

200906005A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化 研究事業

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増殖因子
bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法に
よる心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成22(2010)年5月20日

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化 研究事業

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増殖因子
bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法に
よる心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

平成21年度 総括研究報告書

主任研究者 松原 弘明

平成22（2010）年5月20日

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増殖因子bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法による心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

松原 弘明----- 3

II. 分担研究報告

1. 心筋幹細胞の単離・増幅・移植技術に関する基礎研究

王 英正----- 1 2

2. 患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

友池 仁暢----- 1 5

3. 患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

夜久 均----- 1 8

III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 2 0

IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 2 7

厚生労働科学研究費補助金

(再生医療実用化 研究事業)

(総括) 研究報告書

ヒト心臓内多能性幹細胞と幹細胞増殖因子bFGF徐放シートのハイブリッド移植療法による
心筋再生医療の多施設共同型臨床開発

(主任) 研究者 松原 弘明 京都府立医科大学医学研究科教授

研究要旨

重症心不全への心臓移植事業はドナー不足のため十分に機能せず、これを打開するのが心筋再生医療である。ヒト心筋生検サンプルから心筋幹細胞を単離・増殖させ、移植細胞の生存・増殖を目的とした局所 bFGF 徐放シートとの併用による新規の心筋再生細胞移植療法を開発し、末期的心不全の患者さんを救済する世界で初めての心筋再生医療の安全性・有効性確認臨床試験の実施を事業目的とする

A. 研究目的

末期心不全への心臓移植事業はドナー組織不足のため十分に機能せず、実用性の高い心筋再生医療は世界中でまだ実施されていない。我々は、少量のヒト心筋材料よりヒト心筋幹細胞の単離精製・増幅法を世界に先駆けて確立した(国際特許: W02006/093276)。臨床実用化にむけて、大動物を使用した前臨床試験を実施し、安全性・有効性を検証する。その結果をもとに、臨床試験phase I/I Iaのプロトコールを作製して、世界で初めての重症心不全への心筋再生医療の実現化を目的とする

B. 研究方法

1) ヒト心筋から心筋幹細胞の単離・増殖法の確立と大動物移植実験の実施: 研究代表者らはヒト心筋から心臓幹細胞の単クローン化増殖

・増幅に成功している。小動物移植実験は終了しているので、大動物(ブタ)を用いた前臨床試験を実施する。ヒト心臓組織は開心術中の心房、心筋より約20mg採取する。コラゲナーゼ処理による分離後、我々が独自に開発した、単一細胞無血清浮遊系システムでスフェアを形成した幹細胞群を再度酵素処理にて分離し、我々が発見した心筋幹細胞特異的増殖因子bFGF存在下にて大量に増幅させる。ブタ冠動脈を遮断・再開通させ虚血心筋モデルを作成し、1月後に心筋幹細胞を心筋内に移植し、生体吸収性bFGF徐放ゲラチンシートをその上から覆う。血管造影・エコー・MRIにて移植後の心機能・不整脈を評価する。移植後の心筋組織を免疫組織学的検索により、移植細胞の心筋分化・血管数・奇形種形成を検証する。

2) 臨床試験プロトコル作成と第1相臨床試験：大動物前臨床試験の成績をもとに第1相安全性確認のための第1相臨床試験プロトコルを、先端医療振興財団臨床研究情報センター (TRI) で作成する。低心機能 (EF<35%以下) で心筋壊死領域の多い、冠動脈バイパス形成術を受ける末期的心不全 (虚血性心臓病) を対象に、bFGF徐放ゲラチンシート+心筋幹細胞移植 (約1千万個) を組み合わせたハイブリッド療法の第1相安全性確認臨床試験を厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請する。

(倫理面への配慮)

1) 前臨床試験の有効性・安全性評価、臨床試験プロトコルはTR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って京都府立医大、TRIで作成する。患者さんに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針 (厚生労働省告示第255号) を遵守する。

2) 動物操作にあたっては各施設の動物実験指針に従って行う。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施する。

C. 研究結果

「前臨床試験」

本研究者は大型動物 (ブタ) を用いたヒト心臓幹細胞とbFGF徐放シートの併用療法の有効性・安全性評価を目的とする前臨床試験を施行した。試験デザインは、ヒト臨床試験の対象となる重症虚血性心疾患患者のモデルとして陳旧性心筋梗塞による慢性虚血機能不全心を作成し、前向きランダム化試験1：bFGF徐放シート移植の有効性・安全性の評価、前向きランダム化試験2：bFGFシート単独移植に対

する心臓幹細胞移植併用の有効性評価、追試1：心臓幹細胞単独移植に対するbFGFシート移植併用の有効性評価、追試2：bFGFシート+心臓幹細胞移植術後4ヶ月の長期観察による奇形種形成の危険性評価を行った。有効性については、試験2において用量依存性効果評価目的で低用量群 (5×10^5 個/kg)、高用量群 (5×10^6 個/kg) を設定、また心臓幹細胞の対照細胞としてヒト組織由来幹細胞の骨髄間葉系幹細胞を用い、比較検討を行った。異種間細胞移植治療に該当するため、全頭に免疫抑制剤を移植前日から治療終了まで継続して投与し、血中濃度のモニタリングを行った。

安全性に関しては、試験1及び試験2の合計、全治療ブタ70例において、全死亡は術関連死1例のみで、術後一試験終了時までの期間における死亡例の発生は認めなかった。24時間心電図による不整脈監視においても、心室性不整脈を含む有害事象としての不整脈の発生はいずれの群においても発生は認められなかった。試験1及び試験2において、bFGFシートの心筋表面への移植に際し、術後4週後に再開胸の上確認したが、シートの脱落は1例も認めなかった。また、bFGFシート移植による術後心膜炎、心タンポナーデの発症は全70例中1例も認めず、創感染に起因する軽度の心膜外膿瘍形成を2例認めたが、全身状態及び心機能には何ら悪影響を認めなかった。その他、免疫抑制に伴う感染症、骨髄機能の低下、及び心機能低下は認めなかった。

心臓幹細胞、及び骨髄間葉系幹細胞の移植後の奇形腫形成、癌腫形成の危険性について術後4週の短期観察及び、術後4ヶ月の長期観察を行い、最終的に36頭の免疫不全ブタの細胞移植後心臓の病理学的検索を行ったが、内胚葉、中胚葉、外胚葉組織を含めいかなる奇形種、異形細胞腫の形成も確認されなかった。

有効性に関しては、試験1の無治療対象 (開胸及び培養液単独投与) 群とbFGFシート移植 (及び培養液単独投与) 群の2群比較では、bFGFシート群で明かな虚血心筋内微少循環の改善を機序とした心機能の有意な改善と梗塞

部重量の減少を認めた。

心臓幹細胞単独移植に対するbFGFシート移植併用による有効性を評価した追試1では、移植したヒト心臓幹細胞のbFGFシート併用による明らかなホスト心筋内での生着率の改善が認められ、術後4週において心臓幹細胞単独移植群に対し、bFGFシート併用心臓幹細胞移植群の有意な左心機能の改善を認めた。

以上結果を踏まえ、心臓幹細胞移植の有効性評価解析を行った。心臓幹細胞移植の有効性に関して、細胞用量依存性効果の有無を評価した低用量移植及び高用量移植群の比較では、高用量群において高濃度の細胞移植による組織障害の結果、ホスト心筋への心臓幹細胞の生着能、心筋細胞への分化能は低く、移植治療の有効性は認めなかった。これに比し、低用量群では移植細胞による組織障害は認められず、ゲラチンハイドロゲルを介したbFGFの虚血心筋組織徐放による微小心筋血流の改善と、移植したドナー幹細胞の生着性の向上により、骨髄間葉系幹細胞に比し8倍以上の実質的な心筋細胞再生を確認した。

この結果、低用量心臓幹細胞移植とbFGFシート併用移植による相乗的な心機能改善効果は治療4週後において約12%もの不全梗塞心筋の左室駆出率の改善と3%もの梗塞重量の減少を認めた。この細胞移植とbFGFシート併用移植による相乗的な心機能改善効果は骨髄由来幹細胞移植では認めず、本研究における心臓幹細胞移植の心筋再生における特異的有用性を証明した。さらに、長期観察試験にて、標識された心臓幹細胞は、4ヶ月後の移植後慢性期においても心臓幹細胞とbFGFシートの併用移植群では高い生着率を保ち、心機能改善効果も保持されていた。

「第1相安全性確認pilot臨床試験」

重症慢性虚血性心不全に対して、厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書 “重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコルを作成し、申請した。平成21年9月に承認され、現在は第I相安全性確

認臨床試験中である(6症例)。上記臨床試験の安全性を確認し、高度医療に申請する。第I相試験の結果を受けて、第II相比較対照有効性確認試験(40症例)を実施する。今後、2年以内に6例の患者に実施する。3例終了の段階で中間評価を外部評価委員より受ける。現在、1例目の臨床試験登録を終え、患者心筋より組織採取し、心筋幹細胞の培養を実施している。

プロトコルの概略をのべる

適格規準

1) 年齢 : 症例登録時において年齢20歳以上80歳以下

2) 左心機能 : 前項5-2-1のLVEFにて15%以上、35%以下

3) 臨床病期(心不全分類) : stage D

4) 臨床症状(心不全重症度) : NYHA III~IV度

5) 冠動脈バイパス術適応病変 : 前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある

6) viabilityのある領域 : 上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること

① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する

② すべての梗塞領域の遅延造影濃染部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影濃染部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合

注1) 同部位に対するバイパス術の既往は問わない

注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない

注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする

7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者

除外規準

1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症

2) 左室切除術もしくは弁形成術(置換術を含

- む) を必要とする症例 *1
- 3) 心筋生検禁忌の症例*2
 - 4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者
 - 5) 血液透析患者
 - 6) 肝硬変患者(ICG15分停滞率 30%以上)
 - 7) コントロール不良の糖尿病患者(HbA1c>8.0)
 - 8) 5cm以上の大動脈瘤(解離性含む)
 - 9) 心原性ショック
 - 10) 活動性感染症(サイトメガロ感染症を含む)
 - 11) 薬物依存症(アルコール心筋疾患を含む)
 - 12) HIV抗体陽性
 - 13) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他)
 - 14) ゼラチンアレルギーの既往*3

*1左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の濃染部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。

*2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする

- ① 心原性ショック状態の患者
- ② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者
- ③ II度以上の房室ブロックの患者

*3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する

採取、調製、移植又は投与の方法

被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15〜20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター(以下CPCと略す)において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5-6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に5×10⁵個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心

臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。

安全性についての評価

細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。

幹細胞としての安全に関しては長期継代株における核型異形発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植実験における造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。

D. 考察

1) 達成度について

当初の研究目的は十分に達成されたと考えられる。大動物を用いた前臨床試験で有効性・安全性は確認された。phase I/IIa臨床試験プロトコルを作製し、厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」に申請し、平成21年9月に承認された。現在、1例目の臨床試験登録を終え、患者心筋より組織採取し、心臓幹細胞の培養を実施している。

2) 学術的・国際的・社会的意義

これまで難治性重症不全心患者に対して、心臓幹細胞を用いた細胞治療を施行した報告は世界的に一例の報告もない。また急性虚血心に対する骨髄細胞移植(冠動脈注入及びカテーテルによる心筋移植)、米国で行われた小動物への心臓幹細胞単独移植と比較して下記の利点があると考えられる。

- 1) 体外細胞培養工程により移植細胞数を均一化することで、細胞移植の効果を正確に判定できる
- 2) 直視下に障害心筋に細胞移植操作を行うことで、治療有効領域への確実な移植が可能にできる
- 3) bFGF シート移植を併用することで、心臓幹

細胞の生着率を大幅に向上させ、心筋再生を飛躍的に改善できる

- 必要最小限の有効細胞数の移植により、移植後組織障害の軽減を図ることが可能であり、かつ体外細胞増幅にかかる期間の短縮は必要とされるヒト血清量の節減（患者侵襲の低減）および手術待機期間の短縮を図ることができる

E. 結論

我々が世界に先駆けて開発したFGFシート併用心臓幹細胞移植治療は、心機能改善効果、心筋分化効率、移植後細胞生存率などから考えて世界で最も優れた心筋再生医療であると結論される。GMP準拠CPC活用、細胞培養技術・細胞品質・移植技術の検証、臨床試験プロトコルの妥当性、は厚生労働省科学技術部会「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」にて、承認された。今後の第1相安全性確認臨床試験の結果、第2相有効性安全性臨床試験への展開が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきものはない

G. 研究発表

1. 論文発表

- Honsho S, Matsubara H. (他6人 最終著者) Pressure-mediated hypertrophy and mechanical stretch induces IL-1 release and subsequent IGF-1 generation to maintain compensative hypertrophy by affecting Akt and JNK pathways. *Circ Res.* 2009 Nov 20;105(11):1149-58.
- Ikeda K, Matsubara H. (他5人) Identification of ARIA regulating endothelial apoptosis and angiogenesis by modulating proteasomal degradation of cIAP-1 and cIAP-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(20):8227-32
- Takehara N, Matsubara H., Oh H. (他7人) Controlled Delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Promotes Human Cardiosphere-Derived Cell Engraftment to Enhance Cardiac Repair for Chronic Myocardial Infarction. *J Am Coll*

Cardiol. 52(23)1858-1865, 2008

- Asada S, Matsubara H., Oh H. (他6人) Downregulation of Dicer expression by serum withdrawal sensitizes human endothelial cells to apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295: 2512-2521, 2008
- Tagawa M, Matsubara H., Oh H. (他6人) MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am J PhysiolCell Physiol.* 295: C490-C498, 2008
- Harada K, Matsubara H., Oh H. (他5人) Crossveinless-2 controls bone morphogenetic protein signaling during early cardiomyocyte differentiation in P19 cells. *J Biol Chem.* 283(39);26705-26713, 2008
- Ogata T, Matsubara H., Oh H. (他6人) MURC, a Muscle-Restricted Coiled-Coil Protein That Modulates the Rho/ROCK Pathway, Induces Cardiac Dysfunction and Conduction Disturbance. *Mol Cell Biol;* 28(10)3424-3436, 2008
- Nomura T, Matsubara H., Oh H. (他6人) Therapeutic potential of stem/progenitor cells in human skeletal muscle for cardiovascular regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2(4) 293-300, 2007
- Matsui A, Matsubara H. (他10人) Central role of calcium-dependent tyrosine kinase PYK2 in endothelial nitric oxide synthase-mediated angiogenic response and vascular function. *Circulation* 116 :1041-1051, 2007
- Takahashi T, Matsubara H. New targeted angiogenic strategy: bursting bubbles. *Circ Res* 101:232-233, 2007
- Kitamura R, Matsubara H., Oh H. (他8人) Stage-specific role of endogenous Smad2 activation in cardiomyogenesis of embryonic stem cells. *Circ Res* 101:78-87, 2007
- Ogata T, Matsubara H., Oh H. (他6人) Osteopontin is a myosphere-derived secretory

molecule that promotes angiogenic progenitor cell proliferation through the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway.

BBRC 359:341-347, 2007

- 13 Tateishi K, Matsubara H, Oh H (他 8 人、10 番目著者) Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration

J Cell Sci. 120:1791-1800, 2007

- 14 Yamamoto T, Matsubara H (他 6 人、最終著者) Enhanced activity of ventricular Na⁺-HCO₃⁻-cotransport in pressure overload hypertrophy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol 293:H1254-1264, 2007**

- 15 Tateishi K, Matsubara H, Oh H (他 8 人、10 番目著者) Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3β signaling.

BBRC 352:635-641, 2007

- 16 Nomura T, Matsubara H, Oh H (他 5 人、7 番目著者) Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in deltasarcoglycan knockdown cardiomyopathy.

BBRC 352:668-674, 2007

- 17 Nakajima N, Matsubara H, Oh H (他 5 人、7 番目著者) MicroRNA-1 facilitates skeletal myogenic differentiation without affecting osteoblastic and adipogenic differentiation. **BBRC 350:1006-1012, 2007**

- 18 Takeda M, Matsubara H (他 8 人、最終著者) Spironolacton modulates expressions of cardiac mineralocorticoid receptor and 11β-hydroxysteroid dehydrogenase 2 and prevents ventricular remodeling.

Hypertens Res 30:427-37 2007

- 19 Ikeda K, Matsubara H (他 6 人、最終著者) Glia maturation factor-γ is preferentially expressed in microvascular endothelial and inflammatory cells and modulates actin cytoskeleton reorganization.

Circ Res 99:424-433, 2007

- 20 Voros S, Matsubara H (他 6 人、9 番目著

者) Interaction between AT1 and AT2 receptors during postinfarction left ventricular remodeling. **Am J Physiol Heart Circ Physiol. 290:H1004-10, 2006**

- 21 Shirayama T, Matsubara H (他 4 人、最終著者) Usefulness of Paroxetine in Depressed Men With Paroxysmal Atrial Fibrillation **Am J Cardiol 97:1749-51, 2006**

- 22 Zen K Matsubara H (他 9 人、最終著者) Myocardium-targeted delivery of endothelial progenitor cells by ultrasound-mediated microbubble destruction improves cardiac function via an angiogenic response

J Mol Cell Cardiol. 40:799-809, 2006

- 23 Urao N, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Erythropoietin-Mobilized Endothelial Progenitors Enhance Reendothelialization via Akt-Endothelial Nitric Oxide Synthase Activation and Prevent Neointimal Hyperplasia **Circ Res 98: 1405-1413, 2006**

- 24 Nishikawa S, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Nicorandil regulates Bcl-2 family proteins and protects cardiac myocytes against hypoxia-induced apoptosis.

J Mol Cell Cardiol. 40:510-519, 2006

- 25 Matsuno K, Matsubara H (他 9 人、最終著者) Nox1 is involved in angiotensin II-mediated hypertension: a study in Nox1-deficient mice. **Circulation. 2005;112:2677-85.**

- 26 Tsunoda S, Matsubara H (他 7 人、6 番目著者) Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. **BBRC 2005;336:118-27**

- 27 Takamiya M, Matsubara H (他 8 人、最終著者) Granulocyte Colony-Stimulating Factor-Mobilized Circulating c-Kit⁺/Flk-1⁺ Progenitor Cells Regenerate Endothelium and Inhibit Neointimal Hyperplasia After Vascular Injury. **Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26:751-7.**

2. 学会発表

1. Matoba S, Matsubara H, T Imaizumi, T Murohara, Y

- Saito, MFukushima. Long-Term Clinical Outcome of Therapeutic Angiogenesis by Autologous Transplantation of Bone Marrow Mononuclear Cells for Patients With Chronic Limb Ischemia - Results of the TACT Trial, Prognosis, Efficacy and Safety. **American Heart Association (米国心臓病学会)** Nov14-19, 2009 Orland, USA
2. Nakaoka M, Eri Iwai-Kanai, Matoba S, Kimata M, Nakamura Hideo, Hoshino A, Katamura M, Hiraumi Y, Matsubara H. Differential Roles of Akt and Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathways on Autophagy During Alpha1-Adrenergic Agonist-Mediated Cardioprotection **American Heart Association (米国心臓病学会)** Nov14-19, 2009 Orland, USA
 3. Nakamura H, Matoba S, Eri Iwi-Kanai, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Tatsumi T, Matsubara H p53 promotes heart failure in diabetic cardiomyopathy 日本循環器学会総会 2010年3月5-7 京都、日本
 4. Nakamura H, Matoba S, Eri Iwi-Kanai, Kimata M, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Tatsumi T, Matsubara H p53 modulates autophagy through mitochondrial redox signal regulation during myocardial ischemia. 日本循環器学会総会 2010年3月5-7 京都、日本
 5. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Jisan C, Yamaguchi S, Yamada H, Matsubara H. Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 Plays Crucial Role in Angiotensin II- but Not Norepineprine-mediated Activation fo Rac/Superoxide Pathway that Differentially Regulates Blood Pressure and Vasoconstriction **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 6. Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Yamaguchi S, Kishita E, Yamada H, Matsubara H. Ca+/Redox-sensitive Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis through OxLDL/ROS/p21-Dependent Premature Senescence and Cytokine Induction in Endothelium. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 7. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Matsui A, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin At1 Receptor Regulates Differentiation of Monocyte/Macrophage-Lineage Progenitors from Hematopoietic Stem Cells. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 8. Nakagawa Y, Ikeda K, Nakano R, Uraoka M, Yutaka K, Koide M, Matsubara H. Bone Morphogenetic Protein-2 plays Crucial Roles In The Formation of Medial Calcification And Atherosclerosis In Vivo. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 9. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Matsui A, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow AT1 Receptor Augments Neointima Formation by Promoting Mobilization of Smooth Muscle Progenitor Cells in Platelet-Derived SDF-1 α -Dependent Manner. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 10. Ikeda K, Koide M, Uraoka M, Nakagawa Y, Nakano R, Matsubara H. Molecular Identification and Characterization of a Novel Gene that Regulation Endothelial Cell Apoptosis and Angiogenesis. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
 11. Kishita E, Honsho S, Yamaguchi S, Katsume A, Matsui A, Matsunaga S, Okigaki M, Matsubara H. Calcium/Redox Sensitive Tyrosine Kinase Pyk2 Aggravates Myocardial Ishemia by Promoting Inflammatory Reactions and Cell Apoptosis. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2008 Nov8-12, New Orleans, USA

12. Takahashi M, Ishigatsubo Y, Fujimoto K, Miyamoto M, Horie T, Aizawa Y, Murohara T, Matsubara H, Ikeda U. Therapeutic Angiogenesis by Mononuclear Cell Implantation for Critical Digit Ischemia of Patients with Connective Tissue Disease. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2008 Nov8-12, New Orleans, USA
13. Honsho S, Nisikawa S, Kishita E, Katsume A, Matsunaga S, Matsui A, Okigaki M, Matsubara H. Cardioprotective Action of Interleukin-1 β in Adaptation to Cardiac Pressure Overload Stress by Activation of IGF-1/Akt Pathway. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
14. Kimata M, Matoba S, Nakamura H, Tatsumi T, Matsubara H. p53 Shifts the Balance of Energy Source in Cardiac Myocytes. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
15. Katsume A, Okigaki M, Matsui A, Yamada H, Matsubara H. Ca²⁺-dependent Tyrosine Kinase PYK2 Promotes Atherogenesis by Inducing Monocyte and endothelial cell-Derived TNF- α and MCP-1 Synthesis Unmasked by Analysis of PYK2/ApoE Double Deficient Mice. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
16. Takehara N, Tsutsumi Y, Ota H, Tateishi K, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Tabata Y, Matsubara H, Oh H. Controlled Intramyocardial-delivery of Basic Fibroblast Growth Factor Combined With Human Cardiac Stem Cell Transplantation In Chronic Myocardial Infarction: A Randomized Controlled Preclinical-trial. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
17. Kobayashi S, Ueyama T, Roh R, Masano T, Sakoda T, Matsubara H, Oh H, Hirata K. Myocardin is Required to Prevent Mitochondrial Damage and Cardiac Dysfunction in Response to Beta-Adrenergic Receptor Stimulation. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
18. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Takahashi T, Okigaki M, Hirai H, Aihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Differentially Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Activation of Bone Marrow-Derived Vascular Progenitors. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
19. Okigaki M, Kusaba T, Honsyo S, Matsui A, Matsunaga S, Katsume A, Kishita E, Matsubara H. Klotho-protein Regulates Transient Receptor Potential Canonical-1-mediated Ca²⁺-influx In Endothelial Cells And Prevents Cell Death And Disruption Of Endothelial Integrity Induced By Ca²⁺-overload **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
20. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Yamada H, Matsubara H. Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 Plays Crucial Role in Angiotensin II - But Not Norepineprine-Mediated Activation of Rac/Superoxide Pathway That Differentially Regulates Blood Pressure and Vasoconstriction **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
21. Kawahito H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Yokoi H, Takata H, Hirai H, Imanishi J, Takahashi T, Okigaki M, Mori Y, Matsubara H. Mild Renal Dysfunction Caused by Uninephrectomy Accelerated the Development of Atherosclerosis by Augmented Monocyte Mobilization from Bone Marrow via CCR2-Mediated Signals. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
22. Matsunaga S, Tatsumi T, Okigaki M, Kishita E, Kimata M, Honsyo S, Takeda M, Nishikawa S, Matoba S, Kobara M, Matsubara H. Overexpression of Tie2-promoted Activated

- Fibroblast Growth Factor Receptor 2 in Endothelial Cells enhances Angiogenesis and Induces Cardioprotective Effect via Src-Akt-Hif1 α Signaling Pathway in Mice Myocardial Infarction **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
23. Tsubakimoto Y, Yamada H, Yokoi H, Takata H, Kawahito H, Hirai H, Imanishi J, Ashihara E, Maekawa T, Takahashi T, Okigaki M, Matsubara H. Bone Marrow Angiotensin II Type1 Receptor Augments Atherosclerosis by Promoting Monocyte/Macrophage Lineage Differentiation from Hematopoietic Stem Cells **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
24. Matsui A, Okigaki M, Katsume A, Matsunaga S, Yamada H, Matsubara H. Central Role of Calcium-Dependent Tyrosine Kinase PYK2 in eNOS-Mediated Vascular Function and Angiogenic Response- Unmasked by PYK2 Knockout Mice- **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
- USA
25. Ikeda K, Nakano R, Thomas Quertermous, Matsubara H. BLADE Is A Novel Membrane Protein Regulates Endothelial Apoptosis and Consequently Angiogenesis Both In Vitro and Vivo. **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2007 Nov4-7, Orlando, USA
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ヒト心臓内幹細胞と bFGF 徐放ゲラチンハイドロゲルシートの同時移植による心筋再生医療法の開発 特許出願番号 2007-265008
- 心臓組織由来の多能性幹細胞 特許出願番号 2005-60831
- PCT出願番号 PCT/JP2006/304111
- 骨格筋組織由来の多能性幹細胞 特許出願番号 2005-207670
- PCT出願番号 PCT/JP2006/314070
- 骨格筋由来の心筋幹細胞 特許出願番号 2004-307797

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化 研究事業）

（分担）研究報告書

心筋幹細胞の単離・増幅・移植技術に関する基礎研究

（分担）研究者 王 英正 岡山大学医学部 準教授

（平21年3月31日まで、京都府立医科大学 準教授）

研究要旨

ヒト心筋細胞の単離・増殖・移植技術の確立と心筋幹細胞特異的増殖因子を新たに発見し、細胞移植技術を改良する。

A. 研究目的

- (1) ヒト心筋幹細胞の単離精製・増幅法とその特異的増殖因子の同定
- (2) 心筋細胞移植医療の実現化に向けたヒト心筋幹細胞と特異的増殖因子を組み合わせたハイブリッド的細胞療法の開発。

B. 研究方法

ヒト体組織内から心筋幹細胞を純化し遺伝子の網羅的検索により、細胞特異的増幅因子を同定する。組織工学的手法を用いて増幅因子の組織局所的徐放下で、心筋幹細胞を低心機能の心臓内に直接移植する。

（倫理面への配慮）

- 1) 臨床試験プロトコールはIR実施に当たっての共通倫理審査指針に沿って、臨床研究情報センター（神戸TRI）で作成する。患者さんに対する治療前の説明と理解を得て、またプライバシーの保護を第一とし治療経過はすべて情報公開にする。移植細胞および臨床試験は厚生労働省よりの「幹細胞の臨床応用についての治療指針」、医薬品GCP、臨床研究倫理指針（厚生

労働省告示第255号）を遵守する。

- 2) 動物操作にあたっては各施設の動物実験指針に従って行う。基礎的研究においては、遺伝子改変マウス、プラスミドDNAを用いる場合は仕様に際しては、遺伝子組み換え生物などの使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律に基づき研究を実施する。

A. 研究結果

ヒト心筋幹細胞の単離に成功し、DNA micro-array法にて、bFGFが強力な細胞増幅因子であることを見いだした。大動物を利用した前臨床試験にて、bFGF徐放下での心筋幹細胞移植は同じ表現型である骨髄間葉系幹細胞よりも有効に心機能を改善させる結果となった。

B. 考察

bFGF徐放ゼラチンシートを用いた前臨床試験により、bFGF徐放はヒト幹細胞を移植後に生存・増殖させ、心機能改善を飛躍的に亢進させることを見いだした。このbFGF徐放ゼラチンシートと心筋幹細胞の同時移植は新規の効果的な再生医療として、臨床応用されることになった。

E. 結論

ヒト心筋幹細胞とbFGFとの併用移植療法は前臨床試験でその有効性と安全性が確認され、第I/II相臨床試験を強力に推進することになった。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1 Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by stem cell antigen-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. **J Cell Science**, in press
- 2 Tateishi K, Ashihara E, Honsho S, Takehara N, Nomura T, Takahashi T, Ueyama T, Yamagishi M, Yaku H, Matsubara H, Oh H. Human cardiac stem cells exhibit mesenchymal features and are maintained through Akt/GSK-3 β signaling **Biochem Biophys Res Commun.** 2007; 352(3):635-641.
- 3 Nomura T, Ashihara E, Tateishi K, Asada S, Ueyama T, Takahashi T, Matsubara H, Oh H. Skeletal myosphere-derived progenitor cell transplantation promotes neovascularization in α -sarcoglycan knockdown cardiomyopathy **Biochem Biophys Res Commun.** 2007; 352(3):668-674.
- 4 Nakajima N, Takahashi T, Kitamura R, Isodono K, Asada S, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. **Biochem Biophys Res Commun.** 2006 ;350:1006-1012.
- 5 Oh H, Chi X, Bradfute SB, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Schwartz RJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac muscle plasticity in adult and embryo by heart-derived progenitor cells **Annu. NY. Acad. Sci.** 2004 ;1015:182-9
- 6 Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gausson V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 ;100:12313-8.

- 7 Oh H, Wang SC, Prahash A, Sano M, Moravec CS, Taffet GE, Michael LH, Youker KA, Entman ML, Schneider MD. Telomere attrition and Chk2 activation in human heart failure. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 ;100:5378-83
- 8 Sano M, Abdellatif M, Oh H, Xie M, Bagella L, Giordano A, Michael LH, DeMayo FJ, Schneider MD. Activation and function of cyclin T-Cdk9 (positive transcription elongation factor-b) in cardiac muscle-cell hypertrophy. **Nat Med.** 2002 ;8:1310-7.
- 9 Oh H, Taffet GE, Youker KA, Entman ML, Overbeek PA, Michael LH, Schneider MD. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98:10308-13.

2. 学会発表

- 1 N. Nakajima, T. Takahashi, R. Kitamura, K. Isodono, S. Asada, T. Ueyama, H. Matsubara, H. Oh, MicroRNA-1 Facilitates Myogenic Differentiation and Maturation into Skeletal Myotubes without Affecting Osteoblastic and Adipogenic Differentiation **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 2 K. Tateishi, T. Takahashi, S. Honsho, N. Takehara, T. Nomura, H. Matsubara, H. Oh Single Cardiac Stem Cells in Adult Mammals Exhibit Mesenchymal Features and Proliferate through Akt/GSK3 Pathway **American Heart Association** (米国心臓病学会) 2006 Nov12-15, Chicago, USA
- 3 K. Zen, M. Okigaki, H. Matsubara Myocardium-Targeted Delivery of Endothelial Progenitor Cells By Ultrasound-Mediated Microbubble Destruction Improves Cardiac Function via an Angiogenic Response **American Heart Association** (米国心臓病学会)

学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

- 4 H. Yamada, H. Yokoi, Y. Tsubakimoto, H. Takada, T. Takahashi, M. Okigaki, E. Ashihara, T. Maekawa, M. Iwai, M. Horiuchi, H. Matsubara, Bone Marrow Cells that Abundantly Express Angiotensin AT1 and AT2 Receptors Modulate Vascular Repair by Regulating Mobilization and Differentiation of Smooth Muscle Cell Progenitors and

Macrophage Activation American Heart Association (米国心臓病学術会議) 2006 Nov12-15, Chicago, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

心臓内心筋幹細胞の単離法 (PCT出願中)

骨格筋組織内幹細胞の精製法 (PCT出願中)

2 実用新案登録

特になし

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化 研究事業）

（分担）研究報告書

患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

（分担）研究者 友池 仁暢 国立循環器病センター

研究要旨

重度の心不全症例に対する新たな治療法として心筋細胞による細胞移植医療法の適用となる患者選別・登録、臨床試験の実施にむけた準備を実施した。厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書 “重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討 “のプロトコルを作成し申請した。

A. 研究目的

臨床試験phase I/IIaのプロトコルを主任研究者らと協力して作製して、適用となる患者選別・登録を実施し、世界で初めての重症心不全への心筋再生医療の臨床試験の実施を目的とする。

B. 研究方法

「第1相安全性確認pilot臨床試験」

重症慢性虚血性心不全に対して、厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書 “重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討 “のプロトコルを作成し、平成21年9月に認可された。

プロトコルの概略をのべる

適格規準

- 1) 年齢 : 症例登録時において年齢20歳以上80歳以下
- 2) 左心機能 : 前項5-2-1のLVEFにて15%以上、35%以下
- 3) 臨床病期（心不全分類） : stage D
- 4) 臨床症状（心不全重症度） : NYHA III～IV度
- 5) 冠動脈バイパス術適応病変 : 前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある
- 6) viabilityのある領域 : 上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること
 - ① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する

② すべての梗塞領域の遅延造影濃染部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影濃染部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合

注1) 同部位に対するバイパス術の既往は問わない

注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない

注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする

7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者

除外規準

1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症

2) 左室切除術もしくは弁形成術（置換術を含む）を必要とする症例 *1

3) 心筋生検禁忌の症例*2

4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者

5) 血液透析患者

6) 肝硬変患者 (ICG15分停滞率 30%以上)

7) コントロール不良の糖尿病患者 (HbA1c>8.0)

8) 5cm以上の大動脈瘤（解離性含む）

9) 心原性ショック

10) 活動性感染症（サイトメガロ感染症を含む）

11) 薬物依存症（アルコール心筋疾患を含む）

12) HIV抗体陽性

13) 活動性出血性疾患（消化管出血、外傷その他）

14) ゼラチンアレルギーの既往*3

*1左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の濃染部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。

*2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする

① 心原性ショック状態の患者

② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者

③ II度以上の房室ブロックの患者

*3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する

採取、調製、移植又は投与の方法

被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15～20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」

に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター（以下PCと略す）において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5-6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に 5×10^5 個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。

安全性についての評価

細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。

幹細胞としての安全に関しては長期継代株における核型異形発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植実験における造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。

D. 考察

1) 達成度について

当初の研究目的は十分に達成されたと考えられる。phase I/IIa臨床試験プロトコルを作製し、厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」のにて認可された。1例目の患者は登録され、心筋幹細胞は培養中であり、平成22年度6月中旬に最初の再生医療が実施さ

れる。

2) 学術的・国際的・社会的意義

これまで難治性重症不全心患者に対して、心臓幹細胞を用いた細胞治療を施行した報告は世界的に一例の報告もない。また急性虚血心に対する骨髄細胞移植（冠動脈注入及びカテーテルによる心筋移植）、米国で行われた小動物への心臓幹細胞単独移植と比較して下記の利点があると考えられる。

- 1) 体外細胞培養工程により移植細胞数を均一化することで、細胞移植の効果を正確に判定できる
- 2) 直視下に障害心筋に細胞移植操作を行うことで、治療有効領域への確実な移植が可能にできる
- 3) bFGF シート移植を併用することで、心臓幹細胞の生着率を大幅に向上

させ、心筋再生を飛躍的に改善できる

- 4) 必要最小限の有効細胞数の移植により、移植後組織障害の軽減を図ることが可能であり、かつ体外細胞増幅にかかる期間の短縮は必要とされるヒト血清量の節減（患者侵襲の低減）および手術待機期間の短縮を図ることができる

E. 結論

我々が世界に先駆けて開発したFGFシート併用心臓幹細胞移植治療は、心機能改善効果、心筋分化効率、移植後細胞生存率などから考えて世界で最も優れた心筋再生医療であると結論される。国際特許も申請しており、今後の第1相安全性確認臨床試験、第2相有効性安全性臨床試験への展開が期待される。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化 研究事業）

（分担）研究報告書

患者選別・登録と臨床試験の実施にむけての準備

（分担）研究者 夜久 均 京都府立医科大学 心臓血管外科

研究要旨

重度の心不全症例に対する新たな治療法として心筋細胞による細胞移植医療法の適用となる患者選別・登録、臨床試験の実施にむけた準備を実施した。厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書 “重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコルを作成し申請した。

A. 研究目的

臨床試験phase I/IIaのプロトコルを主任研究者らと協力して作製して、適用となる患者選別・登録を実施し、世界で初めての重症心不全への心筋再生医療の臨床試験の実施を目的とする。

B. 研究方法

「第1相安全性確認pilot臨床試験」

重症慢性虚血性心不全に対して、厚生労働省のヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書 “重症慢性虚血性心不全に対するヒト心臓幹細胞と幹細胞増幅因子bFGFのハイブリッド自家移植療法の検討”のプロトコルを作成し、平成21年9月に認可された。

プロトコルの概略をのべる

適格規準

1) 年齢 : 症例登録時において年齢

20歳以上80歳以下

2) 左心機能 : 前項5-2-1のLVEFにて15%以上、35%以下

3) 臨床病期（心不全分類） : stage D

4) 臨床症状（心不全重症度） : NYHA III～IV度

5) 冠動脈バイパス術適応病変 : 前項5-2-2の冠動脈造影法において主要冠動脈に有意狭窄を有し、冠動脈バイパス術の適応がある

6) viabilityのある領域 : 上記冠動脈病変に起因する障害心筋領域で、造影心MRIによる評価において以下の規準が満たされていること

① 梗塞領域が18分割心区域分類法で2領域以上存在する

② すべての梗塞領域の遅延造影濃染部が、短軸像において心筋壁に対し50%以下の場合、または遅延造影濃染部が51%以上の領域を含む場合でも、同部位が1領域以下に限定される場合

注1) 同部位に対するバイパス術の既往は問わない

注2) 冠動脈の罹患枝数は問わない

注3) 該当のviabilityのある領域が複数存在する場合は、梗塞領域の大きい方を細胞移植領域とする

7) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者

除外規準

1) 28日以内の新規の心筋梗塞、不安定狭心症発症

2) 左室切除術もしくは弁形成術（置換術を含む）を必要とする症例 *1

3) 心筋生検禁忌の症例*2

4) 悪性新生物を有する患者及び3年以内にその既往のある患者

5) 血液透析患者

6) 肝硬変患者(ICG15分停滞率 30%以上)

7) コントロール不良の糖尿病患者(HbA1c>8.0)

8) 5cm以上の大動脈瘤（解離性含む）

9) 心原性ショック

10) 活動性感染症（サイトメガロ感染症を含む）

11) 薬物依存症（アルコール心筋疾患を含む）

12) HIV抗体陽性

13) 活動性出血性疾患（消化管出血、外傷その他）

14) ゼラチンアレルギーの既往*3

*1左室切除術の必要な症例とは、造影心MRIにおいて梗塞部心筋の濃染部が心筋壁に対して51%以上の領域が2領域以上にわたる症例とする。

*2 心筋生検禁忌の症例とは以下の症例とする

① 心原性ショック状態の患者

② カテコラミン等を治療に必要とする鬱血性心不全状態の患者

③ II度以上の房室ブロックの患者

*3 ゼラチンアレルギーについては詳細な既往歴の聴取及び、登録前にパッチテスト、ゼラチンIgEの検査において陰性であることを確認する

採取、調製、移植又は投与の方法

被験者患者右心室から、心筋生検法を用いて15～20mgの心筋組織を採取し、平成19年8月通達「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に従いGMP準拠の細胞調整施設である京都府立医科大学 再生医療・細胞治療研究センター（以下CPCと略す）において、無菌的に自家心臓幹細胞を単離、体外増幅培養を行う。被験者の400mL末梢血から採取分離した血清を用いて5-6週間の細胞培養の後、CPCにおいて生理食塩水に5×10⁵個/kgに調整、懸濁する。プロトコル治療はまず冠動脈バイパス術を行い、その後に、培養自家心臓幹細胞を障害心筋領域に均等に20箇所、筋肉注射する。その後、bFGF徐放シートを同部位に貼付する。

安全性についての評価

細菌試験、真菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験を、培養工程における無菌性の検証を細胞調整の各工程において、細胞製剤標準書SOPに従い行う。

幹細胞としての安全に関しては長期継代株における核型異形発生の有無の確認、免疫不全マウス皮下へのヒト自家心臓幹細胞の移植実験における造腫瘍性の確認を全症例において行う。有害事象発現時・中間評価の際は、本臨床研究から独立した専門家で構成される効果安全性評価委員会が研究責任者の依頼を受けて情報を評価する。

D. 考察

1) 達成度について

当初の研究目的は十分に達成されたと考えられる。phase I/IIa 臨床試験プロトコルを作製し、厚生労働省「ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会」のにて認可された。1例目の患者は登録され、心筋幹細胞は培養中であり、平成22年度6月中に最初の再生医療が実施される。

2) 学術的・国際的・社会的意義

これまで難治性重症不全心患者に対して、心