

# 閉塞性動脈硬化症とバージャー病に対する 血管新生遺伝子治療の臨床応用

森川 雅之  
外科学第二講座

閉塞性動脈硬化症とバージャー病を基盤とした難治性の末梢性動脈疾患に対する新しい治療手段として、遺伝子導入や細胞移植による血管新生療法が注目され、本邦でも臨床研究が進められている。血管新生において、血管内皮増殖因子（vascular endothelial growth factor, VEGF）は初期の血管内皮の分化増殖とネットワーク形成に関与し、Angiopoietin (Ang) は VEGF と協同でその後の血管構造の安定化や発達に寄与する。そこで、ウサギ下肢虚血モデルを用いた治療実験、ラットを用いた安全性試験から、VEGF, Ang1 遺伝子プラスミドの筋肉内投与を併用した血管新生療法の有用性と安全性について検討した。Ang1 遺伝子の前投与を併用した VEGF 遺伝子による血管新生療法は、VEGF 遺伝子単独投与に比べ良好な成熟血管の新生と循環動態の改善、VEGF 遺伝子投与により生じる浮腫の軽減がえられ、低毒性で優れた方法と考えられた。以上を基に臨床研究のプロトコールを作成したので併せて紹介する。

## (1) 末梢性動脈疾患 (Peripheral arterial disease, PAD)

組織に血液を灌流する末梢動脈に閉塞性病変が発生し、血液の供給が組織の需要を満たせない状態を“虚血”という。動脈閉塞の原因として、動脈硬化、血管炎と共に伴う血栓の形成などが挙げられる。通常、四肢の動脈では冷感、シビレに始まり、歩行時の疼痛（間歇性跛行）、安静時疼痛や皮膚の壊死、潰瘍と進展する(I)。

閉塞性動脈硬化症（arteriosclerosis obliterans, ASO）は、高血圧や糖尿病、高脂血症などの併存疾患を背景に、加齢や喫煙、性ホルモン、生活様式などの社会的・生物学的修飾を受けて発生し、粥状動脈硬化による内膜肥厚、血栓形成により、血管内腔の狭窄や閉塞が生じる。下肢への主幹動脈が侵されることが多く、60-70 歳の男性に多く認められる。

バージャー病（閉塞性血栓血管炎、thromboangiitis obliterans, TAO）は 1908 年 Bürger により最初に報告された疾患で、ASO より末梢の四肢の主幹動脈に慢性の

表 1. 臨床症状からみた重症度 (Fontaine分類)  
と治療法の選択

I度：冷感、シビレ感	保存的治療 ・禁煙 ・運動 ・薬物
II度：間歇性跛行 軽症	
III度：安静時疼痛 重症	血行再建 ・カテーテル形成術 ・バイパス術
IV度：潰瘍、壊死	

多発性分節性閉塞をきたし四肢末梢部に難治性の虚血性変化を起こす。原因は不明であるが、喫煙との関係が強く示唆され、ASO より若年の 50 歳以下の壮年男子に好発する。内膜炎を主病変とする動脈全層炎で、罹患動脈に血栓性閉塞を生じるが、動脈に伴走する深部静脈ならびに皮下静脈にも同様の血栓性静脈炎を起こすことが多い。

末梢動脈の閉塞により虚血が進行すると、その重症度に応じて症状を呈するようになる（表 1）。初期には冷感、シビレを

訴えるが (Fontaine 分類 I 度), 進行すると歩行により下肢痛が出現する。この疼痛は歩行を中止すると再度歩行可能となるまでに改善するが, 歩行の再開により疼痛が再出現し歩行が不能となるため間歇性跛行という特徴的な症状となる (Fontaine 分類 II 度), 歩行可能距離は, 虚血の進展とともに短くなり, 安静時にも疼痛を呈するまでに悪化する (Fontaine 分類 III 度)。さらに進行すると虚血領域の潰瘍や壊死を呈する (Fontaine 分類 IV 度)。

治療としては, 第一に禁煙や高血圧, 糖尿病, 高脂血症などの背景疾患のコントロールなどリスクファクターの除去が図られる。また, 側副血行の発達を促す目的で運動療法が勧められる。薬物療法としては, 末梢循環障害の改善を目的として, 血管拡張薬や抗血小板薬などの投与が開始される。進行例には, 閉塞性の病変に対する血行再建術が適応となる。血管内から閉塞性病変部の解除をはかる血管内治療としては, カテーテル先端に備えられた風船で病変部の狭窄を押し広げるバルーン形成術, 金属チューブを用いて拡張し内腔を広く保持するステント留置術が行われている。手術治療としては, 外科的に新たな血行路を作成するバイパス造成術のほか, 内膜摘除術, 交感神経節切除術などが行われる。

## (2) 重症虚血

閉塞性動脈病変による慢性的な安静時疼痛や潰瘍, 壊死があり, 血流改善がえられなければ, 6カ月から1年以内に肢切断に至ると予想される重篤な病態を重症虚血肢(critical limb ischemia, CLI)と呼ぶ(1)。この疾患群は血行再建が行えない症例や適切な治療を行っても再発する症例が多く, しばしば治療抵抗性である。側副血行の発達を促すのに運動療法が有効であるが, 重症例では安静時疼痛や潰瘍のために行えず, 現在有効な治療手段はない。欧米では5-15%の患者が肢切断を余儀なくされており, CLIの診断後2年の死亡率も32%と予後不良である。本邦における統計の詳

細な報告はないが, 大阪地方における肢切断の頻度が1.3肢/10万人/年と報告されており, 568万の北海道, 168万の札幌市(2003年)の人口から, 一年間に北海道では74肢, 札幌市では22肢が切断を余儀なくされていると推測される。肢切断後におけるQOLの低下は言うまでもないが, 肢切断後においても死亡率が高いことが知られており, CLIに対する新たな有効な治療手段の確立が望まれている。

## (3) 治療的血管新生

血管新生治療は, 血管新生因子またはその遺伝子, あるいは血管新生因子を産生したり血管内皮などに分化したりする細胞を用いて, 側副血行を発達させて虚血を改善しようとするものである。血管新生因子としては, 血管内皮細胞に特異的な因子として vascular endothelial growth factor (VEGF), 内皮細胞に非特異的因子として basic fibroblast growth factor (bFGF) や hepatocyte growth factor (HGF) が知られており, 動物モデルでもこれらによる側副血行路の発達や促進が示されている(2)。細胞療法としては, 自家骨髄細胞移植などが本邦を中心に検討されている。

米国の Isner らは VEGF 遺伝子プラスミドを用い, 当初はカテーテル的に動脈壁へ, 次いで下肢筋肉への直接投与によって, 100例以上のPADに対して臨床治験を行っており, 70%以上のCLI症例に臨床的側副血行路の発達や臨床症状(上腕足関節血圧比, 血行, 潰瘍, 疼痛)の改善を認めている(3, 4)。この他バージャー病に対する良好な治療効果(5)や糖尿病神経障害を含む虚血性神経障害の改善(6)なども報告されている。本邦では, 大阪大学の森下らが HGF 遺伝子を用いた臨床治験を22例に行い60-65%の症例で疼痛や血行の改善を報告している(第9回日本遺伝子治療学会総会抄録)。

## (4) Ang1 と VEGF の併用による血管新生療法

VEGF 遺伝子導入による血管新生治療の副作用として、血管新生そのものが内包するリスクである悪性腫瘍や糖尿病性網膜症の促進が危惧される。2例に血管腫の発生が報告されたが、1例は摘出標本で良性と組織診断され、他の1例は自然消退し、現在まで悪性腫瘍や糖尿病性網膜症の悪化の報告はない。頻度の高い副作用は浮腫の発生で、90例中31例(34%)で認められたが、好運にも重大な健康被害とはなっていない(4)。VEGFは血管透過性因子とも呼ばれており、血管内から血管外へ液性成分の漏出を促進するので、浮腫の発生は必然的な副作用と考えられる。浮腫が生じると、組織圧増大から静脈還流を障害する可能性があり、重度の末梢循環障害を有するCLIの患者では、虚血を悪化させる危険性が指摘される。

血管新生の過程は、VEGFをはじめとした血管内皮増殖因子の作用による内皮(内膜)血管の発芽に始まる。発芽した血管は、発達の過程で Platelet-derived growth factor (PDGF)などの作用を介して増殖した血管平滑筋細胞と接着し、裏打ちされて、三層構造をもった成熟血管へと分化、再構成される。このように、初期の血管は脆弱で血管外への血漿漏出が容易に起こると考えられるが、血管新生の後期には漏出に強い安定した血管となる。この血管内皮と血管平滑筋との堅固な接着による血管の安定化に重要な役割を果たすのがAngiopoietin-1(Ang1)である(7)。われわれは、VEGF遺伝子にAng1遺伝子を併用することにより、VEGF遺伝子単独治療に比べて良好な機能を有する成熟血管の新生が起り、その結果、より良好な循環動態の改善、VEGF遺伝子治療で生じる浮腫の軽減がえられるのではないかと考え、以下の前臨床研究を行った。

## (5) 前臨床研究

前述したように、血管新生において、血管内皮増殖因子(VEGF)は初期の血管内皮の分化増殖とネットワーク形成に関与

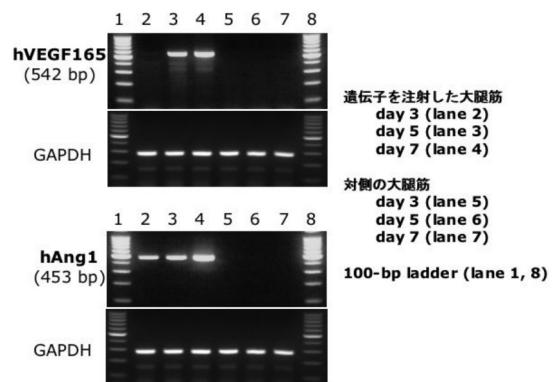


図1. ウサギの大腿筋における導入遺伝子の発現

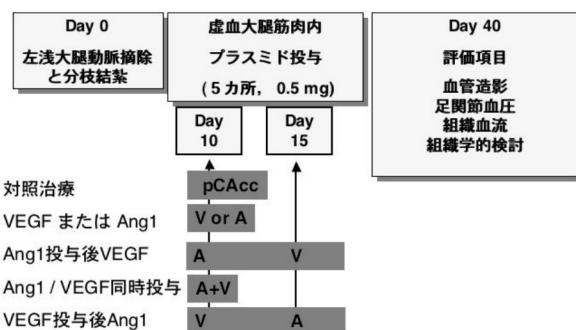


図2. Ang1, VEGF遺伝子治療の動物実験プロトコール

し、Ang1はVEGFと協同でその後の血管構造の安定化や発達に寄与する。そこで、ウサギ下肢虚血モデルを用いた治療実験、ラットを用いた安全性試験から、VEGF、Ang1遺伝子プラスミドの筋肉内投与を併用した血管新生療法の有用性と安全性について検討した。

**血管新生効果：**VEGFおよびAng1プラスミドDNA(pCAccベクター)をウサギの大腿筋に注射し、遺伝子の発現をRT-PCRにて検討したところ、遺伝子導入後3日以降でその発現を確認した(図1)。左浅大腿動脈を全長に亘り切除したウサギ下肢虚血モデルを作成し(d0)、10日後(d10)ないし15日後(d15)にVEGFおよびAng1プラスミドDNA500μgを虚血局所の筋肉内5カ所に投与した(V群: VEGF(d10)単独投与、A群: Ang1(d10)単独投与、A+V群: VEGF, Ang1(d10)同時投与、A-V群: Ang1(d10), VEGF(d15)投与、V-A群:

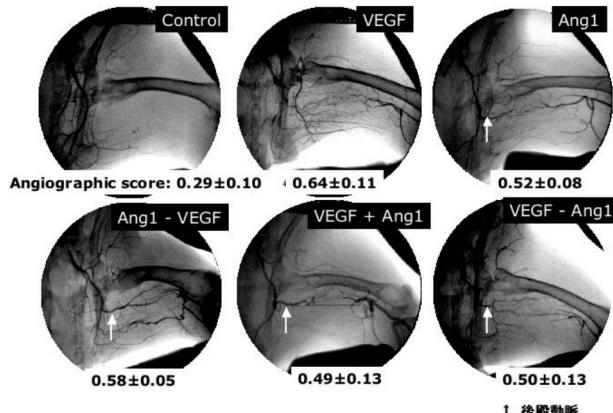


図3. VEGF, Ang1遺伝子導入による血管新生効果（選択的内腸骨動脈造影）

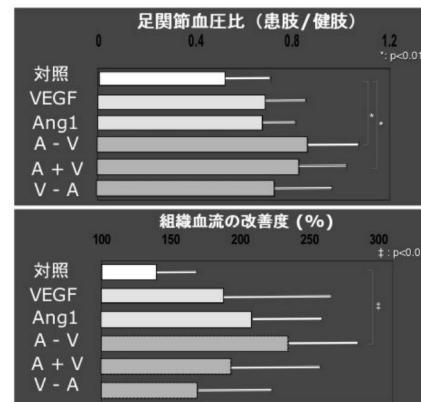


図5. Ang1前投与を併用したVEGF遺伝子治療は虚血肢の血流を改善する

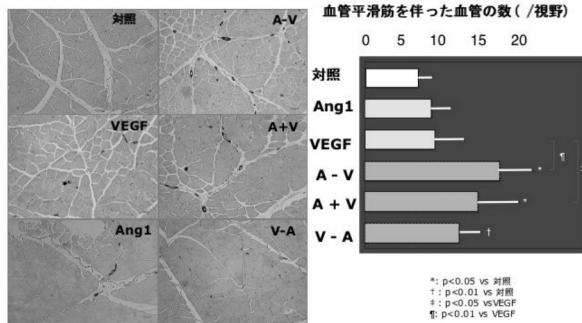


図4. 血管平滑筋を伴う成熟血管の新生

VEGF (d10), Ang1 (d15) 投与, 対照群: コントロールプラスミド投与) (図2)。遺伝子導入30日後(d40)に評価を行ったところ, 血管造影における虚血領域の血管数(図3)や組織学的な毛細血管の密度は遺伝子導入を行った全ての群で対照群よりも有意に高値で良好な血管新生効果を認めた。一方, 平滑筋細胞を伴う細動脈の密度はA-V群でV群, A群の単独治療群より有意に高値で(図4), 血管造影で確認した後殿動脈径もV群に比し有意に大であった(図3)。さらに, A-V群でのみ虚血肢の血圧と組織血流の有意な改善を認めた(図5)。

また, VEGF遺伝子導入により左側下肢に浮腫が発生するが, これは左側陰嚢の腫大として顕著に認められることから, 左側陰嚢を写真撮影しVEGF遺伝子導入前後での面積変化から浮腫の程度について評価した。VEGF遺伝子導入5日後に導入前の約1.5倍に陰嚢が腫大したのに対

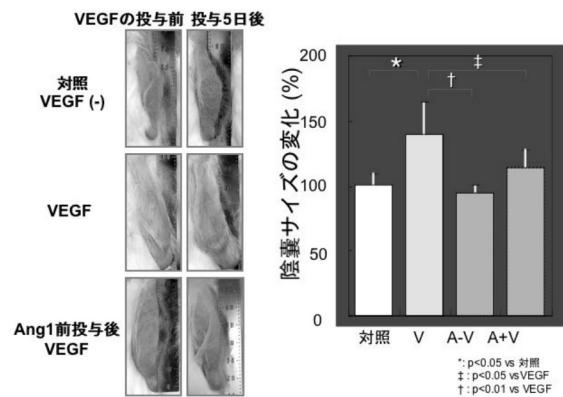


図6. Ang1によるVEGF誘導性浮腫の予防抑制効果

して(V群), A-V群, A+V群では浮腫の発現がないか有意に軽度であり, Ang1による浮腫の予防抑制効果が示された(図6)(8)。

プラスミド投与の安全性:ヒトの臨床使用を想定し, pCAccベクターからウイルス由来のSV40oriを取り除き, 安全性を高めたプラスミドベクター, pCA1ベクターを用いて, プラスミド投与の安全性に関する検討をGLPに準拠した施設に依頼して行った。Ang1とVEGFプラスミドDNAの単独あるいは併用投与(各プラスミド1mg/kg, 同時投与では各0.5mg/kg)について, SDラット(n=112)を用いた単回筋肉内投与試験, 1カ月間反復筋肉内2回投与試験及び最終投与後1カ月と3カ月での回復試験を施行し, 生死, 体重, 一般状態, 血液尿検査, 病理組織学的検査について検討した。注射部位に軽微で可逆的な非特異的炎症性変化を認めたが, 死亡や有意な副作用

表2. 除外基準

- 生命予後が1年未満
- 悪性腫瘍：（疑い、既往歴）
- 重度の糖尿病性網膜症
- 1型糖尿病
- 妊娠可能な女性
- 避妊を拒絶する男性
- 外科的血行再建術、血管形成術、あるいは腰部交感神経節切除術を受けてから2ヵ月未満
- HB、HC、HIV、ATLなどのウイルス感染症
- 虚血四肢に骨髓炎
- 重篤な肝機能異常
- 慢性維持透析患者
- 過去3ヵ月以内に大手術の既往
- 過去3ヵ月以内にアルコール、薬物依存の既往
- インフォームドコンセントを得られない患者
- 遺伝子治療臨床研究の遂行に重大な支障のあるもの



図7. バイアル化されたVEGFおよびAng1遺伝子プラスミド

を認めた動物はなかった。

以上の結果より、Ang1 遺伝子の前投与を併用した VEGF 遺伝子による血管新生療法は、VEGF 遺伝子単独投与に比べ良好な成熟血管の新生と循環動態の改善、VEGF 遺伝子投与により生じる浮腫の軽減がえられ、低毒性で優れた方法と考えられた（血管再生療法：特許出願 2001-174919、平成 13 年 6 月 8 日提出）。

## （6）臨床研究プロトコール

前臨床研究の結果を基に、難治性の重症末梢性動脈疾患（ASO とバージャー病）に対する Ang1、VEGF 遺伝子プラスミドを用いた血管新生療法の安全性と有効性を検討する目的で、臨床研究を計画した。原則として 40 歳以上、80 歳未満の ASO、バージャー病で、安静時疼痛（Fontaine 分類 III 度）、難治性の虚血性潰瘍、壊死（Fontaine 分類 IV 度）が 4 週間以上継続し、薬物治療で症状の改善がえられず、血管内治療やバイパス術などの血行再建術が不能か術後に再発を来たした有効な治療法のない 10 症例を対象とした。

表2に示す除外基準を設定し、研究計画の安全性と倫理性を担保した。インフォームドコンセントをえられない患者を除外するのは無論のこと、血管新生により悪性腫瘍の促進や糖尿病性網膜症の悪化が危惧されることから、悪性腫瘍あるいはその既往や疑いを有する患者、1型糖尿病や治療抵抗性の重度の糖尿病網膜症を有する

患者、遺伝子治療による次世代への影響を排除するため、妊娠中、授乳中および妊娠可能である女性患者、生殖可能な男性患者で規定の期間にわたって避妊を行うことを拒絶する患者は除外した。候補となる患者は、治療前検査（表3）にて選択基準や除外基準について詳細に検討され、適応決定については本学遺伝子治療審査委員会の適応評価小委員会の承認を必須とした。なお、静脈内プロスタグランдин投与による治療あるいは高圧酸素による治療に関しては、患者が同意し、なおかつ医師によって適切と判断された場合には中止とした。また、アスピリン、クマデイン、経口プロスタグランдин製剤、血管拡張薬（カルシウム拮抗剤、ACE阻害剤）、血小板凝集抑制薬（チクロピジン、シロスタゾール）などの薬剤に関しては、遺伝子治療臨床研究に入る前に最低 3 ヶ月間にわたり投薬されている場合には、それらの薬剤を継続しても良いこととした。

各遺伝子プラスミドは名古屋大学において GMP 規準で作製され、バイアル化されて用意される（図7）。遺伝子導入法については、ウサギ下肢虚血モデルの治療実験における方法と同様、虚血筋肉内 4 カ所への遺伝子プラスミド直接投与とし、Ang1 遺伝子プラスミドの 5 日後に VEGF 遺伝子プラスミドを導入することとした。遺伝子発現が約 2-3 週継続することが期待されることより、Isner らや大阪大学の森下らの導入方法に準じて 5 週の間隔を置いて同量を

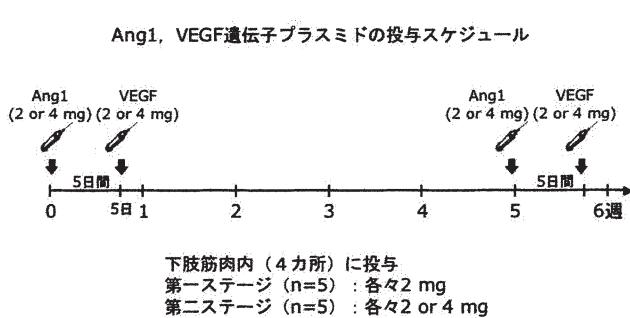


図8. 遺伝子導入方法

再投与することとし、およそ2ヵ月間遺伝子発現を維持できるように設定した。最初の5例では各々2 mgの投与で安全性と治療効果の確認を行い、残りの5例では、2 mgの投与で効果がえられない場合、4 mgに增量して有効用量についても検討することとした(図8)。

治療遺伝子投与開始後は表3に示す観察・検査項目、スケジュールで安全性および効果判定のため詳細に評価を行う。各症例についてAng1投与開始後1ヵ月、3ヵ月、6ヵ月、開始後1年の観察期間終了の時点で判定に必要な評価結果を適応評価小委員会に提出し、安全性および治療効果の評

価を受ける。

なお、設定した効果判定基準を以下に示す。

#### 1) Rutherford分類による判定

Rutherford「慢性虚血肢の臨床分類」(表4)及び「臨床状態の変化についての段階表」(表5)を使用する(9). +1以上を改善とみなす。

#### 2) 無侵襲診断法による下肢血行評価判定

仰臥位でのABI(ankle-brachial Index), TcPO<sub>2</sub>, サーモグラフィーあるいはレーザードップラー血流計により評価する。

#### 3) 血管造影及び画像診断(MRA, CT)による判定

表3に示すスケジュールに従って可能な限り施行する。

#### 4) QOLによる判定

SF-36を参考にQOLを評価する。

#### 5) バージャー病

特にバージャー病では、上記の評価法だけでは充分に評価できない可能性が高いことから、上記の評価法に加え、冷感や疼痛の程度、潰瘍の大きさなど、症状や臨床所見の悪化ないし改善を評価する。

表3. 評価項目と予定

	遺伝子治療開始前												遺伝子治療開始後											
	週		月										週		月									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1 患者背景と転帰	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2 自覚症状、身体所見	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
3 CBC, 生化、尿	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4 腹痛マーカー、便	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5 VEGF, Ang1血中濃度等測定用血清保存	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6 胸部X線	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
7 ECG	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
8 胸腹部CT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
9 感染症	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10 頭部MRI	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
11 胃Ba, GTF	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
12 直腸診(直腸、前立腺)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
13 婦人科的診察(乳房、内診、細胞診)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
14 眼科検査(眼底)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
15 足関節血圧(ABI)	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
16 TcPO <sub>2</sub> 、サーモグラフィー	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
17 MRA	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
18 下肢CT	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
19 血管造影	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
20 QOL評価	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
21 安全性評価	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

表4 慢性虚血肢の臨床分類(Rutherford RB, et al. J Vasc Surg 1986, 4: 80-94)

度	群	臨床定義	客観的基準
0	0	無症状-循環動態からみて有意な閉塞性病変なし	トレッドミル試験あるいは反応性充血試験正常
	1	軽度跛行	トレッドミル運動負荷試験終了可 <sup>#</sup> ;運動後の AP>50mmHg、しかし安静時に比し、最低 20mmHg 下降
	2	中等度跛行	1 群と 3 群の中間
I	3	高度跛行	トレッドミル運動負荷試験終了不能 <sup>#</sup> および運動後 AP<50mmHg
	4	虚血性安静時痛	安静時 AP<40mmHg、足関節あるいは中足骨 PVR の平坦化あるいは波高の激減;TP<30mmHg
II*	5	軽度組織喪失-非治癒性潰瘍、広範足趾虚血を伴う限局性塊疽	安静時 AP<60mmHg、足関節あるいは中足骨 PVR の平坦化あるいは波高の激減;TP<40mmHg
	6	広範な組織喪失-TM より高位に拡大、もはや機能的足部リム・サルベージ不可能	5 群と同じ

AP、足関節圧;PVR、容積脈波測定;TP、足趾血圧;TM、中足骨

\*II 度および III 度、4、5 および 6 群は、重症虚血肢(慢性)と同義である

<sup>#</sup>勾配 12%、2mph にて 5 分間

表5 臨床状態の変化についての段階表(Rutherford RB, et al. J Vasc Surg 1986, 4: 80-94)

+3	著明改善:虚血症状なく、足部病変は完全治癒、ABI は正常化(0.90 以上)
+2	改善:足部病変はないが運動時に症状あり、表 3 の少なくとも 1 群改善、ABI は正常でないが 0.10 以上は上昇
+1	やや改善:ABI は 0.10 以上改善するも群(表 3)の改善なく、又は逆に ABI 0.10 以上の増加はないが群が改善
0	無変化:群の変化なく ABI 0.10 未満の上昇
-1	やや悪化:群は下がらないが ABI 0.10 以上の減少又は、群は下がったが ABI 0.10 未満の減少
-2	悪化:群は 1 つ下がったが、小切断が必要となった場合
-3	著明悪化:1 群以上の悪化、大切断が必要となった場合

ABI:足関節上腕動脈圧比、これが旨く計れない場合は足趾血圧や再建部位すぐ末梢の血圧をその替わりとしてよい

## (7) まとめ

VEGF, Ang1 遺伝子プラスミドの筋肉内投与を併用した血管新生療法の有用性と安全性についてウサギ下肢虚血モデルを用いた治療実験、ラットを用いた安全性試験から検討した。Ang1 遺伝子の前投与を併用した VEGF 遺伝子による血管新生療法は、VEGF 遺伝子単独投与に比べ良好な成熟血管の新生と循環動態の改善、VEGF 遺伝子投与により生じる浮腫の軽減がえられ、低毒性で優れた方法と考えられた。

以上を基に安全性と効果を検討する臨床治験実施計画を作成し、本学遺伝子治療臨床研究審査委員会の承認をえた(平成 15 年 5 月)。その後、GCP 省令を遵守したプロトコールに改訂し、医師主導型治験として本学臨床研究審査委員会の承認をえた(平成 15 年 12 月)。平成 16 年 1 月中に本邦発の医師主導型治験として厚生労働省に申請を行う予定である。

## 文献

- Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC). J Vasc Surg 2000, 31 (1 Pt 2): S1-S296.
- Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. Circulation 1994, 90 (5 Pt 2): II228-34.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM. Constitutive expression of pHVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. Circulation 1998, 97 (12): 1114-23.
- Baumgartner I, Rauh G, Pieczek A, Wuensch D, Magner M, Kearney M, Schainfeld R, Isner JM. Lower-extremity edema associated with gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor. Ann Intern Med 2000, 132 (11): 880-4.
- Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) by

- intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998, 28 (6): 964-73; discussion 73-5.
- 6. Simovic D, Isner JM, Ropper AH, Pieczek A, Weinberg DH. Improvement in chronic ischemic neuropathy after intramuscular phVEGF165 gene transfer in patients with critical limb ischemia. *Arch Neurol* 2001, 58 (5): 761-8.
  - 7. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000, 407 (6801): 242-8.
  - 8. Yamauchi A, Ito Y, Morikawa M, Kobune M, Huang J, Sasaki K, Takahashi K, Nakamura K, Dehari H, Niitsu Y, Abe T, Hamada H. Pre-administration of angiopoietin-1 followed by VEGF induces functional and mature vascular formation in a rabbit ischemic model. *J Gene Med* 2003, 5 (11): 994-1004.
  - 9. Rutherford RB, Flanigan DP, Gupta SK, Johnston KW, Karmody A, Whittemore AD, Baker JD, Ernst CB, Jamieson C, Mehta S. Suggested standards for reports dealing with lower extremity ischemia. Prepared by the Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery/North American Chapter, International Society for Cardiovascular Surgery. *J Vasc Surg* 1986, 4 (1): 80-94.