Basic FGF(塩基性線維芽細胞増殖因子)の臨床効果と使用法の検討

鹿児島県立大島病院外科¹⁾, 同 病理²⁾, 鹿児島大学第1外科³⁾
浜之上 雅 博¹⁾³⁾ 保 清 和¹⁾³⁾ 有 上 貴 明¹⁾³⁾
内 倉 敬一郎¹⁾³⁾ 長 山 周 一¹⁾³⁾ 栗 脇 一 三²⁾
小 代 正 隆¹⁾ 愛 甲 孝³⁾

The Study of Clinical Effect and Usege of Basic FGF (Fibroblast Growth Factor)

Masahiro HAMANOUE¹⁾³⁾, Kiyokazu TAMOTSU¹⁾³⁾, Takaaki ARIGAMI¹⁾³⁾,
Keiitirou UCHIKURA¹⁾³⁾, Shuichi NAGAYAMA¹⁾³⁾, Ichizou KURIWAKI²⁾,
Masataka OJIRO¹⁾ and Takashi AIKOU³⁾

Departments of Surgery¹⁾ and Pathology²⁾, Oshima Prefectural Hospital

³⁾First Department of Surgery, Kagoshima University of Medicine

塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic FGF) は、組織再生を促進するタンパク製剤としてはじめて臨床応用された細胞増殖因子である。basic FGFの創傷治癒における臨床効果を肉眼的また組織学的に確認した。その結果、肉眼的な治癒促進効果は、感染創でもdebrimentをすることにより有効であった。血流の少ない部位の創傷治癒も効果を示した。創部の治癒に伴う肥厚性瘢痕・ケロイド形成は認めなかった。組織学的にKi64抗原染色で線維芽細胞の増殖は促進されていた。また、CD34抗原染色により血管の増生を認め血管新生が確認された。さらに α -平滑筋アクチン染色により染色陽性細胞を認め線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が行われていると考えられた。今回の検討で、basic FGFは非常に強い組織修復作用を示すことが確かめられた。

索引用語：線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor), 組織修復 (tissue repair), 血管新生 (angiogenesis), 再生医学 (regenerative medicine)

緒 言

再生医学と呼ばれる分野が注目を集めるようになり、それに伴い組織再生因子として細胞増殖因子の臨床応用が検討されるようになってきた¹⁾。このような中、最近、関葉系細胞の細胞増殖因子である線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) の臨床使用が、始まった。線維芽細胞増殖因子は、動物およびヒトで数種類報告がありその中でも細胞増殖活性が強い塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic FGF) が遺伝子組み換えタンパク質として開発され臨床使用できるようになった²⁾³⁾。

basic FGFは、分子量約1,7000のタンパク分子であり細胞に発現したFGFレセプターと結合することによりその効果を発現する⁴⁾⁵⁾。basic FGFの生物学的効果は、線維芽細胞の遊走、増殖分子促進、さらに血管内皮細胞の遊走、増殖および管腔形成を促進し、血管新生を促す^{5)~7)}。これらの生物活性は、創傷治癒に起こる過程をbasic FGFがすべて促進することを示している。この生物学的な効果を臨床例において肉眼的および組織学的に確認した。また、今まで薬剤と違う高分子量のタンパク製剤であることを踏まえ効果的な臨床使用法を検討したので報告する。

対象および方法

検討例は、2001年10月より2002年6月までに当院でrecombinant human basic FGF〔Trafermin (genetical recombination), Kaken Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo)〕を創傷部に使用した術

Table 1 Nine cases treated by basic FGF

case 1~7 : cases with wound ulcer by a bacterial infection
case 8,9 : cases with wound ulcer by a burn and an ischemic damage

case	age	primary disease	the area of a wound (cm ²)	the time of treatment (day)
1	17	panperitonitis	125	15
2	44	ileus	135	17
3	67	ileus	6	4
4	54	appendicitis	10	9
5	78	intestinal perforation	60	28
6	64	subcutaneous abscess	12	7
7	67	panperitonitis	175	14
8	65	breast cancer	15	27
9	49	breast cancer	9	17

後感染創離解例7例、熱傷と虚血により皮膚壊死を起こした2例である (Table 1)。対象患者には、今回の検討を説明し承諾を得た。使用法は、術後感染創には、100μg/mlに溶解したbasic FGFを創部に10cm²に約30μg一様に散布した。効果評価は、創部の大きさとbasic FGFを使用始めてから治癒するまでの期間より、一日当たりの治癒面積を求めた。

〔組織学的検討〕創処置としdebritlementを行った時に摂取された組織を、患者の承諾を得て用い形態学的な組織像の変化を検討した。さらに線維芽細胞のKi67抗原染色を行い顕微鏡下において線維芽細胞500個あたりの陽性細胞を数えlabeling indexを計測した。CD34抗原染色による血管新生の評価を行った。また線維芽細胞が脱分化し

Fig. 1A Macroscopic finding of the case 5 with a infectious wound.
(a) Finding before treatment (b) Finding of wound healing 40 days after treatment of bFGF. a b

Fig. 1B Macroscopic finding of the case 8 with a burn and a ischemic damage.
(a) Finding before treatment (b) Finding of wound healing 30 days after treatment of bFGF. a b

て筋線維芽細胞となるとき発現する α -平滑筋アクチン染色を行い線維芽細胞が筋線維芽細胞に脱分化しているか観察した。CD34のおよび α -平滑筋アクチン染色は、それぞれのモノクローナル抗体にパーオキシダーゼが結合した一次抗体(Dako Co., Ltd. Denmark)を用い3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) により発色を行い染色した⁸⁾。

(basic FGFの使用法) basic FGFは凍結乾燥状態では、安定である。しかし溶解状態では、熱に対し不安定である。このため溶解後のbasic FGFの保管は4℃の暗所とし使用時も冷剤を用いできる限り温度の上昇のない状態で使用した。また4℃の保存であっても活性は徐々に低下すると考えられ同時期に使用中の患者すべてに同一の溶解したbasic FGFを使うこととした。溶解したbasic FGFは、酸化・重合変性により沈澱を生じるため濁る。このため使用時に濁り・沈澱を認めたものは破棄した。

結 果

Basic FGFを投与した症例において治癒とならなかった症例はなかった。感染創における1日あ

たりの創治癒面積は、5.0cm²/dayであった。熱傷・虚血による壊死創では0.54cm²/dayであり感染創より治癒速度が遅かった。術後創感染による創離開した7例は、肉眼的にはbasic FGF投与と創のdebridementと抗生物質の投与を行うことにより感染が早期に治癒、その後血流に富んだ肉芽の形成、創部の収縮、そして治癒の過程をたどった (Fig. 1A)。筋膜直上の組織を熱傷で損傷した乳房離断術後患者の壊死創は、治癒は時間がかかったが、肉芽の形成・血管新生が始まると皮膚の再生も進み植皮をさず治癒となった (Fig. 1B)。今回の創傷治癒後、肥厚性瘢痕・ケロイドとなった症例はなかった。組織学的には、basic FGF投与前は肉芽組織の細胞密度は低く炎症細胞の浸潤を認め線維芽細胞もまばらであり間質にある膠原線維も疎であった。basic FGFを投与し感染が消失した時点での肉芽組織は線維芽細胞が密になり、間質の膠原線維も豊富になっていた (Fig. 2)。Ki64抗原染色によるlabelling indexでは、3例の検討であるがbasic FGF投与前も約25%のlabellingを認めたが、basic FGF投与後も細胞密度が高いにもかかわらず約15%のlabellingを認め組織が再生していることが確認された (Fig. 3)。CD34抗

Fig. 2 Pathological finding (H. E. stain $\times 100$).

(a) Wound tissue before treatment showed the loose connective tissue and fibroblasts infiltrated by plasma cells and lymphocytes.

(b) The healing tissues after treatment of bFGF showed the tight connective tissue and fibroblasts which had spindle shapes.

Fig. 3 Immunohistochemical stain (Ki67 antigen (MIB1) stain $\times 100$).

(a) Wound tissues before treatment showed labeling index: 25% (mean of 3 cases).

(b) The healing tissues after treatment of bFGF showed labeling index: 15% (mean of 3 cases).

Fig. 4 Immunohistochemical stain (CD34 stain $\times 100$).

(a) Wound tissues before treatment showed microvessels of various sizes in the loose connective tissue.

(b) The healing tissues after treatment of bFGF showed microvessels of almost same size in the tight connective tissue.

原染色による血管新生の状態は、basic FGF投与前不規則な大きさの血管を肉芽内に散在性に認めた。basic FGF投与後は、肉芽内に比較的径のそろった血管を、密に規則的に認めた (Fig. 4)。 α -平滑筋アクチン染色により染色陽性細胞を認め線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が行われてい

ると考えられた (Fig. 5)。

考 察

FGFは、組織発生の段階で間葉系組織の分化・増殖に大きな役割を担っていることが知られている³⁾⁶⁾。また腫瘍細胞が、細胞増殖因子により増殖

Fig. 5 Immunohistochemical stain (α -smooth muscle actin stain $\times 100$). The healing tissues after treatment of bFGF showed some fibroblasts of positive staining of α -smooth muscle actin.

することも事実でありbasic FGFも肉腫細胞を増殖させることがわかっている^{9)~11)}。basic FGFを薬剤として利用するとき癌が組織学的に存在しない状態であることが条件である。また腫瘍発生に関してイニシエーターとして働く証拠はないが、危険性を完全に否定することができないため生体内の血中濃度を上昇させない局所投与が投与方法として用いられている。現在は、体表面のみの投与であるが、限局した瘻孔のような状態にも使用適応と考える。basic FGF使用時の創部の治癒過程をみると、線維芽細胞の増殖と筋線維芽細胞への分化が起こり、血管新生が再生組織内に密に生じている。その結果、創の収縮が起こる。この過程で感染は主に血流の増加による抗生物質の到達効果と、basic FGFの直接作用である免疫系細胞の賦活化、それに合わせて感染壊死組織のdebridmentにより感染の早期消失が起こったと考えられた¹¹⁾。通常の創傷治癒は、血餅・フィブリン塊が創面を被い、血小板由来のPDGFなどの増殖因子・細胞遊走因子が創面に炎症細胞の浸潤を促す。炎症細胞より放出されるTGF- β , basic FGFを中心とした増殖因子・サイトカインが線維芽細胞・表皮角化細胞の遊走・増殖を促進する。炎症細胞の中でも単球・マクロファージ由来の増殖因子が創傷

治癒の中心的役割を果たす^{12)~16)}。この創部の炎症が創傷治癒後も続くとき過剰な増殖因子・サイトカインが産生され線維芽細胞・表皮細胞の増殖が止まらなくなり、肥厚性瘢痕・ケロイドとなると考えられる。今回、basic FGFを投与例において肥厚性瘢痕・ケロイドが形成されなかった原因を考えると創面の感染物質・壊死組織をdebridmentすることによりできるだけ余計な炎症を誘導しないようにし、その創面にbasic FGFを塗布するようにした。結果として、炎症が必要最小に抑えられ、線維芽細胞が筋線維芽細胞に早期に分化し傷の収縮をみて創は速やかに表皮に覆われケロイドとならずに治癒したと考える¹⁷⁾。日本ではじめて臨床応用された細胞増殖因子であるbasic FGFは、これから実用化される細胞増殖因子の臨床使用の指標となると考えられる。細胞増殖因子は、基本的に局所投与により特定の組織・臓器に対する効果を求めるものである。また、ほとんどの細胞増殖因子が高分子タンパク質であることから、凍結乾燥状態から溶解した後は、熱・光に不安定であることを十分考慮した使用をしなければならない。これを守れば、細胞増殖因子はレセプターが発現している細胞に投与されれば、増殖・分化のシグナルが細胞内に入るため効果は保障されている。様々な組織の再生を考えるといくつかの増殖因子を連続的に使用する方法も考えねばならない⁷⁾¹⁸⁾。basic FGFについて言えば、上皮細胞に対する増殖刺激はないため皮膚の再生は別の上皮細胞増殖因子(epithelial growth factor)などの上皮細胞の増殖を促すものが合わせて使用できればさらに創の修復が促進されると考える¹³⁾。basic FGFをはじめ、様々な増殖因子がこれからの医療で役立つものになるかは、臨床現場において適応を考え適切な使用法で使用することが必要と考える。

参考文献

- 1) 中村敏一：再生医学から再生医療へ。実験医18：420-465, 2000
- 2) Andrades JA, Wu LT, Hall FL, et al: Engineering, expression, and renaturation of a collagen-targeted human bFGF fusion protein. Growth

- Factors 18:261-275, 2001
- 3) Baird A, Ueno N, Esch F, et al: Distribution of fibroblast growth factors (FGFs) in tissues and structure-function studies with synthetic fragments of basic FGF. *Cell Physiol Suppl* 5:101-106, 1987
 - 4) Imasaki S, Emoto N, Koba A, et al: Complementary DNA cloning and sequencing of rat ovarian basic fibroblast growth factor and tissue distribution study of its mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 30:256-263, 1988
 - 5) Abraham JA, Mergia A, Whang JL, et al: Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233:545-548, 1986
 - 6) Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, et al: Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 8:95-114, 1987
 - 7) Takehara K: Growth regulation of skin fibroblasts. *J Dermatol Sci* 24 Suppl 1:S70-77, 2000
 - 8) Scopsi L, Larsson LI: Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. *Histochemistry* 84:221-230, 1986
 - 9) Okumura N, Takimoto K, Okada M, et al: C6 glioma cells produce basic fibroblast growth factor that can stimulate their own proliferation. *J Biochem* 106:904-909, 1989
 - 10) Karey KP, Sirbasku DA: Differential responsiveness of human breast cancer cell lines MCF-7 and T47D to growth factors and 17 beta-estradiol. *Cancer Res* 15:4083-4092, 1988
 - 11) 西川克三, 長尾嘉信, 増田義重他: 腫瘍細胞の自己増殖における増殖因子の役割. *癌と化療* 14:1975-1979, 1987
 - 12) Tanaka E, Ase K, Okuda T, et al: Mechanism of Acceleration of Wound Healing by Basic Fibroblast Growth Factor in Genetically Diabetic Mice. *Biol Pharm Bull* 19:1141-1148, 1996
 - 13) Kibe Y, Takenaka H, Kishimoto S: Spatial and temporal expression of basic fibroblast growth factor protein during wound healing of rat skin. *Br J Dermatol* 143:720-727, 2000
 - 14) Hakvoort T, Altun V, van Zuijlen PP, et al: Transforming growth factor-beta (1), -beta (2), -beta (3), basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor expression in keratinocytes of burn scars. *Eur Cytokine Netw* 11:233-239, 2000
 - 15) Jacinto A, Martinez-Arriaga A, Martin P: Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 3:E117-123, 2001
 - 16) Singer AJ, Clark RAF: Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341:738-746, 1999
 - 17) Ono I: The effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on the breaking strength of acute incisional wounds. *J Dermatol Sci* 29:104-113, 2002
 - 18) Robson MC, Hill DP, Smith PD, et al: Sequential cytokine therapy for pressure ulcers: clinical and mechanistic response. *Ann Surg* 231:600-611, 2000