

## 循環制御による分子治療

尾崎 和成\*, 荻原 俊男\*, 森下 竜一\*\*

### はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) は肝細胞に特異的な増殖因子として見出されたのが最初であるが, その後血管新生作用, 血管内皮細胞増殖・保護作用, 神経細胞保護作用などもあることが報告され, これらの効果を治療に応用する試みが行われている. 冠動脈疾患 (coronary artery disease; CAD), 閉塞性末梢血管疾患 (peripheral arterial disease; PAD), 脳神経疾患などの疾患において, 障害血管, 障害神経の再生への効果が期待されている. 実際, 閉塞性末梢血管疾患に対しては HGF 遺伝子治療を用いた血管新生療法として臨床応用された. 本稿では, HGF の分子生物学的特性, 効果, および実際の疾患への応用とくに HGF を用いた血管新生療法の展望について概説する.

### 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor)

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; 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より部分精製された. HGF は既知遺伝子とは性質の異なる新しい増殖因子であり, 肝障害や腎障害などに伴って障害臓器や肺などの間葉系細胞で産生され, オートクライン・パラクライン機構によって障害臓器に提供される.

1989 年にヒト HGF のクローン作製がなされ, HGF がクリングル構造を持つ新規蛋白質であることが示された. HGF は分子量 69kDa の  $\alpha$  鎖と 34kDa の  $\beta$  鎖からなるヘテロ二量体である.  $\alpha$  鎖には hairpin-loop 構造と 4 個のクリングルドメイン

(K1, K2, K3 および K4) と呼ばれる特徴的構造があり, その各ドメイン内には 3 個のジスルフィド結合がある (図1). 北欧の菓子 kringle の形と似ておりこの名がついた. 他にクリングルドメインを持つ蛋白質としてプロトロンビン, プラスミノゲン, t-PA, アポリポ蛋白質 (a) などがある. また, ヒトの HGF の遺伝子座は第 7 染色体長腕 (7q11.2-21) に存在している.

発見当初は肝細胞に特異的な増殖因子として考えられ, hepatocyte growth factor と名付けられたが, その後, 肺上皮細胞, 腎尿細管上皮細胞, 皮膚ケラチノサイト, 胃粘膜上皮細胞など肝細胞以外の多くの細胞の増殖を促進することが判明した. 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, 間葉系由来の細胞のなかでも軟骨細胞, 血管内皮細胞, 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明らかになった. HGF は別名, 細胞分散因子 (scatter factor; SF) とも呼ばれている. 循環器疾患を中心とした検討でも HGF には血管内皮細胞の増殖作用があり, 内皮再生療法, 血管新生療法などの遺伝子治療への適用が期待されている.

### HGF 受容体 c-Met の構造と機能

HGF の特異的受容体である c-Met は生体内に広く分布しており, 肝臓, 腎臓, 乳腺, 血球では単球やマクロファージ, 脳内ではマイクログリアにその発現が認められる. c-Met は分子量 50kDa の  $\alpha$  鎖と 145kDa の  $\beta$  鎖からなるヘテロ二量体である.  $\alpha$  鎖は細胞外に存在するが,  $\beta$  鎖は細胞外, 膜貫通, 細胞内の各ドメインを含んでいる. その機能においては  $\beta$  鎖が中心的な役割を果たしている (図2). すなわち, チロシンキナーゼ領域は  $\beta$  鎖の細胞内ドメインにあり c-Met の必須機能を担い, システ

\*大阪大学大学院医学系研究科 老年・腎臓内科学講座

\*\*大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学講座

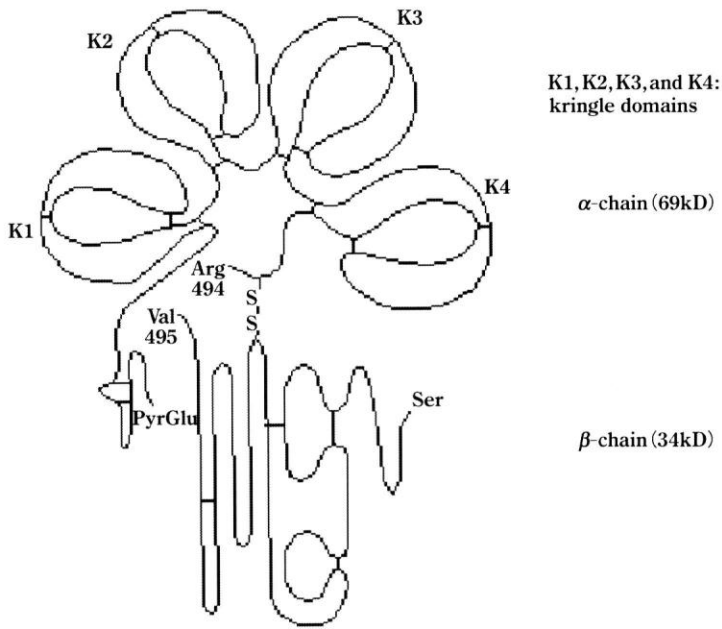


図1 Structure of HGF protein

(Morishita R, Nakamura S, Ogihara T, et al: Contribution of a vascular modulator, hepatocyte growth factor (HGF), to the pathogenesis of cardiovascular disease. *J Atheroscler Thromb* 1998; 4: 128-34. 及び Conway K, Price P, Harding KG, et al: The molecular and clinical impact of hepatocyte growth factor, its receptor, activators, and inhibitors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2006; 14: 2-10.を改変)

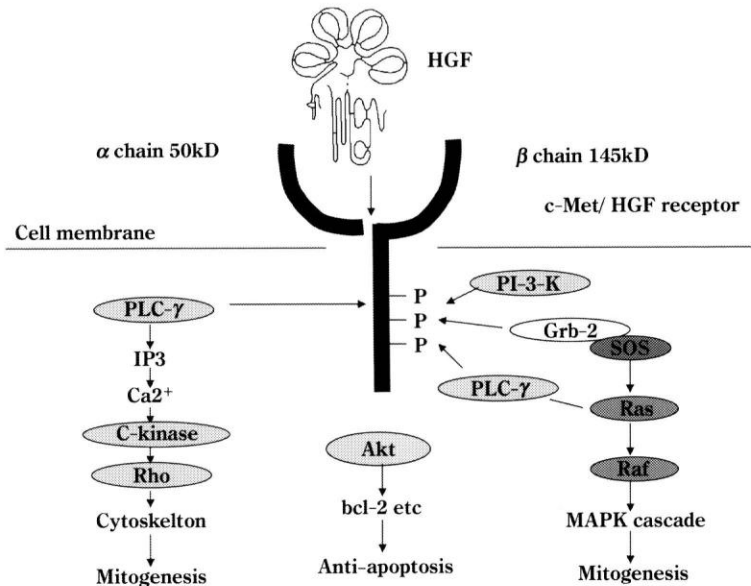


図2 Structure and functions of HGF receptor c-Met

インに富んだ領域は  $\beta$  鎖の細胞外ドメインに存在し HGF との結合に関与している。HGF が c-Met に結合すると、c-Met の二量体形成、さらに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 PI-3-K(phosphatidylinositol-3-kinase), PLC- $\gamma$ (phospholipase C- $\gamma$ ), Grb-2 などの SH2 ドメインを含んだ分子であると報告されている。

## HGFの細胞増殖作用

HGFは遊走因子(motogen)、細胞増殖(分裂)促進因子(mitogen)、形態形成因子(morphogen)などの様々な作用を持つ因子でもある。これらの作用に関するシグナル物質として、mitogen-activated protein kinase(MAPkinase; MAPK)との関係が指摘されている。前述したように、HGFはc-Metのmultifunctional docking siteをリン酸化させるが、ここにGrb-2が結合することが細胞増殖や管腔形成の誘導において必須と考えられている。Grb-2は、SOSを介しアダプター分子として、受容体チロシンキナーゼからRasへのシグナル伝達を行う。Rasはいくつかのシグナル分子にそのシグナルを伝達していくが、このなかで最も解析されているのがRaf-1である。Raf-1はさらにMAPキナーゼ(MEK)を活性化することにより、MAP kinaseカスケードを活性化しより下流へとシグナルを伝達する。一方、HGFはJA 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<sup>1)</sup>。

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出された<sup>2)</sup>。さらに、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<sup>3)</sup>。つまり、HGFは血管内皮細胞において、ERKおよびSTAT3などを介して様々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(anti-apoptosis)の機構も徐々に判明してきた。細胞が細胞死の指令を受けた時、どのような死の形態をとるかは細胞の種類およびその刺激により変わってくるが、血管系の細胞の中で血管内皮細胞には特に細胞死に陥り易いという性質がある。実際に、

培養細胞から血清および増殖因子を除去することで血管内皮細胞は急激に細胞死に陥るが、そこにHGFを添加することでその細胞死は有意に抑制された。つまり、HGFは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もち、増殖因子としての働きを補助することが確認された。HGFの細胞死抑制作用機序の詳細については未だ不明な点が多いが、細胞死抑制因子であるbcl-2のup-regulationを経由する経路<sup>4)</sup>、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<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>などの重要な作用が有ることなどが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には虚血や高血糖状態などがあり、これらにおける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さらすと細胞死が観察されるが、この細胞死はHGF蛋白添加により濃度依存性に防ぐことができた。またこの効果は高血糖状態でも認められる。高血糖状態ではHGFは発現が低下しているが、そこにHGFを補充することで内皮細胞死を回避することができる。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、その低下が益々内皮細胞の修復、機能改善の遅延を加速させる悪循環の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

当初は増殖因子の組換え型蛋白質(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られなかった。しかし遺伝子導入の技術が向上して、より局所への遺伝子導入が可能になり、血管新生因子を使用した遺伝子治療の可能性が再検討されるようになってきた。そもそも組換え蛋白は半減期が短く、有効組織濃度に到達させるためには大量かつ連続投与が必要である

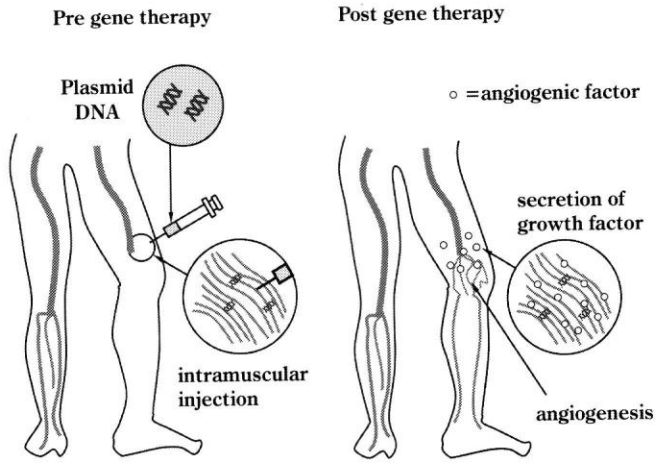


図3 Intramuscular injection of naked plasmid DNA

Low transfection efficiency of naked plasmid will be compensated by paracrine effects of secreted HGF gene product.

が、同時に全身の副作用をなるべく低減するためには投与量を抑えなければならないという相反する二つの面がある。しかし、遺伝子を用いる場合にはより少量の投与で局所に持続的な蛋白発現をもたらすことが期待でき、かつ全身への影響も少なくなる。また、組換え蛋白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、医療経済の様々な面から優れると考えられている。

遺伝子導入法は、外来遺伝子を標的細胞内に取り込ませ特定の遺伝子を一定期間過剰に発現させる方法である。標的細胞への外来遺伝子の取り込み率である導入効率が治療の成否を左右する。遺伝子のベクター(媒体)として代表的なものはウィルスベクターであるが、これは細胞にウィルスが感染し宿主に核酸を取り込ませる現象を利用したものである。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、レトロウィルスベクター、アデノウィルス、アデノ随伴ウィルスなどが検討されてきた。今後解決すべき点としては、ウィ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ある。ベクターを用いない手法として naked plasmid DNA 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ウィルスベクターに比べて劣るが、安全性の面では非常に有利である。また naked plasmid は導入効率の低いものの、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あげることができた<sup>7)</sup>。筋肉注射で導入した場合、筋肉が 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蛋白質が周囲に効果を及ぼすと考えられる(図3)。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 delivery system として導入時に超音波を併用する手法<sup>8)</sup>や electroporation を用いた導入法<sup>9)</sup>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

CAD や PAD などの虚血性疾患の治療は、内科的薬物療法の進歩や外科的血管再建術の発展により著しく改善されたが、統計上の救命率が向上する一方、高齢かつ複雑な重症血管病変を有する場合には症例数が増加傾向でもある。このように既存の内科的・外科的治療での症状改善を望めない患者では、多くの場合保存的治療で対応せざるを得ず、従来の治療戦略とは一線を画した新たな非侵襲的治療法の開発が望まれてきた。近年これらの虚血性疾患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(therapeutic angiogenesis)が期待されている。既に欧米では、血管内皮細胞増殖因子 vascular endothelial growth factor (VEGF) 遺伝子や線維芽細胞増殖因子 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、PAD を対象とした臨床応用も開始された。

HGF には内皮細胞増殖作用、血管新生作用があり、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る。また上記のごとく、HGF には内皮細胞保護効果もある。同様の効果は他の内皮細胞増殖因子である VEGF にもあるが、VEGF がこのような内皮細胞障害時に発現が上昇するのと対照的に HGF はその発現が低下している<sup>10)</sup>。VEGF は hypoxia responsible element (HRE) を転写部位にも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- $\beta$  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- $\beta$  inhibitory element を持つことは既知である。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<sup>11)</sup>。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 は欠乏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<sup>12)</sup>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ている。

### HGF を用いた血管新生療法の臨床研究

日本では大阪大学において 2001 年 5 月より、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 (TREAT-HGF: Japan Trial to Treat Peripheral Arterial Disease by Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer)。4 週間の内科的治療に抵抗性の閉塞性動脈硬化症 (arteriosclerosis obliterans, ASO) またはパーヴァー病 (thromboangitis obliterans, TAO) 患者に対して、図 4 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<sup>13)</sup>。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 (図 5)。HGF は投与局所で消費されやすいため、また前述の通り 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れる。

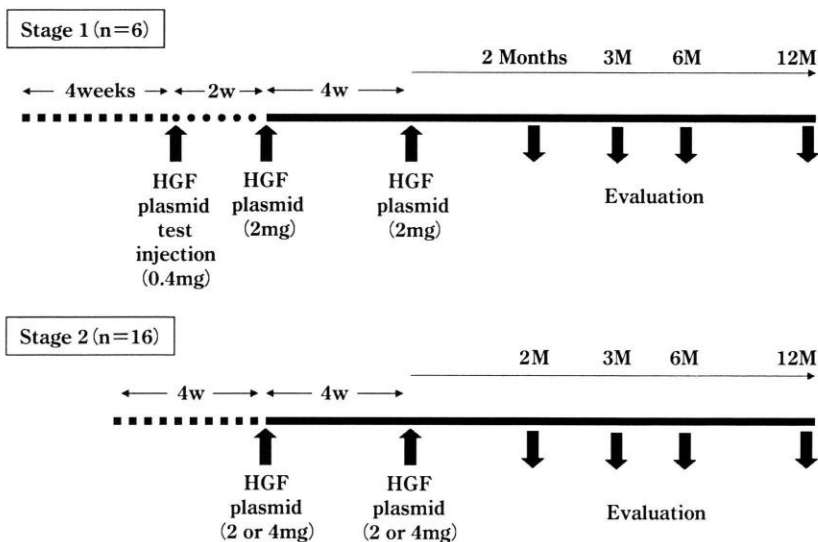


図4 Study protocol of TREAT-HGF clinical trial

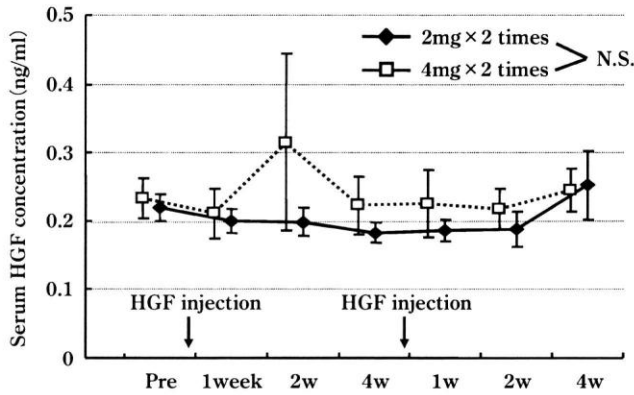


図5 Changes in serum HGF protein

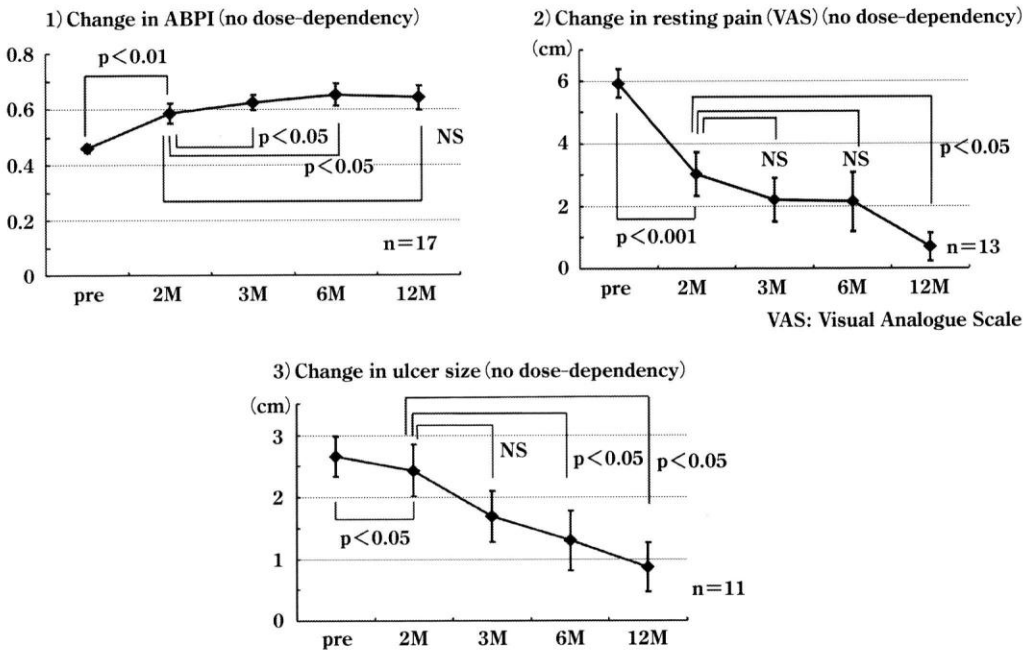


図6 Clinical outcome

末梢血流を足関節/上肢血圧比 (ankle brachial pressure index, AB[P]I) 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 ヶ月後に行った。ABI、疼痛スケール VAS、潰瘍サイズの推移を図6-1)~3) に示す。初期判定の 2 ヶ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表 1 の通りであった。投与後 2 ヶ月の時点で 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 2 年間のフォローアップ期間中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 3 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全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



表1 Changes in efficacy ratio on TREAT-HGF/stage1, 2

	2 months	6 months	12 months	24 months
ABI (elevation > 0.1)	11/17 (65%)	12/15 (80%)	10/13 (77%)	10/13 (77%)
Pain (VAS) (reduction > 2cm)	8/13 (62%)	9/10 (90%)	7/7 (100%)	7/7 (100%)
Ulcer size (reduction > 25%)	7/11 (64%)	8/10 (80%)	8/9 (89%)	8/9 (89%)

VAS: Visual Analogue Scale

ている。6ヵ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認められなかった。今後と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無い場合、血球系細胞が循環内に漏出し、ヒスタミンやロイコトリエンなどを放出し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あり、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、血管の裏打ちは初めから形成され、浮腫が発生しにくいのではないかと推測される。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<sup>14)</sup>。

本研究の問題点は偽薬対照群を設置していない事であり、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事が期待される。

#### 今後の展望、課題

遊走、細胞増殖、形態形成、細胞死抑制などの効果を持つ HGF には様々な疾患への応用の可能性がある。いずれの場合も遺伝子導入により局所での持続効果発現を得ることが共通している。実用化に向けての最大の課題は局所へ効率的かつ安全に遺伝子導入することであろう。現在、ウイルスベクターよりも naked plasmid の安全性が高いと考

えられるため、naked plasmid の使用例が多く見られる。しかし一方で naked plasmid そのものが toll-like receptor を介した作用で生体にアレルギー反応を惹起するとの報告もあり、plasmid そのものの安全性も慎重に論じなければならない局面にある。また、効率性の面では現在の naked plasmid、ベクターともに不十分である。そして、動物実験で侵襲的な投与経路を用いた場合も、実用化するには安全な投与法の検討が必須である。今後さらに安全性と効率性の高い drug delivery system の開発が期待される。

#### 文 献

- 1) Boccaccio C, Andò M, Comoglio PM, et al: Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998; 391: 285-8.
- 2) Nakamura Y, Morishita R, Ogihara T, 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: 1067-72.
- 3) Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, et al: Mitogenic and anti-apoptotic actions of HGF through ERK, STAT3 and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 2001; 37: 581-6.
- 4) Yamamoto K, Morishita R, Ogihara T, 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: 1341-8.
- 5) Nakagami H, Morishita R, Ogihara T, et al: Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes* 2002; 51: 2604-11.
- 6) Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, et al: Mitogenic and anti-apoptotic actions of HGF through ERK, STAT3 and AKT in endothelial cells. *Hypertension* 2001; 37: 581-6.

- 7) Wolff JA, Malone RW, Jani A, et al: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-8.
- 8) Taniyama Y, Tachibana K, Morishita R, 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: 372-80.
- 9) Hartikka J, Sukhu L, Sawdey M, 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: 407-15.
- 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: 138-42.
- 11) Ueda H, Sawa Y, Matsuda H, et al: Gene transfection of hepatocyte growth factor attenuates reperfusion injury in the heart. *Ann Thorac Surg* 1999; 67: 1726-31.
- 12) Aoki M, Morishita R, Ogihara T, et al: Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. *Gene Ther* 2000; 7: 417-27.
- 13) Morishita R, Aoki M, Ogihara T, et al: Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension* 2004; 44: 203-9.
- 14) Thurston G: Complementary actions of VEGF and angiopoietin-1 on blood vessel growth and leakage. *J Anat* 2002; 200: 575-80.