



Phase II Clinical Trial of CD34+ Cell Therapy to Explore Endpoint Selection and Timing in Patients With Critical Limb Ischemia

Fujita, Yasuyuki

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-10-08

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3262号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003262>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



Phase II Clinical Trial of CD34+ Cell Therapy to Explore Endpoint

Selection and Timing in Patients With Critical Limb Ischemia

慢性重症下肢虚血患者を対象とした CD34 陽性細胞治療：エンドポイントの選択および評価時期の探索を目的とした第 II 相臨床試験

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
外科学講座 心臓血管外科学分野
(指導教員：大北 裕 教授)

藤田 靖之

背景

慢性重症下肢虚血 (CLI) は発症後 1 年の死亡率は 25%、下肢大切断率は 30% と極めて予後不良である。近年、救肢・救命には、外科的バイパス手術や血管内治療による血行再建が最善策と考えられているが、CLI 患者の 25-40% は血行再建術の適応外 (No-option) となることが報告されている。No-option の CLI 患者に対する新しい治療戦略の確立は急務である。

骨髓に由来する血管内皮前駆細胞 (EPC) が末梢血の単核球の一部 (CD34 陽性分画) として存在することが証明されて以来、EPC に関する基礎研究が幅広く行われてきた。これら基礎研究成果を基に、我々のグループは、2003 年から No-option CLI 患者を対象とする顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 動員自家末梢血 CD34 陽性細胞移植に関する第 I/IIa 相試験を行った。移植後 12 週までの安全性および有効性を確認し、さらに、その後の長期成績の結果、治療後 4 年までの安全性・有効性が持続することを示した。しかし、治療後の各有効性指標の詳細な経時的变化や臨床の重症度の経時的变化と機能的・主観的有効性指標の経時的变化との相関については、未だ十分には検証されていなかった。

今回の第 II 相試験の目的は、将来のピボタル試験に向けて、適切なエンドポイントの選択および評価時期を探索することである。

方法

試験デザイン

探索的医療機器治験、単施設、単腕試験。本治験はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則、治験実施計画書、薬事法および GCP を遵守して行われた。

対象

選択基準は、1) 下肢血管造影で下肢動脈に 70% 以上の狭窄が確認された動脈硬化性末梢動脈疾患 (PAD) あるいは閉塞性血栓血管炎 (TAO) 患者、2) 下肢虚血発症から 6 カ月以上経過、3) Rutherford 分類 4 群または 5 群、4) 血行再建術の適応が無いあるいは無効、5) 年齢 20 歳以上 80 歳以下、6) 本人から同意文書を取得可能、以上 6 項目。G-CSF 製剤、アフェレシスあるいは CD34 陽性細胞の使用に危険が高いと考えられる患者は除外した。

治療

G-CSF 製剤 (フィルグラスマム；グラン®) を 5 µg/kg を 1 日 1 回、5 日間皮下注射を行い、G-CSF 製剤投与開始後 5 日目にアフェレシスを行い、末梢血単核球を採取した。その翌日に、磁気細胞分離装置 (Isolex 300i Magnetic Cell Selection System version 2.5, Baxter Healthcare 社)

を用いて単核球中の CD34 陽性細胞を分離した。同日、脊髄も膜下麻酔あるいは全身麻酔下に CD34 陽性細胞を患肢に筋肉内注入した。

エンドポイント

治療後 52 週までの安全性評価とともに有効性評価項目を治療前、治療後 2、4、8、12、24、36 そして 52 週の観察時点において評価した。移植が両下肢に行われた場合は、ベースラインでの重症度の高い側を有効性評価対象とした。

1. 臨床的評価項目: 下肢虚血重症度は Rutherford 分類に基づき評価した。CLI 離脱率は Rutherford 分類≤3 群の患者あるいは下肢の割合と定義した。虚血性安静時疼痛は、Visual Analogue Scale (VAS)、Wong-Baker's FACES pain rating scale および Rest Pain Scale を用いて評価した。
2. 機能的評価項目: 血流改善指標として、足関節上腕血圧比 (ABPI)、足趾上腕血圧比 (TBPI)、経皮的酸素分压 ($TcPO_2$) および皮膚灌流圧 (SPP) を計測した。運動耐容能は 6 分間歩行における Total walking distance (TWD) および Pain-free walking distance (PFWD) を計測した。
3. 潰瘍面積: 移植肢あたりの潰瘍面積は、複数箇所で潰瘍が存在する場合は、各潰瘍の合計面積と定義した。
4. 健康関連 QOL: The MOS Short-Form 36-Item health Survey version 2 (SF-36v2) を用いて、1) 身体機能、2) 日常役割機能：身体、3) 体の痛み、4) 全体的健康感、5) 活力、6) 日常役割機能：精神、7) 社会生活機能および 8) 心の健康の計 8 項目について評価した。
5. 安全性評価: 原因に関わらず、すべての有害事象を記録した。身体所見および血液生化学検査は治療期間中および移植後 2、4、8、12、24、36 そして 52 週に行った。網膜の病的血管新生の有無を調査するため、治療前、治療後 2 週および 52 週に眼底検査を行った。

統計

症例登録、データマネジメントおよび統計解析は独立データセンターで行われた。治験の妥当性の検証およびデータの品質管理のためにモニタリングおよび監査が行われた。

データは、連続変数については、平均値±標準偏差、カテゴリー変数については、中央値 [範囲] で表記した。Rutherford 分類の経時の推移は Wilcoxon's signed-rank test を用いて解析した。各有効性評価項目に関する経時の推移を調べるために、混合線形モデルに基づく解析を行った。スクリーニング期を対照とした移植後の各観察時点との差異の比較について、Dunnett-Hsu の方法により多重性を調整した。全生存率およびイベントフリー生存率は Kaplan-Meier 法を用いて解析した。細胞移植後の各エンドポイントの経時の推移を時間 t についての線形回帰（モデル式 $y=a+bt$, y : エンドポイント値、 t : 時間、 a : 切片、 b : 回帰係数）の回帰係数 b の推定値（時間についての傾斜）で要約した。Rutherford 分類と各有効性指標間の時間についての傾斜の相関は Spearman の相関係数を用いた。

結果

患者

11 例の CLI 患者が登録され、プロトコル治療を受けた。平均年齢 48.5 ± 18.1 歳、男女比 6 : 5、原疾患は 7 例 (63.6%) が TAO、4 例 (36.4%) が動脈硬化症 PAD であった。11 例中 9 例 (81.8%) に喫煙歴があったが、現喫煙者はいなかった。全ての患者が 1 種類以上のプロスタノイドまたは抗血小板薬を併用していた。TAO 患者の 2 例、動脈硬化性 PAD の患者 2 例は両下肢に細胞移植が行われた為、結果 15 肢／11 例に細胞移植が行われた。

CD34 陽性細胞治療

G-CSF の投与量は平均 $330.8\pm51.1 \mu\text{g}/\text{日}$ 、全アフェレシス産物は平均 $(3.0\pm0.8)\times10^{10}$ 個、移植された CD34 陽性細胞数は $(6.3\pm5.1)\times10^7/\text{患者}$ 、 $(9.0\pm6.3)\times10^5/\text{kg}$ 、 $(6.5\pm3.7)\times10^5/\text{kg/肢}$ であった。FACS 解析において、磁気分離後の CD34 陽性細胞の純度は $84.8\pm11.9\%$ 、回収率は $69.1\pm16.4\%$ および生存率 $97.1\pm1.5\%$ であった。

有効性評価

CD34 陽性細胞移植後、Rutherford 分類は移植前 $4.0[4.0-5.0]$ に比して、24 週目に $3.0[2.0-5.0]$ と有意な改善を示し ($P<0.05$)、その改善効果は治療後 52 週まで持続した。CLI 離脱率は経時に増加を示し、治療後 36 週で最大値 80.0% (95%CI: 26.2-87.8) を認めた。

虚血性安静時疼痛については、VAS (2.1 ± 2.7 vs 5.4 ± 2.3 (baseline, BL), $P<0.0001$)、Wong-Baker's FACES pain rating scale ($1.0[1.0-3.0]$ vs $3.0[2.0-4.0]$ (BL), $P<0.001$) および Rest Pain Scale ($1.0[1.0-3.0]$ vs $2.0[2.0-4.0]$ (BL), $P<0.05$) ともに移植前に比べ、移植後 2 週より有意な改善を認め、VAS では、移植後 36 週、Wong-Baker's FACES pain rating scale および Rest Pain Scale では移植後 52 週において最大効果を認めた。さらに、移植後 12 週で、10 例中 4 例 (40.0%)、24 週で 5 例 (50.0%) そして 52 週において、7 例 (70%) の患者で疼痛が完全消失した。

機能的評価項目については、各観察時点において 2 回計測を行い、その平均値と高値を評価した。ABPI については、有効性評価対象となる移植前 ABPI < 0.8 の症例はわずか 4 例であり、移植後、有意な変化は認められなかった。TBPI (0.3 ± 0.1 vs 0.2 ± 0.1 (BL), $P<0.05$) は移植後 12 週より有意な改善を認め、SPP (29.2 ± 6.4 vs 23.8 ± 5.6 (BL) mmHg, $P<0.05$) および $TcPO_2$ (35.4 ± 15.4 vs 22.9 ± 15.8 (BL) mmHg, $P<0.05$) は移植後 2 週以降から有意な増加を認め、いずれも 52 週で最大値に達した。TWD (304.1 ± 95.5 vs 204.5 ± 148.4 (BL) m, $P<0.05$) および PFWD (204.4 ± 136.6 vs 93.9 ± 68.4 (BL) m, $P<0.01$) はそれぞれ移植後 8 週および 2 週以降から有意な改善を認め、移植後 52 週で最大改善効果を認めた。高値の解析においても平均値と同様の経時の推移が認められた。

潰瘍面積については、潰瘍部が小切断あるいは縫合されたデータも含まれ、統計学的な評

価は不能であった。

健康関連 QOL

SF-36v2 の 8 個のサブスケール中、身体機能、体の痛み、活力、日常役割機能：精神および心の健康は細胞治療後 4 週以降、有意な改善を認め、日常役割機能：身体は 8 週以降、有意な改善を認めた。移植後 36 週以降は 8 個のサブスケール全てがベースラインと比べ、有意な改善を認めた。

有効性指標間の相関

虚血性疼痛スケールのうち、Rutherford 分類と Rest Pain Scale との間で経時的变化の相関が認められた ($p=0.6333$; $P<0.05$)。一方、生理学的有効性指標と Rutherford 分類との経時的变化の相関は認められなかった。健康関連 QOL では、活力と Rutherford 分類との間で、経時的变化の逆相関が認められた ($p=-0.6546$; $P<0.05$) が、その他のサブスケールと Rutherford 分類の相関は認められなかった。

安全性評価

観察期間中、死亡は認められなかった。重篤な有害事象としては、足趾に壞疽を伴う動脈硬化性 PAD の患者 1 例において、感染が生じたが、細胞治療との関連性は認められなかった。G-CSF 投与開始後 54 日目に大切断に至った。脳血管、心血管イベントや眼底の病的血管新生は認められなかった。

結論と考察

本治験は CLI 患者に対する CD34 陽性細胞移植の安全性、有用性および有効性について、先行の第 I/IIa 相試験をほぼ再現した結果であった。安静時疼痛スケールは細胞移植後、早期（2 週）より改善し、次いで、移植後 2-12 週以降から、TBPI、SPP、TcPO₂、TWD および PFWD を含む機能的評価項目で有意な改善を認め、最後に 12-24 週以降から Rutherford 分類や CLI 離脱率といった下肢虚血の臨床的重症度が経時に有意な改善を認めた。下肢虚血重症度については、欧米の末梢血管疾患の専門医により構成される DEFINE グループによると、CLI に対する血管内治療前後の各時点における Rutherford 分類各群の症例分布、治療前からの Rutherford 分類の改善・増悪の有無は重要なエンドポイントとされている。本治験においても、Rutherford 分類に基づく、下肢虚血重症度関連指標は、細胞移植後経時に改善したことから、次期ビボタル試験における主要評価項目の有力候補と考えられ、評価時期は細胞移植後 36-52 週が妥当であると考えられた。安静時疼痛スケールや機能的評価項目については、細胞移植後 2-4 週以降に評価するのが妥当と考えられた。下肢虚血の臨床的重症度の経時的变化と機能

的評価項目の経時的变化の相関について、Rutherford 分類と疼痛スケールの間での経時的变化に相関を認められたが、Rutherford 分類と血流指標の間では経時的变化に相関が認められなかった。下肢血流に関する機能的評価項目は、下肢虚血の臨床的重症度とは独立して評価されるべきかもしれない。

潰瘍面積については、1 例で予定小切斷が行われ、切斷および断端縫合により、対象病変の面積が変化したことで、正確な計測不能となった。G-CSF 投与前ではなく、予定小切斷後をベースラインとして解決可能と考えられる。

本治験は非ランダム化、非プラセボ対照試験であるため、プラセボ効果については評価不能であった。また、症例数が比較的小いことも本治験の制限事項であった。これらの結果を基に、我々の研究グループは、CD34 陽性細胞治療の安全性・有効性を科学的に検証し、標準治療化を目指して、第 III 相試験の準備を進めている。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第 2134 号	氏名	藤田 靖之
論文題目 Title of Dissertation	Phase II Clinical Trial of CD34+ Cell Therapy to Explore Endpoint Selection and Timing in Patients With Critical Limb Ischemia 慢性重症下肢虚血患者を対象とした CD34 陽性細胞治療：エンドポイントの選択および評価時期の探索を目的とした第 II 相臨床試験		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner 斎向 健一 副査 Vice-examiner 川本 幸司 副査 Vice-examiner 林 祥岡		
(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)			

【目的】

慢性重症下肢虚血 (CLI) は発症後 1 年の死亡率は 25%、下肢大切断率は 30% と極めて予後不良であり、25-40% は血行再建術の適応外 (No-option) となることから、No-option の CLI 患者に対する新しい治療戦略の確立は急務である。

骨髓に由来する血管内皮前駆細胞 (EPC) が末梢血の単核球の一部 (CD34 陽性分画) として存在することが証明されて以来、EPC に関する基礎研究が幅広く行われてきた。これら基礎研究成果を基に、申請者らのグループは、2003 年から No-option CLI 患者を対象とする顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 動員自家末梢血 CD34 陽性細胞移植に関する第 I/IIa 相試験を行い、移植後 12 週までの安全性および有効性を確認し、さらに、その後の長期成績の結果、治療後 4 年までの安全性・有効性が持続することを示した。しかし、治療後の各有效性指標の詳細な経時的変化や臨床的重症度の経時的変化と機能的・主観的有効性指標の経時的変化との相関については、未だ十分には検証されていなかった。今回、申請者らは、将来のピボタル試験に向けて、適切なエンドポイントの選択および評価時期を探索すること目的に、本研究を行った。

【方法】

選択基準は、1) 下肢血管造影で下肢動脈に 70% 以上の狭窄が確認された動脈硬化性末梢動脈疾患 (PAD) あるいは閉塞性血栓血管炎 (TAO) 患者、2) 下肢虚血発症から 6 カ月以上経過、3) Rutherford 分類 4 群または 5 群、4) 血行再建術の適応が無いあるいは無効、5) 年齢 20 歳以上 80 歳以下、6) 本人から同意文書を取得可能、以上 6 項目。G-CSF 製剤、アフェレシスあるいは CD34 陽性細胞の使用に危険が高いと考えられる患者は除外した。

G-CSF 製剤を 5 µg/kg を 1 日 1 回、5 日間皮下注射を行い 5 日目に末梢血単核球を採取した。その翌日に、磁気細胞分離装置を用いて単核球中の CD34 陽性細胞を分離し、CD34 陽性細胞を患肢に筋肉内注入した。

治療後 52 週までの安全性評価とともに有効性評価項目を評価した。

1. 臨床的評価項目：下肢虚血重症度は Rutherford 分類に基づき評価した。CLI 離脱率は Rutherford 分類 ≤ 3 群の患者あるいは下肢の割合と定義した。虚血性安静時疼痛は、Visual Analogue Scale (VAS)、Wong-Baker's FACES pain rating scale および Rest Pain Scale を用いて評価した。
2. 機能的評価項目：血流改善指標として、足関節上腕血圧比 (ABPI)、足趾上腕血圧比 (TBPI)、経皮的酸素分压 ($TcPO_2$) および皮膚灌流压 (SPP) を計測した。運動耐容能は 6 分間歩行における Total walking distance (TWD) および Pain-free walking distance (PFWD) を計測した。
3. 健康関連 QOL: The MOS Short-Form 36-Item health Survey version 2 (SF-36v2) を用いて、1) 身体機能、2) 日常役割機能：身体、3) 体の痛み、4) 全体的健康感、5) 活力、6) 日常役割機能：精神、7) 社会生活機能および 8) 心の健康の計 8 項目について評価した。

【結果】

11例のCLI患者が登録され、プロトコル治療を受けた。平均年齢48.5±18.1歳、男女比6:5、原疾患は7例(63.6%)がTAO、4例(36.4%)が動脈硬化症PADであった。TAO患者の2例、動脈硬化性PADの患者2例は両下肢に細胞移植が行われた為、結果15肢/11例に細胞移植が行われた。

(有効性評価)

CD34陽性細胞移植後、Rutherford分類は移植前4.0[4.0-5.0]に比して、24週目に3.0[2.0-5.0]と有意な改善を示し($P<0.05$)、その改善効果は治療後52週まで持続した。CLI離脱率は経時的に増加を示し、治療後36週で最大値80.0%(95%CI:26.2-87.8)を認めた。

虚血性安静時疼痛については、移植前に比べ、移植後2週より有意な改善を認め、移植後12週で10例中4例(40.0%)、24週で5例(50.0%)そして52週において、7例(70%)の患者で疼痛が完全消失した。

(健康関連QOL)

SF-36v2の8個のサブスケール中、身体機能、体の痛み、活力、日常役割機能：精神および心の健康は細胞治療後4週以降、有意な改善を認め、日常役割機能：身体は8週以降、有意な改善を認めた。移植後36週以降は8個のサブスケール全てがベースラインと比べ、有意な改善を認めた。

【結論】

本治験はCLI患者に対するCD34陽性細胞移植の安全性、有用性および有効性について、先行の第I/Ia相試験をほぼ再現した結果であった。安静時疼痛スケールは細胞移植後、早期(2週)より改善し、機能的評価項目で有意な改善を認め、最後に12-24週以降からRutherford分類やCLI離脱率といった下肢虚血の臨床的重症度が経時に有意な改善を認めた。

本研究は、重症慢性下肢虚血に対してCD34陽性細胞治療の安全性・有効性を証明したものであり、塗料の標準化へ向けて、価値ある知見を得た重要な成果であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。