

200936274A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation/recoveryを目指した

新規治療法の開発と実践

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 澤 芳樹

平成 22(2010)年 5 月

目次

I. 総括研究報告

重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を 目指した新規治療法の開発と実践に関する研究.....	1
大阪大学医学系研究科心臓血管外科 澤 芳樹	

II. 分担研究報告

1. 重症心不全患者に対する筋芽細胞シート移植に関する臨床研究.....	4
大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科 宮川 繁, 国立循環器病センター心臓血管外科 市川 肇	
2. ブタ慢性期梗塞モデルに対する脂肪間葉系幹細胞由来 心筋芽細胞シートに対する前臨床研究	10
大阪大学医学部附属病院未来医療センター 松山晃文	
3. 重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を 目指した心筋治療法の安全性・有効性評価のための生物統計学的 デザイン・方法論の開発に関する研究	14
兵庫医科大学医学部数学教室 大門 貴志	
4. cGMP 対応の細胞培養システムの構築	21
先端医療センター研究所 川真田 伸	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	22
--------------------------	----

IV. 研究成果の別刷

重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation/recoveryを目指した

新規治療法の開発と実践

研究代表者 大阪大学医学系研究科心臓血管外科 教授 澤 芳樹

研究要旨

拡張型心筋症に対する新たな治療法として、再生細胞治療法を実践、先進医療化、ひいては保険医療化することを本研究の最終目的とする。次世代の bridge-to-recovery 再生医療としての確立を目指して、骨格筋芽細胞シート移植による bridge-to-transplantation 臨床研究の実施、脂肪由来間葉系幹細胞より誘導した心筋芽細胞シートの前臨床研究、および cGMP 対応の細胞培養システムの構築を行った。

研究分担者

宮川 繁 大阪大学医学系研究科・助教
市川 肇 国立循環器病センター・医長
松山晃文 大阪大学医学部附属病院・特任准教授
川真田伸 先端医療振興財団・グループリーダー
大門貴志 兵庫医科大学医学部・講師

A.研究目的

難治性の拡張型心筋症の治療において、これまでの補助人工心臓より心臓移植への橋渡し治療のみでは、限界があるのが現状である。この限界を克服するために、本研究では、筋芽細胞シートの臨床応用の継続を行い、最終的には、その効果の検討と、保険医療化を目指している。

本年度は、拡張型心筋症に対する新規治療の開発のため、筋芽細胞シートの臨床応用、心筋芽細胞シートの前臨床試験を中心に研

究を行った。また、ヒト重症心不全に対する筋芽細胞シート治療の可能性、安全性を解析する評価方法の確立を行った。

B.研究方法

1. 拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート移植

当院にて左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対して、骨格筋採取を行い、当院未来医療センターの Cell processing centerにて、GMP 基準を満たす筋芽細胞を単離し、温度応答性培養皿を用いて、筋芽細胞シートを作成する。新規植え込み型定常流人工心臓を装着し、筋芽細胞シート移植を行い、細胞シートによる人工心臓よりの“Bridge to Recovery”を目指す。また、体外式人工心臓より植え込み型定常流人工心臓への入れ替えを

行い、安全に循環動態を維持しながら心臓移植まで自宅にて待機できるような、“Bridge to Transplantation”への橋渡し治療を行う。

2. 筋芽細胞にかわる新しい細胞源として、脂肪間葉系幹細胞より誘導した、心筋芽細胞を分化誘導し、本細胞のシートを作成し、大動物心不全モデルに移植し、心臓超音波、組織学的検討を行い、その効果を解析する。

3. 筋芽細胞シート移植治療の可能性、安全性を適切に評価できるようなシステムの開発

4. 細胞培養施設（CPC）で製造される細胞製剤の薬事対応を担保するCPC図書作成に必要な施設・製造・品質保証要件を検討する。

（倫理面への配慮）

筋芽細胞シート移植法に関しては、大阪大学医学部倫理委員会、および大阪大学付属病院未来医療センターにて、本プロトコルの倫理性、妥当性に関して十分な議論が行われている。また、厚生労働省ヒト幹細胞委員会においても、本臨床研究は認可を受けている。まだ認可を受けていない植え込み型定常流人工心臓は、医師主導のもとに使用されており、既存の体外式補助人工心臓を本人工心臓に入れ替えるプロトコルも、本学倫理委員会にて承認を受けている。患者へのインフォームドコンセントに関しても、各種倫理委員会にて認可を受けた書面にて、承諾を得ている。大動物実験に関しては、大阪大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

1. 心不全患者に対する筋芽細胞シート移植治療

左室補助人工心臓を装着した患者2例より、

骨格筋を安全に採取を行うことが可能であった。大阪大学附属病院未来医療センターのCell processing centerにて、純度93.3%、細胞数 7.5×10^8 の筋芽細胞を得ることが可能であり、計24枚の筋芽細胞シートを作成可能であった。本筋芽細胞シートを1名の患者に安全に移植し、現在評価を待っている段階である。また、もう1例も同様に、筋芽細胞をGMP基準のもと、問題なく回収することができ、純度59%、細胞数 5.1×10^8 であった。現在、筋芽細胞シート移植を予定している。また、人工心臓を装着していない心不全患者の骨格筋を同様の方法で安全に採取することが可能であり、現在 cell processing centerにて培養中である。現在、重症心不全の患者で、筋芽細胞シートを移植する人が2名待機している。

これまで、体外式左室補助人工心臓を装着されていた患者に対して、植え込み型補助人工心臓への入れ替えを4例行った。本治療の目的は、脳梗塞、感染症の合併症が多く、病院への入院を余儀なくされていた、体外式人工心臓装着患者に対して、安全に自宅にて心臓移植待機をさせることと、安全性を担保しつつ、筋芽細胞シート移植による Bridge to Recovery 治療を行うためである。本治療法を開発することにより、人工心臓の合併症を少なくでき、自宅での心臓移植待機が可能となる。

2. 心筋芽細胞シートを用いた重症心不全に対する前臨床研究

前臨床試験として、脂肪由来間葉系幹細胞より分化誘導された心筋芽細胞を用いて、心筋芽細胞シートを作成し、ブタ慢性期梗塞モデルに移植した。本細胞シートは梗塞心に生着し、超音波にて機能を解析したところ、コントロール群と比較し、心機能向上を認めた。移植した心筋芽細胞が心筋細胞特有の構造蛋

白を有しているか、ホスト心筋と電気的な接合を有しているか等の詳細な解析を行う予定である。

3. 筋芽細胞シート移植治療の可能性、安全性を適切に評価できるようなシステムの開発

臨床現場で筋芽細胞シート移植を行った際のデータ管理の基盤を整備するとともに、実施可能性、安全性、有効性に関する適切な生物統計学的評価のための方法論をはじめ、後続の諸種の臨床研究に必要な生物統計学的デザインに関する方法論を開発した。これらの方法論は、Bayes 流統計的推測方式に基づき、過去の知見（動物実験や論文で明らかにされた安全性あるいは有効性に関する情報）を事前情報として活用することができる点で、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を目指した心筋治療法の安全性・有効性における臨床評価の過程に大きく寄与することが示唆された。

4. CPC 図書作成に必要な施設・製造・品質保証要件の検討

細胞培養後の出荷判定基準設定と逸脱時の手順設定はCPC図書における最重要項目の一つである。本年度は出荷判定基準自体のバリデーションと設定値の再設定が可能となるような文章体系を策定した。

D. 考案

筋芽細胞シートの臨床研究においては、安定にGMP基準を維持した筋芽細胞シートを作成することが可能であり、また、左室補助人工心臓を装着した患者に移植可能であった。今後、本年度に開発した筋芽細胞シート移植の安全性・可能性に関する評価法をもとに、本臨

床研究を評価する予定である。また、植え込み型新規定常流補助人工心臓への植え替え治療“Bridge to Bridge”は、心臓移植まで安全にかつ合併症なく自宅待機できる可能性が示唆され、今後補助人工心臓を用いた“Bridge to Transplantation”治療に有意義な治療であるものと思われる。さらに、本研究で開発した“Bridge to Bridge”, “Bridge to Transplantation”治療をベースとした“Bridge to Recovery”治療を、筋芽細胞シートもしくは心筋芽細胞シートを用いて行う予定である。

E. 結語

本プロジェクトにより、細胞シート治療の安全性、可能性が示されるとともに、新しい植え込み型定常流人工心臓と細胞シートを用いた新しい心不全治療の可能性が示された。今後、心筋芽細胞シートの臨床応用を目指し、さらに治療効果を高める方法を模索する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表
各分担者の項参照
2. 学会発表
各分担者の項参照

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
各分担者の項参照
2. 実用新案登録
各分担者の項参照
3. その他
各分担者の項参照

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)

分担研究報告書

重症心不全患者に対する筋芽細胞シート移植に関する臨床研究

研究分担者 大阪大学医学系研究科心臓血管外科 助教 宮川 繁

国立循環器病センター心臓血管外科 医長 市川 肇

研究要旨

拡張型心筋症に対する新たな治療法として、再生細胞治療法を实践、先進医療化、ひいては保険医療化することを本研究の目的とする。前臨床研究として、重症心不全モデル動物に対して、脂肪組織幹細胞由来心筋芽細胞シートの治療効果の検討を行った。また、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり、筋芽細胞シート移植の臨床研究を重症心不全患者に対して行い、次世代の bridge-to-recovery 再生医療としての確立を目指した。

A.研究目的

これまで、我々は、心不全に対する新しい治療法として、筋芽細胞シート移植法を開発し、現在、左室補助人工心臓を装着した心不全患者に対する筋芽細胞シート移植治療プロトコールと左室補助人工心臓を装着する以前の段階の心不全患者に対する筋芽細胞シート移植治療プロトコールの2つの臨床研究を行っている。今回の研究の目的は、本治療法をヒト心不全患者に行い、本治療法の安全性、可能性を検討すること、および前臨床研究として、大動物心不全モデルに対する新しい細胞シート移植治療法の開発を行うことである。

B.研究方法

1. 当院にて左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対して、骨格筋採取を行い、当院未来医療センターの Cell processing centerにて、GMP 基準を満たす筋芽細胞を単離し、温度応答性培養皿を用いて、筋芽細胞

シートを作成する。

2. 左室補助人工心臓を装着していない心不全患者に対して、1と同様に骨格筋を採取し、筋芽細胞を単離培養し、筋芽細胞シートを作成する。

3. 筋芽細胞にかわる新しい細胞源として、脂肪間葉系幹細胞より誘導した、心筋芽細胞を分化誘導し、本細胞のシートを作成し、大動物心不全モデルに移植し、心臓超音波、組織学的検討を行い、その効果を解析する。

4. 新規植え込み型定常流人工心臓を装着し、筋芽細胞シート移植を行い、細胞シートによる人工心臓よりの“Bridge to Recovery”を目指す。また、体外式人工心臓より植え込み型定常流人工心臓への入れ替えを行い、安全に循環動態を維持しながら心臓移植まで自宅にて待機できるような、“Bridge to Transplantation”への橋渡し治療を行う。

(倫理面への配慮)

筋芽細胞シート移植法に関しては、大阪大学医学部倫理委員会、および大阪大学附属病院未来医療センターにて、本プロトコルの倫理性、妥当性に関して十分な議論が行われている。また、厚生労働省ヒト幹細胞委員会においても、本臨床研究は認可を受けている。まだ認可を受けていない植え込み型定常流人工心臓は、医師主導のもとに使用されており、既存の体外式補助人工心臓を本人工心臓に入れ替えるプロトコルも、本学倫理委員会にて承認を受けている。患者へのインフォームドコンセントに関しても、各種倫理委員会にて認可を受けた書面にて、承諾を得ている。

C. 研究結果

1. 心不全患者に対する筋芽細胞シート移植治療

左室補助人工心臓を装着した患者2例より、骨格筋を安全に採取を行うことが可能であった。大阪大学附属病院未来医療センターの Cell processing center にて、純度 96.3%、細胞数 7.5×10^8 の筋芽細胞を得ることが可能であり、計24枚の筋芽細胞シートを作成可能であった。本筋芽細胞シートを1名の患者に安全に移植し、現在評価を待っている段階である。また、もう1例も同様に、筋芽細胞を GMP 基準のもと、問題なく回収することができ、純度 59%、細胞数 5.1×10^8 であった。現在、筋芽細胞シート移植を予定している。また、人工心臓を装着していない心不全患者の骨格筋を同様の方法で安全に採取することが可能であり、現在 cell processing center にて培養中である。現在、重症心不全の患者で、筋芽細胞シートを移植する人が 2 名待機している。2 名とも重症の心不全であるため、骨格筋採取後、植え

込み型人工心臓の補助を必要とする可能性が考えられるため、本患者の心不全治療用に植え込み型人工心臓を待機させている。2 名の患者は 3 月末までに、治療を行う予定にしていたが、1 名は術前の検査で腫瘍マーカーが高値であり、腫瘍の精査をしなければ臨床研究を行うことができなかつたため、治療時期が遅延した。また、1 例は、重症心不全のため、カテコラミンを静注されていたが、薬剤性によるものと思われるアレルギーが発症し、このため、アレルギー性肺炎が発症し、ステロイド治療を行い、やっと最近治癒傾向を認めている。よって、2 例とも患者の病状により筋芽細胞シート、人工心臓装着の時期が遅れてしまった。他、筋芽細胞シート移植目的に、劇症型心筋炎後心筋症 2 症例に対して、左心室、右心室の循環補助目的に植え込み型定常流補助人工心臓を装着した。また、拡張型心筋症患者 2 例に筋芽細胞シート移植前の循環補助目的にて、植え込み型定常流補助人工心臓を装着した。

2. 細胞シートを用いた重症心不全に対する前臨床研究

前臨床試験として、脂肪由来間葉系幹細胞より分化誘導された心筋芽細胞を用いて、心筋芽細胞シートを作成し、ブタ慢性期梗塞モデルに移植した。本細胞シートは梗塞心に生着し、超音波にて機能を解析したところ、コントロール群と比較し、心機能向上(図1)を認めた。移植した心筋芽細胞が心筋細胞特有の構造蛋白を有しているか、ホスト心筋と電気的な接合を有しているか等の詳細な解析を行う予定である。

さらに、前臨床試験として、筋芽細胞と脂肪間葉系幹細胞を共培養した細胞シートを、血管網の構築のために大網組織と一緒に慢性期心不全ブタモデルに移植した。筋芽細胞と

脂肪間葉系幹細胞を共培養した細胞シートのみとの群と比較して、大網を同時に移植した群では、心機能の有意な向上を認めた(図2)。本方法を用いることにより、多量の細胞シートを心臓に供給することが可能であった(図3)。大網を用いた本移植法は、細胞シートを血管を構築しながら、多量の細胞シートを心臓に移植できる唯一の方法であり、今後の臨床応用が期待できるものと思われる。

3. 体外式左室補助人工心臓より植え込み型左室補助人工心臓への入れ替え

これまで、体外式左室補助人工心臓を装着されていた患者に対して、植え込み型補助人工心臓への入れ替えを4例行った。本治療の目的は、体外式人工心臓を装着して、心臓移植を待機した場合、脳梗塞、感染症の合併症が多く、病院への入院を余儀なくされていた。本治療法を開発することにより、人工心臓の合併症を少なくでき、自宅での心臓移植待機が可能となる。

D. 考案

筋芽細胞シートの臨床研究においては、安定にGMP基準を維持した筋芽細胞シートを作成することが可能であり、また、左室補助人工心臓を装着した患者に移植可能であった。今後、その筋芽細胞シートの安全性および機能の解析を行う予定であるが、問題点は、筋芽細胞シートの心臓への移植方法であると考えている。今後、筋芽細胞シート移植のデバイスの開発や、もしくは、前臨床試験で行った大網を移植支持体とした細胞シート移植法の臨床応用が有用であると考えている。また、大網を移植支持体とした移植方法は、大動物で行った実験であり、今後その詳細なメカニズムを小動物心不全モデルにても検証する必要があるもの

と思われる。

また植え込み型新規定常流補助人工心臓への植え替え治療は、心臓移植まで安全にかつ合併症なく待機することが可能であることが示され、今後補助人工心臓を用いた“Bridge to Transplantation”治療に有意義な治療であるものと思われる。また、このような合併症の少ない人工心臓の補助下に、細胞シートを用いた心筋再生治療が行われれば、新たな心不全治療を開拓できるものと思われる。

E. 結語

本プロジェクトにより、細胞シート治療の安全性、可能性が示されるとともに、新しい植え込み型定常流人工心臓と細胞シートを用いた新しい心不全治療の可能性が示された。今後、細胞シート治療の改良を加え、さらに治療効果を高める方法を模索する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

• Shigeru Miyagawa, Atsuhiko Saito, Taichi Sakaguchi, Yasushi Yoshikawa, Takashi Yamauchi, Yukiko Imanishi, Naomasa Kawaguchi, Noboru Teramoto, Nariaki Matsuura, Hidehiro Iida, Tatsuya Shimizu, Teruo Okano, Yoshiki Sawa. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets-A pre-clinical trial for tissue engineered regeneration therapy-. Transplantation 2010 in press.

• Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T, Kawaguchi N, Matsuura N, Sawa Y. Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. J Thorac Cardiovasc

Surg. 2009 Oct;138(4):985-93

・宮川 繁、斎藤充弘、澤 芳樹。心不全に対する再生治療の現状と展望。日本再生医療学会雑誌。2010, Vol.9, No.1。P.26-37。

・宮川 繁、斎藤充弘、澤 芳樹。心不全に対する再生治療の現状と展望。重症心不全の治療。補助循環・人工心臓・再生医療の実際。P140-151。

・宮川 繁、斎藤充弘、坂口太一、吉川泰司、山内 孝、斎藤俊輔、倉谷 徹、澤 芳樹。左室補助人工心臓を装着した拡張型心筋症患者に対して筋芽細胞シート移植を施行した1例。大阪ハートクラブ雑誌 印刷中。

2. 学会発表

・重症心不全に対する心筋再生治療 澤芳樹
日本心血管内分泌代謝学会(埼玉)10/23-24

・循環器疾患治療の未来にむけて 澤 芳樹
日本脈管学会(東京) 10/29-31

・Stem Cell Therapy for Severe Heart Failure
澤 芳樹 ナノバイオ・メディカル部会(岡崎)
11/4-6

・細胞シートによる不全心再生治療の現状と展望 宮川 繁 日本再生医療学会総会(東京)3.5-6

・心血管再生治療の現状と展望 宮川 繁 心血管再生治療研究会(熊本)3/5-6

・重症心不全に対する自己細胞組織移植と左室補助人工心臓を用いた集学的心筋再生治療 宮川 繁 日本人工臓器学会大会(新潟)11/13-15

・Myocardial regeneration therapy by cell sheet technology for severe heart failure 宮川 繁 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会(横浜)12/4-5

・Myoblast Sheet Implantation can Prevent the Impairment of Cardiac Diastolic Function and Late Remodeling after Left Ventricular Restoration in Severe Ischemic Cardiomyopathy Saito S. American Heart Association's Scientific Sessions(AHA) (Orland)11/15-18

・筋芽細胞シートはラット慢性期心筋梗塞モデルに対する左室形成後の再拡張を抑制する 斎藤俊輔 澤芳樹 日本胸部外科学会 定期学術集会(大阪)10/11-14

・A Combined Cell Sheets with Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells and Skeletal Myoblasts Provide Complete Myocardial Regeneration in Rat Myocardial Infarction Model Shudo Y. Sawa Y. American Heart Association(Orland)11/14-18

・A Combined Cell Sheets with Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells and Skeletal Myoblasts Provide Myocardial Regeneration Shudo Y. Sawa Y. 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会(札幌)12/4-5

・筋芽細胞シートと脂肪由来間葉系幹細胞を併用した細胞シートによるラット慢性期心筋梗塞モデルに対する心筋再生効果の検討 首藤恭広 澤芳樹 日本胸部外科学会 定期学術集会(横浜)10/11-14

・Local and Continuous Release of Adiponectin via Adipocyte Sheet Attenuates Cardiac Dysfunction after Acute Myocardial Infarction Imanishi Y. Sawa Y. 国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会(札幌)12/4-5

・Stable Delivery and Long-Term Survival of Sheet-Shaped Skeletal Myoblast in Infarct Myocardium. Imanishi Y. Sawa Y. 日本循環器学会 総会・学術集会(大阪)3/20-22

・重症心不全における細胞移植療法における同種アロ骨格筋筋芽細胞の有用性の検討
 Imanishi Y. Sawa Y. 日本再生医療学会総会(東京)3/5-6

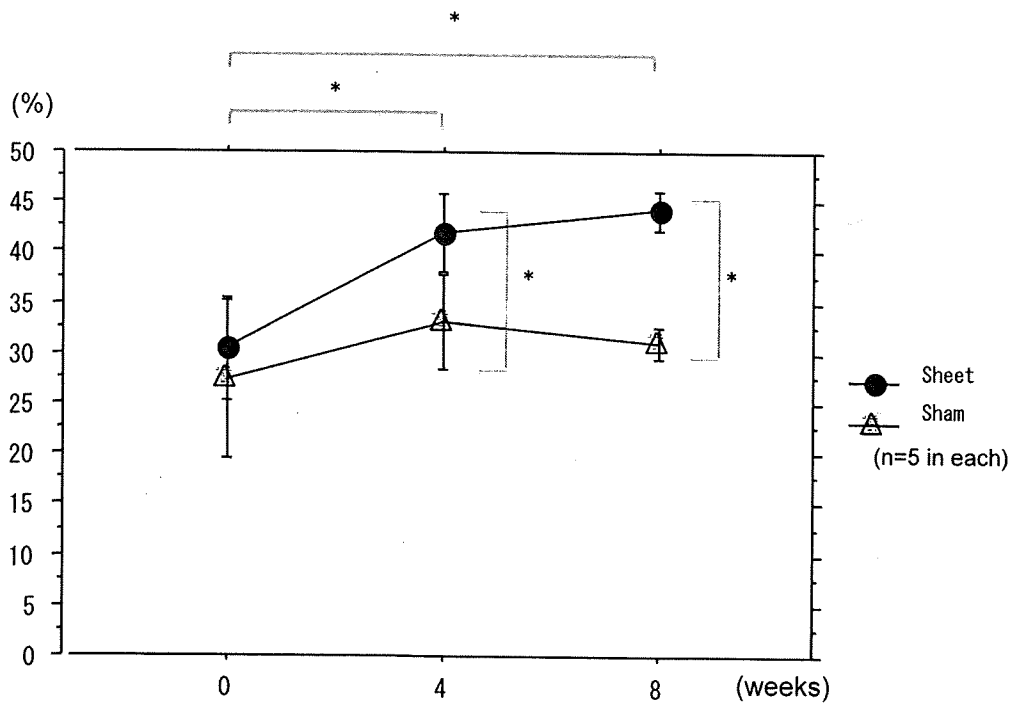
・誘導多能性幹(iPS)細胞由来心筋細胞シートによる心筋再生治療法の検討 三木健嗣 澤芳樹 再生医療学会 (東京)3/5-6

・Bioengineered cardiac tissue derived from Induced Pluripotent Stem Cells showed the functional integration with the impaired myocardium. Miki K. Sawa Y. International Society for Heart Research(札幌)12/4-5

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

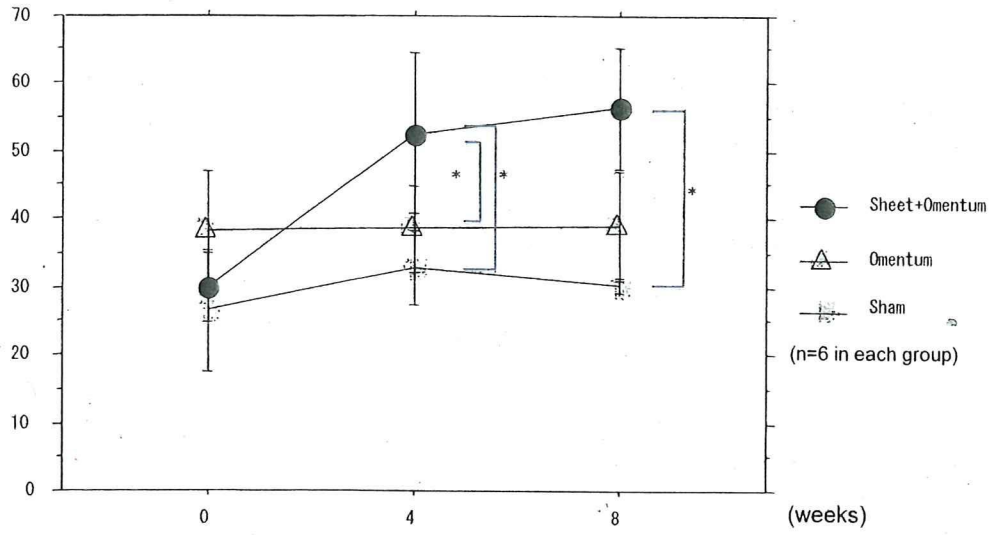
図1



* ; P<0.05

图2

(%)



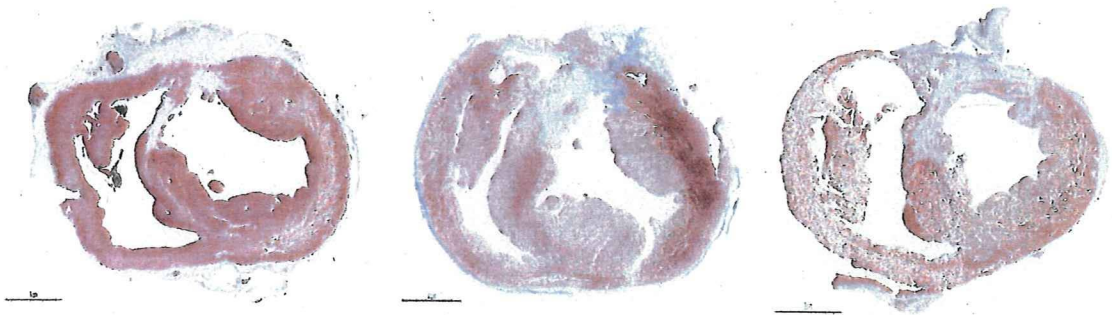
$P < 0.05$

图3

Sheet+Omentum

Omentum

Sham



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

ブタ慢性期梗塞モデルに対する脂肪間葉系幹細胞由来心筋芽細胞シートに
対する前臨床研究

研究分担者 大阪大学医学部附属病院 特任准教授 松山晃文

研究要旨

拡張型心筋症に対する新たな治療法として、再生細胞治療法を实践、先進医療化、ひいては保険医療化することを究極の目的と見据え、bridge-to-recovery を可能とする脂肪組織幹細胞由来心筋芽細胞移植臨床研究にむけ重症心不全モデル動物にて検証を行い、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり厚生労働大臣の意見を聞き、次世代の bridge-to-recovery 再生医療としての確立を目指すべく、大動物実験を行った。

A. 研究目的

拡張型心不全は予後不良な難治性疾患であり、特に end-stage 心不全にあつては1年死亡率が75%とされる。本症重症例に対しては心臓移植が究極の治療法である。臓器移植法の改正をみたが、ドナー不足が急速に解決される訳ではない。移植待機日数も1000日を超え、待機死する患者さんも多い。特に、拡張型心筋症の小児にあつては、本邦での実施例はなく、WHOにより海外渡航による移植が平成22年度には原則禁止される方針も示されており、新たな治療法の開発・我が国での保険医療化は喫緊の課題である。

拡張型心筋症に対する新たな治療法として、再生細胞治療法を实践、先進医療化、ひいては保険医療化することを究極の目的と見据え、bridge-to-recovery を可能とする脂肪組織幹細胞由来心筋芽細胞移植臨床研究にむけ、大量・安全・安定的なGMP対応細胞培養技術を開発、その安全性および有効性について重症心不全モデル動物にて検証を

行い、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり厚生労働大臣の意見を聞き、次世代の bridge-to-recovery 再生医療としての確立を目指すことを目的とする。

B. 研究方法

拡張型心筋症大動物モデルを作成するための条件検討を行う。大動物として豚を用い、ヒト由来細胞の移植に向け免疫抑制プロトコルの構築を行う。加えて、MPR社に依頼し、脂肪組織由来幹細胞及び骨格筋芽細胞にかかる特許調査、ならびに臨床研究プロトコル作成を行う。

製品標準書、製造手順書、製造指図書、製造記録書を策定にむけたデータ収集を行なうとともに、(財)先端医療振興財団の細胞培養施設を借り上げ、患者さんに投与する前のいわゆる cold run を実施する。臨床試験プロトコル策定については、MPR社に依頼する。

(倫理面への配慮)

前臨床・非臨床研究においては、各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。加えて、臨床試験の実施に際しては、研究計画書(プロトコール)に関して倫理委員会での承認を受け、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に基づき厚生労働大臣の意見を聞くこととしている。

C. 研究結果

重症心不全モデルブタとして、ミニブタ前下降枝をアメロイドリングにて結紮、下流の心筋細胞を減少させた個体を4週間後に重症心不全モデルブタとした。当該ブタにDMSO加培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞/多系統前駆細胞をシート化して移植した。移植後4週間後に心臓超音波検査にて心機能を非観血的に観察するとともに、移植後8週にて心臓超音波検査を実施するとともに、犠牲死させ組織学的検索を行った。

心機能増悪個体では成長にともなう体重増加が減少することが知られているため、シート移植時、移植後4週間ならびに8週間における体重増加をシート移植群と非移植群(コントロール群)にて比較検討した。移植後4週間では体重増加において2群に差は認めなかったが、中期観察にあたる移植後8週目ではシート移植群では3.5kgの体重増加を認めたのに対し、非移植コントロール群では0.5kgの体重増加しか認めず、有意な差を認めた。

次いで、心臓超音波検査における心駆出率に関して検討したところ、シート移植群では約30%の心駆出率が4週後には約42%、8週後には45%にまで改善していた。一方でシート非移植コントロール群では、28%から4

週後には32%、8週後には31%であり、心駆出率を指標とした心機能検査でも、シート移植群では有意な改善を認めた。

シート移植の有無による心筋壁厚に関して検討したが、前壁・後壁ともに、シート移植の有無で有意な差は認めえなかった。

左室拡張末期径および左室収縮末期径に関して比較検討したところ、移植後4週にては有意な差を認めえなかったが、移植後8週において両指標ともにシート移植群では非移植コントロール群と比較して減少を認めており、心不全の指標となる心拡大の軽減作用があることが明らかとなった。

組織学的に検討すると、DMSO加培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞/多系統前駆細胞移植群では、移植したヒト細胞がヒト特異的心筋アクチンを発現しており、当該細胞が移植後in situにて心筋へと分化生着していることが明らかとなった。加えて、移植部位のみならず、marginal zoneにおいてもヒト細胞由来心筋を認めることから、広範囲にわたり障害心筋組織を修復していることが明らかとなった。

D. 考察

DMSO加培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞/多系統前駆細胞の有効性が一定程度ではあるが示すことができた。「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年厚生労働省告示第425号)による医師法医療法下での臨床研究であれ、平成11年医薬発第906号通知にかかる確認申請を行うにしろ、有効性・安全性・品質が三大要件となることに異論はない。今後、大動物移植後12週間以上にわたる検索により心機能改善効果という有効性を検証する。加え

て、安全性の観点から、ヌードマウス移植による造腫瘍試験、染色体異常試験が必須であり、投与後急性毒性の有無を判定するために GLP での経静脈、経門脈、経心腔内投与による毒性確認が不可欠であり、特に平成 22 年度にあつては慢性毒性試験、対内動態試験が求められよう。今後の臨床展開を見据えれば、簡易にてこれら試験が実施できることが望ましく、軟寒天コロニー形成試験が造腫瘍試験の代替とできるか、CGH 試験が染色体異常試験の代替となりうるか、の検討も必須である。

E. 結論

DMSO 加培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞/多系統前駆細胞移植は、重症心不全患者にとって新規治療となる可能性が示された。今後、より長期にわたる移植後経過観察による有用性の検証、ならびに「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 18 年厚生労働省告示第 425 号）および平成 11 年医薬発第 906 号通知にかかる確認申請水準の GLP 試験が求められよう。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 松山晃文：「臓器移植・組織移植から再生医療へ—臓器・組織・細胞の procurement の観点から」臓器移植法の研究：第 3 章 8：町野朔編 上智大学出版 2010 印刷中
- 松山晃文：「再生医療と薬事法」臓器移植法の研究：第 3 章 9：町野朔編 上智大学出版 2010 印刷中
- 松山晃文：「再生医療とそれに伴う行

政施策」今日の移植 2010;23(2)印刷中

- 松山晃文：「再生医療の保険診療化 path」臓器移植法の研究：第 3 章 10：町野朔編 上智大学出版 2010 印刷中
- 松山晃文：「再生医療実用化にむけた産学連携の新しいかたち—技術研究組合制度活用による再生医療イノベーションへの提案—」再生医療 2010;9(1)95-99.
- 松山晃文：「最低限必要とされる要求事項」の明示による再生医療実現と社会還元の加速を目指して—再生医療研究大国につぼんの再生医療大国への道のり—」再生医療 2010;9(1)100-104.
- 松山晃文：「再生医療の現状」再生医療 2009;8(4)67-72
- 松山晃文：「再生医療の実現化—制度論的検討—」再生医療 2009;8(3)85-89.
- 松山晃文：「大学発シーズが成果を挙げられないのは何故か—知的財産の観点からの検討—」再生医療 2009;8(3)80-84.

2. 学会発表

- Okura H., Sawa Y and Matsuyama A. Cell-patches Composed with hADMPCs Derived Cardiomyoblasts (hCLCs) and Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells Improve Left Ventricular Dysfunction. (第 9 回再生医療学会学術集会)
- 第 4 回 PMDA 国際シンポジウム 平成 21 年 10 月 9 日 指定発言 「How to Translate Academic Seeds

into Industries.]

- Points to Consider on Efficient Development of iPS Cells-Based Tissue Engineered Medical Products
寒川延子 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日
- 米国、日本および国際幹細胞学会の幹細胞を用いる臨床研究ガイドラインの比較 濱田陽子 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日
- わが国における再生医療関連規制
山本彩 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日
- 再生医療製品の品質・安全性確保において「最低限必要とされる要求事項」の明示による再生医療実現を目指して 嗟峨礼美 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会

平成22年3月18日

- 再生医療実用化にむけた産学連携の新しいかたち—技術研究組合制度活用の提案— 大倉華雪 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日
- 再生医療そのビジネスモデル-needs-oriented business modelの構築に向けて- 大山玲子 松山晃文 第9回日本再生医療学会総会 平成22年3月18日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を目指した心筋治療法の
安全性・有効性評価のための生物統計学的デザイン・方法論の開発に関する研究

研究分担者 大門 貴志 兵庫医科大学 医学部 数学教室 講師

研究要旨

重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を目指した心筋治療法の開発にあたり、骨格筋芽細胞シート移植による bridge-to-transplantation 臨床研究が実施されている。本研究では、当該臨床研究の実実施計画書の作成に参画し、そのデータ管理の基盤を整備するとともに、実施可能性、安全性、有効性に関する適切な生物統計学的評価のための方法論をはじめ、後続の諸種の臨床研究に必要な生物統計学的デザインに関する方法論を開発した。これらの方法論は、Bayes 流統計的推測方式に基づき、過去の知見（動物実験や論文で明らかにされた安全性あるいは有効性に関する情報）を事前情報として活用することができる点で、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を目指した心筋治療法の安全性・有効性における臨床評価の過程に大きく寄与することが示唆された。

A. 研究目的

最近（2010年2月）、米国 Food and Drug Administration (FDA) より医療機器の臨床試験における Bayes 流統計学の使用に関する指針 “Guidance for the Use of Bayesian Statistics in Medical Device Clinical Trials” が提示されたが、この指針が提示されるに至るまでに、探索的臨床試験における Bayes 流統計的推測方式はすでに海外では注目・実践されており、我が国における適切な臨床評価の基盤の確立、その結果の患者様への還元の見点からみても、国内でのその適用の必要性が叫ばれていた。このことは、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation / recovery を目指した心筋治療法の開発に関する臨床研究でも例外でなく、

bridge-to-transplantation/recovery という今の前にいる患者さんを治療できる革新的な治療法の普及・確立には、適切な臨床評価の基盤を支える生物統計学的検討のためのデザインと方法論が必要になる。

本研究では、従来型の頻度流の統計的推測方式に目を向けるだけでなく、Bayes 流の統計的推測方式に基づくデザイン及び方法論を開発し、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation / recovery を目指した心筋治療法の実施可能性、安全性、有効性の生物統計学的評価へのその適用可能性を検討することを目的としている。

統計的推測の学派は大きくは Fisher 学派、Neyman-Pearson 学派、尤度学派、Bayes 学派に分類できるが、Bayes 流学派の他の学派に

ない二三の訴求点は、例えば、この接近法が科学研究の反復過程の定式化を自然な形式で提供し、その過程に主観的判断あるいは過去の知見を柔軟に組み込み、その理由で確率化操作 (randomization) に対する正当性を必要とせず、さらに、事後分布および予測分布の提示は主に頻度流で与えられる推定値や信頼区間よりも多くの情報と明瞭で受け入れ易い解釈を提供する点である。

B. 研究方法

本研究では、骨格筋芽細胞シート移植による bridge-to-transplantation 臨床研究の実施計画書の作成に参画するなかで、臨床医から彼らのこれまでの臨床経験に基づいて、当該およびそれに類似する臨床研究における統計的なデザイン及び方法論の開発に関していくつかの要望が提示されていた:

- 臨床研究に先立ち臨床医がもっている事前の情報、過去の知見、経験則に基づく主観的判断を統計的なデザインあるいは評価に組み込めないか。
- p 値、推定値、信頼区間よりも明瞭で受け入れやすい解釈を与える指標はないか。

「A. 研究目的」で記述したように、これらは頻度流にない Bayes 流学派の訴求点に該当している。また、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation / recovery を目指した革新的な心筋治療法の開発は、探索的な色合いの濃い臨床試験であり、少数例で行われること、さらには、新しい治療法の初めてのヒトへの適用であり、そこではその安全性の評価に重点をおくことが必要であることといった特徴を有している。したがって、この特徴も許容できる Bayes 流の統計的なデザイン及び方法論の開発が喫緊の課題であった。

臨床医らの上記の要望とともに、安全性の評価に力点をおく、探索的臨床試験で適用されている統計的デザイン・方法論の一つとして、連続再評価法 [O'Quigley J, Pepe M, Fisher L. Continual reassessment method: a practical design for phase 1 clinical trials in cancer. *Biometrics* 1990; 46: 33--48.] が知られている。この方法は、がん分野で適用されておりその地位はすでに確立されたものとなっている。本研究では、この確立された方法を基盤にして、重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を目指した心筋治療法の臨床研究の統計的なデザイン・評価に適合させる形で改良型連続再評価法を以下の手順で開発した。

【連続再評価法の改良】

連続再評価法では、従来、抗がん剤の用量毒性関係を規定するモデルが構築され、患者が組み込まれるごとに、その患者の用量・毒性データに基づいて Bayes 流に規定されたモデルが更新され、次の患者に割付けられる用量が決定される。さらには、最大耐用量も推定することができる。本研究では、抗がん剤の用量水準を、骨格筋芽細胞シート移植材料 (研究にあわせてその他の移植材料でもよい) の量あるいは移植面積 (または患者様より採取したそれらの量)、あるいは骨格筋芽細胞シート移植とその他の併用療法又は支持療法との組み合わせに関する治療水準へ対応付け、安全性 (毒性) にあたるものを当該臨床研究で対象とするシート移植に因果関係を有する有害事象へ対応付けることで、骨格筋芽細胞シート移植に係わる情報と安全性の関係構造を規定する統計モデルを構築することとし、このモデルに基づいて推定された許容される有害事

象発現率に対応する治療水準を各患者様に逐次的に割り付けることを検討した。このデザインあるいは方法論は、安全性の視点だけではなく、有効性の視点で構築することも可能である。

ただし、治療水準と有害事象発現確率との真の関係構造が未知であるが故に、ここで用いられるモデルは臨床医らの経験則で規定され、その恣意性が難点であった。したがって、本研究では、複数の臨床医らの経験則を許容する柔軟な統計的方法論が必要とされた。それ故、連続再評価法の改良版として、上記の複数の候補モデルを柔軟に選択できる「モデル選択型連続再評価法」を開発した。

この方法論では、複数の候補モデルを構築し、患者が試験に登録されるごとにそれらを更新し、Bayes 流モデル選択規準を通じて、最もあてはめのよいモデル一つを選択し、その選択されたモデルに基づいて試験に登録される次の患者への治療割付及びそれに関する有害事象発現率の推定を行うことができる。

【開発に用いたソフトウェア】

医薬品の臨床評価および健康管理介入の評価の過程、例えば、臨床試験に場を限定すると、生物学的同等性の評価、非逐次試験における標本サイズ的设计、逐次試験における中間モニタリング、検証的試験で獲得された結果の批判的吟味、適応型デザイン、薬動学、メタ・アナリシス、費用効果解析では、上記のFDAの指針をまたずとも、すでにBayes流接近法は大きな脚光を浴びており、この接近法の有用性が認識されている。これまでは、計算機の性能の限界を超えがちであった事後分布および予測分布に対する高次積分の数値計算、結果のグラフィカル表示の不慣れが難点と

して常に指摘され、この接近法の活用を躊躇させてきた。ただし、最近では、事前分布の選定に関して柔軟かつ実践的な多種多様な方式が提示され、最近の計算機の性能の向上とともに事後分布および予測分布に対する数値計算およびそれらのグラフィカル表示は諸種のフリー・ソフトウェアで実現され、難点は確実に解消されてきている。本研究では、Bayes流統計計算によく適用されるWinBUGS[<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs/>]とその他の高度な統計計算を可能にするR 2.6.2 [R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.], 従来法の検証のために市販の統計ソフトウェア（例えば、SAS）を用いた。また、上述のようにBayes流統計計算にはHigh Performance Computingが可能なデータ解析システムが必要であり、その基盤も整備した。

【仮想的臨床試験によるシミュレーション】

骨格筋芽細胞シート移植によるbridge-to-transplantation臨床研究、後続の重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation / recoveryを目指した革新的な心筋治療法に関する諸種の臨床研究に本研究で開発した統計的デザイン・方法論を即座に適用する前に、それらの臨床研究あるいは当該分野に限らない類似の臨床研究を反映する網羅的なシナリオに基づくシミュレーションを実行し、開発した統計的デザイン・方法論の性能を綿密に評価しておくことが、患者様保護の視点および倫理的な視点で必要不可欠である。

本研究では、図に示すように、重症拡張型

心筋症への bridge-to-transplantation / recovery を目指した革新的な心筋治療法のシート移植の量又は大きさ(あるいはその採取量なども考慮の対象とすることができる),あるいは本治療法と併用療法・支持療法の組合せからなる複数(ここでは, 6 個)の治療水準を設定し, その水準間で有害事象発現確率が単調に増加する二つのシナリオ (Scenario 1, Scenario 2) を検討した. また, ここでは, 治療水準と有害事象発現確率との関係構造に対して, 臨床医が過去の知見からモデル A およびモデル B で記述される二つの意見が提示されていると仮定し, それぞれのモデルが, 各シナリオの治療水準と有害事象発現確率との真の関係構造と一致していると仮定した. すなわち, Scenario1 においてモデル A が真の関係構造を記述し, Scenario2 においてはモデル B が真の関係構造を記述できている場面を想定している. 言い換えれば, Scenario1 ではモデル A に基づいて, Scenario2 ではモデル B に基づいて, 登録される患者様に対する治療水準を決定し, 各治療水準に対する有害事象発現確率を推定することが望ましいといえ, 本研究で開発したモデル選択型連続再評価法が, 各シナリオで適切なモデルを選択でき, 従来の連続再評価法(ここでは, モデル A を基盤とする連続再評価法 a とモデル B を基盤とする連続再評価法 b) よりも性能が優れているかを検証した.

シミュレーション回数(仮想的臨床試験の

数)は 1,000 とし, 登録される患者数は小規模試験を想定して 24 とした. また, 1 番目に登録される患者に割り付けられるのは, 図 1 において安全性を考慮して有害事象発現確率が最も低い治療水準 1 とする制約を設定した. 通常連続再評価法では, 個々のモデルが別個に更新され, 選択されたモデルに基づいて, 許容される有害事象発現確率(ここでは, 0.2 から 0.4)に近い治療水準が同定され, 次の登録患者に割り付けられる. 一方で, モデル選択型連続再評価法では, 上記の二つのモデルが連続再評価法の枠組みで同時に更新され, その二つのモデルのうち, デビアン스情報量規準に基づいて (Deviance Information Criterion based; DIC-based) [Spiegelhalter D, Best N, Carlin B, van der Linde A. Bayesian measures of model complexity and fit. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 2002; 64: 583-639.], あてはまりのよいモデルが信頼のおけるモデルとして一つ選択され, その選択されたモデルに基づいて, 許容される有害事象発現確率 (0.2 から 0.4) に近い治療水準が次の患者に割り付けられる.

性能評価の指標は, 試験終了時に許容される有害事象発現確率(ここでは, 0.2 から 0.4)に近い治療水準が選択される割合, その治療水準で治療される患者様の平均数, 有害事象の平均発生数とした.

Scenarios 1 and 2

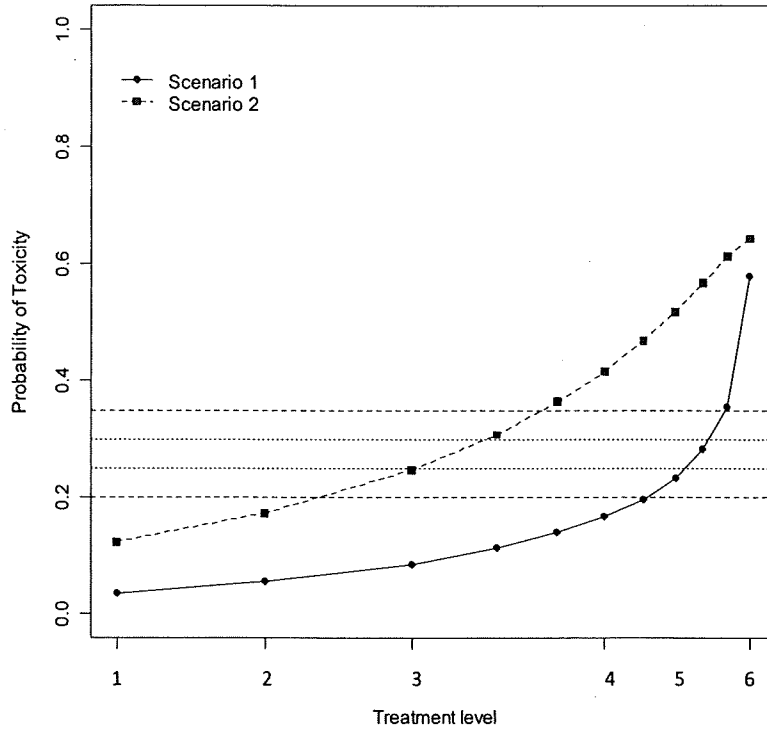


図. 検討した臨床研究シナリオ.

表. シミュレーション結果 (上段:1000 個の試験において, 試験終了時に治療水準が選択される割合, 下段:各試験中に治療水準で治療される患者様の平均数).

Design	1	2	3	4	5	6	Ave.No. of AE	No. of selection	
								Model A	Model B
DIC	0	0	3.8	37.9	57.2	1.1	4.589	13.9	10.1
-based	(1.092)	(0.196)	(3.186)	(9.434)	(10.987)	(0.105)			
a	0	0	2.0	30.8	66.8	0.4	4.831		
	(1.005)	(0.109)	(1.735)	(8.943)	(13.146)	(0.062)			
b	0	0	6.8	44.2	46.7	2.3	4.211		
	(1.087)	(0.336)	(4.545)	(11.520)	(7.364)	(0.148)			
DIC	1.9	15.5	56.4	24.2	1.9	0.1	7.146	7.1	16.9
-based	(2.151)	(3.192)	(11.635)	(6.924)	(1.097)	(0.001)			
a	0.8	9.9	53.7	33.5	2.1	0	7.939		
	(1.340)	(2.140)	(10.167)	(9.628)	(1.725)	(0)			
b	2.1	16.2	57.5	23.8	0.4	0	6.806		
	(2.233)	(3.780)	(12.176)	(6.462)	(0.345)	(0.004)			