

左室補助装置と自己由来細胞シート移植のまとめ

	Case 1		Case 2		Case 3		Case 4	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
HR	60	62	75	77	58	59	73	68
LVEDV(ml)	172	145 ↓	302	383	218	180 ↓	124	130
LVESV(ml)	110	77 ↓	245	320	122	89 ↓	78	71 ↓
LVEF(%)	36	47 ↑	19	16	44	50 ↑	37	42 ↑
LV mass	98	103	186	234	119	94	108	82
PVC/Holter (beats/day)	531	279 ↓	221	452	491	143 ↓	13889	4436 ↓
予後	離脱		心臓移植		離脱		離脱(再装着)	

LVEDV; 左室拡張末期容量、LVESV; 左室収縮末期容量、LVEF; 左室収縮率

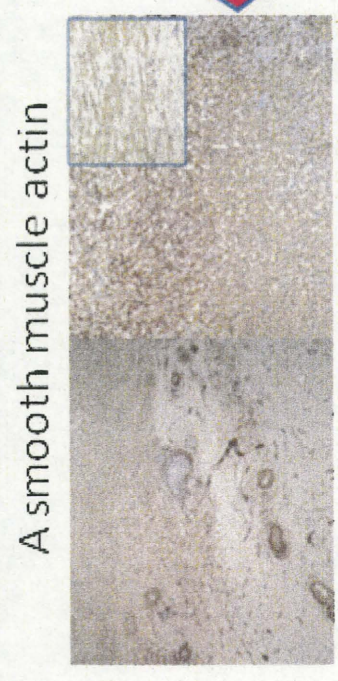
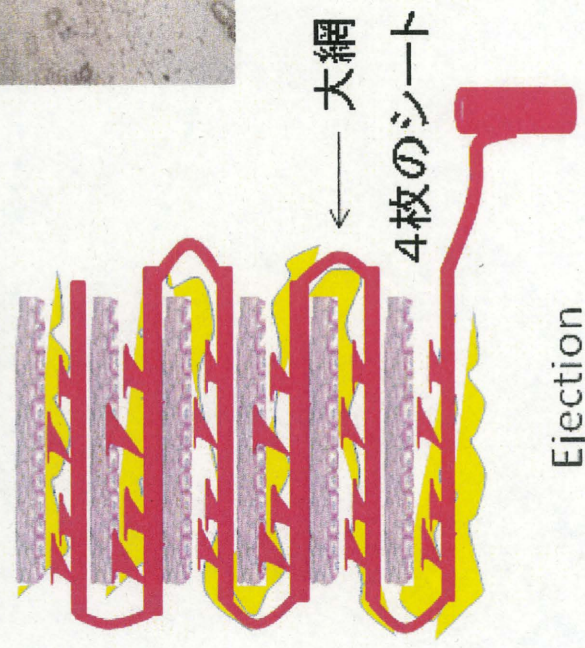
LVADを装着していない心不全患者に対する 筋芽細胞シート移植

Case	Age	Dx	手術	経過
1	58	ICM, EF25%, LVDD77	筋芽細胞シート移植	左室収縮能↑、左室容積↓、心筋 血流↑、運動耐用能↑
2	36	DCM, EF 18%, LVDD75	筋芽細胞シート移植	左室機能→。右室機能↑。カテコラ ミンから離脱し、退院。
3	61	ICM, EF=16%, PH(+)	筋芽細胞シート移植	左室収縮能→、左室容積↓、心筋 血流↑、運動耐用能↑
4	53	ICM, EF 24%, LVDD77	筋芽細胞シート移植	左室収縮能→、左室容積↓、心筋 血流→、運動耐用能↑
5	58	DCM, EF 19%, LVDD80	9/28 MVR + 骨格筋採取 11/26 筋芽細胞シート移植	経過観察中
6	58	DCM, EF 28%, LVDD52	筋芽細胞シート移植	経過観察中
7	54	ICM, EF 15%, LVDD71, PH(+)	骨格筋採取	

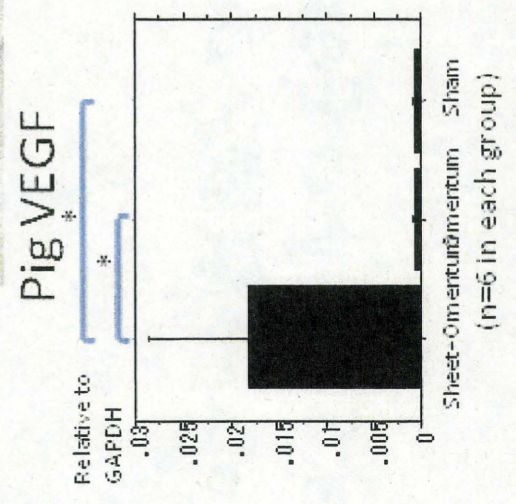
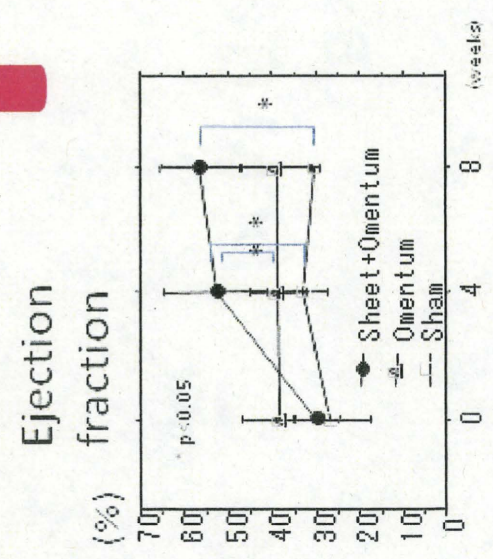
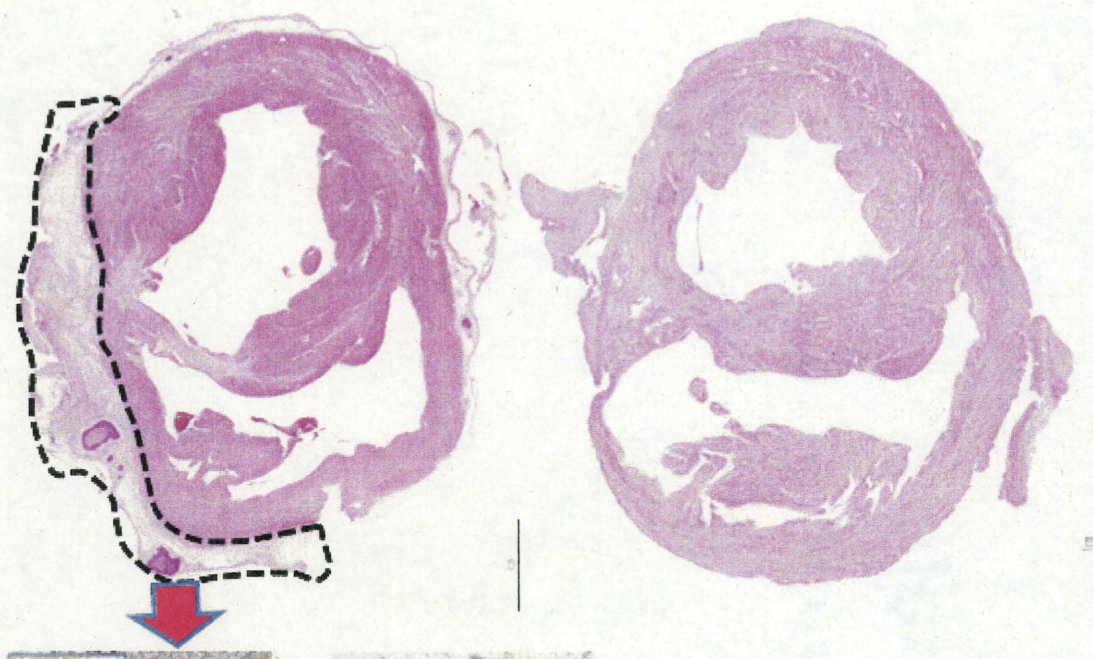
ICM;虚血性心筋症、DCM;拡張型心筋症、EF;左室収縮率、PH;肺高血圧症

筋芽細胞+大網のブタ慢性期梗塞モデルへの移植

計30枚の細胞シート



Factor VIII

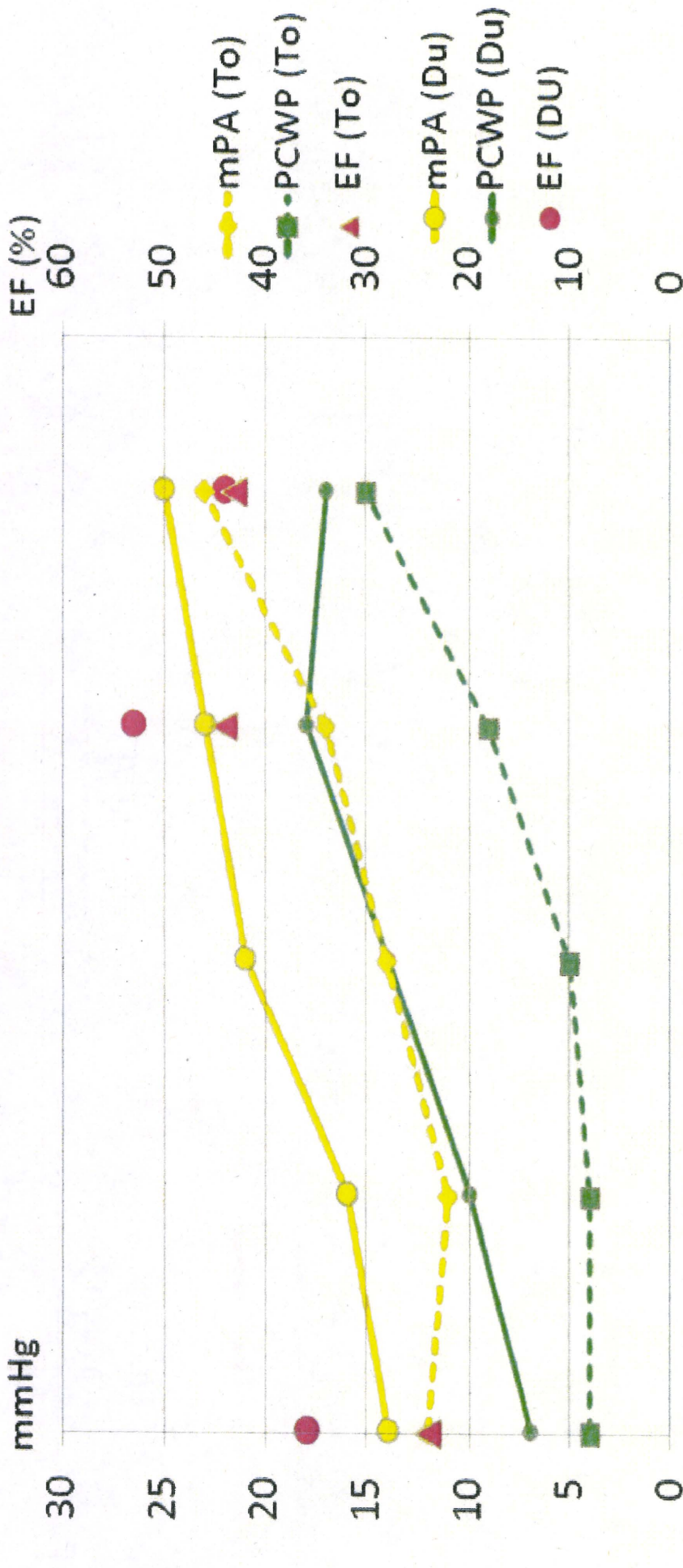


(week)

Sheet-Omentum Sham (n=6 in each group)

Case 5 38y.o Female

DCM (Toyobo → 離脱 → Dura Heart)



HEART FAILURE SUMMIT

— 今後の心不全治療のあり方 —

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」より

主催：大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科

平成23年1月14日(金)12:00 ~ 15:30

TKP新橋ビジネスセンター
東京都港区新橋1-1-1 日比谷ビルディング3階 H-3A

プログラム

12:15 - 12:30 開会挨拶

慶應大学医学部 名誉教授 猿田享男

12:30 - 13:00 講演

東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 所長 岡野光夫

13:00 - 13:30 講演

大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科 教授 小室一成

13:30 - 14:00 講演

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 教授 澤 芳樹

14:00 - 14:30 講演

厚生労働省疾病対策課 課長補佐 荒木裕人

14:30 - 15:20 総合パネル

「再生医療・補助人工心臓・心臓移植患者さんの立場から」

15:20 - 15:30 閉会挨拶

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 教授 澤 芳樹

後援：日本再生医療学会
NHK大阪放送局

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未来医療センター 松山晃文

研究要旨

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。拡張型心筋症に対する新たな治療法として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、その経冠動脈移植による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、有効性および安全性が確認され、新規治療となる可能性を示した。

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、再生細胞治療法を実践、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、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する。

B. 研究方法

1) 細胞

細胞治療の細胞源としては、研究協力機関である神戸大学形成外科一瀬晃洋准教授より手術時余剰皮下脂肪組織を倫理委員会の承認のもと患者同意を取得したのち提供を受ける。当該脂肪組織から新規間葉系幹細胞として本研究分担者が確立した方法でヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を培養し、実験に供した。

再生心筋芽細胞は、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を0.1%DMSO加48時間で培養

して得た。

2) 動物

重症心不全モデルとして豚を選択、心不全モデルを作製した。免疫抑制剤としては、タクロリムスあるいはシクロスポリンを選択した。

3) コールドラン

GMP 対応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 を実施し、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。

(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

《これまでの研究戦略》

平成 22 年 11 月 1 日付けで改定された厚生労働省告示第 380 号(改定:ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針)にのっとれば、平成 11 年医薬発第 906 号通知による確認申請を得る必要がなくなった。一方で、確認申請は細胞加工医薬品等の安全性及び品質を担保するための施策であるのに対し、ヒト幹細胞指針では臨床プロトコールの審査が主体であるため、確認申請が担っていた細胞加工医薬品等の安全性及び品質に関しては、より厳格に審査されることとなる。となれば、ヒト幹細胞臨床研究を経由して、高度医療評価制度(第 3 項先進医療)から、医師の手技としての保険

収載からの社会還元を目指すとしても、薬事法と同等の審査を受けることとなり、本研究でも薬事法下で行われるであろう審査を見越した研究立案が不可欠となった。

薬事法 1 条によると、医薬品の 3 要件は有効性、安全性、品質である。研究開発当初より医薬品としての開発を念頭に入れ、有効性・安全性・品質に関しては CTD package (図 1) に適応した非臨床試験デザインと文書作成を行ってきた。

平成13年6月21日付け医薬審発第899号

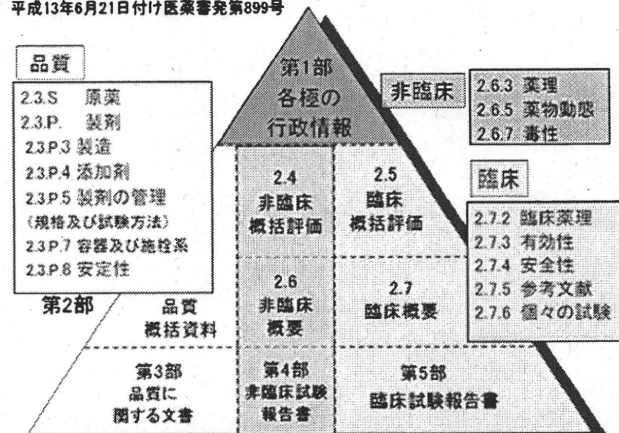


図 1 CTD の構成

《研究成果》

これまでに得られている研究成果に関し、有効性、安全性、品質の観点から報告する。

1) 有効性

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞に DMSO 加培養 48 時間で心筋芽様細胞に誘導されることを見出し、慢性心筋梗塞モデルラットへの移植で心機能と長期生存率が改善することを見出し、報告した (Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose

tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. Tissue Eng Part C Methods. 16(3):417-25. 2010.). 臨床利用にむけ、大動物での有効性検証のため、免疫抑制化慢性心不全モデルブタを作製、当該動物への経冠動脈投与で心機能の改善と長期生存率改善を認め(図2)、その重症心不全への有効性を示した。また、被投与細胞が重症心不全モデルブタ心臓組織内で心筋細胞への分化を組織学的に確認(図3)、細胞加工医薬品として *in situ* differentiation が作用機序であることを示した。

平成23年度においては、有効性にかかるCTD要求試験では、ブタを用いる有効性用量設定試験を実施することとしている。

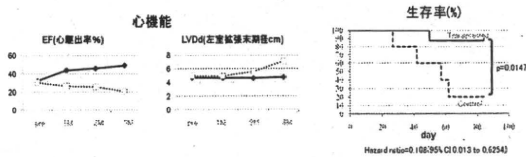


図2 有効性:心機能および生存曲線

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を用いる細胞製剤投与群(実線)では、コントロール群(破線)よりも心臓出率が改善しており、左室拡張末期径は悪化していない。長期生存では、細胞製剤投与群(実線)では有意な改善を認めた。

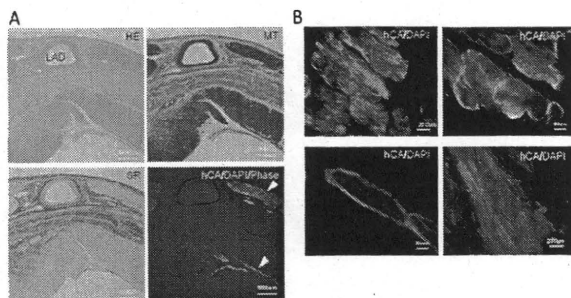


図3 心筋細胞への分化

- A. 心筋横断観察にて、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞から分化した心筋細胞(緑:ヒト alpha 心筋アクチン陽性細胞)がブタ心筋組織内に分布していることが示される。
- B. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞から分化した心筋細胞が、横紋構造を示している(緑:ヒト alpha 心筋アクチン)。

2) 安全性

細胞固有特性の評価として造腫瘍試験、軟寒天コロニー形成試験、核型分析試験をGLPにて終了した。

毒性試験として、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。

慢性毒性試験と体内動態試験(運命試験)を兼ねて3頭の慢性心筋梗塞モデルブタへの細胞投与後6カ月経過観察した。FDAのOrgan Panelを参考に30臓器をリストアップし、各々につき肉眼的所見、組織学的病理所見を確認、慢性毒性試験として病的所見を認めていない。これまでの非臨床安全性試験に關しては表にまとめた(表)。

試験項目	水準	試験薬	試験薬	適用方法	試験結果
慢性毒性試験	GLP	PS hADMPCs	肝動脈投与		Let a, b, 正常
		PS hADMPCs	肝動脈投与		Let a, b, 正常
		PS hADMPCs	肝動脈投与		Let a, c, 軽度改善
DGH	non-GLP	hADMPCs	腹腔内注射		Let a-c, 軽度改善
		PS vs PS, PS vs PS, PS vs PS	腹腔内注射		Let a-c, 軽度改善
急性毒性試験	non-GLP	hADMPCs PS	皮下注射		Let a-c, 正常
急性毒性試験	GLP	PS hADMPCs	静脈注射		Let a-c, 軽度改善
慢性毒性試験	GLP	DMSO投与群 PS hADMPCs	ヌードラット		Let a-c, 正常
		PS hADMPCs	ヌードラット		Let a-c, 正常
慢性毒性試験	GLP	CAGC投与群 PS hADMPCs	ヌードラット		Let a-c, 正常
		PS hADMPCs	ヌードラット		Let a-c, 正常

試験項目	基準	評価	実施状況	評価方法	実施結果
安全性試験	GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞) (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	急性毒性試験 (LD50)	急性毒性試験 (LD50)
体内動態試験 (遺伝子検査)	non-GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	遺伝子検査 (PCR)	遺伝子検査 (PCR)
		DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施中	遺伝子検査 (PCR)	遺伝子検査 (PCR)
非経路試験	non-GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	非経路試験 (体内動態)	非経路試験 (体内動態)
保存安定性試験	non-GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	保存安定性試験 (長期)	保存安定性試験 (長期)
細胞安定性試験	non-GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	細胞安定性試験 (長期)	細胞安定性試験 (長期)
Lineage試験	非特異 GLP	DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (DMSO加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞)	実施済	Lineage試験 (長期)	Lineage試験 (長期)

今後、非げっ歯類での安全性毒性試験、薬理試験を実施する必要があるれば、臨床研究開始前までに non-GLP で行うこととしている

3) 品質

GMP 対応細胞培養システムの構築にむけ、治験水準の製品標準書、標準手順書、製造指図書・記録書を作成した。GMP 対応プレ・コールドランを 2 例実施し、手順書・指図書の改定・修正を行ったところである。

細胞特性解析・生物学的同等性の検定のため、248 種類の細胞表面マーカーについて合計 5 ロットの再生心筋芽細胞を検討し、品質担保に重要な 3 種類のマーカーを選定 (CD45 陰性、CD44 陽性、CD90 陽性)、その他品質を担保する規格を設定した(表)。

製品出荷規格	
試験	測定基準
外観	淡黄白色混濁液で異物混入及び沈澱れなし
細胞濃度	未設定
細胞生存率	70%以上
細胞分布	未設定
純度 (細胞表面マーカー)	CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性
転写因子陽性遺伝子検査 (RT-PCR法)	Islet-1, nkx2.5, GATA-4陽性
マイコプラズマ	陰性
エンドトキシン	検出限界当たり1.67EU/ml以下
菌数	陰性
細胞由来成分否定試験	BSAを指標にELISACによる検出以下確認
モニタリング項目	
試験	
心筋標成蛋白の検出 (RT-PCR法)	alpha-CA, MLC, MHC, cardiac Troponin I等
重要中間体(P5 or 6)でのモニタリング項目	
試験	
細胞表面マーカー	CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性
細胞増殖能	未設定
転写因子陽性遺伝子検査 (RT-PCR法)	Islet-1陽性
数値分化	分化確認
骨芽細胞分化	分化確認
脂肪細胞分化	分化確認

今後も、GMP 対応 CPC を借り上げ、平成 20 年薬食発第 0208003 号通知および同 Q&A に則して、コールドラン 5 例を実施し、平成 24 年度目途にヒト幹細胞臨床研究申請を行うこと

としている。

D. 考察

DMSO 加培養ヒト脂肪組織由来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 22 年厚生労働省告示第 380 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 6 カ月にもわたる検索により心機能改善効果という有効性が検証する。特に平成 23 年度にあつては安全性に関しては慢性毒性試験、体内動態試験、有効性に関しては有効性用量設定試験、品質に関しては CPC におけるコールドラン最低 5 例の実施と検証が必須である。

E. 結論

DMSO加培養ヒト脂肪組織由来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22年厚生労働省告示第380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。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Komoda H, Okura H, Lee C-M, Sougawa N, Iwayama T, Hashikawa T, Saga A, Yamamoto-Kakuta A, Ichinose A, Murakami S, Sawa Y, Matsuyama A. Reduction of Neu5GC Xenoantigen on Human ADMSCs lead to Them as Safer and More Useful Cell Sources for Realizing Various Stem Cell Therapies. *Tissue Eng Part A*. 16(4):1143-55. 2010.
- ② Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T, Sawa Y. Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Eng Part C Methods*. 16(3):417-25. 2010.
- ③ Okura H, Yamashita S, Ohama T, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Hamada Y, Ohyama R, Sawa Y, Matsuyama A. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *J Atheroscler Thromb*. 17(6):568-77. 2010.
- ④ Okura H, Saga A, Soeda M, Ichinose A, Nagai K, Moriyama M, Moriyama H, Miyagawa S, Sawa Y, Tahara S, Hayakawa

T, Matsuyama A. Intracoronary artery transplantation of cardiomyoblast-like cells from human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells improve left ventricular dysfunction and survival in a swine model of chronic myocardial infarction. *In Submission*.

- ⑤ 松山晃文：「大動脈炎症候群 —その臨床症状と検査所見」*医学のあゆみ* 233(4) 274-278. 2010
- ⑥ 松山晃文：「再生医療とそれに伴う行政施策」*今日の移植* 23(2)：165-172. 2010

2. 学会発表

松山晃文：「幹細胞製剤の適応—Science・Translational R&D・Publicへの展開という観点から—」第14回日本適応医学会学術総会 東京 平成22年7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
該当なし

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

cGMP 対応の細胞培養システムの構築

研究分担者

（財）先端医療振興財団 再生医療研究開発部門
再生医療基盤研究グループ グループリーダー 川真田 伸

研究要旨

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。拡張型心筋症に対する新たな治療法として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、pre-cold run のデータをもとに pre-cold run を実施することで、実際の臨床に供する培養細胞の細胞規格と出荷判定基準の設定が可能となった。

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、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、その品質の担保を行うことを目的とする。

B. 研究方法

CPCで再生心筋芽細胞を用いて実施されたpre-cold run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。

（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

平成 22 年 11 月 1 日付けで改定された厚生労働省告示第 380 号(改定:ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針)にのっとれば、平成 11 年医薬発第 906 号通知による確認申請を得る必要がなくなった。一方で、確認申請は細胞加工医薬品等の安全性及び品質を担保するための施策であるのに対し、ヒト幹細胞指針では臨床プロトコルの審査が主体であるため、確認申請が担っていた細胞加工医薬品等の安全性及び品質に関しては、より厳格に審査されることとなる。となれば、ヒト幹細胞臨床研究を経由して、高度医療評価制度(第 3 項先進医療)から、医師の手技としての保険収載からの社会還元を目指すとしても、薬事法と同等の審査を受けることとなり、本研究でも薬事法下で行われるであろう審査を見越した研究立案が不可欠となった。

薬事法 1 条によると、医薬品の 3 要件は有効性、安全性、品質である。研究開発当初より医薬品としての開発を念頭に入れ、有効性・安全性・品質に関しては CTD package (図 1) に適応した非臨床試験デザインと文書作成を行ってきた。

平成 13 年 6 月 21 日付け医薬発第 899 号

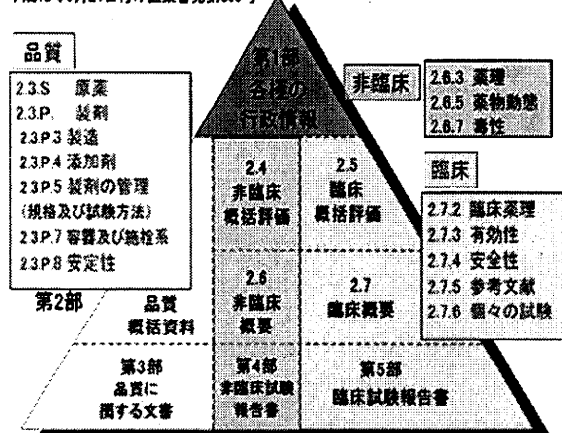


図 1 CTD の構成

1) 品質

GMP 対応細胞培養システムの構築にむけ、治験水準のアドバイスをを行った。

先端医療センターが保有するCPCで再生心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。

D. 考察

DMSO 加培養ヒト脂肪組織由来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 22 年厚生労働省告示第 380 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 6 カ月にわたる検索により心機能改善効果という有効性が検証する。特に平成 23 年度にあっては安全性に関しては慢性毒性試験、体内動態試験、有効性に関しては有効性用量設定試験、品質に関しては CPC におけるコールドラン最低 5 例の実施と検証が必須である。Pre-cold run を実施することで、実際の臨床に供する培養細胞の細胞規格と出荷判定基準の設定が可能となった。

E. 結論

本研究では、幹細胞研究指針適合確認に基

づく臨床研究、高度医療実施、それに続く
医師主導治験を実施するうえで必要とされ
る水準を目指しており、わが国の再生医療
研究の進展を促進するものと考えている。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省科学研究費補助金（難治性克服疾患研究事業）

分担研究報告書（平成 22 年度）

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: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 兵庫医科大学 医学部 数学教室 講師 大門 貴志

研究要旨

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。拡張型心筋症に対する新たな治療法としての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のヒト幹細胞臨床研究指針に則った実施に向けて、生物統計学的デザイン・解析に関して予備的な検討を行った。

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 1,000 日を超え、待機死する患者さんも多い。とくに、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、再生細胞治療法を実践、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、心筋芽細胞移植の臨床研究のヒト幹細胞臨床研究指針に則った実施に向けて、本研究では、生物統計学的デザイン・解析に関して予備的な検討を行うことを目的とする。

B. 研究方法

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。

1. 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
2. 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)

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。

【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】

大多数の再生医療・細胞移植研究がそうであるように、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おける主要評価項目は、プロトコル治療の安全性を評価することであり、その効果については副次評価項目としている。したがって、プロトコル治療の効果についての推定精度又は効果の有無の仮説に対する統計的検定に基づく定型的な例数設計の方法論で目標症例数の規定は困難であるか、不可能なことが多い。また、本研究のように複数の仮説の探索を含意する早期の臨床研究に関しては、プロトコル治療の安全性及び効果に及ぼす影響要因(患者基礎情報に関する要因、疾患要因、治療に関する要因等)を整理・把握し、臨床試験シミュレーション(Clinical Trial Simulation)に基づいて、本研究で獲得される結果を予測し、後続の第II相試験への橋渡しの可能性に関して議論することは有効なひとつの方策である。ただし、本研究でのプロトコル治療のヒトでの成績は存在せず、また本研究に関係しそうな海外での筋芽細胞移植の臨床試験の諸報告では安全性及び効果に及ぼす影響要因に関する統計的考察もなされていないため、後続の第II相試験への橋渡しのためのClinical Trial Simulationを実施するのは困難である。したがって、本研究では先ず、症例数の適切性を、安全性及び効果について定型的な統計的症例数設計の方法論に基づいて吟味する。

<安全性の視点> 任意のひとつの有害事象がプロトコル治療中もしくは追跡中に1被験者につき1回発現し、有害事象を発現した症例数が二項分布に従うと仮定すると、

拡張型心筋症例の被験者数の水準を3例、5例、10例、当該有害事象の発現割合のパラメータの値の水準を $1/4$ 、 $1/3$ 、 $1/2$ と設定したとき、これらの水準の組み合わせに対して、少なくとも1症例以上当該有害事象を観測する場合の確率を算出する。

<有効性の視点> 心機能のひとつの効果指標として左室駆出率 (Left ventricular Ejection Fraction; LVEF) を挙げることができる。当該研究における被験者全員がプロトコル治療を完遂し、6カ月までLVEFを追跡できたと仮定し、対応のあるt検定において両側有意水準0.05で帰無仮説「6カ月の時点とベースラインの時点でのLVEFに差がない」に対して対立仮説「6カ月の時点とベースラインの時点でのLVEFに差が Δ [%]である」(Δ の値の水準は3, 5, 7, 9, 11, 13とし、 Δ の標準偏差の値の水準は3, 5, 10とした)を検出する確率(検出力)を算出する。

【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】

再生医療研究が、他の臨床研究とは異なり「患者の体外で人工的に培養した幹細胞を治療に用いる」という点である。この点は以下の制約を派生させる：

- 1) 再生医療は大きくは幹細胞の (i) 採取, (ii) 培養, (iii) 移植といった過程を踏む。これらの過程はすべて「再生」の成否と密接に絡むため、それらの組み合わせ又は一連のプロセス(すなわち、プロトコル治療手順)に対する評価(例えば、採取細胞数)が必須であること。

- 2) 再生医療は現在、発展途上の段階にあり、再生医療研究の多くは、基礎研究や動物実験で獲得された「根拠 (evidence)」に基づいて実行され、ヒトでの「安全性」の評価を主とすること。
- 3) 1) の過程すべてを完遂できる症例数は、費用の視点、及び2) で言及した通り、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場合もあること。

このような制約のもとでの生物統計学的デザイン・解析の方法論の開発もまた喫緊の課題といえる。前年度において、分担研究者は、上記のような制約に対する一つの解決策として、がん領域における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.] に注目し、再生医療領域への適用に向けてのその拡張 (以下、拡張型連続再評価法と呼ぶ) を試みた。本研究では、この拡張型連続再評価法の性能を評価し、従来型の連続再評価法と比較する。

【拡張型連続再評価法の概要】

脂肪組織由来多系統前駆細胞由来心筋芽細胞移植の安全性には、諸種の要因 (患者背景データ、幹細胞の採取・培養・移植に関するデータ) 及びその階層的構造が影響を及ぼす。とくに、被験者への介入として重要な影響要因は採取・培養・移植される細胞数と考えられる。ここでの予備的検討としての拡張型連続再評価法では、移植幹細胞数と反応 (安全性又は/かつ有効性、ここ

ではとくに安全性として有害事象発現確率) 関係に縮約した候補モデルを「複数」構築 (従来型の連続再評価法では単一のモデルしか許容していない) し、患者が組み込まれるごとに、その患者の移植細胞数・安全性/有効性データに基づいて Bayes 流にそれらのモデルを更新してそのうちの最適なモデルを選択することにより、次の各患者に割り付けられる最適移植細胞数を決定でき、患者集団での最適移植細胞数も同時に推定できる。

【拡張型連続再評価法のアルゴリズム】

拡張型連続再評価法のアルゴリズムは以下のとおりである：

Step.1: 臨床医らによって与えられるすべての候補モデルに従来型の連続再評価法を適用し、それらを更新する。

Step.2: 新しく登録された患者に対して、それまでに得られたデータを用いて、各作業モデルの事後予測損失 (Deviance Information Criterion) [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.] を計算する。最も小さな DIC をもつ、(Step 1 で更新された) 作業モデルから推定された MTD を新しく登録される患者に割り付ける。

Step.3: 規定された標本サイズまで Step 2 を繰り返す。

【シミュレーション設定】

本研究では、図 1 に示すように、移植細胞数 (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)、あるいは当該治療

法と併用療法・支持療法の組合せからなる複数（ここでは、8個）の治療水準を仮想的に設定し、その水準間で有害事象発現確率が単調に増加する一つのシナリオ（図1の太線、したがって、標的有害事象発現確率を0.3とすれば、最適な移植細胞数は4番目の水準といえる）を設定し、これを真の移植細胞数と有害事象発現確率との関係構造として検討を行った。シミュレーションの状況設定は以下のとおりとした：

- シミュレーション回数（試験数）：1000.
- 最大標本サイズ（症例数）：30.
- 比較対照：
 - ▶ 図1に示した各候補モデルに基づく従来型の連続再評価法.
- その他の諸条件：
 - ▶ 最低移植細胞数水準から治療開始.
 - ▶ 有害事象発現確率が0.3を超える確率が90%以上の場合に試験の早期中止.
- 評価項目：
 - ▶ 4番目の水準を最低移植細胞数水準として選択する百分率.
 - ▶ 平均有害事象発現数.

C. 研究結果

【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】

<安全性の視点> 1症例以上当該有害事象を観測する場合の確率を以下の表1に示す。有害事象の発現割合が低い場合には、今回の各疾患の目標症例数は有害事象を観測するのに十分な症例数とは言い難い(例えば、表1に示されるように、発現割合のパラメ

ータの値が1/4以下であれば、少なくとも1症例以上有害事象を観測する確率は80%を下回る[0.76以下である])。

表1. 1症例以上有害事象を観測する確率

登録例数	発現割合パラメータ値		
	1/4	1/3	1/2
3	0.58	0.70	0.86
5	0.76	0.87	0.97
10	0.94	0.98	0.99

一方で、例えば、発現割合のパラメータの値が0.4(=4/10)と想定すると、このような比較的頻回に観測される有害事象の場合には、今回の各疾患の目標症例数は十分な症例数といえそうである(例えば、表1に示されるように、発現割合のパラメータの真値が1/3以上であれば、少なくとも1症例以上有害事象を観測する確率は80%を上回る[0.87以上である])。

<有効性の視点> Δ を検出する確率(検出力)を表2に示す。

表2. 検出力

Δ の標準偏差	Δ					
	3	5	7	9	11	13
3	0.40	0.79	0.96	0.99	0.99	0.99
5	0.18	0.40	0.65	0.84	0.94	0.98
10	0.08	0.14	0.22	0.33	0.46	0.59

表2に示されるように、LVEFの改善が相応に大きく(Δ が7あるいは9以上)、 Δ の標準偏差が小さい(Δ の標準偏差が3あるいは5以上)ならば、当該研究の各疾患の目標症例数は、上記の対立仮説を0.80以上の確率で検出するのに十分な症例数である。

All the candidate models

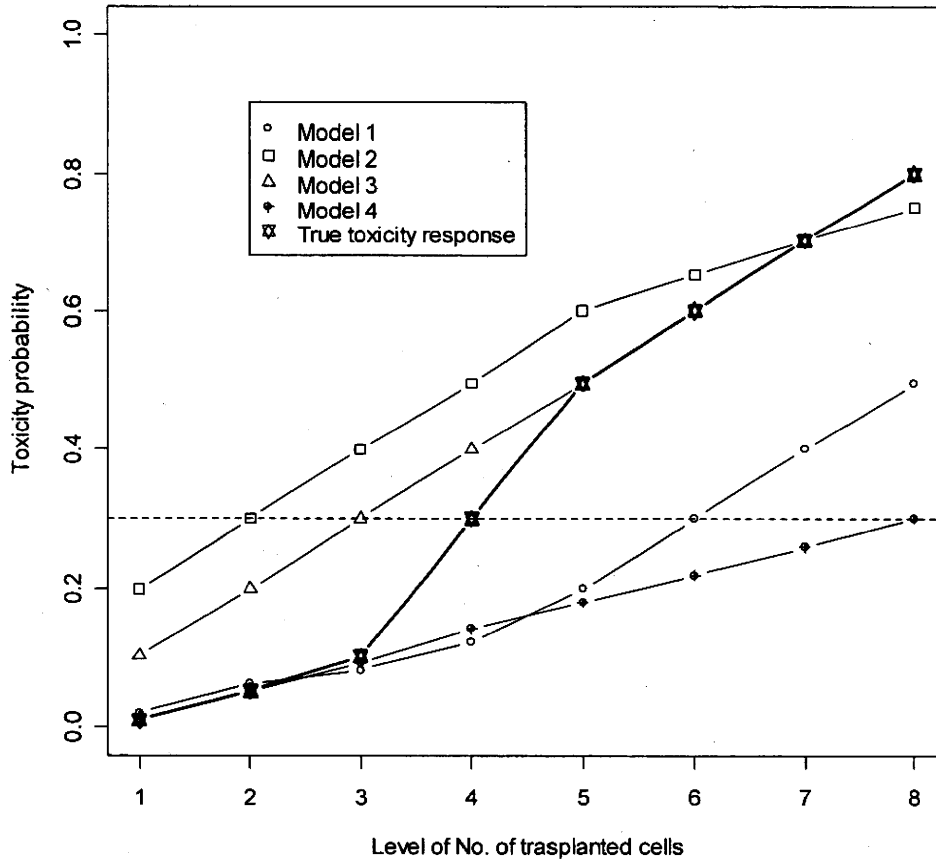


図1. 移植細胞数水準と有害事象発現確率の関係構造に関して想定した候補モデル.

表3. シミュレーション結果 (1000 個の試験中, 終了時に各水準が選択される割合[%]).

連続再 評価法	1	2	3	4	5	6	7	8	平均発 現例数
拡張型	0.0	0.0	13.9	70.2	15.1	0.8	0.0	0.0	9.5
従来型 モデル1	0.0	0.7	15.1	63.6	20.1	0.4	0.1	0.0	10.4
従来型 モデル2	0.0	0.3	18.2	59.0	20.0	2.3	0.2	0.0	9.7
従来型 モデル3	0.0	0.0	13.6	69.8	16.3	0.3	0.0	0.0	9.0
従来型 モデル4	0.0	0.0	13.1	70.9	15.8	0.2	0.0	0.0	8.5

【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】

表 3 に示されるとおり、当該シナリオの場合には、モデル 4 に基づく従来型の連続再評価法では最適な移植細胞数水準の選択割合は 70.9%、その他のモデル 2~4 に基づく従来型の連続再評価法では約 60%であった。このことは、従来型の連続再評価法を用いると、移植細胞数水準と有害事象発現確率の関係構造に関する候補モデルの設定の良し悪しに応じて、最適な移植細胞数水準の選択割合は容易に変わり得ることがわかる。一方で、拡張型連続再評価法では、移植細胞数水準と有害事象発現確率の関係構造に関する最良のあてはめモデルを DIC で選択できる結果、候補モデルの設定の良し悪しにかかわらず、70.2%とモデル 4 に基づく従来型の連続再評価法の値に迫る性能を誇った。

D. 考察

【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。

E. 結論

安全性・効果の視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に関する研究、また、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は、ヒト幹細胞研究指針適合に基づく臨床研究、高度医療実施、それに続く医師主導治験を実施するうえで必要とされる水準に関する基盤構築を目指しており、わが国の再生医療研究の進展を促進の一助となるものと思われる。

F. 健康危機情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Daimon, T., Zohar, S., and O'Quigley, J. (2011). Posterior maximization and averaging for Bayesian working model choice in the continual reassessment method. *Statistics in Medicine* (in press).
- 2) Kainuma, S., Taniguchi, K., Toda, K., Funatsu, T., Kondoh, H., Nishino, M., Daimon, T., and Sawa, Y. (2011). Pulmonary hypertension predicts adverse cardiac events following restrictive mitral annuloplasty for severe functional mitral regurgitation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* (in press).
- 3) 手良向聡・大門貴志 (2010). 産業界および FDA スタッフのためのガイダンス 医療機器の臨床試験における Bayes 流統計学の利用に関するガイダンス (翻訳) [Guidance for Industry and FDA Staff Guidance for the Use of Bayesian Statistics in Medical Device Clinical Trials, U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for

Devices and Radiological Health Division of Biostatistics, Office of Surveillance and Biometrics Center for Biologics Evaluation and Research: Document issued on: February 5, 2010]. *臨床評価* 38(2), 291-326.

- 4) 手良向聡・大門貴志 (2010). FDA 「医療機器の臨床試験における Bayes 流統計学の利用に関するガイダンス」について (解説). *臨床評価* 38(2), 327-334.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
該当せず.
2. 実用新案登録
該当せず.
3. その他
該当せず.