

5 虚血性心疾患に対する血管新生療法

加藤 公則・西川 尚・小澤 拓也
真木山八城・皆川 史郎・相澤 義房

新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野

Therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease

Kiminori KATO, Takashi SAIGAWA,
Takuya OZAWA, Yashiro MAKIYAMA,
Shiro MINAGAWA and Yoshifusa AIZAWA

*Division of Cardiology, Niigata University
Graduate School of Medicinal & Dental Sciences*

Abstract

There are several methods of neovascularization therapy for ischemic heart disease: gene therapy with angiogenic factors, cell therapy with endothelial progenitor cells, and cytokine therapy with granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). However, from the viewpoint of efficacy and safety, cell therapy is thought to be the best approach for regeneration therapy. There has been some scepticism about the efficacy of gene therapy with a single angiogenic factor because angiogenesis is considered to involve several angiogenic factors. It was initially reported that G-CSF therapy caused a high incidence of myocardial infarction or in-stent coronary artery restenosis. Subsequently, intracoronary infusion or intramyocardial injection of bone marrow mononuclear cells or peripheral blood endothelial progenitor cells was shown to be effective in patients with acute myocardial infarction or in those after myocardial infarction. Recently, we found that erythropoietin enhanced angiogenesis induced by implantation of bone marrow mononuclear cells in a murine model of limb ischemia. With the aim of applying this combination therapy for human ischemic heart disease, we are now investigating its effect on the heart.

Key words: therapeutic angiogenesis, gene therapy, cell therapy, cytokine therapy, erythropoietin

はじめに

Isner らが, 1996 年に vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子をヒトの下肢虚血治療に投与したのが, “Therapeutic angiogenesis” の始まりである。その後, 表 1 にあるように, 末

梢動脈疾患や虚血性心疾患に対する遺伝子治療は多く施行されている。日本においては下肢虚血に対する hepatocyte growth factor (HGF) 遺伝子治療が行われており, 我々もこの臨床試験に参加している。そして, 血管新生治療のもう一つの大きな潮流は細胞治療である。また最近, サイトカ

Reprint requests to: Kiminori KATO
Division of Cardiology Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences
1-754 Asahimachi-dori,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先: 〒951-8510 新潟市旭町通り 1-754
新潟大学大学院医歯学総合研究科循環器学分野
加藤 公則

表1 血管新生因子を用いた第2及び第3相大規模試験

Trial	Therapeutic agent	標的疾患	症例数	Endpoint	Results ^a
VIVA	VEGF 蛋白	CHD	178	Exercise tolerance test (ETT) at 60 d	Negative
FIRST	FGF-2 蛋白	CHD	337	ETT at 90 d	Negative
TRAFFIC	FGF-2 蛋白	PAOD	190	ETT at 90 d	Positive
GM-CSF	GM-CSF 蛋白	CHD	21	Invasive collateral flow index at 2 w	Positive
AGENT	Adenovirus - FGF-4	CHD	79	ETT at 4 w	Positive ^b
VEGF peripheral vascular disease trail	Adenovirus - VEGF ₁₆₅ Plasmid/liposome VEGF ₁₆₅	PAD	54	Increased vascularity in angiography at 3 m	Positive
KAT	Adenovirus - VEGF ₁₆₅ Plasmid/liposome VEGF ₁₆₅	CHD	103	Improved myocardial perfusion at 6 m	Positive (adenovirus group only)
REVASC	Adenovirus - VEGF ₁₂₁	CHD	67	Time to 1 mm ST depression on ETT at 26 w	Positive
RAVE	Adenovirus - VEGF ₁₂₁	PADO	105	Peak walking time at 12 w	Negative
Euroinject One Trial	Plasmid VEGF ₁₆₅	CHD	74	Improved myocardial perfusion at 3 m	Negative ^c

CHD, coronary heart disease; PADO, peripheral vascular disease. ^a効果は各プロトコール上の1次もしくは2次エンドポイントにおけるものを表している. ^b1つの用量グループのみ効果があった. ^c6つ研究センターのうち2つのセンターにおける不適当症例をのぞいた後には効果ありと判定されている. (文献1から引用し改変.)

イン治療としてG-CSFを用いた血管新生治療が注目を集めている.

今回、虚血性心疾患に関する血管新生治療を、上記の3つの点を中心にしてその現状を述べたい.

遺伝子治療

VEGF, bFGFなどの血管新生因子を用いた治療は、まずは蛋白を用いた臨床試験から始まった.そして、遺伝子を導入する方法も試みられている.表1をみてわかるように、蛋白投与や遺伝子治療にしる、単一の血管新生因子を用いた治療は、患者数が多い臨床研究になるほど、その臨床効果は否定的である.その原因として、血管新生は単一

の因子で制御できるようなものでなく、その場と時系列に応じた複数の因子からなる複雑な工程を経た現象であることによる.またもう一つの大きな要素としては、ヒトへの遺伝子導入効率の低さも挙げられ、その導入効率はマウスの1/7程度となる¹⁾.

細胞治療

血管新生における細胞治療の発展の基礎は血管内皮前駆細胞の発見²⁾そのものによる.そして、この細胞治療の勝れている点は、単に血管の基になる細胞の移植ではなく、血管新生因子を出す細胞も一緒に移植している点にある.そもそも、血管新生には、angiogenesis(狭義の血管新生)と

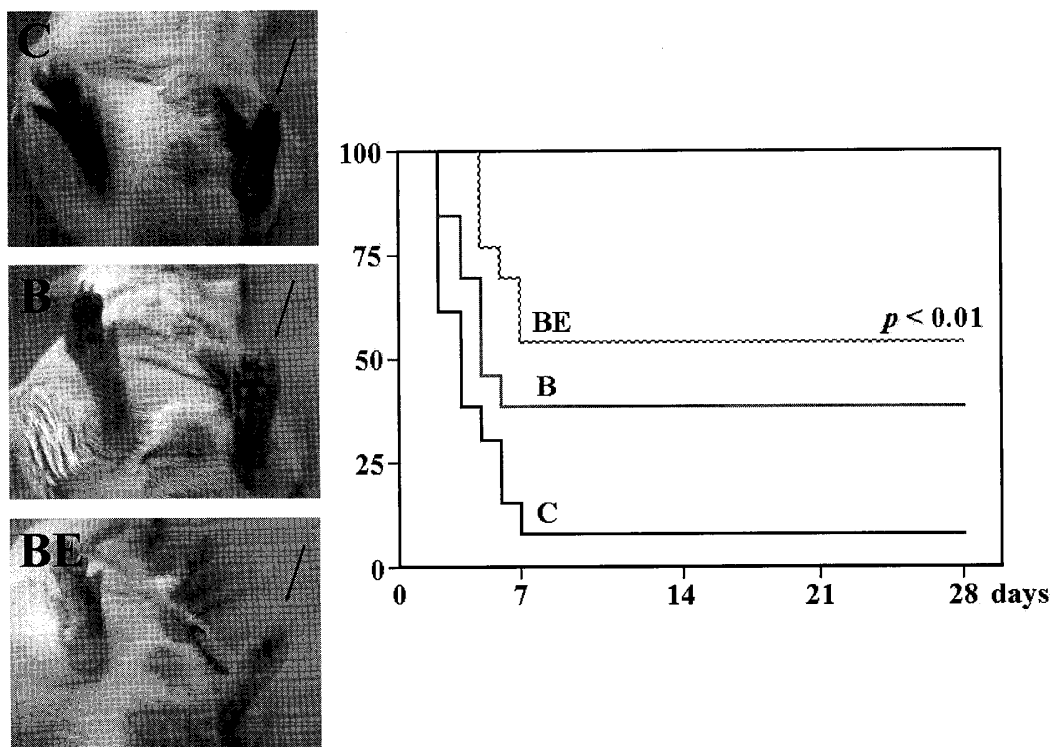


図1 虚血下肢写真ならびに虚血下肢の生存曲線

大腿動脈を結紮し下肢虚血モデルを作成し、以下の3群に分けて下肢の生存曲線を描いた。C: 無治療群, B: 骨髄細胞移植群, BE: 骨髄細胞移植+エリスロポエチン投与群。BE群のみC群に比べて有意に下肢の生存が維持された。写真は各群における代表例。

vasculogenesis (脈管形成) があり、従来成体で観察される血管新生は、全て従来ある血管から新生血管が発芽してのびてくる angiogenesis のみと考えられていた。しかし、血管内皮前駆細胞の発見以来、骨髄から血管内皮前駆細胞が末梢血中に動員され、虚血部位にたどりつき、その血管新生に参与する vasculogenesis が存在することが明らかになった。そして、その比率は約 10% 程度と考えられている。従って、細胞治療はこの生理的に起きている vasculogenesis を人為的に増強する治療とも言える。そして、同時に移植されている他の細胞から分泌される VEGF や bFGF, angiopoietin-1 などといった血管新生因子が実際の血管新生効果に関わっているものと推定される。世界で初めてこの細胞治療をヒトに応用した松原らのグループは、Japan trial of therapeutic angiogenesis by cell transplantation of marrow-

derived cells for patients with ischemic heart disease and peripheral artery disease (TACT) と称して、虚血性心疾患に対する血管新生治療をすでに国内で始めており、我々もこの臨床試験に参加している。関西医科大学における3例の報告では、1例は開胸術下に骨髄単核球を移植し、2例目、3例目はカテーテルによって心内膜からの投与を行い、症状の改善と駆出率の改善が認められた。そして、このような細胞治療はすでに海外の多くの施設にて施行されており、良好な成績を収めている³⁾。しかし、まだ、大規模な2重盲検試験は行われておらず、その臨床効果は確立されていない。

G-CSF 治療

成体にある血管内皮前駆細胞を分化増殖させ、虚血部位へ誘導するという治療が G-CSF 治療で

ある。この治療の利点は簡便性であり、すでに G-CSF は臨床応用されている薬剤であることから、日本では岐阜大学を中心に、すでにヒトに対する臨床試験が始められている。しかし、他施設において虚血性心疾患患者への血管新生を目的として G-CSF 投与によって 2 例の心筋梗塞発症と 1 例の死亡例の報告があった⁴⁾。さらに、韓国からの報告で、急性あるいは慢性期の心筋梗塞患者に対して G-CSF 投与と末梢血から採取された血管内皮前駆細胞の冠動脈内投与を行ったところ、心機能の有意な改善が得られたが、ステント内の再狭窄が G-CSF 投与群において明らかに促進されていた事から、この臨床試験そのものが中止された⁵⁾。以上の結果から、虚血性心疾患の患者に対する G-CSF 投与は安全性といった点から、まだ解決すべき問題が多くある。

将来への展望

我々は、のべ 22 例の末梢動脈疾患の患者へ骨髄単核球移植を施行し、虚血範囲の広い症例や効果不十分の 6 例に対して末梢血単核球移植の追加治療を行ってきた。すでに、重症虚血性心疾患に対する骨髄細胞移植治療は新潟大学医学部倫理委員会にて承認されており、適応症例があれば、いつでも治療を行える。

さらに、我々の基礎実験の検討から erythropoietin にこの骨髄単核球移植の増強作用があることを見いだしている。G-CSF と異なり、erythropoietin には重篤な心事故出現への懸念が少ない。我々が用いている骨髄単核球分画には赤芽球が約 10% 程度含まれており、この赤芽球が赤血球へ分化する際に、VEGF や placenta growth factor (PlGF) を分泌することが知られている⁶⁾。そこで、我々はこの赤芽球系の細胞に erythropoietin を添加することで、VEGF と PlGF の発現が高まることを確かめており、実際にマウス下肢虚血モデルにおいて骨髄細胞と erythropoietin を同時に投与することにより下肢虚血が改善することを報告した(図 1)⁷⁾。さらに、この現象は *in vitro* の実験においても確認しており、赤芽球系の

細胞を血管内皮の培養系に混和すると血管内皮の増殖と管腔形成が促進され、erythropoietin を加えることにより、その効果はさらに増強された⁸⁾。以上から、この erythropoietin を用いた血管新生治療を虚血心筋の治療にも応用するつもりであり、現在、その基礎検討を進めている。

まとめ

虚血心筋に対する血管新生治療は、遺伝子治療、細胞治療、サイトカイン治療の 3 つが考えられるが、有効性と安全性の点から細胞治療が最も有望な治療であると考えられる。我々は、虚血下肢に対するエリスロポエチンを併用した細胞移植治療の有効性を世界で初めて報告したことから、この治療法を心臓へ発展させ、従来の治療法が限界である重症虚血性心疾患に対する治療に応用したいと考えている。

参考文献

- 1) Yla-Herttuala S and Alitalo K: Gene transfer as a tool to induce therapeutic vascular growth. *Nat Med* 9: 694-701, 2003.
- 2) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witztenbichler B, Schatteman G and Isner JM: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275: 964-967, 1997.
- 3) Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, Vogl TJ, Martin H, Schachinger V, Dimmeler S and Zeiher AM: Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 108: 2212-2218, 2003.
- 4) Hill J, Paul J, Powell T, McCoy J, Dunbar C, Horne M, Csako G and Cannon R: Efficiency and risk of granulocyte colony stimulating factor administration in patients with severe coronary

- artery disease. *Circulation* 108 (supp IV): 478, 2003.
- 5) Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM and Park YB: Effects of intra-coronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 363: 751-756, 2004.
- 6) Tordjman R, Delaire S, Plouet J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, Romeo PH and Lemarchandel V: Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood* 97: 1968-1974, 2001.
- 7) Saigawa T, Kato K, Ozawa T, Makiyama Y, Minagawa S, Watanabe R, Tsuchida K, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M, Aizawa Y: Enhancing effect of erythropoietin on neovascularization by implantation of bone marrow cells in vivo. *Circ J* 68S: 571, 2004.
- 8) Ozawa T, Kato K, Saigawa T, Makiyama Y, Minagawa S, Watanabe R, Tsuchida K, Nakamura Y, Hanawa H, Kodama M and Aizawa Y: Erythropoiesis induced angiogenesis in vitro. *Circ J* 68S: 294, 2004.

司会 (林) 心不全、特に虚血によるものでは、よくみると血液を運ぶ血管、毛細管含めてですね、血管系の発達が非常に遅延しているという問題がございます。これに対して何とか血管を増やすことで、あるいは太い血管を作ることでこれらの治療を行なっていこうというスタンスかと思いますが、どなたかご質問・コメントなどございますでしょうか。

司会 (相澤) ありがとうございます。それでは総合討論という形よりも、時間がありませんので私の方から代表して致しますが、質問ございましたらお受けしたいと思います。どなたかございませんか。それでは各演者の先生にこれから代表質問の形でお聞きしていきたいと思えます。大倉先生ですけども、大倉先生が心不全の入口のところを語ってくれましたけど、日本じゃまだデータがない、佐渡市を中心にデータを取ろうということでもありますけども、こういったデータを取る、それによって治療

に入っていくわけですけども、現状の治療で見落としがあるとかあるいは不完全な治療があるとかに対しては、評価は大倉先生どんな風に考えればよろしいでしょうか。

大倉 適応のある人にきちっと治療が行っていない可能性がやはりあると思ひまして、今の調査並行して内服薬の有無、あと開業医さんでフォローアップされてるかそれともカルディオロジストにフォローアップされてるか、そういったところも細かく実は見てるんです。ただ追跡期間がまだ2年と非常に短いので、もう少し時間を延ばしてその辺も含めてきちっと評価するということと、あとは佐渡・新潟研究ですので新潟の方も実はもうはじめてまして、Nを多くしてそういったことも総合的に評価していきたいと思ひます。それでよろしいでしょうか。

司会 (相澤) これはですから早期発見・早期治療で重症かあるいは心不全例の頻度をおそらく確実に予測できる。そういった意味では先生にお願いしたいことは、今心不全の収縮不全で患者さんをピックアップしておられますけど、実はもっと大きな糖尿病がある、高血圧がある、そういう前段階、いわゆるステージAという段階でリスクファクターを如何に治療するか、それも念頭に入れて大スタディをお願いいたします。で、逆に吉井先生でもいいですし、あるいは池主先生からでも、そういった意味では心不全を早く発見して治療をちゃんとしておいてほしいというような希望がございますか。吉井先生、いかがでしょうか。小児の場合特殊な症例ではありましたが。

吉井 先程お話したように、これだけの経験をさせてもらったのは僕らだけなんですけども、ただきっちりデータを出すとたしかに重症な症例にやるといことは確かです。最近たまたまインターネットなどで調べられて全国から2例の方をご紹介いただきましたが、今は立川病院ではできないので、皆山梨に紹介しました。1例は適応があるということだったんですけど、1例は適応がないということでした。やはり非常に具合が悪くなった時にどうするか、たしかに皆具合は悪いんですよ、結局レスピレーターに繋がれてしまうというのは目に見えますので、そういう時に心臓移植しかないと思ってる方、あるいはそういう施設、小児科の先生方にもうちちょっと知っていただいて、公平な目で見ていただいて早めにこの手術を考えていただければと思ひ

ます。これまでもかなりの方から相談いただきましたけど、主治医から直接相談いただいたことは一回も無くて、皆家族からなんですよ。

司会(相澤) 先生のところに来るまでの治療体系はもうほぼ……。

吉井 かなり、もうありとあらゆる治療はされています。

司会(相澤) ありがとうございます。高橋先生、心不全でそういう新しい治療法紹介してくれましたけど、これをもっと普及しなきゃダメとお考えでございますか。

高橋 循環器医には、まだなかなか知れわたっていません。私も最近になって、心不全治療に nasal-CPAP という方法があり勉強させてもらった、というレベルです。呼吸器の先生は以前から知っていたと思われませんが、循環器医にはまだまだ啓蒙が足りない印象があります。

司会(相澤) これはやっぱり先生がデータを発表されて、皆さんに啓蒙していただく、という責任もある意味では担っているんじゃないかと思えますので、今後とも研究の方よろしくお願ひしたいと思えます。池主先生、新しい治療法でまだ機序とか幾つかの分からない所もありますけども、有効例と無効例がある、その中でどうやって、より有効例を選び出すか。それからもう一つは長期予後の現状と希望というようなこと述べていただけますか。

池主 お薬と違うので、無効と考えられる症例には植え込みを行わないという立場だと思えます。有効例をどうやって予測するかということですが、急性効果がなくても段々よくなっていく症例もあったり、伝導障害が無くQRS幅がさほど広くなくとも効果のある例があると言われております。新しいエコーの方法で有効性が予測できるということが最近報告されています。この治療は新しくはじまったばかりで、初めはNYHAⅢ～Ⅳ度の重症例が対象になっています。手技も難しいですし成功率も十分高くはない、カテーテルの検査テーブルに長く寝ているだけで具合が悪くなる場合もあります。長期効果と予後に関する成績が明らかになって、NYHAのⅣ度に進行する前に導入できる目安がつけば、恩恵を受ける人が多くなるんじゃないかと考えております。

司会(相澤) 心不全の悪化に対するいわば一次予防的なもの、という考えでしょうかね。早くすれば進展が阻止できるかとか、そういうのも大きな点

ですね。

池主 そうですね。生命予後に関するデータはまだ少ないと思いますが、QOLはかなりよくなる例が多いと思います。

司会(相澤) ありがとうございます。加藤先生の場合は遺伝子とか細胞治療で、倫理問題がいつも関わってくる、そういった意味では最重症の例から入らざるを得ないわけですけども、それでもいい症例はあるわけですね。で、これはおそらく将来的にいえばもっと早く、下肢の疎血でもフォンテン分類でいう軽いものからする、あるいは心臓でも繋げないところがあったら一本でも残ったらそこに細胞治療やる、というそういう展望はどうでしょう。いかがですか。

加藤 まずG-CSFみたいなサイトカイン治療は非常に簡便で患者への負担も少なく、軽症例から是非使ってみたい治療法です。僕らが、今研究しているエリスロポエチンも、G-CSFより副作用や心事故のおきる可能性が少なく、サイトカイン治療としても有望です。軽症なのに、全身麻酔で骨髄をとってきて下肢に移植するというのも、患者の負担が大きいきりです。先ほど述べたサイトカイン治療が有望ではないでしょうか。

また、国立循環器病センターでは、わずかな量の骨髄間葉系細胞をヒトから採取し、それを体外で増殖させ、数を増やして移植するという治療をはじめています。これも、患者の負担が少なく軽症例から試したい治療です。ただ、この細胞の体外増幅には、極めて高価な設備投資をしないとできないため、この施設でもできるというものではありません。

司会(相澤) 血管はバージャーでもASOでも有効そう。それから心臓ではどうですか、DCMでも虚血でも同じように有効ですか。

加藤 血管を作る治療がDCMにも有効かという問いでしょうか？

司会(相澤) 血管ないしは心筋を作るという意味でも、それはどうですか。

加藤 岐阜大学では、心筋症ハムスターにG-CSFを投与すると心不全の発症が抑制されると発表してましたので、心不全に対するサイトカイン治療も将来ありうる話だと思います。ただ、この機序は、心筋再生によるものなのか、どうかはまだはっきりしていません。先ほど、林先生も言っておられましたが、血管を作る治療はどんな病態の心臓であれ、

心不全を悪化させる方向には持って行かないのではないかと、私は思いますので、我々の行っている血管再生治療が心不全治療に結びつく可能性もあると思います。実際に京都では、自己免疫性心筋炎ラットに、血管を作るサイトカインである HGF を投与すると心不全が起きないという発表をしています。しかし、心不全に対してはやはり「心筋再生」が直接的には効くはずですので、この分野の発展にも期待したいと思っています。ただ、心筋再生の場合には、心筋を誘導する因子がまだよくわかっておらず、治療として現実化するのはまだ先だと思います。

司会（相澤） ありがとうございます。演者の先生方の間で、お互いに質問はありますでしょうか。

吉井 加藤先生は下肢虚血に対して細胞治療を行っているようですが成績を教えてください。

加藤 当科においては、骨髄単核球を用いた血管再生治療を 22 例行っております。そのうち、約 3 分の 1 がバージャー病の症例ですが、バージャー病の方は症状の改善の程度が良く、喜んで帰られる方がほとんどです。また、その効果も持続しています。一方、閉塞性動脈硬化症の方は、短期的成績はまずまずですが、長期的にみると下肢虚血の程度が悪化する人がいます。これは、糖尿病や、透析を行っている方が多く、動脈硬化の素地は依然として存在しています。従って、一度症例を軽減してあげてもそれが持続しない人が存在します。次に、何故バージャー病の患者において効果が認められることが多いのかという点ですが、これには大きく二つあると考えられます。一つは糖尿病や高脂血症の合併症もなく年齢も比較的若いことです。つまり、体内環境が閉塞性動脈硬化症の方に比べて良いということだと思います。二点目は虚血範囲が狭いことだと思います。バージャー病の血管病変は足部に限局して虚血が強い場合が多く、移植した患者の効果が出やすいと考えられます。

司会（相澤） ありがとうございます。各演者の先生方から最新の治療法を紹介していただいたと思います。それでこれからはそういったものの有効例をどういう風に見つけるか、それからおそらく有効例があるわけでございますから、そのタイミング

を如何に早くもってくるか、それから幾つかの方法論、皆違うわけですので、それらの総合的な治療をどうするかという大きなテーマを先生方、それを解決することも一つの責任ある研究者だと思って、それを念頭において研究をお願いしたいと思っております。最後に林先生からまとめていただきたいと思っています。

司会（林） まとめというより、私の感想を一言発言させていただきますが、この企画、相沢先生のご発想で企画されたんですが、実は慢性心不全といいますと、私どもの卒業したての頃を振り返ってみますと、姑息的に薬物治療を行うのがメインだったのではないかと思います。こうやって今日お話を伺いますと、大変目の覚めるような気がするわけでございます。それはやはり慢性心不全といっても同列に扱わないで、一つ一つの病態、その増悪機序に着目して、それを一つ一つどう制御していくのかにターゲットを絞り、よりリファインされた治療の戦略が今作られつつあると、今日ご発表になった多くはこれからの発展分野になるかと思います。その目標も単に生命予後を改善するだけじゃなくて、Quality of Life を少しでも良くしようと。この両者を含んだ新しい治療の体系がこれから我々の目の前に現実化しつつあるという風を感じまして、大変勇気付けられた思いであります。ただ、実際問題こうした治療が必要な患者さんが、我々の医療の現場にたくさん来られるということが、ある意味ではこの治療を促進させるっていうことに繋がるかと思っておりますので、是非ここにご出席の先生方で、ご自身で悩んでおられる患者さん、今までの従来の治療ではちょっとコントロールが大変だと思う患者さんを是非ともたくさん紹介していただいて、大学とか総合病院がこういったところを、先進的な医療を担う現場でございますので、そういうところに患者さんを送り込むことで我々を刺激していただきたいという風に思った次第でございます。今日はお忙しい中、多数ご参加いただきまして、大変ありがとうございます。これでこのシンポジウム終了させていただきます。どうもありがとうございます。