

201024055A

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22（2010）年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 澤 芳樹

平成23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.....	8
--------------------------------------	---

大阪大学医学系研究科心臓血管外科 官川 繁

国立循環器病研究センター小児心臓外科 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	17
--	----

大阪大学医学部附属病院未来医療センター 松山 晃文

3. cGMP 対応の細胞培養システムの構築	22
------------------------------	----

先端医療振興財団先端医療センター研究所 再生医療基盤研究グループ

川真田 伸

4. 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	25
--	----

兵庫医科大学医学部数学教室 大門 貴志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 (別紙4)

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 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科 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、血管ネットワークを豊富に持つ大網と筋芽細胞シート移植の臨床効果、及び血管新生を促す薬剤と筋芽細胞シートを用いたコンビネーション治療の検討を行うとともに、筋芽細胞シート移植の臨床研究を重症心不全患者 10 例に対して行い、次世代の bridge-to-recovery 再生医療としての確立を目指した。

また、拡張型心筋症患者に対する、植え込み型人工心臓を用いた安全で、QOL の高い Bridge to Transplantation 治療を実践し、ひいてはヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり、Bridge to Recovery 治療として人工心臓装着重症心不全患者に対する筋芽細胞シート移植を 4 例行い、うち 2 例は人工心臓より離脱した。

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、具体的な研究目的は以下のとおりである。

1. 拡張型心筋症に対する新規治療の開発のため、臨床の現場では、筋芽細胞シートの重症心不全に対する移植、及び筋芽細胞シート移植の安全性・治療可能性の検討を行った。また、前臨床研究として、次世代細胞シート移植法を目指し、筋芽細胞シートと大網のコンビネーション治療、筋芽細胞シートと血管新

生薬剤とのコンビネーション治療の開発を本研究の目的とした。

筋芽細胞シートによる Bridge to Recovery 治療のみではなく、植え込み型補助人工心臓を用いた、自宅にて安全に心移植待機できる Bridge to Transplantation 治療を確立するとともに、移植待機中に再生型治療を用いた Bridge to Recovery 治療を行えるような新しい臨床プロトコルを模索することを目的とした。

2. 脂肪組織由来多系統前駆細胞由来心筋芽細胞移植の臨床研究にむけ、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うことを目的とした。

3. 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、および今回の臨床研究のデータをベースに、有効性が判定可能なスタディデザインを考案することを研究の目的とした。また心筋芽細胞移植治療の目標症例数の統計学的設定も検討した。

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4例の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。左室補助人工心臓を装着していない重症心不全患者に対して、筋芽細胞シート移植を行い、治療法の安全性・可能性を検討する。

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。植え込み型人工心臓への入れ替えだけではなく、新規に拡張型心筋症患者に植え込み型人工心臓を植え込み、Bridge to recovery 治療を促進するために、未だ確立されていない植え込み型定常流人工心臓の離脱テストを施行する。

筋芽細胞シートの次世代移植法の開発を行った。筋芽細胞シートと血管網の豊富な大網のコンビネーション治療を、大動物心不全モデルに施行し、心臓超音波、組織学的検討を行

い、その効果を解析する。また、筋芽細胞シートと血管新生誘導薬剤との併用による治療効果を同様の方法にて検討する。

2. ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞を採取し、DMSO にて心筋系細胞への分化誘導を行い、これらの細胞をシート状にして、ブタ慢性期心筋梗塞モデルに移植し、その臨床的効果を検討した。また、細胞の頻回投与の可能性も模索するため、同細胞を経冠動脈的にブタ心不全モデルに移植した。本心筋芽細胞移植の臨床研究にむけ、大量・安全・安定的な GMP 対応細胞培養技術を開発し、その品質の解析を行った。

3. 以下の視点で生物統計学的に予備的検討を行い、議論を行う。

- ・安全性及び有効性評価の観点からの心筋芽細胞移植研究における目標症例数の根拠づけ
- ・安全性の観点からの最適移植手順又は最適移植細胞数の Bayes 流逐次推定法の開発と応用

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。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4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、治療効果を期待できうる量、質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4名の左室補助人工心臓装着患者に安全に移植した。全例において、安全に、有害事象を認めず、筋芽細胞シート移植が可能であった。移植した4例のうち、3例において、心機能の向上効果を認め、うち2例は完全に人工心臓より離脱し、現在、自宅療養中である。(図3)

左室補助人工心臓を装着していない心不全患者6例に対して、筋芽細胞を単離し、所定量の細胞を培養することが可能であった。

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. 筋芽細胞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筋芽細胞を用いて、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。経冠動脈的投与においても、心機能の改善、生存率の向上が認められ、移植した細胞は、筋細胞の骨格蛋白を発現しており、筋細胞への分化が示唆された。移植した筋芽細胞が、宿主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。また、げっ歯類(ヌードラット)を用いた用量設定試験(non-GLP)と単回投与毒性試験(GLP)(経左心室腔内投与・経静脈投与)にて毒性の検討を行ったところ、毒性を認めなかった。安全性薬理コア・バッテリー試験では、中枢・呼吸安全性薬理試験(GLP)が終了し、中枢毒性、呼吸毒性ともに認められなかった。

先端医療センターが保有するCPCで再生筋芽細胞を用いて実施されたpre-cold run 2例での品質試験を実施し、そのデータを用いて細胞製造・品質保証に必要なアドバイスをを行った。また、感染症関連試験としてマイコプラズマ否定試験、エンドトキシン試験、無菌試験を実施し、施設バリデーション試験の補助を行い、もって得られたデータが治験水準であることを担保した。

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もしくは筋芽細胞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。

【安全性及び有効性評価の観点からの心筋芽細胞移植研究における目標症例数の根拠づけ】

移植臨床研究では、難治性疾患を対象とする場合もあることから、比較的少数に限定されることが多い。本研究では、その少数例における安全性及び有効性に関する評価可能性について生物統計学的視点から予備的検討を行った。安全性においては有害事象の真の発現率が高ければ、また、効果においては真の効果サイズが大きければ、少数例でもそれらを同定できる。逆にいえば、有害事象の真の発現率が低ければ、また、真の効果サイズが小さければ、少数例の試験では限界がある。いずれの場合においても、少数例の臨床研究は統計的検出力の不足を免れず、「探索」の立場にすることに留意すべきであり、安全性及び有効性の「検証」を目指すならばより規模の大きい試験を行うことが推奨される。

【安全性の観点からの最適移植手順又は最適移植細胞数の Bayes 流逐次推定法の開発と応用】

拡張型連続再評価法は、臨床医によりモデルが誤規定されたとしても、治療水準が選択される割合において頑健な結果をもたらすことが示唆された。

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。また、これらの再生型治療を小児心不全患者にも応用していく予定である。

今回の検討にて、脂肪間葉系幹細胞由来心筋芽細胞も、大動物実験のより臨床効果を有することが確認され、同細胞の安全性、および品質においても GMP 対応であり、今後の臨床応用が待たれる。また、細胞を用いた治療の臨床研究において、safety and feasibility study の目標症例数や臨床効果を解析できるスタディデザインを模索することができた。

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り、品質を担保された心筋芽細胞の臨床応用も今後検討する予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imanishi Y, Miyagawa S, Saito A, Kitagawa-Sakakida S, Sawa Y. Allogenic skeletal myoblast

- transplantation in acute myocardial infarction model rats.
Transplantation. 2011 Feb 27;91(4):425-31.
2. Miyagawa S, Roth M, Saito A, Sawa Y, Kostin S Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. Ann Thorac Surg. 2011 Jan;91(1):320-9. Review.
 3. Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets--a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. Transplantation. 2010 Aug 27;90(4):364-72.
2. 学会発表
1. 澤 芳樹. 心筋再生治療の現状と展望 第 26 回日本医工学治療学会 東京 2010 年 4 月
 2. 首藤恭広. 松宮護郎. 宮川繁. 坂口太一. 吉川泰司. 山内孝. 武田浩二. 井手春樹. 斎藤俊輔. 上仲永純. 清水達也. 岡野光夫. 大倉華雪. 松山晃文. 宮本尚子. 齋藤充弘. 澤 芳樹. 筋芽細胞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 第110回日本外科学会 定期学術集会 名古屋 2010 年 4 月
 3. Yukiko Imanishi. Shigeru Miyagawa. Norikazu Maeda. Ichiro Shimomura. Yoshiki Sawa. Adiponectin continuous delivery system by adipocyte sheet implantation attenuates cardiac dysfunction after acute myocardial infarction. 20th World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR) Kyoto 2010 年 5 月
 4. Yoshiki Sawa. Application of iPS cells for treatment of advanced cardiac failure ISHR World Congress 2010 京都 2010 年 5 月
 5. 澤 芳樹. 心筋再生治療の現状と未来 第 31 回日本循環制御医学会 大阪 2010 年 5 月
 6. Yasuhiro Shudo. Yoshiki Sawa. A combined cell sheets with adipose tissue derived mesenchymal stem cells and skeletal myoblasts wrapped the the omentum provide myocardial regeneration in pig myocardial infarction model. 20th World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR) Kyoto 2010 年 5 月
 7. Kenji Miki. Atsuhiko Saito. Sigeru Miyagawa. Hisazumi Uenaka. Tatsuya Shimizu. Teruo Okano. Shinya Yamanaka. Yoshiki Sawa. Bioengineered myocardium derived from Induced Pluripotent Stem Cells 27th International Society for Heart Research Kyoto 2010 年 5 月
 8. 澤 芳樹. 重症心不全に対する心筋再生治療 第 35 回日本外科系連合学会 東京 2010 年 6 月
 9. 澤 芳樹. 重症心不全に対する治療戦略 第 103 回日本循環器学会 北海道地方会 札幌 2010 年 6 月
 10. Yasuhiro Shudo. Shigeru Miyagawa. Hanayuki Okura. Atsuhiko Saito. Takahiro Higuchi. Sokichi Kamata. Tatsuya Shimizu. Teruo Okano. Akifumi Matsuyama. Yoshiki Sawa. A COMBINED CELL SHEETS WITH ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS AND SKELETAL MYOBLASTS WRAPPED WITH THE OMENTUM PROVIDE MYOCARDIAL REGENERATION IN PIG MYOCARDIAL INFARCTION

MODE 8th International Society for Stem Cell Reserch San Francisco 2010 年 6 月

11. Kenji Miki. Atsuhiko Saito. Sigeru Miyagawa. Hisazumi Uenaka. Tatsuya Shimizu. Teruo Okano. shinya Yamanaka Yoshiki Sawa. CARDIOMYOCYTE SHEETS DERIVED FROM IPS CELLS IMPROVE CARDIAC FUNCTION AND ATTENUATE CARDIAC REMODELING IN MYOCARDIAL INFARCTION MODEL RAT 8th International Society for Stem Cell Research San Francisco 2010 年 6 月
12. 澤 芳樹. 再生医療の現状と人工臓器とのかかわり 第 26 回日本人工臓器学会 教育セミナー 東京 2010 年 7 月
13. 首藤恭広. 宮川 繁. 澤 芳樹. Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells Enhance the Paracrine Effect of Myoblast Sheets in Rat Myocardial Infarction Model 第 33 回心筋代謝研究会 東京 2010 年 7 月
14. 澤 芳樹. 骨格筋芽細胞を用いた心不全治療 第 58 回日本心臓病学会 学術集会 東京 2010 年 9 月
15. 鎌田創吉. 宮川 繁. 坂口太一. 吉川泰司. 山内 孝. 齋藤俊輔. 上野高義. 倉谷 徹. 澤 芳樹自己免疫性心筋炎ラットにおける脂肪細胞シートの有用性の検討 第 3 回ナノ・バイオメディカル学会 横浜 2010 年 9 月
16. Yoshiki Sawa. Stem Cell Therapy for Severe Heart Failure 第 1 回国際細胞治療学会アジア太平洋地域学会 宮崎 2010 年 10 月
17. 澤 芳樹. 心不全治療のみらい 第 51 回日本脈管学会 総会 旭川 2010 年 10 月
18. 澤 芳樹. 重症心不全に対する筋芽細胞シート治療 第 14 回日本心不全学会 学術集会 東京 2010 年 10 月
19. Yasuhiro Shudo. Shigeru Miyagawa. Atsuhiko Saito. Taichi Sakaguchi. Yasushi Yoshikawa. Takashi Yamauchi. Sokichi Kamata. Satoshi Kainuma. Satoshi Nakatani. Tatsuya Shimizu. Teruo Okano. Yoshiki Sawa. Cell sheet based myocardial construct with well-developed vasculature network could deliver a large amount of cells to the scar in pig myocardial infarction model. 第 14 回日本心不全学会 学術集会 東京 2010 年 10 月
20. 首藤恭広. 宮川 繁. 齋藤充弘. 坂口太一. 吉川泰司. 山内 孝. 齋藤俊輔. 樋口貴宏. 鎌田創吉. 清水達也. 岡野光夫. 大倉華雪. 松山晃文. 澤 芳樹. 重症心不全における細胞シートと大網を用いた新しい大量細胞移植法の検討 Cell sheet based myocardial construct with well-developed vasculature network could deliver a large amount of cells to the scar in pig myocardial infarction model 第 63 回日本胸部外科学会 定期学術集会 大阪 2010 年 10 月
21. Yoshiki Sawa. Cardiac Regenerative Therapy 16th International Surgical Symposium cum 2nd West China - CUHK Surgical Forum 中国 2010 年 11 月
22. 澤 芳樹. 心筋はよみがえるか 第 26 回ライフサイエンスセミナー 西宮 2010 年 11 月
23. 澤 芳樹. 重症心不全治療のみらい 第 48 回日本人工臓器学会 大会 仙台 2010 年 11 月
24. Yasuhiro Shudo. Yoshiki Sawa. Myocardial layer Specific Effect of Cell Sheet implantation Therapy: Tissue Strain Imaging Study 48th American Heart Association Scientific Sessions 2010 (AHA) Chicago 2010 年 11 月
25. Yukiko Imanishi. Shigeru Miyagawa. Norikazu Maeda. Ichiro Shimomura.

Yoshiki Sawa. Continuous Adoiponectin Administration Using Adipocyte Sheet-Based Drug Delivery System Ameliorates Cardiac Dysfunction in Mouse Myocardial Infarction Model 48th American Heart Association Scientific Sessions 2010 (AHA) Chicago . 2010年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

26. 吉川泰司, 坂口太一, 宮川繁, 西宏之, 福嶋五月, 上野高義, 倉谷徹, 澤芳樹. 重症心不全患者に対する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果 第41回日本心臓血管外科学会 学術集会 東京 2011年2月
27. 首藤恭広, 宮川繁, 齋藤充弘, 坂口太一, 西宏之, 吉川泰司, 福嶋五月, 齋藤俊輔, 首藤恭広, 樋口貴宏, 鎌田創吉, 甲斐沼尚, 吉岡大輔, 清水達也, 岡野光夫, 澤芳樹. 重症心不全における細胞シートと大網を用いた新しい大量細胞移植法の検討 第41回日本心臓血管外科学会 学術集会 東京 2011年2月
28. 澤芳樹. 自己筋芽細胞シートによる心筋再生治療臨床研究 第10日本再生医療学会 大阪 2011年3月
29. 福嶋五月, Coopen Steven, 宮川繁, Yacoub Magdi, 澤芳樹, 鈴木憲. 虚血性慢性心不全に対する細胞移植後の不整脈発生に関する基礎的研究 第10日本再生医療学会 大阪 2011年3月
30. 樋口貴宏, 坂口太一, 宮川繁, 西宏之, 吉川泰司, 福嶋五月, 齋藤俊輔, 首藤恭広, 鎌田創吉, 齋藤充弘, 澤芳樹. iPS細胞由来心筋シート移植における電気的統合性と心筋再生効果の検討 第10日本再生医療学会 大阪 2011年3月
31. 三木健嗣, 齋藤充弘, 于涛, 樋口貴宏, 宮川繁, 澤芳樹. ヒトiPS細胞由来心筋細胞におけるアドレナリン受容体およびムスカリン受容体の検討 第10日本再生医療学会 大阪 2011年3月

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 大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 宮川 繁
国立循環器病研究センター 小児心臓外科 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、血管ネットワークを豊富に持つ大網と筋芽細胞シート移植の臨床効果、及び血管新生を促す薬剤と筋芽細胞シートを用いたコンビネーション治療の検討を行った。また、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。また、拡張型心筋症患者に対する、植え込み型人工心臓を用いた安全で、QOL の高い Bridge to Transplantation 治療を实践し、ひいてはヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり、人工心臓装着重症心不全患者に対する筋芽細胞シート移植を行い、Bridge to Recovery 治療を行った。

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血管新生を増幅した新しい細胞シート移植治療法の開発を行うことである。

また植え込み型補助人工心臓を用いた、自宅にて安全に心移植待機できる Bridge to Transplantation 治療を確立するとともに、移植待機中に再生型治療を用いた Bridge to

Recovery 治療を行えるような新しい臨床プロトコールを模索した。(図1)

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. 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。

4. 血管新生を促す大綱、またはプロスタグランジン製剤を筋芽細胞シートとコンビネーションさせ、同コンビネーション治療を、大動物心不全モデルに施行し、心臓超音波、組織学的検討を行い、その効果を解析する。

(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。

また、動物実験においても、大阪大学より承認を受け、実験を行った。

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

1-1. 左室補助人工心臓を装着した重症心不全患者に対する自己筋芽細胞シート移植

左室補助人工心臓を装着した患者4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、臨床プロトコルに使用可能であるレベルの筋芽細胞を得ることが可能であり、1人当たり計24枚の筋芽細胞

シートを作成可能であった(図2)。本筋芽細胞シートを4名の患者に安全に移植することが可能であり、臨床効果も認められた(図3)。

3症例において左室容積の縮小化、左室収縮能の改善を認め、大阪大学循環器内科・心臓血管外科との合同カンファレンスにて、人工心臓よりの離脱が可能であると判断され、人工心臓より3例離脱した。うち、2例は順調にカテコラミンを減量することができ、現在自宅にて療養中である。もう一例は、左室補助人工心臓より離脱できたが、輸血の副作用等があり、植え込み型人工心臓を再装着となった。植え込み型人工心臓装着後、術後経過良好で、現在自宅にて移植待機中である(図3)。

1例は、筋芽細胞シート移植にて心機能の向上を認めず、約2年間心移植待機し、昨年末に心臓移植を受けた。摘出した筋芽細胞シート治療を受けた心臓を観察すると、筋芽細胞シートを移植した部位において、非移植部位、及び人工心臓を装着した際の筋芽細胞シート移植前の検体と比較して、血管密度は高く、心筋細胞のデスミンの染色性も良好であった。1-2左室補助人工心臓を装着していない重症心不全患者に対する自己筋芽細胞シート移植

7名の心不全患者より、下肢骨格筋を採取し、筋芽細胞をGMP基準のもと、問題なく単離することができ、本臨床プロトコルに使用できる純度、細胞数の筋芽細胞を回収可能であった。また、温度応答性培養皿を用いて24枚/人の筋芽細胞シートを作成することができた。

6名の重症心不全患者に筋芽細胞シートを移植した。6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

機させた。

6例の症例のうち、4例が半年の観察期間を終了した。観察期間が終了した4症例において、様々なパラメーターにて機能回復効果を示した(図4)。現在2症例を経過観察中である。

2. 細胞シートを用いた新しい再生治療研究 —前臨床研究—

今回、我々は、筋芽細胞シート移植の臨床研究を行っているが、心機能が極めて悪く、心筋組織が高度な線維化を呈している不全心においては、筋芽細胞シートの心筋再生効果が低いことが予測できた。筋芽細胞シートの効果を増幅するためには、シート移植時に、なるべく沢山の細胞を生着させることが重要であり、そのためには、血管を再生させ、移植した細胞の血流を維持させることが必須であるものと考えられる。そこで我々は、筋芽細胞シートと大網とのコンビネーション治療、およびプロスタグランジン製剤と筋芽細胞シートとのコンビネーション治療の前臨床研究を行った。

2-1. ブタ慢性期梗塞モデルに対する筋芽細胞シートと大網のコンビネーション治療

自己筋芽細胞シートを作成し、筋芽細胞シートを大網で覆って、ブタ慢性期梗塞モデルに移植した。コンビネーション治療群においてはコントロール、筋芽細胞シート単独群と比較して、著明な血管新生を伴って、梗塞心に生着し、生着した細胞は移植後8週間にて損失されなかった。超音波にて機能を解析したところ、コントロール群、筋芽細胞シート単独群と比較し、心機能向上効果は増幅された(図5)。高感度 CT にて、大網の血管は、レシピエント心筋に延長し、新生血管は虚血心筋を灌流していることが判明した。大網を用いた本移植法

は、多量の細胞シートを血管を構築しながら、心臓に移植できる画期的な方法であり、今後の臨床応用が期待できるものと思われる。

2-2. プロスタグランジン製剤投与と筋芽細胞シート移植のコンビネーション治療

イヌに対して高速ペーシングを行い、拡張型心筋症モデルを作成した。プロスタグランジン製剤を拡張型心筋症イヌの心筋に直接投与し、同部位に筋芽細胞シートを移植した。このプロスタグランジン製剤は、in vitro にて、平滑筋細胞、血管内皮細胞に作用し、様々なサイトカイン(肝細胞増殖因子等)を発現させ、様々な臓器に作用することが知られている。この薬剤と筋芽細胞シートを拡張型心筋症イヌに投与し、その治療効果を検討した。

プロスタグランジン製剤のみを投与した群では、投与部位に一致して、局所機能が向上した。一方、筋芽細胞シートとプロスタグランジン製剤を同時投与した群では、全体的な心機能向上効果が認められた。

3. 植え込み型人工心臓による Bridge to Transplantation の実践

3-1. 重症心不全患者に対する植え込み型人工心臓の装着

これまで、14例の拡張型心筋症患者に対して、積極的に植え込み型人工心臓を装着し、うち12名は退院することが可能であり、現在自宅にて心移植待機している。これらの患者に対して、離脱テストを行っており、植え込み型人工心臓にて左室が unloading され、機能回復が認められた患者に対して、積極的に筋芽細胞シート移植を行い、Bridge to recovery 治療を行うことを考慮している。

3-2. 体外式人工心臓より植え込み型人工心臓への植え替え

これまで、重症心不全における治療として、体外式補助人工心臓のみが保険認可され、各病院で装着されていたが、同人工心臓は感染、脳合併症率も高く、一旦装着すれば、心臓移植まで病院に入院を余儀なくされていた。本プロトコールにて、安全な Bridge to Transplantation を実践するため、これまで体外式人工心臓を装着された患者で、心臓移植まで入院を強いられている患者に対して、植え込み型人工心臓への植え替えを行い、安全に自宅にて心臓移植を待機してもらえるようなプログラムを設定した。本臨床研究にて、4名の体外式人工心臓を装着した患者に対して、植え込み型人工心臓に入れ替え、全例成功し、自宅にて移植待機中である。また、これらの患者に対して、積極的に離脱テストを行い、左室 unloading により左室機能が回復した患者において、人工心臓よりの離脱基準に達しなければ、筋芽細胞シート移植を積極的に行い、Bridge to Recovery を行う予定にしている。

3-3. 植え込み型人工心臓装着患者に対する人工心臓離脱プログラムの検討

体外式人工心臓装着患者に対する離脱プログラムは当院にて確立されていたが、植え込み型人工心臓における離脱プログラムは世界的にも確立されていない。今後保険医療となり増加していくと考えられる植え込み型人工心臓による Bridge to Recovery 治療を進めるうえで、植え込み型人工心臓における離脱テストの確立は、解決すべき課題である。植え込み型人工心臓装着患者 例に対して、人工心臓離脱テストを行い、植え込み型人工心臓よりの Bridge to Recovery の可能性を検討した。

定常流式 LVAD においては、流入部・流

出部に逆流防止弁が存在しないため、LVAD を完全に停止すると大動脈から左心室への逆流を生じ、著明な心不全を発症する。そのため、定常流式 LVAD では拍動流式 LVAD と違い、完全に LVAD を停止しての LVAD off test を行うことができない。我々は、定常流式 LVAD の設定をデバイスの最低回転数まで低下させることで自己心に負荷をかけ、さらに生理食塩水によって心臓に容量負荷をかけて、それらに対する反応を分析し、拍動流式 LVAD の off test で得られた data と比較することで、定常流式 LVAD の離脱基準作成を試みた。以下に本プロジェクトで確立した定常流 LVAD の離脱テストの方法を記載する。

① 検査方法

LVAD による unloading と薬物治療を原則として3ヵ月間行った後にカテーテル検査室にて LVAD off test を行う。橈骨動脈または大腿動脈に動脈圧ラインを挿入、右大腿静脈より透視下に Swan-Ganz カテーテルを挿入する。Swan-Ganz カテーテルは右内頸静脈からの挿入も可能だが、同時に心エコーを行う必要があるため鼠径部からの挿入が望ましい。ヘパリンの投与は行わない。LVAD の回転数を段階的に最低回転数まで下げていき、各ポイントにおける血行動態・心機能の計測を行う。最低回転数では、5分間その回転数で運転したのちに計測を行う。LVAD の回転数は DuraHeart では Baseline、1500rpm、1350rpm、1200rpm（最低回転数）、

HeartMate II では Baseline、8000rpm、7000rpm、6000rpm (最低回転数) とする。回転数を低下する過程で、患者の自覚症状の著明の悪化を認めた場合はその時点で終了する。

② 水負荷試験

最低回転数での計測終了後、(1) PCWP の 10mmHg 以上の上昇、(2) LVEF の 10%以上の低下、(3) 本人の自覚症状の悪化のいずれも認めなかった場合に、最低回転数のままで水負荷試験を行う。水負荷試験は、10mL/kg/min の生理食塩水を中枢ルートより 15 分間手押しで注入する。水負荷開始後 3 分、6 分、9 分、12 分、15 分の各ポイントで計測を行う。

③ 計測項目

各ポイントにおける計測項目は以下のとおりである。

1) Baseline、最低回転数、水負荷 15 分

LVAD flow, HR, BP, PAP, PCWP, RAP, thermo CO/CI, Fick CO/CI, LVDd, LVDs, LVEF, PA SaO₂, Ao SaO₂

2) 1)以外のポイント

LVAD flow, HR, BP, PAP, PCWP, RAP

以上の方法を用いて、埋め込み型人工心臓 6 例の離脱テストを行った。結果は以下のとおりである。

- 1 例において、LVAD 回転数を最低回転数まで下げた際に息切れと胸部圧迫感が出現したため、水負荷試験を行わずに終了した。
 - 他 5 例においては、水負荷試験まで行い終了。特に症状の出現を認めなかった。
 - LVAD 離脱 テストに起因した合併症を認めなかった。
 - 症状が出現した症例においては、PCWP が 7mmHg (baseline) から 32mmHg (最低回転数)まで上昇した。
 - そのほかの症例においては、水負荷試験において PCWP の上昇を認める症例とあまり変化しない症例があり、水負荷に対する各計測値の反応は、拍動流式 LVAD における off test 時と類似していた。
 - Toyobo LVAD から DuraHeart に移行した 1 症例において、Toyobo LVAD 装着時に施行した off test の結果と DuraHeart にて施行した off test の結果を比較すると、計測の各ポイントにおいて類似した結果が得られた。(図 6) 本患者は Toyobo LVAD 装着後、筋芽細胞シートを移植し、心機能の向上を認めたため、LVAD よりの離脱を試みたが、LVAD よりの離脱後、輸血によるショックにて、植え込み型人工心臓を再装着した患者である。
- 2) 6 例の検査結果から得られる考察
定常流式植込み型 LVAD においても、LVAD 離脱テストは安全に施行し得ることが示された。定常流式植込み型 LVAD において各デバイスの最低回転

数まで LVAD 補助を減じることで、自己心に対して、拍動流式 LVAD を完全に停止させた時と同様な負荷をかけることができると考えられた。また、水負荷試験における各指標の変化は、拍動流式 LVAD における水負荷試験と同様に心機能（特に拡張機能）の指標となりうると考えられた。現在 6 症例と症例数が少なく、また実際に LVAD から離脱し得た症例がないため、今後さらに症例数を増やして検討を重ねる必要はあるが、定常流式植込み型 LVAD においても LVAD 離脱基準を作成できる可能性が示唆された。本離脱テストの結果をもとに、筋芽細胞シート移植の適応の可否を決定し、積極的に筋芽細胞シート移植治療を行う予定である。

D. 考察

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。移植した4例において、2 例の患者が左室補助人工心臓より離脱可能であり、本プロトコールは筋芽細胞シートの safety and feasibility study であるが、ある程度の有効性も推測できるものと思われた。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、今回の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型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。今回、大網を移植支持体とした前臨床研究を行い、その有用性を示したが、対象患者が重症心不全患者であるため、できるかぎり低侵襲な治療法を開発することが重要なポイントであるものと思われる。移植した筋芽細胞に対する blood perfusion 効果を持つ大網のかわりに、強力な血管新生効果を持つ薬剤とのコンビネーション治療も、治療の低侵襲化から鑑みるに、有効な手段であるものと考えている。今後、前臨床研究を行った、これらの新規治療法の臨床応用化を考え、研究を進めていく必要がある。

また、本治療法の高度先進治療申請も、本プロジェクトの一つの目標として掲げており、現在の safety and feasibility study を参考に、高度先進医療化を行うこととする。本プロジェクトは、高度先進医療化だけではなく、筋芽細胞シートの小児心不全への適応も目標としており、来期は、小児心不全への展開も考慮している。

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移植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。有効な Bridge to Recovery 治療を達成するためには、植え込み型人工心臓よりの離脱可能性を探る離脱テストを確立することが必須である。今期は、植え込み型人工心臓を装着した患者に対して、積極的に離脱テストを行い、植え込み型人工心臓における離脱テストの方法

を確立したが、来期は、植え込み型人工心臓装着患者に対する筋芽細胞シート移植治療による Bridge to recovery 治療が行われるものと思われる。

植え込み型人工心臓は、今春保険に認可され、特定の施設での植え込みが行われることが予想される。当プロジェクトで確立した植え込み型人工心臓における離脱プロトコールが臨床の現場で多数行われ、再生型治療を中心とした Bridge to recovery 治療に大きく貢献するものと思われる。

E. 結論

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、本プロジェクトで行った前臨床研究をもとに、さらに治療効果を高める新しい再生型治療が、臨床の現場で実施される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

本プロジェクトにおいて、健康に危険であった事象は認められていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Imanishi Y, Miyagawa S, Saito A, Kitagawa-Sakakida S, Sawa Y. Allogenic skeletal myoblast transplantation in acute myocardial infarction model rats. Transplantation. 2011 Feb 27;91(4):425-31.

2. Miyagawa S, Roth M, Saito A, Sawa Y, Kostin S Tissue-engineered cardiac constructs for cardiac repair. Ann Thorac Surg. 2011 Jan;91(1):320-9. Review.
3. Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, Kawaguchi N, Teramoto N, Matsuura N, Iida H, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets--a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. Transplantation. 2010 Aug 27;90(4):364-72.

2. 学会発表

1. Shigeru Miyagawa. Taichi Sakaguchi. Yasushi Yoshikawa. Takashi Yamauchi. Shunsuke Saito. Atsuhiko Saito. Yasuhiro Shudo. Yoshiki Sawa. From bench to bedside work in cell sheet-based myocardial regeneration therapy. 20th World Congress of the International Society for Heart Research (ISHR) Kyoto 2010年5月
2. 宮川 繁. 坂口太一. 西 宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 齋藤俊輔. 齋藤充弘. 首藤恭広. 清水達也. 岡野光夫. 倉谷徹. 澤 芳樹. 重症心不全に対する筋芽細胞シートを用いた再生治療 第48回日本人工臓器学会大会 仙台 2010年11月
3. 宮川 繁. 坂口太一. 西宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 齋藤俊輔. 齋藤充弘. 倉谷徹. 澤芳樹. 重症心不全に対する自己細胞による再生医療の展開 第41回日本心臓血管外科学会 学術集会 東京 2011年2月
4. 吉川泰司. 宮川繁. 坂口太一. 齋藤充弘. 西宏之. 福嶋五月. 齋藤俊輔. 首藤恭広. 澤芳樹. 左室補助人工心臓装置を要する末期拡張型心筋症患者に対

する自己筋芽細胞シート移植の臨床研究の効果 第 11 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月

5. 于 涛, 宮川 繁, 三木健嗣, 齋藤充弘, 河口直正, 松浦成昭, 澤芳樹. iPS 細胞由来心筋細胞の微細構造と機能の解析 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
 6. 松田剛典, 宮川 繁, 秋丸裕司, 小松-堀井美希, 齋藤充弘, 川本篤彦, 浅原孝之, 澤 芳樹. 心筋再生治療の為にヒト心臓由来 C-kit 要請細胞に対する維持培養法の検討 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
 7. 鎌田創吉, 宮川繁, 坂口太一, 西宏之, 吉川泰司, 福嶋五月, 齋藤俊輔, 今西悠基子. 心筋炎ラットに対するアディポネクチン産生細胞シートによる心筋再生効果の検討 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
 8. 首藤恭広, 宮川 繁, 齋藤充弘, 坂口太一, 西宏之, 吉川泰司, 福嶋五月, 齋藤俊輔, 甲斐沼尚, 清水達也, 岡野光夫, 澤芳樹. 重症心不全における新しい細胞移植法の検討: 細胞シートと大網を用いた大量細胞移植法 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
 9. 白坂知識, 宮川繁, 齋藤充弘, 河口直正, 中谷敏, 酒井芳紀, 大北裕, 澤芳樹. イヌ拡張型心筋症モデルに対する除 放 性 prostacline agonist (ONO1401MS) 心筋内投与の心筋再生効果の検討 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
 10. 今西悠基子, 宮川繁, 前田法一, 下村伊一郎, 澤芳樹. アディポネクチン産生能を有する脂肪細胞シートによる心不全治療に関する検討 第 10 回日本再生医療学会 大阪 2011 年 3 月
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

・ Heart Failure Summit の開催

2011 年 1 月 14 日、Heart Failure Summit を東京新橋にて開催し、厚生労働省官僚、経済産業省官僚、患者、研究者、企業関係者等多数の方が出席された(図 7)。岡野光夫教授(東京女子医科大学先端生命医科学研究所所長)、小室一成教授(大阪大学大学院医学系研究科循環器内科)を招き、第 1 線の研究者による再生医療の現状の解説、および実際に細胞シート治療や心臓移植を受けた患者に対するインタビュー、フリーディスカッションが行われた。多数の出席者より、質問が相次ぎ、本プロジェクトが目指す Bridge to Transplantation、Bridge to Recovery 治療に対する関心の深さ、社会的要望が大きいことが示された。今期も東京、大阪で Heart Failure Summit の開催を予定している。

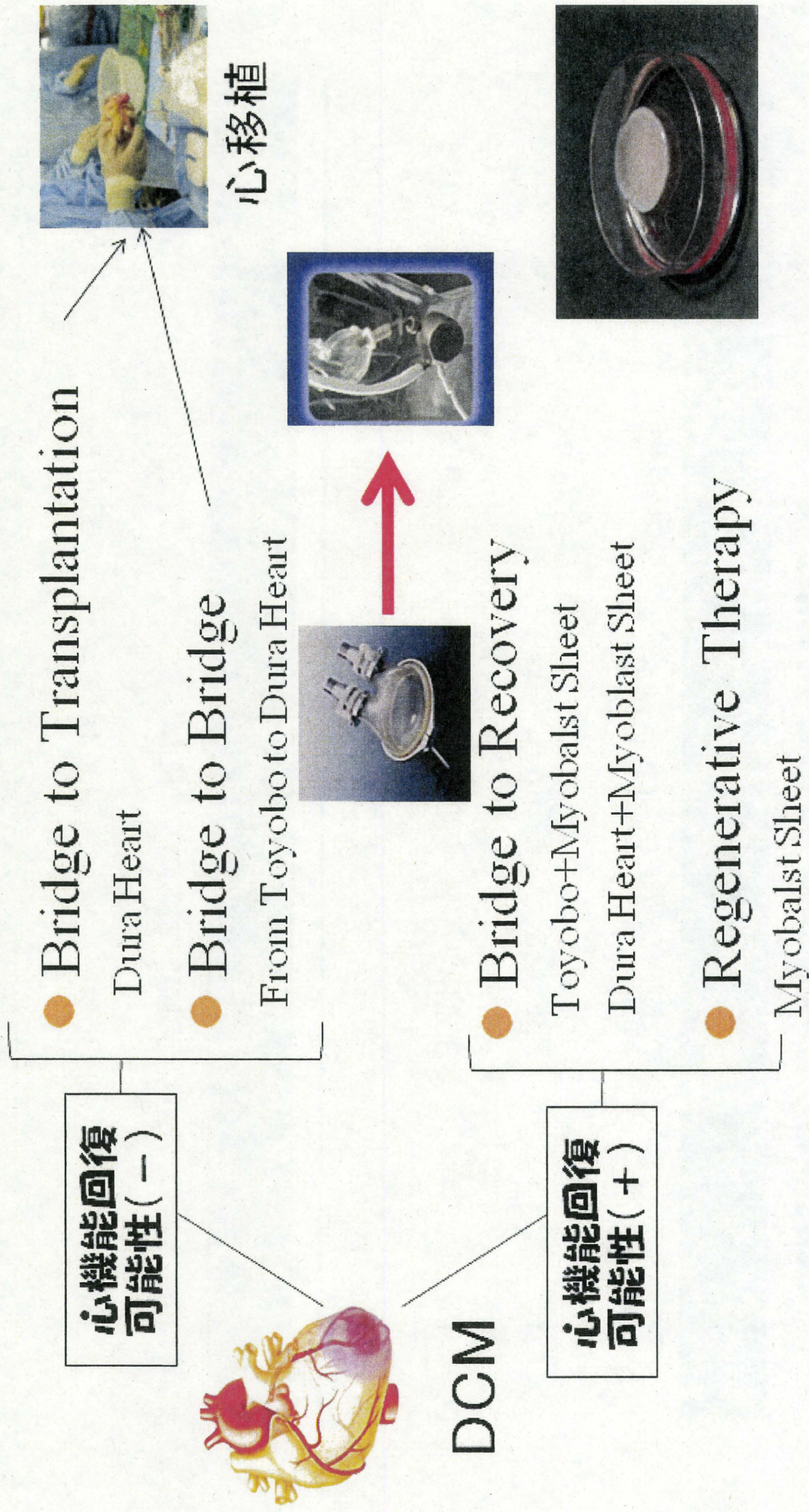
・ 重症心不全に対する筋芽細胞シート移植治療の高度医療申請

2011 年 3 月 7 日の厚生労働省にて、重症心不全に対する筋芽細胞シート移植治療の高度医療申請のための事前面談を行い、本治療法の高度先進医療化に関して活発な議論が行われた。

本プロジェクトにおいて得られた知見を基盤として、今回申請を予定している高度医療は筋芽細胞シートの有効性を反映するスタンダードデザインである必要があり、現

在、有効性を判定できるようなプロトコールを作成している。今春に高度先進医療として提出し、夏には認可されることを目標としている。

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



末期DCM患者の治療法の確立

臨床研究の進捗状況：細胞培養

Study 1		年齢性別	疾患	CD56 (+)	移植細胞数
No. 1	56M	DCM, LVAD	50.6 %	5.0×10^8	
No. 2	23M	DCM, LVAD	95.1 %	6.2×10^8	
No. 3	30M	DCM, LVAD	92.9 %	7.5×10^8	
No. 4	33F	DCM, LVAD	42.3 %	8.3×10^8	

Study 2		年齢性別	疾患	CD56 (+)	移植細胞数
No. 1	58M	ICM	67.6 %	8.2×10^8	
No. 2	36M	DCM	67.9 %	7.5×10^8	
No. 3	61M	ICM	57.7 %	8.7×10^8	
No. 4	53M	ICM	53.8 %	8.2×10^8	