

201409003A

厚生労働科学研究費補助金
(医療技術実用化総合研究事業(臨床研究・治験推進研究事業))
総括研究報告書

重症心不全を対象とする
脂肪組織由来多系統前駆細胞による
心筋再生細胞医薬品の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書
(平成27年3月)

研究代表者
大阪大学臨床医工学融合研究教育センター
招聘教授 松山晃文

目次

I. 総括研究報告書

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞の製造方法(対面助言資料)

研究代表者

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授 松山晃文

..... 3

II. 分担研究報告書

重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に関する評価指標

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授 松山晃文

..... 15

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞の製造工程で用いる

牛胎児血清の生物由来原料基準適合性について

近畿大学 薬学総合研究所 所長・特任教授

早川堯夫

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授

松山晃文

..... 23

脂肪組織由来多系統前駆細胞シートの有効性検証

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 特任准教授 宮川繁

..... 33

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 39

IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 47

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
総括研究報告書

スペルミン加培養脂肪組織由来多系統前駆細胞の製造方法(対面助言資料)

研究代表者

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授 松山晃文

研究分担者

大阪大学大学院医学系研究科 心臓血管外科 特任准教授 宮川繁

近畿大学 薬学総合研究所 所長・特任教授 早川堯夫

研究要旨

重篤な虚血性心疾患・心筋梗塞症例に選択される冠動脈バイパス術によっても、残存心筋細胞の枯渇により治療効果が得られない症例が存在する。そのため、枯渇した心筋細胞を再生する第2世代の再生医療が待たれていた。本年度は、重症心不全を対象疾患とし、冠動脈バイパス術 poor-responder に適用する経冠動脈的投与脂肪組織由来多系統前駆細胞を細胞医薬品として開発するため、薬事申請パッケージ化にむけて、対面助言資料を作成した。

A. 研究目的

重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に特化した評価指標はなく、研究開発に逡巡を与えるものだった。本研究により、開発者側から詳細な基準を提示することを目標とする。

B. 研究方法

本研究分担者である早川堯夫らが主体となった作成したいわゆる平成24年5指針をベースに、重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に関する評価指標に特化して詳細な基準を提示することとする。

(倫理面への配慮)

1. 非臨床試験（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。

2. 動物操作に当たっては、(独)医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行なう。

3. 臨床試研究の実施にあつては、計画書(プロトコール)に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 研究結果

第1 原材料及び製造関連物質

1 原材料となるヒト細胞・組織

(1) 起源及び由来、選択理由

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC)

ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞は、間葉系組織である脂肪組織に由来する細胞群である¹⁻⁶⁾。当該細胞群は、脂肪組織のコラーゲンにより構築された結合織に存在するものであって、脂肪幹細胞(脂肪前駆細胞)として Bjorntorp らにより見出された細胞集団の subpopulation である⁷⁾。これら Bjorntorp らにより見出された脂肪幹細胞(脂肪前駆細胞)は、脂肪細胞への分化能に加え骨芽細胞や軟骨細胞への分化能を有することから、脂肪組織由来幹細胞としても知られている。脂肪組織の実質部(脂肪細胞)ではなく間質に存在し、脂肪組織由来間質細胞(Adipose-tissue derived Stromal cells/ADSC/ASC)と呼ばれる細胞群もある⁸⁾。本申請において用いる細胞群は、有限増殖性である間葉系幹細胞の1つであるが、脂肪組織由来間質細胞(Adipose-tissue derived Stromal cells/ADSCs/ASCs)とは異なった分離法により採取された細胞集団であるため、脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)としてその採取法と特徴を記載する。

ADMPC の分離採取法

清潔下で採取したヒト皮下脂肪組織を洗浄し、コラーゲン分解酵素にて消化、それに遠心作業を加えると、脂肪細胞は比重が小さいため浮遊し、細胞群は細胞ペレットとして得られる。当該細胞ペレットには赤血球が混在していることから、Ficoll 比重遠心法により赤血球を除外した細胞集団を得る。これが Stromal Vascular Fraction (SVF) である。SVF には ADMPC のみならず、血管内皮細胞や前脂肪細胞、線維芽細胞といった間質細胞が多く含まれる。これら SVF を培養皿に播種し 24~48 時間培養を加えると、SVF 集団の細胞は、紡錘型あるいは扁平な細胞と、細胞凝集として付着する

(図 2-1)。当該培養皿を EDTA 溶液にて洗浄すると、球状の細胞は培養皿から解離するが、紡錘状あるいは扁平な細胞は培養皿に付着したままである。解離した細胞を ADMPC とし増殖に供する(図 2-2)。

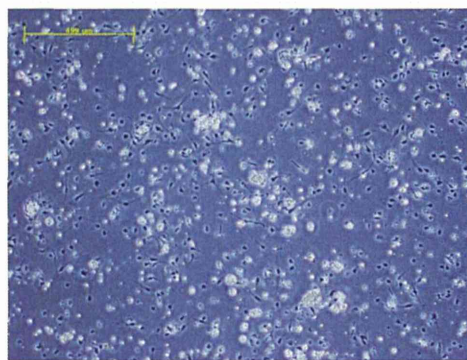


図 2-1 SVF 播種直後



図 2-2 ADMPC 播種直後

スペルミン加培養 ADMPC

スペルミン加培養 ADMPC は、継代培養した ADMPC をスペルミン添加条件で浮遊培養して得られる細胞であって、本細胞製剤が効能を發揮する本体にあたる。スペルミンは、生体も存在するポリアミンの 1 種であり、培地に添加することで細胞が増殖することから細胞増殖因子として知られ、マウス胚性幹細胞を心筋細胞へと分化誘導することも報告されている⁹⁾。スペルミン以外のポリアミンとしては、プトレッシンやスペルミジンがある。スペルミンは、納豆など多くの食物に存在する低分子であり、健常生体血中にも存在、その血中濃度は $5\mu\text{M}$ から $10\mu\text{M}$ とされる。生体ポリアミンは肝臓でアルギニンから合成される。ア

ルギニン¹⁰はアルギナーゼの作用でオルニチンになり、オルニチン・デカルボキシラーゼ (ODC) の働きでプトレッシンに変化する。さらに、プトレッシンはスペルミジンシンターゼによってスペルミジンに変換され、スペルミンシンターゼによってスペルミンが合成される。スペルミンは母乳にも多く含まれていることから、人工哺乳に用いる粉ミルクにも添加されている。

本申請者らは、スペルミン加培養は、ADMPCにおいて心筋前駆細胞マーカーであり心筋細胞への分化に必須である核内転写因子の *Islet-1* および *Nkx2.5* の発現を誘導増強させることを見出した¹⁰⁾。加えてスペルミンは、これら心筋誘導系核内転写因子の下流転写因子である *GATA-4*、心筋構成タンパクである *alpha-Cardiac Actin*、*Cardiac Troponin I* および *Myosin Heavy Chain (MHC)* の発現も増強させる (図 2-3)。

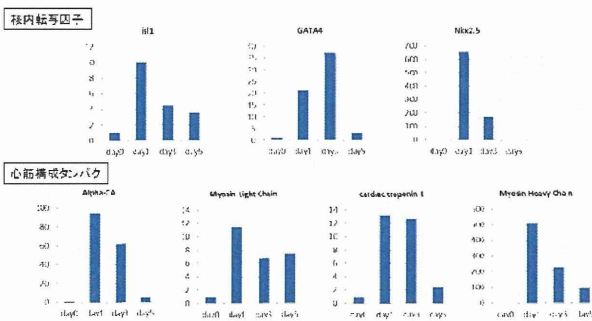


図 2-3 スペルミンによる ADMPC における心筋前駆細胞マーカー発現誘導

Islet-1 あるいは *nkx2.5* が細胞内に存在していることから、生体内の心筋前駆細胞と類似の細胞特性としての心筋指向性を有すると考えられる。心臓組織内の心筋前駆細胞は、周囲環境である心筋組織と協調することで心筋細胞へと分化していく。そこで、スペルミン加培養 ADMPC をヒト心筋細胞と共培養し、心筋細胞マーカー *nkx2.5* の発現が誘導・増強されるかを確認した (図 2-4)。

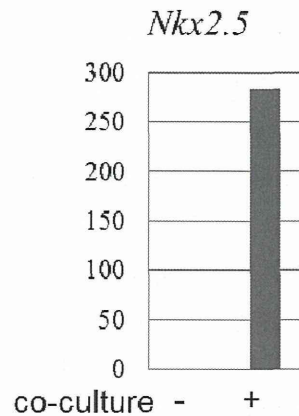


図 2-4 ヒト心筋細胞との共培養によるスペルミン加培養 ADMPC 心筋細胞マーカー誘導

スペルミン加培養 ADMPC の経冠動脈的投与後、ヒト特異的抗 *alpha-cardiac actin* 抗体やヒト特異的抗 *actinin* 抗体により染色される細胞が認められ、*alpha-cardiac actin* や *actinin* が横紋構造を示すことから、それら細胞は心筋内で心筋様細胞へと分化するという特性を有することが示される (図 2-5)。

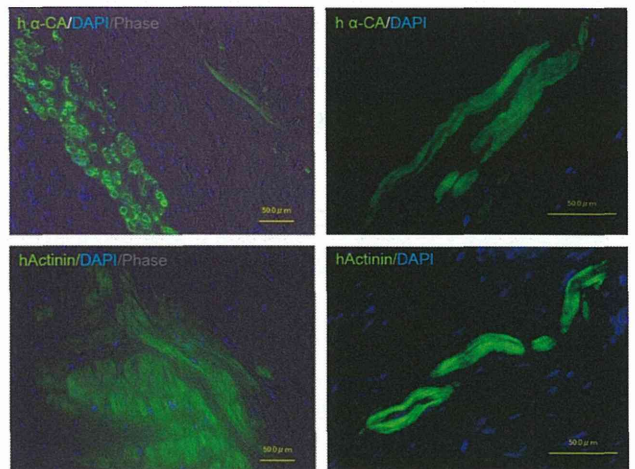


図2-5 スペルミン加培養ADMPC投与後ブタ心筋組織内におけるヒトalpha-cardiac actinおよびヒトactinin陽性細胞 (上anti-human cardiac actin 下anti-human actinin)

【選択理由】

これまでに、ヒト脂肪組織からは、さまざまな

間葉系幹細胞が見出され、その採取方法が報告されている¹¹⁾。1978年には、Bjorntropらが皮下脂肪に脂肪幹細胞 (preadipocyte) の存在を見出し、その単離培養法の確立に成功している⁷⁾。1999年には、脂肪組織もその範疇に入る間葉系組織に「間葉系幹細胞」が存在することが報告されている¹²⁾。2001年には、Zukらにより脂肪幹細胞が「間葉系幹細胞」としてのpotencyを有していることが報告され、脂肪組織由来間質細胞 (Adipose tissue derived stromal cells: ADSC/ASC) としてrenameされた⁸⁾。

Okuraらは、脂肪組織をコラゲナーゼ処理した後得られるstromal vascular fractionの中から、新規の間葉系幹細胞としてADSCsとは異なる細胞群(ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞; human Adipose tissue-derived Multi-lineage Progenitor Cells: hADMPC)の単離培養法を確立し、以後研究を進めてきた¹⁻⁶⁾。ADMPCは、従前報告されている各種間葉系幹細胞と同様に骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化能を有する¹⁾。のみならず、脂肪吸引により得られた皮下脂肪組織を原材料として、ADMPCを単離培養し、スペルミン加培養することで心筋前駆細胞マーカーを増加させ、ブタ慢性心筋梗塞モデル経冠動脈投与にて有用性を示しえた¹⁰⁾。

以上より、脂肪吸引により得られた皮下脂肪組織を、本品の原材料となる細胞・組織として選択することは合理的である。

(2) 原材料となる細胞・組織の特性と適格性

① 生物学的構造・機能の特徴と選択理由

【選択した原材料となる細胞・組織】

脂肪吸引の際に得られた余剰組織で、浅筋膜より浅層(皮膚側)の脂肪組織

【生物学的構造・機能の特徴】

脂肪組織は肉眼上黄～黄白色を呈しており、単

胞性の脂肪滴を内包した球形の成熟脂肪細胞が集合して脂肪組織小葉を形成している。小葉は豊富な膠原線維と毛細血管に富む被膜にて覆われている。皮下に存在し保温や機械的侵襲に対する防御機能を有する皮下脂肪組織と、消化管周囲に存在する内臓脂肪組織とに分けられる。本品の原材料となる細胞・組織としては皮下脂肪組織を選択した。

本品にて原材料となる細胞・組織として選択した皮下組織は、肉眼的には脂肪小葉と筋膜とで構成され、基本的には浅筋膜をはさんで2層構造をしている。浅層はPAFS; Protective Adipofascial System (防御性脂肪筋膜系)、深層はLAFS; Lubricant Adipofascial System (潤滑性脂肪筋膜系)と呼ばれている¹²⁾。本品に用いる脂肪組織は、脂肪吸引の際に得られた余剰組織で、浅筋膜より浅層(皮膚側)の脂肪組織である。

【適格性】

倫理的適格性:

脂肪組織は脂肪吸引など形成外科手術の際の余剰組織として採取することは容易であり、侵襲も少なく局所麻酔下で採取可能である。採取後の疼痛も極めて少なく、脂肪組織吸引後のドナーサイトの変形・欠損も少なく行なえる。ドナーに対して原材料となる細胞・組織の採取を目的としての侵襲を与える必要はなく、かつ廃棄物として処理される余剰組織であるため、法的倫理的問題はなく、本品の原材料となる細胞・組織として選択することは適格である。

② ドナーの選択基準、適格性

性別、免疫適合性、年齢、遺伝的特徴、病歴、健康状態、採取細胞・組織を介して感染する可能性がある各種感染症に関する検査項目、を考慮し、下記表に記載のとおり選択基準を定め、その妥当性を示した。選択基準に実効性を持たせるための問診表をとりまとめ、採血によるドナースクリー

ニングを提示した。

なお、人細胞組織製品原料基準への適合性については対面助言にて適合を確認した。

(3) ドナーに関する記録

原材料となる細胞・組織について、安全性を確保するために必要な情報が確認できるよう、ドナー由来検体については、説明同意取得者が記載した症例登録票を、製造責任者が保管する。

試験的検体のドナーにあつては、同意の取得と連結不可能匿名化を前提として基礎的検討の実施を承認されている。ただし、同意書は試験検体ドナーの診療録に保存される。検体（皮下脂肪組織）採取機関より提供をうける試験検体ドナーに関する情報は、使用目的が臨床的使用でないため、検体提供年月日、性別、年齢層（20歳代、30歳代、40歳代、50歳代、60歳代）、HBV、HCV、HIV-1、2、HTLV-1、HPV検査が陰性である旨、のみである。

(4) 細胞・組織の採取・保存・運搬

細胞・組織の採取・保存・運搬にかかる指針（平成24年薬食発0907第3号別添）適合性についても、対面助言にて適合性を確認した。

製造方法

第1 原材料及び製造関連物質

1 目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質

製造工程における下記各々の工程で使用する目的とする細胞・組織以外の原材料及び製造関連物質について記載する。なお、フィーダー細胞を製造工程で用いず、非細胞成分と組み合わせず、細胞に遺伝子工学的改変を加えないため、指針第2章の2の(1)④、(2)および(3)は非該当である。

指針適合性

指針の内容	対応状況
-------	------

<p>(1) 受入検査 原材料となる細胞・組織について、細胞・組織の種類や使用目的に応じて実施する受入のための試験検査の項目(例えば、目視検査、顕微鏡検査、採取収率、生存率、細胞・組織の特性解析及び微生物試験等)と各項目の判定基準を設定すること。</p>	<p>受入のための試験検査を実施する。</p>
<p>(2) 細菌、真菌及びウイルス等の不活化・除去 原材料となる細胞・組織について、その細胞生存率や表現型、遺伝形質及び特有の機能その他の特性及び品質に影響を及ぼさない範囲で、必要かつ可能な場合は細菌、真菌及びウイルス等を不活化又は除去する処理を行うこと。当該処理に関する方策と評価方法について明らかにすること。</p>	<p>脂肪組織の採取は院内手術室にて実施されるが、完全無菌ではないため、P3までの拡大培養では、抗生剤を培養液に添加している。</p>
<p>(3) 組織の細切、細胞の分離、特定細胞の単離等 原材料となる細胞・組織から製品を製造する初期の過程で行われる組織の細切、細胞の分離、体性幹細胞の</p>	<p>「SVF (Stromal Vascular Fraction) 分離播種工程」に記載。</p>

<p>単離及びそれらの洗浄等の方法を明らかにすること。体性幹細胞の単離を行う場合には、その確認方法を設定すること。</p>	
<p>(4) 最終製品の構成要素となる細胞の作製 ヒト細胞・組織の採取から体性幹細胞の単離を経て、最終製品の構成要素となる細胞を取得するまでの方法（分化誘導方法、目的とする細胞の分離・培養の方法、培養の各段階での培地、培養条件、培養期間及び収率等）を明確にし、可能な範囲でその妥当性を明らかにすること。</p>	<p>「製造方法の概略のフローチャート」および「製造工程の詳細なフローチャート」に記載。</p>
<p>(5) 細胞株の樹立と使用</p>	<p>非該当</p>
<p>(6) 細胞のバンク化</p>	<p>非該当</p>
<p>(7) 製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーション防止対策 ヒト体性幹細胞加工医薬品等の製造にあたっては、製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーションの防止が重要であり、工程管理における防止対策を明らかにすること。</p>	<p>製造工程中の取り違い及びクロスコンタミネーションを防止するため、本細胞製剤の製造工程では1ドナーごと取り扱うこととしている。</p>

2 最終製品の構成要素となる細胞の特性解析

最終製品の構成要素となる細胞について、出荷判定試験にて細胞の特性解析を行っておる。また、当該細胞が脂肪組織由来の間葉系幹細胞であることを示すため、工程内管理試験9にて脂肪細胞分化確認試験を行うこととしている。

3 最終製品の形態、包装

最終製品は、スペルミン加培養ADMPCをSTEM VELLBANKERに懸濁し、フローズバッグにて包装、凍結保存されたものである。密封状態で包装、凍結保管可能であり、品質は確保される。

4 製品の保存及び運搬

本細胞製剤の製造工程で、中間製品（重要中間体）であるP3 ADMPCおよび最終製品を凍結保存することとしている。また、最終製品は凍結細胞製剤として出荷される。

製造工程中の凍結保存期間や加工に伴う細胞培養の期間が長期に及ぶ場合には一定期間ごとに無菌試験を行うなど、無菌性が確保されることを確認する必要がある。生物由来原料基準適合後の製造工程で3ロットの試験製造を開始しており、それらを長期保存し、3ヶ月ごとに解凍して無菌および生存率を検定することとし、検討中である。

5 製造方法の変更

開発途中に製造方法を変更した場合、変更前の製造方法による製品を用いて得た試験成績を治験開始時又は承認申請に使用するときは、製造方法変更前後の製品の同等性／同質性を示すこと。非臨床試験の一部で、生物由来原料基準適合のために製造方法（使用試薬）の変更を行って製造したものを利用している。個別の非臨床試験で、それらを議論することとする。

D. 考察

生物由来原料基準適合性の確認に加え、製造工程の頑健性とその恒常性は、治験のみならず、製造販売承認後にも重要な課題である。本研究で、原材料としての脂肪組織の有用性が再認識された。今後は、verification による検証を進めるべきであろう。

E. 結論

本研究をもとに、薬事戦略相談対面助言戦確 P31 を実施した。品質に関しては概ね治験開始可能水準となった。今後、すみやかな治験届提出にすすみたい。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- A) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human somatic stem cells, *Regenerative Therapy 1*, in press
- B) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human somatic stem cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- C) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human induced pluripotent stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- D) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human induced pluripotent stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- E) Hayakawa T, Aoi T, Umezaw A, Ozaw K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of human embryonic stem (-like) cells. *Regenerative Therapy 1*, in press
- F) Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, **Matsuyama A**, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. *Biologicals*. 2014 Dec 16.
- G) Okura H, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, **Matsuyama A**. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Dec 6
- H) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, **Matsuyama A**, Hayakawa T. Role of notch signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev*. 2014 Sep 15;23(18):2211-24.
- I) Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, **Matsuyama A**, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration*, 2014, in press
- J) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, **Matsuyama A**, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2014 Jun;134(6):1627-35. doi: 10.1038/jid.2014.11. Epub 2014 Jan 8.

- K) 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
- L) 大倉華雪・**松山晃文** 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
- M) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療の開発および規制の歴史」再生医療規制の動向と製品開発および産業化の注意点. 情報機構 (印刷中)
- N) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療にかかる規制の現状」日本臨床 (印刷中)
- O) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療製品の品質管理と規制への対応」再生医療事業の課題解決のための手引書. 技術情報協会 (印刷中)

2. 学会発表

【松山晃文】

1. 「ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理」(招待講演) NPO バイオチップコンソーシアム事務局・2014/4/22
2. 「再生医療からみた規制政策・知財戦略」(独) 医薬基盤研究所・2014/06/06
3. 「再生医療とレギュレーション」(招待講演) 神戸ポートアイランド創薬フォーラム・2014/6/16
4. 「先進医療 B とトランスレーショナルリサーチの実際」東京大学 CRC 講習会 2014/06/26
5. 「創薬支援に向けたヒト由来試料の位置付けについて」厚労科研 (創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究) 班会議・2014/07/09
6. 「再生医療のこれから」島津製作所内部セミナー・2014/07/25
7. 「再生医療のビジネスモデル」(招待講演) ヒューマンサイエンス振興財団・2014/7/22
8. 「再生医療とレギュラトリーサイエンス」(招待講演) 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会・2014/9/5
9. 「再生医療法の成立と薬事法の再生医療等製品区分の創設 その展望と課題—アカデミアの立場から—」(招待講演)・2014/9/6
10. 第 4 回学術大会シンポジウム 一般社団法人レギュラトリーサイエンス学会・2014/9/6
11. 「再生医療分野における法規制のフレームについて」(招待講演) 第 14 回 CRC と臨床試験のあり方を考える会議 2014 日本 SMO 協会・2014/10/4
12. 「再生医療と非臨床試験」(招待講演) 第 10 回霊長類医科学フォーラム 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター2014/11/12
13. 「ヒト由来の生物資源の知財等の環境について」ワークショップ、TKP 品川カンファレンスセンター・2014/11/17
14. 「再生医療のこれまでとこれから」(招待講演) 第 44 回日本医事法学会大会 日本医事法学会・2014/11/30
15. 「ヒト多能性幹細胞を用いる再生医療製品での品質管理 A Case Study」(招待講演) バイオリジクスフォーラム第 12 回学術集会・2014/12/12
16. 「再生医療における品質管理の考え方」(招待講演) 第 1 回再生医療産業化展セミナー・2015/2/4
17. 「創薬・再生医療と知財」(講義) 東京大学大学院教育学研究科・2015/2/14
18. 「再生医療 その規制と知財」(講義) 東京医科歯科大学セミナー・2015/2/24
19. 「再生医療 その規制と知財」(招待講演) 熊本大学平成 26 年度臨床研究センター/付属病院総合臨床研究部キックオフ合同シンポジウム

ウム・2015/3/6

20. 「iPS 細胞由来再生医療等製品の品質と安全性」(招待講演) 第 18 回バイオメディカル研究室・2015/3/17

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

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に関する評価指標

研究分担者

大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 招聘教授 松山晃文

研究要旨

平成 24 年 5 指針の非臨床試験 part はハイレベルなガイドラインとなっている。本評価指標では、経冠動脈手的に投与される再生医療等製品に特化し、循環動態評価のための安全性コアバッテリー評価に関し、詳細に書き込みを行った。本評価指標の提案により、経冠動脈手的に投与される再生医療等製品の研究開発の加速がもたらされる。

A. 研究目的

重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に特化した評価指標はなく、研究開発に逡巡を与えるものだった。本研究により、開発者側から詳細な基準を提示することを目標とする。

B. 研究方法

本研究分担者である早川堯夫らが主体となった作成したいわゆる平成 24 年 5 指針をベースに、重症心不全を適応症とする経冠動脈的投与再生医療等製品に関する評価指標に特化して詳細な基準を提示することとする。

（倫理面への配慮）

1. 非臨床試験（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。

2. 動物操作に当たっては、（独）医薬基盤研究所の動物実験規定に従って行なう。
3. 臨床試験の実施にあつては、計画書（プロトコール）に関して医学倫理委員会での承認を受け、本人の書面による informed consent を取得した患者のみを対象とする。

C. 研究結果

1. はじめに

ヒト由来細胞・組織を加工した再生医療等製品（以下「再生医療等製品」という。）の品質及び安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成24年9月7日付け薬食発0907第2~6号厚生労働省医薬食品局長通知に定められているところである。

本評価指標は、ヒト由来再生医療等製品

のうち特に重症心不全等の治療を目的として心臓に適用されるものであって経冠動脈的に投与する細胞懸濁製品について、上述の基本的な技術要件のうち当該製品に特有の留意すべき事項を示すものである。

2. 本評価指標の対象

本評価指標は、重症心不全治療を目的として適用される再生医療等製品のうち、特に経冠動脈的に投与する細胞懸濁製品について、基本的な技術要件に加えて品質、有効性及び安全性の評価にあたって留意すべき事項を示したものである。重症心不全とは、一般にNYHA 分類でⅢ度以上のものをいうが、製品の適応疾患については、単に重症心不全とするのではなく、例えば、NYHA 分類でⅢ 度以上、左室駆出率(LVEF) 40%未満、内科的には治療手段がない等、既存の治療方法も考慮し、適切かつ具体的な基準を設定すること。

3. 本評価指標の位置づけ

本評価指標は、技術開発の著しいヒト由来再生医療等製品を対象とするものであることを勘案し、留意すべき事項を網羅的に示したものではなく、現時点で考えられる点について示している。よって、今後の更なる技術革新や知見の集積等を踏まえ改訂されるものであり、申請内容に関して拘束力を有するものではない。

製品の評価にあたっては、個別の製品の特性を十分理解した上で、科学的な合理性をもって柔軟に対応することが必要である。なお、本評価指標の他、国内外のその他の関連ガイドラインを参考にすることも考慮すべきである。

4 . 用語の定義

本評価指標における用語の定義は平成24年9月7日付け薬食発0907第2~6号厚生労働省医薬食品局長通知の定義による他、以下のとおりとする。

(1) 心不全：心臓自体の障害により心臓のポンプ機能が低下した結果生じる循環不全であって、組織・臓器が必要とする酸素や血液を十分に供給できな

くなった状態をいう。心不全の重症度の評価方法としてはNYHA 分類等臨床症状による方法や血清学的検討、ないし心筋運動の画像的評価等による方法等が考えられる。

(2) 細胞懸濁液：目的細胞を細胞基液に懸濁させたものをいう。

(3) 細胞基液：目的細胞を懸濁するためのものをいう。

5 . 評価に当たって留意すべき事項

(1) 製品の品質管理

細胞懸濁液の品質管理における留意点として、例えば以下に挙げた事項が考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。なお、各試験項目の設定根拠及び試験方法の妥当性については説明する必要がある。

① 形状について

必要な細胞の分散性、凝集性等の適切な項目を製品の特性に応じて設定すること。

② 細胞濃度について

細胞濃度等について規格を設定すること。特に、経冠動脈的投与においては、微小塞栓症状のリスクがあることから、細胞濃度の一貫性は重要である。

③ 構成細胞及び細胞の分化度について

構成細胞のポピュレーション分布の定量的規格を設定し、定量的PCR法あるいはフロ

一サイトメトリー法等により、それを確認すること。また、細胞特異的マーカーに対する定量的PCRあるいは抗体等を用いて目的細胞の分化状態を確認し、可能であれば製品に必要とされる細胞特性についても規格を設定すること。細胞から産生される因子等が有効性に寄与する可能性が想定される場合には、産生量と臨床試験効果との相関性に関する情報を収集すること。

④ 細胞懸濁液の運搬について

細胞懸濁液を運搬する場合には、運搬容器及び運搬手順（温度管理等を含む。）等を定め、容器内の環境等が適切に管理され、製品の品質、有効性及び安全性が確保されることを示すこと。

⑤ 細胞懸濁液の投与について

経冠動脈的投与により細胞懸濁液を投与する場合、臨床利用と同一あるいは同等である投与機器を用い、投与機器通過前と通過後の生存率および純度に関して、あらかじめ評価しなければならない。

（2）非臨床試験

動物に細胞懸濁液を経冠動脈的に適用して安全性及び有効性を評価する際には、対象疾患を考慮して健常動物あるいは疾患モデル動物を利用すること。

疾患モデル動物作製方法の例として、冠動脈結紮、血管閉塞あるいはクライオ傷害法による心筋梗塞モデル又はoverdriving法ないしは薬剤による拡張型心筋症モデル等が挙げられるが、用いた動物モデルについては、その選択の根拠をMOAから議論し、試験系の妥当性及び得られた結果のヒトへの外挿性について説明する必要がある。なお、安全性の評価については、細胞懸濁液投与で懸念される事項である微小塞栓症とそれに続く心筋梗塞について安全性およびその

回復について評価する必要があることから、心筋の状態が健常である動物を利用することが合理的である。ただし、疾患モデル動物を用いることがより合意理的であると議論される場合には、この限りではない。

安全性および有効性の評価のために、細胞懸濁液を適用した群、細胞基液を適用した対照群、さらに必要であればsham オペ群を用いた比較試験を実施すること。評価期間についても、その設定根拠について説明すること。投与した細胞懸濁製品とそれによってもたらされる効能について、細胞懸濁液に含まれる細胞の心筋組織内における局在性を確認するなど経時的に評価し、その関連性について考察すること。また、動物試験は投与機器に関する試験の意味合いも含んでいることから、動物への適用は、可能な限り臨床での投与機器で行うことが望ましい。評価項目としては、例えば以下を検討することが考えられるが、必要かつ適切であれば別の試験項目の採用又は追加を検討すること。

① 形態学的評価

細胞懸濁製品を適用した部位の組織学的検討を行い、適用部位及び周辺組織の状態を評価すること。例えば、適用部位における投与細胞の生着あるいは生着分化、適用心筋内の線維変性及び炎症細胞の浸潤の有無、心筋組織の変化（形状、厚み、細胞数、あるいは分化状態など）の検討を行うことも考えられる。

② 催不整脈性の評価

催不整脈性に関しては、普遍的に受容されたモデル動物は確立されていないため、（イヌまたはブタなど健常中大動物あるいは対象疾患等を考慮して作成した疾患モデル中大動物を用いて評価すること。

例えば、細胞懸濁製品の適用前後における、各群の長時間の心電図記録をホルター心電図等を用いて比較し、不整脈の有無と重症度について検討すること等が考えられる。ヒト心臓とイヌあるいはブタの心臓の解剖学的位置を勘案し、不整脈を評価するためにもっとも適切な誘導での心電図情報の収集がなされること。不整脈にかかる重症度分類に関しては、ヒト不整脈の評価に一般的に用いられている手法を援用することにより。

③ 血清学的評価

一般的に利用されているマーカー因子を用いて、腎機能、肝機能、急性心筋障害、慢性心筋障害等について評価すること。当該血清学的評価指標は、非臨床試験から臨床試験へ外挿性を有するものであるべきである。なお、細胞懸濁製品の経冠動脈的投与でもっとも議論される微小塞栓による梗塞発症を評価するため、製品投与以外の非臨床試験における介入がbaselineに影響を与えないかを議論し、与える可能性の少ない指標を選択して議論を進める必要がある。

④ 心機能、血流評価

心機能に関しては、心臓超音波検査や造影MRI等によって壁局所を含む収縮能ないしは拡張能を評価する必要がある。その他要すれば左室内腔短縮率、左室壁運動等の評価を検討すること。また、血行再建が作用態様である場合、目的とする疾患、効能及び効果に応じて細胞懸濁製品適用後における血流を評価すること。評価法としては、例えばFDG-PETによる検討、あるいは心臓超音波検査等が考えられる。また、当該有効性が持続する期間についても検討すること。

⑤ 細胞懸濁液の使用法、使用量等に関する評価

梗塞・拡張等の部位・面積等に対し、適切な細胞投与用量等を検討すること。

(3) 臨床試験（治験）

治験実施計画書（安全性及び有効性の評価項目を含む。）は、対象疾患、目的とする効能及び効果、当該治療法に期待される臨床上的位置付け等を明確にした上で、それらに応じた評価項目を設定し、非臨床データ等も踏まえて適切に計画されるべきである。

重症心不全患者は重篤であって、placebo controlを置いたdouble blind試験が、倫理的に許容的ない場合がある。その際には、生物統計的手法を用いて適切な α 値および β 値が設定され望ましい症例数が算定できるなら、同一症例の前後比較を評価指標としたsingle arm試験で実施されることを妨げない。

有効性の評価にあっては、投与局所を含む心筋壁運動の改善を指標とするばあいが想定されるが、壁運動が改善されなくとも心不全が改善されている場合がある。

心不全とは、心機能の異常によって末梢臓器組織の需要に応じた血液の供給ができない、あるいは臓器間での血液分布の不均衡が生じた結果生じる「臨床症候群」と定義される疾患であり、高拍出型心不全も臨床的に認められるように、心壁運動が改善されていないからといって一概に有効性の否定はできない。そのため、有効性にかかるend-pointに関しては、ケースバイケースであることを念頭に、事前に相談されることを推奨する。

安全性の評価にあっては、特に被験者の心筋と適用した細胞懸濁液の細胞の間での不適切な電氣的結合等の原因により、致死的不整脈が誘発される可能性が否定できな

いことから、細胞懸濁液製品の適用前後の適切な時期に継続的に心電図等の不整脈に関する電気生理学的検査等を実施すること。検査方法としては、標準12誘導心電図、ホルター心電図、加算平均心電図、T波交互脈 (T wave alternans) などがある。また、必要に応じて抗不整脈薬の投与または植込み型除細動器の挿入等の緊急時の対応についても検討すること。また、用いる細胞によっては腫瘍または異所性組織分化の有無を確認すべき場合もあるため、必要に応じて、細胞懸濁液製品の適用後に定期的に検査等（例えばCT検査等）を実施することを検討すること。

D. 考察

平成24年5指針は、特に非臨床試験 part がハイレベルなガイドラインとなっており、開発者側も規制側も審査に頭を悩ませていた。本評価指標では、一般安全性（毒性）試験に加え、循環動態評価のための安全性コアバッテリー評価に関し、詳細に書き込みを行うことができた。

E. 結論

本評価指標の提案により、経冠動脈手的に投与される再生医療等製品の研究開発の加速がもたらされる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

A) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals

- and medical devices derived from processing of autologous human somatic stem cells, Regenerative Therapy 1, in press
- B) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human somatic stem cells. Regenerative Therapy 1, in press
- C) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of autologous human induced pluripotent stem (-like) cells. Regenerative Therapy 1, in press
- D) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of allogenic human induced pluripotent stem (-like) cells. Regenerative Therapy 1, in press
- E) Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Yoji Sato, Sawa Y, **Matsuyama A**, Yamanaka S, Yamato M. Study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from processing of human embryonic stem (-like) cells. Regenerative Therapy 1, in press
- F) Kono K, Takada N, Yasuda S, Sawada R, Niimi S, **Matsuyama A**, Sato Y. Characterization of the cell growth analysis for detection of immortal cellular impurities in human mesenchymal stem cells. Biologicals. 2014 Dec 16.
- G) Okura H, Soeda M, Morita M, Fujita M, Naba K, Ito C, Ichinose A, **Matsuyama A**. Therapeutic potential of human adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells in liver fibrosis. Biochem Biophys Res Commun. 2014 Dec 6
- H) Moriyama H, Moriyama M, Isshi H, Ishihara S, Okura H, Ichinose A, Ozawa T, **Matsuyama A**, Hayakawa T. Role of notch

signaling in the maintenance of human mesenchymal stem cells under hypoxic conditions. *Stem Cells Dev.* 2014 Sep 15;23(18):2211-24.

- I) Ozasa M, Sawada K, Iwayama T, Yamamoto S, Morimoto C, Okura H, **Matsuyama A**, Komoda H, Lee CM, Sawa Y, Kitamura M, Hashikawa T, Takedachi M and Murakami S. Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cells. *Inflammation and Regeneration*, 2014, in press
- J) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, **Matsuyama A**, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2014 Jun;134(6):1627-35. doi: 10.1038/jid.2014.11. Epub 2014 Jan 8.
- K) 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
- L) 大倉華雪・**松山晃文** 細胞医療での申請にあたっての注意点—品質の観点から— 先進医療 NAVIGATOR II 再生医療・がん領域の実用化への TOPICS 2014. pp5-8
- M) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療の開発および規制の歴史」再生医療規制の動向と製品開発および産業化の注意点. 情報機構 (印刷中)
- N) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療にかかる規制の現状」日本臨床 (印刷中)
- O) 大倉華雪 **松山晃文** :「再生医療製品の品質管理と規制への対応」再生医療事業の課題解決のための手引書. 技術情報協会 (印刷中)
1. 「ヒト ES/iPS 細胞由来細胞製剤の品質管理」(招待講演) NPO バイオチップコンソーシアム事務局・2014/4/22
 2. 「再生医療からみた規制政策・知財戦略」(独) 医薬基盤研究所・2014/06/06
 3. 「再生医療とレギュレーション」(招待講演) 神戸ポートアイランド創薬フォーラム・2014/6/16
 4. 「先進医療 B とトランスレーショナルリサーチの実際」東京大学 CRC 講習会 2014/06/26
 5. 「創薬支援に向けたヒト由来試料の位置付けについて」厚労科研 (創薬支援のためのバイオリソースデータベースのネットワーク整備と政策・倫理課題に関する研究) 班会議・2014/07/09
 6. 「再生医療のこれから」島津製作所内部セミナー・2014/07/25
 7. 「再生医療のビジネスモデル」(招待講演) ヒューマンサイエンス振興財団・2014/7/22
 8. 「再生医療とレギュラトリーサイエンス」(招待講演) 第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会・2014/9/5
 9. 「再生医療法の成立と薬事法の再生医療等製品区分の創設 その展望と課題—アカデミアの立場から—」(招待講演)・2014/9/6
 10. 第 4 回学術大会シンポジウム 一般社団法人レギュラトリーサイエンス学会・2014/9/6
 11. 「再生医療分野における法規制のフレームについて」(招待講演) 第 14 回 CRC と臨床試験のあり方を考える会議 2014 日本 SMO 協会・2014/10/4
 12. 「再生医療と非臨床試験」(招待講演) 第 10 回霊長類医科学フォーラム 医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター2014/11/12
 13. 「ヒト由来の生物資源の知財等の環境について」ワークショップ、TKP 品川カンファレンスセンター・2014/11/17
 14. 「再生医療のこれまでとこれから」(招待講演)

2. 学会発表

【**松山晃文**】

第 44 回日本医事法学会大会 日本医事法学会・2014/11/30

15. 「ヒト多能性幹細胞を用いる再生医療製品での品質管理 A Case Study」(招待講演)バイオロジクスフォーラム第 12 回学術集会・2014/12/12
16. 「再生医療における品質管理の考え方」(招待講演) 第 1 回再生医療産業化展セミナー・2015/2/4
17. 「創薬・再生医療と知財」(講義) 東京大学大学院教育学研究科・2015/2/14
18. 「再生医療 その規制と知財」(講義) 東京医科歯科大学セミナー・2015/2/24
19. 「再生医療 その規制と知財」(招待講演) 熊本大学平成 26 年度臨床研究センター/附属病院総合臨床研究部キックオフ合同シンポジウム・2015/3/6
20. 「iPS 細胞由来再生医療等製品の品質と安全性」(招待講演) 第 18 回バイオメディカル研究室・2015/3/17

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