

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))
総括研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発

研究代表者 平野賢一 大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学 助教

研究要旨

研究代表者らにより提唱された新規疾患概念である中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)(Hirano K, et al. N Engl J Med, 2008)に対して「中鎖脂肪酸含有医薬品(治験薬コード CNT-01)の開発」が本研究の目的である。非臨床段階(ステップ1)の3年目にあたる本年度は、医薬品医療機器総合機構(PMDA)による対面助言を基に、GLP 基準下での毒性試験、安全性薬理試験などを実施し、CNT-01 の安全性を評価した。代表研究者所属機関附属病院薬剤部に製造設備を構築し、GMP 基準下での治験原薬製造を行った。また、これまで6年間の研究班の成果をまとめ、TGCV の診断のてびき(初版)を作成、公開した。First-in-human 試験として、特発性 TGCV を対象とする第 I/IIa 相試験を実施するため、その治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書を作成、所属研究機関附属病院において、利益相反委員会、治験審査委員会での承認を経て、治験届を提出、臨床段階(ステップ2)に入った。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

青江 秀史	大阪大学知的財産センター センター長
稲葉 亨	京都府立医科大学感染制御・検査医学教室 講師
植田 初江	国立循環器病研究センター病院病理部 部長
江副 幸子	大阪大学医学部附属病院未来医療センター 講師
加藤 良仁	興和創薬株式会社学術部大阪学術課 課長
恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授
小澤 純二	大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学 助教
小谷 順一	大阪大学大学院医学系研究科内科学講座 循環器内科学 特任講師
小林 邦久	福岡大学筑紫病院内分泌・糖尿病内科 教授
財満 信宏	近畿大学農学部応用生命化学科 講師
杉村 宏一郎	東北大学大学院医学系研究科循環器内科学 助教
瀬川 波子	福岡大学医学部医学科生化学 准教授
高木 敦子	国立循環器病研究センター研究所分子薬理部構造機能研究室 室長

田嶋 祥子	興和株式会社医薬事業部製品戦略部
谷本 昭英	鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子細胞病理学 教授
内藤 博昭	国立循環器病研究センター病院 病院長
長澤 康行	兵庫医科大学内科学腎・透析科 講師
中村 浩士	山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授
羽尾 裕之	兵庫医科大学病院病理部 准教授
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻生体工学領域 准教授
間賀田 泰寛	浜松医科大学メディカルフォトンクス研究センター 教授
安井 洋子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 准教授
安野 哲彦	福岡大学医学部腎臓・膠原病内科 助教
山田 壮亮	産業医科大学第2病理学 講師

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)は、心筋および冠状動脈に中性脂肪(以下、TG)が蓄積する結果、青年～壮年層において重症心不全、不整脈、冠動脈硬化症を来す、予後の極めて悪い疾患である。原発性TGCVの原因として、細胞内TG分解の必須酵素である adipose triglyceride lipase (ATGL)の遺伝的欠損が知られており、その病態形成として心筋細胞内TG含量の増加が関与しているものと考えられている。また、本研究班による剖検心の解析から遺伝的原因が未だ明らかでない特発性TGCVも存在する。本研究の目的は、TGCVに対する中鎖脂肪酸を主成分とする医薬品(治験薬コードCNT-01)を開発することである。

B. 研究方法

1) GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験の実施

ラット、イヌの血漿中濃度測定法バリデーション、ラットおよびイヌ4週間反復投与毒性試験、無麻酔イヌに対する心血管に及ぼす影響、ラットに対する呼吸系、神経系に対する影響、hERG試験、ラット小核試験、復帰突然変異試験、ほ乳類細胞における染色体異常試験、ラット経口投与後の吸収分布排泄試験、ラット胚胎児発生試験、原薬の品質試験など、非臨床試験を順次実施する(加藤、田嶋)

2) 医師主導治験の実施計画書等の作成、治験審査委員会(IRB)への申請、治験届提出

上記GLP基準下の各種試験成績やPMDAによる対面助言による指示のもと、治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書などを作成し、所属研究機関附属病院において、利益相反委員会、IRBでの承認を経て、治験届を提出する(平野、加藤、田嶋)

3) GMP 基準下での治験原薬製造技術移転

GMP 基準下での治験原薬製造は大阪大学医学部附属病院薬剤部にて行うこととし、製造技術を薬剤部内 GMP 製造施設に技術移転したのち、治験薬原薬製造システムを立ち上げる(平野)

4) 治験原薬 GMP 製造

大阪大学医学部附属病院薬剤部において、GMP 基準下治験原薬の予備製造を行う。(平野)

5) 診断基準の作成、公開

原発性 TGCV のスクリーニングに有用と思われる末梢血を用いた簡便な検査法の開発を目指す(稲葉、江副)。冠動脈血管内イメージング検査法や心臓シンチグラム検査(BMIPP)を用いた TGCV の新しい評価方法を開発する(小谷、小林、内藤、羽尾、間賀田)。これら画像診断による検討と同時に病理学的、生理学な検討も行い(植田、小林、財満)。臨床的意義について検討する。これらの研究成果を反映した「TGCV 診断基準(初版)」を策定し公開する(平野、小林、中村、長澤)。

6) 末梢血多核白血球の細胞内リパーゼ活性測定系の開発

TGCV の診断及び、治験の際の評価項目の一つとするため、末梢血多核白血球を用いたリパーゼ活性測定系を開発する(高木)。

7) CNT-01 の体内動態、薬効薬理試験
放射性標識脂肪酸誘導体を用いた薬物動態、CNT-01 を用いて野生型マウス、ATGLKO マウスへの薬効薬理について検討する(間賀田、瀬川、平野)

8) 健常人における中鎖脂肪酸濃度の検討

研究協力者 大分大学 臨床薬理センター
今井浩光先生らとともに、健常人における中鎖脂肪酸濃度を検討する(恵)。

9) TGCV 国際登録システムの活用促進
研究班では、昨年度から TGCV および中性脂肪蓄積症(Neutral lipid storage disease, NLSLD)の国際的な症例登録システムを構築し、その運用を開始している。今年度はその利用を促進することを目的として、第3回 TGCV/NLSLD 国際シンポジウムを開催し、各国の研究者との情報共有を行う。(平野)

10) 本研究班における知的財産の整備を行う(青江)。

(倫理面への配慮)

本研究に関与するすべての者は、「世界医師会ヘルシンキ宣言(2008年ソウル修正版)」および「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日改訂版)」に従う。

C. 研究結果

1) GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験の実施

CNT-01 の血中での有効成分であるカプリン酸の血中濃度測定技術を、測定受託

業者に技術移転した。これにより毒性試験における血中濃度の定量が可能となり薬物動態の評価が可能となった(恵)。続いて、治験実施に向けて必要な各種非臨床 GLP 試験を実施し、高用量(無毒性量 1,000mg/kg 以上)でも CNT-01 の安全性が確認しえた(加藤、田嶋)。

2) 医師主導治験の実施計画書等の作成、IRB への申請、治験届提出
PMDA による対面助言に基づいて、First-in-human 試験として特発性 TGCV を対象とする第 I/IIa 相試験を計画し、その治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書などを作成した。所属研究機関附属病院における利益相反委員会、治験審査委員会 (IRB) での承認を経て治験届を提出し、PMDA からの照会事項にも対応した(平野、加藤、田嶋)。

3) GMP 基準下での治験原薬製造技術移転、製造設備の立ち上げ
GMP 基準下での治験原薬製造は大阪大学医学部附属病院薬剤部にて行うこととし、製造技術を薬剤部内 GMP 製造施設に技術移転したのち、治験薬原薬製造システムを構築した(平野)。

4) 治験原薬 GMP 製造
大阪大学医学部附属病院薬剤部において、GMP 基準下治験原薬の予備製造を行った。当初の計画通りの製造を行うことができたことにより、治験薬原薬製造システムの性能を確認した。(平野)

5) 診断基準の作成、公開

TGCV 症例に認められる多核白血球の空胞化に着目して、末梢血塗抹標本を詳細に観察、自動血液分析装置での本症のスクリーニング検査法の開発に向け、検討を重ねている。(稲葉、江副)。冠動脈イメージング検査法(定量的冠動脈 CTA 法(NCVC システム)等)や心臓シンチグラム検査(BMIPP)が、TGCV の診断基準の一項目になりうるか検討を重ねた。(小谷、小林、内藤、羽尾、間賀田)。また、剖検組織を用いた病理学的検討(植田、財満)も行い、臨床的意義について検討した。これまでの6年間の厚労省難病 TGCV 研究班の研究成果をまとめ「TGCV 診断基準(初版)」を策定し、平成 27 年 3 月 14 日に公開した(平野、小林、中村、長澤)。

6) TGCV 国際登録システムの活用促進
研究班では、昨年度から TGCV および中性脂肪蓄積症(Neutral lipid storage disease, NLSD)の国際的な症例登録システムを構築し、その運用を開始している。今年度はその利用を促進することを目的として、国内外の専門家、研究者の参加を得て第 3 回 TGCV/NLSD 国際シンポジウムを開催した。各国の研究者との情報の共有化を行い、国内治験ののちのグローバル治験実施の基礎を構築した。また、症例登録システムの利用推進もなされ、海外の症例登録数を増加させることに成功した。(平野)

7) 健常人における中鎖脂肪酸濃度の検討

研究協力者 大分大学 臨床薬理センター
今井浩光先生らとともに、健常人 100 名の、血中、中鎖脂肪酸の濃度を測定した。わが国の健常人ボランティアでは、約半数が検出感度以下であった(恵)。

8) TGCV モデル動物の開発とそれらを用いた薬効薬理試験(山田、谷本)

TGCV で生じる冠動脈求心性狭窄のメカニズムは明らかになっておらず、原発性 TGCV モデル動物である ATGL KO マウスにおいて通常では血管病変は認めないが、我々は動脈壁の外膜側からカフ刺激を加えることにより、TG 蓄積動脈硬化マウスモデルを作成することに成功している。このモデル動物を使い、CNT-01 投与において血管病変に与える影響を検討したところ、ATGL 欠損による脂質代謝異常が血管外膜側からの刺激を誘発している可能性を見出した。

また、昨年度から引き続き、マイクロミニプタ(MMP)を用いた特発性 TGCV モデル動物の開発を行っている。(谷本)
ストレプトゾシン(STZ)を用いて MMP を糖尿病化することに成功しており、今後は CNT-01 投与による心血管系への中性脂肪蓄積に対する影響を検討していく。

9) 細胞内カプリン酸の動態評価とメタボローム解析

ATGL 欠損症由来皮膚線維芽細胞を用いて、非線形ラマン散乱顕微鏡により、重水素標識した中鎖脂肪酸の細胞内動態の観察、中鎖脂肪酸添加が及ぼす細胞内脂

質動態の変化を検討したところ、脂肪酸鎖長による代謝経路の違いがあることを示唆する結果を得た(橋本)。

10) 末梢血多核白血球の細胞内リパーゼ活性測定系の開発

ATGL 活性やタンパク量を特異的に測定できる系の確立を目指している。今年度は、ATGL に対する中和抗体の作成を行った(高木)。

11) 放射性標識脂肪酸誘導体を用いた薬物動態試験

放射性同位体で標識した C11 標識カプリン酸、C11 標識カプリン酸 TG を用い、マウスにおける吸収・代謝・分布・排泄について検討した。C11 標識カプリン酸は投与初期に心筋に高く取り込まれることが示された(間賀田)。

12) CNT-01 を用いた薬効薬理試験(非 GLP)

野生型マウス小腸由来リポ蛋白に与える影響について検討、アポ B 含有リポ蛋白の産生低下が明らかになった(瀬川)。
ATGL KO マウスの寿命と CNT-01 の投与量との間に、線形性が確認しえた(平野)。

13) 中鎖脂肪酸食事療法継続中の

TGCV 症例の継続的評価、栄養指導
在宅で中鎖脂肪酸食事療法継続中の TGCV の 2 症例を対象とし、在宅での食事療法の効果とその問題点について検討した(杉村、安井)。

14) TGCV 類縁疾患症例の解析
大阪及び九州において、類縁疾患と考えられる症例を見出した(小澤、安野)。

15) 本研究班における知的財産の整備
本研究の過程で生じる様々な知的財産の整備について検討した(青江)。

D. 考察

中鎖脂肪酸含有医薬品を開発し治験開始を目指している本研究は、本年度が非臨床段階(ステップ1)の3年目にあたる。必要な非臨床試験は全て実施され、問題はなかった。研究は順調に進み、First-in-human 試験の治験届を提出して、臨床段階(ステップ2)に入ることができた。これと同時に、糖尿病性 MMP の開発(谷本)や ATGL 欠損マウスを用いた血管障害カフモデルの開発(山田)といった動物モデルを用いた基礎的研究も引き続き行い、CNT-01 の作用メカニズムを詳細に明らかにしたいと考えている。

E. 結論

TGCV に対する診断法の確立のため様々な新規検査法の開発を進め、この結果を盛り込んだ「TGCV 診断基準(初版)」を策定し、平成 27 年 3 月 14 日、「TGCV 診断の手引き」を公開した。「中鎖脂肪酸含有医薬品(治験薬コード CNT-01)の開発」は順調に進捗した。必要な GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験を実施したのち、医師主導治験の実施計画書等を作成して IRB へ申請し、治験実施が承認された。GMP 基準下での治験原薬の製造システムの構築も終了し、治験原

薬の予備製造も問題なく完了した。治験実施に向けて準備を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirano K, Ikeda Y, Sugimura K, Sakata Y Cardiomyocyte steatosis and defective washout of iodine-123-b-methyliodophenyl-pentadecanoic acid in genetic deficiency of adiposetriglyceride lipase
Eur Heart J 36: 580 2015

Higashi M, Hirano K (equal contribution), Kobayashi K, Ikeda Y, Issiki A, Otsuka T, Suzuki A, Yamaguchi S, Zaima N, Hamada S, Hanada H, Suzuki C, Nakamura H, Nagasaka H, Miyata T, Miyamoto Y, Kobayashi K, Naito H, Toda T. Distinct cardiac phenotype between two homozygotes born in a village with accumulation of a genetic deficiency of adipose triglyceride lipase. Int J Cardiol. 192: 30-32, 2015.

Shrestha R, Hui SP, Imai H, Hashimoto S, Uemura N, Takeda S, Fuda H, Suzuki A, Yamaguchi S, Hirano K, Chiba H
Plasma capric acid concentrations in healthy subjects determined by UV-labeled HPLC. Ann Clin Biochem. 2015 Jan 13. pii: 0004563215569081.

Ikeda Y, Zaima N, Hirano K, Mano M, Kobayashi K, Yamada S, Yamaguchi S, Suzuki A, Kanzaki H, Hamasaki T, Kotani J, Kato S, Nagasaka H, Setou M, Ishibashi-Ueda H

Coronary triglyceride deposition in contemporary advanced diabetics
Pathol Int 64(7) 325-335 2014

Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, Kobayashi K, Nakamura H, Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, Hui SP, Toda T, Kuroda H, Chiba H, Hirano K

Peripheral leucocytes' anomaly detected with routine automated hematology analyzer sensitive to adipose triglyceride lipase deficiency manifesting neutral lipid storage disease with myopathy/triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.
Mol Genet Metab Rep. 1 249-253 2014 .

Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M
A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.
Neuromuscl Dis 24 634-641 2014

Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri

Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K

Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique
J Lipid Res. 55(5) 905-918 2014

Shimizu K, Ogura H, Wasa M, Hirose T, Shimazu T, Nagasaka H, Hirano K
Refractory hypoglycemia and subsequent cardiogenic shock in starvation and refeeding: report of three cases.
Nutrition. 30(9) 1090-1092 2014

Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T
Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy
Orphanet J Rare Dis. 8(1) 197 2013

Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M

Genetic mutations in the adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor-gamma

in patients with triglyceride deposit
cardiomyovasculopathy.
Biochem Biophys Res Commun. 443(2)
574-579 2014

Ikeda Y, Hirano K (equal contribution),
Fukushima N, Sawa Y
A novel type of human spontaneous
coronary atherosclerosis with
triglyceride deposition
Eur Heart J. 35(13) 875 2014.

2. 学会発表

・平野賢一

「中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖
脂肪酸を含有する医薬品の開発」
第36回心筋生検研究会・2014/11/28・29
ウイックあいち(愛知県産業労働センタ
ー)

・鈴木朗、和田淳、長坂博範、越智康浩、
千葉仁志、恵淑萍、平野賢一
「中性脂肪蓄積心筋血管症における
Jordans' anomaly を自動血球分析装置で
検出する」

・和田淳、鈴木朗、山本志緒里、越智康
浩、恵淑萍、千葉仁志、平野賢一
「他項目自動血球分析装置
XE-5000 WBC/BASO チャンネルによる、
中性脂肪蓄積心筋血管症判別原理の検
証」

・恵淑萍、シュレスタ ロジート、平野
賢一、鈴木朗、千葉仁志
「中鎖脂肪酸の HPLC 法による定量分

析」
第61回日本臨床検査医学会学術集
2014/11/22～25 福岡国際会議場

・恵淑萍、Rojeet Shrestha、平野賢一、
鈴木朗、千葉仁志
「機能性脂肪酸に関する分析」
第21回日本未病システム学会 学術総
会
2014/11/1・2
千里ライフサイエンスセンター

・恵淑萍、ロジート シュレスタ、平野賢
一、鈴木朗、千葉仁志
「LC/MS による誘導体化脂肪酸の分析」
第39回日本医用マススペクトル学会年会
2014/10/16・17 三井ガーデンホテル千葉

・ロジート シュレスタ、恵 淑萍、
平野賢一、鈴木朗、千葉仁志
「HPLC 法によるカプリン酸の定量分
析」
第94回北海道医学大会 2014/10/4
札幌グランドホテル グランドホール

・原康洋、佐野聖三、橋本裕希、川崎直
子、
平野賢一、鈴木朗、山口知是、朝長毅
「ATGL ノックアウトマウス心筋のプロ
テオーム解析」 日本ヒトプロテオーム
学会 2014/7/17・18 つくば国際会議場

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