

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 循環病態内科学分野 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がんの予後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。その準備として昨年度は、**1）マウス α -GalCer/DCの有効性の確認、2）ヒト α -GalCer/DCの規格決定および品質・安全性試験（GMP基準）と効力の確認、3）ヒト α -GalCer/DC（細胞製品）の製造体制の整備（GLP基準）**の3点について研究を遂行し、その概略は前回報告した通りである。今年度は引き続き下記について研究を遂行した。

4）ヒト α -GalCer/DCの心筋梗塞後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）：アフエ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発現割合をもとに定めた「規格試験」に適合する最終製品あるいはvehicleを、冠動脈を結紮して心筋梗塞を作成したマウスに手術後1日目および4日目に経静脈投与し、4週間飼育した。4週間の生存曲線、4週後の心エコー、血行動態測定、心・肺重量、非梗塞部心筋組織を評価し、ヒト α -GalCer/DCの心不全におよぼす効果を検討した。

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虚血後、結紮解除して再灌流を行った。虚血エリアに対する梗塞サイズの割合はVehicle投与群に比し α -GalCer/DC投与群で有意に抑制された。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）と効力の確認：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、ヒト α -GalCer/DCを作製した。最終製品は培養前に比し樹状細胞マーカー発現が亢進していた。最終製品を 3×10^5 個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。

4) ヒト α -GalCer/DC の心筋梗塞後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): アフェ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、 α -GalCer/DC を作製した。規格試験に適合する最終製品 (ヒト α -GalCer/DC) 3×10^6 個あるいは vehicle を心筋梗塞後心不全マウスに静脈内投与したところ、最終製品投与群では vehicle 投与群に比し心筋梗塞作成後 4 週間までの死亡率が有意に改善した。さらに、最終製品投与群で生存したマウスの左室拡張末期径および収縮末期径は縮小し、左室短縮率は有意に増加し、また左室拡張末期圧も有意に低下していた。

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・安全性に加えて、規格試験に適合したヒト α -GalCer/DC (最終製品) の心不全モデルに対する有効性・安全性が確認された。現在マウスを用いた非臨床安全性試験 (反復投与毒性試験および安全性薬理試験、造腫瘍性試験) の準備を進めているが、今後はこれらの試験結果をもとに 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) を進めてゆく予定でいる。

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. 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* 36:1341-1346, 2013
2. Homma T, Kinugawa S, Takahashi M, Sobirin MA, Saito A, Fukushima A, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Masaki Y, Furihata T, Taniguchi M, Nakayama T, Ishimori N, Iwabuchi K, Tsutsui H: Activation of invariant natural killer T cells by α -galactosylceramide ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *J Mol Cell Cardiol* 62:179-188, 2013
3. Takada S, Kinugawa S, Hirabayashi K, Suga T, Yokota T, Takahashi M, Fukushima A, Homma T, Ono T, Sobirin MA, Masaki Y, Mizushima W, Kadoguchi 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* 114:844-857, 2013
4. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Yokota T, Matsushima S, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Katsuyama R, Oba K, Okita K, Tsutsui H: Decreased serum brain-derived neurotrophic factor levels are correlated with exercise intolerance in patients with heart failure. *Int J Cardiol* 168: e142-4, 2013
5. Fukushima A, Kinugawa S, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Abe T, Suga T, Takada S, Kadoguchi T, Okita K, Matsushima S, Tsutsui H: Increased plasma soluble (pro)renin receptor levels are correlated with renal

dysfunction in patients with heart failure.

Int J Cardiol 168:4313-4314, 2013

2. 学会発表

1. Tsutsui H: Role of Innate Immunity in Cardiac Inflammation. American Heart Association 2013, 2013年11月20日, Dallas Convention Center (Dallas, America)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

(特願 2014-036070)

平成 26 年 2 月 26 日特許出願

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし