

TREAT-HGF - HGF遺伝子を用いた 末梢血管疾患に対する遺伝子治療の臨床研究 -

牧野 寛史¹ 森下 竜一² 荻原 俊男¹

要 旨：近年，動脈硬化を基礎とする血管疾患に対する新しい治療法として遺伝子治療が注目されている。海外では早くよりVEGF(vascular endothelial growth factor)遺伝子を中心に検討されているが，一方，われわれは内皮細胞増殖因子HGF(hepatocyte growth factor)遺伝子に注目し，末梢性血管疾患を対象として遺伝子治療臨床研究を実施している。安全性は許容範囲であると考えられ，また，現在のところ，一定の改善度も得られている。今後，有効性を評価するためにコントロールを設置した研究が必須である。(J Jpn Coll Angiol, 2005, 45: 137-143)

Key words: therapeutic angiogenesis, gene therapy, hepatocyte growth factor (HGF), vector

はじめに

大規模調査によれば60～70歳男性のうち3～6%が間欠性跛行症状を持っており，そのうち50～75%は無治療で経過観察可能であるが，年間1%は下肢切断の危機にあり，慢性虚血肢の発生率は50～100/10万人・年であるといわれる¹⁾。近年のインターベンションや手術療法の進歩は著しいが，それにもかかわらず，安静時疼痛や虚血性潰瘍を呈する重症虚血肢患者の20%は既存の療法に反応せず，下肢切断を余儀なくされ，QOLを障害されている。さらに，下肢切断にまで至る患者は元来高いリスクを抱えており，生命予後も不良である。たとえば膝下切断患者の場合，5年生存率50%との報告がある。このような従来の治療に抵抗性あるいは適応外となる重症虚血肢患者に対する新しい治療法として，遺伝子導入を用いた血管新生療法が注目されている。欧米ではすでに血管内皮増殖因子遺伝子を用いる治療は閉塞性末梢動脈疾患に対してVEGF(vascular endothelial growth factor)遺伝子やFGF(fibroblast growth factor)遺伝子を用いた血管新生療法を臨床応用する検討が進められている。日本では，HGF(hepatocyte growth factor)遺伝子を用いた末梢血管疾患に対する遺伝子治療

の臨床研究が開始された。

HGF

HGFは1984年に成熟ラット初代培養幹細胞に対する増殖因子として肝再生中のラット血液から部分精製され，既知遺伝子とは性質の異なる新しい増殖因子であることから，hepatocyte growth factor(HGF)と名付けられた。1989年にヒトHGFのクローニングがなされ，HGFがクリングルドメインを持つ新規タンパク質であることが示された。HGFは分子量69kDaの α 鎖と34kDaの β 鎖からなるヘテロダイマーであり， α 鎖は4個のクリングルドメインとよばれる特徴的構造を有している。HGFの遺伝子座はヒトでは第7染色体長腕(7q11.2-21)にマップされている。

発見当初は肝細胞に特異的な増殖因子として考えられていたが，その後，腎尿管上皮細胞，皮膚ケラチノサイト，肺胞上皮細胞，胃粘膜上皮細胞など多くの細胞の増殖を促進することが明らかとなった。正常細胞においては上皮系細胞の多くはHGFの標的細胞であり，また，間葉系に由来する細胞のなかでも血管内皮細胞，軟骨細胞，筋衛星細胞など，いくつかの細胞が標的細胞となることが分かってきた。循環器疾患を念頭においた検討においてもHGFは血管内皮細胞の増殖

¹大阪大学大学院医学系研究科加齢医学講座

²大阪大学大学院医学系研究科臨床遺伝子治療学

2005年2月28日受理

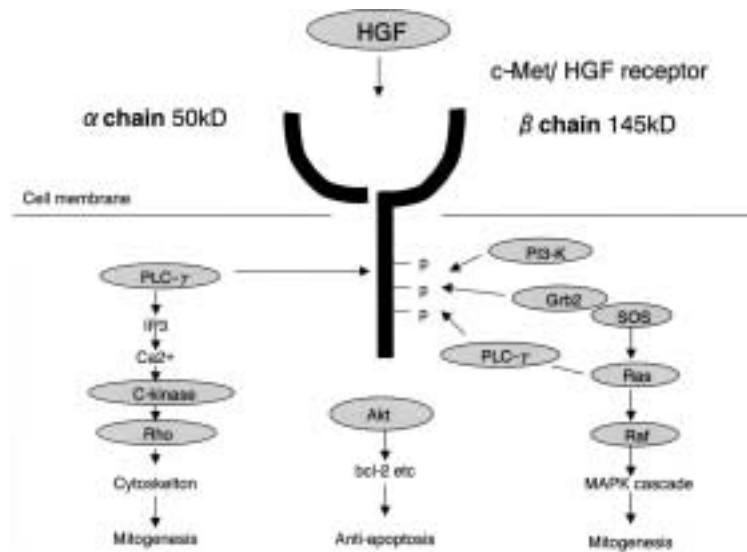


Figure 1 Structure and functions of HGF receptor c-Met.

作用を有しており、内皮再生療法、血管新生療法などでの遺伝子治療への適用が期待された。

HGF受容体c-Metの構造と機能

HGF受容体であるc-Metは生体内に広く分布しており、肝臓、腎臓、乳腺、脳内ではマイクログリア、血球では単球やマクロファージにその発現が認められる。c-Metは分子量50kDaのα鎖と145kDaのβ鎖からなるヘテロ二量体で、α鎖は細胞外ドメインのみを、一方、β鎖は細胞外、膜貫通、細胞内の各ドメインを有するが、その機能においてはβ鎖が中心的な役割を果たしている(Fig. 1)。すなわち、c-Metの機能において必須の役割を担うチロシンキナーゼ領域はβ鎖の細胞内ドメイン、また、HGFとの結合に關与するシステインに富んだ領域はβ鎖の細胞外ドメインに存在している。HGFがc-Metに結合すると、c-Metの二量体形成、それにひき続いてチロシン残基の自己リン酸化が起こる。この部位はmultifunctional docking siteと呼ばれ、結合するシグナル分子としてPI3K(phosphatidylinositol-3-kinase), PLC-γ(phospholipase C-γ), Grb2などが報告されている。

HGFの細胞増殖作用

HGFは細胞増殖、遊走、形態形成などの多彩な作用を持つ。これらの作用に至るシグナル物質として、

mitogen-activated protein kinase(MAP kinase: MAPK)との関係が多く報告されている。上述したように、HGFはc-Metのmultifunctional docking siteをリン酸化させるが、ここへのGrb2の結合が細胞増殖および管腔形成の誘導において必須と考えられている。Grb2は受容体チロシンキナーゼからRasへのシグナル伝達を、SOSを介して中継するアダプター分子として働く。Rasはいくつかのシグナル分子へとそのシグナルを受け渡していくが、このなかでもっともよく解析されているのがRaf-1である。Raf-1はさらにMAP kinase kinase(MEK)を活性化することで、いわゆるMAP kinaseカスケードを活性化してシグナルを下流へ伝達する。一方で、HGFはJAK kinaseを介さずに直接STAT3がc-Metに結合することによりSTAT3をチロシンリン酸化するという報告もある²⁾。

血管内皮細胞においてHGF受容体であるc-Metが発現しており、HGFが内皮細胞に対して細胞増殖作用を呈することが見いだされた³⁾。加えて、血管内皮細胞において、HGFはMAPKの活性化を介して、DNA合成および癌遺伝子のc-fosの転写を亢進していた。また、STAT3のリン酸化の検討では、tyrosine部位のリン酸化は他の細胞に比べて著明でなかったものの、serine部位のリン酸化を認め、これはERKのリン酸化を介していることが分かった⁴⁾。つまり、HGFは血管内皮細胞において、ERKおよびSTAT3などを介してさまざまな分

子の発現を亢進することにより、細胞増殖能を有することが明らかとなった。

HGFの細胞死抑制作用

近年のアポトーシスを中心とした細胞死機構の解明により、増殖因子による細胞死抑制作用のメカニズムも徐々に明らかになってきた。HGFも他の増殖因子と同様、血管内皮細胞に対して細胞死抑制作用を持ち、増殖因子としての働きを補助することが確認された。HGFが持つ抗アポトーシス作用のメカニズムの詳細についてはいまだ不明な点が多いが、抗アポトーシス因子であるbcl-2のup-regulationを介する経路⁵⁾、baxの細胞質からミトコンドリア膜への移動を抑制する機序⁶⁾、PI3の活性化あるいはその下流に存在するAkt (protein kinase B) の活性化を介してcaspase 3活性を抑制する経路、extracellular-signal regulated kinase (ERK) のリン酸化が重要な働きを有していることなどがこれまで明らかにされている。

内皮細胞障害を起こす代表的な病態として虚血や高血糖状態などにおけるHGFの細胞死抑制作用の検討がなされた。虚血モデルとして培養血管内皮細胞を低酸素下におくと細胞死が観察されるが、この細胞死はHGFタンパク添加により濃度依存性を防ぐことができた。また、この効果は高血糖状態においても認められる。高血糖状態ではHGFは発現が低下しているが、そこにHGFを補充することにより内皮細胞死を防ぐことができる。すなわち、高血圧、糖尿病、虚血性疾患など血管内皮細胞障害が起こる疾患においては、障害組織局所でHGFが低下しており、その低下がますます内皮細胞の修復、機能改善の遅延を加速させる病態が想定されている。したがって、これらの疾患においてHGFを補うことは非常に生理的に血管における内皮再生、虚血に対する側副血行路の発達を促進すると考えられる。

疾患への応用、遺伝子導入

当初はこれら増殖因子の組み換え型タンパク質 (recombinant protein) を用いた治療の可能性が模索され、動物実験で効果が証明されたが、その後の臨床研究では大きな成果を得ることはなかった。しかし、遺伝子導入の技術が向上し、より局所への遺伝子導入が可能になったため、血管新生因子を用いた遺伝子治療

の可能性が再検討されるようになった。そもそも組み換え型タンパク質は半減期が短く有効組織濃度に到達させるために大量かつ連続投与が必要であるが、一方で、全身副作用を最小限にするために投与量を抑えなければならないという、相反する条件を満たす必要がある。しかし、遺伝子を用いる場合はより少量の投与で局所に持続的なタンパク発現をもたらすことができ、その結果、全身への影響も少なくなる。また、組み換え型タンパク質は非常に高価で大量生産が困難であり経済面でも劣る。このように遺伝子治療の方が安全性、有効性、医療経済の面から優れていると考えられている。

遺伝子治療では外来遺伝子を細胞内に効率よく導入することが課題になる。遺伝子のベクター (媒体) として代表的なものはウイルスベクターであるが、これらには作成が簡便であること、非分裂細胞にも導入できること、外来遺伝子の発現が一過性であること等の条件が要求され、レトロウイルスベクター、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスなどが検討されてきた。ウイルスベクターの増殖能や宿主への細胞毒性の完全除去などが今後解決すべき点である。ベクターを用いない手法としてnaked plasmidやliposome-plasmid複合体の投与がある。これらは導入効率と発現持続期間では劣るが、ウイルスベクターと異なり感染性がなく、さらに患者本人のゲノムにも挿入されず、投与後1カ月以内には分解されるため、慢性疾患に対する長期使用においても有害作用は少ないと考えられ、安全性の面では非常に有利である。また、naked plasmidは導入効率が低いものの、血管新生療法では筋肉注射という簡便な手技で遺伝子導入が可能であり十分な効果を上げることができた⁷⁾。筋肉注射で導入した場合、筋肉は大きなgene reservoirとして働き、かつ導入された細胞から分泌された増殖因子タンパクが周囲に効果を及ぼす (Fig. 2)。naked plasmidの導入効率が低い理由として、細胞膜の通過性が低いこと、細胞内導入後ライソゾームによる分解などが考えられている。そこで細胞膜の通過性を克服するデリバリーシステムとして導入時に超音波を併用する手法⁸⁾やelectroporationを用いた導入法⁹⁾が提案され動物実験で有効性が報告されている。

血管新生療法への応用

末梢性血管疾患・虚血性心疾患の治療は、薬物療法

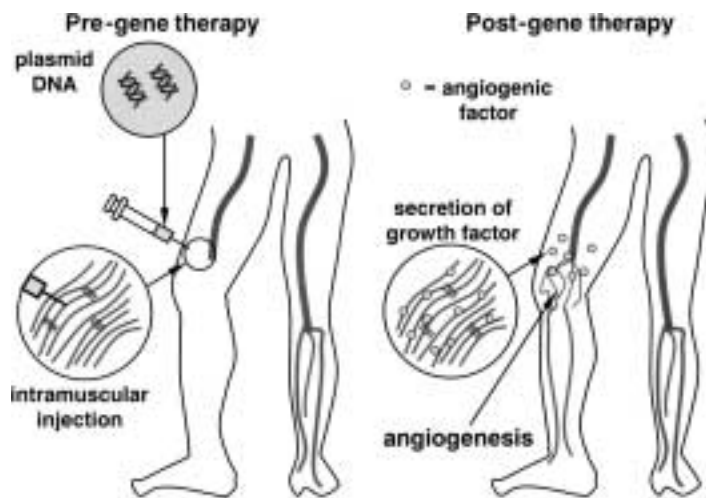


Figure 2 Intramuscular injection of naked plasmid DNA. Low transfection efficiency of naked plasmid will be compensated by paracrine effects of secreted HGF gene product.

や血行再建術の進歩によって劇的に進歩した。しかしその一方で、これら血行再建術がもはや不可能なほどの重症例が増加してきたことも事実である。これらに対しては決定的に有効な治療法はなく、対症療法が中心となっているのが現状である。これらに対する新たな治療法として遺伝子治療を用いた血管新生療法が期待されている。すでに欧米ではVEGF遺伝子やbasic-fibroblast growth factor(b-FGF)遺伝子を用いた遺伝子治療が臨床応用され、その有効性が報告されつつある。HGFもまた血管新生効果を持ち、動物の虚血モデルにおいて血管新生効果が確認されたことを受けて、閉塞性末梢血管疾患を対象とした臨床応用も開始された。

HGFは内皮細胞増殖作用、血管新生作用を持ち、さらにその増殖作用は内皮細胞に特異的であるため、VEGFと同じく動脈硬化性疾患への治療効果が期待できた。また上記のごとく、HGFは内皮細胞保護効果も有する。同様の効果は他の内皮細胞増殖因子であるVEGFでも見られるが、VEGFがこのような内皮細胞障害時に発現が上昇するのに対してHGFはその発現が低下している¹⁰⁾。VEGFはhypoxia responsible element (HRE)を転写部位に持つため、虚血時にその発現が上昇するが、HGFは低酸素刺激によるc-AMPの発現低下、あるいはTGF- β の発現上昇により発現が低下すると考えられる。実際、HGFがその転写部位にc-AMP responsible element, TGF- β inhibitory elementを持つことはすでに知られている。また、虚血心筋では組織内HGFが減少している一方でHGFの受容体c-Metの発現は

上昇していた¹¹⁾。これらのことは、虚血、高血糖、高血圧など内皮機能障害の病態において、局所ではHGFの需要が高いのに反して供給されるHGFは不足していることを示唆している。VEGFが追加療法であるのに対してHGFは補充療法ということができ、HGFが血管新生療法のツールとしてより有用性が期待できる。実際、HGFの血管新生作用は虚血性心疾患に対しても有用であった。ラット冠動脈結紮モデル¹²⁾において、また、ブタ心筋梗塞モデルへのHGF遺伝子導入で血管新生を認めた。

HGFを用いた血管新生療法の臨床研究

日本では2001年より、HGF遺伝子を用いた末梢血管疾患に対する遺伝子治療の臨床研究が開始された。4週間の内科的治療に反応しない閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans: ASO), またはバージャー病 (thromboangitis obliterans: TAO)患者に対して、Fig. 3に示した試験デザインで超音波ガイド下にHGF遺伝子を筋肉内に注射した¹³⁾。ASO 14例、TAO 8例の計22例に適用し、Fontaineステージ別にはIIb度7例、III度4例、IV度11例である。安全性におけるHGF遺伝子治療の最大の特徴は、治療中に血中HGF濃度が変化しないことである(Fig. 4)。HGFは投与局所で消費されやすいことや、また前述のとおりASO患者では虚血組織局所でのHGF濃度が低下しているため、補充療法の意味合いが濃いためであろうと推測される。血中HGF濃度が上昇しないことから全身性に与える影響が少ないと考えら

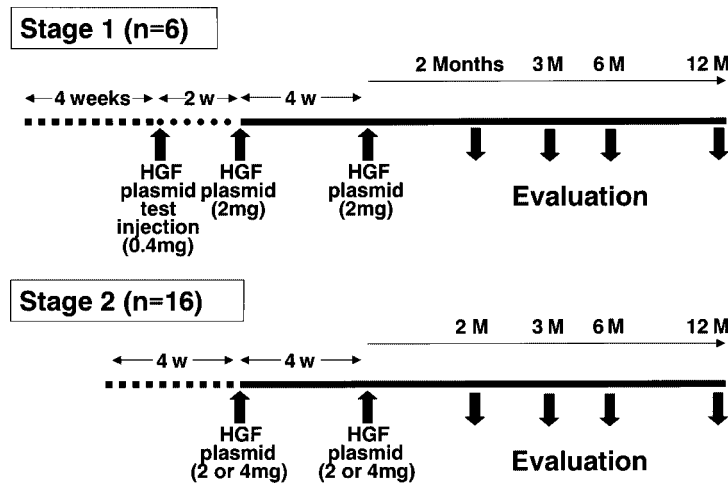


Figure 3 Study protocol of TREAT-HGF clinical trial.

れる。

末梢血流を足関節/上肢血圧比 (ankle brachial pressure index: ABI) で、安静時疼痛はVAS (visual analogue scale; 最大の痛みを10cmとして痛みの程度を患者自身がマークする方法) で、さらに虚血性潰瘍を持つ症例は最大潰瘍の長径サイズを計測し、臨床症状の改善度の評価を行った。初期の効果判定は投与終了 2 カ月後に行った。ABI、疼痛スケールVAS、潰瘍サイズの推移をFig. 5 に示す。初期判定の 2 カ月時点で各項目ともに改善が認められた。これらの効果は投与後 1 年経過しても悪化することがなかった。個々の症例につき、ABIが 0.1以上の改善、疼痛スケールVASが 2cm以上の改善、潰瘍の長径25%以上の改善が得られた症例数の推移はTable 1のとおりであった。投与後 2 カ月の時点でABI、VAS、潰瘍の改善がそれぞれ60%程度の症例に見られ、また、これら臨床項目改善症例数の率は 1 年経過後も悪化することがなかった。これらの臨床効果はVEGF遺伝子治療とほぼ同等である。全くの無効例は4例であったが、悪化した症例はなかった。

一方、安全性評価については、臨床研究実施者とは独立した組織である評価委員会を設置し、同組織にて臨床研究期間中に発生したすべての有害事象についてHGF遺伝子投与との因果関係を検討している。6 カ月経過後までに関して因果関係の検討が終了したが、この段階で遺伝子投与との因果関係のある重篤有害事象はなかった。今後も安全性について検討が進められる。また、VEGFの臨床応用では浮腫の副作用が頻繁

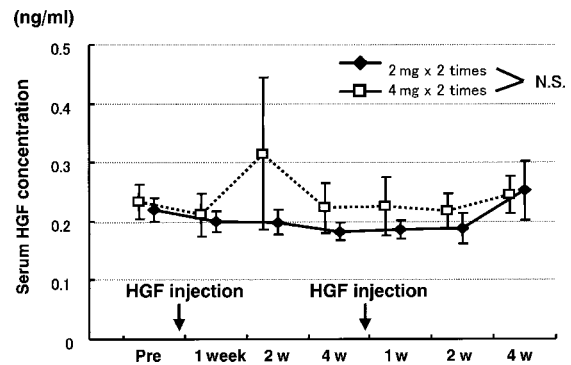


Figure 4 Changes in serum HGF protein.

に見られたが、HGF遺伝子治療では浮腫は観察されなかった。内皮細胞はFlkなどのVEGF受容体を有するためVEGF刺激により内皮細胞の増殖・遊走が起こるが、平滑筋細胞は刺激を受けず血管の裏打ちがないため、血球系細胞が循環内に漏出し、ロイコトリエン、ヒスタミンなどを放出して浮腫を形成するものと考えられている。一方、HGF受容体c-Metは平滑筋細胞上にも存在し、内皮規定膜を内皮細胞と共有する周皮細胞 (pericyte) の遊走を促進するため、内皮細胞増殖と同時に周皮細胞が遊走し、血管の裏打ちが初めから形成され、浮腫が発生しにくいのではないかといわれる。最近、周皮細胞遊走を促進するアンジオポエチンをVEGF治療に併用すると浮腫発生をみないとする報告が発表されている¹⁴⁾。

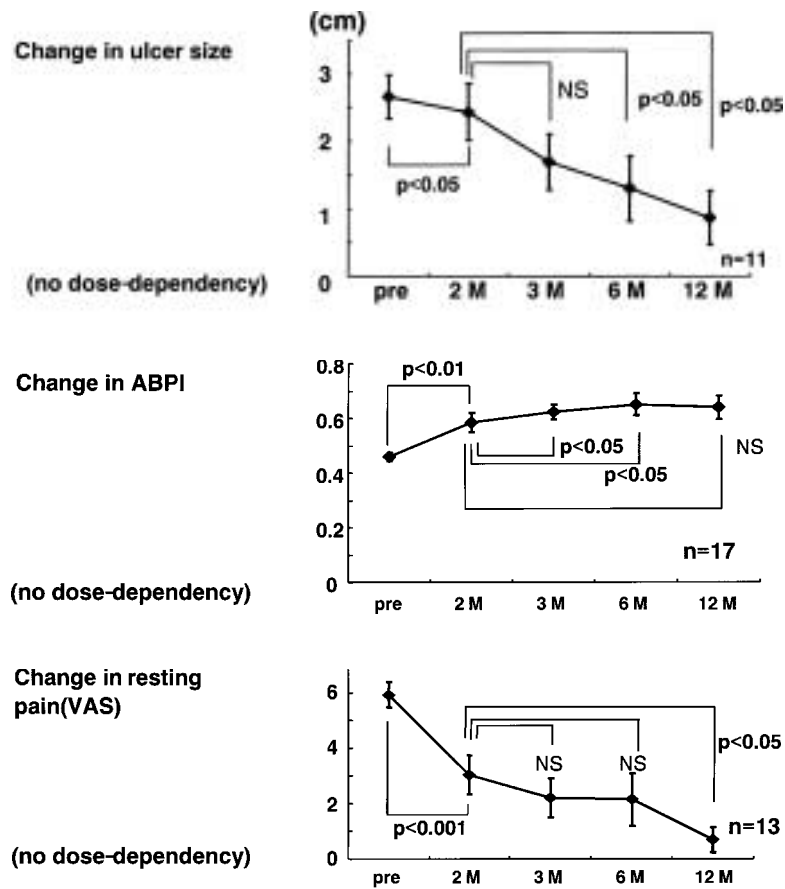


Figure 5 Clinical outcome.

Table 1 Changes of efficacy ratio

	2 months	6 M	12 M
ABI (elevation > 0.1)	11/17 (65%)	12/16 (75%)	10/14 (71%)
Pain (VAS) (reduction > 2 cm)	8/13 (62%)	9/11 (82%)	9/9 (100%)
Ulcer size (reduction > 25%)	7/11 (64%)	8/10 (80%)	8/10 (80%)

本研究の問題点はプラセボコントロール群を設置していないことであり、厳密な有効性の判定が困難であることである。現在、無作為二重盲検試験を多施設で実施中であり、その結果が待たれる。今後、さらに安全性と効果につき十分な検討が進められ、多くの患者にとって有効な治療法となることが期待される。

文 献

- 1) Dormandy JA, Rutherford RB: Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J Vasc Surg, 2000, 31: S1-S296.
- 2) Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L et al: Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. Nature, 1998, 391: 285-288.
- 3) Nakamura Y, Morishita R, Higaki J et al: Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor. J Hypertens, 1996, 14: 1067-1072.
- 4) Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K et al: Mitogenic and antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor through ERK, STAT3, and AKT in endothelial cells. Hyper-

- tension, 2001, **37**: 581–586.
- 5 Y Yamamoto K, Morishita R, Hayashi S et al: Contribution of Bcl-2, but not Bcl-xL and Bax, to antiapoptotic actions of hepatocyte growth factor in hypoxia-conditioned human endothelial cells. *Hypertension*, 2001, **37**: 1341–1348.
 - 6 Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K et al: Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes*, 2002, **51**: 2604–2611.
 - 7 Wolff JA, Malone RW, Williams P et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, **247**: 1465–1468.
 - 8 Taniyama Y, Tachibana K, Hiraoka K et al: Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther*, 2002, **9**: 372–380.
 - 9 Hartikka J, Sukhu L, Buchner C et al: Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther*, 2001, **4**: 407–415.
 - 10 Morishita R, Nakamura S, Nakamura Y et al: Potential role of an endothelium-specific growth factor, hepatocyte growth factor, on endothelial damage in diabetes. *Diabetes*, 1997, **46**: 138–142.
 - 11 Ueda H, Sawa Y, Matsumoto K et al: Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *Ann Thorac Surg*, 1999, **67**: 1726–1731.
 - 12 Aoki M, Morishita R, Taniyama Y et al: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, etc. *Gene Ther*, 2000, **7**: 417–427.
 - 13 Morishita R, Aoki M, Hashiya N et al: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension*, 2004, **44**: 203–209.
 - 14 Thron G: Complementary actions of VEGF and angiotensin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat*, 2002, **200**: 575–580.

Therapeutic Angiogenesis Using HGF (Hepatocyte Growth Factor) Gene to Treat Peripheral Arterial Disease

Hirofumi Makino,¹ Ryuichi Morishita,² and Toshio Ogihara¹

¹Department of Geriatric Medicine, and ²Division of Clinical Gene Therapy Science, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Key words: therapeutic angiogenesis, gene therapy, hepatocyte growth factor (HGF), vector

Therapeutic angiogenesis using angiogenic growth factors is expected to be a new treatment for patients with critical limb ischemia (CLI). As hepatocyte growth factor (HGF) retains potent angiogenic activity, we investigated the safety and efficiency of HGF plasmid DNA in patients with CLI as a prospective, open-labeled clinical trial. Intramuscular injection of naked HGF plasmid DNA was performed into ischemic limbs of CLI patients graded as Fontaine IIb, III or IV. We examined the safety and efficacy of HGF gene transfer as phase I/early phase IIa.

(J Jpn Coll Angiol, 2005, **45**: 137–143)