

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

先天性心疾患由来心臓内幹細胞の分離培養に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

本研究では、心臓手術後の長期予後が極めて不良の小児心不全に対する心臓内幹細胞の自家移植療法に関して、有効性検証目的の第2相臨床研究を実施する。さらに、本細胞治療法の標準化医療に向けて、先進医療ならびに企業連携による医師主導臨床試験の実施開始を目指す。

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 教授

大月 審一

岡山大学病院 教授

を踏まえ、臨床試験を見据えた先進医療による第2相臨床試験を実施し、世界初の小児心不全に対する心筋再生医療法の早期実用化を目的とする。

A. 研究目的

心臓移植の適応と判断された小児心不全の1年生存率は30%と極めて予後不良であるが、国内での小児心臓移植の実施はドナー不足などの問題で、これまでの乳幼児への移植実施例はない。一方、近年における目覚ましい心臓シャント手術法や術後管理法の改良により機能的単心室症の短期予後は著明に改善してきたが、長期予後を左右する心予備能の改善は依然として重要な研究課題である。本研究では、2011年より「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」で実施承認された「機能的単心室症に対する自己心臓内幹細胞移植療法によるTICAP第1相臨床試験(NCT01273857)」の研究成果

B. 研究方法

試験デザイン

目標症例数 : 34 症例

登録期間 : 承認後、試験開始から 4 年

試験期間 : 登録最終症例の移植後 1 年

試験デザインの概要 : ランダム割り振り試験

対照群の設定 : 非細胞移植群（標準治療単独）

対照群の対処法 : 3 か月間の経過観察後、救済的移植の実施

適格基準

被験者は心不全を有する機能的単心室症の患者さんのうち、第 II 期の Glenn 手術または第 III 期 Fontan 手術適応例で、以下の基準を満たし、かつ以下の除外基準のいずれにも該当しない小児心不

全を適格として登録する。

選択基準

- 1) 年齢： 症例登録時において年齢 0 歳以上 20 歳以下。
- 2) 症例登録時において心駆出率が 70%以下の症例。
- 3) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者。

除外基準

- 1) 心原性ショック
- 2) 術後体外循環から離脱できない症例
- 3) 致死性不整脈がコントロールできない症例
- 4) 冠動脈疾患を合併している症例
- 5) Eisenmenger 症候群
- 6) 循環不全などによって脳機能障害を合併する症例
- 7) 悪性新生物を有する症例
- 8) 重篤な神経疾患合併の症例
- 9) 高度な肺塞栓症や肺高血圧症例
- 10) 高度腎不全症例
- 11) 多臓器不全疾患
- 12) 活動性感染症（心内膜炎を含む）
- 13) 敗血症
- 14) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他)

症例登録

- 1) 試験責任医師または試験分担医師は、候補となる患者が適格基準を満たすと考えられた場合、試験担当医師は研究コーディネーターとともに、インフォームドコンセント手続きの作業に入る。

- 2) 試験担当医師は研究コーディネーターとともに、候補となる患者からインフォームドコンセントを得る。
- 3) 試験担当医師はインフォームドコンセントが得られた症例に対し、適格性を判断するために必要な検査（スクリーニング検査）の結果を行う。
- 4) スクリーニング検査の結果、候補となる患者が適格基準を満たす場合、試験担当医師は症例検討委員会に諮り本治療の対象としての適格性を検討する。
- 5) 症例検討委員会の結果、候補となる患者が適格基準を満たしていると判断された場合、試験担当医師は eClinical Base に必要事項を記入の上、データセンターに登録する。

主要エンドポイント

有効性

第 2 相臨床試験における主要エンドポイントとして、細胞移植による 3 か月目での有効性を検証する。評価項目として、治療前後で実施した心エコー図法、心室造影ならびに心臓 MRI で算出された心駆出率の改善を検証する。また、上記の 3 つの検査法によって求められた心駆出率の治療前後における改善度の絶対値を算出し、移植群および非移植群の 2 群間で比較検証する。

評価法

患者背景を知らされていない試験外院内医師 1 名及び試験外院外医師 2 名により構成されたエンドポイント評価委員会により、心エコー図法、心室造影ならびに心臓 MRI を用いた心機能検査によって得られた心駆出率について盲検的に評価する。

副次エンドポイント

有効性

第2相臨床試験における副次エンドポイントは、細胞移植による1年目での有効性を上記項目に沿って検証する。また、本治療前後において得られたその他の有効性に関する心機能の改善とする。評価項目として、心拍出量、心室拡張末期および収縮末期容量とする。

評価法

患者背景を知らされていない試験外院内医師1名及び試験外院外医師2名により構成されたエンドポイント評価委員会により、以下の評価項目について盲検的に評価する。臨床症状、BNP値、心室拡張末期および収縮末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値、心筋重量。

登録連絡先

データセンター：臨床研究情報センター
〒650-0047 神戸市中央区港島南町1-5-4

移植細胞（心臓内幹細胞）の調製

- 1) 細胞の調製・保存・運搬については品質管理者の監督の下、製造管理責任者または試験細胞作成者が行う。
- 2) 採取された心臓組織サンプルは搬送後、直ちに探索的医薬品開発室において、「岡山大学病院・探索的医薬品開発室心臓内幹細胞 調製手順書」に定められた方法にて心臓内幹細胞を単離し、精製・増幅培養を行う。
- 3) 培養は心臓組織採取後28日までとし、 5.0×10^6 個以上の細胞が確保できた時点で、培養を終了する。培養21日までに必要細胞数(3.0×10^6 個)に達しない場合は、細胞の適格性を不適と判断し、本治

療対象から除外する。

4) 移植細胞の調製

移植用の細胞は細胞単離から単一細胞の付着培養系で第3継代まで増幅培養した、増殖能規格に適合した細胞とする。移植用の細胞の調製は、探索的医薬品開発室で試験細胞作成者が手術当日の移植30分前に、下記の方法で実施する。

培地をピペットで吸引し、これを品質管理用に提出する。

培養皿にPBSを加え洗浄する。

リコンビナントトリプシン(0.25%)を用いて細胞を培養皿から解離し、10%血清を含むDMEMにてトリプシン反応を停止させたのち50mL遠沈管に回収し、1500g、4、5分間遠心する。

上清を破棄し、PBSで洗浄し再び遠心動作を行う(2回)。

上清を破棄し、1mLの生理食塩水で懸濁し、生細胞数を測定、 3.0×10^5 個/kgの心臓内幹細胞を抽出する。

抽出された 3.0×10^5 個/kgの心臓内幹細胞を生理食塩水に懸濁し合計を3mLとしたのち、1.5mLのエッペンドルフチューブ6本に0.5mlずつ移入する。

心臓内幹細胞の品質保証について、以下に規定された品質管理が行われたことを保証する書類を品質管理者が発行する。品質保証書、取り扱い説明書とともに心臓内幹細胞を滅菌袋にいれ、試験細胞作成者が常温(20~25℃)で手術室に搬送する。

5) 余剰細胞の取り扱い

余剰細胞は手術延期時の移植用及び細胞の品質管理用に探索的医薬品開発室内で凍結保存する。保存にあたっては細胞の取り違えがな

いように照合認識システムと台帳を用いて製造管理者が管理する。

6) 細胞の凍結保存

予定数に到達後、培養皿より余剰心臓内幹細胞を回収、速やかに凍結する。凍結細胞は、探索的医薬品開発室内の冷凍保管庫にある-150 の超低温槽保存容器内にて保管する。細胞の取り違えがないように照合認識システムと台帳を用いて製造管理者が管理する。

8) 凍結細胞の解凍・再培養

移植術予定日の7日前に、超低温槽保存容器内から凍結細胞を取り出し、37 のヒートブロックで解凍する。解凍後、培養を再び開始する。

細胞移植施設への運搬

調製した移植細胞入り滅菌チューブを滅菌袋に入れ、速やかに試験細胞作成者が手術室に運搬する。運搬時の温度は常温（20～25 ）とする。

臨床研究終了後の追跡調査

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。

（倫理面への配慮）

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 22 年告示第 380 号）を遵守して作成し、外部審査委員を含めた体制で審査される。

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。

試験責任/分担医師は臨床研究保険に加入し、万一、本臨床試験参加によって患者さんに健康被害が生じた場合に対応できるようにする。

独立モニタリング委員会は、責任研究者から6か月ごとに試験進捗状況の報告を受け評価する。勧告すべき事項が提案された場合、委員長が必要に応じて試験の早期中止等の手段を講じる。

データマネジメントは eClinical Base Web 入力システムを活用し、臨床研究情報センターにおいたデータセンターによる中央登録制とする。

C. 研究結果

2013年4月8日に厚生科学審議会の承認後、2014年4月18日まで合計28症例を登録した。うち、移植群14症例、非移植群14症例であった。移植群の14症例中10症例に細胞移植(stage 1)を実施し、非移植群の14症例中3ヶ月目の検査の終了した7症例に対し救済移植(stage 2)を追加した。また、細胞移植を実施した移植群の10症例のうち4症例、非移植群の14症例中7症例が3ヶ月目の各種検査を終えており、統計学的に非移植群($p=0.12$)に比べ、移植群($p=0.03$)において有意な心機能改善を認めた。さらに、心機能改善の機序として、心室拡張末期容積($p=0.01$)ならびに心室収縮末期容積($p=0.002$)の有意な縮小が細胞移植群のみに観察された。

本第2相臨床研究において、特記すべき心機能評価法の一つとして、ガドリニウムを用いた造影MRIが挙げられる。本第2相臨床研究から適応対象者全員に対して、心臓手術前、術後1ヶ月後ならびに細胞移植3ヶ月目と1年目に実施するが、これまでの成果からMRIの造影遅延(LGE+)を伴う症例は、全試験参加症例の1/3を示し、心筋の線維化と潜在的

心不全予備群であることが示唆され、細胞移植による治療効果が乏しいことが予測される。これまでの解析結果より、LGE+群は心駆出率が低く、心室末期容積が有意に大きいことが明らかになった。

さらに LGE+ 症例の特徴として、circumferential strainの解析により、局所心筋の壁運動障害を認め、臨床病態像はBNP値の有意な上昇と高いgradeでの心不全症状の顕在化が示唆されている。LGE+で検出された心筋性状の線維化は単心室循環による容量負荷が大きな要素であり、多変量解析により、第2期手術までの待機時間と有意に相関することが明らかとなった。

また、既に実施終了した第1相臨床研究の成果とともに、本治療法に関してNKメディコ株式会社の企業参入が決定しており、既に治験薬製造委託先も選定され、今後PMDAとの再度事前相談を経て、医師主導臨床治験に向けたPMDAとの対面助言と臨床治験届の申請を現在準備中である。本臨床研究の着実な遂行により、国内外との多施設共同臨床研究に展開させ、本治療法の薬事法承認を目指す。

D. 考察

平成23年から平成25年まで世界初の小児心不全に対する冠動脈注入法による心臓内幹細胞自家移植のTICAP第1相臨床試験を実施し、全7症例の移植後1年目までの安全性を確認かつ有効性を示唆する所見を得た。有効性を検証する本第2相臨床研究(PERSEUS)では、1:1のランダム化比較対照臨床研究となっており、これまでの中間成績から細胞移植を受けた症例は非移植群に比べ、有意な心機能改善を認めた。

現在進行中の第2相臨床研究であるが、これまでの初期成績の結果から、細胞移植による心不全の救済効果が明らかにされた。一方、ランダム化による群分けで非移植群に割り振りされた症例に対

しても、3ヶ月目の各種検査終了後に希望対象者に対し積極的に救済移植を行い、全体的な評価として、これまでに細胞移植を受けた症例の3ヶ月目での初期成績は概ね良好であった。

今後、自己幹細胞を用いた心不全への新たな治療法として、医師主導臨床治験を経て、薬事法承認に向けて臨床成果を活用していく。

E. 結論

既に実施終了したTICAP第1相臨床研究と同様に、ランダム化第2相臨床研究の中間成績からも、小児心不全に対する心臓内幹細胞移植療法は安全で、細胞移植後3ヶ月目より心室機能を有意に改善させ、1年目までの長期観察期間においても、その治療効果は継続していることが明らかとなった。

今後予定症例数の34症例までの登録と心臓手術の実施を踏まえ、ランダム化に沿った細胞移植と対照比較群との有効性検証を詳細に行い、自家幹細胞移植療法の臨床的意義を明らかにし、薬事法承認を目指した医師主導臨床治験の実施根拠となる治療実績を積み重ねていく。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by $\alpha 1$ -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3811-6.

Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.

Methodist DeBakey Cardiovascular Journal, 2014 (in press).

樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療
月刊循環器 9月号 3(9): 69-76 医学出版(2013)

2. 学会発表

王 英正 先天性心疾患に対する自己心臓内幹細胞による再生医療 第116回日本小児科学会学術集会 広島 (2013.4.19)

Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S.

Intracoronary delivery of cardiac progenitor cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 30th International Society for Heart Research (2013. 6.29) San Diego.

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 第3回先端医学研究会 at OU 直島 (2013.8.3)

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 岡山先端医学研究会 岡山 (2013.7.19)

王 英正 希少難治性心不全への心臓内幹細胞を用いた再生医療 青森臨床循環器研究会 青森 (2013.10.26)

王 英正 希少難治性心不全に対する心臓内幹細胞を用いた再生医療 岡山大学知恵の見本市2013 岡山 (2013.11.1)

王 英正 子どもの難治性心不全に対する幹細胞移植療法の取り組み 公開セミナーはあとネット兵庫 神戸市 (2013.1.24)

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. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the models of 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. *The 21st annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Cardiac progenitor cell therapy in patients with hypoplastic left heart syndrome. S Sano, H Oh, S Tarui, S Ohtsuki, S Kasahara. *American Association for Thoracic Surgery*. Minneapolis. (2013. May 4)

Lineage induction of patient-specific iPS cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in HLHS. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *TAKAO Symposium* Tokyo (2013. July. 16)

Directed differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in 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.* (2013). Dallas

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)

樽井俊、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞を用いた自家移植療法 第 13 回心血管再生外科治療研究会 熊本 (2.19.2014)

奥山倫弘, 逢坂大樹, 石神修大, 小林純子, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 3D 細胞外マトリックスを利用したヒト幹細胞再播種によるバイオ人工心臓の作成 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

樽井俊、石神修大、大月審一、逢坂大樹、栄徳隆裕、近藤麻衣子、小林純子、奥山倫弘、馬場健児、川畑拓也、吉積 功、黒子 洋介、新井禎彦、岩崎達雄、佐藤修平、笠原真悟、佐野俊二、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 1 相試験 (TICAP) 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

小林純子, 吉田 賢司, 樽井 俊, 永井祐介, 笠原真悟, 成瀬恵治, 伊藤 浩, 佐野俊二, 王 英正 患者由来 iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における疾患発症機序の解明 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji

Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh Assessment of genetic and epigenetic modifications in hypoplastic left heart syndrome by disease-specific iPS cells 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京

Suguru Tarui, Shinichi Ohtsuki, Daiki Ousaka, Takahiro Eitoku, Maiko Kondo, Junko Kobayashi, Michihiro Okuyama, Shunta Ishigami, Kenji Baba, Sadahiko Arai, Takuya Kawabata, Ko Yoshizumi, Yosuke Kuroko, Tatsuo Iwasaki, Shuhei Sato, Shingo Kasahara, Shunji Sano, and Hidemasa Oh. Intracoronary Cardiac Progenitor Cell Transfer to Treat Univentricular Heart Disease: A Phase 2 Randomized Controlled Clinical Trial (PERSEUS) 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

Preparation for treating heart disease used in cell therapy. Patient No: US8414924 B2, Apr. 9. 2013.

細胞移植療法に用いられる心疾患治療薬 特許第5496675号 2014年3月14日登録

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。