

201244001A

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(国際水準臨床関係研究分野)

新規医薬品・医療機器等の創出、難治性疾患の
治療法の開発および最適な治療法の確立に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 典宏

平成 25 (2013) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

(国際水準臨床関係研究分野)

新規医薬品・医療機器等の創出、難治性疾患の
治療法の開発および最適な治療法の確立に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 佐藤 典宏

平成 25 (2013) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

新規医薬品・医療機器等の創出、難治性疾患の治療法の開発および最適な治療法の確立に関する研究

研究事業全体の総括 ----- 1

【佐藤 典宏】

II. 分担研究報告

1. 研究事業 1. 新規培養法による自己骨髄間質細胞による脳梗塞の再生医療 --- 3

【寶金 清博】

2. 研究事業 2. 臨床応用を目指した慢性炎症制御に基づく新規心血管病治療法の開発 ----- 6

【筒井 裕之】

3. 研究事業 3. 小児難治性急性白血病に対するボルテゾミブ併用化学療法 ---- 10

【井口 晶裕】

4. 研究事業 4. 常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者の肝嚢胞に対する球状塞栓物質による治療法開発 ----- 14

【西尾 妙織】

5. 研究事業 5. 統合失調症ならびに双極性障害患者における糖脂質代謝障害と抗精神病薬使用時の代謝能変化に関する研究 ----- 18

【久住 一郎】

6. 研究事業 6. ベザフィブレートによる極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼII欠損症患者の治療 ---- 21

【白石 秀明】

I. 総括研究報告書

新規医薬品・医療機器等の創出、難治性疾患の治療法の開発および最適な治療法の確立に関する研究

研究代表者 佐藤 典宏 北海道大学病院 高度先進医療支援センター センター長・教授

研究要旨

臨床研究中核病院整備事業で整備中の基盤を活用し、画期的医薬品等の創出を目標とした細胞治療・再生医療（研究事業 1, 2）、小児疾患・難治性疾患に対する治療法の開発（研究事業 3, 4, 6）、最適治療の確立（研究事業 5）を目指した研究を実施した。平成 24 年度は、2 件で探索的臨床試験を開始、2 件で医薬品医療機器総合機構（PMDA）薬事戦略相談を実施、また 1 件で臨床試験開始のためのスタートアップミーティングを開催するなど、概ね順調に研究が進んでいる。次年度以降は、薬事承認に向けた医師主導治験を開始するなど、更に研究を進める計画である。

A. 研究目的

画期的医薬品等の創出、小児疾患・難治性疾患に対する治療法の開発、最適治療の確立を目指し、臨床研究中核病院整備事業による基盤を活用し、6 つの研究テーマについて治験または臨床試験を実施する。

B. 研究方法

研究事業 1（新規培養法による自己骨髄間質細胞による脳梗塞の再生医療）

動物蛋白を用いない安全な培養法として、他家ヒト血小板溶解物（PL）を利用した方法の確立を目指し、PL の調製とそれによる骨髄間質細胞の培養を行った。また、臨床応用を目指して PMDA 薬事戦略相談を行い、その助言に基づいて培養工程の確立と品質の検討を行った。

研究事業 2（臨床応用を目指した慢性炎症制御に基づく新規心血管病治療法の開発）

α -ガラクトシルセラミド（ α -GalCer）をパルスした樹状細胞（DC）の有効性を、マウス脾細胞およびヒト末梢血単核球を細胞源として検討した。また、ヒト α -GalCer/DC（細胞製品）規格決定および品質・安全性試験の検討を行った。

研究事業 3（小児難治性急性白血病に対するボルテゾミブ併用化学療法）

小児難治性急性白血病に対するボルテゾミブの有効性を証明し、薬事承認に繋げるための同剤併用化学療法のプロトコールの検討を行った。また、並行して同治療法の安全性確認と薬物血中濃度の測定のため、探索的臨床試験を計画した。

ため、探索的臨床試験を計画した。

研究事業 4（常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者の肝嚢胞に対する球状塞栓物質による治療法開発）

有効な治療法のない巨大肝嚢胞に対する治療法を開発するため、球状塞栓物質（Embosphere）の安全性と有効性を示す臨床試験を計画し、実施する。

研究事業 5（統合失調症ならびに双極性障害患者における糖脂質代謝障害と抗精神病薬使用時の代謝能変化に関する研究）

第二世代抗精神病薬により代謝能変化を明らかにして薬物療法のガイドラインを作成することを目的に、大規模多施設共同研究（症例数 3000 例）の実施体制を構築し、臨床試験を開始する。

研究事業 6（ベザフィブレートによる極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損症およびカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II 欠損症患者の治療）

稀少疾患であるミトコンドリア脂肪酸代謝異常症（FAOD）の治療法確立のため、ベザフィブレートによる治療法のプロトコールを作成すると共に、治験への参加が可能な患者数の把握のための調査を行った。

C. 研究結果

研究事業 1

健常人由来 PL を調製し、ヒト骨髄間質細胞の培養を行った。その結果、ウシ胎仔血清と同程度の培養速度であり、PL が使用可能であることは確認された。また、並行して臨床応用における細胞調製工程を確立し、品質試験の内容を決定した。

研究事業 2

マウスの虚血再灌流実験において、マウス α -GalCer 投与群は、梗塞サイズを有意に縮小した。また、ヒト α -GalCer 投与により、マウス血漿サイトカイン (IL-4、IFN- γ) が有意に上昇した。以上より、 α -GalCer の有効性が示された。また、アフェレーシス細胞由来のヒト α -GalCer の作成に成功し、製造の規格を決定することができ、品質試験の内容を決定した。

研究事業 3

ボルテゾミブの薬事承認を目的とした試験デザインについて PMDA 薬事戦略相談事前面談を行った。その結果、同剤を含む群と含まない群によるランダム化比較試験を行う方向となった。次年度に再度事前面談を行い、対面助言を経てプロトコルを確定し、医師主導治験の実施をめざす。また、探索的臨床試験は、北海道大学病院を含む 3 施設で行うことが同病院に倫理審査委員会で承認され、患者登録を待っている段階である。

研究事業 4

Embosphere による治療の安全性を主要評価項目とし、有効性を副次的評価項目とするプロトコルを作成し、北海道大学病院の倫理審査委員会の承認を得た。目標症例数は 5 例であり、これまで 2 例に実施、重篤な有害事象の発生はなく経過している。

研究事業 5

多施設共同研究 (全国 21 施設が参加) による大規模臨床試験を実施するため、EDC システムの構築とそれによるデータマネジメント体制を確立した。責任機関である北海道大学病院をはじめ順次、参加施設での倫理審査委員会の承認を得ている。また、スタートアップミーティングを終了し、次年度早々から患者登録が開始される。

研究事業 6

プロトコルの検討においては、被験者の対象年齢、主要評価項目の設定、薬剤投与方法、安全性の確保などが課題として挙げられ、文献報告や本剤の開発メーカーとの検討を重ねることにより確定した。また、本治験に参加できる患者は全国で 10 名程度であることも判明した。これらの成果を踏まえ、次年度早々に PMDA 薬事戦略相談を行う。

D. 考察

研究事業 1 は、実験レベルの細胞培養法は確立できたので、次年度は臨床レベルの培養を行う。また、品質試験項目を決定したので、早々に 2 回目の PMDA 薬事戦略相談を行う計画である。

研究事業 2 は、in vitro の系で有効性が示され、かつヒト細胞を用いた規格決定や品質基準の作成を行うことができた。これらの成果を踏まえ、PMDA 薬事戦略相談を進む計画である。

研究事業 3 は、PMDA 薬事戦略相談の結果を踏まえプロトコルを確定したので、次年度に医師主導治験に向けた具体的な準備を進めることができる。

研究事業 4 は、安全性評価の探索的臨床試験を開始し、現時点まで安全に施行できている。本試験の成果を踏まえ、次年度では薬事承認を目指した医師主導治験へ進む予定である。

研究事業 5 は、臨床試験実施体制は整備され、次年度早々からの患者登録を行える状態になっている。次年度は、患者登録の促進が課題となる。

研究事業 6 は、プロトコルの作成および患者数の調査を終えた。次年度早々、PMDA 薬事戦略相談を行い、医師主導治験に進める計画である。

E. 結論

各研究事業とも、臨床研究中核病院整備事業の基盤を活用し、当初計画にほぼ準じた進捗状況で研究が進んでいる。次年度は、本年度の成果を進め、臨床試験・治験が実施されることが期待できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告書

研究事業1. 新規培養法による自己骨髄間質細胞による脳梗塞の再生医療

研究分担者 寶金 清博 北海道大学大学院医学研究科 神経病態学講座 教授

研究要旨

脳梗塞はわが国の主要疾病の一つであり、その後遺症は日常生活に重大な支障を及ぼし、介護や医療費は年々増加している。近年、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)を利用した再生医療が、後遺症を改善させる新たな治療法として期待されている。実際、自己 BMSC 移植は国内外で臨床試験が開始されつつあるが、BMSC の安全で効率的な培養法や移植法は確立されていない。

当院では、『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生治療 - 治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』(RAINBOW研究)を、平成27年度開始をめざし準備中であるが、本研究では治療プロトコルとして他家ヒト血小板溶解物(platelet lysate: PL)を添加物に用いたBMSC培養と、さらに細胞を脳内に定位的移植することを想定している。現在は、他家PLを用いて培養されたBMSCの、品質と安全性についての非臨床試験を準備中である。

A. 研究目的

脳梗塞はわが国の主要疾病の一つであり、その後遺症は日常生活に重大な支障を及ぼし、介護や医療費は年々増加している。近年、骨髄間質細胞(bone marrow stromal cells; BMSC)を利用した再生医療が、後遺症を改善させる新たな治療法として期待されている。実際、自己 BMSC 移植は国内外で臨床試験が開始されつつあるが、BMSC の安全で効率的な培養法や移植法は確立されていない。

今年度の本研究の目的は、他家ヒト血小板溶解物(platelet lysate: PL)を添加物に用いた BMSC 培養について、その品質と安全性に関し検討することである。

B. 研究方法

ボランティアから血小板を成分採血し、GMP 準拠の濃厚血小板血漿 (PRP) 15-20 単位を作成する。院内 CPC で PRP を凍結、解凍し細胞膜を破壊する。遠心分離の後、上清をとり PL を作成する。基本培地に PL、抗生物質を加え細胞培養に用いる。

ボランティアから、局所麻酔下で腸骨稜より約 50mL の骨髄液を採取する。CPC 内に搬入し遠心分離により単核球だけを採集する。

CPC で培養フラスコに単核球の播種を行う。播種 24 時間後に浮遊細胞を除去し、接着細胞のみの培養を開始する。コンフルエントになった時点で継代を行い、全培養細胞数が細胞移植手術に必要な量(1-5 × 10⁷ 個)に達するまで継代培養を行う。

培養終了時に細胞生存率、無菌検査(細菌感染、マイコプラズマ感染、エンドトキシン)、フローサイトメトリー(CD34、CD45、CD44、CD90、CD105、CD166)、グライコミクス解析を行う。さらに、ラット、マーモセットなどの脳内に BMSC を定位的に移植し、一般毒性試験など安全性を検討する。

C. 研究結果

今年度は preliminary な研究として、市販ヒト BMSC を利用し PL を用いた細胞培養を行った。細胞の培養速度は、ウシ胎仔血清(FCS)を用いたものとほぼ同等であった。これらにグライコミクス解析を行

うと、N-glycan、および FOS (free oligosaccharide) の糖鎖総量が著しく異なっていた。PL と FCS 培養の両者において、フローサイトメトリーでは両者を明確に区別するマーカーは存在しないが、糖鎖の定量解析によって両者を明確に区別することができることが示唆された。また、非ヒト型糖鎖が FCS を用いた培養によって BMSC から検出された (1%程度)。これは FCS 中に含まれる NeuGc が取り込まれ、N-glycan 合成に供されたと考えられた。これらの結果は、国際学術誌に投稿準備中である。

現在、ボランティア由来の PL 作成と骨髄液採取、BMSC 培養に関し IRB の承認が得られたため、今後ボランティア由来の BMSC を他家 PL により培養し、品質試験、安全性試験を行う。

D. 考察

Therapeutic time window として、多くの基礎研究の結果から急性一亜急性期に BMSC を移植することが望ましいとされる。しかし脳梗塞の初期治療に 2 週間かかり、その後に患者から骨髄採取を行うと、移植に必要な細胞数までの培養にさらに 3-4 週間かかる。過去のほとんどの臨床応用では、培養速度を高める添加物として FCS が使用されてきたが、動物由来物質の使用は可能な限り避けるべきである。FCS 代替品として自己血清の使用も報告されているが、脳梗塞患者の多くは高齢者であり、採取した血清の増殖活性に懸念がある。また急性期は低栄養状態に陥りやすく、患者から大量の血清を採集することも問題となる。

これらの問題を回避するために、他家 PL を用いて BMSC の培養をおこなう研究が報告されている。2005 年、Doucet らが PL の有用性を報告して以来、現在までに 30 編以上の報告がみられ、臨床応用も行われている。当院では、『新たな培養・移植・イメージング技術を駆使した自己骨髄間質細胞移植による脳梗塞再生治療 - 治療メカニズムの解明を目的とした臨床試験』(RAINBOW 研究)を、平成 27 年度開始をめざし準備中であるが、本研究では治療プロトコルに他家 PL を添加物に用いた BMSC 培養を組み入れ

ることを想定している。しかし、中枢神経再生分野での臨床応用の報告はなく、PL を用いて培養した BMSC の品質と安全性の確認が必須となる。

E. 結論

preliminary な研究として、市販ヒト BMSC を培養しグライコムクス解析を行った。糖鎖の定量解析によって PL と FCS により培養された細胞とを区別することができた。また、非ヒト型糖鎖が FCS を用いた BMSC から検出されたことから、PL を用いた BMSC 培養の安全性が示唆された。

今後はボランティア由来の BMSC を他家 PL により培養し、品質試験、安全性試験を行うとともに、ヒトへの定位的脳内細胞移植の効率性、安全性に関してもさらに検証していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Bone marrow stromal cell transplantation enhances recovery of local glucose metabolism after cerebral infarction in rats: a serial 18F-FDG PET study. Miyamoto M, et al. J Nucl Med. 2013 Jan;54(1):145-50.
- 2) Timing and cell dose determine therapeutic effects of bone marrow stromal cell transplantation in rat model of cerebral infarct. Kawabori M, et al. Neuropathology. 2013 Apr;33(2):140-8.
- 3) Intracerebral, but not intravenous, transplantation of bone marrow stromal cells enhances functional recovery in rat cerebral infarct: an optical imaging study. Kawabori M, et al. Neuropathology. 2012 Jun;32(3):217-26.
- 4) Impact of ageing on biological features of bone marrow stromal cells (BMSC) in cell transplantation therapy for CNS disorders: functional enhancement by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). Chiba Y, et al. Neuropathology. 2012 Apr;32(2):139-48.

2. 学会発表

1) Bone marrow stromal cells serve “nursing effect” to damaged neurons by secreting neurotrophic factors *in vitro* and *in vivo*. Hideo Shichinohe, et al. International Stroke Conference 2013, Honolulu, HI. (2013/2/6-8)

2) Bone marrow stromal cell transplantation ameliorates motor deficit in rat lacunar infarct model. Hideo Shichinohe, et al. International Stroke Conference 2013, Honolulu, HI. (2013/2/6-8)

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究事業2. 臨床応用を目指した慢性炎症制御に基づく新規心血管病治療法の開発

研究分担者 筒井 裕之 北海道大学大学院医学研究科 内科学講座 教授

研究要旨

わが国では、人口の高齢化、生活習慣病の増加、急性心筋梗塞に対する急性期治療の普及と治療成績の向上などによって、心血管病の患者が増加の一途をたどっている。特に近年の薬物療法・非薬物療法の進歩によって、心不全患者の予後は格段に改善してきたが、重症例の予後は未だに不良であり、患者は増悪による入院を反復し、最終的には死に至る。したがって、心血管病の中でも心不全の新たな治療法の開発に対する医療現場における必要度は極めて高い。

心筋リモデリングの形成・進展には、心筋組織における炎症の遷延化・慢性化が関与する。ナチュラルキラーT (NKT) 細胞は、マクロファージや樹状細胞 (Dendritic cell; DC) などの抗原提示細胞から刺激を受け種々のサイトカインを産生する炎症細胞のひとつであるが、Th1/Th2 バランスを調節し生体における炎症を制御する「炎症調節細胞」としての役割を担っている。近年、 α -ガラクトシルセラミド (α -GalCer) により NKT 細胞を活性化し Th1/Th2 バランスを Th2 へシフトさせることにより自己免疫疾患やガンを改善できることが報告され、慢性炎症制御は新たな治療戦略として期待されている。

A. 研究目的

本研究は、NKT 細胞の炎症制御における基盤的役割に着目し、DC を担体とした α -GalCer (α -GalCer/DC) を用いた NKT 細胞活性化の心不全における有効性を検証し、新たなパラダイムに基づく心血管病、特に心不全の新規治療法を開発しようとするものである。

B. 研究方法

本研究では、 α -GalCer/DC の心血管病治療における有効性を検証し、新規治療法として開発する。具体的には、昨年度は下記の3点に分けて研究を遂行した。

(1) マウス α -GalCer/DC の有効性の確認

マウス脾臓から MACS を用いて CD11c 陽性細胞を分離したのち R1 培地で培養し、 α -GalCer を添加してマウス α -GalCer/DC を作製した。作製したマウス α -GalCer/DC あるいは vehicle を虚血再灌流モデルマウスに投与し、心筋障害におよぼす効果を比較検討した。

(2) ヒト α -GalCer/DC の規格決定および品質・安全性試験 (GMP 基準) と有効性の確認

アフレーシスによってヒト末梢血単核球を分離し、IL-2 および GM-CSF 添加 AIM-V 培地で6日間培養後、 α -GalCer を添加してヒト α -GalCer/DC を作製した。ヒト α -GalCer/DC の作製は GMP 基準に準拠し、当院

セルプロセッシングセンター (CPC) 内にて行ない、培養細胞を回収洗浄し、フローサイトメトリーを用いて樹状細胞マーカーの発現などを測定して規格試験した。また、ヒト α -GalCer/DC を正常マウスに投与して、Cytometric Bead Array System にて血漿中の IFN- γ や IL-4 などのサイトカイン濃度を測定し、ヒト α -GalCer/DC の有効性を検討した。

(3) ヒト α -GalCer/DC (細胞製品) の製造体制の整備 (GLP 基準)

PMDA「細胞・組織加工製品の品質及び安全性に係る確認申請書」に準拠し、工程内管理試験 (細胞数測定、細胞生存率測定、確認試験)、規格試験 (細胞数測定、細胞生存率測定、確認試験、細胞純度試験、製造工程由来不純物試験、無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験) の妥当性を検討した。

C. 研究結果

(1) マウス α -GalCer/DC の有効性の確認

マウスの冠動脈を結紮し45分の虚血後、結紮を解除し24時間再灌流を行った。Vehicle 投与群の虚血エリアに対する梗塞サイズの割合は $53.6 \pm 4.9\%$ であった。 α -GalCer/DC 投与群では $36.8 \pm 3.5\%$ であり、有意に抑制された。一方、左室心筋全体に対する虚血エリアは両群で差がなかった。

(2) ヒト α -GalCer/DC の規格決定および品質・安全

性試験 (GMP 基準) と有効性の確認

アフエレーシス施行後に細胞調製し、ヒト末梢血単核球を採取した。IL-2 および GM-CSF 添加 AIM-V 培地で 6 日間培養後 α -GalCer を添加し、培養開始時の 2 倍量のヒト α -GalCer/DC を作製することができた。フローサイトメトリーで培養前にくらべ、樹状細胞マーカーの発現は亢進していた。 3×10^5 個のヒト α -GalCer/DC を正常マウスに静脈内投与したところ、血漿サイトカイン濃度の有意な上昇を認めた (IL-4 は投与 3 時間後、IFN- γ は投与 12 時間後に最高値)。

(3) ヒト α -GalCer/DC (細胞製品) の製造体制の整備 (GLP 基準)

複数の健常人より分離作製したヒト α -GalCer/DC データより、工程内管理試験の基準となる細胞数・胞生存率・単核球割合、規格試験の基準となる樹状細胞マーカー発現割合を定めた。

D. 考察

これまでの研究より、ヒト α -GalCer/DC の規格決定および品質・安全性と有効性が確認された。今後は、ヒト α -GalCer/DC の心不全モデルマウスにおける有効性・安全性の確認 (前臨床試験) を行なうとともに、PMDA 医薬品薬事戦略相談 (事前面談・対面助言) による臨床試験計画策定に関する指導・助言を受けながら、試験計画の策定 (臨床試験準備) を進めてゆく必要がある。

E. 結論

これまでの本研究の結果から、ヒト α -GalCer/DC を用いて NKT 細胞を活性化することにより、モデルマウスにおいて心筋リモデリングが抑制される結果を得た。これらの基礎的研究の成果をふまえ、ヒト α -GalCer/DC を生体内投与して NKT 細胞を活性化し、Th1/Th2 バランスの適正化を図って心筋リモデリングを抑制するという我々独自の発想に基づいた治療パラダイムが、実際の心不全治療として臨床応用に繋がるのが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Chiba S, Naya M, Iwano H, Yoshinaga K, Katoh C, Manabe O, Yamada S, Wakasa S, Kubota S, Matsui Y, Tamaki N, Tsutsui H: Interrelation between myocardial oxidative metabolism and diastolic function in patients undergoing

surgical ventricular reconstruction. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40(3):349-55, 2013

2. Yokota T, Kinugawa S, Yamato M, Hirabayashi K, Suga T, Takada S, Harada K, Morita N, Oyama-Manabe N, Kikuchi Y, Okita K, Tsutsui H: Systemic oxidative stress is associated with lower aerobic capacity and impaired skeletal muscle energy metabolism in patients with metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2013, in press
3. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Sobirin MA, Masaki Y, Kodoguchi T, Okita K, Tsutsui H: Angiotensin II receptor blocker improves the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *J Appl Physiol* 114(7):844-57 2013
4. Tsuchihashi-Makaya M, Matsuo H, Kakinoki S, Takechi S, Kinugawa S, Tsutsui H; for the J-HOMECARE Investigators. Home-based disease management program to improve psychological status in patients with heart failure in Japan. *Circ J* 77(4):926-33, 2013
5. Takada S, Okita K, Suga T, Omokawa M, Morita N, Horiuchi M, Kadoguchi T, Takahashi M, Hirabayashi K, Yokota T, Kinugawa S, Tsutsui H; Blood flow restriction exercise in sprinters and endurance runners. *Med Sci Sports Exerc* 44(3):413-9, 2012
6. Yamato M, Shiba T, Ide T, Seri N, Kudo W, Ando M, Yamada K, Kinugawa S, Tsutsui H: High-fat diet-induced obesity and insulin resistance were ameliorated via enhanced fecal bile acid excretion in tumor necrosis factor-alpha receptor knockout mice. *Mol Cell Biochem* 359(1-2):161-7, 2012
7. Suga T, Okita K, Takada S, Omokawa M, Kadoguchi T, Yokota T, Hirabayashi K,

- Takahashi M, Morita N, Horiuchi M, Kinugawa S, Tsutsui H: Effect of multiple set on intramuscular metabolic stress during low-intensity resistance exercise with blood flow restriction. *Eur J Appl Physiol* 112(11):3915-20, 2012
8. Hamaguchi S, Kinugawa S, Sobirin MA, Goto D, Tsuchihashi-Makaya M, Yamada S, Yokoshiki H, Tsutsui H; for the JCARE-CARD Investigators. Mode of death in patients with heart failure and reduced vs preserved ejection fraction. *Circ J* 76(7):1662-9, 2012
 9. Takada S, Okita K, Suga T, Omokawa M, Kadoguchi T, Sato T, Takahashi M, Yokota T, Hirabayashi K, Morita N, Horiuchi M, Kinugawa S, Tsutsui H: Low-intensity exercise can increase muscle mass and strength proportionally to enhanced metabolic stress under ischemic conditions. *J Appl Physiol* 113(2):199-205, 2012
 10. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Goto D, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H; The JCARE-CARD Investigators. Loop diuretic use at discharge is associated with adverse outcomes in hospitalized patients with heart failure. *Circ J* 76(8):1920-7, 2012
 11. Sobirin MA, Kinugawa S, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Hirabayashi K, Suga T, Azalia P, Takada S, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H; The activation of natural killer T cells ameliorates post-infarct cardiac remodeling and failure in mice. *Circ Res* 111(8):1037-47, 2012
 12. Goto D, Kinugawa S, Hamaguchi S, Sakakibara M, Tsuchihashi-Makaya M, Yokota T, Yamada S, Yokoshiki H, Tsutsui H; The JCARE-CARD Investigators. Clinical characteristics and outcomes of dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy: Report from the registry data in Japan. *J Cardiol* 61(1):65-70, 2012
 13. Katoh C, Yoshinaga K, Klein R, Kasai K, Tomiyama Y, Manabe O, Naya M, Sakakibara M, Tsutsui H, Dekemp RA, Tamaki N: Quantification of regional myocardial blood flow estimation with three-dimensional dynamic rubidium-82 PET and modified spillover correction model. *J Nucl Cardiol* 19(4):763-74, 2012
 14. Meta-analysis Global Group in Chronic Heart Failure(MAGGIC): The survival of patients with heart failure with preserved or reduced left ventricular ejection fraction: an individual patient data meta-analysis. *Eur Heart J* 33(14):1750-1757, 2012
 15. Momomura SI, Tsutsui H, Sugawara Y, Ito M, Mitsuhashi T, Fukamizu S, Noro M, Matsumoto N, Tejima T, Sugi K; for the MOMIJI Study Investigators. Clinical efficacy of cardiac resynchronization therapy with an implantable defibrillator in a Japanese population: results of the MIRACLE-ICD outcome measured in Japanese indication (MOMIJI) study. *Circ J* 76(8):1911-1919, 2012
 16. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Goto D, Yamada S, Yokoshiki H, Takeshita A, Tsutsui H; The JCARE-CARD Investigators. Loop diuretic use at discharge is associated with adverse outcomes in hospitalized patients with heart failure: a report from the Japanese cardiac registry of heart failure in cardiology (JCARE-CARD). *Circ J* 76(8):1920-1927, 2012
 17. Watanabe M, Yokoshiki H, Mitsuyama H, Mizukami K, Ono T, Tsutsui H: Conduction and refractory disorders in the diabetic atrium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*

303(1):H86-95, 2012

18. Sakakibara M, Yamada S, Kamiya K, Yokota T, Oba K, Tsutsui H: Sleep-disordered breathing is an independent risk factor of aborted sudden cardiac arrest in patients with coronary artery spasm. *Circ J* 76(9):2204-2210, 2012
19. Danzaki K, Matsui Y, Ikesue M, Ohta D, Ito K, Kanayama M, Kurotaki D, Morimoto J, Iwakura Y, Yagita H, Tsutsui H, Uede T: Interleukin-17A deficiency accelerates unstable atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(2):273-80, 2012

2. 学会発表

1. Homma T, Kinugawa S, Fukushima A, Suga T, Takada S, Masaki Y, Kadoguchi T, Furihata T, Tsutsui H: The role of invariant natural killer T cells in myocardial ischemia reperfusion injury
The 29th Annual Meeting of the International Society for Heart Research Japanese Section, 2012. 10. 27 (Fukuoka, Japan)
2. 本間恒章、絹川真太郎、福島新、菅 唯志、高田真吾、正木芳弘、門口智泰、降旗高明、筒井裕之: ナチュラルキラーT細胞の活性化はマウスの心筋虚血再灌流障害を改善する
第16回日本心不全学会学術集会、2012. 11. 30

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究事業 3. 小児難治性急性白血病に対するボルテゾミブ併用化学療法

研究分担者 井口 晶裕 北海道大学病院 小児科 助教

研究要旨

寛解導入不能あるいは第一再発以降の小児難治性急性白血病に対するボルテゾミブ併用化学療法の有効性と安全性を検証し薬事承認に繋げることを目的に医師主導治験を計画した。治療レジメンは米国の Therapeutic Advances in Childhood Leukemia (TACL) の第一相試験および第二相試験を参考に、従来型の寛解導入療法であるビンクリスチン、デキサメサゾン、アントラサイクリン、L-アスパラギナーゼの骨格にボルテゾミブの4回投与を併用する内容となっている。治験デザインは臨床研究中核病院事業の規模や協力施設数から考えられる実現可能性のあるものを考慮しボルテゾミブの有無によるランダム化試験とする予定で、今後 PMDA と協議を行いデザインを確定し治験を実施する予定である。

本治験を開始する前にボルテゾミブ併用化学療法の安全性評価のための探索的臨床試験を先行して開始しており、これにより小児急性白血病におけるボルテゾミブの安全性を評価するとともに小児における薬物動態を確認することとしている。

本治験および探索的臨床試験の実施と併行して、ボルテゾミブの白血病に対する作用機序を明らかとするためにユビキチン化タンパク、プロテアソームタンパク、およびアポトーシス関連遺伝子などの薬剤作用発現に関連する遺伝子解析を計画している。

A. 研究目的

寛解導入不能あるいは第一再発以降の小児難治性急性リンパ性白血病 (ALL) に対するボルテゾミブ併用化学療法の有効性と安全性を検証し薬事承認に繋げることを目的に、日本小児白血病/リンパ腫研究グループ (JPLSG) と協力し、医師主導治験、探索的臨床試験、および薬剤作用発現に関連する遺伝子解析を行う。

B. 研究方法

(1) 研究の種類・デザイン

前向き介入ランダム化試験

(2) 対象

既存の治療では有効率が低いと考えられる寛解導入不能例 (初回寛解導入不能例は 2 回以上の異なる治療を施行した症例のみ)、早期再発例、造血細胞移植後再発例、頻回再発例などの小児難治性 ALL を対象に以下の選択基準および除外基準を満たす小児患者を対象とする。

(3) 選択基準

①初回寛解導入不能 (2 回以上の異なる治療を施行した症例、あるいは第 1 再発以降の髄外単独

再発を除いた小児 ALL (B 前駆細胞型および T 細胞性) の患者。

- ②骨髄に 25%以上の白血病細胞浸潤を認める患者。
- ③初発診断時の年齢が 1 歳以上 18 歳未満かつ本試験登録時の年齢が 20 歳未満である患者。
- ④登録時に米国 Eastern Cooperative Oncology Score (ECOG) performance status (PS) スコアが 0-2 である患者。
- ⑤登録時にステロイドを除いた前回治療より 2 週間以上経過しており、骨髄抑制を除き、前回治療の有害事象が解決している患者。
- ⑥造血幹細胞移植後の症例では移植後 6 ヶ月以上経過しており、その時点で活動性のある GVHD を認めていない患者。ただし免疫抑制剤は投与中であっても減量中であること。
- ⑦十分な肝・腎・心機能を有し、下記の基準を全て満たしている患者。検査値は症例登録日より 14 日以内の値とする。
 - ・血清総ビリルビン値 2.0mg/dl 以下
 - ・クレアチニンクリアランス 70 ml/min/1.73m² 以上
 - ・心電図にて治療を要するような異常を認めない

⑧本臨床試験への参加について本人又は代諾者（被験者が16歳以上の未成年者である場合には、本人および代諾者）から文書で同意が得られている患者。

(4) 除外基準

- ① tyrosine kinase inhibitor (TKI) による治療を一度も受けていないPh1陽性ALLの患者。
- ② ダウン症候群の患者。
- ③ 治療遂行に支障を来すCTCAE ver4.0 Grade3以上の中枢神経出血や白質脳症を伴う患者。
- ④ 過去にてんかん、ギランバレー症候群、脳炎、脳症の既往がある。難治性てんかんである患者。
- ⑤ コントロール困難な感染症（活動性の結核、HIV感染症を含む）を伴う患者。
- ⑥ 妊娠中、又は妊娠している可能性がある患者。
- ⑦ 先天性、あるいは後天性免疫不全症候群の既往がある患者。
- ⑧ 過去の治療などにより、本治療計画に含まれる薬剤の1つ以上が全く使用できない患者。
- ⑨ 末梢神経障害CTCAE ver4.0 Grade2以上の既往がある患者。
- ⑩ マニトールおよびホウ素にアレルギーがある患者。
- ⑪ 過去にアンスラサイクリン系薬剤がドキソルビシン換算で350mg/m²以上投与されている患者。
- ⑫ 過去の治療経過中に間質性肺炎の既往がある、あるいは治療開始時にCTで間質性の異常陰影がある患者。
- ⑬ 再発ALL以外に二次がんを合併している患者。
- ⑭ その他、担当医が本臨床試験に参加することが不適当と判断する場合。

(5) 治療スケジュール

(ボルテゾミブ群)

BZM: day1、4、8、11に1.3mg/m²をゆっくり静注。

VCR: day1、8、15、22に1.5mg/m²をゆっくり静注。最大投与量は2.0mg。

DEX: day1~14に10mg/m²を分2で経口投与し、その後1週間以上かけて漸減し中止する。腫瘍崩壊症候群が懸念される症例については最大5日間のDEXの先行投与を許容する。経口投与が困難な場合は注射剤に変更してもよい。ただし注射剤に変更する

場合の用量は経口剤×0.825とする。

MIT あるいは DOX:

MIT は day1, 2 に 10mg/m² を 1 時間かけて点滴静注する。

DOX は 60mg/m² を 1 時間以上かけて点滴静注する。

L-ASP: day2、5、8、11、15、18、22、25に10000U/m²を6時間かけて点滴静注又は筋注する。

5%ブドウ糖に溶解する。Day15、18、22、25投与時は投与前にステロイドホルモン、抗ヒスタミン剤を使用する。

IT MTX: day1にMTXを髄注する。1歳8mg、2歳10mg、3歳以上12mg。但しこの治療研究開始前1週間に髄注を施行している患者は省略する。

IT Triple¹: 全例 day15にMTX、Ara-C、HDCを髄注する。

Ara-C 1歳20mg、2歳26mg、3歳以上30mg。

HDC 1歳6mg、2歳8mg、3歳以上10mg。

IT Triple²: 研究開始時 CNS 陽性患者のみ day8、15、21にMTX、Ara-C、HDCを髄注する。用量は上記と同様。

(非ボルテゾミブ群)

上記治療内容からボルテゾミブを除いた治療内容となる。

(6) エンドポイント

治験

プライマリーエンドポイント

治療反応率（完全寛解と部分寛解の和）

セカンダリーエンドポイント

完全寛解率

有害事象発生率

4か月無イベント生存率

探索的臨床試験

プライマリーエンドポイント

有害事象（用量制限毒性：dose limiting toxicity、DLT）の発生の有無

セカンダリーエンドポイント

治療反応率（完全寛解と部分寛解の和）

完全寛解率

DLT以外の有害事象発生率

4か月無イベント生存率

C. 研究結果

治験については、治療内容をアントラサイクリン系抗がん剤のMITとした治療骨格に加え、ボルテゾミブの有無によるランダム化試験とするデザインに決定し、治験開始に向けて引き続きPMDAと協議している。

探索的臨床試験は多施設共同の臨床試験として、北海道大学、福島県立医科大学、および神奈川県立こども医療センターにて患者のエントリーを待っている。

VCRおよびDOXなどの薬剤耐性細胞株を作成し、薬剤非耐性細胞株に比べてNF- κ Bが恒常的に活性化されていること、および薬剤耐性細胞株ではMDR1の蛋白発現を確認しており今後ボルテゾミブ使用例での検討を進める予定である。

D. 考察

小児難治性ALLに対して効果があると考えられ、かつ作用機序の異なる抗腫瘍効果を有するボルテゾミブをデキサメサゾン、ビンクリスチン、アントラサイクリン、L-アスパラギナーゼの4剤と併用する治療の安全性と有効性を確認することで、小児難治性ALLの治療成績向上と新規治療の導入に繋がるものと考えられる。

E. 結論

小児難治性ALLに対するボルテゾミブの有効性と安全性を確立することで、ボルテゾミブ併用化学療法が本疾患に対する新たな治療戦略となることが期待される。また薬剤耐性細胞株における遺伝子解析によりボルテゾミブの小児難治性ALLに対する作用機序が明らかとなることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Sato T, Okumura F, Iguchi A, Ariga T, Hatakeyama S. TRIM32 promotes retinoic acid receptor α -mediated differentiation in human promyelogenous leukemic cell line HL60. *Biochem Biophys Res Commun.* 417:594-600, 2012

- (2) Ichikawa M, Suzuki D, Inamoto J, Ohshima J, Cho Y, Saitoh S, Kaneda M, Iguchi A, Ariga T. Successful alternative treatment containing vindesine for acute lymphoblastic leukemia with Charcot-Marie-Tooth disease. *J Pediatr Hematol Oncol.* 34:239-41, 2012

2. 学会発表

- (1) Daisuke Asai, Toshihiko Imamura, Souichi Suenobu, Akiko Saito, Daichiro Hasegawa, Takao Deguchi, Yoshiko Hashii, Kimikazu Matsumoto, Sadao Tokimasa, Atsushi Satoh, Akihiro Iguchi, Yoshiyuki Kosaka, Masue Imaizumi, Midori Shima, Yuhei Hamasaki, Hirohide Kawasaki, Hiroki Hori, Keiko Yagi, Keizo Horibe, Junichi Hara, Megumi Oda.

IKZF1 deletion is associated with a poor prognosis in pediatric BCP-ALL with TCF3-PBX1 fusion.

第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月、京都

- (2) Junjiro Ohshima, Minako Sugiyama, Yukayo Terashita, Mizuho Ichikawa, Yuko Cho, Akihiro Iguchi, Tadashi Ariga.

Successful treatment of atypical mycobacteriosis for a boy receiving cord blood transplantation.

第74回日本血液学会学術集会, 2012年10月、京都

- (3) 井口晶裕, 寺下友佳代, 杉山未奈子, 大島淳二郎, 長祐子, 小林良二, 有賀正

造血幹細胞移植後の神経学的合併症(単一施設報告).

第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年12月、横浜

- (4) 杉山未奈子, 寺下友佳代, 大島淳二郎, 長祐子, 井口晶裕

メソトレキセート髄注後に発症した一過性脳症の一例.

第54回日本小児血液・がん学会学術集会, 2012年12月、横浜

- (5) 長祐子, 杉山未奈子, 寺下友佳代, 大島淳二郎, 井口晶裕, 鈴木大介, 小林良二, 金田眞, 市川瑞穂

造血細胞移植中のオピオイドによる疼痛管理と合併症との関連に関する検討. 第 35 回日本造血細胞移植学会総会、2012 年 3 月、金沢

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究事業 4. 常染色体優性多発性嚢胞腎（ADPKD）患者の肝嚢胞に対する球状塞栓物質による治療法開発

研究分担者 西尾 妙織 北海道大学病院 内科Ⅱ 助教

研究要旨

多発性肝嚢胞は、嚢胞が肝に多数生じる病気で、嚢胞そのものは良性病変だが、特に常染色体優性多発嚢胞腎（ADPKD: Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease）に併発した場合には、時間が経つにつれ嚢胞は徐々に大きくなり、腹部膨満を生じる。進行すると腫大した肝により消化管（胃、腸）が圧迫され、食物の通過障害を生じ、さらに進行すると体動制限による ADL 低下、肺や心臓の圧迫による呼吸障害を生じる。現在金属コイルを用いた肝動脈の塞栓術の報告があるが、再発も多く、長期的な治療効果の持続を得るため球状塞栓物質（Polyphosphazene-coated hydrogel microspheres (Embozene™)）を用いた試験を行った。

A. 研究目的

本試験は、巨大肝嚢胞を有する常染色体優性多発性嚢胞腎患者あるいは多発性肝嚢胞患者に対しての球状塞栓物質を用いた TAE 治療の有用性と安全性の検討を行うことを目的としている。

B. 研究方法

以下の適格基準を満たす巨大肝嚢胞を有する患者 5 例に対して肝動脈にカテーテルを挿入し、Embosphere® Microspheres で塞栓を行い、安全性と治療効果を検討する。

<適格基準>

- (1) 20 歳以上である。
- (2) Computed Tomography (CT)、Magnetic resonance imaging (MRI) あるいは超音波検査で多嚢胞肝と診断され、これに起因する腹部膨満・圧迫症状、行動障害、摂食障害、呼吸障害、腹痛、背部痛などのいずれかの自覚症状がある。
- (3) Child-Pugh score が 6 点以下である。
- (4) 主要臓器（骨髄、心など）機能が保持されている。
- (5) 一般状態（Performance Status (ECOG)）が 0、1、2 の症例。

（倫理面への配慮）

本試験に関与するすべての者は世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び「臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示 415 号）」に従って本試験を実施する。

C. 研究結果

多発性肝嚢胞に対する球状塞栓物質を用いた塞栓療法に関する報告はなく、まずは 5 名に対して安全性を主要評価項目とする自主臨床試験を行うこととした。平成 24 年 3 月 11 日付けで本大学の自主臨床研究審査委員会にて当研究は承認された。現在まで 5 例中 2 例の塞栓術が終了し、重篤な有害事象なく経過している。

D. 考察

多発性肝嚢胞に対する治療は現在なく、嚢胞穿刺吸引、嚢胞開窓術、外科的肝切除が行われているが侵襲が強く、副作用や再発の問題もあり非常に困難である。金属コイルの塞栓治療は数十本から百本近い金属コイルを使用し、高額な処置であるが、再発率が高く、再発した場合には挿入されたコイルがあることで再治療ができない。今後国内で承認見込みである Embosphere® Microspheres が多発性肝嚢胞の治療に有効であれば、多くの患者の治療に役立てることは間違いない。今回の自主臨床試験で Embosphere® Microspheres の安全性と有効性が証明できれば医師主導治療の開始が可能となると考えている。

E. 結論

多発性肝嚢胞患者の肝嚢胞に対する球状塞栓物質を用いた肝動脈塞栓術治療は安全である可能性が示

唆される。平成25年度ではさらに3名の治療（既に日程は確定している）を行い、引き続き安全性を確認するとともに有効性を検証する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T, Nishio S, Kasahara M, Ishizu A: Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil: Implication of disordered neutrophil extracellular traps in a rat model of myeloperoxidase antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum.* 64: 3779-3787, 2012.
 2. Higashihara E, Horie S, Muto S, Mochizuki T, Nishio S, Nutahara K. Renal disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* Aug;16(4):622-8, 2012
- ### 2. 学会発表
1. Daigo Nakazawa, Saori Nishio, Utano Tomaru, Akihiro Ishizu: Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps induced by propylthiouracil are implicated in the pathogenesis of MPO-ANCA-associated vasculitis. 49th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress 2012, Paris, France (2012) May 24-26
 2. Miho Kimachi, Saori Nishio, Akiko Sato, Tasuku Nakagaki, Daigo Nakazawa, Yasunobu Ishikawa, Shibagaki Sekiya, Tatsuya Atsumi: INVOLVEMENT OF IFN- γ IN THE PATHOGENESIS OF TYPE2 DIABETIC NEPHROPATHY. 49th European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Congress 2012, Paris, France (2012) May 24-26
 3. Tasuku Nakagaki, Saori Nishio, Sekiya Shibazaki, Yasunobu Ishikawa, Stefan Somlo, Tatsuya Atsumi: Aliskiren Ameliorates Cyst Progression in an Orthologous Mouse Model of Autosomal Dominant Polycystic Kidney. American Society of Nephrology, Kidney Week 2012. San Diego, USA (2012) Oct 30-Nov 4
 4. Yasunobu Ishikawa, Saori Nishio, Stefan Somlo, Tasuku Nakagaki, Sekiya Shibazaki, Tatsuya Atsumi: Branched-chain amino acid supplementation accelerates cyst growth in a mouse model of autosomal dominant polycystic kidney disease. Kidney Week 2012, San Diego, USA (2012) Oct 30-Nov 4
 5. Takayuki Toyoyama, Daigo Nakazawa, Junya Yamamoto, Naoko Matsuoka, Akiko Sato, Tasuku Nakagaki, Yasunobu Ishikawa, Sekiya Shibazaki, Saori Nishio, Tatsuya Atsumi: The Long-Term Prognosis of IgA Nephropathy Patients Treated by Tonsillectomy Plus Steroid Pulse Therapy』 American Society of Nephrology San Diego 2012. 11. 1-4

<国内学会・研究会>

1. 中沢大悟, 外丸詩野, 西尾妙織, 渥美達也, 笠原正典, 石津明洋: Abnormal conformation and impaired degradation of neutrophil extracellular traps (NETs) induced by propylthiouracil: Implication of disordered NETs in MPOANCA-associated vasculitis. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月7日 神戸市
2. 豊山貴之, 松岡奈央子, 山本準也, 佐藤亜樹子, 中沢大悟, 中垣祐, 石川康暢, 柴崎跡也, 西尾妙織: 当院におけるIgA腎症の扁桃摘出術+ステロイドパルス療法の治療成績. 第67回北海道臨床腎臓研究会 2012年11月9日 札幌市
3. 松岡奈央子, 西尾妙織, 山本準也, 豊山貴之, 佐藤亜樹子, 中垣祐, 中沢大悟, 石川康暢, 柴崎跡也, 渥美達也: 道内の透析施設に対するC型慢性肝