

201128007A

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

肝細胞増殖因子による  
筋萎縮性側索硬化症に対する  
新規治療法の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 青木正志 / 東北大学大学院医学系研究科 神経内科

平成24年3月 印刷

# 目 次

## I 研究者一覧

## II 総括研究報告書

- 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発 ----- 1  
東北大学大学院医学系研究科 神経内科 青木 正志

## III 分担研究報告書

1. HGF による ALS 治療法最適化を目指して ----- 7  
旭川医科大学 教育研究推進センター 船越 洋
2. 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発 --- 11  
慶応義塾大学 医学部生理学 岡野 栄之  
慶応義塾大学 医学部整形外科 中村 雅也
3. 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発  
－臨床試験の実施と製造関連試験－ ----- 15  
クリングルファーマ株式会社 事業開発部 安達 喜一

## IV 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 19

## V 研究成果の刊行物 ----- 20

## 研究者一覧

研究代表者	青木 正志	東北大学大学院医学系研究科神経内科	教授
研究分担者	岡野 栄之	慶応義塾大学 医学部生理学	教授
	船越 洋	旭川医科大学 教育研究推進センター	准教授
	中村 雅也	慶応義塾大学 医学部整形外科	専任講師
	安達 喜一	クリングルファーマ株式会社 事業開発部	取締役 事業開発部長

総 括 研 究 報 告 書

## 肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発

研究代表者 青木正志 東北大学神経内科

**研究要旨** 肝細胞増殖因子（HGF）が筋萎縮性側索硬化症（ALS）のモデルマウス・ラットの両方で運動ニューロン保護、生存延長効果をもつことは既に報告している。これまでの研究で、臨床試験を行うために霊長類であるマーモセットを用いて HGF の髄腔内投与による副作用を検証すると共に臨床用量の設定を行った。さらに、HGF の臨床試験実施に向けてカニクイザルによる GLP 毒性試験を行い、脊髄腔内投与による HGF の安全性と薬物動態を確認した。また、脊髄腔内投与用の製剤化検討を行い、第 I 相臨床試験で用いる治験薬を製造した。第 I 相臨床試験の準備は、プロトコール開発からプロジェクトマネジメント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、治験コーディネーター（CRC）育成に至るまで東北大学トランスレーショナルリサーチ（TR）センターの全面的支援を得て進めた。平成 23 年 6 月に第 I 相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院治験審査委員会（IRB）に提出し承認を得た。現在、東北大学病院において第 I 相臨床試験を実施中である。

研究代表者：青木正志  
東北大学大学院医学系研究科神経内科 教授

研究分担者：  
岡野栄之 慶應義塾大学医学部生理学 教授  
船越 洋 旭川医科大学教育研究推進  
センター 教授

中村雅也 慶應義塾大学医学部整形外科  
専任講師

安達喜一 クリングルファーマ株式会社  
取締役副社長

進行性の運動ニューロンの選択的細胞死を惹起する筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対して、わが国で発見された神経栄養因子である肝細胞増殖因子（Hepatocyte Growth Factor、以下 HGF）を用いた治療法の臨床応用を目的にしている。すでに ALS ラットに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与で有効性を示したので、霊長類を用いて HGF の髄腔内投与による安全性を検証すると共に臨床用量の設定を行う。その結果を元に、ALS 患者に対する第 I 相臨床試験に進む。同時に HGF の治療効果の機序を明らかにする。

### B. 研究方法

本研究グループによるこれまでの研究により、私たちが開発した ALS ラットに対するリコン

### A. 研究目的

ビナント HGF 蛋白の髄腔内投与によって臨床的にも病理学的にも有効性が明らかになった。多くの神経栄養因子のなかでもこの様に変異 SOD1 トランスジェニック動物による ALS モデルに対して明確な治療効果を示したものは少なく、この有効性を ALS 患者に臨床応用する意義と必要性がある。臨床応用の最も可能性の高いルートとしての髄腔内投与での効果が ALS ラットで確認されたことから、ラットおよび霊長類（マーモセット、カニクイザル）に対する髄腔内投与での非臨床試験により、安全性を確認し臨床用量を設定する。その後ヒトでの第 I 相臨床試験を開始する。

**1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全性試験**  
マーモセットを用いて HGF の髄腔内投与による副作用を検証すると共に臨床用量の設定を行った。マーモセットによる ALS モデルは確立されていないので、HGF の臨床用量決定には慶應義塾大学の岡野らが確立したマーモセットによる脊髄損傷モデルを用いた。

上記の結果を受け、GLP 基準を満たしたカニクイザルに対する髄腔内投与による安全性試験を行った（クリングルファーマ担当、委託先：新日本科学）。すなわち、ヒトリコンビナント HGF 蛋白（3 用量）をカニクイザル（各群雄 4 匹）の脊髄腔内に 4 週間持続投与したときの毒性変化を調べるとともに、4 週間の休薬期間を設けてその回復性について検討した。また、そのときの全身的曝露についても評価した。本試験は、①髄腔内持続投与の安全性と同時に、②髄腔内投与時の薬物動態（HGF の髄腔内分布・排泄経路の確認、全身への移行性など）を確認することを目的とする。

## 2) q-space imaging による評価法の確立

治療の評価に必要な新たな画像評価法の確立を目指して基礎研究を行った。サル(normal)及び損傷脊髄の q-space imaging (以下 QSI) を撮像し、組織学的所見との比較検討を行った。

(倫理面への配慮)

すべての遺伝子操作は本学および共同研究施設の DNA 組換え実験指針に従い、また動物実験は同動物実験指針に従った上で動物愛護面に配慮しかつ利用動物数を極力減らすように努めた。

## 3) 治験薬製造

ヒトリコンビナント HGF 蛋白製剤としては、すでに臨床試験で使用実績のある静注用製剤があるが、組成の中に髄腔内投与の使用実績のない、あるいは使用実績を超える賦形剤が含まれている。従って、安全性を考慮し、髄腔内投与用に製剤組成を変更することにした。新たに製剤（液剤）化の試作検討を行い、既存の髄注製剤の使用実績を超えない範囲で賦形剤の組成を決定した。第 I 相臨床試験に使用する注射液剤と投与濃度に希釈するための希釈液を、GMP 基準で製造した。また、HGF 製剤の試作品を用いて予備安定性試験を開始した（クリングルファーマ担当、委託先：東洋紡バイオロジックス、東洋紡績）。

## 4) 第 I 相臨床試験の準備

東北大学 TR センターの全面的支援を得て、第 I 相臨床試験の準備、すなわちプロトコール開発、プロジェクトマネジメント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、CRC 育成を行った。また、臨床試験で使用する髄腔内投与のための医療器具を選定した。さらに、臨床試験において必要となるヒト血漿および髄液中の HGF および抗 HGF 抗体の定量検査の委託先、モニタリングおよび監査を担当する開発業務受託機関（CRO）を選定した。

## 5) 第 I 相臨床試験の実施

医薬品・医療機器総合機構（PMDA）との対面助言（治験開始前相談）を経て、治験届を PMDA ならびに東北大学病院治験審査委員会（IRB）

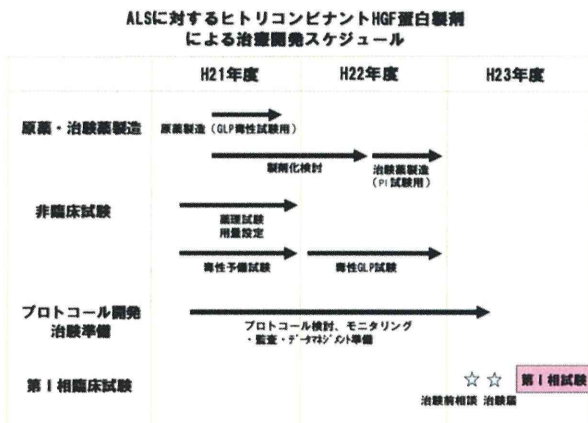
に提出し、速やかに治験を開始する。

(倫理面への配慮)

全ての治験は治験届の提出およびIRBの承認を経てから施行する。

### C. 研究結果 および D. 考察

ALSに対するヒトリコンビナント HGF 蛋白製剤による治療開発スケジュールを下図に示す。



#### 1) 霊長類に対する髄腔内投与での安全性試験

東北大学においてはマウスおよびラット (コントロールおよびALSラット) に対して、慶應義塾大学・実験動物中央研究所においてはマーモセットによる脊髄損傷モデルに対してヒトリコンビナント HGF 蛋白の髄腔内持続投与を行った。

マーモセット脊髄損傷モデルに対する投与では400 $\mu$ gのヒトリコンビナント HGF 蛋白を髄腔内に4週間持続投与したところ (実薬群; n=6, 対照群; n=5)、ヒトリコンビナント HGF 蛋白投与群で上肢筋力の有意な回復および機能スコアの有意な改善を認めた。7テスラMRIによる脊髄の評価でも病巣面積の有意な縮小が確認された。一方で、12週の観察期間において、異常行動ならびにMRI像における腫瘍形成は一切認められなかった。さらには病理学的にも問題がないことを確認した (Kitamura et al. PLoS One 2011)。

上記の結果を受けて、GLP基準によるカニクイ

ザルに対する髄腔内投与による安全性試験を行った (クリングルファーマ担当)。平成21年度に施行した予備試験の結果を受け、平成22年度に本試験を実施・完了した。投与および休薬期間中、死亡例はみられなかった。また、一般状態、一般症状および神経行動学的機能観察では、いずれの群においても HGF に起因すると考えられる変化は認められなかった。病理組織学的検査では、臨床用量の60倍を超える高用量群においても毒性所見は認められなかった。本試験において、①髄腔内持続投与の安全性ならびに、②髄腔内投与時の薬物動態の確認 (HGFの髄腔内分布・排泄経路の確認、全身への移行性など)を確認することができた。

#### 2) q-space imaging(QSI)による評価法の確立

QSIの代表的なパラメーターである

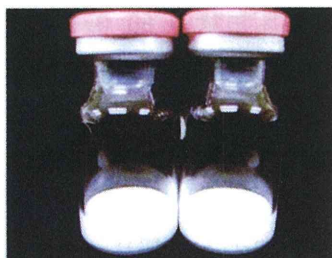
displacement mapは脊髄内の構造物の大きさを反映しており前角部神経細胞を可視化できる可能性が示唆された。また、kurtosisから我々が独自に構築したmyelin mapにより脊髄内の髄鞘を可視化できることを明らかにした。さらにサル脊髄損傷に対する神経幹細胞移植を行い、脊髄内の再髄鞘化が促進されることをmyelin map及び組織学的に捕らえることに成功した。以上のより、中枢神経再生の臨床研究における新たな画像評価法としてQSIが有力なツールとなりうると考えられた。

#### 3) 治験薬製造

第I相臨床試験に使用する治験薬 (注射液剤)と希釈液をGMP基準で製造した。製造工程において異常は認められず、製造標準書どおりに製造することができた。製造した注射液剤と希釈液について規格試験を実施したところ、すべての規格に適合し、出荷可否判定において合格と判定された。また、予備安定性試験によって治験薬として十分に安定であることが示された。

さらにはこの液剤に変わる新製剤を検討す

るための原薬を製造した。培養工程および精製工程のいずれにおいても異常は認められず、製造標準書通りに HGF 原薬を製造することができた。製造した HGF 原薬はすべての規格試験に適合した。製造した原薬を用いて新製剤を開発した。新製剤は凍結乾燥製剤であり（下写真）、現行の凍結溶液製剤に比べて扱いやすく、今後の第Ⅱ相試験から使用する予定である。



#### 4) 第Ⅰ相臨床試験の準備

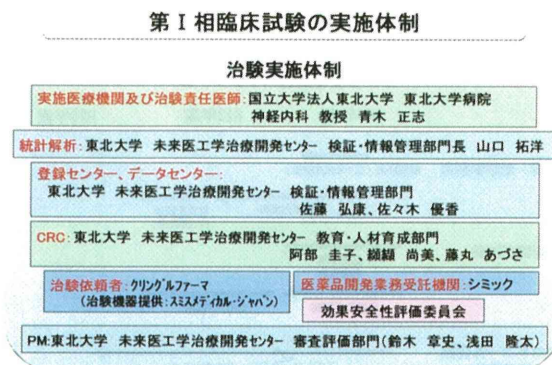
第Ⅰ相臨床試験の準備は、東北大学病院を実施医療機関とし（治験責任医師：神経内科 青木 正志）、東北大学 TR センター（未来医工学治療開発センター）各部門の支援の下で行った。

東北大学 TR センター審査・評価部門と協同し、第Ⅰ相臨床試験のプロトコール、ならびに治験必須文書（治験薬概要書、治験機器概要書、治験実施計画書、患者同意説明文書、症例報告書）および各種手順書を作成した。さらには治験としての安全性や倫理的妥当性を薬事法および GCP に遵守して確保するために、東北大学 TR センター検証・情報管理部門の支援を受けてモニタリング・監査・統計解析・データマネジメントの整備も進めた。また、東北大学 TR センター教育・人材育成部門において CRC の育成を行うと同時に、担当モニター（シミック）を交えての各種手順の確認を行い、GCP に沿った治験実施体制を整えた。全体のプロジェクトマネジメントは東北大学 TR センター審査・評価部門にて行うこととした。

一方、臨床試験で使用する投与機器として、カテーテルと皮下ポートのセットとなっているポータカットⅡ（スミスメディカル）を選定した。ポータカットⅡを使用することにより、

皮下ポートを介して HGF を髄腔内に繰り返し投与することが可能となった。また、臨床試験の薬物動態等の検査施設として新日本科学を、CRO としてシミックを選定した。

以上のように構築した第Ⅰ相臨床試験の実施体制を以下の図に示す。



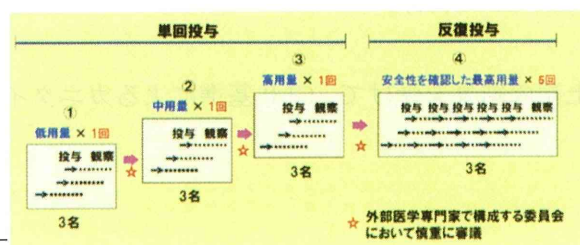
#### 5) 第Ⅰ相臨床試験の実施

上記の準備を経て、平成 23 年 6 月に第Ⅰ相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院 IRB に提出し其々承認を得た後、第Ⅰ相臨床試験を開始した。本試験は ALS 患者を対象とし、HGF を髄腔内投与したときの安全性・忍容性および薬物動態を確認することを目的とする。また、本試験はオープンラベルで行い、用量漸増（低、中、高用量）による髄腔内単回投与と、安全性を確認した最高用量での髄腔内反復投与の計 4 群（12 例）の試験である。各群終了時に外部医学専門家で構成する効果安全性評価委員会による臨床評価を行い、安全性には十分配慮して試験を進めることとした。なお、東北大学 TR



### 第Ⅰ相臨床試験の概要

- デザイン:** ① 単回投与: 3 用量、用量漸増  
② 反復投与: 安全性を確認した最高用量で 5 回投与  
**対象:** ALS 患者、各群 3 例 X 4 群 計 12 例





センター臨床応用部門より、効果安全性評価委員会の委員に加わって頂いた。第 I 相臨床試験の概要を以下に示す。

本試験の対象患者の選択基準は、以下のとおりである。

- ・ ALS の診断基準に該当し発症後 2 年以内
- ・ ALS の重症度分類が 1 もしくは 2
- ・ 年齢が 20 歳以上、65 歳未満
- ・ 投与・観察期間の一定期間の入院が可能
- ・ 治験参加に同意

また、ALS 以外の重篤な疾患がある方、癌あるいは癌の既往のある方、医療機器にアレルギーのある方などは本試験から除外することとした。

本研究において、当初の大きな目標であった第 I 相臨床試験を開始することができた。平成 24 年度以降、投与症例数を重ねて本試験を完了し、HGF の髄腔内投与による安全性・忍容性および薬物動態に関する臨床データを取得する。また、本試験終了後、引き続いて ALS 患者での有効性を確認するための第 II 相臨床試験（いわゆる Proof of Concept 試験；POC 試験）を実施する予定である。第 II 相臨床試験では、HGF を髄腔内に長期投与することを計画している。よって、長期投与の安全性を担保するために、カニクイザルによる慢性毒性試験を GLP 準拠で実施する必要がある。平成 24 年度以降、第 I 相臨床試験と並行して上記非臨床試験、さらには第 II 相臨床試験に用いる治験薬製造を行い、迅速な医薬品開発と第 II 相臨床試験での POC 取得を目指す。

## E. 結論

HGF の ALS に対する第 I 相臨床試験を開始するために必要な、非臨床試験および治験薬製造を実施・完了した。東北大学 TR センターの全面的な支援を得て第 I 相臨床試験の準備を行った。PMDA および治験施設 IRB から治験届の承認を得て、東北大学病院において第 I 相臨床試験を開始した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. PLoS One 2011;6(11):e27706.

Funakoshi H., and Nakamura T., Hepatocyte Growth Factor (HGF): Neurotrophic Functions and Therapeutic Implications for Neuronal Injury/Diseases. Current Signal Transduction Therapy 2011; 6: 156-167

他

### 2. 学会発表

青木正志、肝細胞増殖因子による ALS に対する新規治療法の開発 第 52 回日本神経学会総会シンポジウム 2011 年 5 月 20 日 名古屋

青木正志、HGF を用いた筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発 第 34 回神経科学会特別企画プログラム 2011 年 9 月 16 日 横浜  
他

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許登録

ラットを用いた ALS モデル(出願済)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

東北大学プレスリリース(平成 23 年 7 月 8 日)  
「筋萎縮性側索硬化症(ALS)に対する HGF(肝細胞増殖因子)による第 I 相臨床試験の開始について」

分 担 研 究 報 告 書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「HGF による ALS 治療法至適化を目指して」

研究分担者： 船越 洋（旭川医科大学 教育研究推進センター）  
共同研究者： 島田（大谷）若菜（旭川医科大学 教育研究推進センター）  
野間 さつき（旭川医科大学 教育研究推進センター）  
金井 将昭（旭川医科大学 教育研究推進センター）  
加藤 信介（鳥取大学 脳研病理）  
青木 正志（東北大学 神経内科）  
中村 敏一（大阪大学先端科学イノベーションセンター）

研究要旨

ALS モデルトランスジェニック動物に対し、HGF 遺伝子および HGF 蛋白質が治療効果を持つことが明らかとなっている。しかし、その至適投与法は未完成であった。本研究成果により、rhHGF の投与法として皮下注射より髄腔内投与が適していることがクリアとなった。現在、東北大学で ALS 患者に対する HGF 髄腔内投与の Phase I study がすすめられており、成功すれば HGF による画期的 ALS 治療法確立に寄与するものと期待される。また、本研究で HGF が ALS 動物の肝臓における病理変化からの回復過程で機能する内因性治療因子として機能することが明らかとなった。さらにダブルトランスジェニックマウスのアプローチを用い、HGF が ALS のみならず、他の神経変性疾患の神経変性を抑制することが明らかとなった。今後、HGF が ALS に加えてさらに多くの神経変性疾患に対する治療薬となることが期待される。

A. 研究目的

- (1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究
- (2) ALS 病態進行過程における内因性 HGF の機能解析：神経系と非神経系の比較解析
- (3) HGF による各種神経変性疾患に対する一般的な治療法確立に向けて— HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—

- (1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究

HGF の至適投与法として、これまでにトランスジェニック動物を用いた遺伝子導入法と、リコンビナントヒト HGF 蛋白質（rhHGF）の髄腔内投与法の有効性が明らかとなっている。ただし、後者の投与形態は、一般病院のどこでも容易にできる方法とはいえない。一方で、各種神経栄養因子の ALS への治療研究は、ヒトにおいては通常皮下注射の方法がとられており、もし皮下投与法が有効であった場合、臨床上の投与形態としては、髄腔内

投与に比べ一般病院での治療に適した投与形態である。しかし、多くの機能蛋白質は血液脳関門 (B.B.B.) を通過できないため皮下注射による神経疾患への治療適用は最近では疑問視されるようになってきている。本研究では、rhHGF の ALS への最適な治療法の確立に向けて、投与形態の最適化をはかるための基盤研究を行うことを目的とした。

(2) ALS 病態進行過程における内因性 HGF の機能解析 神経系と非神経系の比較解析

ヒト ALS の原因遺伝子である変異型 SOD1 を過剰発現する ALS モデルトランスジェニックマウスおよびラットにおいて、運動神経細胞の変性が進行性であるのに対して、肝臓の病理変化は一過性で ALS の進行過程で回復現象が見られることが明らかとされた (Kato *et al.*)。なぜ、神経は回復しないのに肝臓は回復していくのか、その回復過程に HGF が寄与しているか否か、解析することを目的とした (HGF は神経栄養活性に加えて肝再生因子としての機能も有名である)。

(3) HGF による多彩な神経変性疾患に対するユニバーサルな治療法確立に向けて—HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—

ALS に加えて多くの神経変性疾患が知られるが、いずれも根本治療法がない難病である。ALS で得られた知見が他の神経変性疾患にも適用可能か否かを見るため、

神経変性疾患の 1 つである「脊髄小脳変性症」に焦点をあて、HGF の治療適用の可能性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ALS モデル動物としては、Tg-SOD1<sup>H46R</sup> ラット (東北大学神経内科青木教授より供与していただいた) を用いた。この ALS モデルラットは、rhHGF の髄腔内投与による治療効果がすでに明らかになっている Tg-SOD1<sup>G93A</sup> ラットより、病態進行が緩徐な ALS モデル動物である。Tg-SOD1<sup>H46R</sup> ラットに対して 1 ヶ月にわたり rhHGF 蛋白質を皮下投与し、Tg-SOD1<sup>H46R</sup> ラットの寿命が延長するか否かを解析した。

(2) Tg-SOD1<sup>G93A</sup> マウス (G1H) とその同腹肢を用い、脊髄と肝臓組織について、HGF、c-Met (HGF 受容体) およびリン酸化 c-Met (活性化型 c-Met) について免疫染色法を用いて解析した。肝臓の病理変化については、H-E 染色法と PAS 染色法を用いた。内因性 HGF の機能を中和するため、抗 HGF 中和抗体を皮下ポンプにて持続投与し解析した。

(3) 脊髄小脳変性症モデルノックインマウス (SCA-KI) と神経特異的 HGF トランスジェニックマウス (HGF-Tg) を交配し、WT, SCA-KI, HGF-Tg, SCA-KI/HGF-Tg マウスの 4 群を作成し、HGF、c-Met、リン酸化 c-Met (活性化 c-Met) の発現および神経変性を ELISA 法および免

疫染色法で評価した。

## C. 研究結果

### (1) ALS への HGF 治療最適化への基盤研究(髄腔内投与法 V.S. 皮下投与法の比較)

Tg-SOD1<sup>H46R</sup> ラットに、多くの動物疾患モデル動物で有効性が確認されている濃度で rhHGF 蛋白質を投与したところ、vehicle 投与群に比べて寿命延長効果を得られなかった。この結果は、Tg-SOD1<sup>H46R</sup> ラットに比較して病態進行が早く寿命の短い Tg-SOD1<sup>G93A</sup> ラットに対して、rhHGF 蛋白質の髄腔内投与で寿命延長効果が得られているのと対照的な結果であった (Funakoshi H, Aoki M *et al.*, in preparation)。

### (2) ALS 病態進行過程における内因性 HGF の機能解析 神経系と非神経系の比較解析

HGF とリン酸化 c-Met (活性化型) の発現を解析した結果、脊髄組織ではリン酸化 c-Met の発現が持続するのに比べて、肝臓ではより早期からリン酸化 c-Met の発現が始まり、次第に免疫染色性が低下し、その後染色性が detect できなくなった。この染色パターンはまさに脊髄の運動神経細胞の変性が持続するのに対して、肝臓は一過性病理変化から回復していく経過とよく対応していた。さらに抗 HGF 中和抗体投与で、肝臓組織の病理変化からの回復が遅延した (Ohya-Shimada *et al.*, in preparation)。

### (3) HGF による多くの神経変性疾患

に対する治療法確立に向けて—HGF による ALS 以外の神経変性疾患への適用の可能性の解析—

SCA-KI マウスに比較し、SCA-KI/HGF-Tg マウスでは、免疫染色による解析の結果、神経細胞の変性が抑制されることが明らかとなった (Noma *et al.*, in preparation)。

## D. 考察

本研究により、ALS への HGF 供給法としては、皮下投与法に比べ、髄腔内投与法が優れていることが ALS トランスジェニック動物の解析結果明らかとなった。現在東北大学神経内科青木教授らにより HGF の ALS 患者への髄腔内投与の Phase I study が開始されている。本研究結果から、ヒト ALS 患者への rhHGF の投与方法としては、髄腔内投与法が至適であることが明らかとなったことから、rhHGF の髄腔内投与法の安全性が Phase I study で確保されたら、「臨床適用に向け大きな一歩が歩みだせる」と期待された。

一方で、内因性 HGF が ALS モデル Tg ラットの肝臓の病理変化からの回復現象に寄与していることが明らかとなった。この結果は、HGF を基盤として ALS からの脊髄組織変性からの回復療法を開発できる可能性を示唆する重要知見である。今後より詳細な解析を進めることで、ALS に対する次世代 HGF 治療法開発を目指していきたい。

また、HGF が脊髄小脳変性症に対する有効な治療効果を示すことが明らかとなり、これまで ALS で培った HGF 投与方法をより多くの神経変性

疾患治療に生かせる可能性が明らかとなった。近い将来、HGFによる広範な神経変性疾患に対する治療法が慎重かつ最速で開発できることが期待される。

#### E. 結論

HGFのALSへの至適供給法は、皮下投与ではなく髄腔内投与であることを明らかとした。HGFはALSに加えて、他の神経変性疾患へも治療効果を持つことが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報

特記なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Funakoshi H., and Nakamura T., Hepatocyte Growth Factor (HGF): Neurotrophic Functions and Therapeutic Implications for Neuronal Injury/Diseases. **Current Signal Transduction Therapy**. 6, 156-167, 2011.

Funakoshi H., Kanai M., and Nakamura T. Modulation of Tryptophan Metabolism, promotion of neurogenesis and Alteration of Anxiety-Related Behavior in Tryptophan 2,3-Dioxygenase-Deficient Mice. **International Journal of Tryptophan Research** 4, 7-18, 2011.

Kadoyama K., Kadoyama K., Funakoshi H., Nakamura T., Sakaeda T. Therapeutic Potential of Hepatocyte

Growth Factor for Treating Neurological Diseases. **Current Drug Therapy** 6( 3), 7-206, 2011.

Kitamura K, Fujiyoshi K, Yamane J, Toyota F, Hikishima K, Nomura T, Funakoshi H, Nakamura T, Aoki M, Toyama Y, Okano H, Nakamura M. Human hepatocyte growth factor promotes functional recovery in primates after spinal cord injury. **PLoS One** 6(11), e27706, 2011.

Shang J, Deguchi K, Ohta Y, Liu N, Zhang X, Tian F, Yamashita T, Ikeda Y, Matsuura T, Funakoshi H, Nakamura T, Abe K. Strong neurogenesis, angiogenesis, synaptogenesis, and antifibrosis of hepatocyte growth factor in rats brain after transient middle cerebral artery occlusion. **J Neurosci Res**. 89(1), 86-95, 2011.

##### 2. 学会発表

省略。

#### H. 知的所有権の取得状況（予定を含む）

##### 1. 特許取得

特記なし。

##### 2. 実用新案登録

特記なし。

##### 3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発」

研究分担者：岡野 栄之 慶應義塾大学医学部生理学教授  
中村 雅也 慶應義塾大学医学部整形外科専任講師

**研究要旨**

本研究では、肝細胞増殖因子を用いた中枢神経再生の新規治療法を確立するうえで必要不可欠な新たな画像評価法の確立を目指して基礎研究を行った。これまでに髄鞘の性質と QSI の特性を利用することにより、髄鞘を特異的に可視化する Myelin map を開発した。今年度は、1) サル化学的脱髄モデルを用いて、同一動物の脊髄における脱髄と再髄鞘化を Myelin map により経時的に評価する、2) 髄鞘形成不全突然変異をきたす shiverer と jimpy マウスの脊髄を Myelin map により評価することで、Myelin map により髄鞘を特異的に可視化できるかを検証した。Myelin map が水分子の強い制限構造である髄鞘に基づいた画像法であることが証明された。また Myelin map は従来動物を sacrifice して組織学的に評価せざるを得なかった損傷脊髄内の髄鞘の状態を非侵襲的かつ定量的に知る方法であることが明らかとなった。以上のより、中枢神経再生の臨床研究における新たな画像評価法として Myelin map が有力なツールとなりうると考えられた。

**A. 研究目的**

脊髄損傷後の脱髄を評価することは、機能的予後の予測や治療効果判定に重要である。Diffusion tensor imaging (以下 DTI) や Magnetization transfer contrast が髄鞘の評価に有用であるとの報告も多数あるが、髄鞘を特異的に描出するものとは言い難く、新たな評価ツールの開発が求められた。髄鞘は脊髄内における微細な構造であり、かつ水分子の拡散を強く制限する性質を持っている。一方、high b-value を用いた diffusion MRI のひとつである q-space imaging (以下 QSI) は強い制限拡散を観測し画像化することが可能である。われわれは髄鞘の性質と QSI の特性を利用することで、世界ではじめて髄鞘を特異的に可視化する Myelin map を開発し、霊

長類脊髄損傷における脱髄を明瞭に描出できることをこれまでに報告した。本年度の目的は、1) サル化学的脱髄モデルを用いて、同一動物の脊髄における脱髄と再髄鞘化を QSI により経時的に評価する、2) 髄鞘形成不全突然変異をきたす shiverer と jimpy マウスの脊髄を QSI により評価することで、Myelin map が真に髄鞘を可視化する方法であることを検証した。

**B. 研究方法**

1) サル化学的脱髄モデル：すべての外科的手技と MRI の撮像は全身麻酔下に行った。コモンマーモセットの第 5 頸椎高位の脊髄後索部に lysophatidylcholine を注入し、脱髄モデルを作製した（損傷群 n=4）。対

照として外科的手技を加えない動物を使用した（対照群 n=2）。7テスラ小動物用MRI（Bruker biospin）を用いて損傷前および損傷後1週、2週、6週で拡散MRIを撮像した。損傷後1週と6週でMRI撮像後に1匹ずつ灌流固定し、組織学的検討を行った。拡散計測にはQSI、DTIを使用し、その解析および表示には計算機処理ソフトIDLを用いた。QSIの代表的なパラメーターであるdisplacementのほかに、われわれ独自のMyelin mapを構築し組織と詳細に比較検討した。2）マウス脱髄モデル：shivererとjimpyマウスの脊髄を摘出し、ex vivoでQSIを撮像しMyelin mapを構築した。対照群として、phenotypeを発現していないlittermateの脊髄を用いた。組織学的検討は髄鞘染色であるLuxol Fast Blue (LFB)染色、HE染色、および髄鞘の主要な構成タンパクであるMBP (myelin basic protein)、PLP (proteolipid protein)の免疫染色を行った。

### C. 研究結果

生きているサルの化学的脱髄モデルを用いて、明瞭なMyelin mapの描出に成功した。Myelin mapは損傷後1週における脱髄と（図1A）、6週における再髄鞘化を描出していることが、LFB染色像と電子顕微鏡像との比較により確認できた（図1B）。また、shivererとjimpyマウスの脊髄を用いた従来のMRIやDTIでは髄鞘形成不全脊髄と正常脊髄の違いを描出できなかったが（図2A, B）、Myelin mapでは、両マウスの脊髄ではほとんど信号値はみられず、組織学的検討により脱髄所見を反映していることが明らかになった（図2C, D）。

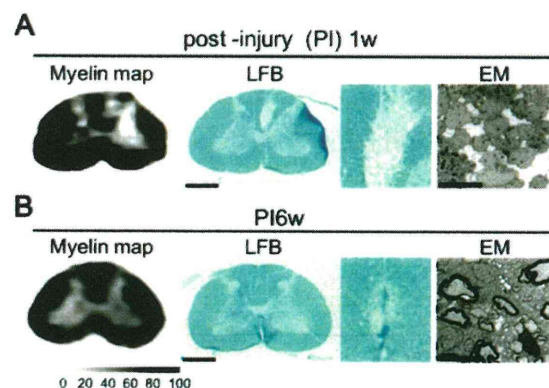


図1

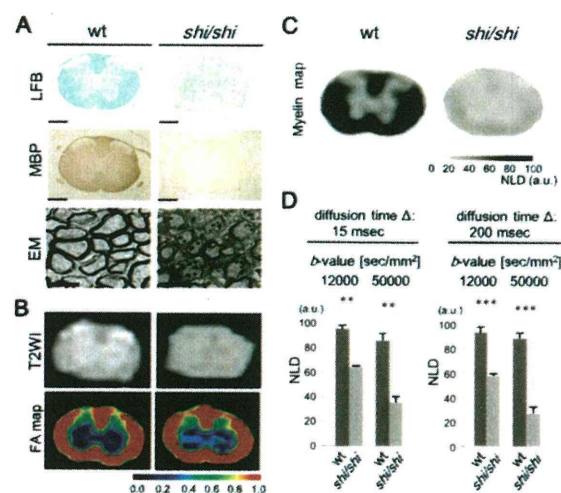


図2

### D. 考察

髄鞘形成不全マウス及びサル化学的脱髄モデルを用いてMyelin mapの妥当性を検証した。今回の検討より、Myelin mapが水分子の強い制限構造である髄鞘に基づいた画像法であることが証明された。またMyelin mapは従来動物をsacrificeして組織学的に評価せざるを得なかった損傷脊髄内の髄鞘の状態を非侵襲的かつ定量的に知る方法であることが明らかとなった。Myelin mapは脊髄損傷だけでなく、あらゆる原因不明の中中枢神経系疾患の診断と治療効果判定に役立つと考えられた。



## E. 結論

QSI に基づく Myelin map は脊髄内の髄鞘を特異的に可視化できる可能性が示唆された。Myelin map は脊髄損傷の診断は勿論のこと、将来計画している肝細胞増殖因子を用いた中枢神経の再生医療の治療効果判定に大きく役立つものと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Yasuda A, Nori S, Kobayashi Y, Takano M, Okano HJ, Toyama Y, Okano H, Nakamura M  
Quantitative tracing of spared fibers after contusive spinal cord injury by diffusion tensor tractography in common marmosets  
41st Annual meeting Neuroscience 2011 (Washington DC, USA, 2011, 11)

Fujiyoshi K, Tsuji O, Hikishima K, Yamada M, Kitamura K, Momoshima S, Okano H, Toyama Y, Nakamura M,  
q-space MR imaging depict demyelination after spinal cord injury in non-human primate  
41st Annual meeting Neuroscience 2011 (Washington DC, USA, 2011, 11)

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M, Quantitative tracing of spared tract fibers after contusive spinal cord injury by in

vivo diffusion tensor tractography: non-human primates study. CSRS 39<sup>th</sup> Annual meeting (Arizona, USA, 2011, 12)

Konomi T, Fujiyoshi K, Hikishima K, Komaki Y, Tsuji O, Toyama Y, Okano H, Nakamura M, In vivo Myelin map can predict functional prognosis after contusion spinal cord injury in common marmosets. CSRS 39<sup>th</sup> Annual meeting (Arizona, USA, 2011, 12)

藤吉兼浩, 辻収彦, 疋島啓吾, 岩井宏樹, 西村空也, 小林喜臣, 許斐恒彦, 松本守雄, 千葉一裕, 戸山芳昭, 岡野栄之, 中村雅也  
high b-value q-space MR イメージングを用いた髄鞘可視化法の開発と脊髄再生メカニズムの解明 第 10 回日本再生医療学会総会 (2011, 3, 東京)

藤吉兼浩, 辻収彦, 疋島啓吾, 岩井宏樹, 西村空也, 小林喜臣, 許斐恒彦, 松本守雄, 千葉一裕, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也  
霊長類同種神経幹細胞移植による脊髄再生メカニズムの検討. 第 40 回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4, 21-5, 9, web)

藤吉兼浩, 辻収彦, 疋島啓吾, 岩井宏樹, 西村空也, 小林喜臣, 許斐恒彦, 松本守雄, 千葉一裕, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也  
霊長類同種神経幹細胞移植による脊髄再生メカニズムの検討. 第 40 回日本脊椎脊髄病学会 (2011, 4, 21-5, 9, web)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 高橋勇一郎, 海苔聡, 安田明

正, 小林喜臣, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也. Q-space imaging を用いた 霊長類圧挫脊髓損傷の機能的予後予測. 第 40 回日本脊椎脊髓病学会 (2011, 4, 21-5, 9, web)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 高橋勇一郎, 海苔聡, 安田明正, 小林喜臣, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 拡散テンソル解析 (DTI) を用いた 脊髓圧挫損傷後のワーラー変性の描出. 第 40 回日本脊椎脊髓病学会 (2011, 4, 21-5, 9, web)

藤吉兼浩, 中村雅也, 許斐恒彦, 辻収彦, 疋島啓吾, 小牧祐司, 戸山芳昭, 岡野栄之 脊髓損傷モデルおよび再生過程における軸索および髄鞘の可視化の試み 第 26 回学術集会 神経組織の成長・再生・移植研究会 (2011, 6, 東京)

許斐恒彦, 藤吉兼浩, 疋島啓吾, 辻収彦, 安田明正, 海苔聡, 小林喜臣, 高野盛登, 岡野栄之, 戸山芳昭, 中村雅也 霊長類圧挫損傷脊髓の残存神経線維の定量化 拡散テンソルトラクトグラフィー (DTT) を用いて 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2011, 10, 群馬)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

「肝細胞増殖因子による筋萎縮性側索硬化症に対する新規治療法の開発」  
－臨床試験の実施と製造関連試験－

1) 第 I 相臨床試験、2) 治験薬の安定性試験、3) 原薬製造

研究分担者： 安達 喜一（クリングルファーマ株式会社 事業開発部長）  
共同研究者： 阿部 哲士（クリングルファーマ株式会社 医薬開発部長）  
福田 一弘（クリングルファーマ株式会社 研究開発部長）  
井上 逸男（クリングルファーマ株式会社 品質保証部長）

研究要旨

筋萎縮性側索硬化症（ALS）を対象とする肝細胞増殖因子（HGF）の第 I 相臨床試験を開始した。第 I 相臨床試験の準備は、プロトコール開発からプロジェクトマネジメント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、治験コーディネーター（CRC）育成に至るまで東北大学トランスレーショナルリサーチ（TR）センターの全面的支援を得て進めた。平成 23 年 6 月に第 I 相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院治験審査委員会（IRB）に提出し承認を得た。現在、東北大学病院において第 I 相臨床試験を実施中である。

製造関連試験としては、第 I 相臨床試験で使用している治験薬（液剤および希釈液）の安定性を経時的に確認し、使用中の治験薬に問題がないことを確認した。また、HGF の原薬製造を行い、凍結乾燥製剤を新たに開発した（第 II 相臨床試験で使用予定）。

A. 研究目的

本研究の目的は、肝細胞増殖因子（HGF）の筋萎縮性側索硬化症（ALS）に対する第 I 相臨床試験を実施し、脊髄腔内投与による安全性と薬物動態を確認することである。本年度は、前年度までの準備を踏まえて第 I 相臨床試験を開始することを主目標とし、併せて治験薬の安定性試験と原薬製造ならびに凍結乾燥製剤の開発を行った。

B. 研究方法

1) 第 I 相臨床試験

東北大学 TR センターの全面的支援を得て、第 I 相臨床試験の準備、すなわちプロトコール開発、プロジェクトマネジ

メント、モニタリング・監査・統計解析・データマネジメント、CRC 育成を行った。また、臨床試験において必要となるヒト血漿および髄液中の HGF および抗 HGF 抗体の定量検査の委託先、ならびにモニタリングおよび監査を担当する開発業務受託機関（CRO）を選定した。医薬品・医療機器総合機構（PMDA）との対面助言（治験開始前相談）を経て、治験届を PMDA ならびに東北大学病院治験審査委員会（IRB）に提出し治験を開始した。

2) 治験薬の安定性試験

第 I 相臨床試験で使用している治験薬（液剤および希釈液）の安定性試験を経時的に行った。安定性試験は日米欧医薬

品規制調和国際会議（ICH）のガイドラインに則って実施した。

### 3) 原薬製造

第Ⅱ相臨床試験で使用する凍結乾燥製剤を新たに開発するために必要となる HGF の原薬製造を行った。HGF 産生細胞のマスターセルバンク（MCB）から作製したワーキングセルバンク（WCB）を用いて培養を開始し、培養スケールを拡大した。拡大培養終了後、細胞をろ過除去し、培養上清を得た。培養上清中に含まれる不活性な一本鎖 HGF を活性型の二本鎖 HGF に変換した後、精製工程に移行した。精製工程では多段階のカラムクロマトグラフィーにより HGF を精製した。上記の製造はすべて GMP 基準で実施した。製造した HGF 原薬は、品質標準書に従って規格試験を実施し、それらの結果に基づいて出荷の可否を判定した。

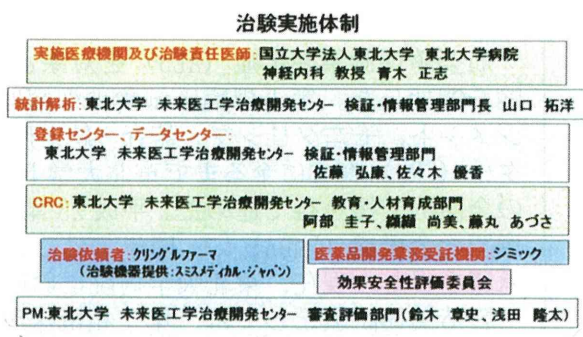
## C. 研究結果

### 1) 第Ⅰ相臨床試験

第Ⅰ相臨床試験の準備は、東北大学病院を実施医療機関とし（治験責任医師：神経内科 青木正志）、東北大学 TR センター（未来医工学治療開発センター）各部門の支援の下で行った。東北大学 TR センター審査・評価部門と協同し、第Ⅰ相臨床試験のプロトコル、ならびに治験必須文書（治験薬概要書、治験機器概要書、治験実施計画書、患者同意説明文書、症例報告書）および各種手順書を作成した。第Ⅰ相臨床試験のプロトコルの策定にあたっては、前年度までに実施した薬物動態試験および毒性試験の結果に基づいて、用量・投与間隔などを設定した。また、治験としての安全性や倫理的妥当性を薬事法および GCP に遵守して確保するために、東北大学 TR センター検証・情報管理部門の支援を受けてモニタリング・監査・統計解析・データマネジメントの整備も進めた。また、東北大学 TR センタ

ー教育・人材育成部門において CRC の育成を行うと同時に、担当モニター（シミック）を交えての各種手順の確認を行い、GCP に沿った治験実施体制を整えた。全体のプロジェクトマネジメントは東北大学 TR センター審査・評価部門にて行った。また、臨床試験の薬物動態等の検査施設として新日本科学を、CRO としてシミックを選定した。以上のように構築した第Ⅰ相臨床試験の実施体制を下図に示す。

### 第Ⅰ相臨床試験の実施体制



上記の準備を経て、平成 23 年 6 月に第Ⅰ相臨床試験の治験届を医薬品医療機器総合機構（PMDA）に、同年 7 月に東北大学病院 IRB に提出し其々承認を得た後、第Ⅰ相臨床試験を開始した。本試験は ALS 患者を対象とし、HGF を髄腔内投与したときの安全性・忍容性および薬物動態を確認することを目的とする。本試験では、ALS で障害を受ける脊髄神経に直接 HGF を作用させることを狙っており、このため、髄腔内に直接 HGF を投与する。HGF の髄腔内投与のためには、専用のカテーテルを髄腔に埋め込むこととする。本試験はオープンラベルで行い、用量漸増（低、中、高用量）による髄腔内単回投与と、安全性を確認した最高用量での髄腔内反復投与の計 4 群（12 例）の試験である。各群終了時に外部医学専門家で構成する効果安全性評価委員会による臨床評価を行い、安全性には十分配慮して試験を進めるこ