

201406007A

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

小児心不全に対するヒト幹細胞移植による先進医療の
実用化加速に向けた第2相臨床研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成27（2015）年 3月

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

小児心不全に対するヒト幹細胞移植による先進医療の
実用化加速に向けた第2相臨床研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成27（2015）年 3月

目 次

I. 総括研究報告

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

王 英正----- 3

II. 分担研究報告

先天性心疾患の心臓手術および組織採取に関する研究

佐野 俊二 ----- 15

冠動脈内注入法による心臓内幹細胞の自家移植に関する研究

大月 審一 ----- 24

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 33

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 40

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依然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相ランダム化臨床研究を実施する。さらに、本細胞治療法の薬事法承認に向けて、企業の治験参入に向けた産学間の交渉と技術導出を伴う企業主導多施設共同臨床治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

果を踏まえ、臨床治験を見据えた有効性検証目的の第2相ランダム化臨床試験を実施し、薬事法承認を経た世界初の小児心不全に対する心筋再生医療法の標準医療化を目的とする。

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「ヒト幹細胞を用いる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相臨床研究(NCT01273857)」の研究成

B. 研究方法

2013年4月8日に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」で実施承認され、2013年6月より症例登録及びプロトコル治療を開始した有効性検証目的のPERSEUS第2相ランダム化臨床研究(NCT01829750)の継続実施と移植群および非移植群における予定追跡調査期間で取得した臨床データ解析を主たる研究目標とする。

また、本細胞治療法の薬事法承認を目指した企業主導の多施設共同臨床治験の開始に向けて、出資企業との産学交渉ならびに医療行政・規制当局に対応するための取り組みと目標達成度について、研究結果の項において述べる。

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。

① 培地をピペットで吸引し、これを品質管理用に提出する。

② 培養皿にPBSを加え洗浄する。

③ 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。

④ 上清を破棄し、PBSで洗浄し再び遠心動作を行う(2回)。

⑤ 上清を破棄し、1mLの生理食塩水で懸濁、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。

- ⑥ 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。
- ⑦ 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。
- ⑧ 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。
- ⑨ 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°C 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。
- ⑩ 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°C 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。

品質管理

自家心臓組織から分離された細胞が心臓内幹細胞の性質を有する細胞であることを確認するために、その指標として心臓内幹細胞に共通する以下の各種転写因子、発現マーカーの有無を評価す

る。

- 1) 心筋固有の転写因子 Nkx2.5 陽性もしくは GATA4 陽性。
- 2) 間葉系幹細胞マーカー CD90、CD105、SIRPA 陽性かつ CD45、免疫提示抗原 MHC class-II 陰性。

心臓幹細胞の品質に関して、細胞の分化能、増殖能を確認する。分化能については、これまでに本研究者らが行ってきた分化誘導法に従い、心筋細胞へ分化誘導し確認を行う。増殖能の確認は分離後、通常培養を行い、約 21 日目の時点で規定細胞数（ 5×10^6 個）に達しない場合に、分離した有核細胞が増殖能を有しない細胞であると判断する。また凍結保存後、解凍を行った際に 50% 以上の生存が確認されない場合に凍結された細胞の生存能がないものと判断する。

培養過程における細胞の感染の有無を培養開始時、細胞凍結時、細胞解凍時、細胞出荷時に細菌培養、真菌培養、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン測定、培養上清ウイルス検査によりチェックする。

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。

説明と同意（インフォームド・コンセント）

試験責任／分担医師は、被験者が試験に参加する前、心臓組織の採取前及び細胞移植手術前に、それぞれ説明文書を用いて十分説明し、試験への参加について自由意思による同意を本人から文書として得る。文書による同意を得る際には、説明医師ならびに被験者が説明文書の内容を十分理解した上で、同意書（様式）に各自日付を記入し、記名捺印または署名する。試験責任／分担医師は、記名捺印または署名した同意書の写しを説明文書と共に被験者に交付し同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して当該医療機関で保管する。

説明文書に重大な改訂があった場合、説明医師は試験参加中の被験者に対して改訂後の説明文書を用いて再度説明し、試験参加の継続について自由意思による同意を本人から文書として得る。

試験参加中の被験者が同意の撤回を申し出た場合、試験責任／分担医師はその旨をカルテに記載し、記録を残す。被験者は同意を撤回する場合、試験責任者に対し同意撤回文書の交付を要求し、必要事項を記入した後に、提出する。試験責任医師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報告する。独立データモニタリング委員会は同意撤回手続きが正しく行われたことを確認、担当の試験責任医師にこれを通知する。試験責任医師は被験者に通知し、同意撤回手続きが完了する。同時に試験責任医師は登録・データセンターに試験中止報告書を提出する。

個人情報の保護

個人情報の保護については、岡山大学に適用され

る法令、条例等を遵守する。

試験に係わる関係者は、ヒト幹細胞臨床研究を行う上で知り得た被験者等に関する個人情報を正当な理由なく漏らしてはならないものとする。職を退いた後も同様とする。

試験責任医師および試験分担医師は、症例登録票および症例報告書等を当該機関外に提供する際には、連結可能匿名化を行うために新たに被験者識別コードを付し、それを用いる。医療機関外の者が、被験者を特定できる情報（氏名・住所・電話番号など）は記載しない。

登録・データセンターが医療機関へ照会する際の被験者の特定は、試験責任医師および試験分担医師が管理する被験者識別コードまたは登録・データセンターが発行した登録番号を用いて行う。主任研究者等が試験で得られた情報を公表する際には、被験者が特定できないよう十分配慮する。

保有個人情報について、その利用目的を変更する場合には、改めて被験者等に当該変更の内容を説明し、同意を得る。また、変更前の利用目的と相当の関連性を有すると合理的に認められる範囲内において利用目的を変更する場合は、当該変更の内容について被験者等に通知または公表する。他の研究者等から研究を継承することに伴い個人情報を取得した場合は、あらかじめ被験者等の同意を得ないで、承継前において当該個人情報の利用目的の達成に必要な範囲を超えて、当該個人情報を取り扱わないようにする。また、利用目的の達成に必要な範囲内において、保有個人情報を正確かつ最新の内容に保つようにする。

保有個人情報の漏洩、紛失又はき損の防止その他の保有個人情報の安全管理のために必要かつ適切な措置を講ずる。保有個人情報の取り扱いに

関する被験者からの苦情又は問い合わせに対しては適切かつ迅速な対応を行う。

被験者の秘密保持の立場から、診療録、検査データ、被験者の同意に関する記録等は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科心臓血管外科において、また症例報告書およびそれに準ずる書類は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科心臓血管外科において、試験期間中は保管し、試験終了後は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科心臓血管外科において、臨床試験の統括報告書を厚生労働大臣に提出してから10年間保存される。またこれらの記録等は必要に応じて検索できるように保存する義務がある。

健康被害に対する補償

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、すみやかに適切な治療その他最善の措置を受けることが出来るように、主任研究者、試験分担医師と岡山大学病院が対応する。ただし、健康被害の治療費には健康保険を適用し、補償金、医療手当などの補償は行わない。

試験の早期中止と終了

試験の終了

追跡期間の終了およびデータベースの固定をもって試験の終了とする。データセンターからデータベース固定の連絡を受けた主任研究者は、試験が終了したことを試験責任医師、統計解析責任者および独立データモニタリング委員に報告する。報告を受けた試験責任医師は、医療機関の長および医療機関内の関連部門にその旨を報告する。

試験の早期中止

原則として上記終了の定義に至るまで試験を継続するが、以下の理由により予定より早期に試験を中止する場合がある。

- 1) 中間解析により試験治療の有効性における著しい劣性が確認された場合。
- 2) 予期せぬ重篤な有害事象の発生。
- 3) 明らかな治療関連死の発生。
- 4) その他、症例登録の遅れ、プロトコル逸脱の頻発などの理由により、試験の完遂が困難と判断された場合。

記録の保存

当該臨床試験の実施に係る記録（文書および電子記録）を試験終了後、臨床試験の統括報告書を厚生労働大臣に提出してから10年間保存する。保存場所は、試験期間中の主任研究者、試験責任／分担医師の担当する記録は、岡山大学病院・新医療研究開発センターにおいて、データセンターの担当する記録は、臨床研究情報センターにおいて、試験終了後は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科心臓血管外科で保存する。細胞の調製等に関する記録は以下の通りで、岡山大学病院 探索的医薬品開発室内の細胞調製室が保存する。

（倫理面への配慮）

- ①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。
- ②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。
- ③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。

④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。

⑤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、2015年1月まで予定の全34症例を登録終了した。内訳は、移植群17症例、非移植群17症例であった。2015年3月10日までに移植群の全17症例への細胞移植(stage 1)と非移植群に対する3ヶ月目検査実施終了後に救済移植(stage 2)を希望された全17症例に対して実施完了した。

また、細胞移植を実施した移植群の17症例のうち12症例、救済移植を追加した非移植群の17症例中16症例が3ヶ月目の各種心機能検査を終えており、3ヶ月目における中間評価として、心臓MRI、心室造影、心エコー検査などによって、心室駆出率は、プロトコル治療を受けた細胞移植群で非移植群に比し、それぞれ有意に機能改善することを確認した($P=0.02$, $P=0.006$, $P=0.005$)。

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。昨年度の報告書において、造影遅延(LGE)を伴う症例では、LGE陰性症例に比べ、心臓手術前も心機能は低く、局所における心室ストレインも有意に低下していることを明らかにしたが、本年度においては、本臨床研究に参加した全症例における細胞治療の有無に関するLGEの退縮能について詳細に検討した。

プロトコル治療を受けた細胞移植群は、非移植群に比べ、3ヶ月目における造影MRI検査で検出さ

れた心室筋組織の線維化重量、線維化領域、線維化容積はともに有意にそれぞれ縮小しており($P=0.02$, $P=0.01$, $P=0.02$)、この心筋組織の線維化退縮の臨床的意義は、カテーテル検査より取得した圧データをもとに計算された心室筋の弾性能の改善やstiffnessの緩和につながっていることも明らかにした。

また、企業主導の多施設共同臨床治験の実施に向けて、産学連携による企業参入の交渉ならびに医療行政・規制当局との折衝を同時並行で進めてきた。2014年1月に(株)日本再生医療と企業主導臨床治験の実施について合意に達した。2014年5月にPMDAとの事前相談を実施し、6月に岡山大学と企業間で技術移転の契約締結を完了した。さらに、(株)日本再生医療より製造委託先として、ファーマバイオ社が選定され、7月に製造移管目的で同社に技術導出を開始した。9月に入り、企業側よりPMDAに対して具体的な安全性試験や毒性・薬理試験についての事前面談を実施、11月にはPMDAとの対面助言に向けた資料作成と治験実施戦略の選定を岡山大学側との間で深く協議した。2015年1月にPMDAとの対面助言を行い、臨床治験開始までに必要な非臨床POCの取得に関する具体的な助言をいただき、現在まで、治験届けまでに必要な安全性試験や毒性・薬理試験について、追加実験を継続実施中である。

D. 考察

2011~2012年にかけて実施報告した世界初めての小児心不全を対象にした心臓内幹細胞自家移植療法(TICAP第1相臨床研究: NCT01273857)により、冠動脈注入法による自己幹細胞移植は安全で有効性が示唆されている(*Circ Res*, 2015)。

2013年より有効性検証目的で現在実施中の

PERSEUS 第2相ランダム化臨床研究 (NCT01829750) は、登録終了後の現時点で、主要エンドポイントである3ヶ月目での各種心機能検査において、非移植群では観察されない有効性を支持する所見を得ている。これまでに移植群ならびに非移植群に対する救済移植を含めると合計34症例 (全17症例が救済移植希望のため、予定の全登録症例数と一致) に冠動脈内注入法による自己幹細胞移植を実施したが、これまでに特記すべき急性期における有害事象は認められていない。これらの全34症例に対して、中長期における安全性と有効性についても、慎重に臨床経過の推移を検討していく。

また、企業手動の臨床治験の実施に向けて、出資企業や委託製造企業への技術導出も完了しており、医療行政・規制当局との折衝も対面助言まで終了しており、研究推進に関する進捗は順調である。今後、PMDAより提案された追加の非臨床POCの取得を進め、治験前相談から治験相談を経て治験届けを提出し、治験薬の薬事法承認に向けて、平成27年度内での企業主導多施設共同臨床治験の実施開始を目指す。

E. 結論

PERSEUS第2相ランダム化臨床研究より得られた中間的研究成果は、18ヶ月目まで長期経過観察を終了したTICAP第1相前向き臨床研究とは異なり、移植後3か月目までの短期における冠動脈内細胞移植法の安全性と有効性について再現性をもって確認し得た。今後、中長期における本細胞治療法の安全性と有効性検証を行うことは極めて重要であり、企業主導臨床治験の実施承認を得るための貴重な参考資料となる。

PMDAより指摘されたヒトでは観察し得な

い有害事象や副作用について、毒性・薬理試験を主体とした非臨床POCとして追加取得することは、本細胞治療法の安全性を高めることにつながり、臨床的にも意義深い検証実験として、今後も着々と研究事業を進めていく。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, Okuyama M, Kobayashi J, Baba K, Arai S, Kawabata T, Yoshizumi K, Tateishi A, Kuroko Y, Iwasaki T, Sato S, Kasahara S, Sano S, Oh H. Intracoronary Autologous Cardiac Progenitor Cell Transfer in Patients with Hypoplastic Left Heart Syndrome: The TICAP Prospective Phase 1 Controlled Trial. *Circ Res.* 2015;116:653-664.
- ② Kobayashi J., Sano S., Oh H. Epigenetic modification in congenital heart diseases by using stem cell technologies *Stem Cell Epigenetics* 2015; 2:1
- ③ Kobayashi J., Yoshida M., Tarui S., Hirata M., Nagai Y., Kasahara S., Keiji K., Ito H., Sano S., Oh H. Directed Differentiation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Identifies the Transcriptional Repression and Epigenetic Modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 in Hypoplastic Left Heart Syndrome. *PLOS One* 2014;9(7): e102796.
- ④ Tarui S., Sano S., Oh H. Stem cell therapies in patients with single ventricle

physiology. *Methodist Debakey*

Cardiovascular Journal. 2014;10(2):77-81.

- ⑤ 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 α 1-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111(10):3811-6.
- ⑥ 樽井俊、王 英正、佐野俊二 先天性心疾患外科手術における再生医療 循環器内科 75(1): 87-93, 2014
2. 学会発表
- ① 王 英正 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 第 34 回日本小児病理研究会 学術集会 (Sep. 6, 2014) 岡山
- ② 王 英正 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 岡山先端医学研究会 (2014.9.26) 岡山
- ③ 王 英正 臨床試験における具体的な評価指標の定め方 技術情報協会セミナー 東京 (2014.10.7)
- ④ 王 英正 心臓内幹細胞を用いた小児心疾患の解明と再生医療 高知小児循環器・川崎病研究会 (2014.12.4) 高知
- ⑤ 王 英正 先天性心疾患への再生医療の現状 抗加齢医学会総会 (6. Jun.2014) 大阪
- ⑥ 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 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 日本小児循環器学会 (3, Jul,2014) 岡山
- ⑦ 石神修大、樽井俊、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筋再生医療の第 1/2 相臨床研究 日本小児循環器学会 (3, Jul,2014) 岡山
- ⑧ 王 英正 小児心不全に対する心臓内幹細胞自家移植療法の第 I/II 相臨床研究 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 (Nov. 28, 2014) 岡山
- ⑨ 王 英正 心臓内幹細胞を用いた先天性心疾患の病態解明と再生医療 ミニリトリート 徳島 (Jan. 10, 2015)
- ⑩ Engineering bioartificial heart by human stem cells with three-dimensional extracellular matrix materials. Okuyama M, Ousaka D, Ishigami S, Kobayashi J, Sano S, Oh H. *International Society of Biomechanics* (May 14, 2014), Okayama
- ⑪ Unique epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with 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. *International Society of Stem Cell Research* (June17-21, 2014) Vancouver.
- ⑫ Engineering bioartificial heart by human stem cells using nature's three dimensional platform of rat heart. Okuyama M, Ousaka D, Ishigami S, Kobayashi J, Sano S, Oh H. *International Society of Stem Cell Research* (June17-21, 2014) Vancouver.
- ⑬ Intracoronary cardiac progenitor cell

- infusion in patients with single ventricular physiology: Interim results of phase I/II clinical trials. Ishigami S, Okuyama M, Tarui S, Ohtsuki S, Ousaka D, Eitoku T, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, Oh H. *International Society of Stem Cell Research* (June 17-21, 2014) Vancouver.
- ⑭ Epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with 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. *Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions* (July 14-17, 2014) Las Vegas.
- ⑮ Late gadolinium enhancement on cardiac MRI identifies ventricular dysfunction and regional myocardial dyssynchrony in patients with univentricular heart diseases. Okuyama M, Ishigami S, Ousaka D, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions* (July 14-17, 2014) Las Vegas.
- ⑯ Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in children with hypoplastic left heart syndrome: 2-year results of the TICAP trial. Ishigami S, Tarui S, Okuyama M, Ousaka D, Kobayashi J, Kasahara S, Sano S, Oh H. *Basic Cardiovascular Sciences 2014 Scientific Sessions* (July 14-17, 2014) Las Vegas.
- ⑰ Shuta Ishigami, Suguru Tarui, Michihiro Okuyama, Daiki Ousaka, Shinichi Ohtsuki, Takahiro Eitoku, Maiko Kondo, Junko Kobayashi, Kenji Baba, Sadahiko Arai, Takuya Kawabata, Ko Yoshizumi, Yosuke Kuroko, Tatsuo Iwasaki, Shuhei Sato, Shingo Kasahara, Shunji Sano, and Hidemasa Oh. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in children with hypoplastic left heart syndrome: 2-year results of the TICAP trial. *European Society of Cardiology YIA* (31. Aug, 2014) Barcelona.
- ⑱ Shuta Ishigami, Michihiro Okuyama, Daiki Ousaka, Junko Kobayashi, Shingo Kasahara, Shunji Sano, Hidemasa Oh Delayed enhancement cardiac MRI identifies ventricular dysfunction and impaired regional myocardial mechanics in univentricular heart diseases. *European Society of Cardiology* (31. Aug, 2014) Barcelona.
- ⑲ Michihiro Okuyama, Daiki Ousaka, Shuta Ishigami, Junko Kobayashi, Shunji Sano, Hidemasa Oh. Engineering bioartificial heart by human stem cells with perfusion-decellularized three-dimensional matrix materials. *European Society of Cardiology* (31. Aug, 2014) Barcelona.
- ⑳ Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh. Unique epigenetic and transcriptional regulation of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. *European Society of Cardiology YIA* (31. Aug, 2014) Barcelona.
- ㉑ Yoshida M, Tarui S, Kobayashi J, Tohru M, Nakamura Y, Maeshima S, Sano S, Ito H, Oh H. T-box5 controls age-dependent cardiac activity in human cardiac

progenitor cells through insulin-like growth factor-1 receptor signaling.

European Society of Cardiology (31. Aug, 2014) Barcelona.

- ②② Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. NKX2.5, HAND1, and NOTCH1 regulate the cardiac development of induced pluripotent stem cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 10th Japan-China-Korea Pediatric Heart Forum (4. Jul, 2014) Okayama
- ②③ Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. Epigenetic And Transcriptional Regulation Of Induced Pluripotent Stem Cells In Patients With Hypoplastic Left Heart Syndrome. *Best of American Heart Association Specialty Conference* (Nov. 15, 2014) Chicago
- ②④ S. Ishigami, S. Tarui, M. Okuyama, D. Ousaka, S. Ohtsuki, T. Eitoku, J. Kobayashi, S. Kasahara, S. Sano, None; H. Oh, Intracoronary Delivery of Autologous Cardiac Progenitor Cells in Children With Hypoplastic Left Heart Syndrome: The Ticap Trial With 18-Month Follow Up. *Cardiovascular Disease in the Young Outstanding Research Award. American Heart Association.* (Nov. 17, 2014). Chicago
- ②⑤ Michihiro Okuyama, Shuta Ishigami, Daiki Ousaka, Junko Kobayashi, Shingo Kasahara, Shunji Sano, Hidemasa Oh. Cardiac magnetic resonance late gadolinium enhancement is associated with ventricular elastance that may predict latent ventricular dysfunction after Fontan procedure. *American Heart Association.* (Nov. 17, 2014). Chicago
- ②⑥ Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Shuta Ishigami, Michihiro Okuyama, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh. Disease-specific induced pluripotent stem cells identify the transcriptional repression and epigenetic modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 during cardiac development of hypoplastic left heart syndrome. *American Heart Association.* (Nov. 17, 2014). Chicago
- ②⑦ Junko Kobayashi, Hidemasa Oh. Patient-specific induced pluripotent stem cells identify the transcriptional repression and epigenetic modification of NKX2-5, HAND1, and NOTCH1 during cardiac development of hypoplastic left heart syndrome Dong Wook Han Seminar (Jan 28, 2015) Okayama
- ②⑧ Shuta Ishigami, Hidemasa Oh Intracoronary delivery of autologous cardiac progenitor cells in children with hypoplastic left heart syndrome: The TICAP trial with 18-month follow up Dong Wook Han Seminar (Jan 28, 2015) Okayama
- ②⑨ 逢坂大樹、石神修大、奥山倫弘、小林純子、佐野俊二、王英正 心臓MRIの遅延造影を用いた幼児期単心室症患者における心筋線維化の検出と臨床的意義 日本小児循環器学会 (3.Jul.2014) 岡山
- ③⑩ 石神修大、樽井俊、奥山倫弘、逢坂大樹、大月審

- 一、栄徳隆裕、小林純子、笠原真悟、佐野俊二、
王 英正 機能的単心室症に対する心臓内幹細胞自家移植療法：第 I/II 相臨床試験の 2 年目長期成績 日本小児循環器学会 (3.Jul.2014) 岡山
- ③① 石神修大、樽井俊、後藤拓弥、奥山倫弘、逢坂大樹、小林純子、藤井泰宏、黒子洋介、川畑拓也、小谷泰弘、新井禎彦、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 I 相臨床試験 (TICAP trial) 18 カ月長期成績 優秀演題 日本胸部外科学会 (16. 2. 2015) 京都
- ③② 逢坂 大樹、石神 修大、奥山 倫弘、後藤 拓哉、大月 審一、笠原 真悟、佐野 俊二、王英正 心臓超音波検査による心臓内幹細胞自家移植療法に伴う心筋ストレイン変化の機能解析 日本心エコー図学会学術集会 北九州市 (27, 3, 2015)
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- ① Pluripotent stem cell derived from cardiac tissue
 CA2600653 カナダ特許 Hidemasa Oh (2014/9/9)
2. 実用新案登録
 該当なし。
3. その他
 該当なし。

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治験中である。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

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。

- ① 臨床症状：チアノーゼ症状、蛋白漏出性腸症。
- ② 房室弁逆流：心エコー図法、心室造影。
- ③ 心不全症状：BNP値。
- ④ 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。

⑤ 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。

プロトコル治療中止基準

- 1) 被験者が試験参加の同意を撤回した場合、あるいは試験継続の意思を表明できない意識障害や混迷状態に陥った場合。
- 2) 登録後に不適格症例であることが判明した場合。
- 3) 心臓幹細胞採取において以下の合併症にて遂行不能の場合。
 - ① 心臓組織採取不能例
 - ② 心タンポナーデ
 - ③ 心室性不整脈（散発性の心室性期外収縮は除く）
 - ④ 心原性ショック
- 4) 心臓幹細胞培養工程において、培養21日までに必要細胞数(3.0×10^6 /kg 個)に達しない場合。
- 5) 培養開始時、細胞凍結時、及び細胞解凍時のエンドトキシン、細菌、真菌、マイコプラズマ検査、細胞上清ウイルス検査で陽性の場合。なお細胞移植後に上記検査結果が陽性と判定された場合は、被験者にその旨説明し、支持療法として創感染に対処する。
- 6) 試験治療待機期間及び、試験治療後の観察期間中に何らかの侵襲的治療（補助循環装置、心室再同期療法、心臓移植等）が必要とされた場合（術後回復期間中の集中治療室における一過性ペースメーカー埋め込み、補助循環装置の使用は除く）。
- 7) 細胞移植治療中に致死的合併症（心室細動含む）が発生した場合。
- 8) 死亡した場合。
- 9) その他試験担当医師が被験者の安全性確保及び自己決定権尊重のためにプロトコル治療の中止を判断した場合。

支持療法

以下の予想される有害事象に対して、適切な治療を行う。

- 1) 採血部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 2) 採血後の貧血：鉄剤の投与。
- 3) 鼠径穿刺部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 4) 鼠径穿刺後の後腹膜腔血腫、腰部皮下血腫：必要な場合はドレナージ。
- 5) 術中の不整脈（心室細動を含まない）：抗不整脈薬の投与。
- 6) 術中、術後回復期間においての遷延性低血圧もしくは心原性ショック：
昇圧剤、強心剤の投与、補助循環装置の使用。
- 7) 創感染（縦隔炎含む）：菌同定・抗生物質の投与、無効な場合は病巣洗浄・搔爬。
- 8) 全身麻酔に関連した有害事象：
 - ①アナフィラキシーショック：ステロイド剤等の投与。
 - ②肝機能検査異常：肝庇護剤の投与。
 - ③腎機能検査異常：輸液による電解質補正、重篤な場合は透析。

後療法

プロトコル治療後は一般的に難治性重症心不全患者に実施する標準治療を行う。つまり担当医が最善と判断する治療、すなわちリハビリテーション並びに合併症の防止を行い、特に制限を設けない。

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。

予想される心臓手術に関する有害事象

- 1) 全身麻酔に関連する合併症
 - ① 極めて稀であるが、死亡等の重篤な有害事象の発生の可能性がある。
 - ② 肝機能異常：GOT、GPT、ALP、LDH上昇など。
 - ③ 腎機能異常：血清クレアチニン上昇など。
- 2) 心臓手術に関連する合併症
 - ① 脳血管障害：脳梗塞、脳出血など。
 - ② 術後心不全。
 - ③ 不整脈：心房細動、心室性不整脈など。
 - ④ 術後呼吸障害：術後無気肺、気胸、肺炎など。
 - ⑤ 肝機能異常：GOT、GPT、ALP、LDH上昇など。
 - ⑥ 腎機能異常：血清クレアチニン上昇、腎不全など。
 - ⑦ 出血：創出血、心タンポナーデなど。
 - ⑧ 感染症。
 - ⑨ 薬物アレルギー。
 - ⑩ 腸閉塞。
 - ⑪ 死亡。

(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 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。
- ④ 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。
- ⑤ 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。
- ⑥ 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。
- ⑦ 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。
- ⑧ 監査が行われる場合にすみやかに対応できるよう、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27年1月までに合計全34の適応症例に対し心臓手術の実施を終了した。平成26年度内に登録し、心臓手術し終えた全適応症例について、特記すべき外科的有害事象は認められなかった。

全登録症例の内訳として、左心低形成症候群が15症例（移植群：6例、非移植群8例）で、2期手術が8例（移植群：4例、非移植群：4例）、3期手術実施例が26症例（移植群：13例、非移植群：13例）であった。男児が占める割合は移植群で9例、非移植群で11例と差はなく、術前血中BNPの平均値もそれぞれ61.9 pg/mLと61.6 pg/mLと両群間で相違はなかった。

平成25年6月より登録開始後、適応基準を満たした全34の手術実施症例において、術後に遷延する心不全や致死性不整脈、重篤な肝機能障害や腎機能不全を併発した症例はなく、術後より開始となるプロトコル治療の前後を通じて、経過観察期間中におけるECMO装着症例や死亡症例も認められなかった。

D. 考察

登録された適応症例の全34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、従来の心臓手術実施症例に比べ、組織