

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ヘ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2013-2014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（GLP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（治験薬GMP基準）、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の確認（非臨床試験）**の4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。

5）ヒト α -GalCer/DCの安全性の確認（GLP基準）：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の作製は治験薬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生理食塩水を、GLP基準下でヌードマウスに1週間間隔で2回経静脈反復投与後4週間飼育観察し、ヒト α -GalCer/DCの毒性（生存、心毒性、体重減少、血液障害、感染症、肝障害、腎障害、神経障害など）を検討した。さらに、最終製品の安全性を確認するため、GLP基準下で詳細な副作用（急性投与、慢性投与下での血液障害、感染症、肝障害、腎障害、神経障害など）についても検討した。また、最終製品の造腫瘍性に関しては、核型分析及び軟寒天コロニー形成試験をGLP基準下で実施した。

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（GLP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 (治験薬 GMP 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の確認 (非臨床試験): 健常人より分離し、製造手順に沿って作製したヒト 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 週後までの死亡率は有意に改善し、左室拡張末期径・収縮末期径は縮小、左室短縮率は増加し、左室拡張末期圧も有意に低下していた。

5) ヒト α -GalCer/DC の安全性の確認 (GLP 基準): 健常人より分離し、製造手順に沿って作製したヒト α -GalCer/DC 2×10^7 個あるいは生理食塩水をヌードマウスに 2 回反復投与したが、全観察期間における死亡例は認めず、血液障害、感染症、肝障害、腎障害、神経障害などに関して GLP 基準下に病理組織学的検討を行ったが、最終製品反復投与による毒性を示唆する所見は認めなかった。また、核型分析及び軟寒天コロニー形成試験も GLP 基準下で実施したが、最終製品反復投与による造腫瘍性を示唆する所見も認めなかった。

D. 考察

これまでの研究より、ヒト α -GalCer/DC の規格決定や、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・安全性に加えて、マウスを用いた非臨床安全性試験 (反復投与毒性試験、安全性薬理試験、および造腫瘍性試験) など、GLP 基準下で実施した非臨床試験の結果から、最終製品に関する安全性が確認された。今後はこれらの結果をもとに、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、First-in-Human 試験実施に向けて、計画の策定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。また、GLP 遵守非臨床試験によるヒト α -GalCer/DC の安全性も確認され、品質・規格および製造体制も整備された、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ことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Matsushima S, Sakakibara M, Ishimori N, Goto D, Tsutsui H: Hyponatremia is an independent predictor of adverse clinical outcomes in hospitalized patients due to worsening heart failure. *J Cardiol.* 63(3):182-188, 2014
2. Hamaguchi S, Kinugawa S, Tsuchihashi-Makaya M, Goto D, Tsutsui H: Weekend versus weekday hospital admission and outcomes during hospitalization for patients due to worsening heart failure: a report from Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Heart Vessels.* 29(3):328-335, 2014
3. Imamura T, Kinugawa K, Ohtani T, Sakata Y, Higo T, Kinugawa S, Tsutsui H, Sunagawa K, Komuro I: Assessment of quality of life during long-term treatment of tolvaptan in refractory heart failure: design and rationale of the AQUA-TLV study. *Int Heart J.* 55(3):264-267, 2014
4. Hamaguchi S, Kinugawa S, Matsushima S, Fukushima A, Yokota T, Sakakibara M, Yokoshiki H, Tsuchihashi-Makaya M, Tsutsui H; JCARE-CARD Investigators: Clinical

characteristics and CHADS2 score in patients with heart failure and atrial fibrillation: Insights from the Japanese Cardiac Registry of Heart Failure in Cardiology (JCARE-CARD). *Int J Cardiol.* 176(1):239-242, 2014

5. Fukushima A, Kinugawa S, Takada S, Matsushima S, Sobirin MA, Ono T, Takahashi M, Suga T, Homma T, Masaki Y, Furihata T, Kadoguchi T, Yokota T, Okita K, Tsutsui H: (Pro)renin receptors in the skeletal muscle is involved in the development of insulin resistance associated with post-infarct heart failure in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 307(6):E503-514, 2014
6. Hirabayashi K, Kinugawa S, Yokota T, Takada S, Fukushima A, Suga T, Takahashi M, Ono T, Morita N, Omokawa M, Harada K, Oyama-Manabe N, Shirato H, Matsushima S, Okita K, Tsutsui H: Intramyocellular lipid is increased in the skeletal muscle of patients with dilated cardiomyopathy with lowered exercise capacity. *Int J Cardiol.* 176(3):1110-2, 2014

2. 学会発表

1. Saito A, Ishimori N, Nishikawa M, Kinugawa S, Tsutsui H: Circulating invariant natural killer T cells are decreased in patients with chronic heart failure. American Heart Association 2014, 2014 年 11 月 17 日, Chicago Convention Center (Chicago, America)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

名称：樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

発明者：筒井裕之・絹川真太郎・石森直樹・斎藤晶理

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2015/055547

出願年月日：2015 年 2 月 26 日

国内外の別： 国外

名称：樹状細胞を含有する医薬およびその製造方法

発明者：筒井裕之・絹川真太郎・石森直樹・斎藤晶理

権利者：同上

種類：特許

番号：2014-36070

出願年月日：2014 年 2 月 26 日

国内外の別： 国内

2. 実用新案登録 該当なし

