

201324041A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

平成 25 年度 研究報告書

小児重症拡張型心筋症への
bridge-to-transplantation/recoveryを
目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践

研究代表者 澤 芳樹

平成 26 (2014) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)

平成 25 年度 研究報告書

小児重症拡張型心筋症への
bridge-to-transplantation/recoveryを
目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践

研究代表者 澤 芳樹

平成 26 (2014) 年 3 月

目次

I. 総括研究報告書

小児重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation/recoveryを 目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践.....	1
---	---

大阪大学大学院医学系研究科 澤 芳樹

II. 分担研究報告書

小児重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation/recoveryを 目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践(添付資料 1,2).....	6
---	---

大阪大学心臓血管外科 宮川 繁

細胞製剤製造施設構造設備にかかる Minimum Consensus Package (MCP)の提案.....	20
--	----

近畿大学薬学総合研究所 早川堯夫

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 松山晃文

III. 研究成果の刊行に関する一覧.....	29
-------------------------	----

IV. 研究成果の別刷

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）

総括研究報告書

小児重症拡張型心筋症へのbridge-to-transplantation/recoveryを
目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践

研究代表者 大阪大学大学院医学系研究科 澤 芳樹

研究要旨

拡張型心不全は予後不良な難治性疾患であり、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ものの小児ドナーからの臓器提供は進まず、WHO イスタンブール宣言により海外渡航による移植も原則禁止され、本邦での小児心移植の実施例は稀有であり、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

本研究期間においては、澤らがテルモ株式会社と共同で開発・実践してきた骨格筋芽細胞シート移植を、研究終了後目途として小児拡張型心筋症を適応症とする医師主導型治験に展開すべく、小児を適応症とするために希求される非臨床安全性試験・薬効薬理試験および品質管理試験を実施、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり厚生労働大臣の意見を聞き、pilot study として小児を対象とする場合の最適なエンドポイントを設定、医師主導型治験関連文書作成に資する。

A. 研究目的

自己骨格筋芽細胞シートは、澤らが臨床研究として開発、成人虚血性心疾患を適応としてテルモ株式会社が引き受けて確認申請を取得、企業治験が実施される。一方、市場性が小さいために小児の拡張型心筋症の unmet medical needs は満たされていない。そこで本研究では、医師主導型治験により適応の拡大を図り、産業界の力を借りて幅広く小児拡張型心筋症の治療に資することを射程にのせる。特に本申請においては、小児に適応するために必須な幼若動物（ブタ）での非臨床不毒性試験・非臨床安全性薬理試験等を実施し、小児拡張型心筋症への適応拡大を図るための非臨床試験・品質試験を実施することを目的とする。

B. 研究方法

1) 幼若ブタ心不全モデル動物作成、骨格筋芽

細胞シート移植と有効性検証（澤・宮川）

離乳早期幼若ブタを用い、骨格筋芽細胞シート移植の2カ月間の有効性に関して検証する。

2) 非臨床急性・亜急性安全性試験パッケージの構築（宮川・松山）

成人を対象とした非臨床急性・亜急性安全性試験のパッケージは、テルモ株式会社が確認申請取得に用いたものが参考となる。小児に関しては、成長の過程にあるということ、生殖器の獲得の過程であることから、上乘せ試験が求められる。この点に留意して、パッケージ構築を行う。

3) cGMP 対応の細胞培養システムの構築（松山・早川）

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、患者さんに投与する前のいわゆる cold run を開始、品質に関して早川が検討を行う。

(倫理面への配慮)

1. 臨床試験の実施に際しては、研究計画書(プロトコル)に関して医学部医学倫理委員会での承認を受け、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」あるいは「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聴いた後、医学系研究科長の責任のもと実施することとし、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを研究対象とする。
2. 基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。非臨床動物試験に関しては、GLP 各種通知にのっとり実施する。
3. 動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なう。

C. 研究結果

1) 幼若ブタ心不全モデル動物作成、骨格筋芽細胞シート移植と有効性検証

生後2カ月齢の幼若ブタを使用した。生後2カ月齢を選択した理由は、離乳して、生殖機能が発達していない時期が、生後2カ月齢であり、臨床の現場で対象となる小児患者を想定した場合、ブタでの適正年齢は生後2カ月であることが推測されたからである。

幼若ブタと成獣ブタ(生後8カ月)の筋芽細胞の性質を比較検討したところ、幼若ブタの筋芽細胞は、成獣の筋芽細胞と比較して、Sirt-1、Sirt-7といった抗アポトーシスシグナルを高発現してお

り、また、血管新生因子であるVEGFの発現も有意に高値であった。また、幼若ブタの筋芽細胞はスクラッチテストにて、成獣の筋芽細胞と比較して、増殖能が高く、Ki67陽性細胞も高値であった。

幼若ブタの前下行枝をカテーテルにて閉塞させ、心筋梗塞モデルを作成し、自己筋芽細胞シートを4枚左室前壁から側壁に移植した。幼若ブタでは4枚の筋芽細胞シート移植が外科的に移植限界であった。移植後は正常と同等の体重増加を認め、筋芽細胞を採取した部位の歩行障害も認めず、成長は順調であった。正常移植後1カ月、2ヶ月後での心機能検査では、駆出率、心拍出量の増加を認め、また、梗塞部位の dyssynchrony が是正されており、短期間での効果が確認された。腎臓、卵巣、肝臓との遠隔臓器の腫瘍源生を検証したところ、同臓器に腫瘍形成は認めなかった。今後、移植後長期における効果ならびに、不整脈等の安全性を検討する予定である。

2) 非臨床慢性安全性試験・体内動態試験併合試験パッケージの構築

単回移植慢性毒性試験と体内動態試験を併合試験にて1本の試験として実施可能となった。評価項目に関して検討を加え、パッケージを構築ができており、今後上記1)の幼若大動物試験に反映させる予定である。

3) cGMP 対応の細胞培養システムの構築

すでにテルモ社で作成されているGMP基準を満たした筋芽細胞シートを本治療で使用する予定であり、製品標準書、製造手順書、製造指図書、製造記録書は作成されている。細胞調整施設の空調設備や構造設備に関する的確な管理方法の検証も行った。

4) 小児を対象とした骨格筋芽細胞シート移植による臨床研究の申請・実施

小児心不全患者に対する自己骨格筋芽細胞シートの臨床研究プロトコルが大阪大学未来医療センターにて承認され、昨年ヒト幹細胞臨床研究

に関する審査委員会にて承認された。今年度臨床研究第一例として、11歳女兒がエンロールされた。2013年12月6日、当該医師主導治験の実施について、事前相談を実施し、治験薬の規格や対象年齢について質問を受け回答し、薬事戦略相談 対面助言実施時に必要となる資料について確認を行った。

2014年3月27日、薬事戦略相談 対面助言を実施した。また、筋芽細胞シートに関しては、テルモ社が作成している GMP 基準を満たした筋芽細胞シートを使用する予定である。

D. 考察

現在、GMP 基準を満たす筋芽細胞シートを作成することが可能であり、小児心不全に対する筋芽細胞シートの POC も獲得できている。また、本臨床研究はヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に承認され、pilot study として数例の臨床研究が開始された。臨床研究にて取得されたデータを還元し、適切なエンドポイント、治験プロトコルを探索し、それらの知見を反映させた医師主導型治験の計画書を作成し、最終的には医師主導型治験への移行を行う。

E. 結論

本研究にて、小児心不全に対する筋芽細胞シートの POC を取得でき、また、GMP 基準を満たす筋芽細胞シートの使用も可能となっている。数例の臨床研究のデータを医師主導型治験に反映させ、良質な医師主導型治験を行う予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M,

Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. : Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model. *Tissue Eng Part A* 20(3-4) 728-39, 2014

- 2) Alshammary S, Fukushima S, Miyagawa S, Matsuda T, Nishi H, Saito A, Kamata S, Asahara T, Sawa Y. : Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction, *Surg Today* 43(9) 970-6, 2013
- 3) Matsuda T, Miyagawa S, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Akimaru H, Horii-Komatsu M, Kawamoto A, Saito A, Asahara T, Sawa Y. : Human Cardiac Stem Cells With Reduced Notch Signaling Show Enhanced Therapeutic Potential in a Rat Acute Infarction Model. *Circ J* 78(1) 222-31, 2013
- 4) Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. : Myocardial layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. *Circ J*, 77(4) 1063-72, 2013
- 5) Shudo Y, Cohen JE, Macarthur JW, Atluri P, Hsiao PF, Yang EC, Fairman AS, Trubelja A, Patel J, Miyagawa S, Sawa Y, Woo YJ. : Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle cell-endothelial progenitor cell bi-level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium. *Circulation* 128 S59-68, 2013
- 6) Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N. : Transplantation of myoblast sheets that

secrete the novel peptide SVVYGLR
improves cardiac function in failing hearts,
Cardiovasc Res 99(1) 102-10 2013

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Sawa Y.: Autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy, TERMIS 1 上海 2013.10.24 講演
- 2) Miyagawa S.: A Phase I clinical trial of autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy AHA (米国心臓病学会議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20 Poster
- 3) Miyagawa S, Sawa Y.: Myocardial regeneration therapy for heart failure, Core-to-core program International Symposium for Young Researchers 大阪、2013.12.11 シンポジウム
- 4) Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima, S, Saito A, Harada A, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Pearson J, Ching Y, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Toda K, Kuratani T, Shirai M, Hatazawa J, Sawa Y. : Combinatorial Therapy of Cell Sheet Implantation with Pedicle Omentum Flap Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood Vessels with Cardiac Function Recovery in Rat Myocardial Infarction Model AHA(米国心臓病学会議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20 Poster
- 5) Ozawa H. : Juvenile Skeletal Myoblast Has Greater Therapeutic Potentials Of Regenerative Therapy Than Adult Sheet For Treating Chronic Myocardial Infarction In Infarct Porcine AHA(米国心臓病学会

議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20
Poster

[国内学会]

- 1) 澤 芳樹 : 重症心不全に対する細胞シートを用いた心筋再生治療法 A promising regenerative therapy for severely damaged myocardium using cell sheet technology. -Up to date and perspective of stem cell therapy. 第19回日本遺伝子治療学会 岡山 2013.7.05 教育講演
- 2) 宮川 繁 : 心不全外科学における再生医学の現状と展望 第49回日本移植学会総会 京都 2013.9.5-7 シンポジウム
- 3) 宮川 繁 他 : 重症心不全に対する再生医療の現状と展望 第113回日本外科学会定期学術集会、福岡 2013.4.11-13 シンポジウム
- 4) 宮川 繁 他 : 医工連携による筋芽細胞シートの製品化を目指した取り組み 第51回日本人工臓器学会大会 横浜 2013.9.27-29 ワークショップ
- 5) 甲斐沼 尚 他 : 虚血性心筋症 モデルに対する筋芽細胞シートと大網同時移植による心筋再生療法の開発 第44回日本心臓血管外科学会、熊本、2014.2.19-20 会長要望演題
- 6) 今西 悠基子 他 : 重症心不全に対する骨髄間葉系幹細胞移植後のガン化に関するマーカーの解析 第13回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 7) 原田 明季摩 他 : 細胞シート移植治療における血管新生プロセスの検討、第13回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 8) 大河原弘達 他 : 細胞シートの臨床的汎用性の向上を目指した新しい長時間保存法の開発 第13回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 9) 小澤 秀登 他 : 幼弱ブタ虚血性心筋症モデルに対する自己骨格筋細胞シート移植の有効性の検討 第13回再生医療学会、京都、

2014.3.4-6. 一般(ポスター)

- 10) 甲斐沼 尚 他 : Cell Sheet Implantation
combined with Pedicle Omentum Flap
Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood
Vessels in Rat Myocardial Infarction Model
第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.22 会
長要望演題
- 11) 吉川 泰司 他 : Myocardial regenerative
therapy using myoblast cell sheet in patients with
end-stage heart failure - from bench to clinical
trial- 第 78 回日本循環器学会、東京、
2014.3.23 プレナリーセッション
- 12) 原田 明希摩 他 : Impacted mechanism of
angiogenic process of skeletal myoblast sheet
induced in chronological paracrine manner of
various cytokines. 第 78 回日本循環器学会、
東京、2014.3.23 ポスター
- 13) 小澤 秀登 他 : Juvenile Skeletal Myoblast
has Greater Therapeutic Potentials of Cell-Sheets
than Adult Myoblasts for Treating Chronic
Myocardial Infarction in Infarct Porcine 第 78
回日本循環器学会、東京、2014.3.23 ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）
分担研究報告書

小児重症拡張型心筋症への bridge-to-transplantation/recovery を
目指した骨格筋芽細胞シートの開発と実践

研究分担者 大阪大学心臓血管外科 宮川 繁

研究要旨

本研究においては、大阪大学がテルモ株式会社と共同で開発・実践してきた骨格筋芽細胞シート移植を、研究終了後目途として小児拡張型心筋症を適応症とする医師主導型治験に展開すべく、小児を適応症とするために希求される非臨床安全性試験・薬効薬理試験および品質管理試験を実施、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり厚生労働大臣の意見を聞き、pilot study として小児を対象とする場合の最適なエンドポイントを設定、医師主導型治験関連文書作成に資することを目的とする。

本研究にて、筋芽細胞シートの幼弱動物心不全に対する筋芽細胞シートの薬効・薬理の POC を獲得することができ、また Pilot study として「小児拡張型心筋症患者に対する筋芽細胞シート治療」がヒト幹細胞委員会での承認を得ることができた。そのデータをもとに医師主導型治験における適正なエンドポイント、対象患者の選択基準等の策定が可能であり、最終目的とする医師主導型治験の貴重なデータになるものと思われる。

A. 研究目的

本研究においては、大阪大学がテルモ株式会社と共同で開発・実践してきた骨格筋芽細胞シート移植を、研究終了後目途として小児拡張型心筋症を適応症とする医師主導型治験に展開すべく、小児を適応症とするために希求される非臨床安全性試験・薬効薬理試験および品質管理試験を実施、ヒト幹細胞臨床研究指針にのっとり厚生労働大臣の意見を聞き、pilot study として小児を対象とする場合の最適なエンドポイントを設定、医師主導型治験関連文書作成に資することを目的とする。

B. 研究方法

1) 幼若ブタ心不全モデル動物作成、骨格筋芽細胞シート移植と短期有効性検証（澤・宮川）

離乳早期幼若ブタを用い、骨格筋芽細胞シート移植の1カ月間の短期有効性に関して検証するとともに、幼弱ブタ由来筋芽細胞シートの特性を細胞増殖能、サイトカイン分泌能等を分子生物学的に検討する（図1、2、3）。

（倫理面への配慮）

1. 臨床試験の実施に際しては、研究計画書（プロトコール）に関して医学部医学倫理委員会での承認を受け、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」あるいは「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聴いた後、医学系研究科長の責任のもと実施することとし、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを研究対象とする。

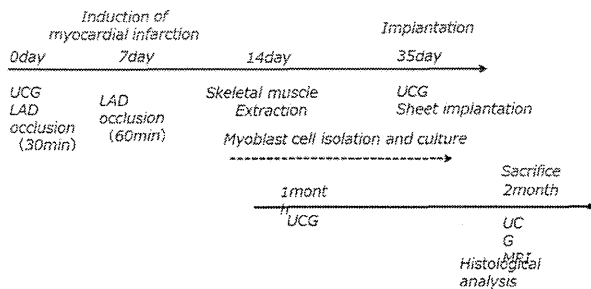


図 1. 評価方法

- 対象： 幼若ミニブタ由来骨格筋芽細胞 (2 month)
成熟ミニブタ由来骨格筋芽細胞 (20 month)
- ① sirtuin 1発現 enzyme immunoassay, real-time PCR
 - ② 細胞増殖能 スクラッチテスト、doubling time、Ki 67 陽性 細胞数
 - ③ 血管新生因子 の発現
 - ・培養上清中のVEGF蛋白発現量 (ELISA)
 - ・VEGF、HGF、HIF1、HGF、SDF-1遺伝子の発現 (real-time PCR)

図 2. 評価項目 (in vitro)

(1) 心機能評価

- ①移植手術後4週間目に、全身麻酔下でUCGを施行し心機能を測定。
- ②移植手術後8週間目に、全身麻酔下でUCG、MRIを施行。

(2) 組織検査

心筋組織：心筋組織を採取して組織学的、生化学的評価
 Histology: HE, Masson-trichrome, PAS, Tunnel
 Immunofluorescence: 梗塞境界領域
 Vascular density (CD31)
 心筋細胞径 (PAS染色)
 線維化率 (マッソン・トリクローム染色)

図 3. 評価項目 (in vivo)

2. 基礎的研究において、遺伝子改変動物、プラスミドDNAあるいは遺伝子導入ウイルス等を用いる場合は、使用に際して遺伝子組み換え生物などの使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律、カルタヘナ条約等各種法令・告示・通知に基づき研究を実施する。非臨床動物試験に関しては、GLP 各種通知にのっとって実施する。
3. 動物操作に当たっては、本学の動物実験規定に従って行なう。

C. 研究結果

1) 幼若ブタ心不全モデル動物作成、骨格筋芽細胞シート移植と有効性検証

生後2カ月齢の幼若ブタを使用した。生後2カ月齢を選択した理由は、離乳して、生殖機能が発達していない時期が、生後2カ月齢であり、臨床の現場で対象となる小児患者を想定した場合、ブタでの適正年齢は生後2カ月であることが推測されたからである (図 4)。

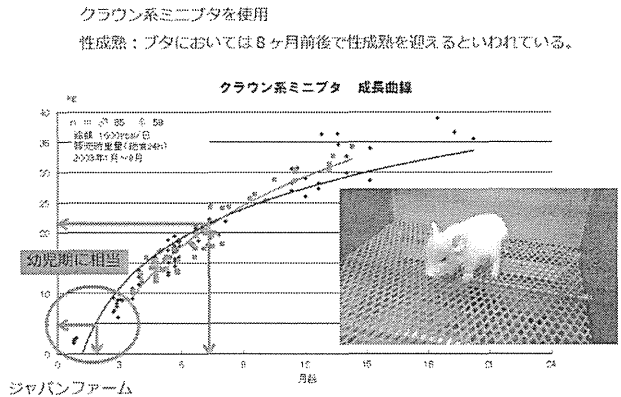


図 4. クラウン系ミニブタの成長曲線

幼若ミニブタ由来骨格筋芽細胞シートおよび成熟ミニブタ由来骨格筋芽細胞シートの sirtuin の発現に関しては、細胞シートにおいて、免疫染色により幼若ミニブタ由来骨格筋芽細胞シートで高い sirtuin 蛋白の発現を認め、また real time PCR および enzyme immunoassay において、幼若ミニブタ由来骨格筋芽細胞が高い sirtuin 遺伝子および蛋白の発現を認めた (図 5)。また、細胞の増殖能の検討では、まずスクラッチテストにおいて、幼若骨格筋芽細胞でより高い増殖能を認め、doubling time は、成熟動物由来骨格筋芽細胞に比べ短い時間であり、細胞シートにおいて有意に多

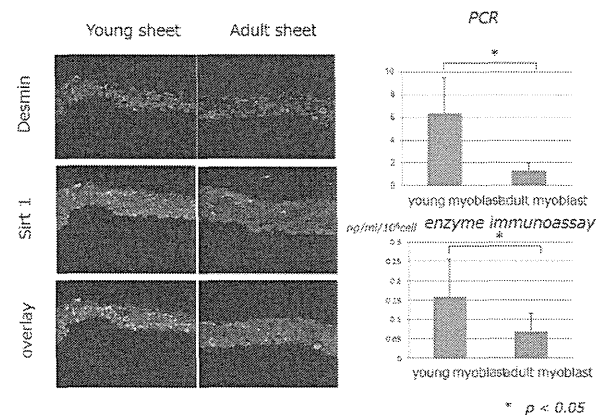


図 5. Sirtuin 遺伝子および蛋白の発現

数の Ki67 陽性細胞を認めた (図 6)。

ELISA 法にて血管新生因子である VEGF 等のサイトカインの発現も有意に高値であった (図 7、8)。

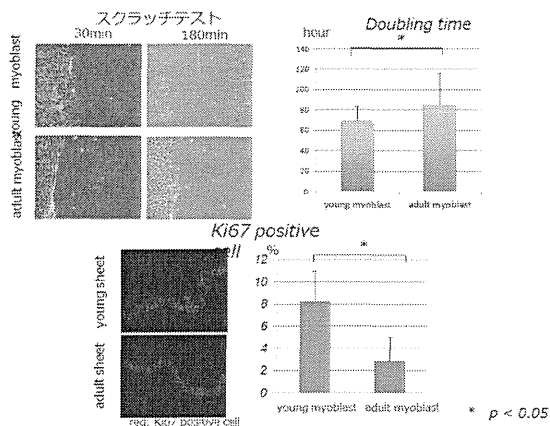


図 6. 幼若ミニブタ由来骨格筋芽細胞の増殖能

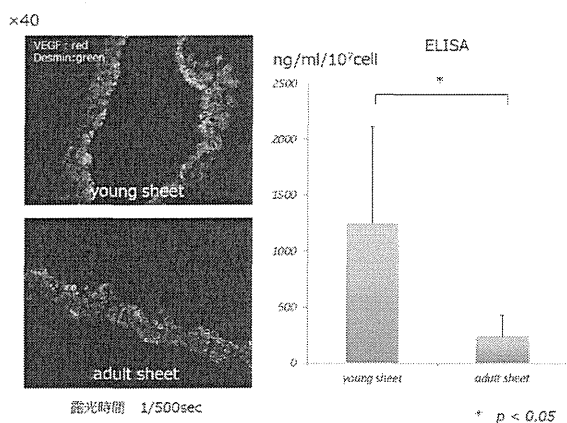


図 7. VEGF の発現と外液への遊離

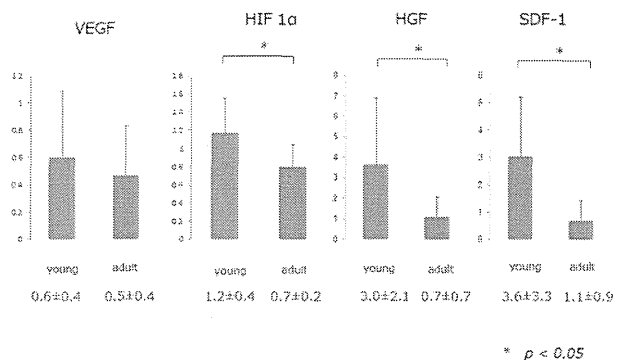


図 8. 血管新生サイトカインの発現-real time PCR による発現定量

幼若ブタの前下行枝をカテーテルにて閉塞させ、心筋梗塞モデルを作成することが可能となった (図 9)。モデル作成後 1 ヶ月の時点での超音波検

査および組織染色にて、心筋梗塞部位は非薄化し、著明な線維化を確認した (図 10)。自己筋芽細胞

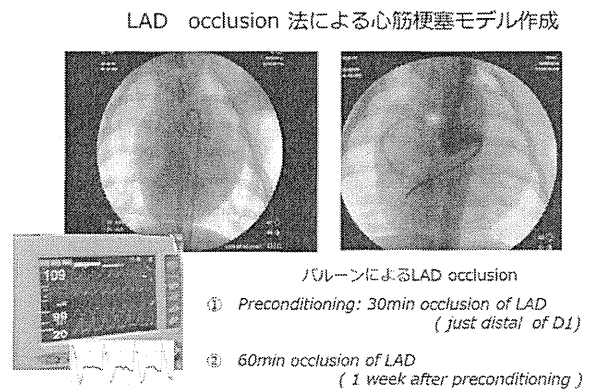


図 9. 幼若ミニブタの虚血性心疾患モデルの作成

シートを 4 枚左室前壁から側壁に移植した。幼若ブタでは 4 枚の筋芽細胞シート移植が外科的に移植限界であった (図 11)。移植後は正常と同等の体重増加を認め、筋芽細胞を採取した部位の歩行障害も認めず、成長は順調であった (図 12)。正常移植後 1 カ月、2 ヶ月後での心機能検査では、駆出率、心拍出量の増加を認め (図 13、14)、また、梗塞部位の dyssynchrony が是正されており (図 15)、有効性が確認された。心筋組織の組織学的検証を行ったところ、幼若ミニブタシート移植群において線維化の程度が有意に少なく (図 16、17)、CD31 陽性細胞の全細胞数に対する比率を評価すると、幼若ミニブタシート移植群にて有意に高値であった (図 18)。また、PAS 染色にて、幼若ミニブタシート移植群にてもっとも心筋の肥大が抑制されていた (図 19)。Tunnel 染色にて、細胞のアポトーシスは、幼若ミニブタシート移植群においてアポトーシスが抑制されている傾向が認められた (図 20)。上記有効性は、成獣と比較して、有意に高値であった。

また、犠死の際、主要臓器 (腎臓、卵巣、肝臓、脾臓、肺、脳) を摘出し、筋芽細胞シート移植による組織学的な異常所見がないか検討したところ、腫瘍形成等の所見は認められず、安全性が示唆された (図 21)。今後、移植後長期における効果ならびに、不整脈等の安全性を検討する予定である。

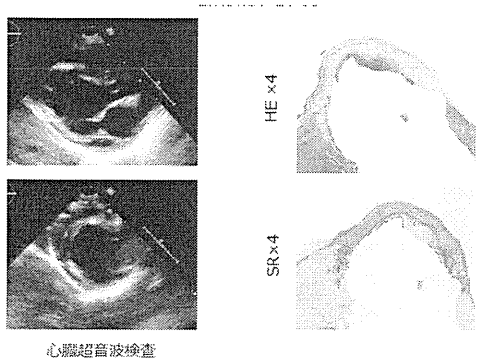


図 10. LAD 量領域の心筋梗塞作成一カ月後の超音波検査及び組織化学的所見

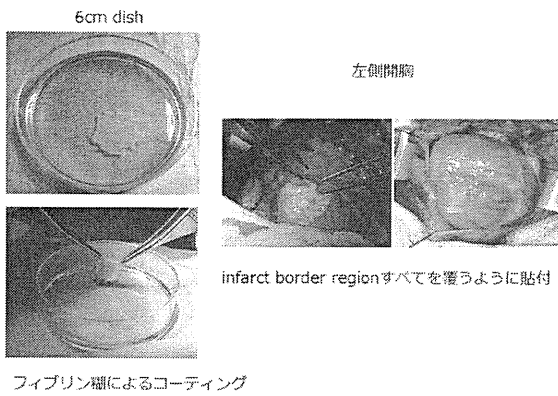


図 11. 幼若ミニプタへの筋芽細胞シート移植

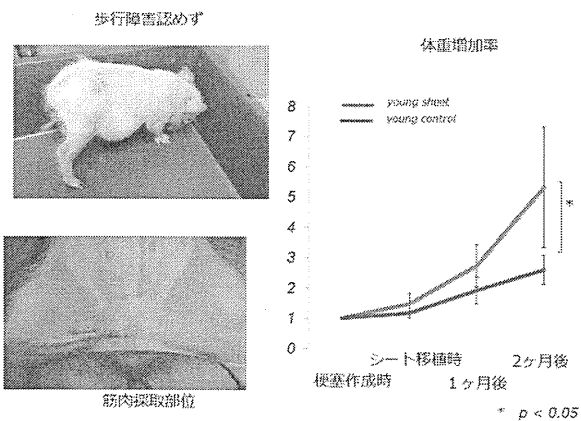


図 12. 移植後の歩行と体重増加率

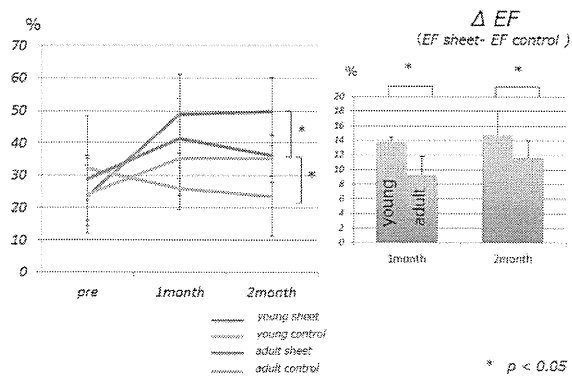


図 13. Ejection Fraction の継時変化

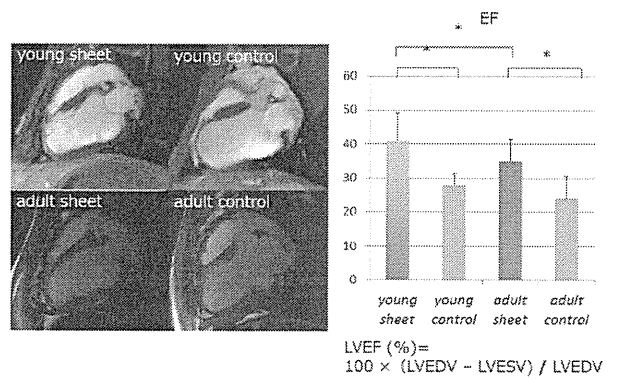


図 14. 移植 2 カ月後の MRI および EF

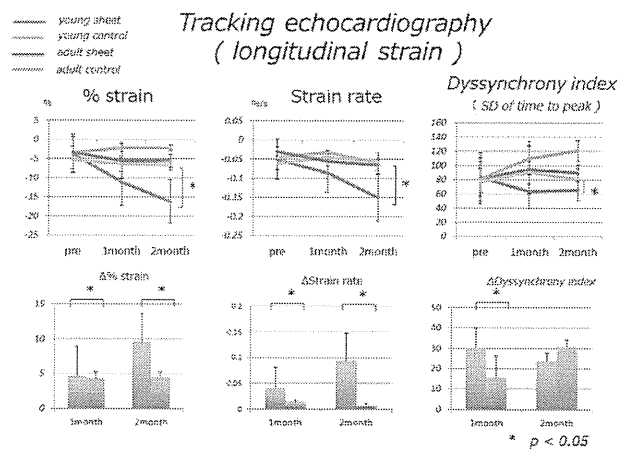


図 15. 梗塞部位の dyssynchrony の変化

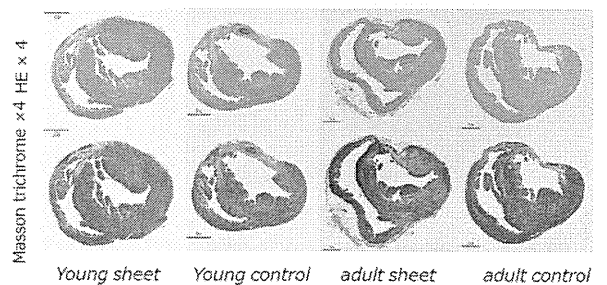


図 16. 組織化学的所見

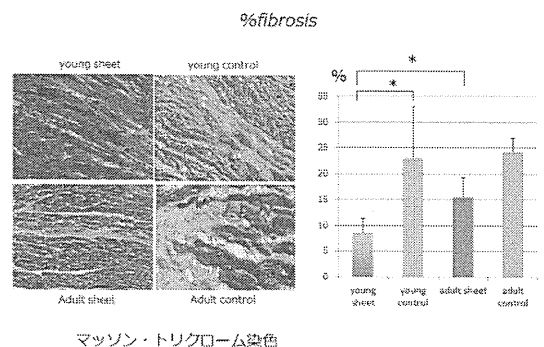


図 17. 境界領域における線維化率の変化

4) 小児を対象とした骨格筋芽細胞シート移植による臨床研究の申請・実施

小児心不全患者に対する自己骨格筋芽細胞シートの臨床研究プロトコールが大阪大学未来医療センターにて承認され、昨年ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会にて承認された。今年度臨床研究第一例として、11歳女児がエンロールされ、骨格筋採取を行った。

2012年から、治験薬提供者により、虚血性心筋症に対する企業治験が実施されている。目標症例数のエントリーは終了しており、企業治験終了後、製造販売承認申請を実施予定であるが、当該治験で対象とはならなかった小児重症心不全患者についても、本剤の有効性評価方法の妥当性ならびに安全性を確認し、新たな治療法を探索する目的で、医師主導治験として実施することとした。本臨床試験の結果、小児重症心筋症の患者に対して、本治験薬を用いた治療法が確立できれば、移植までの待機期間が長期に及んだ場合でもより安全に過ごすことができるほか、LVAS装着及び心臓移植を回避出来る可能性があるものと考えている。

本治験の実施計画書を作成するにあたり、当科の臨床研究の計画書を基に作成したが、QOL評価については、小児を対象とした適切なものがないため、当院の小児科医等関係部署に聞き取りを行い、当科独自でQOLの指標となるものを作成した。また、有害事象の評価の基準値についても、小児にあった基準値一覧を作成した。症例数については、本治験の対象となる患者は年間数例であることから、3例で計画した。

本治験薬は、当科で開発を進めてきた化合物であるが、今後製造販売はT社が行っていくことから、治験薬提供者となるテルモ社と規格等の協議を行い、テルモ社が作成した治験薬を使用することとした。

2013年12月6日、当該医師主導治験の実施について、事前相談を実施し、治験薬の規格や対象年齢について質問を受け回答し、薬事戦略相談対面助言実施時に必要となる資料について確認を行った（添付資料1）。

CD31-positive capillaries

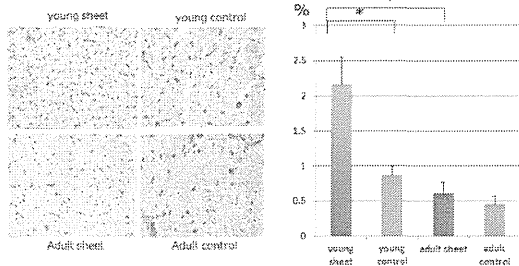
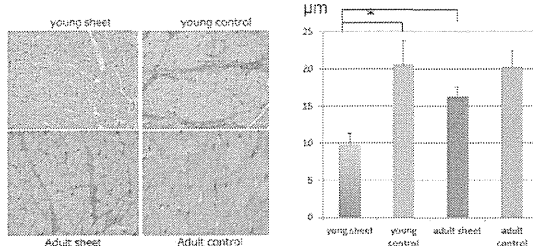


図 18. 境界領域における血管形成

* $p < 0.05$

Myocardial cell size



PAS染色

図 19. 境界領域における PAS 染色

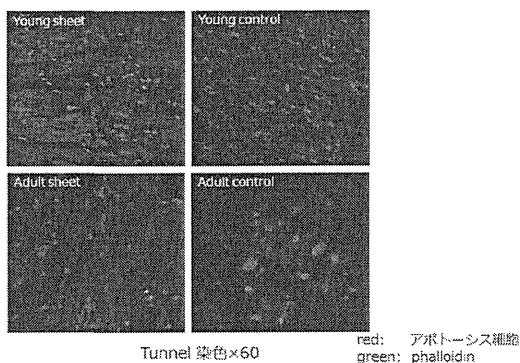


図 20. 境界領域におけるアポトーシス

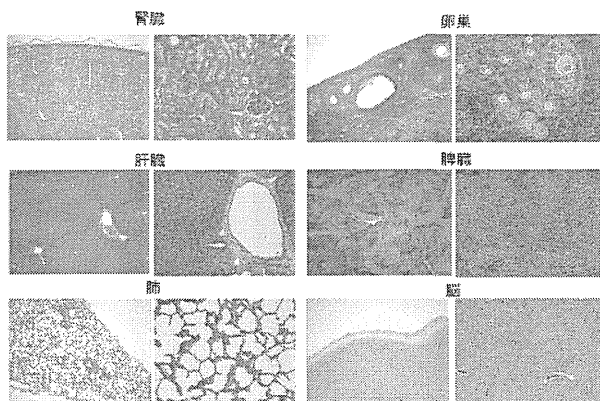


図 21. 各臓器における腫瘍奇形性の検討

2014年3月27日、薬事戦略相談 対面助言を実施した。対象疾患について、患者数が限られることから、複数の疾患を含むことの合意は得られたが、対象とならない患者に対する基準を設け、また、成人と同等の心不全患者がエントリーされるよう基準を設定するよう指摘があり、選択基準・除外基準について、再確認することとした。

評価項目については、安全性及び有効性評価ができるデータを可能な限り収集することができるよう成人と同様の項目を確認するよう指摘があり、設定することし、機構より、非臨床試験における安全性の結果の提示を求められ、成人と同等であることを示すこととなった（添付資料2）。

今後は、機構より指摘頂いた内容を治験実施計画書に反映させ、また、非臨床試験における安全性の結果の確認を行うとともに、症例判定委員会及び効果安全性評価委員の選定、外部業務委託先の検討および選定、治験薬提供費用等の協議を行い、院内の利益相反委員会及び治験審査委員会の承認後、単施設にて医師主導治験を実施していく予定である。

また、筋芽細胞シートに関しては、テルモ社が作成している GMP 基準を満たした筋芽細胞シートを使用する予定である。

D. 考察

今回の非臨床試験にて、小児心臓に対する外科的手術手技が、成人の心臓への移植と比較して、心臓のサイズの問題で、多数の筋芽細胞シートを移植することは困難であることが判明し、実際の臨床研究での手術手技を確認することができた。また、本研究にて、幼弱ブタ心不全モデルを用いた筋芽細胞シートの薬効・薬理の POC を獲得し、移植する筋芽細胞シートはテルモ社が作成した GMP 基準の細胞シートであり、本医師主導型治験プロトコールは対面助言の段階にまで到達した。小児筋芽細胞シートはこれまでの筋芽細胞シートとは生理物性学的に異質であることが PMDA 側より指摘されているため、来期不整脈等の安全性試験を行い、医師主導型治験の承認を目指す。今回承認された臨床研究において探索される適切なエンドポイントと患者選択基準により、良質の医

師主導型治験を行うことが可能となると思われる。

E. 結論

本年度の本研究により、医師主導型治験に向けた基盤が確立しつつあり、数例の臨床研究を行うことにより、小児心不全に対する適正な治験デザインを確立することが可能になるとと思われる。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shudo Y, Miyagawa S, Ohkura H, Fukushima S, Saito A, Shiozaki M, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Matsuyama A, Sawa Y. : Addition of Mesenchymal Stem Cells Enhances the Therapeutic Effects of Skeletal Myoblast Cell-Sheet Transplantation in a Rat Ischemic Cardiomyopathy Model. *Tissue Eng Part A*, 20(3-4), 728-39, 2014
- 2) Alshammary S, Fukushima S, Miyagawa S, Matsuda T, Nishi H, Saito A, Kamata S, Asahara T, Sawa Y. : Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction, *Surg Today*, 43(9), 970-6, 2013
- 3) Matsuda T, Miyagawa S, Fukushima S, Kitagawa-Sakakida S, Akimaru H, Horii-Komatsu M, Kawamoto A, Saito A, Asahara T, Sawa Y. : Human Cardiac Stem Cells With Reduced Notch Signaling Show Enhanced Therapeutic Potential in a Rat Acute Infarction Model. *Circ J*, 78(1) 222-31, 2013
- 4) Shudo Y, Miyagawa S, Nakatani S, Fukushima S, Sakaguchi T, Saito A, Asanuma T, Kawaguchi N, Matsuura N, Shimizu T, Okano T, Sawa Y. : Myocardial

layer-specific effect of myoblast cell-sheet implantation evaluated by tissue strain imaging. Circ J, 77(4), 1063-72, 2013

- 5) Shudo Y, Cohen JE, Macarthur JW, Atluri P, Hsiao PF, Yang EC, Fairman AS, Trubelja A, Patel J, Miyagawa S, Sawa Y, Woo YJ. : Spatially oriented, temporally sequential smooth muscle cell-endothelial progenitor cell bi-level cell sheet neovascularizes ischemic myocardium. Circulation 128, S59-68, 2013
- 6) Uchinaka A, Kawaguchi N, Hamada Y, Mori S, Miyagawa S, Saito A, Sawa Y, Matsuura N. : Transplantation of myoblast sheets that secrete the novel peptide SVVYGLR improves cardiac function in failing hearts, Cardiovasc Res, 99(1) 102-10, 2013

2. 学会発表

[国際学会]

- 1) Miyagawa S : A Phase I clinical trial of autologous stem cell-sheet transplantation therapy for treating cardiomyopathy AHA (米国心臓病学会議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20 Poster
- 2) Miyagawa S, Sawa Y: Myocardial regeneration therapy for heart failure、Core-to-core program International Symposium for Young Researchers 大阪、2013.12.11 シンポジウム
- 3) Kainuma S, et al. : Combinatorial Therapy of Cell Sheet Implantation with Pedicle Omentum Flap Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood Vessels with Cardiac Function Recovery in Rat Myocardial Infarction Model, AHA(米国心臓病学会議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20 Poster

- 4) Ozawa H. et al. : Juvenile Skeletal Myoblast Has Greater Therapeutic Potentials Of Regenerative Therapy Than Adult Sheet For Treating Chronic Myocardial Infarction In Infarct Porcine AHA(米国心臓病学会議) 米国テキサス州・ダラス 2013.11.16-20 Poster

[国内学会]

- 1) 宮川 繁 : 心不全外科学における再生医学の現状と展望 第 49 回日本移植学会総会 京都 2013.9.5-7 シンポジウム
- 2) 宮川 繁 他: 重症心不全に対する再生医療の現状と展望 第 113 回日本外科学会定期学術集会、福岡 2013.4.11-13 シンポジウム
- 3) 宮川 繁 他 : 医工連携による筋芽細胞シートの製品化を目指した取り組み 第 51 回日本人工臓器学会大会 横浜 2013.9.27-29 ワークショップ
- 4) 甲斐沼 尚 他: 虚血性心筋症 モデルに対する筋芽細胞シートと大網同時移植による心筋再生療法の開発 第 44 回日本心臓血管外科学会、熊本、2014.2.19-20 会長要望演題
- 5) 今西 悠基子 他: 重症心不全に対する骨髄間葉系幹細胞移植後のガン化に関するマーカーの解析 第 13 回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 6) 原田 明季摩 他 : 細胞シート移植治療における血管新生プロセスの検討、第 13 回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 7) 大河原弘達 他 : 細胞シートの臨床的汎用性の向上を目指した新しい長時間保存法の開発 第 13 回再生医療学会、京都、2014.3.4-6 一般(ポスター)
- 8) 小澤 秀登 他 : 幼弱ブタ虚血性心筋症モデルに対する自己骨格筋細胞シート移植の有効性の検討 第 13 回再生医療学会、京都、2014.3.4-6. 一般(ポスター)

- 9) 甲斐沼 尚 他 : Cell Sheet Implantation combined with Pedicle Omentum Flap Promotes Angiogenesis and Stabilizes Blood Vessels in Rat Myocardial Infarction Model 第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.22 会長要望演題
- 10) 吉川 泰司 他 : Myocardial regenerative therapy using myoblast cell sheet in patients with end-stage heart failure - from bench to clinical trial- 第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.23 プレナリーセッション
- 11) 原田 明希摩 : Impacted mechanism of angiogenic process of skeletal myoblast sheet induced in chronological paracrine manner of various cytokines. 第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.23 ポスター
- 12) 小澤 秀登 他 : Juvenile Skeletal Myoblast has Greater Therapeutic Potentials of Cell-Sheets than Adult Myoblasts for Treating Chronic Myocardial Infarction in Infarct Porcine 第 78 回日本循環器学会、東京、2014.3.23 ポスター

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし。
2. 実用新案登録 該当なし。
3. その他

事前面談議事録

添付資料 1

2013年12月6日

11:00～12:00

議題:

1. 重症心不全患者に対する自己由来骨格筋芽細胞シート移植による探索的試験の薬事戦略事前面談

場所：独立行政法人医薬品医療機器総合機構 審査マネジメント部 薬事戦略相談室

出席者:

- 大阪大学 心臓血管外科 澤 芳樹
- 大阪大学 心臓血管外科 宮川 繁
- 大阪大学 心臓血管外科 平 将生
- 治験薬提供者 2名

内容:

大阪大学の澤より、説明資料を用いて、非臨床の結果、今までの臨床試験結果の説明を行い、成人に対する適応拡大及び小児を対象とした医師主導治験の実施について、相談を行った。

PMDA：テルモ株式会社より治験薬は提供されるということであるが、大きさは同じで枚数が異なるという違いだけか。

澤：サイズは関係ない。テルモ株式会社にて、培養されたものを提供頂き、院内でシートにする。

PMDA：小児のシートは何歳で実施する予定か。

平：新生児から対象で考えている。

PMDA：小児の対象試験において、中学生であれば評価可能かと考えるが、新生児の評価は難しいのではないか。

平：他の治験において、新生児の評価を実施しているものがあるので、その評価を流用できたらと考えている。

受付日・番号：平成26年2月10日 第戦P118号
依頼物の名称又は説明：自家骨格筋芽細胞シート
相談者：大阪大学医学部附属病院
相談区分：医薬品戦略相談
相談日時：平成26年3月27日(木) 15:00～17:00 (14F会議室27)

平成26年3月14日

相談事項に対する機構の意見

対面助言を実施するにあたり、その進行及び記録の作成をより効率的に進めるため、相談事項に対する機構の意見を事前にお示しします。また、機構が解釈した対面助言の相談内容についても併せてお示ししています。

【相談内容の解釈】に対するご指摘及び【機構の意見】に対する相談者の対応については、3月20日(木)17時までにご提出ください。なお、機構が解釈した相談内容と相談者が期待する相談内容とが異なる場合には、異なる点を具体的に分かり易く箇条書き等にてご指摘ください。相談内容の解釈に問題がない場合もその旨を記載してご提出ください。

相談事項2 小児（小児重症心筋症に対する TCD-51073 の探索的試験）

1. 試験のデザインの骨子について

【相談内容の解釈】

小児における重症心不全治療の現状は成人より厳しい状況にあり、心臓移植の適応となる重症心不全患者は、臓器提供者が少ないため心臓移植待機期間が長い一方で、体格の小さな小児に対して使用可能な補助人工心臓もなく、重症心不全患者に対する治療体系を早急に確立する必要がある。相談者は、このような社会的背景から、1歳未満の乳幼児を含む小児の重症心筋症を対象とした臨床試験（以下、「小児治験」）を計画している。

小児治験の目的は、本剤適用時の安全性の確認及び小児における実施可能性の確認であるため、成人 ICM 治験の検査・観察項目から以下の点を変更した。これらの変更を加えた試験計画が受入れ可能かどうかについて、機構の意見を聞きたい。

<変更点>

- 1) 心プールシンチグラフィ（LVEF）の省略
- 2) CT 検査（LVEF、LVEDV、LVESV、心拍数、左室拡張末期壁厚、左室収縮末期壁厚）の省略
- 3) 6分間歩行試験、心肺運動負荷試験及び身体活動能力指数（SAS）の省略
- 4) 相談者が独自に作成した QOL 票を用いた評価の追加

（変更理由）

- 1)及び2) 心拍数の高い小児では成人と同等の評価が困難なこと、造影剤を多量に使用する検査はリスクが高いことから、検査による被験者の負荷や侵襲を軽減させるため省略した。
- 3) 幼少期から心疾患により高度に運動制限されて成長・発達した患者では、運動耐容能の個人差が大きく客観性のある評価結果が得られないこと、患者によっては得られる成果よりも運動負荷によるリスクが上回ることが懸念されるため省略した。
- 4) 本剤の適用により、日常生活動作（ADL）及び QOL の改善が期待されるものの、小児では使用可能な評価指標がないため、回答書 p.8 に示した文献等を参考に、相談者が独自に QOL 票を作成した。

【機構の意見】

- 1)、2)及び3) 小児治験の対象年齢は18歳以下とされていることから、被験者の年齢や状態によっては検査の実施が可能な場合もあると推測されます。小児治験の対象患者が極めて限られることを踏まえ、今後の開発にあたり、可能な限り有効性に関する情報も取得しておくことが望ましいと考えます。
- 4) 相談者が独自に作成した QOL 票を使用することは差し支えないと考えます。ただし、評価指標としての信頼性及び妥当性を確立するための適切なバリデーションが実施さ

れていないのであれば、現段階では参考的な位置付けにとどまることに留意する必要があります。

相談事項 2 小児（小児重症心筋症に対する TCD-51073 の探索的試験）

2. 選択基準／除外基準について

【相談内容の解釈】

相談者は、小児治験の被験者組入れに際して、薬事戦略相談 対面助言資料 別紙 1p6 に示した選択基準／除外基準を計画している。小児においては、成人と異なり病理組織学的診断が必ずしも可能ではないことから、対象疾患を「重症心筋症」と設定した。重症心筋症には、拡張型心筋症、拡張型相肥大型心筋症等の特発性心筋症や左室緻密化障害、心筋炎後心筋症、形態異常や虚血に伴う心筋障害等が含まれる。相談者の計画する選択基準／除外基準について、機構の意見を聞きたい。

【機構の意見】

機構は、小児治験の対象集団を「心筋症に対する対症的治療法となる内科的治療法及び外科的治療法が奏功せず、心臓移植の適応となる前段階である重症な心不全患者」（小児治験計画書 p.30）とすることについて、小児の重症心筋症の患者数が極めて限られること、病理組織学的確定診断が困難な場合も少なくないことから、対象疾患に複数の疾患が含まれることはやむを得ないと考えます。一方、小児治験の対象ではないと考えられる患者の組入れを避けるために、以下の点について適切な選択基準／除外基準を設定する必要があると考えます。

- ・ 既存治療（例えば心臓再同期療法等）が奏功しない重症心筋症であること。
- ・ 外科手術によって改善できる拡張型心筋症様の疾患（例えば BWG 症候群）を除くこと。
- ・ 先天性心疾患の合併に関する規定。
- ・ 先天性冠動脈の異常（例えば、冠動脈起始異常（BWG 症候群）に関する規定。
- ・ 代謝疾患（例えば、カルチニン欠損、Pompe 病等の酵素欠損異常疾患）の合併に関する規定。
- ・ 開胸手術が可能であること。

相談事項 2 小児（小児重症心筋症に対する TCD-51073 の探索的試験）

3. 評価項目について

【相談内容の解釈】

相談事項 2-1 に示したとおり、小児治験は小児重症心筋症患者に対する初めての治験となることから、主要な目的を安全性の評価及び実施可能性の確認としており、以下のとおり主要評価項目を設定している。

- 1) 不整脈（安静時標準 12 誘導心電図検査、24 時間ホルター心電図検査）
- 2) 不整脈以外の有害事象及び副作用