

厚生労働科学研究費補助金
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業
(総括)研究報告書

小児心不全に対する細胞治療と単心室症由来人工多能性幹(iPS)細胞
の樹立による次世代心筋再生医療法の開発に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

複雑心奇形である機能的単心室症に対する修復術後遠隔期における循環不全は、従来の治療法では救命が期待できない重篤な心疾患である。ヒト心臓内幹細胞は成人より小児の心臓内に多く存在し、かつ自己複製能が高いことから、小児心不全に対する心臓内幹細胞自家移植療法を確立することを本研究事業目的とする。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

心臓血管外科教授

伊藤 浩

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

循環器内科教授

A. 研究目的

本研究事業では、欧米では小児心臓移植適応例の50%以上を占める単心室症由来の小児心不全に対して、冠動脈内注入法による心臓内幹細胞自家移植療法を行うことで、世界初の小児心不全に対する細胞治療法を実用化することを目的とする。

平成24年度では、平成22年度から平成23年度にかけて実施してきた左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植の連続全7症例の安全性確認

と非移植群である7症例との心機能改善度に関する有効性の検証を細胞移植後1年目まで観察し、TICAP第1相臨床試験の研究成果の総括を行うことを目的とする。

B. 研究方法

1. 小児心不全への細胞移植療法の第1相臨床試験のデータ解析

世界初となる小児心不全への細胞治療法の第I相臨床試験は、平成23年1月に「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」に則り、厚生科学審議会にて実施承認後、同年3月より岡山大学病院で2年間かけて登録実施してきた。プロトコルの主要エンドポイントに従い、心不全、致死性不整脈、蛋白漏出性腸症、感染症、造腫瘍作用などを含む重篤な有害事象の発生有無に最大限の注意と経過観察を行う。(岡山大学病院)

2. 第2相臨床試験のプロトコル作成と承認申請

第1相臨床試験の安全性確認を踏まえ、有効性検証目的となる第2相臨床試験では、第1相臨床試験の成果を踏まえ、細胞治療の有効性を検出する必要最小限の症例数を算出する必要がある。7対7症例の第1相臨床試験において得られた細胞移植後の心機能改善度を解析し、同群間のみならず異群間での心機能改善度を統計学的に有意に検出できる実施症例数を算出する。

作成した第2相臨床試験プロトコルは学内の倫理委員会での審議承認を経て、厚生科学審議会に提出し、承認申請を行う。第2相臨床試験はより科学的な有効性の判定を行うため、試験設計は無作為割り付けによる比較対照試験とする。また、有害事象に関するデータモニタリングを実施するため、eClinical/Electronic Data Capture (EDC) による登録症例の適応基準の判定、コンピューターによる無作為の群別割り付けや細胞治療前後の臨床経過の追跡を行う内容にする。(岡山大学病院)

3. 先天性心疾患由来のヒトiPS細胞の樹立によるヒト心臓自己再生プログラムの解明

心臓手術時に精製したヒト心臓内幹細胞を用いてiPS細胞樹立に必須であるヒトOct3/4/Klf4/Sox2/c-mycのレンチウイルスベクターをそれぞれ作成し、ヒト心臓内幹細胞内に遺伝子導入させることでヒトiPS細胞を樹立する。

単心室及び二心室より樹立したヒトiPS細胞の包括的遺伝子解析を行い、単心室症の病態発生機序に関して、流出路、房室弁や心室内腔の形成に関わる各種転写因子群の発現様式について網羅的に探索し、二心室心疾患との比較により単心室症の発症規定因子群を同定する。(岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科心臓血管外科)

4. ヒト心臓内幹細胞における直接心筋細胞誘導

法の開発

マウス心臓内の繊維芽細胞はTbx5, Mef2C, GATA4, Myocardin, Hand2といった心臓の発生に必須な5つの転写因子群によって直接心筋細胞に変換されることが明らかとなったが、ヒト心筋細胞への直接分化誘導法はいまだ不明である。

本研究では、ヒト心臓内幹細胞にレンチウイルスベクターを用いて、上記の5転写因子群を幹細胞内導入することで、機能的ヒト心筋細胞の作成と再生医療への応用を試みる。心筋細胞への系統誘導を定量的に評価する指標として、心筋構造タンパクであるアルファアクチンのプロモーター制御下でEGFPのリポーター遺伝子を用いて心筋分化度を経時的に追跡可視化した。定量法として、免疫組織染色、FACS解析、細胞内カルシウムの取り込み解析やリアルタイムRT-PCR法を用いる。(岡山大学病院、岡山大学医歯薬学総合研究科循環器内科)

(倫理面への配慮)

1. ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル(承認番号 766)に従順して行い、“手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成10年厚生科学審議会答申)”を遵守する。
2. 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」を遵守して行う。
3. 臨床研究プロトコルはヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年告示第425号)を遵守して作成し、外部倫理委員会を含めた体制で審査される。

4. 各関係者は臨床研究を遂行にあたり、“臨床研究に関する倫理指針”(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守して行う。ヒト心臓内幹細胞は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成22年告示第380号)を遵守して、岡山大学病院内に整備したGMP基準の細胞調節施設内で精製する。
5. 臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。
6. 有害事象発生時には、試験責任/分担医師は「重篤な有害事象発生時対応マニュアル」に沿って対応し、一次、二次と最終報告を行う。

C. 研究結果

1. 実施終了の第1相臨床試験のデータ解析(安全性検証)

平成24年度は平成23年度内に移植実施した全7症例の安全性検証について、移植直後から1年間にかけて長期にわたって観察し各種評価法により定量化した。移植後急性期より、冠動脈内注入法による細胞移植で虚血や不整脈の惹起を認めず、移植後1年間を通じて、死亡、心不全発症や感染症の併発などの事象は起こらなかった。もっとも重要なこととして、細胞移植した全7症例において、移植した心臓部位を含め腫瘍形成作用を認められなかった。

2. 第1相臨床試験の有効性検証

本臨床研究では、7症例の細胞移植群と7症例の標準治療群(非細胞移植群)の比較試験を行い、心臓内幹細胞自家移植の有効性について検証した。細胞移植後1週間前後にて、全7症例とも軽快退院

となり、3か月目および1年目での心機能評価を各種パラメーターを用いて解析した。

細胞治療の有効性について、細胞移植後3か月目より1年目にかけて、心エコー、心臓カテーテル、心臓MRI検査によって評価し、心室駆出率と心係数の継続的改善を示した。興味深いことに、細胞治療群は移植後心収縮能のみならず、拡張能の改善ならびに三尖弁の弁輪径の縮小を認めた。

D. 考察

本第1相臨床試験で実施した全7症例において冠動脈内注入法による細胞治療法の安全性を確認した。治療有効性に関しては、今後34人から構成される無作為割り付けした第2相臨床試験において平成25年度より検証していく。

E. 結論

左心低形成症候群7症例を対象に、小児心不全における心臓内自己幹細胞を用いた冠動脈内注入による移植法の安全性を確認した。体重が3キロ以上で、年齢が生後6か月以降なら、カテーテル操作を伴う冠動脈造影や細胞注入は技術的に充分実施可能でかつ安全である。具体的には、細胞移植後1年目までの観察期間において、細胞注入による急性心筋虚血、催不整脈作用はなく、心不全や死亡事例も生じなかった。長期的観察期間における細胞起因性の腫瘍形成や感染症の発症も認めなかった。

また、細胞治療群の7症例は非細胞治療群の7症例に比し、心室収縮能および拡張能の改善を有意に認め、移植後1年目まで継続したこれらの有効性を示唆する所見は、今後合計34人まで症例数を増やしたランダム化対照比較試験を登録実施することによって注意深く検証していく予定で

ある。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

王 英正 小児心不全への細胞治療の現状と展望 呼吸と循環 医学書院 60;S1-S4

(2012)

王 英正 テロメア生物学から心筋再生医療の実用化へ 岡山医学会雑誌

124;27-34(2012)

小林純子、佐野俊二、王 英正 先天性心疾患に対する心筋再生医療 循環器内科

71(4):360-368 科学評論社 (2012)

2. 学会発表

I. 王 英正 心不全の心筋再生医療 **岡二会** 岡山 (2012.1.28)

II. 王 英正 小児心不全と細胞治療 先天性心疾患シンポジウム 岡山 (2012.5.27)

III. 王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法 第7回 岡山心移植心不全研究会 岡山 (2012.9.4)

IV. 王 英正 第15回遺伝子治療推進産学懇話会 小児心不全への再生医療の可能性 京都大学東京オフィス (2012.9.25)

V. 王 英正 Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors 東京女子医科大学 第3回最先端研究開発支援プログラム(FIRST)セミナー 東京 (2012.10.05)

VI. 王 英正 重度心臓病に対する心筋再生医療 オープンフォーラム 2012 岡山 (2012.10.27)

VII. 王 英正 心筋再生医療の臨床試験と研究開発状況 技術情報協会セミナー 東京 (2012.11.20)

VIII. 王 英正 疾患特異的幹細胞およびiPS細胞を駆使した希少小児心疾患に対する細胞治療と病態解明 消化器研究セミナー 岡山大学 (2013.1.10)

IX. 王 英正 橋渡し研究加速推進ネットワークシンポジウム 小児心不全に対する細胞治療の中間報告と疾患特異的iPS細胞の樹立による次世代心臓再生法の開発 岡山 (2012.7.7)

X. 王 英正 岡山心臓血管外科カンファレンス 小児心不全への細胞治療法の可能性 岡山 (2012.7.21)

XI. Oh H. Mending and Modeling the Congenital Heart Diseases by Patient-Specific Cardiac Progenitors. Symposium at Texas Heart Institute (2012.11.4)

XII. Oh H., Tarui S, Ohtsuki S, Sano S. Cardiac progenitor cell infusion in patients with hypoplastic left heart syndrome: a prospective phase 1 clinical trial. Japanese Heart Failure Society (2012,12.2)

XIII. Oh H. iPS細胞を用いた心疾患の新たな診断法と治療開発 岡山大学サイエンスカフェ (2013.2.8)

XIV. 王 英正 希少難治性心不全に対するヒト幹細胞移植療法の長期的エビデンス 第12回日本再生医療学会 (2013.3.21)

XV. Oh H. Cardiac progenitor-based therapy

- and reprogramming in patients with congenital heart disease, **Cardiac Development Symposium**, Munich (2012.3)
- XVI. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, **Oh H International Society of Stem Cell Research** (2012)
- XVII. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J , Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H International Society of Stem Cell Research** (2012)
- XVIII. Transition of cardiogenic to angiogenic potential of human cardiac progenitor cells occurs with age. Yoshida M, Tarui M, Kobayashi J , Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H. International Society of Stem Cell Research** (2012)
- XIX. Mechanical stretch modulates calcium handling during direct cardiac reprogramming of resident progenitor cells in human heart. Tarui S, Kobayashi J , Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H European Society of Cardiology** (2012)
- XX. Patient-specific induced pluripotent stem cells from cardiac progenitors recapitulate the models for cardiac chamber disorder. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, **Oh H European Society of Cardiology** (2012)
- XXI. Hedgehog interacting protein controls age-dependent angiogenic activity in human cardiac progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling Yoshida M, Kobayashi, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H. American Heart Association Suppl.** (2012).
- XXII. Patient-specific induced pluripotent stem cells for modeling hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, **Oh H American Heart Association Suppl.** (2012).
- XXIII. Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J , Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H American Heart Association Suppl.** (2012).
- XXIV. Mechanical stretch promotes reprogramming of human cardiac progenitors into functional cardiomyocytes by defined factors. Tarui S, Kobayashi J , Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H 第76回日本循環器学会総会学術集会 Circulation Journal** (2012)
- XXV. Reprogramming of human cardiac

- progenitors into pluripotency in patients with congenital heart disease. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H** 第 76 回 日本循環器学会総会学術集会 **Circulation Journal** (2012)
- XXVI. 先天性心疾患患者由来の心臓内幹細胞を用いた疾患特異的ヒト iPS 細胞の樹立と機能解析. 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, **王 英正** 小児循環器学会 (2012)
- XXVII. Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, **Oh H**. 小児循環器学会 (2012)
- XXVIII. 疾患特異的ヒト iPS 細胞を用いた左心低形成症候群の実験モデル化と病態解析 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, **王 英正** 日本胸部外科学会 **Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.** 439 (2012)
- XXIX. 人工ヒト心筋細胞の成熟化におけるカルシウムイオンポンプの重要な役割 樽井俊、小林純子、平田昌敬、高橋賢、入部玄太郎、成瀬恵治、笠原真悟、佐野俊二、**王 英正** 日本胸部外科学会 **Gen Thorac Cardiovasc Surg. Suppl.** 440 (2012)
- XXX. Aberrant calcium handling inhibits functional maturation and excitation in factors-based human cardiomyocytes differentiation. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, **Oh H** 日本心不全学会 YIA (2012).
- XXXI. 先天性心疾患の疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, **王 英正** 日本心臓血管外科学会 (2013)
- XXXII. Modeling and dissecting hypoplastic left heart syndrome by patient-specific induced pluripotent stem cells Kobayashi J, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, **Oh H**. 第 77 回 日本循環器学会総会学術集会 **Circulation Journal** (2013)
- XXXIII. Engineering human bioartificial heart with three-dimensional extracellular matrix materials. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, **Oh H**. 第 77 回 日本循環器学会総会学術集会 **Circulation Journal** (2013)
- XXXIV. Heterokaryon-based reprogramming of human cardiac progenitor cells into functional cardiomyocytes. Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, **Oh H**. 日本心臓血管外科学会 (2013)
- XXXV. ハーフクリップ法によるラット右心圧負荷モデルの作製 Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Sano S, **Oh H**. 日本心臓血管外科学会 (2013)
- XXXVI. 疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋

介,立石篤史,吉積 功,新井禎彦,笠原真
悟,佐野俊二,**王 英正** 日本外科学会 Young
Researcher Award (2013)

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得