

201128008A

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23年度 総括研究報告書

代表者 澤 芳樹

平成24年5月

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23年度 総括研究報告書

代表者 澤 芳樹

平成24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

澤 芳樹 ..... 1

### II. 分担研究報告

1. 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

宮川 繁・市川 肇 ..... 6

2. 脂肪幹細胞由来心筋芽細胞移植にむけた大動物モデル検定

松山 晃文 ..... 15

3. cGMP 対応の細胞培養システムの構築

川真田 伸 ..... 22

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

大門 貴志 ..... 23

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 27

IV. 研究成果の刊行物・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、新しい細胞源（心筋芽細胞）の基礎的研究を行うとともに、筋芽細胞シート移植の臨床研究を重症心不全患者 14 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。本研究にて行った治療のデータをもとに、PMDA との交渉を行い、最終的に企業治験の申請が受理され、本年度には治験を開始する予定である。

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。観察期間が終了した人工心臓を装着していない心不全患者 5 例において、ほとんどの症例で左室の reverse remodeling 効果、症状の改善を認めた。

また、筋芽細胞にかわる新しい細胞源を求めて、脂肪組織由来多系統前駆細胞由来心筋芽細胞移植の非臨床研究を行った。将来的な臨床研究にむけ、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えた。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。

### 研究分担者氏名・所属機関名及び所属機関における職名

1. 宮川 繁 大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科 助教
2. 市川 肇 国立循環器病研究センター小児心臓外科 部長
3. 松山晃文 大阪大学医学部附属病院未来医療センター 特任准教授
4. 川真田伸 先端医療センター細胞評価事業部
5. 大門貴志 兵庫医科大学医学部数学教室 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、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する。

3. 従来型の頻度流の統計的推測方式に基づく生物統計学的デザイン・解析に関して予備的な検討（主に目標症例数の根拠づけ）を行うとともに、Bayes 流の統計的推

測方式に基づく最適治療レジメン探索のためのデザイン及び方法論を開発し、その適用可能性を検討することを目的とした。

## 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.

1) 脂肪組織由来多系統前駆細胞由来筋芽細胞

ヒト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) 実験動物

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、経冠動脈にて細胞を移植し、心機能の改善効果を検討した。

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。

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。

1. 安全性の観点からの心筋治療法における頻度流の目標症例数の根拠づけ
2. 安全性の観点からの最適治療レジメンのBayes流逐次推定法の開発とシミュレーションによる検討

(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 (詳細は分担の項目参照)

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。大阪大学医学部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。

左室補助人工心臓を装着していない心不全患者13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り、

うち10例に筋芽細胞シートを移植した。現在5症例の観察期間は終了し、筋芽細胞シートに起因する有害事象は観察されなかった。5例のうち3例に左室 reverse remodeling 効果を認め、全例においてSAS、6分間歩行による生活の質の改善を認めた。

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. 心筋芽細胞を用いた重症心不全に対する前臨床研究

免疫抑制化慢性心不全モデルブタを複製、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、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組織内で心筋細胞への分化を組織学的に確認、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。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し、 $3 \times 10^5/\text{kg}$  が至適細胞数であることが明らかとなった。

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。

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。平成23年度においては、当該改定・修正を下にコールドランとして2例実施した。

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

## 3. 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た、生物統計学的デザイン・解析

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。本研究にて、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ことが判明した。

#### 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、筋芽細胞シート移植の安全性・可能性を評価し、統括報告書を作成予定であり、拡張型心筋症に対する筋芽細胞シート治療の高度医療化を行う予定である。また、当初の目的であった本細胞シート治療の企業治験申請も達成した。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、小児心不全患者にも応用していく予定であり、現在プロトコールを作成している。

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、企業治験につなげることができた。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  
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

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。

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. 血管新生を促す大網、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。また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。大阪大学付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。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1)。

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。

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。また、移植前の検体の Connexin43 の発現を検討したところ、Connexin43 の発現は diffuse であり、蛋白量の低下していた。一方、筋芽細胞シートを移植した患者では、Connexin43 の発現の局在性は明瞭であり、発現量も向上していた。fast type myosin heavy chain(MHC) をマーカーとする筋芽細胞を免疫染色にて確認したところ、fast type MHC 陽性の細胞は認められなかった。

#### 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

12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。

10名の重症心不全患者に筋芽細胞シートを移植した。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。

10例の症例のうち、5例が半年の観察期間を終了した。観察期間が終了した5症例において、左室 reverse remodeling 効果を示し(図2)、症状の回復も認めた(図3)。現在5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。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、19 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 15 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、5 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 ヶ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 SaO<sub>2</sub>, Ao SaO<sub>2</sub>
- 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 8) 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る。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、前臨床研究にて行った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おり、小児心不全における筋芽細胞シート治療のプロトコールを作成中である。

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、今後、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 治療を行う方針である。

植え込み型人工心臓は、昨年度保険に認可され、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, Sawa Y(7). Induced

adipocyte cell-sheet ameliorates cardiac dysfunction in a mouse myocardial infarction model: a novel drug delivery system for heart failure. *Circulation*. 2011 Sep 13;124(11 Suppl):S10-7.

2. Shudo Y, Sawa Y(11). Novel regenerative therapy using cell-sheet covered with omentum flap delivers a huge number of cells in a porcine myocardial infarction model. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 142(5);1188-96.
3. Fujita T, Sawa Y(7). Clinical impact of combined transplantation of autologous skeletal myoblasts and bone marrow mononuclear cells in patients with severely deteriorated ischemic cardiomyopathy. *Surg Today*. 2011 Aug;41(8):1029-36.
4. Kawamura M, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Ueno T, Kuratani T, Sawa Y. Exchange of DuraHeart left ventricular assist device via a subcostal approach. *J Artif Organs*. 2011 15(1);87-9.

## 2. 学会発表

### 【国外学会】

1. Sawa Y. Tissue-Engineered Cell Sheets to Facilitate VAD Wean. 49<sup>th</sup> American Heart Association (AHA) Orland 2011.11.12-16
2. Shirasaka T. Combined Therapy of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation with Administration of Prostacycline Agonist Makes Left Ventricular Reverse Remodeling on the Impaired Myocardium in Rapid-Pacing Induced End-stage Heart Failure in Canine Heart. 49<sup>th</sup> American Heart Association (AHA) Orland 2011.11.12-16
3. Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Ueno T, Kuratani T, Saito A, Sawa Y. Myoblast Sheet Implantation Can Prevent the Impairment of Cardiac Diastolic Function after Left Ventricular Restoration by Modulating the Extracellular Matrix Gene Expression. Progress Meeting on International consortium for cardiac tissue engineering Tampere, Finland 2011.8.22-24
4. Shudo Y, Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Kainuma S, Kuratani T, Sawa Y. Novel

Regenerative Therapy Using Cell-Sheet Covered with Omentum Flap to Deliver Huge Numbers of Cells in a Porcine Myocardial Infarction Model. 91<sup>th</sup> AATS (American Association for Thoracic Surgery) Philadelphia 2011.5.7-11

5. Saito S, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Ueno T, Kuratani T, Saito A, Sawa Y. Myoblast Sheet Implantation Can Prevent the Impairment of Cardiac Diastolic Function after Left Ventricular Restoration by Modulating the Extracellular Matrix Gene Expression. 31<sup>th</sup> International Society for Heart and Lung Transplantation San Diego 2011.4.13-16
6. 宮川 繁. 澤 芳樹. 再生医療を用いた心不全に対するアンチエイジング治療. アンチエイジングフェスタ 2011 大阪 2011.12.2-3
7. 宮川 繁. 澤 芳樹. 心不全における再生医療の現況. 第 49 回日本人工臓器学会大会 東京 2011.11.25-27
8. 宮川 繁. 吉川泰司. 坂口太一. 西 宏之. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 斎藤充弘. 樋口貴宏. 首藤恭広. 澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する自己筋芽細胞移植の効果—症例報告—. 第 15 回日本心不全学会学術集会 鹿児島 2011.10.13-15

#### 【国内学会】

9. Yoshikawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Saito A, Nishi H, Fukushima S, Saito S, Higuchi T, Shudo Y, Sawa Y. A Scaffold-free myocardial regenerative therapy using the autologous skeletal-muscle-derived cell (SC) sheet implantation for patients with dilated cardiomyopathy. 第 15 回日本心不全学会学術集会 鹿児島 2011.10.13-15
10. 吉岡大輔. 坂口太一. 宮川繁. 西宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 上野高義. 倉谷徹. 澤芳樹. Toyobo 型 LVAD から植込み型 Dura Heart LVAD への conversion の有用性の検討. 第 64 回日本胸部外科学会定期学術集会 名古屋 2011.10.9-12
11. 吉川泰司. 宮川 繁. 坂口太一. 西 宏之. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 斎藤充弘. 樋口貴宏. 首藤恭広. 澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する自己筋芽細胞移植の効果—症例報告—. 第 32 回循環器内科・外科フォーラム 大阪 2011.9.10

12. 宮川 繁. From Bench to Bedside work in cell sheet-based myocardial regeneration therapy. 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 横浜 2011.8.3-4

13. 吉岡大輔. 坂口太一. 宮川繁. 西宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 上野高義. 倉谷徹. 澤芳樹. Optimal Timing of Left Ventricular Assist Device implantation for Severe Heart Failure Patients. 第 75 回日本循環器学会総会・学術集会 横浜 2011.8.3-4

14. 宮川 繁. 坂口太一. 西 宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 齋藤充弘. 首藤恭広. 樋口貴宏. 上野高義. 倉谷 徹. 澤 芳樹. 虚血性心筋症に対する再生型治療の現状と展望. 第 16 回日本冠動脈外科学会学術大会 長野 2011.7.14-15

15. 吉川泰司. 坂口太一. 宮川 繁. 西 宏之. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 上野高義. 倉谷 徹. 澤 芳樹. 虚血性心筋症患者への自己筋芽細胞シート移植の効果. 第 54 回関西胸部外科学会学術集会 高松 2011.6.30-7.1

16. 宮川 繁. 坂口太一. 西 宏之. 吉川泰司. 福嶋五月. 斎藤俊輔. 首藤泰広. 齋藤充弘. 倉谷 徹. 澤 芳樹. 重症心不全における再生型治療の基礎研究および臨床応用. 第 111 回日本外科学会定期学術総会 震災の影響により誌上発表 (予定: 東京国際フォーラム 2011.5.26-28)

17. 首藤恭広. 宮川 繁. 齋藤充弘. 坂口太一. 西 宏之. 吉川や牛倉谷 徹. 澤 芳樹. 重症心不全における新しい細胞移植の検討: 細胞シートの大網を用いた大量細胞移植法. 第 111 回日本外科学会定期学術総会 震災の影響により誌上発表 (予定: 東京国際フォーラム 2011.5.26-28)

18. 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. 澤 芳樹. 重症心不全に対する筋芽細胞シートの臨床応用. 第 27 回日本医工学治療学会学術大会 岡山 2011.4.22-24

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

#### ・第1回 Heart Failure Summit の開催

2011年1月にて、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。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）、澤 芳樹（大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科）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。

#### ・第2回 Heart Failure Summit の開催

2011年12月17日、大阪にて第2回 Heart Failure Summit を開催した。筋芽細胞シートを移植した患者、心臓病の子供を守る会会員の方々、医療関係者等様々な分野からの参加者を認めた。宮川分担研究者より本事業の概要、治療成績の発表、神戸大学循環器内科川合教授、大阪大学小児循環器科小垣先生、厚生労働省健康局疾病対策科 中川先生より御講演をいただいた。市民の小児心不全に対する再生治療の要望も多く、今回は、筋芽細胞シートを移植した患者で結成される患者の会を結成し、今後心不全患者間の情報の交換をすすめることとなった。来年2月14日東京にて第3回 Heart Failure Summit を予定している。

#### ・第3回 Heart Failure Summit の開催

2012年2月14日東京にて第3回 Heart Failure Summit を行った。筋芽細胞シートを移植した患者3名、医療関係者、企業関係者、研究者、医師、患者等様々な分野からの参加者を認めた。澤芳樹プロジェクトリーダーより本事業の成果と今後の展開について講演し、大阪大学未来医療センター

特任准教授松山晃文先生、東京医科歯科大学循環器内科 磯部光章教授、東京女子医科大学先端生命医科学研究所 岡野光夫所長、北里大学循環器内科 猪又孝元講師、厚生労働省健康局疾病対策科 中川先生より、様々な視点から見た心不全に関する御講演をいただいた。また、筋芽細胞シート移植を行った患者との座談会が催された。

#### ・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ディー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。

また、本研究より得られたデータを基にして、虚血性心筋症に対する筋芽細胞シート移植治療の企業治験が PMDA に提出され、スタディーデザインの合意は得られ、治験承認された。



## 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 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

図 1

## 左室形態・機能の変化 — 虚血性心筋症 —

	Case 1		Case 3		Case 4	
	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
HR	80	80	75	77	58	59
LVEDVI (ml/cm <sup>2</sup> )	182	183	167	171	183	162 ↓
LVESVI (ml/cm <sup>2</sup> )	132	118 ↓	145	146	129	113 ↓
LVEF(%)	28	35 ↑	13	15	29	30
LVM(g/cm <sup>2</sup> )	95	84 ↓	75	55 ↓	-	-
Wall stress	429	295 ↓	460	393 ↓	370	370

図 2

## 運動耐用能の変化 — 虚血性心筋症 —

### 虚血性心筋症 3 例

	年 齢	性 別	術後生 存期間 (日)	術前後の変化	運動耐容能
Case 1	58	M	276	↑ 退院 NYHA III → NYHA II	6分間歩行: 525m → 560m SAS: 3-4Mets → 6-7Mets
Case 3	61	M	392	↑ 退院 在宅酸素療法から離脱	6分間歩行: 200m → 501m SAS: 3-4Mets → 5-6Mets
Case 4	53	M	332	↑ 退院 NYHA III → NYHA II	6分間歩行: 270m → 360m SAS: 2-3Mets → 3-4Mets

(SAS: 身体活動能力質問票)

図 3

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

研究分担者

大阪大学医学部附属病院 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。次いで、off-patent chemical library からのべ約 3000 種類に薬剤を用い、安定的に脂肪組織由来多系統前駆細胞を心筋芽（様）細胞に分化誘導する薬剤 Chemical X をスクリーニングし、ブタ慢性心不全モデルによりその有効性用量設定試験を終了した。Chemical X-induced Cardiomyoblast-like Cells は、投与後梗塞後ブタ心筋内に生着し、心筋特蛋白を発現する。これらから、*in situ* reprogramming との概念を世界に先駆けて提唱した。

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。

薬剤X誘導心筋芽細胞は、ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞を薬剤X添加培養24時間にて得た。

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。ヒト由来細胞の移植に向け免疫抑制プロトコールの構築を行うこととし、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。

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、神戸都市振興サービス株式会社より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 を実施した。臨床試験プロトコール策定については、MPR 社に依頼した。

### 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。

(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(図表を1~2点添付)

### Chemical X 誘導心筋芽細胞懸濁液経冠動脈投与

#### ①慢性心不全ブタモデルの最適化

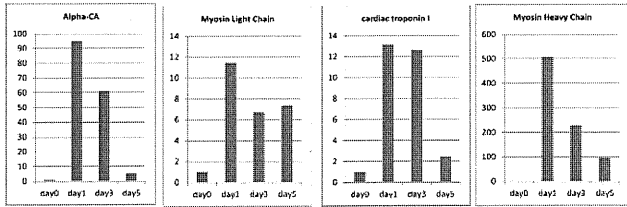
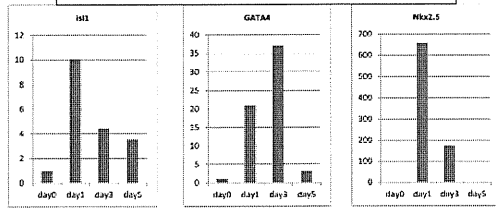
広範囲心筋障害モデル作製のため、前下降枝#6にてバルーニングを行うこととし、2atm 60minにて閉塞を行った。ブタ6頭のうち、翌日生存が3頭であり、より生存率が高くかつ広範囲心筋障害

モデルが作成しうることが望まれた。Pre-conditioning が有効と想定、2段階塞栓法を考案した(論文投稿準備中)。具体的には、第1対角枝#9にて2atm 30min/60min/120minバルーニングを行い、生存率と心臓超音波検査にて心室壁運動を検討した。第1回バルーニング非実施群・30min群・60min群・120min群では各々生存は6頭中3頭、3頭、5頭、4頭であった。1回目バルーニングの後、1週間後に前下降枝#6に2atm 60minバルーニングを行い、そののち4週間後に心筋壁運動につき検討した。60minおよび120minバルーニング群で側壁運動の低下を認め、本事業で対象として広範囲心筋症のモデルとしては、60minあるいは120minバルーニング群が適していることを見出した。以後、我々が開発した2段階塞栓法(第1回目対角枝#9 2atm 60min、1週間後に第2回目前下降枝#6 2atm 60min)にて、第2回目バルーニング後4週間にて試験に供するのが最適と判断した。

#### ②off-patent chemical libraryからの心筋芽細胞誘導薬剤のスクリーニング

心筋遺伝子マーカーとして *islet-1*、*GATA-4*、*Nkx2.5*、*alpha CA*、*Myosin light chain*、*cardiac troponin I*、*Myosin heavy chain* を選択、それらの発現増強を指標として、LOPAC off-patent chemical library から低分子化合物(ファミリー)をスクリーニングしえた(動物試験のデータを交えての特許出願を準備中)。当該薬剤の至適添加濃度、培養日数を検討、下図のように24時間培養が最適であるとの結論にいたった。

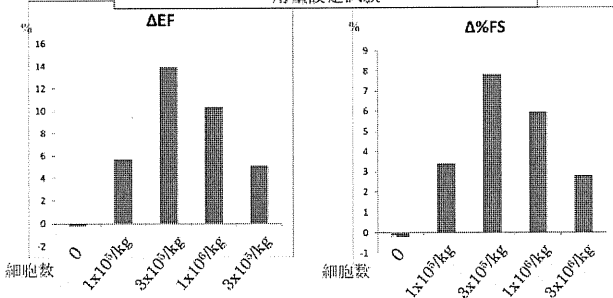
Chemical Xによる心筋遺伝子マーカー発現増加（比率）



### ③薬剤 X 誘導心筋芽細胞懸濁液経冠動脈単回投与有効性用量設定試験

前記項目②にて見出した薬剤 X 誘導心筋芽細胞の、ブタ慢性心不全モデルにおける有効性を検証することとした。ブタ慢性心不全モデルとして前記項目①にて作製したモデルを採用した。有効性用量を見出すため、投与細胞数 0、 $1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$  cells/kg として、線型性を担保して有効性用量設定試験を実施した。当該細胞浮遊液を経冠動脈的に#7 に投与し、心筋前壁の壁運動を心臓超音波試験にて検討。細胞投与後 1 カ月にて  $\Delta$ EF% および  $\Delta$ %FS（細胞投与時との経時的変化）を検討したところ、 $3 \times 10^5$  cells/kg が最適用量であることが見出された。

経冠動脈的投与後4週間後のEF及び%FSの変化率  
用量設定試験



$1 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$  cells/kg においては投与細胞用量依存的に心機能の改善が認められる。一方、 $3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$  cells/kg と用量が増加すると、むしろ有効性は低下している。これは、投与細胞が多いことによる心筋障害等が想定される。

以上の結果より、最適有効用量は  $3 \times 10^5$  cells/kg として決定した。

### ④Chemical X 誘導心筋芽細胞懸濁液経冠動脈頻回投与試験（有効性蓄積試験）

臨床の現場にての利用を想定すると、1 回よりも複数回の細胞投与によるより効果的な細胞治療が期待される。そこで、前記項目③にて決定した有効性用量である  $3 \times 10^5$  cells/kg に固定し、1 回投与、2 回投与、3 回投与（2 週間間隔）の比較試験を行うこととした。Preliminary な試験結果ではあるものの、1 回投与よりも 2 回投与群でより心機能が改善していた。3 回投与群でも有効性蓄積が認められたが、その蓄積は投与回数が増加するにともない低減すると推測される。

3 回投与においては、アナフィラキシーを含む有害事象は認めておらず、有効性の蓄積は認めるが、危険性の蓄積は認めないと思われる。

### D. 考察

DMSO 加濃縮培養あるいは薬剤 X 誘導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 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が検証する。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、特に慢性毒性試験、体内動態試験が求められよう。

### E. 結論

DMSO 加培養ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞