

20114044A

厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

研究課題名：生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子
を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療
の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坂田 隆造

平成 24（2012）年 5 月

目 次

平成23年度厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

研究課題名：生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討（H23-臨研推一般-006）

I. 総括研究報告

- ・総括研究報告 ----- 1
研究代表者 京都大学大学院医学研究科 坂田 隆造
研究分担者 京都大学医学部附属病院探索医療センター 丸井 晃
- ・平成23年度 坂田班 班会議開催状況報告 ----- 13
- ・臨床試験実施計画書 ----- 14

II. 分担研究報告

- ・分担研究報告 1 ----- 58
研究分担者 京都大学再生医科学研究所 田畑 泰彦
- ・分担研究報告 2 ----- 70
研究分担者 京都大学医学部附属病院探索医療センター 清水 章
- ・分担研究報告 3 ----- 72
研究分担者 京都大学医学部附属病院探索医療センター 横出 正之
- ・分担研究報告 4 ----- 75
研究分担者 京都大学医学研究科 川上 浩司
研究分担者 京都大学医学部附属病院探索医療センター 手良向 聡
- ・分担研究報告 5 ----- 77
研究分担者 京都大学医学部附属病院 桂 敏也

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ----- 80

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 84

I. 総括研究報告

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた 難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発： オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所 属 京都大学大学院医学研究科
研究代表者 坂田 隆造

所 属 京都大学医学部附属病院探索医療センター
分担研究者 丸井 晃

研究要旨

近年、従来の方法では治療困難な重症下肢虚血や虚血性心疾患の患者が増加しており、遺伝子治療や細胞移植治療などの「血管新生療法」試みられているが遺伝材料の安全性・複雑な手技・高コスト等の課題が指摘されている。

我々は遺伝子や細胞の代わりに、安全かつ細胞増殖因子を必要十分に作用できる「ゼラチンハイドロゲル」を開発した。この最大の利点はゼラチンハイドロゲルが生体吸収性であり臨床における安全性が期待できる点にある。また様々な細胞増殖因子を組み合わせることで効果的な徐放投与が可能であり、遺伝子治療・細胞移植治療と比べて手技が非常に簡便・低コストであることも特徴である。我々は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放化ゼラチンハイドロゲルの有効性を多くの基礎研究で検証し、臨床治験に向けた治験薬 GMP 基準での製剤施設を立ち上げ、平成 22 年 6 月には「生体内吸収性高分子担体と bFGF による血管新生療法」が第三項先進医療の承認を受け、臨床試験を開始した。

本研究では第三項先進医療の臨床例を重ね(H23~24)、将来的な薬事承認および保険診療化を目標とする(H24~27)。また当技術を重症虚血性心筋症に応用し、昨今のドナー不足が深刻である心移植や補助人工心臓などの「置換型医療」の代替の可能性を探る(H23~27)。この技術を発展させる基礎研究として①複数の増殖因子の計画的徐放による効果的な血管新生を行う「カクテル治療」(H23~24)、②当技術により細胞移植治療の効率を高める「ハイブリッド治療」(H24~26)、さらにこれらを組み合わせ、③各患者に応じて最適な有効性と同時に副作用を回避する「オーダーメイド治療」の基礎的検討を行い、将来的な臨床応用の足がかりとする(H25~27)。

この技術が薬事承認・保険診療化されれば、臨床応用された世界初の血管新生療法となり、重症下肢虚血患者の救済のみならず、世界初の血管新生製剤販売による医療産業の育成、少ない医療費で患者予後が改善する医療経済効果、また心臓における応用により、ドナー不足が深刻な重症末期心不全患者に対する置換型医療の代替医療としての可能性が期待できる。

本研究は臨床研究としては①重症下肢虚血に対する第三項先進医療の遂行および発展、②先進医療当該技術の虚血性心疾患への応用、を計画し、基礎研究としては①複数の細胞増殖因子の計画的徐放による「カクテル治療」、②細胞移植治療との併用による「ハイブリッド治療」、③各疾患に適した「オーダーメイド治療」、を計画している。基礎研究②および③については次

年度以降に計画しているため、臨床研究および基礎研究①について報告する。

【臨床研究①】

第三項先進医療「生体内吸収高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」

A. 研究目的

従来の方法では治療困難できわめて近い将来において下肢切断術が免れられない下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）患者を対象として、塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor：bFGF）徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒の安全性および臨床効果を評価する。

B. 研究方法

【試験デザイン】

第 I-II 相臨床試験（非ランダム化、コントロール無し）で、bFGF 200 μ g の単一用量にて臨床効果、安全性の検討を行う。

【エンドポイント】

<主要エンドポイント>

- ・安全性の評価
- ・経皮的酸素分圧測定（TcO₂）の変化

<副次エンドポイント>

- ・上肢下肢血圧比（ABI）
- ・上肢足趾血圧比（TBI）
- ・虚血性潰瘍の面積、チアノーゼ
- ・6分間歩行距離
- ・Rutherford 慢性虚血肢臨床分類
- ・疼痛スケールによる安静時疼痛

【目標症例数・観察期間】

10 例・治療後 24 週

【適格基準】

選択基準（抜粋）

- 1) 下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症またはバージャー病）と診断されている。
- 2) 対象側について、以下すべてを満たす下肢末梢性血管疾患である。
 - ・下肢虚血による潰瘍、限局性の壊疽、安静時疼痛のいずれかの症状がある。
 - ・Rutherford 慢性虚血肢臨床分類の 4 群～5 群と判定される。
 - ・骨・腱の露出した深部潰瘍または広範な壊疽いずれも認めない。
- 3) あらゆる内科的治療（血管拡張剤、抗血小板剤、経皮的血管形成術）または外科的治療（バイパス血行再建術等）を施行した後も、臨床症状の改善が得られない患者
- 4) 登録時の年齢が 20 歳以上 80 歳未満である。

除外基準（抜粋）

- 1) 以下のいずれかの合併症を有する。
 - ・コントロール不良な虚血性心疾患・心不全・不整脈
 - ・臨床的に問題となる感染症（蜂窩織炎・骨髄炎を含む）
 - ・コントロール不良の糖尿病患者（HbA_{1c} > 10%）
 - ・余命が 1 年以内と考えられる合併症
- 2) 以下のいずれかの既往を有する。
 - ・過去 6 か月以内に発症した心筋梗塞・脳梗塞・脳出血・一過性脳虚血発作
 - ・重度の薬剤アレルギー
 - ・過去 1 年以内に治療を要するアルコール依存または薬物依存を認めた
- 3) 現在、慢性腎不全により維持透析中である。
- 4) 糖尿病性網膜症（増殖前糖尿病性網膜症または増殖糖尿病網膜症）で治療中である。
- 5) ゼラチンハイドロゲル細粒の皮内反応が陽性である。
- 6) 過去、以下の臨床試験・治験に参加している。
 - ・bFGF に関する試験
 - ・遺伝子治療に関する試験
- 7) 活動性の悪性腫瘍（無病期間が 3 年以内の悪性腫瘍）を有する。
- 8) 喫煙者である、または禁煙期間が 1 か月未満である。

【製剤】

京都大学附属病院薬剤部内に治験薬 GMP に準拠した設備を立ち上げ、そこでゼラチンハイドロゲル細粒の作製を行っている。また「治験薬に関する文書（臨床研究用）」を作成し、製造したゼラチンハイドロゲルを用いて、無菌試験、エンドトキシン試験ならびに安全性試験を実施した。

【治療法】

日帰り手術室で腰椎麻酔下に bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル 200 μ g（40ml）を虚血下肢に 40 ヲ所筋肉内注射により単回投与。治療後 24 週間の観察を行う。

【健康被害に対する補償について】

- ・健康被害に対する治療に係る医療費は、患者の健康保険を適用する。
- ・健康被害に対する補償措置として病院が補償賠償責任保険に加入している。

【研究体制】

<研究統括>

京都大学心臓血管外科

京都大学探索医療センター 開発部

<製剤>

京都大学再生医科学研究所

京都大学附属病院薬剤部

<患者リクルート>

京都大学探索医療センター 臨床部

<データマネジメント・モニタリング>

京都大学探索医療センター 検証部

<スタディデザイン・統計解析>

京都大学探索医療センター 検証部

C. 研究結果

2012年3月に目標登録症例数の10症例の登録を完了し、すでに8例に24週の観察期間を終了した。現時点では治療に関連すると思われる明らかな有害事象は無く、有効性評価のエンドポイントも改善を認めている。現在データ解析の準備を進めており、10症例目の観察期間が終了する平成24年8月を目処にデータレビュー・固定を行い統計解析に取りかかる予定である。

D. 考察

今回高度医療評価制度という枠組みで、新規血管新生療法の臨床研究を行うことができた。京大病院の支援体制も充実しており、製剤・患者リクルート・データ管理・統計解析などにおける学内での支援体制が整っており、非常にスムーズに目標症例登録を完了することができた。今後は結果の解析を早急に行い報告を行うと共に、その結果を十分に吟味し、今後は追加症例を行うか治験に移行するかを検討する。また治験を念頭においた治験薬 GMP 基準でのゼラチンハイドロゲルの製造を企業にて行うべく調整を現在行っている。将来的には医師主導治験・国際共同治験等を念頭に薬事承認、保険診療化を目指している。

E. 結論

第三項先進医療の目標症例登録が速やかに完了した。薬事承認・保険診療化を目指した企業との折衝、医師主導治験・国際共同治験などの方向性を検討中である

F. 健康危険情報

目標症例数10例を登録完了し、24週の経過観察を行っているが、現時点で治療に関連があると考えられる有害事象は認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic treatment with sustained-release platelet-rich plasma restores blood perfusion by augmenting ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis in diabetic mice. *J Vasc Res.* 2011;48(3):195-205.
2. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 Dec;40(6):804-9.
3. 【疾患治療とドラッグデリバリーシステム】細胞増殖因子徐放化による血管新生治療 山本雅哉, 丸井晃, 坂田隆造, 田畑泰彦 *細胞* 44 巻 2 Page64-67
4. 下肢血管新生療法の臨床応用 丸井晃, 坂田隆造 *日本医事新報* 4553 号 Page62-63
5. 患者まで届く再生医療 生体吸収性担体を用いた重症下肢虚血に対する血管新生療法 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 手良向聡, 横出正之, 清水章, 中尾一和, 坂田隆造 *再生医療* 10 巻 1 号 Page37-44

2. 学会発表

1. 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 清水章, 坂田隆造 *心血管トランスレーショナルリサーチ(TR) 医薬品市販化・保険診療化を目指した試み* 第41回日本心臓血管外科学会学術集会 2011.2.23. 東京
2. Masumoto H, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita J. Embryonic Stem (ES) Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction. 第75回日本循環器学会総会学術集会 2011.3. 東京
3. 丸井晃, 田畑泰彦, 柳茂樹, 山本雅哉, 米澤淳, 桂敏也, 横出正之, 清水章, 坂田隆造 *bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法の長期成績および医薬品市販化・保険診療化の試み* 第39回日本心臓血管外科学会学術集会 2011.4.21. 那覇市

4. Marui A, Tabata Y, Sakata R. Biomaterial-based Regenerative Therapy in Cardiovascular Field. 1st Meeting of Asia-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration. 2011.6.2 Kyoto
 5. 升本英利、池田義、清水達也、岡野光男、坂田隆造、山下潤 マウス多能性幹細胞由来心臓組織シートの心筋梗塞後リモデリング抑制効果 第32回日本炎症・再生医学会 2011.6.3 京都市
 6. 小田基之、丸井 晃、武田崇秀、坂田隆造 重症下肢虚血に対する血管新生療法の中間報告 第11回比叡山ワークショップ 2011.6.4. 京都市
 7. Masumoto H, Ikeda T, Sakata R, Yamashita J. Mouse Embryonic Stem Cell-engineered Tissue Sheets with Defined Cardiac Cell Populations Ameliorate Function after Myocardial Infarction. International Society for Stem Cell Research 9th Annual Meeting. 2011.6.17. Tronto, Canada
 8. 升本英利、池田義、坂田隆造 多能性幹細胞由来心臓組織シートによる虚血性心疾患治療への挑戦 第9回メタボリックシンドロームカンファレンス 2011.7.16 京都市
 9. Masumoto H, Shimizu T, Ikeda T, Okano T, Sakata R, Yamashita J. Central Role of Cardiomyocytes in Cell Therapy: Transplantation of Cardiac Tissue Sheets with Defined Cell Populations from Pluripotent Stem Cells. The 33th European Society of Cardiology. 2011.8. Paris, France
 10. 丸井 晃 ゼラチンハイドロゲルによるDDSを応用した心血管再生医療 -From bench to bedside- 第4回北和脈管疾患連携の会 2011.9.3. 奈良市
 11. 升本英利、池田義、坂田隆造 多能性幹細胞由来心臓構成細胞の再構成による心臓組織シート —治療効果と機能回復メカニズム解析— 第64回日本胸部外科学会学術集会 2011.10.11 横浜市
 12. 丸井晃、玄丞然、坂田隆造 臨床を目指した高分子バイオマテリアルのDDS 新規バイオマテリアル"LYDEX"を用いた心臓血管外科領域におけるDDS 第33回日本バイオマテリアル学会大会 2011.11.22. 京都市
 13. 熊谷基之、丸井 晃、田畑泰彦、武田崇秀、山本雅哉、米澤 淳、池田隆文、桂 敏也、川上浩司、横出正之、清水 章、坂田隆造 bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルによる重症下肢虚血に対する血管新生療法 第1回 DDS 徐放化再生医療研究会 2011.12.3. 東京
- 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
- 【臨床研究②-1】**
先進医療当該技術の重症虚血性心疾患への応用
- 先進医療当該技術心臓への応用にあたり現在大動物による安全性試験を進めている。臨床試験プロトコルについては現在検討中であり、以下研究目的および研究方法の案を提示する。
- A. 研究目的**
虚血性心疾患を有し、従来の血行再建法（経皮的冠動脈形成術または冠動脈バイパス術）では血流改善が得られない虚血心筋領域を有する患者を対象として bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルの安全性および臨床効果を評価する。
- B. 研究方法**
【試験デザイン】
第 I-II 相臨床試験。単一容量の単回投与試験
- 【適格基準】**
- 1) 虚血性心疾患を有する患者で心臓外科手術を必要とする患者
 - 2) 年齢 20-80 歳
- 【治療箇所の決定】**
冠動脈造影上、冠血行再建（PCI および CABG）に適さない虚血部位を持ち、かつその部位での心筋 viability が心筋シンチグラフィ（負荷タリウム SPECT および FDG-PET）によ

って証明されていること。MRI 遅延造影による17セグメントモデルにおける評価を併用。

【治療法】

心臓外科手術を行うときに、ゼラチンハイドロゲルシートを目的虚血部位に貼付する。シートの作製は治験薬 GMP に準拠した京大病院薬剤部内の施設で作製する。

【エンドポイント】

・安全性の評価
・局所心機能・局所心筋血流（MRI, シンチグラフィ）

【観察期間】

6ヶ月

C. 研究結果

なし

D. 考察

現在試験プロトコルを作成中であるが、様々な点で細部を詰める必要がある。まず安全性の検証を大動物で進めており、また今後スタディデザインを決定する上で、まず治療対象となりうる同様の患者群でのデータを収集することを考慮している。

E. 結論

当該技術を応用した虚血性心疾患への臨床応用を検討中である。それと平行して大動物による毒性試験を行っている。

F. 健康危険情報

臨床試験の実施には至っていないが、大動物による毒性試験では当該技術に関連する有害性は認めていない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO-Kyoto Investigators. Significance of off-pump coronary artery bypass grafting compared with percutaneous coronary intervention: a propensity score analysis. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2012 Jan;41(1):94-101.
2. Funakoshi S, Furukawa Y, Ehara N, Morimoto T, Kaji S, Yamamuro A, Kinoshita M, Kitai T, Kim K, Tani T, Kobori A, Nasu M, Okada Y, Kita T, Kimura T; CRE

DO-Kyoto Investigators. Clinical characteristics and outcomes of Japanese women undergoing coronary revascularization therapy. *Circ J.* 2011;75(6):1358-67.

3. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Miwa S, Yamazaki K, Minakata K, Nakata T, Ikeda T, Furukawa Y, Kita T, Sakata R; CREDO-Kyoto Investigators. Coronary revascularization in patients with liver cirrhosis. *Ann Thorac Surg.* 2011 May;91(5):1393-9.
4. Yanagi S, Matsumura K, Marui A, Morishima M, Hyon SH, Ikeda T, Sakata R. Oral pretreatment with a green tea polyphenol for cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in an isolated rat heart model. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Feb;141(2):511-7.
5. 【虚血性心筋症に対する外科治療戦略】虚血性僧帽弁閉鎖不全症に対する外科治療 山崎和裕, 南方謙二, 仲原隆弘, 船本成輝, 小田基之, 高井文恵, 武田崇秀, 村中弘之, 丸井晃, 三和千里, 池田義, 坂田隆造 胸部外科 64 巻 11 号 Page968-975
6. 【主幹部病変における冠血行再建術: PCI vs CABG】左主幹部病変における冠血行再建 エビデンスをいかに解釈するか 丸井晃, 坂田隆造 日本冠疾患学会雑誌 17 巻 3 号 Page246-253
7. 冠動脈バイパス術と脳血管障害 冠動脈バイパス術と脳血管障害 丸井晃, 坂田隆造 日本冠疾患学会雑誌 17 巻 2 Page153-159

2. 著書

1. 【冠動脈疾患(上)-診断と治療の進歩】冠動脈疾患における治療学の進歩 冠動脈バイパス術(CABG) 冠動脈バイパス術の変遷と現状 概論 丸井晃, 坂田隆造 日本臨床 69 巻増刊 7 冠動脈疾患(上) Page390-397

3. 学会発表

1. Minakata K, Miwa S, Yamazaki K, Takai F, Oda M, Funamoto M, Nakata T, Marui A, Ikeda T, Sakata R. Reappraisal of Batista Concept as a Treatment of Severe Functional Mitral Regurgitation in Cardiomyopathy: Restoration of Papillary Muscle Dimensions. 47th Annual Meeting of Society of Thoracic Surgery. 2011.1. San Diego, USA
2. 丸井晃, 坂田隆造 冠動脈外科の未来 次の10年に向けて今必要なことは 冠疾患治療の未来像 エビデンスによる検証 第41回日本心臓血管外科学会学術集会

- 2011.2.24. 東京
3. Minakata K, Sakata R. Impact of Perioperative Glycemic Control on Outcome after Coronary Artery Bypass Grafting JMAP Study-0 (Japanese Study of Impact of Diabetes Mellitus Protocol on Outcome of Cardiac Surgery) 第75回日本循環器学会総会学術集会 2011.3. 東京
 4. 丸井晃, 木村剛, 田中司朗, 三和千里, 山崎和裕, 南方謙二, 古川裕, 北徹, 坂田隆造 透析患者への冠動脈血行再建の適応と限界 ~CREDO-Kyoto からの検証~ 第64回日本胸部外科学会学術集会 2011.10.10 横浜市
 5. 南方謙二, 坂東 興, 高梨秀一郎, 小西宏明, 上田裕一, 大北 裕, 岡林 均, 夜久均, 岡村吉隆, 那須通寛, 種本和雄, 有永康一, 久 容輔, 坂田隆造 糖尿病合併が冠動脈バイパス術に与える影響~多施設共同研究による検討 第64回日本胸部外科学会学術集会 2011.10.12 横浜市
 6. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Miwa S, Yamazaki K, Minakata K, Furukawa Y, Kita T, Sakata R. Benefits of off-pump coronary artery bypass grafting in high-risk patients: A propensity score analysis. American Heart Association Scientific Sessions. 2012.11.14. Orlando, Florida
 7. 丸井晃, 木村剛, 田中司朗, 三和千里, 山崎和裕, 南方謙二, 古川裕, 北徹, 坂田隆造 ガイドラインに基づく冠血行再建治療ガイドラインに基づく冠血行再建治療 CREDO-Kyoto からの検証 第25回日本冠疾患学会学術集会 2011.12.16. 京都市
 8. 山崎和裕, 仲原隆弘, 船本成輝, 武田崇秀, 村中弘之, 南方謙二, 三和千里, 丸井晃, 坂田隆造 虚血性不全心を問う 虚血性僧帽弁逆流に対する外科治療 第25回日本冠疾患学会学術集会 2011.12.17. 京都市
 9. 大井啓司(長野県厚生農業協同組合連合会北信総合病院 心臓血管外科), 宮田裕章, 本村昇, 坂田隆造, 吉田哲矢, 竹下斉史, 高本眞一 脳血管障害既往例におけるCABG術後死亡および合併症についての危険因子の検討 JACVSDを用いた一研究 第25回日本冠疾患学会学術集会 2011.12.17. 京都市
 10. 南方謙二(京都大学 大学院医学研究科心臓血管外科), 坂東興, 高梨秀一郎, 小西宏明, 上田裕一, 大北裕, 岡林均, 夜久均, 岡村吉隆, 那須通寛, 種本和雄, 村中弘之, 有

永康一, 久容輔, 坂田隆造 糖尿病における冠疾患治療 腎機能からみた糖尿病合併患者に対する冠動脈バイパス術の問題点 第25回日本冠疾患学会学術集会 2011.12.17. 京都市

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

【臨床研究②-2】

<bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルのビーグルにおける心臓貼付による毒性試験>

A. 研究目的

末期重症心不全に対し、有効な治療法は心臓移植療法であるが、ドナー不足のため一般的ではない。我々はbFGFをゼラチンハイドロゲルに含浸させ、心臓に局所発現させることで心筋再生を促す新しい治療法を確立させ、心臓移植療法に代わる治療法を目指している。

当該技術の大動物の虚血性心疾患における有効性は既に確認しているが、今回臨床研究を行うに当たって当該技術の心臓における毒性試験を大動物で事前に評価を行った。試験は国内有数の安全性試験専門の施設を持っており、国内外の企業との安全性試験の豊富な実績を持っている株式会社新日本科学に委託して行った。試験はbFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルをビーグルの心表面に貼付したときの毒性変化を調べ、そのときの全身的曝露についても評価する事を目的とした。

B. 研究方法

雄ビーグル犬(10~14kg)を使用し、開・閉胸のみのsham群、ゼラチンハイドロゲル単独群、およびゼラチンハイドロゲルにそれぞれ少容量(40µg/body)、中容量(200µg/body)、高容量(2000µg/body)のbFGFを含浸させた合計5群とした(各群3匹ずつ)。尚、ゼラチンハイドロゲルはGMP基準に基づき作成したものを使用した。

方法は、全身麻酔下で左第6肋間にて開胸す

る。心膜を切開し、心室表面にゼラチンハイドロゲルを貼付し、心膜を結節縫合で閉鎖し、閉創した。

評価は一般状態観察、体重測定、心電図及び血圧検査を定期的に行い、血液学的及び血液生化学的検査は術前、6、13 及び 27 日目(トロポニン測定のみ術翌日も)に測定した。手術後 28 日目に剖検し、全身状態の観察および、その後の病理組織学的検査を行い、全身状態を評価した。

C. 研究結果

bFGF の血中濃度測定では、術翌日に高容量(2000 μ g/body)群でのみ bFGF が検出されたが、他の群では測定限界以下であった。また、採血・心電図・一般状態では sham 群と他群とを比較しても有意な異常所見は認められなかった。

また、剖検所見からは、全例ゼラチンハイドロゲルの残存が各群で認められたが、それ以外異常所見は認められなかった。

D. 考察

今回の研究は、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを虚血性心疾患に応用するにあたっての毒性をビーグル犬を使用して行った。明らかな有害事象を認めず、高用量群の血中濃度の上昇もごく短期間で有り、かつ実際の治療域の用量は今回の中用量群の投与量以下であり、臨床応用にあたっては毒性の懸念が低いことが示された。しかし徐放化シートが完全には分解されておらず、平成 24 年度は徐放性の再検討を含めた毒性実験を追加で行う予定である。

E. 結論

高容量群でのみ血中から bFGF が極短期間に僅かに検出されたものの、心臓及び多臓器への影響は認められなかった。臨床応用の場合、中容量群以下の濃度を考えているため、今回の実験から bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルシートを臨床応用する場合による毒性は認められないと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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

【基礎研究①-1】

<実験:血小板内細胞増殖因子混合物(PGFM)徐放化 DDS 医薬品の生体内における変異原性の検討>

A. 研究目的

本研究の目的は、患者から採取可能な血小板内の細胞増殖因子混合物(PGFM)と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を用い、2 種類以上の細胞増殖因子を生体内で長期にわたって徐々に放出(徐放)するドラッグデリバリーシステム(DDS)技術の開発、および下肢虚血に対する新たな成熟血管新生誘導治療法の確立である。本研究では、臨床応用の前段階として多血小板血漿(Platelet-rich plasma)単独、bFGF 単独および PRP+bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルの生体内投与における変異原性の有無の検討を行った。

B. 研究方法

<活性化 PRP の作成>

PRP は、ダブルスピン法により調整した。ウサギ心臓より直接穿刺して採血した血液 9ml と抗凝固剤 1ml を混合して、4 $^{\circ}$ C、450G、6 分間の遠心分離を行い、血漿成分を回収した。得られた血漿成分を、さらに 4 $^{\circ}$ C、1600G、5 分間の遠心分離を行った。この上層の血漿(Platelet-poor plasma)を除去して、PRP を得た。これに 2wt% 塩化カルシウム溶液を 7:1 の分量で加え、室温にて 1 時間インキュベーションを行い、上清を回収して活性化 PRP を作成した。

<PRP 単独、bFGF 単独、PRP+bFGF 含有ゼラチンハイドロゲルの作成>

活性化 PRP をゼラチンハイドロゲル 100 μ g に浸漬し、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベーションを行った。(PRP 群) 同様に bFGF 100 μ g をゼラチンハイドロゲル 100 μ g に浸漬し、37 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベーションを行った。(bFGF 群)活性化 PRP

および bFGF100 μ g をゼラチンハイドロゲルに浸漬し、37 $^{\circ}$ C、1時間インキュベーションを行った。(PRP + bFGF 群)

＜ウサギ下肢虚血モデルへの PGFM 徐放投与ならびに変異原性の評価＞

ウサギ右下肢において下腹壁動脈、深大腿動脈、外側大腿回旋動脈、浅腹壁動脈の分枝をそれぞれ結紮切離して、外腸骨動脈から膝窩動脈、伏在動脈分岐までの本幹を結紮切離して虚血モデルを作成した。それをランダムに4群に分け(各群それぞれ5匹)、切離した動脈近傍の大腿四頭筋に、生理食塩水 10ml にて希釈したゼラチンハイドロゲルを各 1ml ずつ、合計 10 か所に局所筋肉内投与した。なお no treat 群は、虚血作成のみとした。評価は投与1週間後に行った。ゼラチンハイドロゲルを投与した近傍の肉片を切離して、癌抑制遺伝子である p53 および予後不良癌で見られる EGFR 遺伝子の mRNA 発現を RT-PCR 法にて定量して、安全性の評価を行った。

C. 研究結果

どの群も、未投与群に比較して p53 および EGFR 遺伝子の mRNA の発現に有意差は見られなかった。(図 1)

D. 考察

PRP は様々な脈管形成成長因子を含んでおり、虚血組織への灌流改善、血管増殖を促進することで、閉塞性動脈硬化症やパーリネーション病などの重症虚血性疾患に対する治療として、その効果が期待されている。PRP は自家移植が可能であ

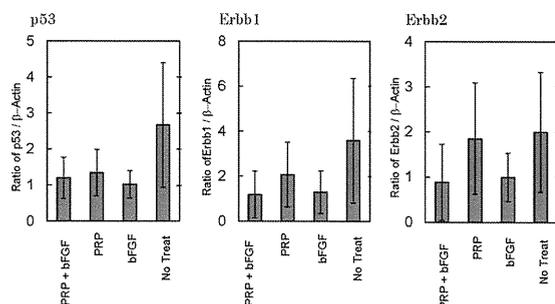


図 1 PRP および bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルの変異

るため、臨床応用するにあたり抗体形成や感染などの危険に対して特別な考慮は必要ではないという利点を持つ。また、現在、すでに PRP は整形外科や形成外科領域で臨床応用されており、骨または軟部組織治療においても有効性を示す文献も見られる。しかし、文献によっては PRP の効果が乏しいものもあり、PRP 単体の投与だと、急速な分解により効果が乏しくなる可能性がある。そこでゼラチンハイドロゲルと組み合わせることにより、PRP を徐放化させ、持続的に効果を発揮することで臨床応用が期待されるが、その安全性という点で、特に発癌の問題をクリアせねばならない。今回、PRP 単独、bFGF 単独、PRP+bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルそれぞれを投与した部位での、局所の癌抑制遺伝子 p53、予後不良癌で見られる EGFR 遺伝子の mRNA を定量したが、未投与群と比較して有意差なく、ゼラチンハイドロゲルを用いた DDS は安全であると考えられた。

E. 結論

以上より、PRP 単独、bFGF 単独および PRP+bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルの生体内投与における変異原性はないものと結論できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic treatment with sustained-release platelet-rich plasma restores blood perfusion by augmenting ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis in diabetic mice. *J Vasc Res.* 2011;48(3):195-205.
- Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 Dec;40(6):804-9.
- 【疾患治療とドラッグデリバリーシステム】細胞増殖因子徐放化による血管新生治療 山本雅哉, 丸井晃, 坂田隆造, 田畑泰彦 *細胞*44巻2 Page64-67

2. 学会発表

- Marui A, Tabata Y, Sakata R. Biomaterial-based Regenerative Therapy in

Cardiovascular Field. 1st Meeting of Asia-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration. 2011.6.2 Kyoto

2. 小田基之、丸井 晃、武田崇秀、坂田隆造 重症下肢虚血に対する血管新生療法の中間報告 第 11 回比叡山ワークショップ 2011.6.4. 京都市
3. 丸井 晃 ゼラチンハイドロゲルによる DDS を応用した心血管再生医療 -From bench to bedside- 第 4 回北和脈管疾患連携の会 2011.9.3. 奈良市
4. 熊谷基之、丸井 晃、田畑泰彦、武田崇秀、山本雅哉、米澤 淳、池田隆文、桂 敏也、川上浩司、横出正之、清水 章、坂田隆造 bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる重症下肢虚血に対する血管新生療法 第 1 回 DDS 徐放化再生医療研究会 2011.12.3. 東京

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

【基礎研究①-2】

<糖尿病マウス下肢虚血モデルに対する多血小板血漿 Platelet Rich Plasma (PRP) の局所徐放投与療法>

A. 研究目的

血小板多血漿 (Platelet-rich plasma (PRP)) は、さまざまなサイトカインを含むことが報告され、組織再生を容易にするとされている。

今回の研究は、まず脈管形成の負の因子の一つである糖尿病をもつマウスを作り、さらに下肢虚血を作成し、虚血部位において、灌流と血管新生における PRP の役割を評価することを目的とした。

B. 研究方法

ストレプトゾトシンによって誘発された糖尿病性のマウスを使用し、マウスの右外腸骨動脈、大腿動静脈、回旋動静脈を結紮・離断し、下肢

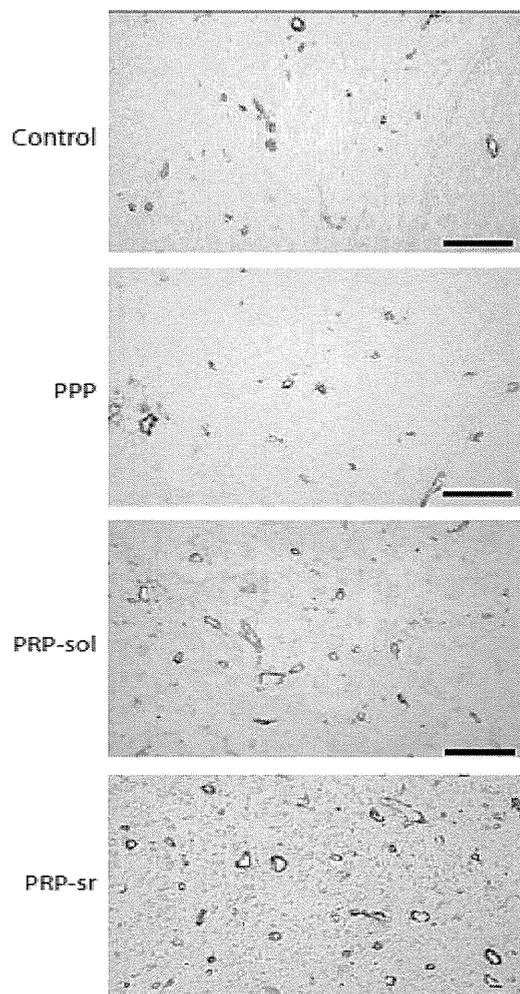
虚血マウスモデルを作成した。それをランダムに 4 群に分け(各群それぞれ 10 匹)、10mg のゼラチンハイドロゲルのみを虚血肢に筋注したコントロール群 (C)、100ug の血小板乏血漿 (platelet-poor plasma (PPP)) をゼラチンにハイドロゲルを含浸し虚血肢に筋注した群 (PPP)、100ug の PRP を溶媒に溶かし虚血肢に筋注した群 (PRP-sol)、100ug の PRP をゼラチンハイドロゲルに含浸し虚血肢に筋注した群 (PRP-sr) の 4 群とした。なお、我々は成長因子の徐放担体としてゼラチンハイドロゲルを用いた。

評価は投与 4 週間後に行った。評価法は、レーザー・ドップラー・パーフュージョン・イメージング (LDPI) による血液評価、vWF 抗体による血管密度測定、抗平滑筋アクチン抗体による血管密度測定を行い、また SDF-1、DGF-BB、VEGF、bFGF、IGF-1 の血管増殖にかかわる成長因子の測定も行った。

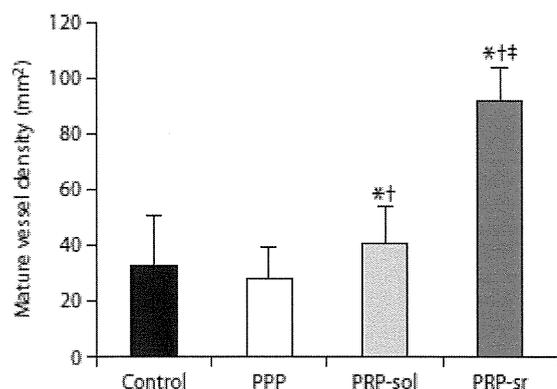
C. 研究結果

PRP-sr 群は他の群と比べ、成長因子である SDF-1、DGF-BB、VEGF、bFGF、IGF-1 全てにおいて有意差を持って増加が認められた。また PRP-sr 群は、虚血組織への灌流、血管密度、血管成熟度においても、他群より有意差を持って増加していることが認められた(図 1、図 2)。

(図 1) vWF 抗体による血管密度測定(術 4 W 後)



(図 2) vWF 抗体による血管密度測定(術 4 W 後)



D. 考察

今回の研究は我々が調べうる限り、ストレプトゾトシンにより誘発された糖尿病性マウスモデルにおいて下肢阻血を作成後、PRP の徐放により血管内皮細胞増殖と血管形成を調べた唯一の研究である。

PRP は様々な脈管形成成長因子を含んでいるとされている。今回の研究結果からは、虚血肢を持つ糖尿病性マウスにおいて、PRP は高い有

効性を持つ様々な血管形成成長因子を刺激し、虚血組織への灌流改善、血管増殖を促進することで治療効果が認められたと結論づけることができる。また、過去の我々の研究から、コラーゲンの誘導体であるゼラチンに PRP を含浸させることにより、血小板活性化を起動させることができる。

PRP は、自家移植が可能であるため、臨床応用する場合でも抗体形成や感染などの危険に対し特別な考慮は必要ではない。また、現在 PRP は整形外科や形成外科で臨床応用されており、骨または軟組織治療にもおいて PRP の有効性を示す文献も出てきている。しかし、文献によっては PRP の効果が乏しいものもある。これは、我々の研究でも同様だったが、PRP 単体の投与のみだと、急速な分解により効果が乏しくなる可能性があるため、ゼラチンハイドロゲルに含浸し投与することで、PRP を徐放化させ、持続的に効果を発揮することで臨床的に有効となるかもしれない。

E. 結論

以上より、強力な脈管形成成長因子を含んでいる PRP の徐放により、血管および動脈形成を刺激し血液環流が増加することが証明できた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Bir SC, Esaki J, Marui A, Sakaguchi H, Kevil CG, Ikeda T, Komeda M, Tabata Y, Sakata R. Therapeutic treatment with sustained-release platelet-rich plasma restores blood perfusion by augmenting ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis in diabetic mice. *J Vasc Res.* 2011;48(3):195-205.
2. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010 Dec;40(6):804-9.

2. 学会発表

1. Marui A, Tabata Y, Sakata R. Biomaterial-based Regenerative Therapy in Cardiovascular Field. 1st Meeting of Asia-Pacific Federation of Inflammation and Regeneration. 2011.6.2 Kyoto

2. 熊谷基之、丸井 晃、田畑泰彦、武田崇秀、山本雅哉、米澤 淳、池田隆文、桂 敏也、川上浩司、横出正之、清水 章、坂田隆造
bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルによる重症下肢虚血に対する血管新生療法 第1回 DDS 徐放化再生医療研究会 2011.12.3. 東京

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

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金
医療技術実用化総合研究事業（臨床研究推進研究事業）

研究課題名

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

－班会議開催状況報告－

坂田班としては班会議を以下の通り行っており、会議議事録を研究代表者のもとで保管している。

第 1 回	平成 2 3 年	5 月 2 4 日 (火)	(出席者 6 名)
第 2 回	平成 2 3 年	7 月 5 日 (火)	(出席者 5 名)
第 3 回	平成 2 3 年	9 月 1 3 日 (火)	(出席者 5 名)
第 4 回	平成 2 3 年	1 1 月 1 日 (火)	(出席者 5 名)
第 5 回	平成 2 4 年	1 月 2 4 日 (火)	(出席者 4 名)
第 6 回	平成 2 4 年	3 月 2 3 日 (金)	(出席者 6 名)

臨床試験実施計画書コード : KUTR-008-4

**下肢末梢性血管疾患に対する、
生体内吸収性高分子担体と塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を
用いた血管新生療法の、臨床効果および安全性に関する臨床試験**

臨床試験実施計画書

主任研究者： 心臓血管外科 坂田 隆造
副主任研究者： 探索医療開発部 丸井 晃

第 1.0 版	2009 年 7 月 23 日
第 1.1 版	2009 年 9 月 28 日
第 1.2 版	2010 年 1 月 28 日
第 1.3 版	2010 年 9 月 8 日
第 1.4 版	2011 年 4 月 20 日

目 次

0. シェーマ	18
1. 目的	19
2. 背景と根拠.....	19
2.1 下肢末梢性血管疾患に対する従来の治療法の限界と血管新生療法.....	19
2.2 現在の血管新生療法の問題点.....	19
2.3 試験治療	20
2.4 本試験のデザインおよびエンドポイントの設定根拠	22
2.5 試験参加に伴って予想される利益および不利益	23
3. 薬物情報	24
3.1 bFGF.....	24
3.2 凍結乾燥ゼラチンハイドロゲル細粒	24
3.3 bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の調製方法.....	25
4. 診断基準と病期・病型分類.....	26
4.1 下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）	26
4.2 Rutherford 慢性虚血肢臨床分類	27
4.3 虚血性潰瘍の深達度	27
5. 適格基準	28
5.1 選択基準	28
5.2 除外基準	28
6. 登録	29
6.1 患者への説明と同意取得	29
6.2 症例登録の手順	30
7. 治療計画	31
7.1 試験治療	31
7.2 併用薬剤	32
7.3 試験治療中止基準.....	33
7.4 有効性評価の中止基準.....	33
7.5 後治療.....	33
8. 有害事象の評価・報告	34
8.1 有害事象および副作用の定義.....	34
8.2 有害事象の評価と報告.....	35
8.3 予期される有害事象	35
8.4 有害事象の緊急報告と対応	36
8.5 健康危険情報に関する報告	38
9. 観察・検査・報告項目とスケジュール	38
9.1 患者の試験期間	38

9.2	登録前および投与前の検査・観察・報告項目	38
9.3	試験期間中の検査・観察項目	39
9.4	血中 bFGF 濃度測定の方法	40
9.5	カレンダー	41
10.	目標症例数と試験期間	42
10.1	目標症例数	42
10.2	試験期間	42
11.	エンドポイントの定義	42
11.1	主要エンドポイント	42
11.2	副次エンドポイント	43
12.	統計学的考察	45
12.1	解析対象集団	45
12.2	データの取扱い	45
12.3	統計解析	46
13.	症例報告書の記入と提出	47
13.1	様式と提出期限	47
13.2	記入方法	47
13.3	送付方法	47
14.	モニタリング	47
14.1	モニタリングの方法	47
14.2	モニタリングの項目	47
14.3	医療機関の長への定期報告	48
15.	品質管理・保証	48
15.1	データセンターにおける品質管理	48
15.2	効果安全性評価委員会	48
15.3	医療機関の長による自己点検	48
15.4	倫理審査委員会による調査	48
15.5	厚生労働省による調査	48
16.	倫理的事項	48
16.1	遵守すべき諸規則	48
16.2	説明文書・同意文書の作成と改訂	49
16.3	説明と同意（インフォームド・コンセント）	49
16.4	個人情報とプライバシーの保護	49
17.	試験の費用負担	50
17.1	資金源および財政上の関係	50
17.2	試験に関する費用と患者負担について	50
17.3	健康被害に対する補償について	50

18.	試験実施計画書の逸脱・承認・変更・改訂	51
18.1	試験実施計画書および指針等からの逸脱	51
18.2	試験実施計画書の承認および改訂	52
19.	試験の終了と早期中止・中断	52
19.1	試験の終了	52
19.2	試験の早期中止・中断	52
20.	試験に関する資料の取り扱い	52
21.	研究成果の帰属と結果の公表	53
22.	研究組織.....	53
23.	文献.....	54
24.	付録.....	57

シエーマ

