

別紙 1

厚生労働科学研究費補助金

臨床試験推進研究事業

シロリムスによるリンパ脈管筋腫症の

第 III 相国際共同臨床試験 MILES trial に関する研究

主任研究者 中田 光

課題番号 H19-臨床試験—一般—008

平成 20 年 4 月 10 日

目次

I. 総括研究報告

シロリムスによるリンパ脈管筋腫症の第III相国際共同臨床試験 MILES trial の準備  
経過報告・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3

新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター

教授 中田 光

付録資料：MILES 試験患者配布資料（ホームページ・リーフレット原稿）

II. 分担研究報告

1. リンパ脈管筋腫症患者の QOL 調査・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 15

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター 臨床研究センター

呼吸不全研究部長 井上義一

2. リンパ脈管筋腫症患者の血清マーカー探索のための予備調査研究・・・・ 19

新潟大学医歯学総合病院 生命科学医療センター

准教授 吉澤弘久

3. リンパ脈管筋腫症の MILES trial のためのクリティカルパス作成・・・・ 25

新潟大学医歯学総合病院 第二内科

助教 中山 秀章

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

厚生労働科学研究費補助金（臨床試験推進研究事業）

総括研究報告書

シロリムスによるリンパ脈管筋腫症の第 III 相国際共同臨床 試験 MILES trial

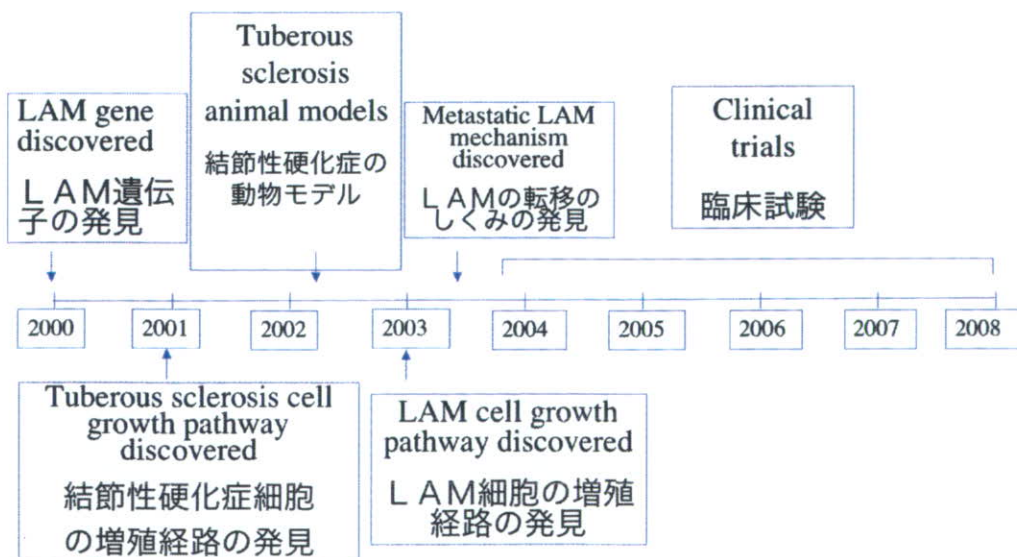
主任研究者 中田 光 新潟大学医歯学総合病院教授

研究要旨：リンパ脈管筋腫症(Lymphangiomyomatosis: LAM)は若年女性が罹患し進行性予後不良の難治性稀少疾患である（15年生存率 68%）。現時点で有効な治療法はない。本邦で約 173 例が報告されている。最近、米国で免疫抑制剤シロリムスの I/II 相試験が行われ、呼吸機能が改善することが確認された。07 年より国際共同臨床試験が始まるが、新潟大学と近畿中央胸部疾患センターはその施設に指定された。本研究では、本邦の患者へのシロリムスの有効性と安全性を検証し、QOL の向上を計る。

分担研究者氏名・所属機関名・職名  
井上義一・国立病院機構近畿中央胸部疾患センター・研究部長  
吉澤弘久・新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター・准教授

パ管などで増殖する疾患である。常染色体優性遺伝の結節性硬化症に合併する LAM (TSC-LAM)と、遺伝性のない孤発性 LAM (Sporadic LAM)に分類される。癌抑制遺伝子として機能する結節性硬化症 (TSC) 遺伝子の変異が LAM 細胞に検出されることが、90年代の終わりに判明した。そのことが契機となって、下図に示すように、LAM の病因に関する研究は今世紀に入っ

A.研究目的： リンパ脈管筋腫症 (lymphangiomyomatosis, LAM) は、妊娠可能年齢の女性に発症する稀な疾患。平滑筋様細胞 (LAM 細胞) が肺やリン

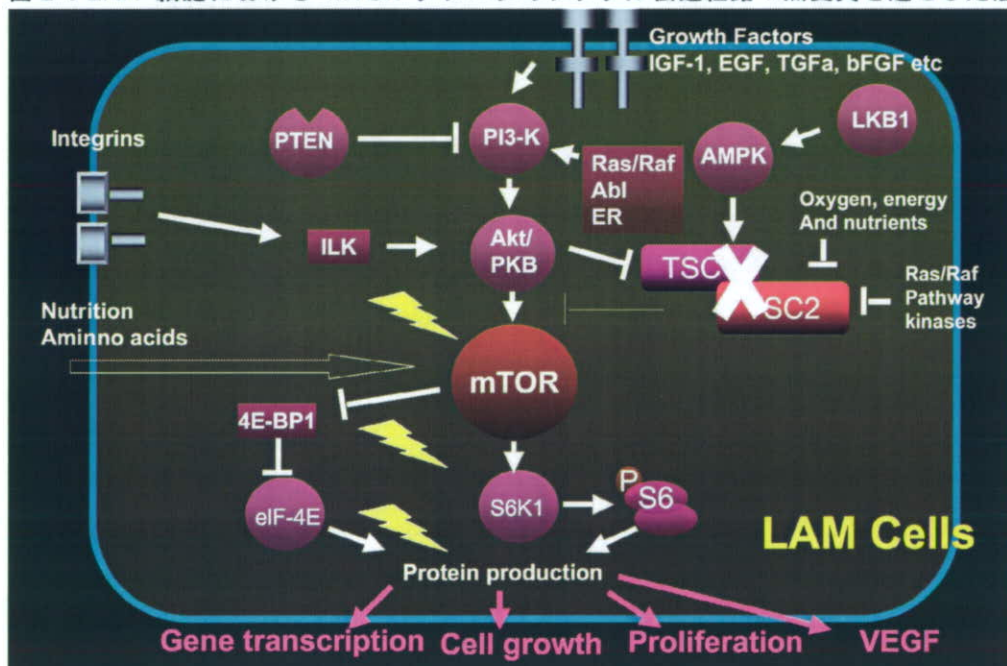


て急速に進歩した。

以上の研究から、LAM は癌抑制遺伝子であるハマルチン遺伝子(*TSC1*)座(9q34)および第16染色体上のツベリン遺伝子(*TSC2*)座(16p13.3)のどちらか一方における突然変異によって誘発されることがわかった。*TSC* 遺伝子の2本ともに決定的な突然変異があると、その遺伝子によって生成されるツベリンまたはハマルチンが欠陥や欠乏をきたし、その結果、タンパク質機能が失われ、細胞の成長、生存および/または移動の調節ができなくなる。その結果、LAM 細胞は異常に増殖するのである。最近の研究

データで、*TSC* または *LAM* の細胞機能異常におけるツベリンおよびハマルチンの役割が明らかになった。ショウジョウバエ実験により、ツベリン減少により細胞周期コントロールに異常が生じ、S 期の反復のみでM 期に移行しないことが明らかになった。これらの研究や別の研究でも、ツベリンおよびハマルチンは栄養取り込み、細胞サイズおよび増殖を調節する *PI3K/PKB(Akt)/mTOR/S6K* シグナリング経路の主要な構成要素であることが判明した(図2)。

図2 : LAM 細胞における mTOR タンパクのシグナル伝達経路：点変異を起こした癌抑制遺伝子



*TSC1/TSC2* がコードしているツベリン・ハマルチンの異常により *mTOR* の制御が障害されている。

ツベリンおよびハマルチンは結合して複合体になり、Rheb と呼ばれる中間 G タンパク質を介して、Akt 経路のキナーゼ *mTOR* (哺乳動物におけるシロリムスの標的) の主要な調節因子として機能する。正

常なツベリン/ハマルチン複合体は、Rheb を不活性非リン酸化状態(Rheb GDP)に維持する。Akt によるツベリンリン酸化はツベリン/ハマルチン複合体の GAP 活性を不活性化し、解離を引き起こす。その結果 Rheb-GTP が増え、*mTOR* を介して S6 ま

での下流標的および開始因子抑制剤である 4E 結合タンパク質(4E-BP1)が活性化される。結節性硬化症や LAM 患者に発生するツベリンまたはハマルチン欠如、または機能不全をもたらす遺伝子突然変異は、S6K および 4E-BP1 の構成的活性化ならびに増殖調整機能欠如を誘発する。以上のことから、ツベリン・ハマルチンの下流にあるタンパクが LAM 細胞増殖抑制のターゲットとなりうるが、その中でもシロリムスなどの Akt 経路シグナリング阻害剤が最も有望と考えられた。シロリムスは FK-506 結合タンパク質 12(FKBP-12)に結合し、mTOR を阻害する。実際、シロリムスは結節性硬化症モデルバエに投与すると細胞の大きさの異常を元に戻したり、また、結節性硬化症モデルラットならびにマウスに投与すると癌の成長を遅らせることが明らかになっている。

以上を根拠として、腹部血管筋脂肪腫を有する LAM 患者を対象に 2003～2006 年にシロリムスの I・II 相試験が行われた。シロリムスが 6 ヶ月以上投与された患者における腎血管筋脂肪腫は、6 ヶ月で平均 15%(n=9)、12 ヶ月で 35%(n=2)と、月平均で約 2.5%退縮した。臨床試験開始時に肺機能異常 (FEV<sub>1</sub> が予測量の

80%未満)があり、投与期間が 6 ヶ月以上であった LAM 患者 7 例における FEV<sub>1</sub> は平均 154±139 cc 改善し (個々の ΔFEV<sub>1</sub> 値は 250cc、190cc、10cc、170cc、370cc、130cc および -40cc)、FVC は平均 561±307cc 改善した (個々の値は 610 cc、380cc、1,050cc、560cc、270cc、210cc および 850cc) (図 3)。データ入手可能なこれらの少数患者においては、全肺気量の有意変化を伴うことなく残気量が予測量の平均 47%減少し、また肺拡散能に変化はないようであった。2004 年春現在における副作用については、患者の約半数に口腔内潰瘍形成 (用量減量または休業日設定で対処)、および約 3 分の 1 に食事療法または治療的介入を要する血清中脂質濃度上昇が認められた。短期入院 (いずれも 3 日以内) 4 例のうち 1 例が飲食困難な口腔内潰瘍形成、1 例がシロリムス投与中に治癒した市中感染性肺炎 (臨床試験医師は呼ばれなかった)、下痢症が 2 例あり、その原因は *C. difficile* 感染、スタチン及びシロリムスによると考えられた。気管支炎および上気道感染数例の多くにおいてはシロリムス投与が控えられたが、日和見感染やシロリムス肺臓炎に一致するような原因不明の肺浸潤は認められていない。

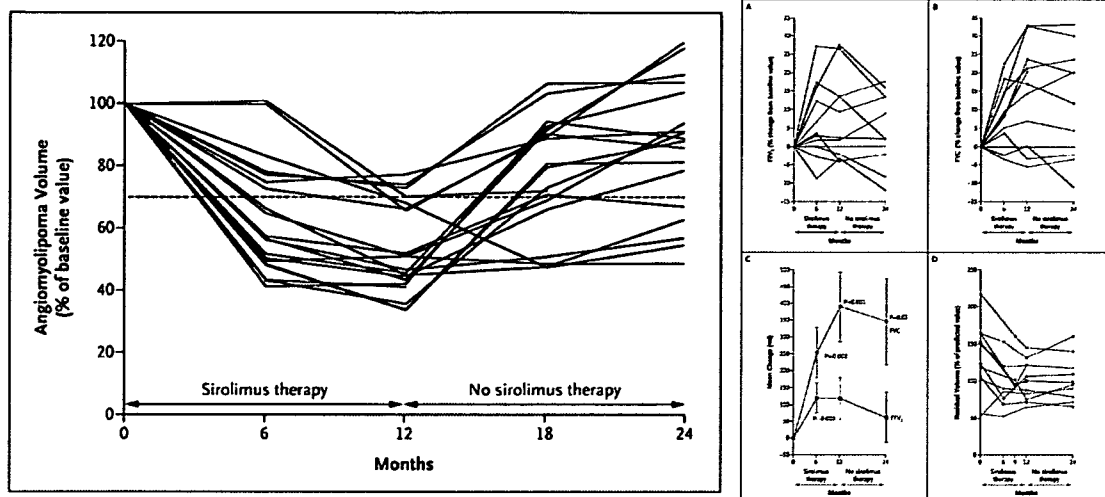


図3 : LAM 患者を対象に行われたシロリムスの I・II 相試験における肺機能の変化  
 Bissler JJ et al. N Engl J Med 2008;358:140-151

## B. 研究方法

### 1. 本臨床試験の目的と試験実施組織

シロリムス (rapamycin) は欧米を中心に世界で移植後の免疫抑制剤として認可され、汎用されているが、免疫抑制以外に抗腫瘍剤としても最近注目されている。LAM に対しても、上述したように抗腫瘍効果が期待できる。本試験は、治療薬として米国 Food and Drug Administration (FDA) の承認を目的とする第 III 相国際共同多施設臨床試験である。日米加 3 カ国において 120 症例を治療登録する。試験の主任研究者は、シンシナティ大学 Medical Center Frank McCormack, M.D. で、下表に示す 12 施設が参加している。試験全体のプロジェクトマネージャーが各施設の臨床試験の立ち上げを支援し、文書整備、スタッフ教育、実施体制の審査を行っている。試験薬剤は、シンシナティ小児病院の中央薬剤部

が白箱（実薬と偽薬のセット）を管理し、各試験施設に発送している。シロリムスの血中濃度（トラフ値）は、シンシナティ小児病院の中央検査部が各施設から送付された検体を中央で測定する。各施設はプロトコルに準じて試験を実施し、データは全て WEB 上で入力し、フロリダにある Data Technology Coordinating Center (DTCC) がデータの収集と解析を行う。DTCC は、スタッフ教育のためのビデオを配信するほか、プロトコルや手順書などの配信、インターネットを利用した会議なども行っている。有害事象やプロトコルの齟齬など、試験全体の安全性や実施体制の審査は NIH にある Data Safety Monitoring Board (DSMB) が行っている。我が国の試験体制としては、新潟大学と近畿中央胸部疾患センターが独立して、試験を実施するが、そのプロジェクトマネジメント（たとえば、プロトコル変更の IRB 申請手続きや Site Initiation の手続き、データモニタリング、文書整備）はシミック株式会社がそれぞれと契約してサポートしている。

表 1. 試験参加施設と試験実施のための体制

主任研究者：Frank McCormack, M.D.,  
シンシナティ大学 Medical Center,  
プロジェクトマネージャー：Matthew  
Hodgison

・臨床試験実施施設:

1. Oregon Health & Sciences University
2. National Jewish Medical & Research Center
3. Harvard/Brigham & Women's Hospital
4. University of Texas Health Center
5. Cleveland Clinic Foundation
6. Medical University of South Carolina
7. Cincinnati Children's Medical Center
8. University of Florida, Gainesville
9. 新潟大学医歯学総合病院
10. 国立病院機構近畿中央胸部疾患センター
11. National Institutes of Health
12. University of Toronto

- ・薬剤の中央管理と送付
- ・ Cincinnati Children's Medical Center 中央薬剤部
- ・ シロリムス血中濃度測定
- ・ Cincinnati Children's Medical Center 中央検査部
- ・ データマネジメントとスタッフ教育ビデオ配信・患者無作為割付
- Data Technology Coordinating Center, Tampa, Florida
- ・ 安全性の審査とデータモニタリング
- Data Safety Monitoring Board, NIH
- ・ 日本の臨床試験のプロジェクトマネジメントとデータモニタリング
- CIMIC 株式会社

2. 試験内容

シロリムスの投与期間は12ヶ月で、投与後の観察期間は12ヶ月である（全試験期間は3年間）。本試験は米国シンシナティ大学に本部を置く Rare Lung Disease Clinical Research Consortium が実施する医師主導型治験であるが、本邦ではシロリムスが認可されていないため、新潟大学と近畿中央胸部疾患センターではそれぞれの IRB に自主臨床試験として申請し、承認された。統一プロトコールはすでに NIH, FDA, 及びシンシナティ大学の治験審査委員会の承認を得ている。申請者らは統一プロトコールを我が国の新 GCP に即したものに改訂した。我が国の割り当て目標症例数は、30例である。臨床試験は

二重盲験法を用いて行われ、適格患者は登録後、Data and Technology Coordinating Center(DTCC)により匿名番号化され、さらに実薬群と偽薬群に無作為に割り付けられ、本部より薬が新潟大学あるいは近畿中央胸部疾患センターへ送られてくる。患者は当初 2 mg の薬剤を服用するが、定期的に採血され薬剤血中濃度を測定し、用量を調節する。治験コーディネーター（CRC）は電話で頻繁に患者と連絡をとり、試験責任医師に報告すると共に検査データと有害事象は web 上で DTCC に登録する。患者の血液は定期的に本部に発送する。1年目には3ヶ月毎、2年目には6ヶ月毎に肺機能をチェックし、12ヶ月後の一秒量の改善を主要評価項目とする。

各アーム患者25例が1年目に達したところで、中間解析し、実薬と偽薬群の肺一秒量改善の有意差 P値が0.0054以下であれば、

盲検を解除、エントリーした全員が1年間の実薬投与をうける。

★目的：リンパ脈管筋腫症患者を対象にシロリムスの有効性と安全性を調べる。

★第三相並行群間二重盲検試験

★エントリー期間は2007～2009年、後観察を含めて全試験期間4年

★投薬1年、後観察1年

★目標症例数は120例（我が国の目標30例）

★Data and Technology Coordinating Center(DTCC)

フロリダにある。MILES trialの全データと有害事象はWeb上でここに集められる。

★データと安全性のモニタリング部門(DSMB) NIHにある。実施計画書、同意説明書、モニタリング画、及び登録前の訪問表を審査し、NIHと関係スポンサーにアドバイスし、評価項目を調べ、継続か終了か修正かをNIHに勧告する。

★主要評価項目

治療開始前後の呼吸機能検査で一秒量の改善



主要評価項目：1年間の1秒量の改善

### C. 研究結果

平成18年4月に本臨床試験に参加が決まってから、実に2年を準備に費やしている。最初の大きな壁は、我が国の臨床試験のIND Holder(治験届け)を誰が行うかという問題だった。我が国の医師主導治験として届けることは可能だったが、以下の問題があった。

1. シロリムスの発売元である Wyeth 社が承認後の我が国における発売を拒否している。
2. 我が国の医師主導治験として届けるには膨大な費用と時間がかかる。
3. 仮に届けることが可能だとしても、医薬品機構からプロトコルの変更の要請が出て、国際共同臨床試験から脱落して

しまう可能性がある。

以上のことから、本試験により、有効性と安全性を証明し、将来的には先進医療として特定機能病院において LAM 患者の治療にあたるのが得策と考えた。主任研究者の Frank McCormack 医師とのねばり強い交渉により、同医師が日本の治験届けを FDA に申請した。

次の大きな壁は、日米の医療制度上の相違をプロトコル上でどのように切り抜けていくかという問題だった。プロトコルの立ち入った内容については、明らかにできないが、米国本部が DTCC の勧告により、附記という形で、日本とカナダのプロトコル変更事項

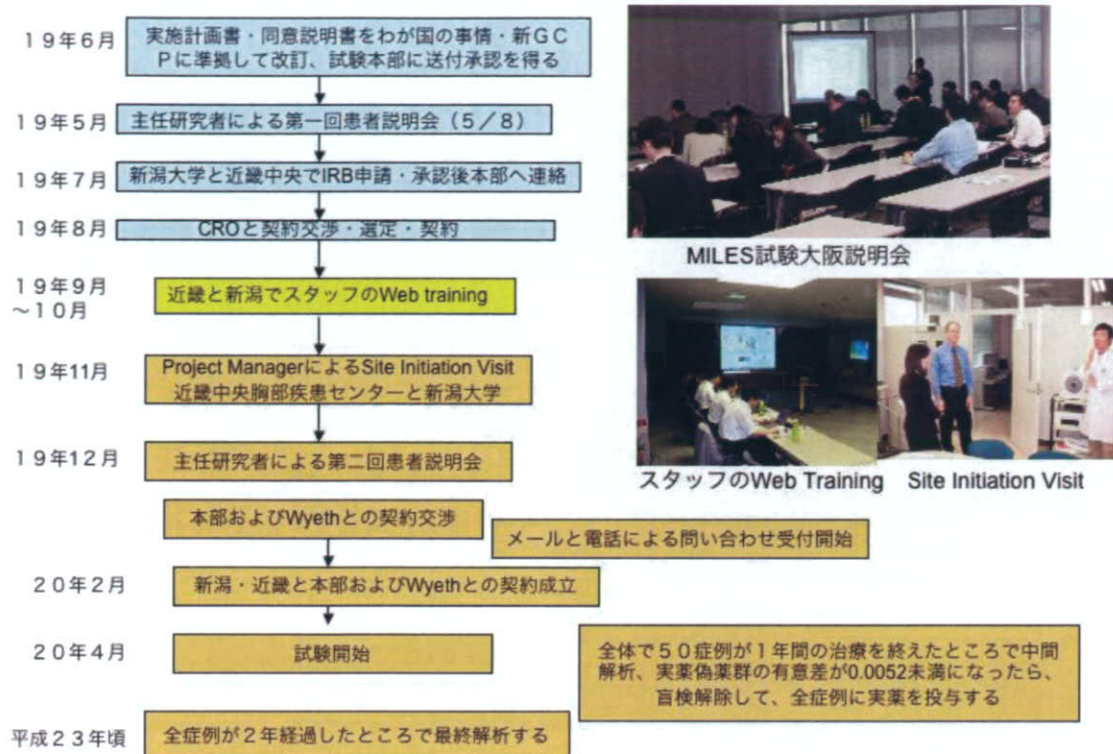


を明記し、シンシナティ小児病院の IRB で承認した。18年12月に試験への協力を呼びかけるため、J-LAM の会（患者会）の代表と会い、試験内容を説明し、その後、19年5月、12月に大阪、名古屋、東京で患者、家族、主治医を集めて説明会を実施した。

19年に厚労科研の研究が開始されてから、Project Management, Monitoring などの業務を委託するため、外部 CRO の選定、契約交渉を行い、シミック株式会社と契約した。本臨床試験に参加する医師、薬剤師、検査技師、CRC、放射線技師は総数25名を超える。全てのスタッフに米国 NCI が Web 配信している Human Research Participant Protection Education と DTCC が配信している Protocol Training を行い、免許証や履歴など、全て本

部に提出し、漸く11月に本部の Project Manager が近畿と新潟の施設の監査を行った。

11月末に主任研究者と分担研究者が渡米、本部を訪問し、試験実施のトレーニングを受けた。12月末にホームページ上に公開され、また、病院向けのリーフレットが配布され、患者の募集が開始された（付録参照）。当初、Wyeth は、日本へのシロリムス輸出を渋っていたが、主任研究者のねばり強い交渉によって、合意に達し、新潟、近畿ともに Wyeth と契約が成立している。現在、薬剤（白箱）輸出の手続きを代行する米国代理店 Aptuit が輸出の手続きを行っている。20年2月に新潟と近畿が個別に本部(CCHMC)と契約した。薬剤の輸出が承認されると両施設の Site Activation が行われる。



#### D. 考察

試験開始まで、膨大な文書と手続きを要したが、平成20年4月中旬を目処に試験が開始される。このような医師主導の国際共同臨床試験は米国側にとっても初めての経験であり、準備が遅れたのは、日米双方に経験不足があったからだと思う。しかしながら、このような困難と多大な労力と時間を費やしても本臨床試験を実施することは大変意義深いことと考える。なぜなら、今後稀少難病の臨床試験において、1国のみでは、薬剤の有効性や安全性の確認が困難な場合でも、国際共同臨床研究によって問題をクリアできる可能性が高いこと、また、人種を越えて有効性や安

全性が確認できればより治療薬としての普遍性が確認できること、最後にこの試験の成功により、今後の稀少難病研究に対する国際協力がさらに進むことが期待できるからである。

#### E. 結論

リンパ脈管筋腫症の新治療開発を国際共同多施設臨床試験により実施しようとする試みが現実化しつつあり、是非成功させたい。

#### F. 健康危険情報

まだ、臨床試験が開始されていないので、特記すべきことなし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Fukuno K, Tomonari A, Tsukada N, Takahashi S, Ooi J, Konuma T, Uchiyama M, Fujii T, Endo T, Iwamoto A, Oyaizu N, Nakata K, Moriwaki H, Tojo A, Asano S. Successful cord blood transplantation for myelodysplastic syndrome resulting in resolution of pulmonary alveolar proteinosis. *Bone Marrow Transplant.* 2006, 38(8): 581-582.

2. Inoue Y, Nakata K, Arai T, Tazawa R, Hamano E, Nukiwa T, Kudo K, Keicho N, Hizawa N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Maeda Y, Koreeda Y, Kodo N, Sakatani M. Epidemiological and clinical features of idiopathic pulmonary alveolar proteinosis in Japan. *Respirology.* 2006, 11: S55-S60.

3. Nam MH, Hijikata M, Tuan Le A, Lien LT, Shojima J, Horie T, Nakata K, Matsushita I, Ohashi J, Tokunaga K, Keicho N. Variations of the CFTR gene in the Hanoi-Vietnamese. *Am J Med Genet A.* 2006, 136(3): 249-253.

4. Kamio K, Matsushita I, Hijikata M, Kobashi Y, Tanaka G, Nakata K, Ishida T, Tokunaga K, Taguchi Y, Homma S, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Promoter analysis and aberrant expression of the MUC5B gene in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 171(9): 949-957.

5. Ishige I, Eishi Y, Takemura T, Kobayashi I, Nakata K, Tanaka I, Nagaoka S, Iwai K, Watanabe K, Takizawa T, Koike M. Propionibacterium acnes is the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis.* 2006, 22(1): 33-42.

6. Hoshino Y, Hoshino S, Gold JA, Raju B, Prabhakar S, Pine R, Rom WN, Nakata K, Weiden M. Mechanisms of polymorphonuclear neutrophil-mediated induction of HIV-1 replication in macrophages during pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis.* 2007 May 1; 195(9): 1303-10

7. Iwabuchi H, Kawasaki T, Yamamoto T, Uchiyama M, Nakata K, Naito M. Expression of PU.1 and terminal differentiation of alveolar macrophages in newborn rats. *Cell Tissue Res.* 2007 Jul; 329(1): 71-9.

8. Watanabe M, Uchida K, Nakagaki K, Kanazawa H, Trapnell BC, Hoshino Y, Kagamu H, Yoshizawa H, Keicho N, Goto H, Nakata K. Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals. *FEBS Lett.* 2007 May 15; 581(10): 2017-21.

9. Tanaka G, Shojima J, Matsushita I, Nagai H, Kurashima A, Nakata K, Toyota E, Kobayashi N, Kudo K, Keicho N. Pulmonary Mycobacterium Avium complex infection: Association with NRAMP1 polymorphisms. *Eur Respir J*. 2007 Jul;30(1):90-6.

10. Horie T, Lien LT, Tuan LA, Tuan PL, Sakurada S, Yanai H, Keicho N, Nakata KA. Survey of tuberculosis prevalence in Hanoi, Vietnam. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007 May;11(5):562-6.

11. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, Arai T, Takada T, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ichiwata T, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Nukiwa T, Sakatani M, Krischer JP, Nakata K; Japanese Center of the Rare Lung Diseases Consortium. Characteristics of a large cohort of patients with Autoimmune pulmonary Alveolar proteinosis in Japan. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Apr 1;177(7):752-62.

12. 中田光、井上義一、高田俊範、寺田正樹、新井徹、坂谷光則、田澤立之、貫和敏博. 肺胞蛋白症の臨床. *The Lung perspective*. 15: 59-63, 2007.

13. 中田光、井上義一、高田俊範、寺田正樹、

新井徹、坂谷光則、田澤立之、貫和敏博、檜澤伸之、山口悦郎、江田良輔、土橋佳子、田中直彦、笠原靖紀. わが国の特発性肺胞蛋白症の病勢、予後、GM-CSF吸入療法のUp-to-date. *分子呼吸器病*, 11 (1) 72-74, 2007

## 2. 学会発表

1. Multicenter Phase II trial of inhaled aerosolized Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor for Patients with Idiopathic Pulmonary Alveolar Proteinosis; the prognosis of patients Koh Nakata, Yoshikazu Inoue, Toshihiro Nukiwa, Ryushi Tazawa, Keiko Tsuchihashi, Toshinori Takada, Masaki Terada, Hiroko Kanazawa, Nobuyuki Hizawa, and Bruce C. Trapnell : oral presentation. American Thoracic Society International Conference, May 18-23, 2007

2. 中田光、井上義一、高田俊範、寺田正樹、新井徹、坂谷光則、田澤立之、貫和敏博 「肺胞蛋白症はどこまで明らかとなったか？」第47回日本呼吸器学会学術講演会:個別化医療講演, 東京フォーラム, 2007年

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし

### 3. その他

#### 付録 患者向け MILES 試験リーフレット

#### LAMとシロリムス(ラバマイシン)について

##### LAMとは

リンパ管腫瘍症(Lymphangiolipomatosis、以下LAMと表記)はおもに妊娠可能な若い女性がかかる難治性の稀少疾患です。肺、リンパ管、腎臓などに平滑筋細胞が異常増殖し、肺に多数の穴が空いた状態が現れたり、胸が痛くなる傾向です。

LAMは、女性ホルモンの影響が原因とされるため、一般的には女性ホルモンの抑制療法が行われる事が多いのですが、病状の進行スピードやホルモン療法の効果は患者さままで異なります。副作用も考慮するため、ホルモン療法に関してはまだ議論が必要とされています。

近年、アメリカを中心にLAMの原因が解明されつつあり、病状の診断に基づいた新しい分子標的治療の試みも開始されています。その中で注目されているのが「シロリムス」です。

※シロリムスは別名「ラバマイシン」とも呼ばれますが、このリーフレットでは「シロリムス」で一貫して記述いたします。

##### 薬剤「シロリムス」について

**シロリムスとは**  
シロリムスはアメリカ医薬品局が腎臓移植用の臓器移植拒絶を防ぐために認可した免疫抑制剤です。シロリムスは腎臓の腫瘍を抑制、あるいは壊滅の役割も果たします。

**LAMとの関わり**  
リンパ管腫瘍症はLAMと同じく原因が不明な病態がほとんどで発症に誘発することによって起こります。このLAM病態はリンパ管を好んで増殖させ、そこで、蛋白分解酵素を放出して体の一部を破壊していきます。よく病変は肺と腎臓にできますが、肺に病変が出た場合、蛋白分解酵素の働きで、正常な肺が少しずつ破壊されていき、呼吸が難しくなっていきます。近年の研究で、LAM病態は腎臓を破壊しているエンターリンという遺伝子発現している癌抑制因子であるタンパク質とハマルタンという二つの蛋白のどちらかに異常があると、エンターリンが暴発して癌腫の増殖がどんどん進むことがわかりました。このエンターリンの暴発を抑えるのが、シロリムスです。

アメリカで1日1回投与が行われたバイロコスタターでは、1年で1秒量(FEV1)は1年後の改善が118±24cc、2年後で62±154ccであり、肺容量(FVC)は1年後の改善が390±212cc、2年後で345±178ccでした。

##### 副作用について

アメリカで行われたLAMに対するバイロコスタターでは、重症の副作用はありませんでした。軽症の副作用は下に示すとおりです。

<input type="checkbox"/> 口内炎	<input type="checkbox"/> 口内潰瘍	<input type="checkbox"/> 高コレステロール血症
<input type="checkbox"/> 膀胱炎	<input type="checkbox"/> 血小板減少	<input type="checkbox"/> ニキビ等の皮膚
<input type="checkbox"/> 下痢	<input type="checkbox"/> 高血圧	

#### <お問い合わせ>

**新潟大学医学部総合病院**  
生命科学医療センター/中野 光  
所在地:Y95-1-85-20 新潟県新潟市中央区西町1-754  
TEL:025-227-2022 FAX:025-227-0377



**近畿中央胸部疾患センター**  
小島隆幸  
所在地:Y99-1-45-55 大阪府市北区長瀬1-1-80  
TEL:072-252-3021 (内線) FAX:072-251-1372 (内線)



<http://www.bmrctr.jp/lam/>



リンパ管腫瘍症(LAM)の患者さまへ



#### シロリムス(ラバマイシン)による 臨床試験<MILES試験> 参加のお願い

リンパ管腫瘍症(LAM)の患者さまを対象としたシロリムス(ラバマイシン)による治療研究<MILES試験>にご協力ください。

● LAMとシロリムス(ラバマイシン)について ●

LAM(リンパ管腫瘍症)は妊娠可能な若い女性に主に発生する難治性の稀少疾患です。新薬の候補として注目されている薬剤が「シロリムス(ラバマイシン)」です。



独立行政法人 国立病院機構  
近畿中央胸部疾患センター



リンパ脈管筋腫症日本人患者に於ける健康関連 Quality of Life :  
MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36)と  
St. George' s Respiratory Questionnaire (SGRQ)の検証

国立病院機構近畿中央胸部疾患センター

臨床研究センター<sup>1</sup>、循環器科<sup>2</sup>、心療内科<sup>3</sup>、内科<sup>4</sup>、検査科<sup>5</sup>、放射線科<sup>6</sup>

井上義一<sup>1</sup>、大家見子<sup>2</sup>、所昭宏<sup>3</sup>、新井徹<sup>4</sup>、杉本親寿<sup>4</sup>、西山明秀<sup>4</sup>、橘和延<sup>4</sup>、  
源誠二郎<sup>1</sup>、関谷浩実<sup>1</sup>、元房あゆ<sup>1</sup>、広瀬雅樹<sup>1</sup>、松室昭子<sup>1</sup>、中川美紀子<sup>1</sup>、廣畑和弘<sup>1</sup>、  
小松勝明<sup>5</sup>、審良正則<sup>6</sup>、北市正則<sup>5</sup>、林清二<sup>4</sup>、岡田全司<sup>1</sup>、坂谷光則<sup>4</sup>

我が国で予定されているリンパ脈管筋腫症(LAM)治療研究 (MILES Trial) で使用予定の健康関連 Quality of Life(HR-QOL)質問票のうち、正式な日本語版のある MOS 36-Item Short-Form Health Survey (SF-36), Ver.2.0 日本語版と St. George' s Respiratory Questionnaire (SGRQ)日本語版について日本人LAM患者で有用性を検証する。国立病院機構近畿中央胸部疾患センター受診患者および、患者会(J-LAM)を通じてご協力いただいた患者合計 59 名。SF-36、SGRQ の結果が、肺機能等の臨床データとの相関するか検討する。LAM 患者では身体機能的な指標に加え精神的な指標も低下していた。SF-36 のスコアは PF、RP、GH、SF、RE で特に低下 (悪化)、SGRQ では activity、symptom、impact の順に沿増加 (悪化) していた。SF-36 の PF、SGRQ の activity は呼吸困難度 (MRC スコア) および%FEV1 と有意な相関を認めた ( $p<0.0001$ )。SF-36 の MH と SGRQ の impact も呼吸困難度と相関していた( $p<0.05$ )。LAM 患者では主に機能系のスコアが低下し、実際の肺機能を良く反映していた。また精神的なスコアも低下していた。日本人の LAM 患者で SF-36、SGRQ の検証を行い、質問票が有用である事を初めて証明した。MILES Trial でこれら質問票により病態や重症度を反映する。

A. 研究目的

我が国で予定されているリンパ脈管筋腫症(LAM)治療研究で使用予定の健康関連 Quality of Life(HR-QOL)質問票のうち、MOS36-Item Short-Form Health Survey (SF-36)と St. George' s Respiratory Questionnaire (SGRQ)について日本人 LAM 患者で有用性を検証する。

B.研究方法

対象患者は国立病院機構近畿中央胸部疾患センター受診 LAM 患者および、患者会(J-LAM の会)を通してご協力いただいた LAM 患者 59 名。患者が自記式で解答した後の質問票は患者名が特

定化出来ないよう匿名化番号で扱い、解答結果に医療関係者から受けるバイアスが生じないシステムを構築した (詳細省略)。SF-36、SGRQ の結果と呼吸困難度 (MR スコア)、肺機能検査 (%VC、%FEV<sub>1</sub>、%DLco、PaO<sub>2</sub>) の臨床データとの相関するか検討する。

尚、SF-36 は iHope International (健康医療評価研究機構) から Ver.2.0 日本語版の使用契約のうへ使用し、SGRQ は西村浩一博士 (京都桂病院) の許可を得て使用した。尚、本研究の実施に当たり、患者にはインフォームドコンセントをいただき、また国立病院機構近畿中央胸部疾患センター臨床

試験審査委員会の承認を得た。尚、本データの一部は途中経過として別途報告を行っているが、今回 MILES Trial で調査票を使用するための検証のための研究として、症例数を増加したうえで報告する。

### C. 研究結果

表 1 に対象患者の背景を示す。孤発性 (Sporadic) LAM 42 名、結節性硬化症 (TSC) LAM 患者 3 名、不明 14 名、合計 59 名である。患者は MRC2-3 程度の呼吸困難であるが肺機能上閉塞性障害と肺拡散能力の低下を認めた。

表 1 LAM 患者の打ち分けと、MRC スコア、肺機能検査、動脈血液ガス。

N (female/male)	59 (59/0)
Sporadic LAM/TSC LAM/NA	42/3/14
Age at the questionnaire	39 ± 9 y.o
MRC	2.7 ± 1.6
%VC	88 ± 27 %
%FEV <sub>1</sub>	56 ± 27 %
%DLco	47 ± 26 %
PaO <sub>2</sub>	72 ± 14 Torr
PaCO <sub>2</sub>	41 ± 8 Torr

NA; not available, mean±SD

図 1 に LAM 患者 59 名の SF-36 の結果を示す。●は LAM 患者の平均と標準偏差、○は年齢、性別マッチさせた日本人の標準値の平均と標準偏差を折れ線で示す。Physical functioning (PF)、Role-physical (RP)、Body pain (BP)、General health (GH)、Vitality (VT)、Social functioning (SF)、Role-emotion (RE)、Mental health (MH) の 8 つのカテゴリーについてスコアを計算し年齢をマッチさせた日本人の標準を基本としたスコア (Normal-based scoring: NBS) で表現した。日本人の標準では各スコアは 50±10 となりスコアが低い状態は QOL の低下を示す。

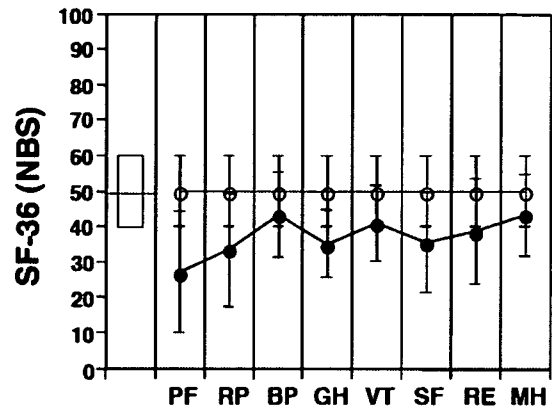


図 1 LAM 患者 (n=59 名) に於ける SF-36 スコア (NBS)。{PF: Physical functioning, RP: Role-physical, BP: Body pain, GH: General health, VT: Vitality, SF: Social functioning, RE: Role-emotion, MH: Mental health}

SF-36 のスコアは LAM 患者では全ての項目で低下あるいは低下傾向を認めたが、特に生理的な機能や役割を示す PF、RP に加え健康観である GH、社会的精神的な指標である SF、RE が低下していた。

図 2 左に示すように、SF-36 の PF スコアと呼吸困難度 (MRC) は有意な強い相関を示した ( $r=0.864$ ,  $p<0.0001$ )。また図 2 右に示すように SF-36 の PF スコアは %FEV<sub>1</sub> と極めて強い相関を示した ( $r=0.721$ ,  $p<0.0001$ )。

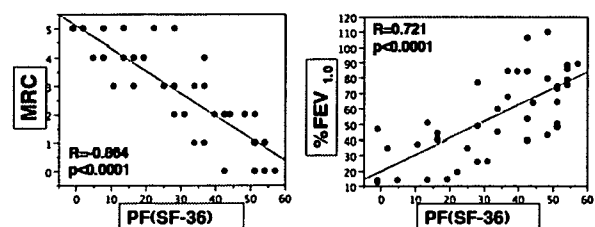


図 2 SF-36 の PF スコアと呼吸困難度 (MRC) 及び、%FEV<sub>1</sub> との相関。



図3にLAM患者59名のSGRQの結果を平均±標準偏差で棒グラフで示す。SGRQのスコアは、① Symptom、②Activity、③Impact、psychosocial factor およびその合計となる Total として示す。SGRQではスコアが高い事は状態が悪いことを示す。LAM患者では特に機能を示すActivityが最も悪く、Symptom、Impactの順に悪かった。

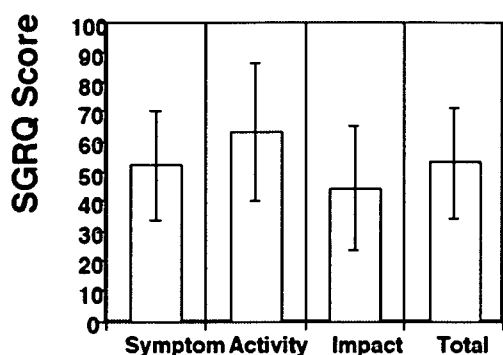


図3 LAM患者 (n=59) に於けるSGRQの結果。左からSymptom、Activity、Impact、および合計スコアである。

図4左に示すように、SGRQのActivityスコアと呼吸困難度(MRC)は有意な強い相関を示した ( $r=0.773$ ,  $p<0.0001$ )。また図4右に示すようにSGRQのActivityスコアは $\%FEV_1$ とも極めて強い相関を示した ( $r=0.751$ ,  $p<0.0001$ )。

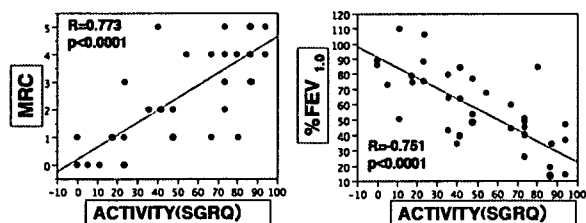


図4 SGRQのActivityスコアと呼吸困難度(MRC)及び、 $\%FEV_1$ との相関。

表2に示すよに、精神的カテゴリーであるSF-36

のMHは呼吸困難度(MRC)と有意な相関( $P<0.05$ )を示した。またSGRQのImpactも呼吸困難度(MRC)と相関を示し、更に、 $\%FEV_{1.0}$ 、 $\%DLco_2$ 、 $PaO_2$ と有意な相関を認めた( $P<0.05$ ,  $P<0.0001$ )。

表2 MH (SF-36)とImpact (SGRQ)とMRC、 $\%FEV_{1.0}$ 、 $\%DLco_2$ 、 $PaO_2$ との相関。

	MH (SF-36) r (p-value)	Impact (SGRQ) r (p-value)
MRC	-0.400 (0.008)*	0.726 (<0.0001)**
$\%FEV_{1.0}$	0.274 (0.087)	-0.507 (0.001)*
$PaO_2$	0.206 (0.216)	-0.422 (0.009)*
$\%DLco$	0.155 (0.441)	-0.528 (0.005)*

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.0001$

#### D. 考察

LAMは、妊娠可能年齢の女性に発症する稀な疾患であり、平滑筋様細胞(LAM細胞)が肺やリンパ管などで増殖する増殖性疾患である。常染色体優性遺伝の結節性硬化症に合併するTSC-LAMと、遺伝性のないSporadic LAMに分類される。これまで有効な治療法がなく、進行性で予後不良、肺移植の対象疾患である。患者のHR-QOLは悪い事が予想されるがこれまで、日本人のLAM患者でHR-QOLを大規模に検討した報告はなかった。今回の検討で、LAM患者では主に機能系のスコアが低下し、実際の肺機能を良く反映していた。また精神的なスコアも低下し、患者の症状に身体的機能不全に加えて、精神的影響も加味されていることが明らかになった。

近年、癌抑制遺伝子として機能する結節性硬化症(TSC)遺伝子の変異がLAM細胞に検出されることが判明し、mTOR阻害剤等を用いた新たな治療法の臨床試験が開始されつつある。今回、近畿中央胸部疾患センターと新潟大学が指名されて、米国主導の国際共同LAM治療研究に日本側のサイトとして参加する。プロトコール上、SF-36とSGRQ

等の質問票の使用が予定されているが、我々は、現在日本で使用されている正式な翻訳版を用いる予定である。我々は、これらの日本語版が日本人のLAM患者に当てはまるか検証を行った。SGRQは呼吸器疾患特異的であるが、SF-36は一般的な質問票である。呼吸器の症状にはSGRQがより優れている事が予想されるが、LAMは様々な症状を示し、全身疾患である。SF-36とSGRQを併用する事でLAMの病態はより明らかにされるものと考えられた。

#### E. 結論

日本人のLAM患者でSF-36、SGRQの検証を行い、質問票が有用である事を初めて証明した。MILES Trialでこれら質問票により病態や重症度を反映すると考えられる。

【謝辞】本研究を実施するにあたり、御協力いただいた、患者様および患者会(J-LAMの会)の方々に深謝いたします。

#### G. 研究発表

1. Young L, Inoue Y, McCormack FX. Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangioleiomyomatosis. *N Engl J Med.* 358(2):199-200, 2008
2. Hayashida M, Seyama K, Inoue Y, Fujimoto 1K, Kubo K, Respiratory failure researchGroup of the Japanese ministry of health, labour, And welfare. The epidemiology of lymphangioleiomyomatosis in Japan: A nationwide cross-sectional study of presenting features And prognostic factors. *Respirology* 12:523-30, 2007.
3. Inoue Y, King TE Jr, Barker E, Daniloff E, Newman LS. Basic fibroblast growth factor

- and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangioleiomyomatosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166(5):765-7, 2002
4. Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors. *Am J Respir Crit Care Med.* 151:527-33, 1995
  5. 大家晃子, 井上義一. リンパ脈管筋腫症. In 工藤翔二, 中田紘一郎, 貫和敏博編. *呼吸器疾患の最新の治療 2007-2009.* 南江堂, P318-321. 2007.
  6. 井上義一. リンパ脈管筋腫症. *COPD Frontier.* 6: 74-79, 2007.
  7. 久保恵嗣, 井上義一. 本邦におけるLAMの治療、予後の現状と問題点. *日本胸部臨床*, 65(2): 150-155. 2006.
  8. 林田美江, 藤本圭作, 久保恵嗣, 瀬山邦明, 井上義一. わが国におけるLAMの疫学. *日本胸部臨床*, 65(2):113-119. 2006.
  9. 井上義一, 小堂直彦, 是枝幸子, 前田優華, 坂谷光則. LAMにおけるLAM細胞の増殖と組織破壊のシグナル: マスト細胞の関与をみる. *分子呼吸器病* 9(5): 414-419, 2005.
  10. 大家晃子, 井上義一, 田中勲, 小塚健倫, 審良正則, 前田優華, 深水玲子, 新井徹, 林清二, 木村謙太郎, 坂谷光則. 肺リンパ脈管筋腫症の嚢胞性病変の評価 三次元 computed tomography による試み. *臨床放射線.* 50(1): 104-107, 2005.
  11. 井上義一, 大家晃子. リンパ脈管筋腫症, LAMの疫学, ラパマイシン治療臨床試験. *LAM Handbook 日本版* p 2-9. 特定非営利活動法人障害者団体定期刊行物協会. 2005.

厚生労働科学研究費補助金（臨床試験推進研究事業）

（分担）研究報告書

リンパ脈管筋腫症患者の血清マーカー探索のための予備調査研究

分担研究者 吉澤弘久

新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 准教授

研究要旨：LAM 患者プール血清（いずれも孤発性 LAM）と健常者プール血清からタンパクを抽出し、二次元電気泳動を施行し、相違スポットを見いだした。そのスポットの同定をおこなった。興味深いことに、患者では、transthyretin の等電点が酸性側にシフトしていた。また、VitaminD binding protein precursor の増加が見られた。

A. 研究目的：MILES trial では、主要評価項目が％肺予測 1 秒量であるが、自然気胸などの合併症の恐れもあり、検査を繰り返すことから、患者の負担も大きい。血清中病勢相関マーカーを用いた病勢の予測ができれば患者にとって大きなメリットとなる。

B. 研究方法：

患者プール血清及び健常者プール血清からアフィニティーカラムを用いてアルブミン、グロブリンなど 6 種のタンパクを除去し、同一条件で 2 枚ずつ二次元電気泳道を行い、相違スポットを画像解析ソフトを用いて、割り出す。その後、MALDI-TOF-TOF 解析により、相違スポットを同定する。

【サンプル】

LAM 患者血清 30  $\mu$ l LAM 患者 4 名から取得した血清の等量混合物

健常者血清 30  $\mu$ l 健常者 4 名から取得した血清の等量混合物

【アルブミン除去処理】

Agilent Multiple Affinity Removal Spin Cartridge (5188-5230, Agilent

Technologies)を用いて、アルブミンなど血清に多量に含まれる 6 種のタンパク質 (albumin, IgG,  $\alpha$ 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin) をサンプルから除去した。除去後の溶液は、ultrafree-0.5 Centrifugal Filter Device (UFV5BCC00, Millipore)を用いて濃縮した。

【電気泳動用 lysis buffer】

濃縮したサンプルは、以下の電気泳動用 lysis buffer に溶解した。

5M 尿素、2M チオ尿素、2% CHAPS 2.0 g、2% SB3-10、1% DTT、2% アンフォライン

【等電点電気泳動】

各サンプル 100  $\mu$ g を以下の条件で等電点展開した。なお、各サンプル 2 回の泳動を行った。

等電点泳動ゲル Immobiline dry strip pH 3-10 (17-1234-01, GE Healthcare)

泳動装置 Multiphor II electrophoresis system(GE Healthcare)

泳動条件 3,500 V, 8 hr

【SDS-PAGE】

等電点電気泳動後、以下の条件で SDS-PAGE を行った。なお、各サンプル 2 枚の泳動を行った。

電気泳動ゲル 9-18% アクリルアミドゲル

泳動装置 Iso-Dalt electrophoresis system (GE Healthcare)

泳動条件 80 V, 16 hr

分子量マーカー Broad Range Protein Molecular Weight Markers (V8491, Promega)

#### 【染色】

染色は SYPRO Ruby (S21900, Invitrogen) によって行い、Molecular Imager FX (Bio-Rad) を用いて二次元電気泳動像を取得した。

#### 【二次元電気泳動像の解析】

二次元電気泳動像の解析は、ImageMaster 2D Platinum (GE Healthcare) を使用した。

#### 【タンパク質の同定】

分析するスポットをゲルから切り出しトリプシンで酵素消化した後、質量分析計 ultraflex TOFTOF (Bruker Daltonics) で測定を行った。測定データをタンパク質同定ソフトウェア MASCOT (Matrix Science) を用いて NCBI のデータベースに対して検索をかけることによりタンパク質の同定を行った。

#### C. 研究結果：

アジレントカラム処理後健常者および LAM 患者 プール血清の二次元電気泳動像を図 1 A, 1B に示した。アルブミンのスポットはまだ、残っているが、グロブリンに特徴的なアルカリ側の 28.57kD の帯状のバンドは消失しており、前処理が有効であったことを示していた。これらのイメージを GE 社製 Image Master により、重ね合わせ処理で二次元電気泳動を行うと、これら主要タンパクのスポットに隠れて検体間の微妙な差が見えなくなる。そのため、今回の検討では、健常者及び LAM 患者のプール血清をアフィニティーカラムで精製し、主要タンパク 6 種を除去して、二次元電気泳動し、比較解析した。未だに臨床試験が開始されておらず、症例数が少なく、今回の結

せたものが、図 2 である。青色で示されるスポットは LAM 患者に優位に発現しているタンパクであり、赤色で示されるスポットが健常者に優位なスポットである。Swiss Plot の spot 情報から推定すると、LAM 患者で減少しているものは、apolipoprotein E,  $\alpha 2$  microglobulin precursor, 増加しているのは、apolipoprotein CII であった。次に相違解析の結果を確認するためにスポットの切り出し、マスペクトルによる同定を行った。興味深いのは、Transthretin の 3 つのスポットのうち、健常者はアルカリ側のスポットが優位で、LAM 患者では、酸性側が増加していた。また、患者で vitamin D binding protein precursor の増加が見られた。

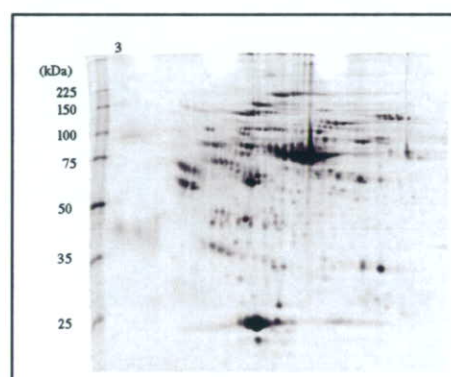


図 1 A 健常者血清アジレント処理の二次元電気泳動像

#### D. 考察

血清タンパクの 90% 以上がアルブミン、グロブリン、トランスフェリンなど主要なタンパクで占められる。したがって、通常の結果はあくまで予備的検討である。しかし、このような方法によって、血清タンパクの比較解析のためのファーストスクリーニングを行えることが確認された。その結果、LAM 患者の Transtretin の一部に等電点のシフトが見られた。このシフトは分子量の変化を伴わないことから、タンパクのリン酸化の可能性がある。また、患者血清で