. ; Lomsky, M. ; Hjalmarson, A. ; Bengtsson, B.A. *Eur Heart J*, **1998**, *19*, 1704-1711.
- [33] Buerke, M. ; Murohara, T. ; Skurk, C. ; Nuss, C. ; Tomaselli, K. ; Lefer, A.M. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1995**, *92*, 8031-8035.
- [34] Reiss, K. ; Cheng, W. ; Ferber, A. ; Kajstura, J. ; Li, P. ; Li, B. ; Olivetti, G. ; Homcy, C.J. ; Baserga, R. ; Anversa, P. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1996**, *93*, 8630-8635.
- [35] Li, Q. ; Li, B. ; Wang, X. ; Leri, A. ; Jana, K.P. ; Liu, Y. ; Kajstura, J. ; Baserga, R. ; Anversa, P. *J Clin Invest*, **1997**, *100*, 1991-1999.
- [36] Lee, W.L. ; Chen, J.W. ; Ting, C.T. ; Ishiwata, T. ; Lin, S.J. ; Korc, M. ; Wang, P.H. *Endocrinology*, **1999**, *140*, 4831-4840.
- [37] Tateishi-Yuyama, E. ; Matsubara, H. ; Murohara, T. ; Ikeda, U. ; Shintani, S. ; Masaki, H. ; Amano, K. ; Kishimoto, Y. ; Yoshimoto, K. ; Akashi, H. ; Shimada, K. ; Iwasaka, T. ; Imaizumi, T. *Lancet*, **2002**, *360*, 427-435.
- [38] Toma, C. ; Pittenger, M.F. ; Cahill, K.S. ; Byrne, B.J. ; Kessler, P.D. *Circulation*, **2002**, *105*, 93-98.
- [39] Reinecke, H. ; Zhang, M. ; Bartosek, T. ; Murry, C.E. *Circulation*, **1999**, *100*, 193-202.
- [40] Iwase, T. ; Nagaya, N. ; Fujii, T. ; Itoh, T. ; Murakami, S. ; Matsumoto, T. ; Kangawa, K. ; Kitamura, S. *Cardiovasc Res*, **2005**, *66*, 543-551.
- [41] Nagaya, N. ; Kangawa, K. ; Itoh, T. ; Iwase, T. ; Murakami, S. ; Miyahara, Y. ; Fujii, T. ; Uematsu, M. ; Ohgushi, H. ; Yamagishi, M. ; Tokudome, T. ; Mori, H. ; Miyatake, K. ; Kitamura, S. *Circulation*, **2005**, *112*, 1128-1135.
- [42] Mangi, A.A. ; Noiseux, N. ; Kong, D. ; He, H. ; Rezvani, M. ; Ingwall, J.S. ; Dzau, V.J. *Nat Med*, **2003**, *9*, 1195-1201.
- [43] Iwase, T. ; Nagaya, N. ; Fujii, T. ; Itoh, T. ; Ishibashi-Ueda, H. ; Yamagishi, M. ; Miyatake, K. ; Matsumoto, T. ; Kitamura, S. ; Kangawa, K. *Circulation*, **2005**, *111*, 356-362.
- [44] Hanabusa, K. ; Nagaya, N. ; Iwase, T. ; Itoh, T. ; Murakami, S. ; Shimizu, Y. ; Taki, W. ; Miyatake, K. ; Kangawa, K. *Stroke*, **2005**, *36*, 853-858.

Ⅲ-2-6-3. HGF を基盤とした再生医療の現状と展望

大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

森下竜一

1) HGF の血管新生作用の分子機構

HGF (Hepatocyte Growth Factor:肝細胞増殖因子) は、本邦で肝臓の再生因子として 1980 年代初頭に発見された増殖因子である。その後の検討で、肝臓だけでなく腎再生など多くの臓器で再生に関与していることが明らかにされてきている。HGF は、クリングル構造をもちクリングルファミリーに属しているが、他にこのファミリーにはアポリポプロテイン(a)や t-PA などがある。同じファミリーに属するアポリポプロテイン(a)は血管平滑筋細胞や内皮細胞を増殖させることを我々は見つけており、HGF にも同様の作用があることを予測し、1994 年に HGF は血管内皮細胞の増殖・遊走を促し、強力な血管再生を持つことを明らかにした。一方、HGF は同じクリングルファミリーでもプラスミノゲンのような血栓・止血に関する作用はない。また、HGF は平滑筋細胞において遊走は刺激するが、増殖刺激作用は無く、FGF (Fibroblast Growth Factor:繊維芽細胞増殖因子) と VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor:血管内皮特異的増殖因子) の中間に属する作用を持っている。現在では平滑筋細胞の遊走作用が血管形成時に見られる浮腫の発生に関係していることがわかっているが、HGF は VEGF とは異なり、浮腫を惹起しないことは临床上特記すべき事項である(この点は、後ほど述べる臨床試験でも確認された)。

さらに、HGF は内皮細胞や心筋細胞に対する強い抗アポトーシス作用も有している。HGF による増殖作用は、ERK を介する古典的な MAP キナーゼ系を利用している一方、抗アポトーシス作用は Akt を介した bcl-2 の発現亢進、bax のトランスロケーション阻止などが主要な分子機構である(図 1)。

HGF の血管新生作用は、in vivo でラットおよびウサギ閉塞性動脈硬化症モデルにおいて確認された。HGF タンパク投与や虚血筋肉への HGF プラスミド DNA 投与により血管新生と血流増加が明らかになり、新生血管はいわゆる毛細血管の形成ではなく、HGF は arteriogenesis (動脈形成) を起こすことも示されている。

2) HGF 遺伝子治療の現況

末梢性血管疾患に対する HGF の臨床試験は、大阪大学でのオープンラベルの臨床研究（閉塞性動脈硬化症及びビュルガー病を対象としたフェーズ I/IIa）、アンジェス MG 社による国内での閉塞性動脈硬化症を対象としたプラセボ対照二重盲検試験（フェーズ III）及びビュルガー病を対象としたオープンラベル一般臨床試験（フェーズ III）、米国での閉塞性動脈硬化症を対象としたプラセボ対照二重盲検試験（フェーズ II）及びその追加試験としてプラセボを対照とした投与方法の検討試験（フェーズ II）、以上の 5 試験が行われている。現在までに結果が明らかになっているのは、大阪大学での臨床研究と米国でのプラセボ対照二重盲検で、他の試験は現在進行中である。大阪大学での臨床研究は、2001 年 6 月より開始され、安静時痛または虚血性潰瘍・壊死を有する閉塞性動脈硬化症あるいはバージャー病の患者が対象である。罹患肢筋肉に HGF 遺伝子プラスミドを 4（もしくは 8）カ所注入する。全症例数は 22 症例で、最終症例に対する遺伝子プラスミド投与は 2002 年 11 月 18 日に終了した。副作用に関しては投与部位の出血・痛みなど遺伝子投与および投与手技と因果関係が完全には否定できない有害事象はあったが、その程度は臨床的に許容範囲内であり、安全性に問題はなかった。なお、悪性腫瘍の発生は認めていない。

HGF 遺伝子投与後 2 ヶ月の初期成績は、有効性（改善度）に関しては、改善度を検討する評価項目として上下肢血圧比（ABI）・安静時疼痛スケール（VAS）・虚血性潰瘍のサイズ・歩行可能距離の延長を評価した。ABI の 0.1 以上の上昇は測定可能症例 17 症例中 11 症例（64.7%）に認められた。VAS の 1 cm 以上の改善は、13 症例中 12 例（92.3%）、2cm 以上の改善は、安静時疼痛を有する 13 症例中 8 症例（61.5%）に認められている。虚血性潰瘍の 25%以上の縮小は、潰瘍を有する 11 症例中 7 症例（63.6%）に認められた。歩行可能距離の 25%以上の改善は、間欠性跛行を有する 7 症例中 6 症例（85.7%）に認められた。全症例の解析では、Fontaine IIb では 7 例中 6 例が、有効、Fontaine III では 4 例中 3 例（75%）が有効、Fontaine IV では 11 例中 9 例が有効であった。これらのことを総合的に考慮し、一項目以上の改善方向への変化を認めた症例は 22 症例中 18 症例（81.8%）と判定された。

米国では、FDA との協議を経て、大阪大学での臨床研究をフェーズ I/IIa と位置付け、フェーズ I を実施することなく、フェーズ II として、100 例の患者でプラセボを対象として二重盲検試験が実施された。対象となる被験者は、閉塞性動脈硬化症で安静時疼痛や潰瘍を有し、薬物治療やバイパスやカテなどの外科治

療が困難な患者である。低用量(0.4mg)及び高用量(4mg)が設定され、高用量 HGF 群では、TcPO₂ (末梢酸素分圧) の有意な改善がプラセボ群と比較して見られたが、発症頻度が低いため下肢切断や死亡率では有意差は認められなかった。米国では、TcPO₂ は末梢の血行動態を評価する最も良い検査のひとつとされており、30 mmHg 以上へと改善することにより下肢切断を回避できると考えられている。HGF は”Proof of Concept”といわれる血管新生による機能評価でプラセボとの比較で初めて目標を達成した血管新生治療として米国血管外科学会などで高く評価されており、現在フェーズ III の準備中である。副作用に関しては、日本と同様な結果であった。

国内でのプラセボ対照二重盲検フェーズ III 試験は、2007 年 1 月には治験薬投与例数が解析に必要な設定数に達したことが報告され、年内には結果が明らかになるものと思われる。

3) 虚血性心疾患に対する HGF による治療

HGF が、心臓領域においては血管新生作用に加えて、心筋細胞に対する抗アポトーシス作用、TGF- β 発現抑制及び MMP 活性化増強作用を介した線維化に対する改善作用、不整脈発生の抑制作用が報告されており、FGF や VEGF よりも優位性の高いユニークな保護因子であると考えられている。動物実験においては、ラット及びイヌ、ブタにおける急性及び慢性心筋梗塞モデル、ラット及びブタ心臓移植モデル、ハムスター及びイヌ心不全モデルなど多くのモデルにおいて直接的な HGF プラスミド DNA 投与の有効性が明らかにされている。臨床においては、現在までのところ、アンジェス MG 社による米国での重症狭心症患者におけるフェーズ I 試験が唯一の試験である。本試験は、9 例の重症狭心症患者に針付きカテーテルを用いて直接心筋内へ HGF プラスミド DNA を投与する試験で、低用量 3 人と高用量 6 人への投与が行われた。安全性には問題のないことが明らかにされているが、有効性の検討はこれから行う予定である。一方、心臓領域においては細胞治療やセル・シートとの融合治療が積極的に実験レベルでは検討されている。筋芽細胞や線維芽細胞を、HGF を分泌させるためのプラットホームとして利用しようという考え方で、今後細胞治療の実用化が進めば、有望な手段になりうる。現在までの幹細胞研究により、心筋細胞への分化の割合は極めて低く、細胞融合を入れても治療に十分な量を確保するのは困難であるとするのが欧米では一般的で、幹細胞から分泌される心保護作用を有するサイトカインを同定し、細胞治療と組み合わせるハイブリッド治療が

想定されているので、HGFは有望な候補である。

4) 血管新生医薬の実現のための審査指標

ウイルスベクターの安全性が未だ確立していない現状では、ウイルスを用いた遺伝子投与は実際の臨床においては使用しにくい。したがって、ベクターとしてプラスミドを使用する方法は、現段階でもっとも医薬に適していると考えられる。VEGFやHGFは分泌蛋白であるので、すべての細胞に遺伝子が導入される必要がなく、部分的に導入されるだけでも局所濃度を上げることが可能であり、保存に関しても長期保管に適しており、当面プラスミドDNAを中心に遺伝子医薬品の開発が進むと考えられる。そのような状況の中で審査に関する指標などを考えたい。

品質：バイオロジクスである以上は、プラスミドDNAについてもその品質を考慮しなければならないが、プラスミドDNAはモノクローナル抗体たん白とは異なり、いくつもの高次構造が存在するわけではなく、高次構造に起因する予期しない安全性上の問題を懸念する必要はない。また、製造に関しても、高次構造を考慮する必要がほとんどないため、モノクローナル抗体のような他のたん白製剤に比して、安定した一定の品質の製剤製造が可能となっている。

安全性：基本的な全身毒性に関しては従来と変わらない。ただ、長期にわたり慢性的に投与するか、または単回投与かによって、安全性評価は大きく異なる。血管新生治療の場合、基本的には単回もしくは限られた少数回での投与が想定されており、治療実態に即した規制上の安全性判定が重要である。

また、ウイルスベクター、プラスミド、細胞などの個別の安全性の検討が前臨床試験では必要であるが、これは別途項目があるので、ここでは述べない。HGFのような血管新生作用のある増殖因子の安全性に関しては、全身投与であるか、局所投与であるかにより、視点は大きく異なるし、審査上も大きく異なるべきであると考えられる。当然全身投与であれば、暴露される臓器も必然的に多くなり、この観点からは従来の低分子の化学合成医薬品と同様な基準になるであろう。

一方、局所治療に関してはどうか？この場合、血液中濃度が生理的範囲を超えて過剰に増加するか、生理的範囲内に収まるかが、審査の重要なポイントであろう。生理的範囲の10倍を超えるような増加を示すのであれば、これは全身投与と同じ考え方をを用いるべきであるが、局所投与としては現実的ではなく想定しがたい。逆に、生理的範囲内に収まれば、全身投与であったとしてもリスクは殆どないとみなすことが出来る（シロリムスをコーティングしたサ

イファーステントなども同様である)。HGF に関しては、現在までの全ての臨床試験においてヘパリンへの結合性が極めて高いために局所に留まり、血液中の濃度は増加せず、典型的な局所治療になっている。この場合、安全性上考慮すべき点は実際には多くないと考えられるが、局所での刺激性・異常血管新生などについては評価すべきであろう。一方、がん原性やがん増殖作用などに関しては、HGF ががん原性を持たないことから、がん原性を確認する試験については必要とは考えられないが、腫瘍細胞を増殖する可能性は否定できないことから、安全性を確認するための試験を考慮する必要があるであろう。

5) 有効性評価において留意すべき指標、方法、評価の考え方

血管新生の客観的評価

現在血管新生の客観的評価は大変困難であり、各種臨床試験の中でも明確なものはない。現在の造影(DSA、MRI など)などでは血管新生治療で形成されると想定される 10 μ M のサイズは造影するのは困難であり、新しい評価方法が必要である。一例としては、フラクタル解析を用いた方法などが今後考慮されるべきであろう。また、機能的評価方法である SPP (skin perfusion pressure : 皮膚還流圧測定) や TcPO₂ などを活用することも合理的である。特に、TcPO₂ は欧米では外科手術の評価も含めて最も信頼に足る指標として重要視されており、二次評価項目としては有用であろう。

臨床試験のデザイン

既にいくつかの臨床試験においてプラセボ効果が存在することは確認されている(約 30-40%と想定されている)。国内におけるプラセボとの比較試験は容易ではないが、基本的には望ましい。その場合も、観察期間の設定や用量試験のデザインなども議論が多い。特に、細胞治療や遺伝子治療では、低分子化学合成医薬品とは異なり、用量設定は容易ではない。また、エンドポイントに関しては、欧米とわが国においては疾病の自然経過や治療方針が異なり、欧米では下肢切断が多いのに対し、国内では頻度が少ないという現実がある。従って、国内と欧米では異なるエンドポイントの設定が自然である。具体的には、国内では潰瘍の改善率や疼痛の改善率など患者の具体的な不満や臨床症状の改善を評価するエンドポイント(具体的には潰瘍の改善率+安静時疼痛の改善の複合エンドポイント)を使用すべきである。

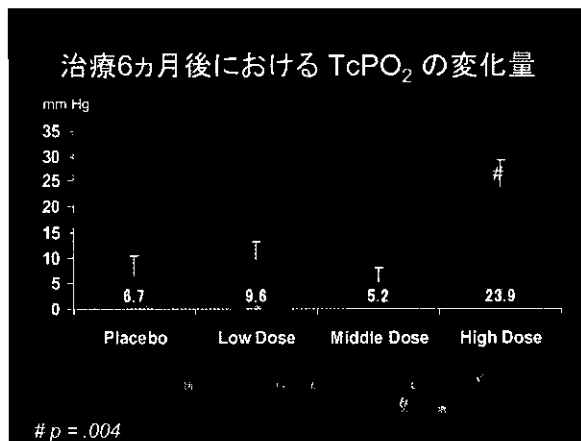
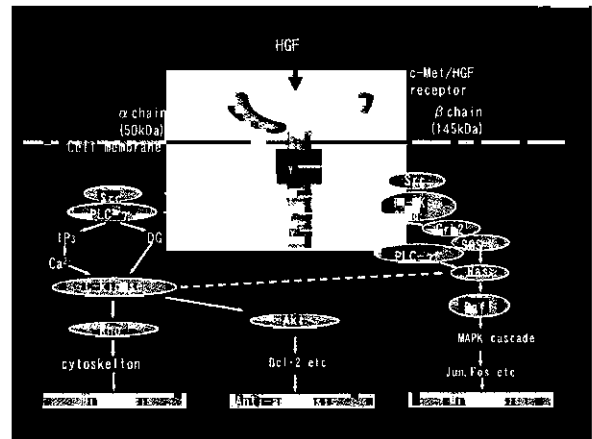
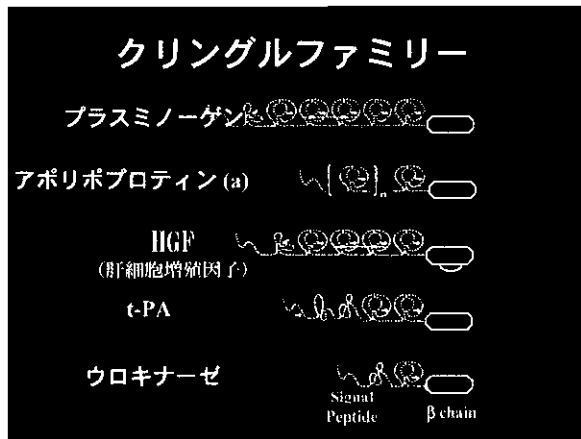
副作用評価

副作用に関しては、従来より懸念されているがんや網膜症に関する評価は重要であるが、その際に血液中濃度の変動などの合理的な理由に基づくリスク・ベネフィット解析を行うことが重要である。なお、細胞治療との組み合わせに関しては、細胞治療に伴うイベントや再狭窄率の増加などが報告されており、単なる HGF 遺伝子による局所治療とは異なった副作用が発現する可能性は否定できない。

投与後のフォローアップ調査、すなわち遅発型の副作用に関しては、遺伝子治療単独においては遺伝子の消失期間がプラスミドで 1 ヶ月程度と考えられていることから、長くても 2 年程度の確認で十分であろう。一方、細胞治療と組み合わせた場合は細胞の消失期間が現状では検討されておらず、その結果によって決められるのが妥当であろう。

6) 臨床的適応の決定

この点に関しては評価項目でないが、重要であると考えられる。細胞治療の現状では、Fontaine 1 度などの軽症患者に対しても一部病院では行われており、当初の血管新生療法の適応から大きくずれてきている。まずは、Fontaine III-IV 度の重症虚血下肢患者を対象に有効性と安全性を検討すべきであり、特段の問題がないことが確認された後、Fontaine IIb までを対象にされるべきであると考ええる。



血管再生療法の限界と今後の課題

血管新生の客観的評価
 造影(DSA, MRIなど)/ABI/TcPO₂など
臨床試験のデザイン
 プラセボ、観察期間、用量、エンドポイント
 副作用 (短期+長期)
 イベント、再狭窄、ACS、がん、網膜症
臨床的適応の決定
 Fontaine IIb-IV、リスクファクターなど
 長期効果、長期予後 (死亡率は?)
 併用療法 (薬物、外科的手法)

TcPO₂による血管新生の評価

1. 皮膚微小循環の評価が可能
2. 血管新生でできる血管は150から200ミクロンで、微小血管
3. 潰瘍の改善や下肢の切断の指標として広くしようされている
4. 欧米の血管外科に最も広く使用され、信用できる評価とみなされている

TcPO₂ 測定部位

III-2-6-4. VEGF による血管新生促進療法

東海大学医学部再生医療科学
先端医療センター研究所
浅原孝之

1994年12月、Jeffrey M Isner 教授がボストンのセントエリザベスメディカルセンターにおいて、下肢血管閉塞症患者に対する、血管内皮増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) の遺伝子を用いた血管新生療法が開始された(1)。これは、循環器学界における世界初の遺伝子治療で、現在は重症虚血性心疾患のケースを含め 100 例以上を数えており、その効果は今まで治療が不可能だった例に画期的な血行の改善をもたらしている。

血管新生促進療法のコンセプトは古くからあったが、近年の molecular biology の発達に伴う、数々の growth factor の発見が臨床応用を実現させたもので、本稿では血管新生促進療法としての VEGF の作用をまとめて報告する。

Juddy Folkman

Angiogenic growth factor (血管新生増殖因子) とその治療応用の概念は、“血管新生”のパイオニア Juddy Folkman によって30年近く前に確立された(2)。彼は癌の発達は血管新生に依存していることを突きとめ、その際に癌から血管新生を招く増殖因子が発現されることを明らかにし、増殖因子の働きで既存の近傍血管から血管内皮細胞を増殖、遊走させ新たな血管を作り出す過程を“angiogenesis”と定めた。さらに、この血管新生が腫瘍形成に不可欠なもので、angiogenic switch が掛かったとたんに癌発育浸潤が進むことを明らかにしたのも彼の専門の仕事である(3)。その後、彼のラボで endostatin, angiostatin, などの内因性血管新生抑制因子が発見され、マウスの癌を退縮させる事に成功している。

血管新生増殖因子

ここ数年で数々の因子が血管形成を調節していることが判明した。癌治療には血管新生を抑制させねばならないが、反対に血管形成を促進する治療法も求められるようになってきた。下肢閉塞性動脈硬化症、心筋梗塞などの虚血性心疾患は血行改善が不可能に陥った状態の疾患であるため、血管新生療法が究

極の治療法と考えられるからである。近年の動物実験を通じて、VEGF, basic FGF, HGF, GM-CSF/G-CSF, Angiopoietin-1 などの増殖因子を下肢虚血あるいは心筋虚血モデルに投与すると、血管新生が促進され血行改善に結びつくことが示された。その中でも、VEGF は血管内皮細胞に特異的な増殖分化因子で、血管形成におけるその本質的な働きから、多くの注目を集めるに至った。

Vascular Endothelial Growth Factor (血管内皮増殖因子)

VEGF は腫瘍細胞の分泌する血管透過性誘進因子として、また下垂体ろ胞細胞培養上清中の血管内皮細胞特異的な増殖因子として1980年代に発見された(4, 5)。PDGF に類似の構造を示し、分子量45 kD の分泌性タンパク質で、発見の経緯からも VEGF の主な生物活性は、血管内皮細胞の増殖遊走と透過性誘進と考えられている。最近になって血管内皮前駆細胞が骨髄由来で血液中に存在することが確認され、この細胞の分化増殖等に深くかかわっているも判明している。

VEGF は、上皮系細胞から間葉系細胞まで様々な種類の細胞によって分泌されることがわかっており、正常体内でも発現され、血管内皮の維持修復および血管機能の保全に携わっている。ところが、生体条件が変わると VEGF の分泌にも変化が現われ、異なる役目を担うことになる。虚血性疾患、腫瘍形成、創傷治療の患部では組織の虚血が引き金になり、大量の VEGF が分泌され新たな血管を形成する機序(血管新生)が引き起こさる。生理的な、子宮内あるいは卵巣内の血管形成も VEGF の分泌誘進とともに引き起こされる。これらの VEGF の分泌変化は、基礎実験によって、低酸素状態、ホルモン、サイトカインなどの刺激で局所の細胞が VEGF の分泌を一時的に増加させていることがわかっている。つまりこの VEGF 分泌調整が、病理学的および生理学的血管形成を司っていると考えられる。しかし、近年のわれわれや他のラボの研究で、加齢、高脂血症、糖尿病、などの原因で必要な内因性 VEGF 分泌が惹起されず、血管形成不全に陥っていることが判明した。そこで研究されたのが、この増殖因子 VEGF を外因性に補う血管新生療法である。

VEGF 遺伝子治療---基礎実験

最初にこの動物実験を施行したのは、現国立循環器病センターの竹下聡である。彼は St Elizabeth's Medical Center のラボで、兎の慢性下肢動脈閉塞性虚血モデルを開発し、VEGF タンパク投与による血管新生療法の有効性を証明し

た(6)。続いてこのモデルを発展させ、VEGF の遺伝子治療実験に応用した(7)。カテーテルバルーンにコーティングされているハイドロジェルに VEGF の遺伝子が組み込まれたベクターを取りこませ、虚血部位上流の血管に用意したカテーテルで遺伝子を導入した。遺伝子治療30日後、生理学的(血管造影、血流量測定、血圧測定)、組織学的(血管の免疫学的染色)な検査から、遺伝子治療による血管新生が大いに促進され、虚血部位に十分な側副血行路を造成していることが確認された。RT-PCR 検査により、実際遺伝子治療部位から約3週間 VEGF の mRNA が発現を続けていることも判明した。虚血部位の筋肉内への遺伝子導入治療も考案され実験が始まった。これは、現東京女子医大心研の鶴見由紀夫によって発表された(8)。兎の下肢動脈閉塞性虚血モデルに、筋肉内 VEGF 遺伝子導入し、約三週間にわたって遺伝子が発現発現されタンパクが分泌されていることを確かめた。下肢の虚血は、側副血行路の発達とともに改善され、組織学的に多量の血管新生が確認された。

この VEGF の過剰発現によって虚血組織にさらなる血管新生を確認したが、他の正常組織では新たな血管形成はまったく確認することはなかった。実際正常部位の血管内皮細胞でも、VEGF のリセプター(flk-1, flt-1 etc) は発現されている。これは、正常部位と虚血部位の血管内皮細胞におけるリセプター/リガンド(VEGF) システムの作用が異なることを示している。VEGF の過剰発現が選択的に虚血部位での血管新生作用にしか働かないことは、安全性の面で朗報であった。

この他に多くの安全性および有効性の基礎データ提出により、1994年9月この遺伝子治療は RAC (組み換え DNA 委員会) および FDA (食品医薬委員会) で承認され、1994年12月臨床治療が始まった。

下肢虚血に対する VEGF 遺伝子治療---臨床治療

1994年12月当時、全米にはすでに100を数える遺伝子治療のプロトコールが承認され、実行されていたが、循環器領域で初めての治療ということで、全米の注目を浴びて始まった。対象患者は既存の服薬治療および外科治療(バイパス手術)での症状改善が見られず、潰瘍壊死の進行により将来的に切断手術の可能性がある下肢閉塞性動脈硬化疾患患者である(1)。基礎動物実験と同様、ハイドロジェルバルーンに単体 VEGF-DNA プラスミッドを取りこませ、虚血部位上流の血管に遺伝子を導入した。さらに筋肉内遺伝子治療も承認され1995年より開始された。

多くの例で数日以内に安静時疼痛軽減が得られ（これは VEGF の血管拡張作用と思われる）、4、8 週間後の血管造影、MRI 造影で新たな血管陰影、虚血部位での循環改善が確認された(9)。大多数の例で ankle-brachial index の改善、疼痛改善服薬の減少あるいは中止、半数以上の患者さんで下肢の潰瘍の寛解治癒を確認できた。結果的に多くの例で、下肢切断手術の適応を免れて経過観察をしている。

虚血性心疾患の VEGF 遺伝子治療---臨床治療

1997 年末、下肢閉塞性動脈硬化症の成功を受けて、虚血性心疾患患者の遺伝子治療が承認され、現在まで約 60 例が行われた(11)。心筋梗塞症あるいは狭心症患者で内科的および外科的治療が無効の例を対象とし、VEGF 遺伝子治療で新しい血管を形成し血行再建をはかろうというわけだ。最初のプロトコールでは、胸壁小開窓による直視下での心筋内遺伝子導入が始められた。術中の遺伝子挿入部位は食道内エコーでコントロールされ、総量 2mg の単体 VEGF-DNA プラスミッドが心筋内に注入される。1999 年 7 月から経皮経管的カテーテル心筋内遺伝子治療も始まった。NOGA システムを用いてカテーテル先から心室内表面の心筋電位および動態を確認しながら、カテーテルに内蔵された注射針で遺伝子を注入していく方法である。

本治療は、自覚症状、画像学的診断で、良好な治療効果が確認された(12)。特に quality of life の面でいうと、今までどの治療も無効だった患者を集めて行われているだけに、その効果は新たな治療領域を拓げつつあると考えられる。

タンパクか遺伝子か

VEGF タンパクを用いた虚血性心疾患治療も開始された。逆に、VEGF 遺伝子治療が承認された当時、タンパクの臨床応用申請も進んでない時点で、なぜタンパクではなく遺伝子なのか驚きの声も多かった。ヒト合成タンパクの場合、完全な内因性タンパクでないため FDA の審査が厳しかったという問題もあったが、タンパク治療と遺伝子治療の最大の違いは、治療効果にある。単体 DNA プラスミッド遺伝子導入のような一時的で弱い遺伝子発現のケースでも、少量の持続性分泌で、より目的部位局所的に必要なタンパクを到達させることができる。この少量発現性による副作用の少なさと治療効果の高さが、承認の決め手になったと思われる。実際、後年 VEGF タンパクを用いた心筋梗塞治療の臨床研

究がカルフォルニア大学で試されたが、有効性を示すことに失敗している。

VEGF 遺伝子治療の問題点

しかし、VEGF 過剰発現に関しては重大な懸念が残っている。VEGF は、血管新生がその病態の進行に寄与しているような血管新生性疾患（癌、糖尿病性網膜症、など）、の機序に深くかかわっている。そこで、遺伝子治療申請において、この点が問題となった。実質問題として、遺伝子治療での VEGF の過剰発現で新たに発病することはいえませんが、血管新生性の基礎疾患を有している場合、病態の悪化の可能性がある。そのため、遺伝子治療候補の患者は、腫瘍の有無、糖尿病による網膜症の有無とはじめとする、全身スクリーニング検査が事前に義務づけられた。

単体 DNA プラスミッド遺伝子治療

この遺伝子治療、動物実験結果および他の研究結果からも示されている通り DNA 単体プラスミッド遺伝子治療は、一時的遺伝子導入で導入効率も限られている。ところが、この点が治療の必要性和安全性を考えた場合、大きなメリットになることが判明した。引き起こされる血管新生は、数週間で過程を終了するため、3週間の分泌は副作用を避けるためには理想的である。VEGF 自体分泌性増殖因子であるため、発現細胞でのみ働く、あるいはその隣接する細胞にのみ働くような因子ではなく、細胞から分泌し周辺組織および血行を利用してさらに拡散される。遺伝子導入された局所だけではなく、その周辺および血行経路での広範囲の効果が期待できるため、高効率で広い範囲への遺伝子導入である必要がないわけだ。もっと高効率な遺伝子導入を期待する場合には、アデノウイルスのような体内に直接投入するには安全性の面で問題が残されているベクターを用いなければならない。こういった理由で、現在日本で進んでいる HGF の遺伝子治療も、この単体 DNA プラスミッド遺伝子導入法を起用している。

血管新生療法の将来

現在では多施設で血管新生治療を目的とした遺伝子治療が進められている。当初は、他の遺伝子治療と比べて症例の重大性を問題にする向きもあった。直接の致死性の疾患ではないのに、遺伝子治療が必要かという疑問がもたらされた。しかし、遺伝子治療の捉え方自身も変わってきており、遺伝子治療は救命

性のものでなく、Quality of life のための治療として考えられるようになってきている。その先駆例として、St Elizabeth' s Medical Center の虚血性疾患に対する遺伝子治療は大きな注目を集めてきた。良好な結果の報告とともに、同様の遺伝子治療が循環器学領域に拡大しつつある。狭窄性動脈硬化部位に対する angioplasty 後 restenosis の予防の為の血管内皮再生療法というのがある(13-15)。VEGF を応用したこの遺伝子治療による血管内皮再生療法も臨床試験が続けられている。

しかし、技術的にはまだまだ解決されるべき点が多く残されている。遺伝子発現の期間、容量を調節できないか、目的部位選択的に効率良く治療できないか、などいろいろ検討が続いている。

血管内皮前駆細胞による血管発生療法

1997 年、血管内皮前駆細胞が成体の血液中に存在し、重症虚血部位の血管形成に関与することが発見された(16)。実はこの血管内皮前駆細胞は、VEGF の遺伝子治療研究のなかで、偶然発見された細胞である。VEGF 遺伝子を導入された血管を早期(導入3-5日後)の段階で取り出して観察したところ、遺伝子導入部位の血管表面に、大量の血液細胞が集積しており、コロニー状に増殖分化している様子が確認された。この細胞を追求したところ、骨髄由来で血液中を流れている未分化細胞であることが判明した。

この機序は、胎児期のみ存在するとされた血管発生(Vasculogenesis)、つまり血管内皮前駆細胞が未分化のままその場所にたどり着き、増殖、分化することで血管を構築する過程、に一致し、これまで考えられてきた成体の血管形成、既存隣接血管の血管内皮細胞による増殖、遊走により成立する血管新生 Angiogenesis(2)、とは異なる概念が生まれた(17-19)。

この末梢血液あるいは骨髄より集められる血管内皮前駆細胞を、細胞治療あるいは遺伝子治療に応用しようという基礎研究・臨床研究が現在進んでいる(20)。この細胞を *ex vivo* で増殖分化させ、虚血モデルの動物に投与すると、細胞は選択的に血管新生部位に集積し、新しい血管の一部になる。この機序を利用し集めた血管内皮前駆細胞に血管新生増殖因子の遺伝子導入し、細胞移植しようという試みは、将来 VEGF 遺伝子治療を安全かつ強力に推し進める可能性を有している。

文献

1. Isner J. M., K. Walsh, J. F. Symes, A. Piezcek, S. Takeshita, J. Lowry, K. Rosenfield, L. Weir, E. Brogi, D. Jurayj. Arterial gene therapy for therapeutic angiogenesis in patients with peripheral artery disease. *Circulation*. 1995;91:2687-2692.
2. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971;285:1182-1186.
3. Hanahan D., J. Folkman. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996;86:353-364.
4. Ferrara N., W. J. Henzel. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;161:851-855.
5. Senger D. R., S. Galli, A. M. Dvorak, C. A. Perruzzi, V. S. Harvey, H. F. Dvorak. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 1983;219:983-985.
6. Takeshita S., L. P. Zheng, T. Asahara, L. Q. Pu, N. Ferrara, J. F. Symes, J. M. Isner. Therapeutic angiogenesis: A single intra-arterial bolus of vascular endothelial growth factor augments collateral vessel formation in a rabbit ischemic hindlimb. *Circulation*. 1993;88:1-370-0.
7. Takeshita S., L. Weir, D. Chen, L. P. Zheng, R. Riessen, C. Bauters, J. F. Symes, N. Ferrara, J. M. Isner. Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;227:628-635.
8. Tsurumi Y., S. Takeshita, D. Chen, M. Kearney, S. T. Rossow, J. Passeri, J. R. Horowitz, J. F. Symes. Direct intramuscular gene transfer

of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation*. 1996;94:3281-3290.

9. Isner J.M., A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, T. Asahara, K. Rosenfield, S. Razvi, K. Walsh, J.F. Symes. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet*. 1996;348:370-374.

10. Baumgartner I., A. Pieczek, O. Manor, R. Blair, M. Kearney, K. Walsh, J. M. Isner. Constitutive expression of phVEGF165 following intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation*. 1998;97:1114-1123.

11. Losordo DW, PR Vale, JF Symes, CH Dunnington, DD Esakof, M Maysky, AB Ashare, K Lathi, JM Isner. Gene therapy for myocardial angiogenesis: Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 1998;98:2800-2804.

12. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE, Maysky M, Esakof DD, Symes JF, Isner JM. Left ventricular electromechanical mapping to assess efficacy of phVEGF(165) gene transfer for therapeutic angiogenesis in chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 2000;102:965-74.

13. Asahara T., C. Bauters, C. J. Pastore, M. Kearney, S. Rossow, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, J. M. Isner. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995;91:2793-2801.

14. Asahara T., D. Chen, Y. Tsurumi, M. Kearney, S. Rossow, J. Passeri, J. Symes, J. Isner. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function following phVEGF165 gene transfer.

Circulation. 1996;94:3291-3302.

15. Isner JM, K Walsh, R Schainfeld, T Asahara, K Hogan, A Pieczek. Arterial Gene Therapy for Restenosis. *Human Gene Therapy*. 1996;7:989-1011.

16. Asahara T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzgenbichler, G. Schatteman, J. M. Isner. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:965-967.

17. Takahashi T, C Kalka, H Masuda, D Chen, M Silver, M Kearney, M Magner, JM Isner, T Asahara. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Med*. 1999;4:434-438.

18. Asahara T, T Takahashi, H Masuda, C Kalka, D Chen, H Iwaguro, Y Inai, M Silver, JM Isner. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone-marrow derived endothelial progenitor cells. *EMBO*. 1999;18:3964-3972.

19. Asahara T, H Masuda, T Takahashi, C Kalka, C Pastore, M Silver, M Kearney, M Magner, JM Isner. Bone marrow origine of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999;85:221-228.

20. Isner JM, T Asahara. Angiogenesis and Vasculogenesis as Therapeutic Strategies for Postnatal Neovascularization. *J Clin Invest*. 1999;103:1231-1236.

Ⅲ-2-6-5. アンジオポエチンと血管新生

名古屋大学大学院医学系研究科

室原豊明

血管系は種々のサイトカイン・成長因子・生体内活性物質・炎症性細胞などによって、時間的・空間的に巧妙に制御されている。その中で、血管内皮細胞や未分化な血球系幹細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼを介するシグナルは、個体の発生から病態までさまざまな過程での血管新生の制御に関わっている。本稿では、受容体型チロシンキナーゼの1つである Tie2 およびそのリガンドである Angiopoietin (Ang)のシグナルの血管システムにおける役割と、Angiopoietin-1 (Ang-1) の遺伝子を用いた細胞移植との併用による新しい血管新生療法の基礎的検討について概説する。

はじめに

生体活動は酸素と栄養補給に依存することから、生体内では酸素・栄養運搬を担う血液循環システム（血管系）が正常に作動することは生命維持にとってかつ不可欠なことである。そのため血管系は末梢の組織まで血流供給が過不足なく行えるように種々の血管新生因子によって時間的、空間的に巧妙に制御されている。その中で、血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2 を介する Angiopoietin (Ang)のシグナルは血管内皮細胞と周皮細胞（pericyte）間の相互作用、および隣り合う血管内皮細胞間の接着を制御し血管構造の恒常性維持とリモデリングに関与している。さらに、近年 Ang に構造上類似した分子として報告された未だ助様態の同定されていないリガンドであるアンジオポエチン様因子(Angptl)が、血管新生作用や血管以外の細胞への多面的作用を示し、さまざまな病態でかかわっていることがわかってきた。本稿では、主に Angiopoietin から見た血管システム制御とそれによる我々が最近行った血管再生療法の基礎研究について概説する。

1 Angiopoietin の生物学的作用

1) 血管新生における Angiopoietin の役割

Angiopoietin は、造血幹細胞などの血球系細胞と血管内皮細胞に豊富に発現する受容体型チロシンキナーゼ Tie2 のリガンドとして 1996 年に米国の

Youcopoulos らのグループにによって同定・報告された。その後、遺伝子改変マウスを用いた解析などから、基本的な血管システムの構築・維持に重要であることが明らかにされた。Angiopoietin は分泌型タンパク質で、N 末端の coiled-coil ドメインで多量体を形成し、Tie2 受容体に結合する部位は C 末端の fibrinogen-like ドメインに存在する。現在までに Angiopoietin 1~4 が同定されており、Angiopoietin-1 (Ang-1)、Angiopoietin-2 (Ang-2) はヒト、マウスいずれにも存在するが、Ang-3 はマウス、Ang-4 はヒトに存在する。

個体の発生における血管系構築は、多段階の過程を経て多数の因子により相互性かつ階層性をもって制御されている。中胚葉から血管内皮前駆細胞を経て血管内皮細胞へ分化し原始血管網(primary vascular plexus)を形成する過程を脈管発生(vasculogenesis)とよび、VEGF ファミリーや FGF ファミリーにより細かく制御されている。このようにして形成された原始血管網から血管内皮細胞が、さまざまな血管新生刺激にตอบสนองして発芽(sprouting)、分枝(branching)、嵌入(intussusception)、退縮(regression)などの現象をもって反応し新たな管腔が形成されてくる。この過程を総合して、広義の血管新生(angiogenesis)とよばれており、Tie2 を介する Angiopoietin シグナルはこの過程で主に機能する。これは、VEGF 遺伝子欠損マウスが血管発生のごく初期に脈管形成の過程で死亡するのに対して、Ang-1 遺伝子欠損マウスが血管のリモデリング(成長や分枝)の異常により胎生中期に死亡することからも明らかである。

Ang-1 による引き起こされる Tie2 シグナルの活性化は、インテグリンの活性化による細胞接着誘導、FAK の活性化による細胞伸張、細胞移動、PI3K/Akt の活性化による抗アポトーシス作用などの生物学的活性を誘導する。Morla らは最近、Angiopoietin がインテグリン β_1 、 $\alpha_v\beta_5$ と結合し、これらの細胞内シグナルを活性化して運動を制御するとの報告をしており、Angiopoietin が Tie2 のみならずインテグリンをも介する多系統の受容体システムで細胞運動を制御していることが明らかとなった。

2) Ang-1、Ang-2 による血管新生の制御

初期の Angiopoietin 研究では Ang-1 の血管内皮細胞に対する遊走の役割について焦点があてられていたが、最近、Ang-1 は血管の成熟を促進する因子と考えられており、血管周皮細胞-血管内皮細胞間、あるいは血管内皮細胞相互間の接着を制御し血管の恒常性維持に重要であることが報告されている。このことは Ang-1 の血管透過性抑制作用を支持するものである。一方、Ang-2 は血管の不安

定化のシグナルとして機能し、血管新生反応のごく初期に起こる血管内皮細胞と周皮細胞との離解、それに続く血管の発芽や退縮に際して重要である。

血管新生における主要な因子の VEGF は hypoxia (低酸素) により誘導されるが、Ang-1、Ang-2 もともに hypoxia により発現誘導される。しかし興味深いことに、Ang-2 は Ang-1 と比較して 10 倍以上の発現量を示す。このことは、両者の役割の違いを示すものと考えられる。実際 Ang2 を Tie2 プロモーター下で血管内皮細胞に過剰に発現させたマウスにおいて、前述の Ang-1 遺伝子欠損マウスと同様血管のリモデリングの異常のため子宮内で死亡する。注目すべきことは、Ang-2 を血管内皮細胞に過剰に発現させたトランスジェニックマウスも Ang-1 遺伝子欠損マウスと同様に、内皮細胞と壁細胞の解離という異常が認められたことである。これらの過程において、Ang-1 がアゴニストとして、Ang-2 がアンタゴニストとしてそれぞれシーソーのように機能し、さらに VEGF と協調的に働き血管新生における血管のリモデリング、恒常性維持に関与しているものと考えられる。

Ang-2 は卵巣、胎盤、子宮などの血管リモデリングが激しく起こる部位や腫瘍、加齢黄斑変性症、リウマチなどの血管新生病態に依存しやすい病態で高発現していることを考えると、生理的および病的血管新生においても Ang-1 の血管安定化作用に対して Ang-2 が拮抗的に働き、血管新生制御に関与していることが予想できる。当初 Ang-1 は Tie2 受容体のリン酸化を誘導するが、Ang-2 は Tie2 受容体に結合するもののリン酸化を誘導せず、Ang-1 による Tie2 受容体のリン酸化を抑制することが報告された。これは上述の知見を支持するものであるが、最近血管内皮細胞に対して Ang-2 を長期に暴露させると、Tie2 受容体のリン酸化を誘導し、*in vitro* において血管内皮細胞の走化性、管腔形成を促進させることが報告された。これは低酸素で発現が誘導される Ang-2 を長期に暴露するといった、いわば生理的とはいえない環境においてのことではあるが、Tie2 受容体を介する Ang-1 と Ang-2 シグナル制御機構は、上述したような我々が考えているように（シーソーのように）単純ではないのかもしれない。最近でも、Thurston らが血管内皮細胞に対して増殖作用はないとされている Ang-1 が新生児期の短い期間にのみ静脈において特異的に血管内皮細胞を増殖させ血管径の拡大を誘導することを報告した。これは、ヒトでの Tie2 受容体の遺伝子変異における静脈血管の形成不全を示したかつての報告を支持するものであるが、これもまた Ang/Tie2 シグナルの生物学的作用の複雑さを支持する所見である。

3) リンパ管新生における Angiopoietin の役割

近年、Ang-2 遺伝子欠損マウスの解析により Tie2 受容体を介する Ang-2 シグナルが脈管のもう 1 つの構成要因であるリンパ管の形成に重要な機能をもつことが明らかにされた。その後、尾池らとフィンランドの Alitalo らのグループは、リンパ管内皮細胞に Tie2 受容体が発現すること、さらに Ang-1/Tie2 のシグナルがリンパ管新生にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

2 Angiopoietin による治療の展望

1996 年の Youcopoulos らによる発見以来、この 10 年間で Angiopoietin シグナルの血管における機能が明らかにされてきた。Ang-1 の血管透過性抑制作用は血管透過性を伴うさまざまな病態に対して新規治療法開発へ応用できるかどうか試されている。眼内の血管新生病である増殖性糖尿病性網膜症病態モデルに対しては、硝子体腔に Ang-1 を注入することにより網膜血管透過性が抑制されたことが報告されている。また上述したように低酸素刺激による血管新生の開始段階で重要な役割を演じる Ang-2 に対しては、腫瘍の移植実験で、中和抗体により Ang-2 を特異的に抑制した結果、腫瘍移植片の増殖抑制を認めている。また、最近では、Tie2 受容体のチロシンキナーゼに対する特異的な阻害剤や Tie2 受容体の下流シグナルを調節する低分子化合物の開発が行われており、近い将来の臨床の場への登場が期待されている。

3 Ang-1 遺伝子と自己骨髄細胞移植の併用による血管再生療法の基礎的研究

以上のような背景の元我々は、Ang-1 のプラスミド遺伝子と自己骨髄細胞移植を併用したさらなる遺伝子細胞治療による血管新生療法に関し、基礎研究を行った。NZW ウサギ (n=40) の左大腿動脈を結紮削除し、下肢虚血モデルを作成した。虚血 7 日後にウサギをランダムに 2 群に分け、それぞれ LacZ 発現コントロールベクター、または Ang-1 発現プラスミドベクター (500 μ g) を直接骨格筋内に遺伝子導入した。遺伝子導入の確認は、組織内 LacZ の発現 (X-gal 染色) および組織中のプラスミド特異的な RNA 配列の RT-PCR による発現確認により行った。さらに虚血 10 日後 (遺伝子導入から 3 日後)、それぞれの群でさらに生理食塩水または自己骨髄単核球細胞 (1×10^6 細胞) を骨格筋内に投与した。これにより、(1) コントロールベクター+生理食塩水群 (コントロール群)、(2) Ang-1 遺伝子治療+生理食塩水群 (遺伝子治療単独群)、(3) コントロールベクター+細胞治療 (細胞治療単独群)、(4) Ang-1 遺伝子治療+細胞治療 (遺伝子

細胞治療併用群)の4群に振り分けられた。

虚血手術後35日目の下肢血管造影では、コントロール群に比して遺伝子治療単独群、細胞治療単独群で血管新生スコア (angiographic score) の増強傾向が見られたが、遺伝子細胞治療併用群では、さらにこのスコアが有意差を持って増大した。組織をアルカリフォスファターゼにて染色して検討した毛細血管密度に関しても同様の傾向が認められた。

以上のように解剖学的な指標では血管造影で見える比較的大きな動脈の再生 (angiographic score)、ならびに毛細血管 (capillary density) の再生が起こっていたが、機能的にも下肢血流が改善しているか否かをさらに検討した。機能的な血管再生 (虚血後血流再開) の指標として、組織内酸素分圧 (TcO₂)、視診による下肢虚血の程度をスコア一化した。すなわち、全く下肢の潰瘍や皮膚の変色などが無いグレード0から、メジャーな下肢脱落のグレード5まで、段階的に下肢虚血、脱落の程度をグレード化した。この結果、予想外に細胞移植単独群、遺伝子細胞移植併用群では、組織内酸素分圧と下肢虚血所見のグレードが改善したものの、遺伝子治療単独群ではコントロール群とそれほど差がないかむしろ悪化する傾向がみられた。

これらのことは、今回 Ang-1 という遺伝子の単独の治療では、解剖学的な血管新生増強効果が得られたものの、これらの新生血管は機能的にはあまり役に立っていなかったことを示唆している。さらにマウスの耳朶に Ang-1 蛋白と自己骨髄細胞を移植した検討においては、Ang-1 蛋白移植群では、微小血管種、動脈瘤、コイル (コークスクリュー) 状血管などが多数形成され、全体の血管密度の増生はみられたものの、明らかに形態的には病的な血管が形成された。以上のように Ang-1 単独投与の効果そのものは血管新生に陽性に働くと考えられるが、過剰に機能した場合病的な血管が出来すぎてしまい、結果的に組織の酸素化は不変ないしは悪化する可能性が示唆された。組織が虚血に陥ると、数百の遺伝子の発現が変化すると言われているが、このような状況下で単独の遺伝子のみを投与することにより、健全な血管を再生し組織虚血を改善しようという試みそのものが、かなり無理のあることなのかも知れない。

このような Ang-1 であるが、自己骨髄細胞移植と併用した場合、細胞移植単独治療群に比べて解剖学的に血管新生を増強させ、さらに機能的な血流の指標 (組織内酸素分圧と下肢虚血スコアのグレード) をも改善した。このことは移植細胞そのものが多種類の血管新生サイトカインや成長因子を放出し、これらが相乗的に作用してより生理的な血管が作られたこと、さらにこれらの因子

と Ang-1 の血管新生増強効果があいまって、さらなる血管新生が誘導されたことが考えられる。実際にウサギ骨髄単核球細胞を培養して得られた内皮前駆細胞用の付着細胞に Ang-1 蛋白を作用させると、これの細胞の遊走能が著明に改善することが Boyden chamber を用いた実験により確認された。しかしながら、Ang-1 添加による細胞増殖増強効果は認められなかった。

おわりに

1996 年の発見以後、Angiopoietin シグナルの血管における機能が明らかにされてきた。最近新井らは骨髄ニッチ構成細胞である骨芽細胞から分泌される Ang-1 によってニッチに存在する造血幹細胞は、骨芽細胞との接着を強固なものにし、細胞周期を止め静止幹細胞の状態にしていること、Ang-1 で前処置することにより 5-FU 投与や放射線照射による細胞死から造血幹細胞を防げることを見出している。造血幹細胞はニッチにおいて Tie2 を介する Ang-1 のシグナルによりさまざまなストレスから自分自身を守っており、血管系において Ang-1 が血管システムの恒常性維持に重要な作用をもつこととあわせて考えると興味深い。Angiopoietin の真の生理活性を明らかにするためには、今後 Tie2 受容体とインテグリンの dual 受容体システムをどのように使い分けているのかを明らかにする必要がある。

Ⅲ-2-7. 再生医療製品における血清の安全使用

東京大学医科学研究所細胞プロセッシング
CERES 寄付研究部門 高橋恒夫
株式会社BCS 大野邦夫

はじめに：

血清は血液が凝固した上澄みの液体成分であり、血液から細胞成分を除いた血漿からさらに線維素原と凝固因子を除いたものである。血小板の凝集によって様々な蛋白、サイトカインが放出され、またリポ蛋白その他様々な細胞の増殖に必要な因子が含まれおり細胞培養に広く使われている。

再生医療における細胞培養、増幅に用いられる血清については、患者の自己血清を使用可能な場合以外は、他家あるいは異種動物由来の血漿を使う必要がある。ヒト及び異種動物の血清を使わない完全無血清培地の開発改良がすすめられているものの血清を完全には置き換えることは現時点ではむずかしい。したがっていかに安全性を確認して血清を使っていくかが再生医療製品において課題となっている。国内外の血清の安全性に関わる規制の状況と製品製造における血清の使用例をまとめたので報告する。

再生医療製品のリスク要因

再生医療の材料、製品のリスクは以下のようにまとめられる。

即ち：

- ・生物に由来する原料又は材料（添加剤、培地等を含む）に起因するウイルス、BSE等の感染因子
- ・製造工程中における細菌、真菌、ウイルス等による汚染及び細胞・組織のがん化など好ましくない形質変化の可能性
- ・原料又は工程材料の生物由来成分に起因する発がん性、免疫原性など生物学的安全性
- ・製品の不適切な取り扱いや使用による不具合、副作用の発生などである。

その中で血清、特に牛血清、牛胎児血清の使用にあたっては以下のリスク要因が考えられる。

- ・未知の感染性因子が存在する可能性
- ・vCJDを発症させるプリオンが存在する可能性
- ・ウイルス、細菌、真菌による汚染の可能性
- ・異種タンパク質による免疫原性の可能性

- ・異種糖鎖による免疫原性の可能性
- ・再生医療製品の異種タンパク、糖鎖取り込みによる移植後拒絶の可能性

ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針

様々な材料を用いて展開される再生医療分野においてヒトの種々の幹細胞を用いた臨床研究はその主流を占めると考えられる。

昨年（平成18年9月）から施行された厚労省“ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”において血清の使用に関わる部分は以下のように記されている。

指針：第4章：ヒト幹細胞の調製段階における安全対策等

1. 細菌、真菌、ウイルス等による汚染の危険性の排除

研究責任者は、調製するヒト幹細胞の特性に応じて次ぎに掲げる方策を適宜組み合わせることにより、細菌、真菌、ウイルス等による汚染の危険性を排除するものとする。

- (1) 原料となるヒト幹細胞の受入時における提供者のスクリーニング記録の確認
- (2) 調製工程における汚染防止
- (3) 調製での各段階での試験および検査
- (4) 妥当性の確認された方法による不活化および除去の導入
- (5) 異種移植および血清の取り扱いに関する記載

〈細則〉 培養による血清は、細胞活性化又は増殖等の加工に必要でなければ使用しないこと。（ただし自家血清を除く。）血清使用が避けられない場合には、次に掲げる点を考慮し、血清からの細菌、真菌、ウイルス、プリオン等の混入および伝搬を防止すること。なお、血清成分については、『ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について』（平成12年12月26日付け医薬発第1314号厚生省医薬品安全局長通知）及び『生物由来原料基準』（平成15年厚生労働省告示第210号）に順じて対応すること。

- (1) 由来を明確にする
- (2) 牛界面状脳症の発生が確認された地域からの血清を避ける等、感染症リスクの低減に努める。
- (3) 由来動物種に特異的なウイルスやマイコプラズマに関する適切な否定試験を行い、ウイルス等に汚染されていないことを確認した上で使用する。
- (4) 細胞の活性化、増殖に影響を与えない範囲で細菌、真菌、ウイルス等に対する適切な不活化処理および除去を行う。例えば、潜在的なウイルス混入の危険性を避けるために、必要に応じて加熱処理、フィルター処理、放射線処理、UV処理等を組み合わせて行う。
- (5) 培養細胞でのウイルス感染のモニター、患者レベルでのウイルス性疾患の発症に対するモニター、異種血清成分に対する抗体産生等の調査のために、

使用した血清の一部を保管する。

このヒトの幹細胞を用いた臨床研究への指針からは、血清使用は出来るだけ避けるようにとのことであるが、血清の使用はその安全性が現在の科学的レベルで保証されればその使用が許されると判断できる。

再生医療製品の血清使用に関連する規制

上記の指針が示している異種動物の血清の使用について関係する代表的な規制は以下のようなものである。

1. 改正薬事法（H15. 7. 30） 「生物由来製品；ヒトその他の生物（植物を除く）に由来するものを原料として製造される 医療製品」に対する上乗せ規制である。
2. 告示210号（H15. 5. 20） 薬事法第42条に基づき、生物由来製の医薬品、医療機器、医薬部外品、化粧品の原材料について、一定の原料選択基準、製造工程における処理基準を定めたものである。
3. 通知906号（H11. 7. 30） 細胞・組織利用医療製品の治験には確認申請を必要とする。
4. 通知1314号（H12. 12. 26） 細胞・組織を扱う際の基本的要件を示し、製品の品質及び安全性の確保を目的とする。

1の改正薬事法（2003年7月30日施行）では生物由来製品について以下のようにまとめられる。

- **生物由来製品の指定**：感染リスクに応じた分類
「生物、特生物」、「自己、非自己」を分類し、他家細胞組織を利用したものは「特生物」として位置づけている。（表1）
- **原料採取・製造・販売段階**：医薬、医療機器への上乗せ規制である。製造管理者の設置、生物由来原料基準、記録の保存及び管理、販売業者に記録・報告義務、について記されている。
- **市販後安全対策**：上乗せ規制
製品に「生物」・「特生物」を表示、添付文書への記載すること、「生物」「特生物」使用原材料に関する感染症定期報告、また「特生物」における遡及調査、医療機関の記録・報告義務、が記されている。

表1. 生物由来製品の感染リスク分類等に応じた分類の基本的考え方

安全対策の概要(案)		製品の例(案)	原料段階	製造段階	市販後段階		
			原料選択基準	記録の保管	表示添付文書記載義務	遡及調査の為の記録	感染症定期報告
分類(案)							
生物由来製品 (厚生労働大臣指定)	特定生物由来製品	細胞組織医薬品・医療機器	個体毎必要	○	○	○	○
	(厚生労働大臣指定)	人血液製剤	個体毎必要	○	○	○	○
		ヒト生体由来成分抽出物(尿以外)	個体毎必要	○	○	○	○
	その他の生物由来製品 (厚生労働大臣指定)	自己由来細胞組織医薬品・医療機器		○	△		○
		動物(死)細胞医療機器	飼育管理	○	△		○
		ワクチン・アレルゲン		○	△		○
		ヒト生体由来成分抽出物(尿)	個体毎又は原料ウイルス検査	○	△		○
遺伝子組換え製品			○	△		○	
細胞培養医薬品		○	△		○		
	動物由来成分抽出医薬品・医療機器(注射剤・植込)		○	△		○	

○化学薬品に上乗せ規制

△製品の特性に応じ上乗せ規制ありうる

- 再生医療製品の品質、安全性に対する規制

- 通知医薬発第1314号（H12.12.26）；ヒト又は動物由来成分を原料として製造される医薬品等の品質及び安全性確保について
 1. ヒト又は動物の細胞・組織から構成される製品
 2. ヒト又は動物の細胞・組織からの抽出物又は分泌物に由来する成分を含有する製品
 3. ヒト又は動物の尿等からの抽出物に由来する成分を含有する製品
 4. ヒト又は動物由来細胞に対して細胞培養、遺伝子組換え技術を応用して製造される製品
 5. 添加剤（製造過程の培地を含む）として(1)～(4)の成分を用いて製造される製品
- とされている。

医療製品に対するBSE関連規制

特に血清、ウシ由来血清に関しては以下の規制が関わってくる。

1. ウシ等由来物を原料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保の強化について(平成13年10月2日 医薬発第1069号)
2. ウシ等由来物及び人由来物を原料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保の強化について(平成15年4月14日 医薬発第0414004号)
 - 使用部位等からみて注意すべきウシ等由来原料
 - 1) 原材料に関するBSE感染リスクが高い部位の汚染を防止するための対応を行うこと。
 - 2) 医薬品、医療用具等の製造に使用するウシ等の血液、体液等については畜前に採取したものであること。また、胎児血清については、胎盤、子宮等の母獣由来の臓器・組織の汚染がない方法で採取されたものであること。
3. カナダ産のウシ等由来物を原材料として製造される医薬品、医療用具等の品質及び安全性確保について(平成15年5月22日 医薬発第0522002号)
4. 生物由来原料基準の一部改正について(平成16年7月5日 薬食発第0705001号)

規制における異種由来成分使用の扱いは以下に記されている。

・ 告示第210号「生物由来原料基準」

第4 動物由来製品原料総則

1. 反芻動物由来原料基準
 - (1) グリセリン等高度精製品を除く、反芻動物由来の原料又は材料
 - (2) 下垂体、胸腺、硬膜、松果体、せき髄、胎盤、腸、脳、脳せき髄液、脾臓、副腎、扁桃、眼、リンパ節、せき柱骨、頭骨、三叉神経、背根神経節の部位は使用不可
 - (3) (別表1) アルゼンチン、豪、ボツワナ、伯、チリ、エルサルバドル、

ナミビア、ニュージーランド、ニカラグア、パナマ、パラグアイ、シンガポール、スワジランド、ウルグアイ、バヌアツ※、ニューカレドニア※

(※については別途原料基準の改定を行い、使用可能国となる予定)
(別表2) コロンビア、コスタリカ、インド、ケニア、モーリシャス、ナイジェリア、パキスタン

(4) 品質及び安全性の確保上必要な情報を確認

2. 動物細胞組織製品原料基準

- (1) 採取の過程で病原微生物その他の汚染を防ぐために必要な措置を講じる
- (2) ドナー動物の適格性をもつこと
- (3) 動物の生きた細胞又は組織を用いる場合、ウイルス感染リスクの検証を行う
- (4) (3) 以外では、無菌性が担保されていること及びウイルス感染リスク検証の確認
- (5) 記録、保存
- (6) 採取に必要な衛生管理を行うのに十分な人員及び設備を有する施設で採取

3. 動物由来原料基準

- (1) 健康な動物からを確認できない場合、無菌性の担保及びウイルス感染リスクの検証
- (2) 原産地、使用部位等、細胞又は組織の入手方法の明示
- (3) 動物由来細胞株の細胞培養により生産される製品の場合、ウイルス試験を実施
- (4) 生きた動物全体を出発基材として生産される製品の場合、製品原料基準(2)を準用
- (5) 細胞、組織、体液から得られた原材料は、工程中に細菌、真菌、ウイルスの不活化、除去を行う
- (6) 品質及び安全性の確保上必要な情報が確認
- (7) 生物由来製品に指定された製品以外の製品については(2)から(7)は適用外

異種動物由来成分利用製品の規制における扱い

- ・ 我が国、また米国においても異種細胞、組織、臓器に触れたヒト細胞組織の再生医療製品は感染リスクの面から異種移植の扱いになる。

米国FDA

- ・ PHS Guideline on Infectious Disease Issues in Xeno-transplantation, January 19, 2001

- ・ FDA Letter, March 08, 2002
- ・ GUIDANCE FOR INDUSTRY; Source Animal, Product, Preclinical and Clinical Issues Concerning the Use of Xenotransplantation Products in Humans, April 2003

厚生労働省

- ・ 異種移植の実施に伴う公衆衛生上の感染症問題に関する指針(平成14年7月9日 医政研発第0709001号)
- ・ 3T3J2株及び3T3NIH株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針 (平成16年7月2日 医政研発第0702001号)
- ・ 日本では、自家細胞・組織であっても、牛血清を含む培地を用いて製造すると、「生物由来製品」で「特定生物由来製品」に指定される可能性がある。

皮膚領域での指針

再生皮膚領域での指針では以下のものがある。

3T3株をフィーダー細胞として利用する上皮系の再生医療への指針 (平成16年7月2日 医政研発第0702001号)

- ・ 異種移植とは、次に掲げることをいう
 - a ヒト以外の動物に由来する生きた細胞、組織又は臓器をヒトに移植、埋め込み又は注入すること
 - b 体外において、ヒト以外の動物に由来する生きた細胞、組織又は臓器に接触したヒトの体液、細胞、組織又は臓器をヒトに移植、埋め込み又は 注入すること（接触には、共培養による間接的な接触を含む。）
- ・ 薬事法に規定されない部分等については、本指針を参照
- ・ フィーダー細胞に由来する病原体の移植患者への感染による公衆衛生上の危険性を、現在の医学では完全には排除し得ないので、サーベイランス等感染症対策を十分に行なうことができることが実施の前提
- ・ 移植患者の微生物学的監視は、生涯にわたって続けられねばならない。 培養組織試料、移植に関する記録は30年間の保存
- ・ インフォームド・コンセントでは、異種動物由来感染症に関する事項として、フィーダー細胞に由来する未知の病原体による感染可能性など少なくとも以下の11項目を説明されなければならない。
 - (1) フィーダー細胞に由来することが判明している病原体による感染の可能性
 - (2) 報告は無いが、フィーダー細胞由来の未知の病原体の感染の可能性否定出来ず
 - (3) 上記病原体は、移植患者に接触する家族や性的交渉相手等体液に接触する

- 可能性のある者に感染する可能性を完全には否定できない
- (4) 移植患者に異種動物由来の感染があると、血液又は体液への接触により他の人に感染させる可能性がある。移植患者又は接触者に原因不明の症状が見られた場合、移植担当医に直ちに報告する必要がある
 - (5) 必要に応じて組織や血清を採取して検査を行う必要がある
 - (6) 採取された試料及び医学的記録は移植実施後30年間保管
 - (7) 血液、その他身体の部分をヒトへの使用を目的として提供する場合、感染のリスクについて医療従事者、被移植者等に伝え、関係者と十分に検討した上でのみ提供し得る
 - (8) 将来、出産する場合は、受胎から発育期間、出産及び授乳の際に、子供に異種動物由来感染症が生じることを否定できない
 - (9) 移植患者は、住所等の変更があった場合、必ず移植の担当医に連絡する必要がある
 - (10) 移植による感染が疑われる場合、死後、剖検を実施し、臓器等が採取・保存され、研究及び感染症の原因究明の目的で使用される
 - (11) すべての医学的記録は、要請があった場合には関係する公衆衛生機関(厚生労働省、国立感染症研究所等)に開示する必要がある。ただし、移植患者のプライバシーは最大限守られる

培養皮膚における血清の使用

海外で実際に臨床使用されている培養皮膚における血清、フィーダー細胞の状況を以下にまとめる(表2)。

表2。海外で臨床使用されている培養皮膚

	商品名	製造元/販売元	製品概要	適応	承認
自家培養表皮	Epicel	Genzyme(米)	自己表皮細胞を3T3株FL、FBSで培養	重症熱傷	FDA承認
	Cell Active Skin	Isotis(蘭)	自己表皮細胞を3T3株FL、FBSで培養		CEマーク、独、澳、瑞で販売
	Epidex	Modex(スウ)	自己毛包由来細胞を培養、FBS使用	糖尿病性下肢潰瘍	CEマーク

	AcuDress	Modex (スイス)	担体にフィブリン使用の特許の製品化 FBS 使用	J&J Integra と共同臨床	CE マーク
同種培養皮膚	Aplograft	Organogenesis (米) /Novartis (全世界)	牛コラーゲン担体に同種表皮、真皮を培養 FBS 使用	下肢潰瘍	FDA 承認 カナダ承認
	OrCel	Ortec (米)	牛コラーゲンゲルで表皮、コラーゲンスポンジで真皮を培養、FBS 使用	表皮水泡症、植皮採皮創	FDA 承認
同種培養真皮	Dermagraft	Advanced Tissue Sciences (米) /Smith & Nephew (米)	PGA メッシュに真皮細胞を播種、FBS 使用	糖尿病性下肢潰瘍	FDA 承認 カナダ承認

再生医療製品の製造におけるウシ血清の使用

再生医療製品の製造工程における FBS 使用状況についてまとめた (表 3)。

表 3. 再生医療製品の製造工程における FBS 使用状況

利用される細胞・組織	研究機関	ウシ血清使用	出典
ヒト培養表皮細胞	複数	10% FBS, 3T3	FDA 承認製品 添付文書等
生分解性基板上のヒト表皮細胞 &線維芽細胞	ニプロ	10% FBS	特 開 2005-013717
ヒト関節組織由来細胞	リューマチ学会	10% FBS	2004 研究報告
ヒト神経細胞	熊本大	10% FBS	特 開 2003-274940
ヒト間葉系幹細胞 →培養軟骨	名大医、帝人		特 開 2004-307350
非軟骨細胞 (例: ヒト皮膚線維芽細胞) →軟骨様細胞	東大医	10% FBS	特 開 2004-267052
ヒト口腔粘膜細胞 →角膜上皮細胞シート	J-TEC	10% FBS, 3T3	特 開 2002-331025
マウス筋肉由来前駆細胞 →心筋細胞	武田薬品	10% FBS 10% ウマ血清	特 開 2003-259863

再生医療研究分野における無血清培地の検討

利用される細胞・組織	課題～成果	出典
ES 細胞（胚性幹細胞）	無血清培地で、かつ、フィーダー細胞を使用しない増殖培養法	理研 発生再生科学研究センター・ ACT 社（日経バイオテック）
神経幹細胞	成長因子 (EGF, /FGF) 存在下、無血清培地での無限増殖法確立 課題：目的細胞への確実な分化	報告多数
ES 細胞	ES 細胞培養用無血清培地	理研発生再生科学研究センター、ステムサイエンス(株)
角膜上皮細胞	無血清培地（カスケード社） 成長因子剤（カスケード社）	三洋化成 特開 2002-320666
各種細胞	還元剤（アスコルビン酸エステル、グルタチオン）を含む無血清培地；アポトーシス抑制作用あり	科学技術振興事業団 （発明者；阪大） 特開 2002-142759

まとめ

異種動物の血清使用は再生医療に用いる細胞培養等に現時点では必要であり、その安全性を如何にして担保するかが重要である。動物由来成分の FBS は生きているフィーダー細胞とは基本的にことなり、滅菌は可能、ウィルス否定試験も可能なので公衆衛生上の懸念は小さい。

欧米ではフィーダー細胞、FBS を用いて製造された再生医療製品は相当数承認され販売されている。これらの製品の臨床使用の実績は少なくとも数千例はあるが、FBS、フィーダー細胞、またプリオン等の感染によると推測される健康被害の報告は知られていない。但し、ワクチンで多く報告されている異種タンパク質等による免疫原性の懸念は否定できない。目的とする再生医療製品開発に向けて、それぞれに最適な無血清培地の開発が再生医療製品開発のロードマップに組み込み、研究の促進が必要と考える。

Ⅲ-2-8. 細胞シート調製のための多孔性温度応答性培養皿の調製

東京理科大学基礎工学部材料工学科

菊池明彦

1. 多孔性温度応答性培養皿の調製

細胞には、生体内で基底膜側からの刺激によって細胞機能が亢進したり、基底膜側から有用物質を産生するものがある。このような細胞を再生医療に適用する場合に、あらかじめ基底膜側から各種増殖因子や分化因子などの適切な刺激を与えることが可能な培養器材の調製が望まれる。本項では、このような培養に相当と考えられる多孔性膜を有する培養基材の製造に関し、以下に説明する。多孔性膜を用いるもう一つの利点と考えられるのは、通常の温度応答性培養皿上から回収しにくい細胞シートの脱着を容易にできる可能性がある点である。

多孔性温度応答性培養皿の製造法は、あらかじめ求められる性能（安全性と有効性）を製品標準書に定め、最適な工程の設計と標準作業手順（SOP）を決定し、それに対応し適切な検査方法を用いる。

1-1. 原材料・規格

1-1-1. 原材料

原材料である N-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm)、および電子線重合時に NIPAAm を溶解する溶媒（2-プロパノールなど）については、購入品の、①メーカー名、②メーカー規格、③受け入れ規格（試験方法）、④保管条件、⑤使用期限（未開封、開封後）についてそれぞれ定めておく。納品後に精製を行う場合は、その精製方法、検査方法、および精製後の保存方法と使用期限についても明示する必要がある。

1-1-2. 基材

温度応答性高分子が固定される基材には、市販の多孔性膜をもつ培養基材の使用、あるいは独自に作成された射出成型品、平膜、多孔性膜などのプラスチック基材等の使用が考えられるが、いずれにおいても、①形状、②原材料（組成など）、③メーカー規格、④受け入れ規格（試験方法）、⑤使用期限を定めておく。

1-2. 温度応答性高分子による多孔性膜表面の修飾

1-2-1. 温度応答性高分子の多孔性膜表面への導入法

製造においては、製品標準書に定められた規格の製品が製造できるように、使用する機器（電子線照射装置）に求められる性能や、製品の製造条件について規定し、予め定められた標準作業手順（SOP）に従って作業を行う必要がある。

温度応答性多孔性膜の調製は、たとえば電子線照射装置を用いて行われる。

- i) 所定濃度の NIPAAm モノマーの溶液を調製する。
- ii) 電子線照射直前に所定量のモノマー溶液を多孔性膜表面に展開する。
- iii) エリアビーム型電子線照射装置で所定量の電子線を照射し、モノマーの重合と基材表面へのポリマーの固定を行う。
- iv) 残存の可能性のある非固定ポリマー、ならびに未反応モノマーは大量の冷水中に少なくとも一昼夜静置後に冷水にて洗浄・除去する。ついで 20℃で減圧乾燥する。

1-3. 多孔性膜表面への温度応答性高分子の固定とその確認

電子線重合後の温度応答性高分子修飾多孔性膜表面は、外観は無処理の多孔性膜表面の性状と同じで見た目だけで修飾されているかどうかを確認することはできない。多孔性膜表面上へのポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）の固定の確認は、一般的な高分子修飾表面の物性解析法を適用することで可能である。具体的な方法を以下に示すが、製品においては、製品標準書に定められた規格が満足されるように、確認方法（検査方法）を最適化する必要がある。

1-3-1. 全反射赤外分光分析（ATR/FT-IR）

たとえば、基材がポリエチレンテレフタレート（PET）である場合は以下のような解析を行う。

温度応答性高分子を修飾した多孔性膜を鋭利なカッターなどで切り出し、試料とする。赤外分光光度計の ATR ユニット上、Ge プリズムを用いて Ge プリズム表面に試料の PNIPAAm 修飾多孔性膜の修飾面を密着させ、赤外分光分析を行う。温度応答性高分子を修飾したポリエチレンテレフタレートでは、基材自体のエステルカルボニル（C=O）に由来する吸収が 1750cm^{-1} 付近に確認される。一方で基材自体には存在しないアミド結合に由来するアミドカルボニルに由来する吸収が 1650cm^{-1} 付近に確認される。PNIPAAm のアミド結合と、基材のポリエチレン

テレフタレートに由来するエステルカルボニルの吸収強度比 (I_{1650}/I_{1750}) が、表面固定した高分子量に密接に関連する。すなわち、既知量のポリマーを用いて測定したデータから作成した検量線を利用すれば、電子線重合によって調製した温度応答性高分子修飾多孔性膜表面上の PNIPAAm 量を規定できる。

細胞シートを調製する細胞種、ならびに個体差を考慮し、最適な温度応答性高分子の固定量を制御する。

1-3-2. 静的接触角測定

温度応答性高分子修飾多孔性膜表面の、所定の温度における水との接触角を液滴法を用いて測定し、基材では認められない接触角の温度依存性を示すことを確認する。つまり培養温度付近で接触角が大きな値を示してより疎水性の表面物性を、一方低温側では水滴の形成する接触角が小さくなってより親水性の表面物性を示すかどうか、を確認する。

表面の高分子修飾層の厚みはきわめてわずかであり、PNIPAAm 水溶液を温度の異なる水槽に入れたときに示す、沈殿-溶解現象を界面で明確に観察することは困難であり、高分子の修飾と温度変化に伴う表面物性の確認には簡便な接触角変化で解析することは妥当である。

1-3-3. X線光電子分光分析 (XPS) (オプション)

XPS による表面元素分析を通じて、ごく界面近傍の元素組成 (たとえば C、N、O) が解析できると同時に、各元素のシグナル強度比から表面固定された高分子の元素組成が類推できる。たとえば、NIPAAm モノマーの化学構造に基づく N/C 比と観測された元素組成から求めた N/C 比の比較から高分子の固定が類推できる。さらに、C1s シグナルの波形解析から NIPAAm 由来のモノマー単位の構造に由来する信号 (主鎖、アミドカルボニルなど) を確認し、温度応答性高分子の修飾が確認できる。

1-3-4. 二次イオン質量分析 (SIMS) (オプション)

温度応答性高分子修飾表面の二次イオン質量分析を行い、NIPAAm モノマーの分子構造に由来する二次イオンに基づくシグナルが観測できるかどうか、を確認する。

ルーチンに製品への PNIPAAm の固定を確認する場合には、全反射赤外分光分析法を用いた温度応答性高分子のグラフト量の定量と、温度応答性高分子の相転移温度前後の温度における表面の水に対する接触角の測定結果から、温度応答性高分子による表面修飾を確定できる。

1-4. 未反応の遊離モノマー、非固定高分子の洗浄と汚染物等の有無の確認

1-4-1. 未反応物の洗浄操作

1-2-2. iv) 項に示したとおり、電子線重合後に残存する未反応の遊離モノマーや非固定高分子は冷水に可溶であり、冷水に浸漬するとともに、水流下で洗浄・除去できる。溶出試験等による評価は、製品標準書において予め設定した安全性が担保できる測定方法を選択し、試験を行う必要がある。

1-4-2. 温度応答性培養皿の安全性評価⁹⁾

製造された培養皿に汚染物等が残留していないことの確認には、日本薬局方の一般試験法に基づいて実施する必要があると考える。具体的には、灰化試験による蒸発残分評価や、溶出物試験による泡立ち（消失時間）、pH（ブランク差）、KMnO₄消費量、UV スペクトル、蒸発残留物、重金属、及びエンドトキシン量の評価が挙げられる。それぞれについて、培養皿にて最適な検出能力を有する測定方法を選択し、製品標準書において予め設定した安全性が担保できる試験を行う必要がある。

1-5. 滅菌バリデーション、材料調製の再現性

滅菌方法には、エチレンオキシドガス（EOG）滅菌、あるいはガンマ線滅菌、電子線滅菌などの放射線滅菌が考えられ、それぞれの滅菌方法に最適な滅菌バリデーションを行う必要がある。医療機器一般では、作業者の安全性の観点より EOG 滅菌を避け、放射線滅菌を行うことが推奨されているが、特殊な材料を用いた医療機器については、放射線滅菌は不適であるため EOG 滅菌を用いることがある。温度応答性培養皿についても同様の理由により EOG 滅菌を選択することが考えられるが、その場合、細胞に対する障害性についても考慮を行い、エチレンオキシド残留濃度を決定する必要がある。

また、同一ロット内、ロット間においてランダムに取り出した試料（培養皿）上に修飾されたポリマー固定量がほぼ一定であるかどうかについては、適当な評価方法を選択し、実行する必要がある。