

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

先天性心疾患の心臓手術および組織採取に関する研究

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

研究要旨

単心室循環を呈する機能的単心室症は比較的稀な先天性心疾患であるが、ここ20数年来の外科的手術法の進歩により、臨床的に大きく注目されてきたが、術後長期予後はまだ満足できる内容でなく、成人した症例におけるQOLも重要な問題である。近年提唱されたこれらの臨床的課題に対し、心臓血管外科側からの早期の手術法や術後管理法の改良とともに、細胞治療を取り入れた再生医療法と組み合わせることで、実質的な長期での手術成功症例の増加を目指す。

A. 研究目的

機能的単心室症は単心室循環を呈し、左右どちらかの流入路の血流障害を伴い、しばしば流出路の形態異常と肺動脈や大動脈レベルでの閉塞を合併する。1940年代にB-Tシャント（第1期）が考案され、肺動脈流出路閉鎖に対する肺動脈血流が部分的に確保できるようになった。1950年代になるとGlenn手術（第2期）が考案され、上大静脈と肺動脈吻合による肺血流の確保が安定化してきたが、静脈血と動脈血の混入により、体血流は依然と低酸素状態であった。1970年代に入るとFontan手術（第3期）が取り入れられ、すべての循環静脈血が直接肺動脈内に流入することで酸素化不良の問題が改善した。

しかしながら、機能的単心室症の心室機能は経

時的に低下していくものであり、心筋細胞微小構造の変化、低酸素状態、3度にわたる開心術などがその原因と考えられている。また、拡張障害が初期の心不全の原因と考えられ、実質心筋細胞の線維化がその進行過程を司っている。早期の心臓手術は心室の容量負荷軽減につながり、心筋細胞障害の緩和とよい循環動態で第3期手術に移行できる点で、幼若期での心臓手術が勧められているものの、長期的には心収縮能や運動耐用能の改善にまでつながらないという報告が多い。

Fontan術後の肺血流や体血流変化は第3期術後の長期予後を規定する重要な因子の一つである。肺血流量は心室拡張末期圧、肺血管抵抗、人工血管の抵抗などに依存し、単心室循環にとって適性の前負荷は良好な体循環につながる重要な指標で

ある。このため、第3期手術後急性期にみられる静脈圧の上昇は、胸水や腹水の貯留、心拍出量の減少として現れ、10年単位での長期的観測では肝硬変門脈線維化、蛋白漏出性腸症を合併し、細胞間マトリックスの破壊から重篤な炎症疾患を併発する。

学童期における機能的単心室症症例においても様々な問題は存在し、心機能異常以外にも、呼吸機能、学習能力、神経発達障害、認識障害、追視能力、言語発達や注意力の低下など様々な問題が明らかとなっている。幼少時での無酸素条件下での運動耐用能は通常人の約65%と言われ、成人とともにさらに低下すると報告されている。

外科的治療後の維持管理法として、beta-遮断薬、ACE、アルドステロン拮抗薬が使われている。最近ではホスホジエステラーゼ5阻害薬、エンドセリン拮抗薬の投与がFontan術後の運動耐用能を改善することが示唆され現在臨床試験中である。しかしながら、現在までのところ、単心室循環の術後長期予後を促進させる新たな治療法はとして、機械的な体循環の維持管理法以外は見当たらない。機能的単心室症に対する幹細胞自家移植による自己再生能を促す本臨床研究は、幼少期から年長期にかけての心機能改善を含めた臨床的予後への影響を検証することで、難治性心疾患に対する新たな治療法を開発する。

B. 研究方法

目標症例数

第2相臨床試験の目標症例数は34例とする。

第2相臨床試験の主要エンドポイントである有効性を検証するために必要な症例数を目標症例数とする。目標症例数は試験適格症例で患者の同意を得られた症例のうち、心臓組織採取が適切に行われかつ、

単離した心臓幹細胞が使用試験細胞基準に適合し、全プロトコル治療が遂行された症例とする。

保存血より血清の採取

移植術日の前日までに、岡山県血液赤十字センターより手術時に使用する保存血の入手を依頼し、手術当日、岡山大学病院・中央手術部において血清採取を行う。

心臓手術時に人工心肺の回路にprimingする前の自己血を20mlの採取し、10mlの血清を分離する。採取した血清は岡山大学病院・探索的医薬品開発室の冷凍保管庫において-20℃で冷凍保存する。

心臓組織採取

細胞移植予定日の3週前の週に、心臓手術のため、岡山大学病院・心臓血管外科に入院する。岡山大学病院・中央手術部において、試験担当医師によって、手術中に100～250mgの右心房心臓組織を採取する。

細胞培養施設への運搬

8-1-3で採取した心臓組織は、滅菌された培養液の入った容器に入れ、速やかに試験細胞作成者により探索的医薬品開発室へ運搬される。運搬時の温度は常温（20～25℃）とする。

解析方法

主要エンドポイント

評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

副次エンドポイント

1) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後1年目の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

2) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月、1年の時点において以下の基準において評価し、比較検討する。

臨床症状:チアノーゼ症状、蛋白漏出性腸症。

房室弁逆流：心エコー図法、心室造影。

心不全症状：BNP値。

心機能評価：心臓カテーテル検査による心室拡張末期圧、心室収縮末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値の計測。

心筋重量：心臓MRI検査にて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

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)

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。

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。

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。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。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書を独立データモニタリング委員会に提出する。

本臨床試験の実施に起因して有害事象が発生し、被験者に健康被害が生じた時には、独立データモニタリング委員会に報告する。すみやかに適切な治療を受けることが出来るように、責任研究者/分担医師と岡山大学病院が対応する。

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する。

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。監査が行われる場合にすみやかに対応できるように、原医療記録閲覧について患者説明を行う。

C. 研究結果

平成25年4月8日に承認されたヒト幹細胞臨床研究実施計画に基づき、機能的単心室症由来の小児心不全に対する心臓内幹細胞の冠動脈内自家移植による第2相臨床試験 (PERSEUS 試験: NCT01829750)の登録実施を開始した。平成25年6月に第1症例目の心臓手術を実施、平成26年4月現在まで合計30の適応症例に対し心臓手術を行った。

うち、1症例は心臓手術前に臨床研究参加の同意を得たものの、術後1か月目（細胞移植前）の心機能検査により、適格基準である心室機能が規定の70%以上を上回ったため、登録除外症例とした。もう1症例は同じく心臓手術前に臨床研究参加の同意を得たものの、家庭内事情による心臓手術後の早期退院を強く希望され、患児のご両親による参加撤回となった。したがって、合計30症例手術した30症例のうち、28症例が現在も登録中であり、ランダム化によるプロトコル治療に沿って、治療及び経過を観察中である。

また、心臓手術を実施し登録された28症例に関しては、術後一過性のくも膜下出血が3例、菌血症1例を認めたが、概ね臨床的経過良好となり、現在プロトコル治療継続中である。

D. 考察

登録された適応症例の全28症例から、心臓内幹細胞の分離培養に必要な余剰組織量である100mg~250mgの採取が充分臨床的に可能であった。また、組織採取による心臓の解剖学的影響や術後心機能の回復度に相違はなかった。

合計34症例を登録する臨床研究であるが、約10か月間でこれまでに28症例の心臓手術を実施できたことは、研究事業期間内に、十分に本研究事業の達成目標に到達できると考える。

E. 結論

小児心不全に対する心臓内幹自家移植に必要な組織量を心臓手術中に採取することは臨床的に可能であった。実施予定症例設定数も統計学に基づいて算出されており、研究期間内に充分臨床的遂行完了できる計画内容である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S. Long-term effects of transcatheter closure of atrial septal defect on cardiac remodeling and exercise capacity in patients older than 40 years with a reduction in cardiopulmonary function. *J Interv Cardiol*. 2013 Apr;26(2):195-9.

Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondo M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T. Usefulness of balloon angioplasty for the right

ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013 Apr;81(5):837-42.

Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, Sano S, Ito H. Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation. *Cardiovasc Interv Ther.* 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]

Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 2014 (in press).

Ündar A, Wang S, Palanzo D, Weaver B, Pekkan K, Agirbasli M, Zahn JD, Luciani GB, Clark JB, Wilson RP, Kunselman AR, Sano S, Belli E, Pierce WS, Myers JL. Outcomes of the ninth international conference on pediatric mechanical circulatory support systems and pediatric cardiopulmonary perfusion. *Artif Organs.* 2014 Jan;38(1):5-10.

Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S. Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Mar;45(3):549-55.

Tateishi A, Kasahara S, Kawabata T, Kuroko Y, Yoshizumi K, Takagaki M, Arai S, Sano S. The effect of pulmonary root translocation on the left ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg.* 2013 Oct;96(4):1469-71.

Kanamitsu H, Fujii Y, Mitsui H, Sano S.

Effects of atrial natriuretic peptide after prolonged hypothermic storage of the isolated rat heart. *Artif Organs.* 2013 Nov;37(11):1003-8.

Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, Sano S, Ito H. Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cerebrovascular accidents: initial experiences in Japan. *Cardiovasc Interv Ther.* 2014 Jan;29(1):11-7.

黒子洋介、佐野俊二 先天性心疾患 完全大血管転位症 今日の循環器疾患 治療指針 pp531-532, 2013.

服部 滋、吉積 功、川畑拓也、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二 先天性右室瘤の外科治療：乳児期に急速な瘤拡大を示した1例 日本小児循環器学会雑誌, 29:194-199, 2013.

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

Kasahara S, Goto T, Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Ishigami S, Kawabata T, Kuroko Y, Masuda Z, Zenichi, Yoshizumi K, Arai S, Sano S. SURGICAL RESULTS FOR THE PATIENTS WITH FUNCTIONAL SINGLE VENTRICLE HAVING HIGH PULMONARY ARTERY PRESSURE ASCVTS 2013 2013.4.4.7.

神戸

Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Takahashi K, Iribe G, Naruse K, Kasahara S, Sano S, Oh H Factors-based human cardiomyocytes

differentiation exhibits incomplete maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.4.7 神戸

Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Masataka Hirata, Ken Takahashi, Shingo Kasahara, Kenji Naruse, Hiroshi Ito, Shinji Sano, Hidemasa Oh. PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS RECAPITULATE THE MODELS OF HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Surgery 2013.4.7 神戸

Goki T, Miyata H, Murakami A, Tomotaki A, Goki T, Matsumura G, Sano S, Takamoto S DOSE SURGICAL APPROACHES HAVE ANY IMPACT ON MORTALITY AND MORBIDITY AFTER BLALOCK-TAUSSIG SHUNT PROCEDURES. RISK MODELS BASED ON THE JAPAN CONGENITAL CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.7 神戸

Goto T, Yoshizumi K, Kasahara S, Arai S, Tateishi A, Kuroko Y, Kawabata T, Sano S SURGICAL REPAIR FOR DOUBLE OUTLET RIGHT VENTRICLE WITH INTACT VENTRICULAR SEPTUM 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Ishigami S, Kasahara S, Takagaki M, Arai S, Sano S SALVAGE PROCEDURE FOR HIGH RISK PATIENTS WITH COMPLEX CARDIAC ANOMALY 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S, Kasahara S, Yoshizumi K, Tateishi A, Kawabata T, Kuroko Y, Fujii Y, Arai S SANO MODIFICATION WITH A RIGHT VENTRICLE-TO-PULMONARY ARTERY SHUNT TO THE PATIENTS WITH HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME ASCVTS 2013 2013.4. 7 神戸

Murakami A, Takamoto S, Miyata H, Morita N, Sano S JAPAN CONGENITAL CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE FOR QUALITY IMPROVEMENT 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S PARACHUTE MITRAL VALVE The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S FIRST STAGE PALLIATION UNITY RU-PA SHUNT TO HLHS The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Douguchi T, Itoh H, Taka H, Yagi T, Sano S VENO-VENOUS BYPASS 中に高カリウム血症の是正を目的として CHD を使用した脳死肝腎移植術の 1 症例 The 21st Annual Meeting of The Asian Society for

Cardiovascular and Thoracic Surgery
2013.4.7 神戸

笠原真悟、吉積 功、高垣昌巳、新井禎彦、
佐野俊二 複雑心奇形を有する成人期再手術
例の治療成績ならびに現状の問題点 第
113 回日本外科学会定期学術集会
2013.4.11 福岡

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 疾患特異的
iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における
心臓発生異常の解明 第 113 回日本外科学
会定期学術集会 2013.4.11 福岡

Sano S, Kasahara S, Fujii Y, Tateishi A,
Kuroko Y, Yoshizumi K, Arai S
Atrioventricular valve Repair in
Heterotaxy syndrome 2013 AATS Mitral
Conclave 2013.5.2 New York

Sano S, Oh H, Tarui S, Kobayashi J, Hirata
M, Kawabata T, Tateishi A, Kuroko Y,
Yoshizumi K, Arai S, Kasahara S Annual
Meeting of American Association for
Thoracic Surgery 2013.5.4 Minneapolis

Sano S. Stem Cell Therapy In Children
With HLHS 9th International
Conference on Pediatric Mechanical
Circulatory Support System & Pediatric
Cardiopulmonary Perfusion 2013.5.8
Hershey

Yoshizumi K, Kasahara S, Tateishi A,

Kawabata T, Kuroko Y, Arai S, Sano S The
influence of Lower Body Circulatory Arrest
on the Acute Kidney Injury after Surgery for
Congenital Heart Disease in Neonate 9th
International Conference on Pediatric
Mechanical Circulatory Support Systems &
Pediatric Cardiopulmonary Perfusion
2013.5.8 Hershey

佐野俊二 先天性心疾患治療の最前線 第 6
回先天性心疾患シンポジウムイン岡山
2013.5.18 岡山

Sano S 日本における心疾患治療の最新状況
について International contribution of
Cardio Surgery starts with training young
surgeon Medical Excellence JAPAN
Seminar -Vietnam~Japan Medical
Collaboration- 2013.8.26 Hanoi

Sano S RV-PA conduit for Stage I
Hypoplastic Heart Syndromt The 5th
Congress of Asia Pacific Oediatric Cardiac
Society 2014.3.6. New Delhi.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。