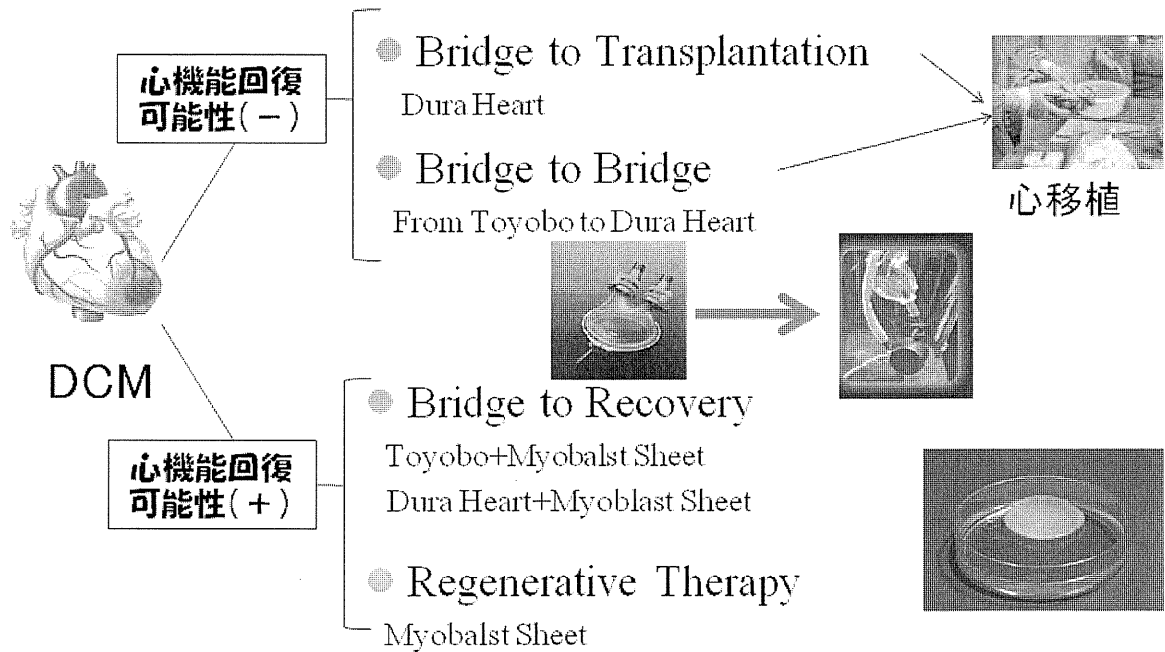


重症拡張型心筋症へのbridge-to transplantation /recoveryを目指した新規治療法の開発と実践



末期DCM患者の治療法の確立

図 1

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

図 2

各症例の筋芽細胞培養上清中 血管新生関連因子量

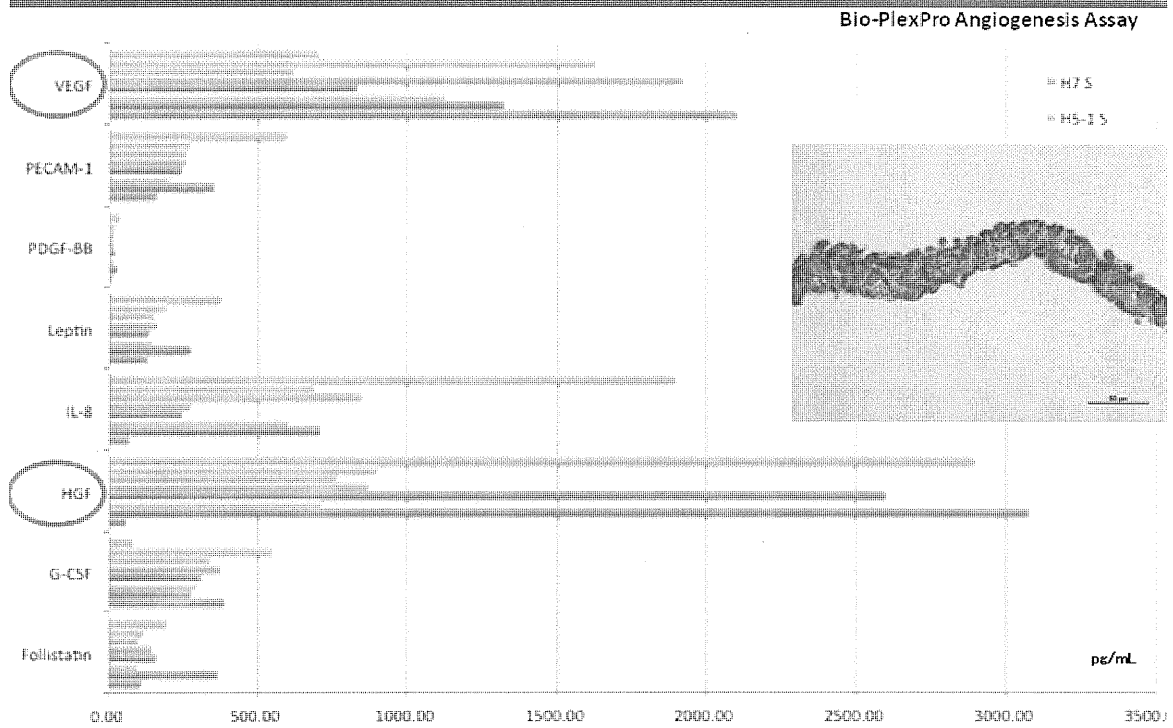
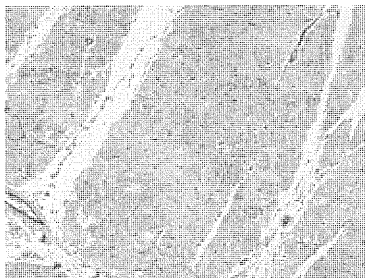


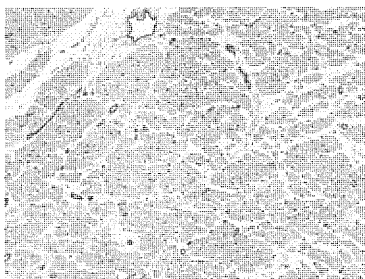
図 3

左室補助装置と自己由来細胞シート移植

筋芽細胞シート移植前



筋芽細胞シート移植後



血管密度

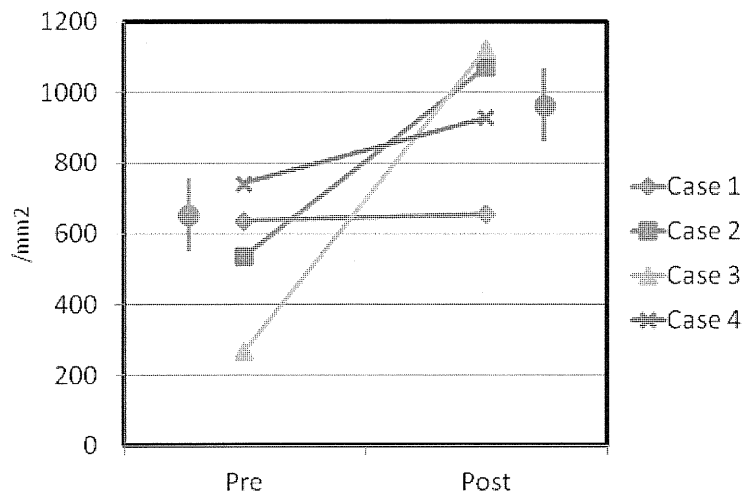


図 4

Connexin 43

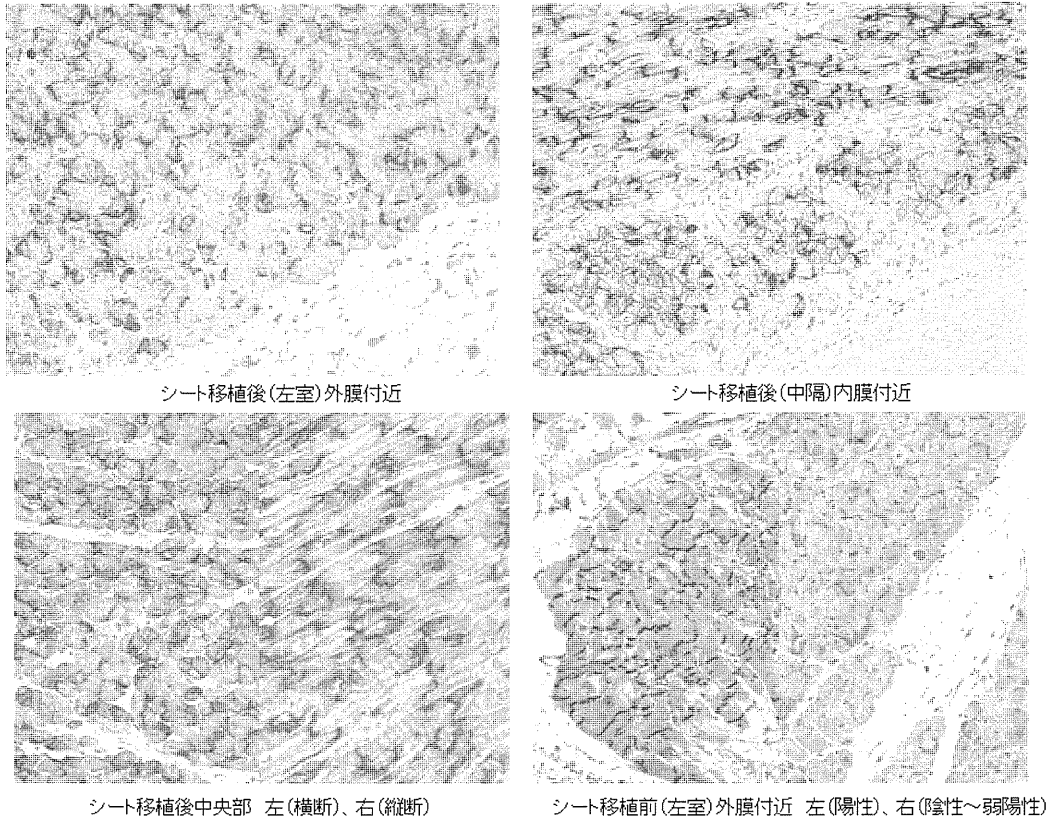
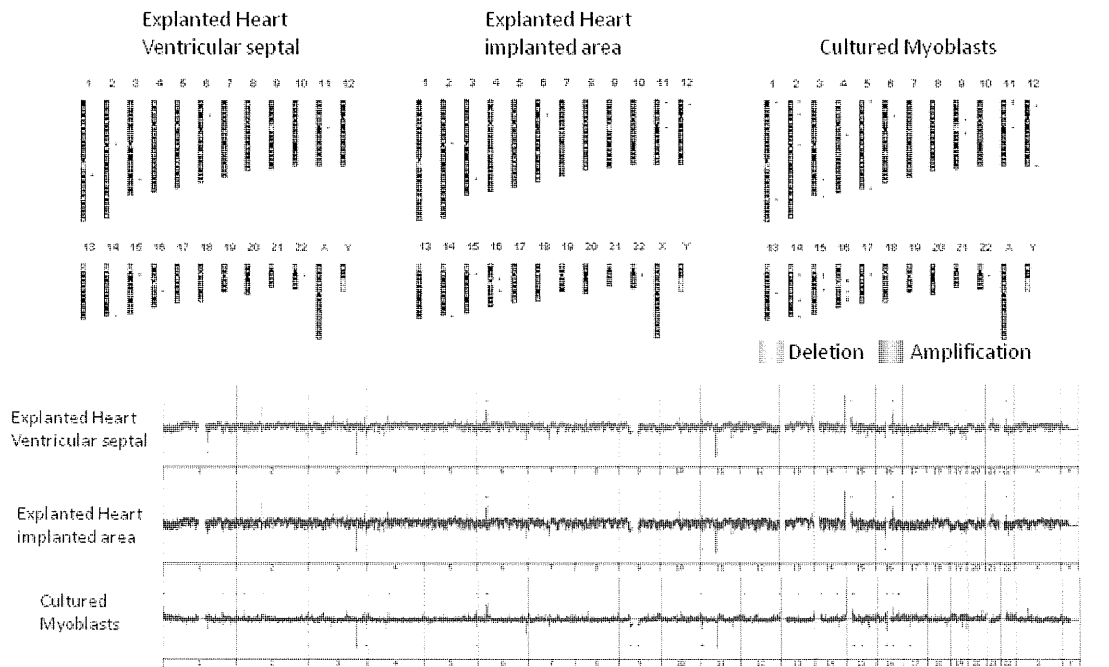


図 5

ゲノム異常の解析法(アレイCGH解析)→コピー数変化領域を検出

Genome Overview



コピー数の変化領域はすべてCNV(Copy Number Variation)として報告されている領域であった

Human Genome CGH Microarray 244k (Agilent)
Reference: HapMap DNA NA19000B (Japanese, Male)

図 6

アンモニアPETによる血流評価

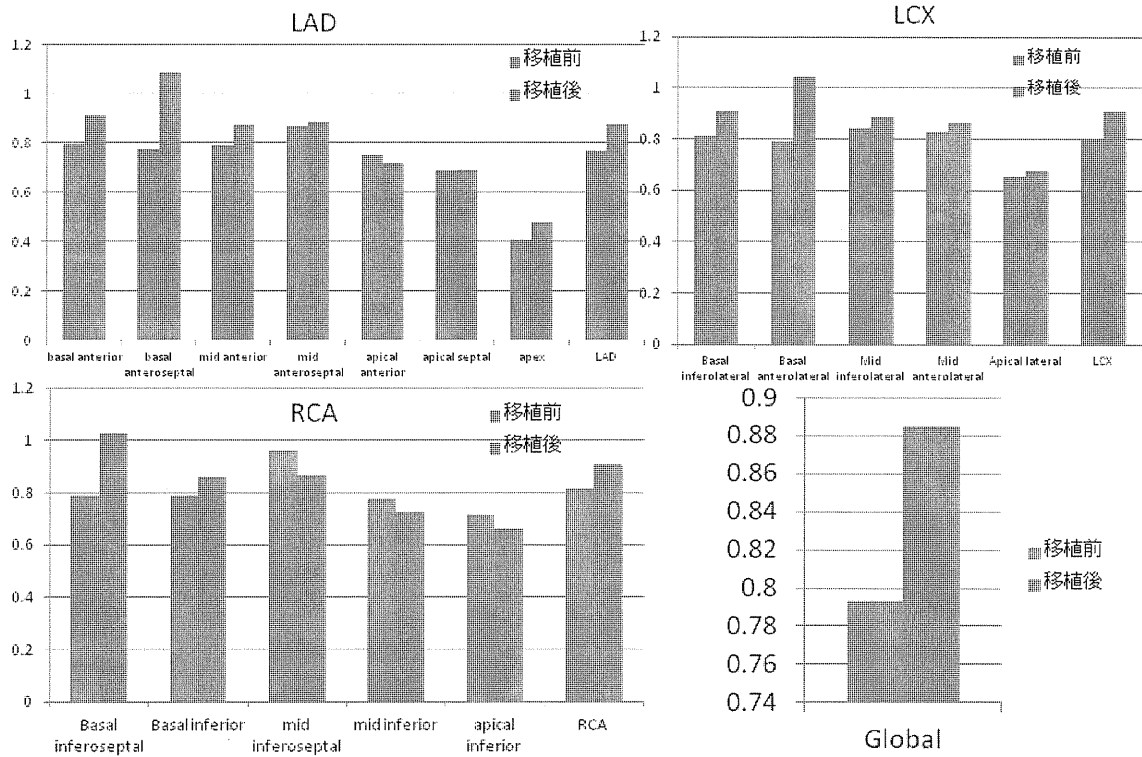


図 7

NH₃-PET による血流変化の解析

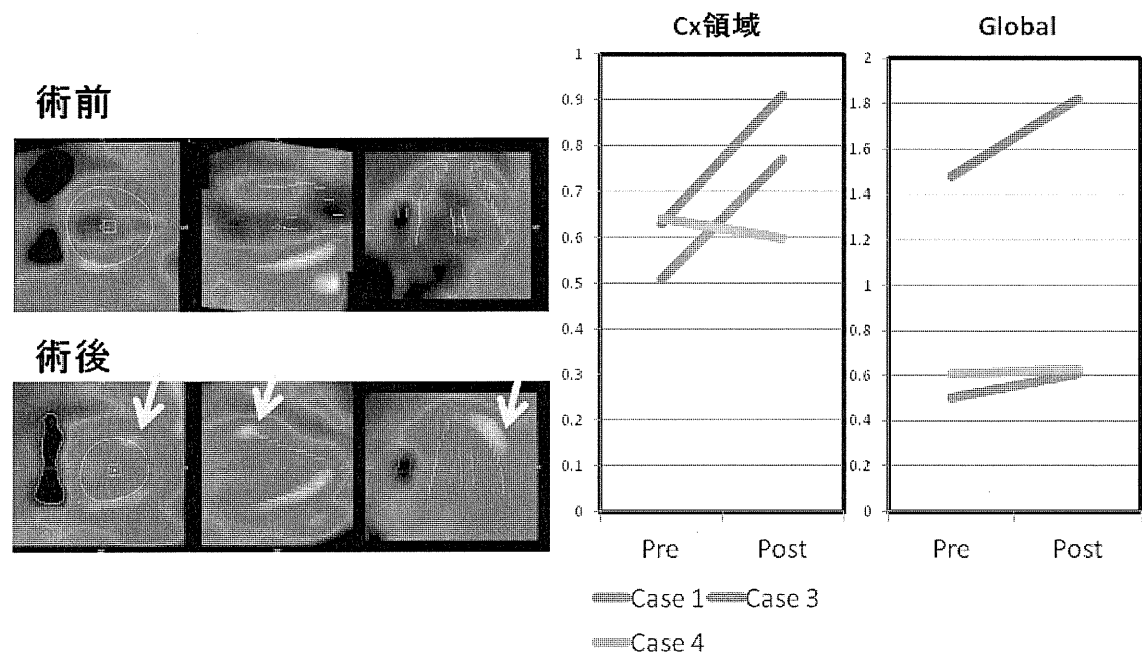


図 8

移植前LVEF vs Δ LVEF

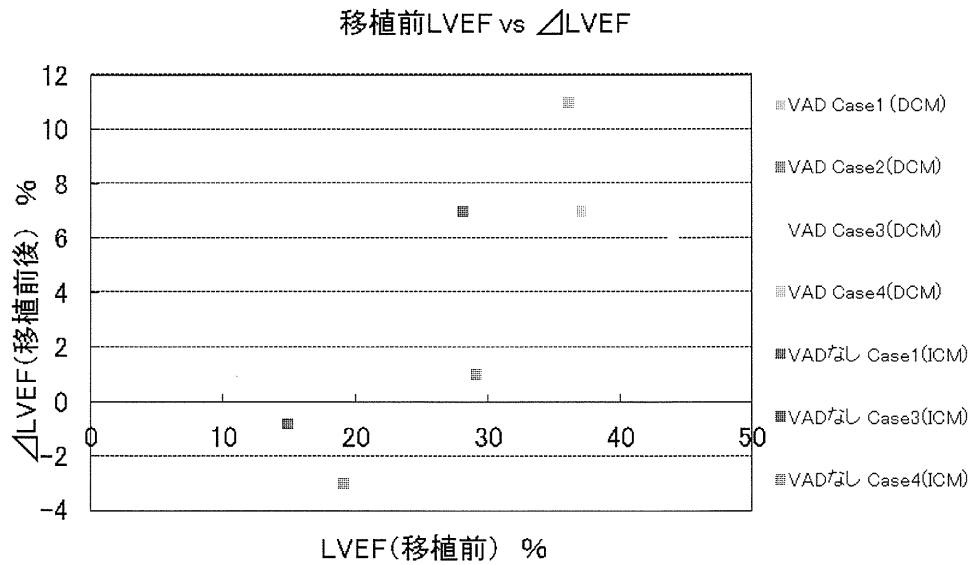


図 9-1

移植前LVEF vs Δ LVESV

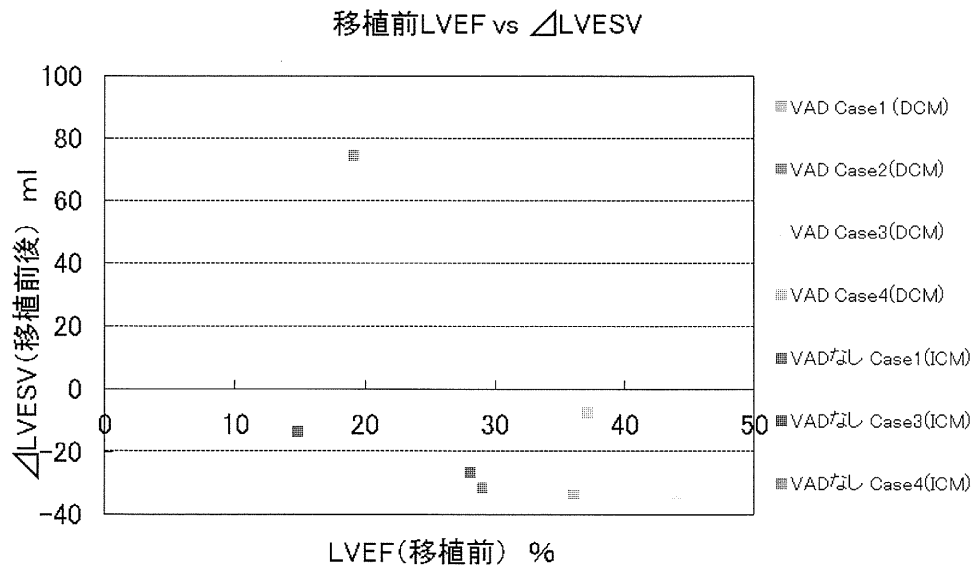


図 9-2

移植前LVEF vs Δ 6分間歩行距離

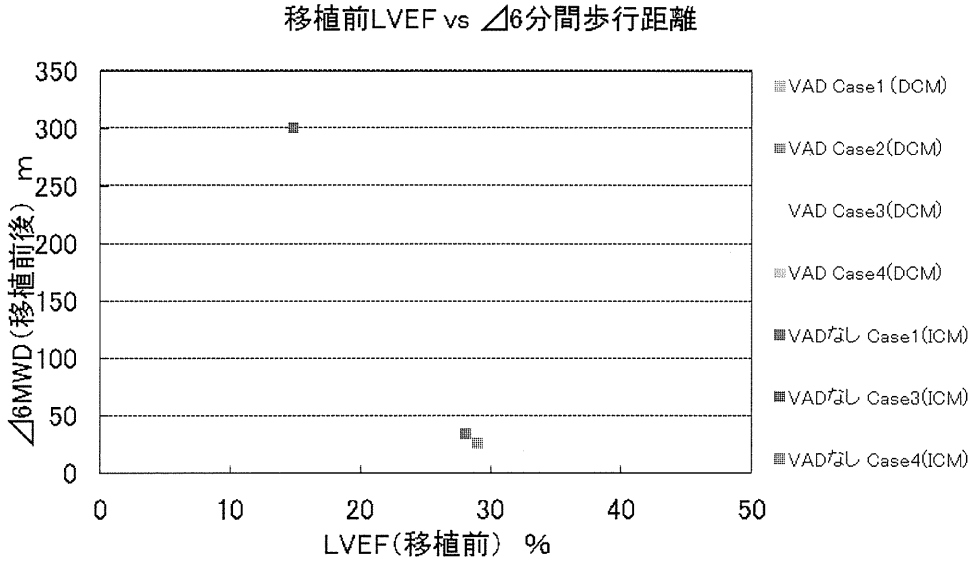


図 9-3

移植前LVEF vs Δ SAS

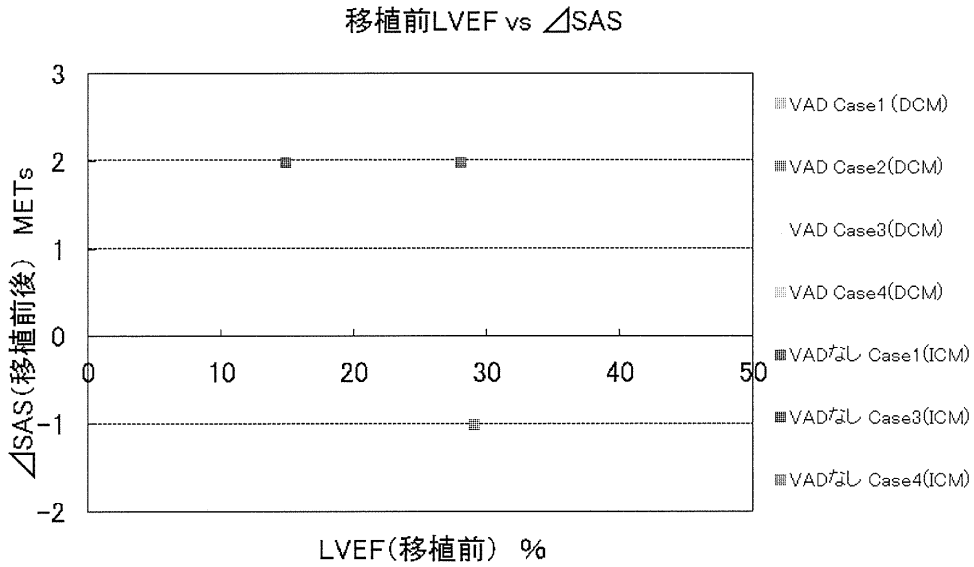


図 9-4

筋芽細胞+大網のブタ慢性期梗塞モデルへの移植

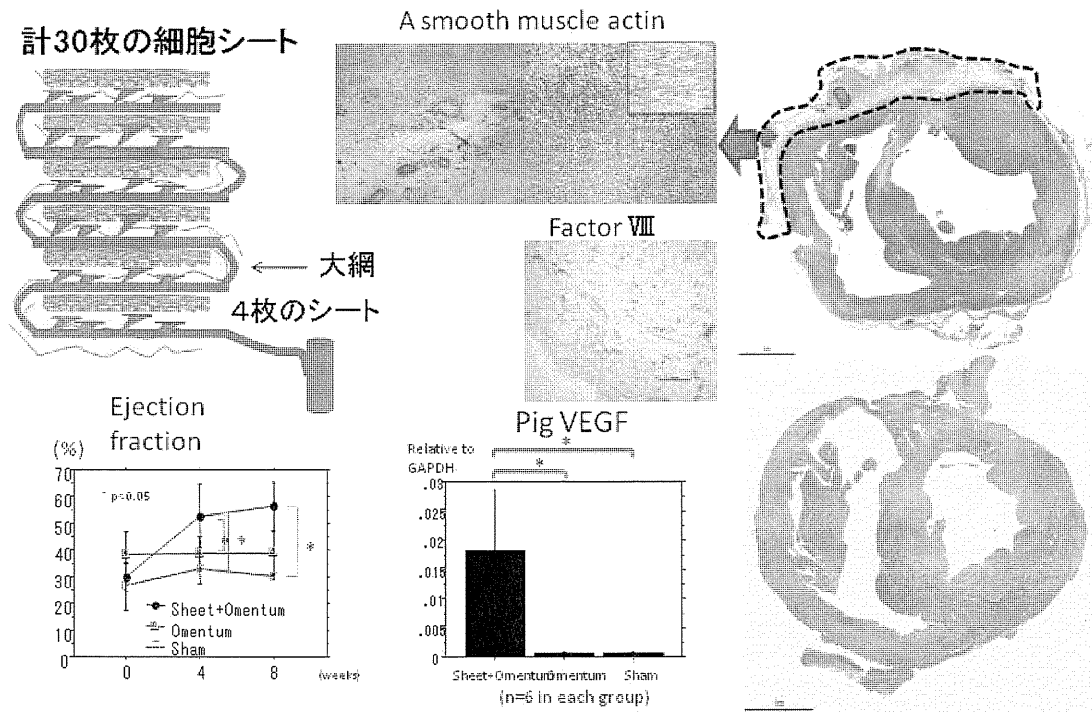
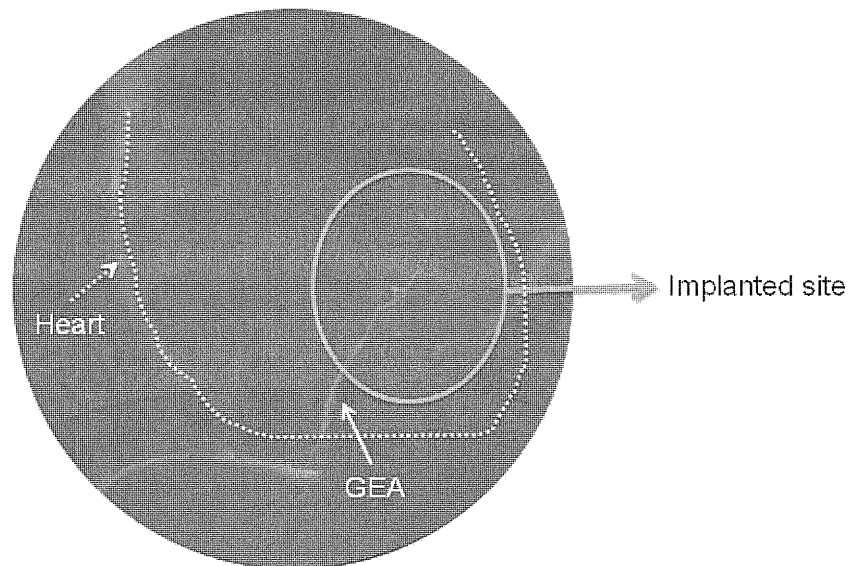


図 10

Result

-Angiography via gastroepiploic artery (GEA)-

SO group: Cell sheet wrapped with omentum



Gastroepiploic artery (GEA) perfused the omentum and the myocardial tissue.

図 11

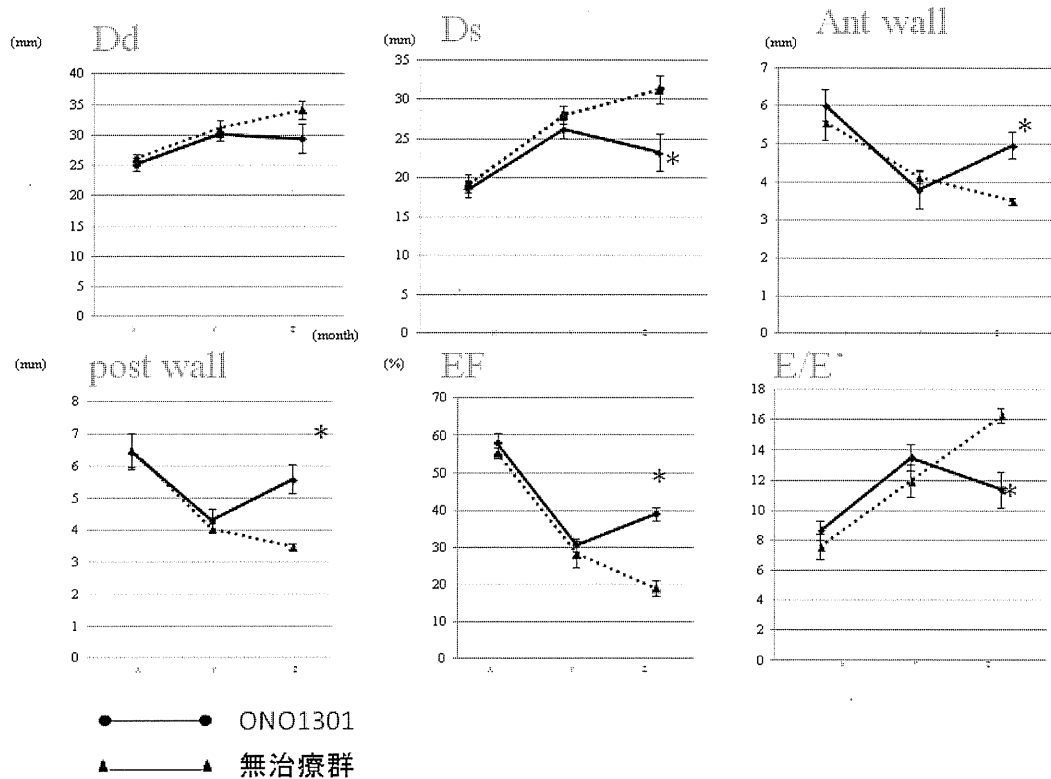


図 12

Case 5 38y.o Female DCM (Toyobo→離脱→Dura Heart)

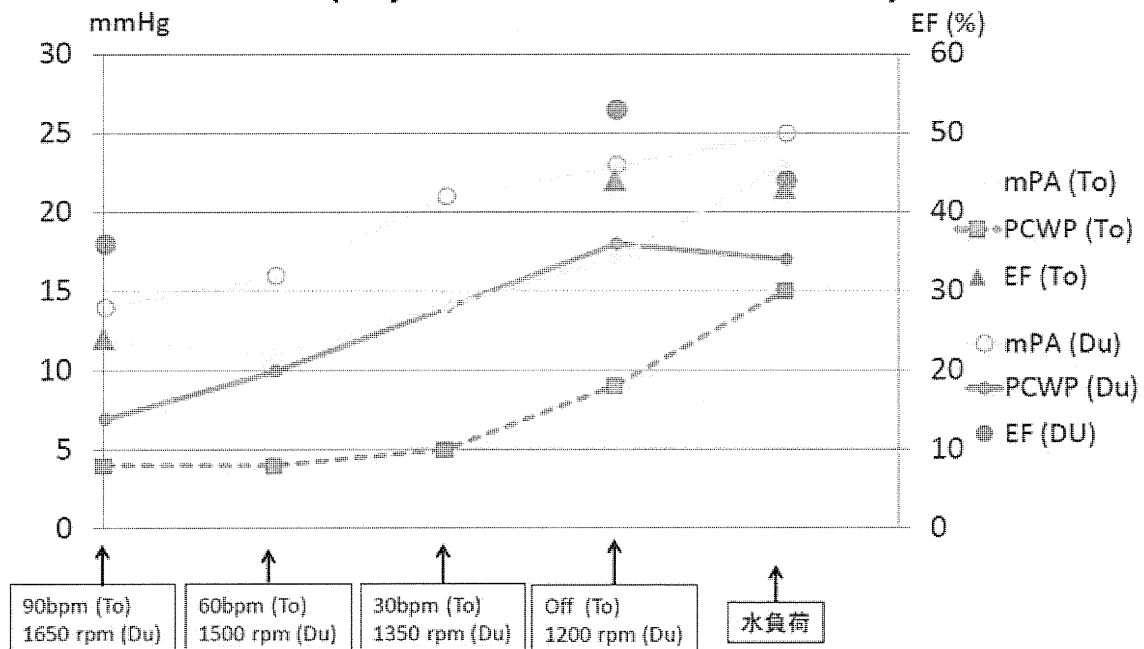


図 13

筋芽細胞シート移植手術を受けられた 患者さんの感想



第1回Heart Failure Summit 2011.1. 東京

図 14

第2回 HEART FAILURE サミット2011 市民公開講座
第6回未来医療市民公開シンポジウム
(第15回未来医療交流会)

「心不全は治る!？」

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

日時：平成23年12月17日(土)13:00 ~ 16:30
場所：ハービスENT会議室(9階)
主催：大阪大学大学院医学系研究科心臓血管外科
未来医療交流会

【プログラム】
司会：奥井 ともこ(アナウンスクラブ)

13:00-13:10 開会挨拶 大阪大学 心臓血管外科教授 澤 芳樹

13:15-13:45 講演「本事業の成果と今後の展開」 大阪大学 心臓血管外科助教 宮川 繁

13:45-14:15 講演「成人心不全診療の現状」 神戸大学 循環器内科教授 川合 宏哉

14:15-14:45 講演「小児の重症心不全:過去・現在・未来」 大阪大学 小児循環器科講師 小垣 滋豊

14:45-15:15 講演「難治性疾患治療に対する行政の取り組み」 厚生労働省健康局 疾病対策課 中川 義章

15:15-16:15 総合パネル
「人工心臓、心臓移植、再生医療の心不全患者さんの立場から」

16:20-16:30 閉会挨拶 大阪大学 心臓血管外科 教授 澤 芳樹

図 15

第3回 HEART FAILURE サミット市民公開講座

「心不全は治る!？」

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

日時：平成24年2月14日(火)13:00 ~ 16:30

場所：東京ステーションコンファレンス 602号室

主催：大阪大学医学系研究科 心臓血管外科

【プログラム】

司会：山本淳子(アナウンスクラブ)

- 13:00-13:05 開会のご挨拶 大阪大学 心臓血管外科 教授 澤 芳樹
- 13:05-14:00 成果報告1
「本事業の成果と今後の展開」
大阪大学 心臓血管外科 教授 澤 芳樹
- 成果報告2
「脂肪組織由来細胞による重症心不全の再生細胞治療を目指して」
大阪大学 未来医療センター 特任准教授 松山 晃文
- 14:10-14:30 講演「心不全とは：現状と課題」
東京医科歯科大学 循環器内科 主任教授 磯部 光章
- 14:30-14:50 講演「世界初の細胞シート再生医療の開始」
東京女子医科大学 先端生命医学研究所 所長 岡野 光夫
- 14:50-15:10 講演「心不全とどう向き合うか～医師として、患者として」
北里大学 循環器内科 講師 猪又 孝元
- 15:10-15:30 講演「難治性疾患治療に対する行政の取組み」
厚生労働省健康局 疾病対策課 中川 義章
- 15:40-16:20 総合パネル
「人工心臓、心臓移植、再生医療の心不全患者さんの立場から」
- 16:20-16:30 閉会のご挨拶 大阪大学 心臓血管外科 教授 澤 芳樹

図 16

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 x10 ⁸
No. 2	23M	DCM, LVAD	95.1 %	6.2 x10 ⁸
No. 3	30M	DCM, LVAD	92.9 %	7.5 x10 ⁸
No. 4	33F	DCM, LVAD	42.3 %	8.3 x10 ⁸

Study 2	年齢 性別	疾患	CD56 (+)	移植細胞数
No. 1	58M	ICM	67.6 %	8.2 x10 ⁸
No. 2	36M	DCM	67.9 %	7.5 x10 ⁸
No. 3	61M	ICM	57.7 %	8.7 x10 ⁸
No. 4	53M	ICM	53.8%	8.2 x10 ⁸

表 1

患者背景

	年齢	性別	診断	術前状態	集出率	純度 (%)	総細胞数 (x10 ⁸)	枚数
Case 1	58	男	ICM	NYHA III	28	67.6	7.8	25
Case 2	37	男	DCM	強心剤	23	67.9	7.2	24
Case 3	61	男	ICM	冠動脈バイパス術後 在宅酸素療法	21	57.7	8.8	25
Case 4	53	男	ICM	NYHA III	29	53.8	7.2	24
Case 5	59	男	DCM	僧帽弁置換術後	30	57.0	4.5	15
Case 6	58	男	DCM	NYHA III	28	21.2	1.1	37
Case 7	31	男	ICM	NYHA III 経過観察中	23	59.4	3	29
Case 8	68	女	ICM	冠動脈バイパス術後 経過観察中	31	59.2	8.7	29
Case 9	53	男	ICM	NYHA III,PH	21	99	4.9	24

(ICM:虚血性心筋症、DCM:拡張型心筋症)

表 2

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 ²)	182	183	167	171	183	162 ↓
LVESVI (ml/cm ²)	132	118 ↓	145	146	129	113 ↓
LVEF(%)	28	35 ↑	13	15	29	30
LVMI(g/cm ²)	95	84 ↓	75	55 ↓	-	-
Wall stress	429	295 ↓	460	393 ↓	370	370

表 3

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)

表 4

心機能の変化 — 拡張型心筋症 —

	Case 2		Case 5	
	Pre	Post	Pre	Post
HR	60	60	71	62
LVEDVI(ml/cm ²)	204	212	263	208 ↓
LVESVI(ml/cm ²)	157	170	226	183 ↓
LVEF(%)	23	20	14	12
LVMI(g)	-	-	117	95 ↓
RVEDVI	97	83 ↓	85	61 ↓
RVESVI	49	31 ↓	71	38 ↓
RVEF	49	63 ↑	16	38 ↑
Wall stress	338	318 ↓	336	341

表 5

生活の質の向上 — 拡張型心筋症 —

	年齢	性別	術後生存期間(日)	術前後の変化	運動耐容能
症例2	37	男	433	↑ 退院 強心剤から離脱 社会復帰	6分間歩行: なし→622m SAS: 4-5Mets(強心剤下)→4-5Mets(強心剤なし)
症例5	59	男	245	↑ 退院 NYHA III → NYHA II	6分間歩行: 662m→667m SAS: 5-6Mets→6-7Mets
症例6	58	男	182	↑ 退院 NYHA III → NYHA II	(—)

(SAS: 身体活動能力質問票)

表 6

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えた。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、心筋特有的蛋白を発現する。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。

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。薬剤X誘導心筋芽細胞にあつては、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。

MPR社に依頼し、脂肪組織由来幹細胞及び骨格筋芽細胞にかかる特許調査、ならびに臨床研究プロトコール作成を行った。

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）

1) DMSO 加濃縮脂肪組織由来多系統前駆細胞シート移植

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

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

次いで、心臓超音波検査における心駆出率に関して検討したところ、シート移植群では約30%の心駆出率が4週後には約42%、8週後には45%にまで改善していた。一方でシート非移植コントロール群では、28%から4週後には32%、8週後には31%であり、心駆出率を指標とした心機能検査でも、シート移植群では有意な改善を認めた。

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

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

組織学的に検討すると、DMSO加培養ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞/多系統前駆細胞移植群では、

移植したヒト細胞がヒト特異的心筋アクチンを発現しており、当該細胞が移植後in situにて心筋へと分化生着していることが明らかとなった。加えて、移植部位のみならず、marginal zoneにおいてもヒト細胞由来心筋を認めることから、広範囲にわたり障害心筋組織を修復していることが明らかとなった。

2) DMSO 加濃縮脂肪組織由来多系統前駆細胞懸濁液経冠動脈投与

《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 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。

《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 1）、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。

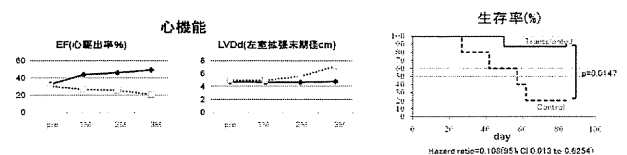


図 1 有効性：心機能および生存曲線

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）よりも心駆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。

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関しては表にまとめた (表)。

試験項目	承認	投与	試験系	適用方法	試験結果
慢性毒性試験	GLP	P3hADMPCs	細胞分化		Let a, b, c 正常
		P5hADMPCs	細胞分化		Let a, b, c 正常
		P8hADMPCs	細胞分化		Let a, b, c 正常
GLP	ADMPCs	P3h, P5, P8 vs. P2, P5 vs. P8	遺伝子発現変動試験		Let a, c 異常発現あり
			遺伝子発現変動試験		Let a, c 異常発現あり
慢性毒性試験	GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	ブタ心臓への移植	ブタ心臓への移植	Let a, c: 異常発現あり
					Let a, c: 異常発現あり
慢性毒性試験	GLP	P5hADMPCs	ブタ心臓への移植	ブタ心臓への移植	Let a, c: 異常発現あり
					Let a, c: 異常発現あり
慢性毒性試験	GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	ブタ心臓への移植	ブタ心臓への移植	Let a, c: 異常発現あり
					Let a, c: 異常発現あり
慢性毒性試験	GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	ブタ心臓への移植	ブタ心臓への移植	Let a, c: 異常発現あり
					Let a, c: 異常発現あり

試験項目	承認	投与	試験系	適用方法	試験結果
安全性薬理試験	GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化		正常
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化		正常
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化		正常
慢性毒性試験 (運命試験)	non-GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
薬理学的試験	non-GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
保存安定性試験	non-GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
細胞分化安定性試験	non-GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
慢性毒性試験	GLP	DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり
		DMSO 投与群 P5hADMPCs	細胞分化	慢性心筋梗塞モデルブタ organ panelにて投与	異常発現あり

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
外觀	淡黄色濁濁液で異物混入及び液體なし
細胞濃度	未測定
細胞生存率	70%以上
細胞分布	未測定
純度 (細胞表面マーカー)	CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性
転写因子発現確認試験 (RT-PCR法)	islet1、nkx2.5、GATA-4陽性
マイコプラズマ	陰性
エンドトキシン	製剤原液当たり1.67EU/mL以下
菌類	陰性
増殖由来成分否定試験	BSAを指標にELISAによる感度以下確認

モニタリング項目	
試験	測定基準
心筋梗塞由来の検証 (RT-PCR法)	alpha-GA、MLC、MHC、cardiac Troponin I等

重要中間体 (P5 or P6) でのモニタリング項目	
試験	測定基準
細胞表面マーカー	CD45陰性、CD44陽性、CD90陽性
細胞増殖能	未測定
転写因子発現確認試験 (RT-PCR法)	islet1陽性
数値分化	分化確認
増殖細胞分化	分化確認
脂肪細胞分化	分化確認

本事業による成果は、第 10 回日本再生医療学会総会にて執り行われた、スーパー特区薬事勉強会にて公表し、我が国の再生医療研究開発水準の向上に寄与した。(資料 1)

3) Chemical X 誘導心筋芽細胞懸濁液経冠動脈投与

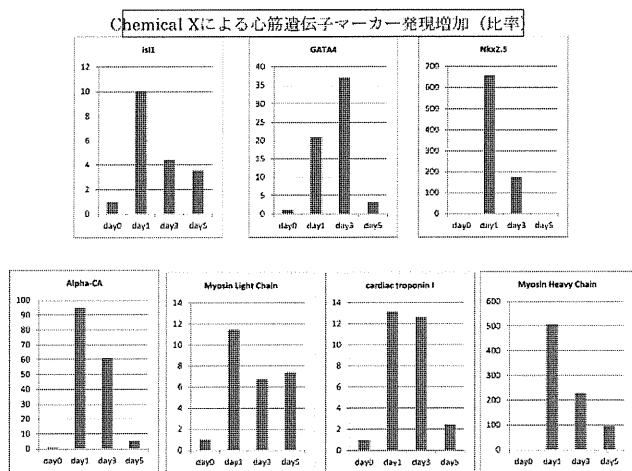
①慢性心不全ブタモデルの最適化

広範囲心筋障害モデル作製のため、前下降枝#6にてバルーンリ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 バルーンリングを行い、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 回バルーンリング非実施群・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 回目バルーンリングの後、1 週間後に前下降枝#6に 2atm 60min バルーンリングを行い、そのうち 4 週間後に心筋壁運動につき検討した。60min および 120min バルーンリ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 バルーンリ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

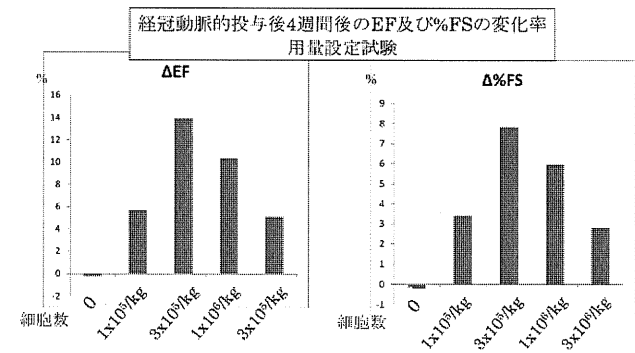
心筋遺伝子マーカーとして *islet-1*、*GATA-4*、*Nkx2.5*、*alpha CA*、*Myosin light chain*、*cardiac troponin I*、*Myosin heavy chain* を選択、それらの発現増強を指標として、LOPAC off-patent chemical library から低分子化合物(ファミリー)をスクリーニングしえた(動物試験のデータを交えての特許出願を準備中)。当該薬剤の至適添加濃度、培養日数を検討、下図のように24時間培養が最適であるとの結論にいたった。



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、 1×10^5 、 3×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 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 Δ EF%および Δ %FS (細胞投与時との経時的変化)

を検討したところ、 3×10^5 cells/kg が最適用量であることが見出された。



1×10^5 、 3×10^5 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、 3×10^5 、 1×10^6 、 3×10^6 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 3×10^5 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 3×10^5 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あるいは薬剤X誘導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を行い、すみやかな薬事展開を目指したい。

なお、本事業の我が国の再生医療研究開発水準の向上への寄与の観点から、当ラボにてミーティング時に用いた資料を添付する(資料3-1~3-9)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okura H, Saga A, Soeda M, Ichinose A, Matsuyama A. Adipose Tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells as a Promising Tool for *In Situ* Stem Cell Therapy. *Current Tissue Engineering*, 2012. Accepted date: Jan 03. 2012.
- Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, Fujita T, Matsuyama A, Saito A, Shimizu T, Okano T. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today*. 2012 Jan;42(2):181-4. Epub 2011 Dec 27.
- Saga A, Okura H, Soeda M, Tani J, Fumimoto Y, Komoda H, Moriyama M, Moriyama H, Yamashita S, Ichinose A, Daimon T, Hayakawa T, Matsuyama A. HMG-CoA reductase inhibitor augments the serum total cholesterol-lowering effect of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells in hyperlipidemic homozygous Watanabe rabbits. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Aug 19;412(1):50-4.
- Yuasa-Kawase M, Masuda D, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Nishida M, Ishigami M, Kawamoto T, Komuro I, Yamashita S. Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2011 Nov 10. [Epub ahead of print]
- Hanada H, Mugii S, Okubo M, Maeda I, Kuwayama K, Hidaka Y, Kitazume-Taneike R, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Tsubakio-Yamamoto K, Masuda D, Ohama T, Matsuyama A, Ishigami M, Nishida M, Komuro I, Yamashita S. Establishment of chemiluminescence enzyme immunoassay for apolipoprotein B-48 and its clinical applications for evaluation of impaired chylomicron remnant metabolism. *Clin Chim Acta*. 2012. Jan 18. 413(1-2):160-5.
- Masuda D, Sakai N, Sugimoto T, Kitazume-Taneike R, Yamashita T, Kawase R, Nakaoka H, Inagaki M, Nakatani K,

- Yuasa-Kawase M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Nakagawa-Toyama Y, Nishida M, Ishigami M, Masuda Y, Matsuyama A, Komuro I, Yamashita S. Fasting Serum Apolipoprotein B-48 Can be a Marker of Postprandial Hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(12):1062-70.
- Okura H, Saga A, Fumimoto Y, Soeda M, Moriyama M, Moriyama H, Nagai K, Lee CM, Yamashita S, Ichinose A, Hayakawa T, Matsuyama A. Transplantation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells reduces serum cholesterol in hyperlipidemic Watanabe rabbits. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011 Feb;17(2):145-54.
 - Matsuyama A.: Diabetes Mellitus: An Opportunity for Therapy with Regenerative Medicine? Beta Cells: Functions, Pathology and Research. Editors: Sarah E. Gallagher, Nova Publishers. 2011.
 - Fujii H, Matsuyama A, Komoda H, Sasai M, Suzuki M, Asano T, Doki Y, Kirihata M, Ono K, Tabata Y, Kaneda Y, Sawa Y, Lee CM. Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo. *Radiat Oncol.* 2011 Jan 20;6:8.
 - Sandoval JC, Nakagawa-Toyama Y, Masuda D, Tochino Y, Nakaoka H, Kawase R, Yuasa-Kawase M, Nakatani K, Inagaki M, Tsubakio-Yamamoto K, Ohama T, Matsuyama A, Makoto Nishida, Ishigami M, Komuro I and Yamashita S. Molecular Mechanisms of Ezetimibe-Induced Attenuation of Postprandial Hypertriglyceridemia. *J Atheroscler Thromb.* 2010 Sep 30;17(9):914-24.
 - Komoda H, Okura H, LeeC-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.
 - 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.
 - 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.
 - 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.*
 - 松山晃文：「臓器移植・組織移植から再生医療へ—臓器・組織・細胞の procurement の観点から」移植医療のこれから：第2部III 12：町野朔・山本輝之・辰井聡子編 信山社 2011. p175-184.