

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591053

研究課題名(和文) 閉塞性動脈硬化症に対する単核球移植とアドレノメデュリン併用療法

研究課題名(英文) Combination revascularization therapy using peripheral mononuclear cell and adrenomedullin for patients with peripheral artery disease

研究代表者

北 俊弘(Kita, Toshihiro)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：70315365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢動脈疾患患者で、血行再建術の適応とならない重症虚血下肢を対象として、末梢血単核球移植術とアドレノメデュリン持続静注(1.5 pmol/kg/min×8時間/日を2週間)併用療法の有用性を検討した。治験はプラセボ対照二重盲検試験とし、実薬2例、プラセボ2例の試験を実施したが、1年以上追跡できたのは各群1例であった。アドレノメデュリン併用群では1年6ヶ月にわたり有効性が持続した。プラセボ群の1例は1年間有効性が持続したが、1例は早期に足切断に至った。本試験は少数例に留まり十分な評価を行えなかったが、得られた知見は現在進行中のアドレノメデュリンを使用した医師主導治験の計画作成に大きく寄与した。

研究成果の概要(英文)：We assessed effectiveness of combination therapy that consisted with therapeutic revascularization using peripheral mononuclear cells and continuous infusion of adrenomedullin (AM) (1.5 pmol/kg/min X 8 hr/day for 2 weeks) for severe ischemic limb of patients with peripheral artery disease who had not responded to conventional therapy. We conducted a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Four patients, 2 with AM and 2 with placebo, were treated and one patient in each group was followed over 1 year. Favorable effect was continued for 1 year and 6 months in patient with AM. In placebo group, 1 patient sustained therapeutic effect for 1 year, but another 1 patient underwent foot amputation within several months.

We cannot conducted enough evaluation from small number of the patients, but we collected valuable experience and knowledge through the trial, and the information is contributed as a base of the plan in investigator initiated trials using AM which is now in progress.

研究分野：循環器内科学

キーワード：循環器 再生医療 アドレノメデュリン 末梢血単核球移植術 臨床

### 1. 研究開始当初の背景

急速な高齢化により閉塞性動脈硬化症 (ASO) 患者が急増しており、従来の血行再建術や薬物療法の限界を超える重症虚血下肢に苦しむ患者も増加している。このような患者に対して有効性が確立した治療法はなく、自然経過では下肢切断、さらに死亡にいたる場合も少なくなく、新たな治療法が求められている。一方で、成人末梢血中の単核球分画に血管内皮細胞に分化しうる内皮前駆細胞の存在が報告され、下肢虚血動物モデルへの骨髄由来単核球細胞移植により血管新生と血流増加が確認された。その後、重症虚血下肢患者に対して、骨髄単核球移植による血管再生療法の有効性が報告された。ただし、虚血性心疾患など多くの動脈硬化病変を抱える患者には侵襲が大きく、十分な細胞数を確保し、移植細胞の機能を保つことは困難な場合が多い。そこでより侵襲の少ない末梢血単核球移植術が考案されたが、治療効果がやや低いとされている。最新の報告で、末梢血単核球移植術にも確実な効果があることが確認されたが、一方で透析患者などの動脈硬化が進行した患者では有効性が低いことも明らかとなった。

生理活性ペプチドであるアドレノメデュリン (AM) は、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞のアポトーシスを強力に抑制し、加えて血管新生作用、血管拡張作用がある。AM は強力な血管拡張作用に加え、上記の血管保護作用によって、移植単核球細胞が骨格筋内に定着し、内皮化・血管新生を引き起こすことで、細胞移植治療効果が増強させる可能性がある。実際、下肢虚血ラットに AM 投与下で単核球を移植すると血管新生・血管再生効果が増強された。また、国立循環器病センターで重症虚血下肢患者 (ただしバージャー病主体) に対し、末梢血単核球移植 + AM 局所 (下肢) 皮下注療法のパイロット試験が実施され、良好な結果が得られている。我々は AM を臨床応用すべく、健常者を含めて多くの対象者に AM 持続静注を行い、血行動態やホルモンの反応を検討しており、多くの経験とデータを有している。そこで、ASO による重症虚血下肢に対する末梢血単核球移植 + AM 持続静注法を考案し、予備試験を経て今回のプロトコルを完成した。本プロトコルは AM 全身投与による血圧低下などの副作用を最小限に抑えつつ、AM の効果を最大限発揮できるように工夫されている。加えて、末梢血単核球移植を全例に行うことで、クリティカルな状況にある ASO 患者に、無用な負荷をかけて病変を進行させてしまう危険を回避でき、倫理的な問題が少ない。

### 2. 研究の目的

本研究では ASO による重症虚血下肢に対する末梢血単核球移植 + AM 持続静注法の有効性、安全性を検証することを目的とする。治療の性質上、厳格な評価が不可欠であり、対

象となる ASO 患者全員に末梢血単核球移植による治療を行い、その後、無作為二重盲検法により AM またはプラセボを 2 週間持続静注する。これを 1 クールとして、連続 2 クールを実施し、治療後 6 ヶ月後の時点での効果と、すべての有害事象を第一評価項目とする。なお、最低治療後 1 年間は追跡を継続する。加えて、治療前後での炎症マーカー、各種サイトカイン、VEGF、酸化ストレスマーカー等の経過を調査し、どのような指標が治療効果と関連があるかを検討する。

### 3. 研究の方法

重症閉塞性動脈硬化症 (ASO) により QOL が阻害され、血行再建術の適応と判断されない、安静時疼痛、皮膚潰瘍または 200 m 未満の歩行でも下肢の疼痛が出現する患者を対象とする。文書による同意を得たのち入院し、血管新生因子である末梢血単核球細胞移植を行い、その後無作為二重盲検法によりアドレノメデュリンとプラセボ群に振り分け、合成ヒトアドレノメデュリン又はプラセボを 2 週間持続静注する。同様のプロトコルを 2 回連続して実施し、全体で 4 週間の治療を実施する。その後、外来にて自覚症状、下肢血流状態などの経過を観察し、術後 6 ヶ月の時点で効果判定を行う。ただし、外来経過観察は 1 年間以上継続し、効果と共に有害事象の有無を評価する。効果の主要評価項目は疼痛の軽減、皮膚潰瘍の縮小ないし治癒、痛みが出るまでの歩行距離と最大歩行距離によって行い、副次項目として ABI/TPI、皮膚灌流圧、経皮酸素分圧、鎮痛薬の使用の有無などを評価する。加えて、治療前後での炎症マーカー、各種サイトカイン、VEGF、酸化ストレスマーカー等の経過を調査し、どのような指標が治療効果と関連があるかを検討する。対象症例数は各群 10 例の 20 例とし、全例が 6 ヶ月の経過観察終了時に臨床試験全体の評価を実施する。

#### 【臨床試験プロトコル】

##### 選択基準

患者本人から文書による同意が得られること

同意取得時の満年齢が 20 歳以上の者

血管造影、CT-angiography または MRA により、投与対象肢の浅大腿動脈、膝窩動脈または膝窩動脈以下に閉塞または狭窄部位があり、その閉塞・狭窄に起因する安静時疼痛、虚血性潰瘍または 200 m 未満の間歇性跛行を有している者

投与対象肢に対して一般に血行再建術の適応と判断されないもの (血行再建術の適応があればまずそれを実施し、その後も症状が残存すれば血管新生療法を考慮する)

**除外基準:** 以下の基準に 1 つでも該当する症例は除外とする

悪性腫瘍を有する患者

肝機能不全症を有する患者

同意日 1 ヶ月以内に急性心筋梗塞、不安定狭心症、心筋炎、脳梗塞に罹患した患者  
活動性の感染症を有する患者  
妊婦または妊娠している可能性のある患者

増殖糖尿病網膜症（未治療の増殖網膜症、中期・晩期増殖網膜症）を有する者（治療終了例は除く）

その他、担当医師が不相当と判断した患者

### 治療法

治療当日に、専用アフェレーシス機器（Cardian BCT 社製）にて末梢血単核球 100 億個を収集し、遠心調整後に、同日、手術室で全身麻酔下に患者患肢の 50-100 か所に分割して筋注する（千葉大学方式に準拠）。翌日より合成ヒトアドレノメデュリン 250  $\mu\text{g}/\text{日}$ （1.5 pmol/kg/min の速度で 8 - 10 時間かけて div）又はプラセボを経静脈的に 2 週間連続投与する。血圧、脈拍数をモニターし、患者の状況（血圧が規定以上に低下した場合など）によっては患者の安全を優先し、投与スピードを遅くする場合がある。

投与試薬は薬剤部で調整し、AM/プラセボが 1 : 1 になるように無作為に振り分け、実施者、患者ともにどちらの薬剤が投与されているかは分からないように配分する。

本治療は、同じ薬剤の割り付けのまま、同じプロトコルで 2 回連続して実施し、合計 4 週間の治療を行う。

4 週間の治療終了後、有害事象がみられなければ、外来での経過観察に移行する。

### 評価項目

治療効果の評価は治療 1 ヶ月、2 ヶ月、3 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月後に実施し、6 ヶ月後の効果を第 1 評価とする。

< 有効性 >

#### 主要評価項目

登録時 Fontaine 分類に応じた症状の改善率

- Fontaine IV 度の被験者：潰瘍の大きさの変化率
- Fontaine III 度の被験者：疼痛分類、VSA による疼痛の程度の変化
- Fontaine IIb 度の被験者：トレッドミルでの疼痛出現時間、最大歩行時間（距離に換算）の変化

#### 副次評価項目

皮膚灌流圧、鎮痛剤使用の有無、QOL、ABPI/TPI、血管造影、経皮酸素分圧

< 安全性 >

有害事象（投与対象肢の切断を含む）、副作用、臨床検査値

## 4. 研究成果

### 研究用製剤の作成と割付

合成ヒトアドレノメデュリンは、株式会社ペプチド研究所で医薬品製造と同等の基準（Good Manufacturing Practice: GMP）にて合成されたものを原末として購入した。宮崎大学医学部附属病院薬剤部にて、AM を秤量後に 3.75%マンニトール溶液に溶解し、滅菌フ

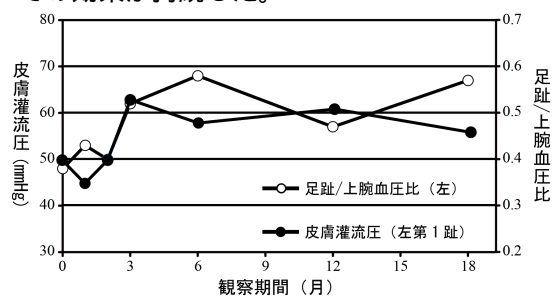
ィルターにて無菌化した後、バイアルに封入した（1V あたり 250  $\mu\text{g}/2.5 \text{ ml}$ ）。肉眼による異物検査を行い、-30 にて凍結保存した。プラセボ製剤は 3.75%マンニトールを同様の手順で滅菌し、バイアルに封入した（1V あたり 2.5 ml）。

独立した割付責任者が AM とプラセボが識別不能であることを確認後に、AM とプラセボを 1 : 1 の比率となるように割付けた試験薬を 20 セット（1 患者あたり 14 本を 1 セットとする）作成し、セットに付された番号順に試験に使用した。割付表は試験完了まで割付責任者が保管した。

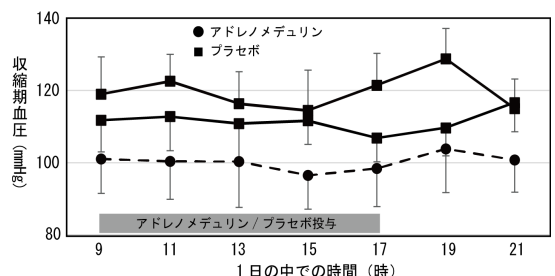
### 臨床研究の実施

試験開始後 4 名の患者に治療を実施したが、その後集患が難しくなり、プラセボ対照試験であることを理由に試験参加を拒否する患者が続いたため、実薬のみを投与するオープン試験に変更することにした。これに伴い、コード開封の結果、2 名に AM が、2 名にプラセボが使用されていた。最終年度に 2 名の患者（AM とプラセボ併用各 1 名）の最終追跡調査を行い、AM 併用患者では症状、血流指標等の改善が 1 年 6 ヶ月にわたり持続していた。他の 2 名のうち、プラセボを併用した患者は、末梢血単核球移植術後に病状が一時改善したが、数か月もせずに病状悪化し、最終的に足部の切断に至った。他の 1 名（AM 併用）は、患者都合により早期離脱し、追跡調査が実施不能となった。

1 年 6 か月追跡した AM 併用患者は安静時にも足部のしびれ感を訴えていたが、今回の併用療法により自覚症状は著明に改善した。また、図のように他覚的検査所見も改善し、その効果が持続した。



試験薬投与 14 日間の血圧を平均して比較したところ、AM およびプラセボ投与により血圧は有意な変化をみせず、血圧変化より AM とプラセボ投与を判別することはできないことが確認された。



末梢血単核球移植により VEGF や各種サイトカインは既報と同じように変化したが、AM 投与によりこれらの指標が影響を受けることはなかった。

#### 結果の総括

今回の研究では、少数の症例しか登録できず、AM 併用の有効性を十分に評価することはできなかった。ただし、長期に評価できた症例の治療効果は満足すべきものであった。

例えば、AM とプラセボの二重盲検試験を行う際に血圧変化から両者の投与が判明する可能性が低いことなど、今回の研究を通して得られた知見は非常に有用である。これらの知見は、現在プロジェクトマネージャーとして進めている医師主導治験（難治性炎症性腸疾患を対象としたアドレノメデュリン製剤による医師主導治験）において、プロトコル立案から実施可能な試験のための患者選択などを考慮するための基礎となっている。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

##### 〔雑誌論文〕(計3件)

1. Ashizuka S, Kita T, Inatsu H, Kitamura K: Adrenomedullin: A novel therapy for intractable ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 19, 2013, 26-27 (査読有)
2. Ashizuka S, Inatsu H, Inagaki-Ohara K, Kita T, Kitamura K: Adrenomedullin as a potential therapeutic agent for inflammatory bowel disease. *Current Protein and Peptide Science* 14, 2013, 246-255 (査読有)
3. 芦塚伸也、彦坂ともみ、稲津東彦、北 俊弘、北村和雄：炎症性腸疾患に対するアドレノメデュリン療法 . 消化器内科、査読有、2012、154-160

##### 〔学会発表〕(計4件)

1. Kita T, Kitamura K: Ten-year tendency of pulse wave velocity in Japanese medical students. The 25th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2014-6-14, Athens (Greece).
2. 渡嘉敷真理子、北 俊弘、永田さやか、横田直人、加藤文司、北村和雄：血中アドレノメデュリン、プロアドレノメデュリンと腎機能障害の関連性 . 第 37 回日本高血圧学会総会、2014 年 10 月 19 日、横浜 .
3. Ashizuka S, Inatsu H, Kita T, Kitamura K: The first clinical pilot study of adrenomedullin therapy in refractory ulcerative colitis: the initial six

cases.

Digestive Disease Week 2012 (AGA), 2012-5-21, San Diego (USA).

4. Kitamura K, Yokota N, Ogawa N, Tokashiki M, Nagata S, Kita T, Kato J: C-terminal fragment peptide of preproadrenomedullin (C-proAM) is a possible biomarker for hypertension and related diseases. 24th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension, 2012-10-3, Sydney (Australia).

##### 〔図書〕(計1件)

1. 北 俊弘、北村和雄、シーエムシー出版、アドレノメデュリンと関連ペプチドによる新たな臨床診断・治療法の開発 . ペプチド医薬の最前線、2012 年、pp188-192.

##### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/medicin1/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北 俊弘 (KITA TOSHIHIRO)  
宮崎大学・医学部・准教授  
研究者番号：70315365