20140924A

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）

研究課題名：生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

平成 26 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　坂田　隆造

平成 27（2015）年 5 月

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）

研究課題名：生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

平成 26 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　坂田　隆造

平成 27（2015）年 5 月

目　次

平成２６年度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）
研究課題名：生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討（H23-臨研推-一般-006）

I. 総括研究報告 ---------- 1

・総括研究報告 ---------- 2
研究代表者　京都大学大学院医学研究科　坂田　隆造
研究分担者　天理よろづ相談所病院　心臓血管外科　丸井　晃

・平成 26 年度　坂田班　班会議開催状況報告 ---------- 9

・先進医療に係る定期・総括報告書 ---------- 10

II. 分担研究報告 ---------- 17

・分担研究報告 1 ---------- 18
研究分担者　京都大学再生医科学研究所　田畑　泰彦

・分担研究報告 2 ---------- 21
研究分担者　京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター　清水　章

・分担研究報告 3 ---------- 23
研究分担者　京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター　横出　正之

・分担研究報告 4 ---------- 26
研究分担者　京都大学大学院医学研究科　森田　智視

・分担研究報告 5 ---------- 27
研究分担者　京都大学医学部附属病院　松原　和夫

III. 研究成果の刊行に関する一覧 ---------- 30

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ---------- 34

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

生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

所　属　　京都大学大学院医学研究科
心臓血管外科
研究代表者　　坂田　隆造
研究分担者　　丸井　晃

近年、従来の方法では治療困難な重症下肢虚血や虚血性心疾患の患者が増加しており、遺伝子治療や細胞移植治療などの「血管新生療法」試みられているが遺伝材料の安全性・複雑な手技・高コスト等の課題が指摘されている。

我々は遺伝子や細胞の代わりに、安全かつ細胞増殖因子を必要十分に作用できる「ゼラチンハイドロゲル」を開発した。この最大の利点はゼラチンハイドロゲルが生体吸収性であり臨床における安全性が期待できる点にある。また様々な細胞増殖因子を組み合わせて効果的な徐放投与が可能であり、遺伝子治療・細胞移植治療と比べて手技が非常に簡便・低コストであることも特徴である。我々は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放化ゼラチンハイドロゲルの有効性を多くの基礎研究で検証し、臨床治験に向けた治験薬 GMP 基準での製剤施設を立ち上げ、平成 22 年 6 月には「生体内吸収性高分子担体と bFGF による血管新生療法」が第三項先進医療（現先進医療 B）の承認を受け、臨床試験を開始した。平成 24 年 3 月に目標の 10 症例の登録を完了し、同年 8 月に全例の 24 週の観察を終了した。結果として治療に関連する明らかな有害事象はなく、主要エンドポイントの下肢の経皮的酸素飽和度(TcO_2)の有意な改善を認めた。平成 25 年 3 月には「先進医療に係る定時・総括報告書（別項）」の提出を完了した。平成 25 年 11 月には PMDA 薬事戦略相談事前面談を行い、今後の治験における方向性として下肢切断率に代わる TcO_2 の妥当性の検証が必要とされ、今年度はその検証を行った。また当該技術の重症虚血性心疾患における応用では、平成 24-26 年度で大動物での安全性・有効性の検証を完了し、現在臨床研究のプロトコル作成中であり、今年度中の開始にむけて準備を進めている。

この技術が薬事承認・保険診療化されれば、臨床応用された世界初の血管新生療法となり、重症下肢虚血患者の救済のみならず、世界初の血管新生製剤販売による医療産業の育成、少ない医療費で患者予後が改善する医療経済効果、また心臓における応用により、ドナー不足が深刻な重症末期心不全患者に対する置換型医療の代替医療としての可能性が期待できる。

本研究は①重症下肢虚血に対する先進医療 B の遂行および発展、②先進医療当該技術の虚血性心疾患への応用、を計画している。研究開始当初は基礎研究として、①複数の増殖因子の計画的徐放による効果的な血管新生を行う「カクテル治療」、②当技術により細胞移植治療の効率を高める「ハイブリッド治療」、さらにこれらを組み合わせ、③各患者に応じて最適な有効性と同時に副作用を回避する「オーダーメイド治療」の基礎的検討を行う計画であったが、該当技術の臨床応用のための前臨床研究以外の基礎的研究は当科学研究費の趣旨に合致しないことを平成 24 年度に指摘されたため、平成 25 年度以降は当研究費による前臨床研究以外の基礎的検討は行なっていない。

今年度は臨床研究①②および②における前臨床研究について報告する。

【臨床研究①】
先進医療 B「生体内吸収高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」

この研究は、従来の治療法では近い将来に下肢切断となる可能性が高い下肢末梢性血管疾患

（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）患者に対して、塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor : bFGF）徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒の安全性･有効性を検証し、将来的な臨床応用を目的として開始した。

平成25年11月にはPMDA薬事戦略相談事前面談を行い、今後の治験における下肢切断率に代わるTcO_2の妥当性の検証が必要とされた。そこで今年度はこの研究の成果を学術誌に報告するとともに(Kumagai M, et al. Heart and Vessels, in press)、今後の治験に向けてTcO_2の主要エンドポイントとしての妥当性を臨床研究総合センターと共同で検証した。

A. 研究目的

下肢切断回避率の代替指標（サロゲートマーカー)としてのTcO2の妥当性を検証すること。

B. 研究方法

重症下肢虚血患者において、虚血の重症度とTcO_2との相関に関する約200本の文献から、解析可能なデータを含む文献を対象とした。カットオフ値20 mmHgに関しては13文献、カットオフ値30、40 mmHgに関しては12文献が対象となった。統計解析はdiagnostic odds ratio(DOR)に対するDerSimonian and Laird (1986)法によるメタアナリシスを行った。

C. 研究結果

統合された対数DORは、カットオフ値20、30、40それぞれに対し、1.61 (95%CI: 0.73-2.49)、2.07 (95%CI: 1.17-2.97)、1.67 (95%CI: 1.05-2.29)となり、カットオフ値30で一番高い値を示した。

D. 考察

海外における重症下肢虚血治療に関する治験の主要エンドポイントは、下肢切断率や死亡率などといったいわゆるハードエンドポイントを用いることが一般的となっている。一方、本邦における重症下肢虚血による下肢切断は、動脈硬化疾患の発生率・重症度の差・地域差・人種差・保険制度の違いなどの疫学的・経済的理由から、100万人に30人程度と海外の報告と比べ約10分の1程度と著しく低いと考えられている。したがって、本邦における重症下肢虚血治療に関する治験において、主要エンドポイントとして下肢切断回避率や死亡率を用いることはサンプルサイズ・イベント数などの点から非常に困難であると考えられる。

そのため平成25年のPMDA薬事戦略相談では、「下肢切断率の代替指標としてTcO_2の妥当性を証明できれば、治験における主要エンドポイントとすることは可能」との意見を頂いた。そこで、今回のメタアナリシスはTcO_2を主要エンドポイントとすることを目指し、その下肢切断率との相関性を補強することを目的として解析した。

今回のメタアナリシスではTime to eventの情報がないため、このデータのみでは下肢切断との相関性のエビデンスとするには弱いと思われるが、ガイドラインの補助的な位置づけで今回のデータを利用できると考えている。

E. 結論

TcO_2は下肢切断回避率の代替指標となり得る可能性が示され、今後の治験においてTcO_2を主要エンドポイントする妥当性の根拠となりえた。今後はさらにPMDAとの相談をすすめ薬事承認・保険診療化を目指した企業との折衝、医師主導治験・国際共同治験などの方向性を検討していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. Heart Vessels in press.

著書

なし

学会発表

1. 熊谷 基之, 丸井 晃, 田畑 泰彦, 武田 崇秀, 山本 雅哉, 池田 隆文, 川上 浩司, 横出 正之, 清水 章, 坂田 隆造. 重症下肢虚血治療の新たなオプションとしての生体材料DDSによる血管新生の可能性. 第44回日本心臓血管外科学会学術総会 2014.2.19-21 熊本市

2. 松尾 武彦, 升本 英利, 丸井 晃, 田島 脩平, 田畑 泰彦, 池田 義, 坂田 隆造, 山下潤. 心臓組織シート多層積層化におけるゼラチンハイドロゲル微粒子の有効性. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6 京都市
3. 熊谷 基之, 丸井 晃, 田畑 泰彦, 吉川 英治, 武田 崇秀, 山本 雅哉, 米澤 淳, 池田 隆文, 松原 和夫, 川上 浩司, 森田 智視, 横出 正之, 清水 章, 坂田 隆造. ゼラチンハイドロゲルを用いた bFGF 徐放投与による血管新生療法の可能性. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6 京都市
4. Kumagai M., Marui A., Tabata Y., Yoshikawa E., Shimizu A., Sakata R. Intramuscular injection of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia: a phase I/IIa clinical trial. The 22st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Istanbul, Turkey. April 3-6, 2014
5. 熊谷 基之, 丸井 晃, 田畑 泰彦, 吉川 英治, 山本 雅哉, 米澤 淳, 池田 隆文, 升本 英利, 阪口 仁寿, 南方 謙二, 山﨑 和裕, 池田 義, 横出 正之, 清水 章, 坂田 隆造. 慢性心筋梗塞大動物モデルに対する bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルシートによる血管新生療法. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 2014.9.30-10.3 福岡市
6. 丸井 晃, 田畑 泰彦, 清水 章, 坂田 隆造. シンポジウム 心血管再生医療実現に向けたバイオマテリアル DDS の可能性 ～ From Bench to Bedside ～. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6 京都市
7. 丸井 晃, 田畑 泰彦, 清水 章, 坂田 隆造. シンポジウム バイオマテリアルによる DDS を応用した心血管再生医療 ～ 心臓血管外科医の視点から ～. 第 13 回日本再生医療学会総会 2014.3.4-6 京都市
8. 丸井 晃, 田畑 泰彦, 吉川 英治, 清水 章, 坂田 隆造. シンポジウム 3 バイオマテリアル DDS の心血管再生医療における可能性～心臓血管外科医の視点から～. 第 35 回日本炎症・再生医学会 2014.7.1-4 名護市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【臨床研究②】

先進医療当該技術の重症虚血性心疾患への応用

末期重症心不全に対し、有効な治療法は心臓移植療法であるが、特に本邦におけるドナー不足は深刻であり汎用的医療となっていない。一方、末期重症心不全に対し、細胞や遺伝子を用いた再生医療の細胞や遺伝子を用いた再生医療が試みられているが、安全性・複雑な手技・コスト等様々な課題があるため、確立された治療になり得ていない。そこで我々は先進医療 B の該当技術、すなわち bFGF をゼラチンハイドロゲルに含浸させ、心臓に局所徐放させることで心筋再生を促す新しい治療法を確立させ、心臓移植療法に代わる新たな治療法の開発を目指している。

我々は先進医療当該技術心臓への臨床応用にあたり大動物による安全性試験および有効性の検証を完了した。臨床試験プロトコルについては現在作成中であり、以下案を提示する。

A. 研究目的

冠動脈バイパス術を必要とする重症虚血性心疾患を有し、従来の血行再建法（経皮的冠動脈形成術または冠動脈バイパス術）では血流改善が得られない虚血心筋領域を有する患者を対象として bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルの安全性および臨床効果を評価する。

B. 研究方法

【試験デザイン】

単施設前向き介入研究。単一容量の単回投与試験

【適格基準】

1) 虚血性心疾患と診断され冠動脈バイパス術を必要とする患者

2) 心筋虚血部位を持つ、またはその部位の心筋 viability が心エコー、MRI または心筋シンチグラフィなどによって証明されている

3) 右冠状動脈、左前下行枝、左回旋枝の 3 領域のうち、少なくとも一つの領域で冠状動脈の性状不良のため、バイパスが困難または不適当と考えられる部位を有する

4) 年齢 20-80 歳

【治療箇所の決定】
心筋 viability が心筋シンチグラフィ（負荷タリウム SPECT および FDG-PET）によって証明される虚血部位を有すること。MRI 遅延造影による 17 セグメントモデルにおける評価を併用

【治療法】
心臓外科手術を行うときに、ゼラチンハイドロゲルシートを目的虚血部位に貼付する。シートの作製は治験薬 GMP に準拠した京大病院薬剤部内の施設で作製する。

【エンドポイント】
有害事象および副作用の発生と有効性の評価

【観察期間】
6 ヶ月

C. 研究結果
なし

D. 考察
安全性・有効性の検証を目的とした前臨床研究を行い、安全性及び有効性が確認できた。現在上記臨床試験に向けたプロトコルを作成中であり、近日中に京都大学医学部附属病院位の倫理委員会に申請予定である。申請に並行して患者リクルートも開始しており、プロトコル承認後可及的速やかに試験を開始できるよう準備を進めている。

E. 結論
当該技術を応用した虚血性心疾患への臨床応用計画しており、大動物による前臨床試験が終了したため、それに引き続き臨床試験を行うべく準備を進めている。

F. 健康危険情報
臨床試験の実施には至っていないが、大動物による毒性試験では当該技術に関連する有害性は認めていない。

G. 研究発表
論文発表

1. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with end-stage renal disease requiring dialysis (5-year outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). Am J Cardiol. 2014;114:555-61
2. Minakata K, Bando K, Tanaka S, Takanashi S, Konishi H, Miyamoto Y, Ueshima K, Yasuno S, Ueda Y, Okita Y, Masuda I, Okabayashi H, Yaku H, Okamura Y, Tanemoto K, Arinaga K, Hisashi Y, Sakata R. Preoperative chronic kidney disease as a strong predictor of postoperative infection and mortality after coronary artery bypass grafting. Circ J. 2014;78:2225-31
3. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Comparison of five-year outcomes of coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fractions ≤50% versus >50% (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). Am J Cardiol. 2014;114:988-96
4. 丸井 晃, 坂田 隆造.【低心機能例に対する血行再建(PCI vs CABG)】 低左心機能例に対する血行再建 PCI vs CABG わが国でのレジストリーデータを含むこれまでのエビデンス. 日本冠疾患学会雑誌. 2014;20:67-74
5. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Three-year outcomes after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with heart failure: from the CREDO-Kyoto percutaneous coronary intervention/coronary artery bypass graft registry cohort-2. Eur J Cardiothorac Surg. 2015;47:316-21

著書

1. 丸井 晃, 坂田 隆造. 心血管外科 左主幹部・3 枝病変の冠血行再建術 PCI vs CABG. Annual Review 循環器. 2014:270-281
2. 坂田 隆造.【臨床医学の展望 2014】 心臓血管外科学 複雑冠動脈病変では CABG が標準治療に. 日本医事新報. 2014;4685:32-33

学会発表

1. Marui A, Kimura T, Tanaka S, Hanyu M, Komiya T, Kita T, Sakata R. Poster Abstracts

Percutaneous vs Surgical Myocardial Revascularization in Patients With Diabetes:5-Year Outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. STS Annual Meeting 2014.1.25-29 Florida, U.S.A.

2. 丸井 晃, 木村 剛, 塩見 紘樹, 北 徹, 坂田 隆造. 優秀演題, シンポジウム 1 不安定狭心症・非 ST 上昇型心筋梗塞への至適冠血行再建 CREDO-Kyoto Registry Cohort-2. 第 44 回日本心臓血管外科学会学術総会 2014.2.19-21 熊本市
3. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Hanyu M, Komiya T, Tanaka S, Kita T, Sakata R. Controversy 3 Impact of Evidence-Based Clinical Practice from "Real World" Myocardial Revascularization in Japan: The CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. 第 78 回日本循環器学会学術集会 2014.3.21-23 東京都
4. Marui A., Kimura T., Nishiwaki N., Mitsudo K., Komiya T., Hanyu M., Sakata R., The CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Impact of Coronary Artery Bypass Surgery in Patients with Diabetes: 5-Year Outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. The 22st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular and Thoracic Surgery, Istanbul, Turkey. April 3-6, 2014
5. 丸井 晃, 西脇 登, 小宮 達彦, 羽生 道弥, 南方 謙二, 木村 剛, 坂田 隆造. 合同セッション 本邦における On-pump および Off-pump CABG 選択の変遷とアウトカム. 第 23 回日本心血管インターベンション治療学会学術集会 2014.7.24-26 名古屋市
6. 丸井 晃, 木村 剛, 西脇 登, 小宮 達彦, 羽生 道弥, 坂田 隆造. シンポジウム(成人心臓 2) : びまん性冠動脈病変・糖尿病症例に対する冠血行再建治療戦略 糖尿病患者に対する PCI vs. CABG ～CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2～. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 2014.9.30-10.3 福岡市
7. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R, The CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators Optimal Coronary Revascularization in Patients With Unstable Angina or Non-ST Elevation Myocardial Infarction: 5-Year Outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, USA. November 15-19, 2014
8. Marui A, Nishiwaki N, Komiya T, Hanyu M, Tanaka S, Kimura T, Sakata R, The CREDO-Kyoto CABG Registry Cohort-2 Investigators. Impact of Left Ventricular Diastolic Dysfunction on Long-Term Outcomes Following Coronary Artery Bypass Grafting: 5-Year Outcomes of the CREDO-Kyoto CABG Registry Cohort-2. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, USA. November 15-19, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

【基礎研究①】

イヌ慢性期虚血性心疾患モデルに対する、bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルシートの心臓貼付による安全性および有効性試験

我々は先進医療当該技術心臓への臨床応用にあたり、大動物による安全性試験および有効性の検証を行ってきた。平成 24 年度は、心筋梗塞後慢性期に低左心機能を呈したイヌモデルの作製方法の検討を行った。平成 25 年度は、前臨床研究として、大動物虚血性心疾患モデルにおいて bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルシートの有効性及び安全性の確認を行いった。今年度は平成 25 年から行っている前臨床研究を継続し、有効性に関して詳細な検討を行った。

A. 研究目的

イヌ慢性期虚血性心疾患モデルを用いて、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルシートを心筋梗塞部及びその周囲の心表面に貼付した時の有効性及び安全性の評価を行うこと。

B. 研究方法

試験は一昨年、昨年同様、国内有数の安全性試験専門の施設を持っており、当該技術の毒性試験を委託した株式会社新日本科学と共同で行った。また、検体検査のうち NT-pro BNP 及び BNP 測定に関しては、国内有数の検体検査を行っている株式会社ケー・エー・シー及びアイデ

ックスラボラトリーズに委託し評価を行った。

病態モデルとして当該技術の臨床研究を行うにあたり、対象患者と同様なモデルが必要なため、イヌを用いて心筋梗塞後慢性期に低左心機能を呈したモデル作成を行った。まず、全身麻酔下にてビーグル犬(8～11kg)を左開胸し、冠動脈前下行枝及び第1～3対角枝を4-0 monofilament糸で結紮することで心筋梗塞を作製し、血行動態が安定している事を確認後閉胸した。4週後の超音波検査で左心室局所壁運動の低下及び心機能低下を確認し、慢性期虚血性心疾患モデルとした。

続いて、この慢性期虚血性心疾患モデルを全身麻酔下のもと再開胸し，生食のみをゼラチンハイドロゲルシートに含浸させた群(対照群)、及びbFGF(200μg)を含浸させた群(bFGF群)の2群に分け、それぞれのシートを心筋梗塞部及びその周囲を覆うように貼付し閉胸した。評価は、心筋梗塞作製前、治療前、治療3週後、及び治療6週間後に血液検査と心臓超音波検査による心機能測定を行った(超音波検査は昨年報告済み)。また、治療6週後の検査後に犠牲死させ、心臓及び他の臓器を摘出・固定を行い、組織学的評価を行った。

今年度は、von Willebrand Factor(vWF)を用いた免疫組織学的評価において、対照群とbFGF群のそれぞれにおける心筋梗塞境界部、心筋梗塞部、及び心表面の毛細血管数評価を行い、bFGF徐放化ゼラチンハイドロゲルシートによる血管新生効果について検討を行った。また、心不全により上昇する血中BNP及びNT-proBNPを心筋梗塞作製前、治療前、治療3週後、及び治療6週間後にそれぞれ測定し、心不全の程度を検討した。

C. 研究結果

対照群は5匹、bFGF群は7匹で解析を行った。治療に起因した有害事象は認めず、血中bFGF濃度は全例検出限界以下だった。また、左室心筋に占める心筋梗塞による心筋線維化面積比(左室心筋線維化面積/左室心筋面積)を測定し(9.0～16.5%)、心筋梗塞が軽度であったbFGF群の1例(心筋線維化面積比：2.9%)を除いた計11匹(対照群は5匹、bFGF群は6匹)で心筋線維化面積比を比較したところ両群間に優位差は認められなかった(対照群:12.1±2.3% vs. bFGF群:11.8±4.2%, p=0.90)。

続いて、von Willebrand Factor(vWF)を用いた免疫組織学的評価では、対照群と bFGF 群のそれぞれにおける Capillary (血管<25μm)、Aeteriole (25μm≦血管径<100μm)を心筋梗塞境界部、心筋梗塞部、及び心表面おいてそれぞれ測定したところ、Capillary に関しては、心筋梗塞境界部(対照:110.7±39.9 個/mm^2 vs bFGF 群:197.5±76.5 個/mm^2、p<0.01)、心筋梗塞部(対照群: 96.3±45.2 個/mm^2 vs bFGF 群:155.5±53.0 個/mm^2、p=0.02)、心表面(対照群:72.9±34.1 個/mm^2 vs bFGF 群:136.6±55.8 個/mm^2、p＜0.01)と bFGF 群で有意に多く認められた。Arteriole に関しても、心筋梗塞境界部(対照:4.37±1.64 個/mm^2 vs bFGF 群:7.27±2.23 個/mm^2、p<0.01)で bFGF 群で有意に多く、心筋梗塞部(対照群: 3.70±2.01 個/mm^2 vs bFGF 群:5.76±4.32 個/mm^2、p=0.22)、心表面(対照群:3.69±3.00 個/mm^2 vs bFGF 群:4.63±3.83 個/mm^2、p=0.55)では有意差はなかったものの bFGF 群で多い傾向にあった。

BNP値に関しては、有意差は認められなかったが、NT-proBNP値に関して、対照群と比べbFGF群において治療6週後に有意な低下が認められた(図1)。

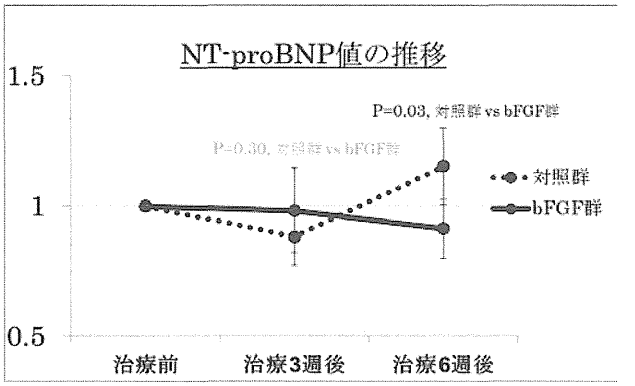

図 1 NT-pro BNP 値の推移

D. 考察

今回の研究は、今後の臨床研究を見据えての前臨床試験となるため、当該技術の有効性評価が非常に重要となる。当該技術の有効性評価のために、まずは臨床試験での対象患者と同様な慢性期に心機能低下をきたした虚血性心疾患モデル作製が必要である。心筋梗塞後慢性期を治療対象としているため、治療により心筋梗塞により線維化をきたした面積の大きさは変わらないと考えられるが、今回の結果において対照群と bFGF 群との間に心筋線維化面積の割合に差が認められなかったということは、治療対象モデルとして適切であったと考える。

また、前年度に行った心臓超音波検査による心機能評価において、対照群と比べ bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルシート貼付により左室内径短縮率の改善が認められ、今年度に行った組織学的評価でも bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルシート貼付による血管新生効果が示されたことは、当該技術の有効性を裏付けており、

臨床効果として期待できる。

今後は臨床試験を行い、当該技術の臨床効果を検討していく。

E. 結論

イヌ慢性期虚血性心疾患モデルに対し、200μg の bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルシートの心臓貼付による有効性試験を行ったところ、心筋梗塞及びその周囲に血管新生を促し、心不全を改善させうる可能性が考えられた。今後は、臨床研究を行い、当該技術のヒトにおける有効性を検討してきたいとと考える。

F. 研究発表

論文発表

なし

著書

なし

学会発表

1. 熊谷 基之, 丸井 晃, 田畑 泰彦, 吉川 英治, 山本 雅哉, 米澤 淳, 池田 隆文, 升本 英利, 阪口 仁寿, 南方 謙二, 山﨑 和裕, 池田 義, 横出 正之, 清水 章, 坂田 隆造. ポスター 成人心臓 2：再生医療 慢性心筋梗塞大動物モデルに対する bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲルシートによる血管新生療法. 第 67 回日本胸部外科学会定期学術集会 2014.9.30-10.3 福岡市.
2. Kumagai M, MaruiA, Tabata Y, Yoshikawa E, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Ikeda T, Masumoto H, Nakata T, Sakaguchi H, Minakata K, Yamazaki K, Ikeda T, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. A Novel Method to Therapeutic Angiogenesis by Sustained Release of BasicFibroblast Growth Factor Using Biodegradable Gelatin Hydrogel Sheet in a Canine Chronic Myocardial Infarction Model. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, USA. November 15-19, 2014
3. 熊谷 基之, 丸井 晃, 田畑 泰彦, 山本 雅哉, 米澤 敦, 瀧本 真也, 平尾 慎吾, 坂本 和久, 西尾 博臣, 中田 朋宏, 阪口 仁寿, 南方 謙二, 山﨑 和裕, 池田 義, 森田 智視, 松原 和夫, 横手 正之, 清水 章, 坂田 隆造. 一般演題 16 慢性心筋梗塞イヌモデルに対する bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルによる血管新生療法. 第 4 回 DDS 再生医療研究会 2014.12.6 東京都.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3, その他

なし

平成26年度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）

研究課題名
生体内吸収性高分子担体と細胞増殖因子を用いた難治性虚血性疾患に対する新しい再生医療の開発：オーダーメイド医療の実現に向けた検討

－班会議開催状況報告－

坂田班としては班会議を以下の通り行っており、会議議事録を研究代表者のもとで保管している。

第1回　平成26年　4月　8日（火）　（出席者4名）
第2回　平成26年　6月27日（火）　（出席者4名）
第3回　平成26年　8月20日（火）　（出席者3名）
第4回　平成26年　10月28日（火）　（出席者3名）
第5回　平成27年　1月27日（火）　（出席者5名）
第6回　平成27年　3月31日（火）　（出席者5名）

先進医療に係る定期・総括報告書

1. 標題

下肢末梢性血管疾患に対する、生体内吸収性高分子担体と
塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を用いた血管新生療法の、
臨床効果および安全性に関する臨床試験

先進医療名	生体内吸収性高分子担体と塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を用いた血管新生療法
実施医療機関名	京都大学医学部附属病院　計1施設
使用医薬品又は医療機器	bFGF含有ゼラチンハイドロゲル細粒
先進医療承認日	2010年7月1日
先進医療（予定）終了日	2013年1月1日
倫理基準等の遵守	本試験は、「世界医師会ヘルシンキ宣言（2008年10月修正）」、「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）」、「厚生労働大臣の定める先進医療及び施設基準を定める件（平成20年厚生労働省告示第129号）」、「厚生労働大臣の定める先進医療及び施設基準の制定等に伴う実施上の留意事項及び先進医療に係る届け出等の取扱いについて（平成20年3月31日付保医発第0331003号）」、及び「高度医療に係る申請等の取扱い及び実施上の留意事項について」（平成21年3月31日付医政発0331021号）」を遵守して実施され、すべての試験にかかわる文書、資料及び試料は各責任部署において適切に保存されている。
報告書作成日	2013年2月12日
実施責任医師	京都大学大学院医学研究科　器官外科学講座心臓血管外科学 教授　坂田　隆造 〒606-8507　京都市左京区聖護院川原町54 電話：075-751-3780　FAX：075-751-3098
実施者	京都大学医学部附属病院 探索医療センター　准教授　丸井　晃 探索医療センター　助教　武田　崇秀 探索医療センター　助教　柳　茂樹 心臓血管外科　医員　熊谷　基之
問い合わせ窓口	問い合わせ先： 京都大学大学院医学研究科　器官外科学講座心臓血管外科学 教授　坂田　隆造 電話：075-751-3780　FAX：075-751-3098

2. 概要

臨床研究登録 ID：UMIN000002671
目的： 従来の方法では治療困難できわめて近い将来において下肢切断術が免れられない下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）患者を対象として、塩基性線維芽細胞増殖因子（Basic Fibroblast Growth Factor：bFGF）徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒の安全性および臨床効果を評価する。
技術の内容： ［先進性］ 近年、糖尿病患者や高齢者の増加に伴い動脈硬化を原因とする下肢の閉塞性動脈硬化症が増加しており、血行改善薬などの内科的治療や下肢の血管拡張術・血栓除去術、動脈血栓除去術、血管移植術、バイパス移植術などの外科的治療はその治癒に大きく貢献している。しかし、閉塞性動脈硬化症やバージャー病のために下肢切断を余儀なくされる患者も多く、現存の治療法が十分であるとは言い難い。 近年、新たな治療法として、虚血部周辺組織からの血管新生及び側副血行の発達を促し虚血組織の血流を確保するという血管新生療法が注目されている。この治療法には主として血管新生タンパクを投与する「タンパク治療」、血管新生タンパクを発現する遺伝子を投与する「遺伝子治療」、血管新生を促す細胞を移植する「細胞移植治療」があるが、「タンパク治療」は血管新生タンパクを全身へ大量・反復投与を必要とすることによる副作用、「遺伝子治療」には安全性に対する懸念や遺伝情報の発現コントロールが十分ではないという問題、「細胞移植治療」には移植細胞採取の侵襲性、手技的煩雑さ、倫理問題、高額な費用などの問題が存在していることから、新たな方策の開発が求められている。 そこで本治療は「タンパク治療」の問題点であった全身への大量反復投与による副作用を解決すべく、ドラッグデリバリーシステムである生体吸収材料（ゼラチンハイドロゲル）を開発し、血管新生タンパクを十分かつ必要期間及び必要部位に作用させることを可能とした。このゼラチンハイドロゲルは血管新生タンパクの生理活性を保ったままで固定化包含できること、また血管新生タンパクを含んだゼラチンハイドロゲルが生体内で分解される期間を調整できることから、1 回の局所投与にて、必要部位における血管新生タンパクの濃度維持が可能である。また、「遺伝子治療」や「細胞移植治療」と比較し、患者投与までの手技が非常に簡便であり低コストであることも特徴である。 ［概要］ トラフェルミン（bFGF）を生理食塩水で溶解し、濾過滅菌後にゼラチンハイドロゲルに浸潤させ、注射剤を用時調製した。 腰椎麻酔下で、この bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル 1 mL ずつを虚血下肢腓腹筋に 40 箇所（計 40 mL bFGF として計 200 μg）注射した。
患者数 ①計画時：10 例 ②終了時：最大の解析対象集団（FAS）10 例、安全性解析対象集団 10 例 【②／③：約 0.0025%、②／④：約 0.03～0.05%】 ③日本国内における当該疾病患者数：推定約 40 万人（患者数の根拠：末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン及び血管炎症候群の診療ガイドライン） ④日本国内における当該技術の対象となる患者数：推定約 2～3 万人［患者数の根拠：Trans-Atlantic Inter-Society Consensus II（TASC II）(J Vasc Surg. 2007 Jan;45 Suppl S:S5-67.)、末梢閉塞性動脈疾患の治療ガイドライン及び血管炎症候群の診療ガイドライン］ ⑤考察：登録期間 15 か月間で、総紹介患者数 78 名のうち下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）を有する患者は 62 名であった。そのうち重症下肢虚血患者は 34 名であり、最終的に 10 名が登録された。15 か月間の登録期間中に総紹介患者のうち 13%（10/78 名）が治療適応であった。

診断及び主要な組入れ基準：
［対象疾患］
下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症、バージャー病）

［選択基準］
(1) 下肢末梢性血管疾患（慢性閉塞性動脈硬化症又はバージャー病）と診断されている。
(2) 対象側について、以下すべてを満たす下肢末梢性血管疾患である。
・下肢虚血による潰瘍、限局性の壊疽、安静時疼痛のいずれかの症状がある。
・Rutherford 慢性虚血肢臨床分類の 4 群～5 群と判定される。
・骨・腱の露出した深部潰瘍又は広範な壊疽のいずれも認めない。
(3) あらゆる内科的治療［血管拡張剤、抗血小板剤、経皮的血管形成術（PTA）］又は外科的治療（バイパス血行再建術など）を施行した後も、臨床症状の改善が得られない患者である。
(4) 治療開始 4 週間以内に下肢大切断（足関節以上）を受ける可能性がないと判断される。
(5) 登録時の年齢が 20 歳以上 80 歳未満である。
(6) 骨髄、肝機能が保持されている。（登録前 4 週間以内の最新の検査）
・ヘモグロビン量 ≧ 10.0 g/dL
・血小板数 ≧ 7.0 万/μL
・GOT/AST ≦ 100 IU/L
・GPT/ALT ≦ 100 IU/L
(7) 試験参加について、患者本人から文書による同意が得られている。

［除外基準］
(1) 下肢血行再建術（外科的バイパス術、PTA）後 3 か月以内である。
(2) 冠動脈バイパス術（CABG）又は経皮的冠動脈形成術（PCI）施行後 3 か月以内である。
(3) 以下の薬剤を投与中で、症状悪化の可能性のために中止することが困難である。
・アルプロスタジル（リプル®、パルクス®など）
・アルプロスタジルアルファデクス（プロスタンディン®など）
・アルガトロバン（ノバスタン®、スロンノン®など）
ただし、試験治療開始（bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与）1 週間前から、本試験の観察期間（bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与後 24 週まで）終了まで中止可能と判断できる場合は登録可とする。
(4) 以下のいずれかの合併症を有する。
・コントロール不良な虚血性心疾患・心不全・不整脈
・臨床的に問題となる感染症（蜂窩織炎・骨髄炎を含む）
・コントロール不良の糖尿病患者（HbA1c > 10%）
・余命が 1 年以内と考えられる合併症
(5) 以下のいずれかの既往を有する。
・過去 6 か月以内に発症した心筋梗塞・脳梗塞・脳出血・一過性脳虚血発作
・重度の薬剤アレルギー
・過去 1 年以内に治療を要するアルコール依存又は薬物依存を認めた
(6) 現在、慢性腎不全により維持透析中である。
(7) 糖尿病性網膜症（増殖前糖尿病性網膜症又は増殖糖尿病網膜症）で治療中である。
ただし、bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒の投与までに糖尿病性網膜症の治療が終了予定の患者については、眼科医が本試験の参加に問題がないと判断した場合は、登録可とする。
(8) ゼラチンハイドロゲル細粒の皮内反応が陽性である。
(9) 過去、以下の臨床試験・治験に参加している。
・bFGF に関する試験
・遺伝子治療に関する試験
(10)活動性の悪性腫瘍（無病期間が 3 年以内の悪性腫瘍）を有する。ただし、carcinoma in situ

（上皮内癌）や粘膜内癌は活動性の悪性腫瘍に含めない。悪性腫瘍による難治性潰瘍の可能性のある患者については、事前に生検などにより投与部位に悪性腫瘍のないことを確認すること。
(11)喫煙者である、又は禁煙期間が 1 か月未満である。
(12)妊娠中又は妊娠の可能性がある女性。妊娠を希望している女性。授乳中である女性。パートナーの妊娠を希望する男性。
(13)その他、研究責任者又は担当医師が本試験を安全に実施するのに不適当と判断した患者。

実施計画（スケジュール）：
bFGF 及び凍結乾燥ゼラチンハイドロゲル細粒より調製した bFGF 含有ゼラチンハイドロゲル細粒を、腰椎麻酔下で虚血下肢腓腹筋約 40 箇所（計 40 mL bFGF として 200 μg）に筋肉内注射する。

試験スケジュール

検査・観察・評価項目 ＼ 時期		登録前	投与前	投与後（観察期間）（投与日＝Day0 とする） D1	D2	D3	1W	2W	4W	8W	12W	24W
患者背景		○[1]										
体重		△	○[3]	←		←		△		→		→
身長		△	○[3]									
疾患評価	Rutherford 慢性虚血肢臨床分類	○[1]	○[3]	△	△	△	△	△	○	△	△	○
	潰瘍の深達度		○[3]						○			○
	経皮的酸素分圧		○[3]						○			○
	上肢・下肢・足趾血圧		○[3]						○			○
	虚血性潰瘍の面積		○[3]						○			○
	チアノーゼ		○[3]						○			○
	6 分間歩行距離		○[3]						○			○
	安静時疼痛		○[3]						○			○
検査	血液・生化学・CRP	○[1]	△	○	○	○	○	○	○	○	○	○
	HbA1c	○[1]	△	←		←		△		→		→
	心電図、心エコー、胸 XP	○[1]	△	←		←		△		→		→
	冠動脈造影	○[2]										
	ゼラチンハイドロゲル細粒皮内反応	○[1]										
	血中 bFGF 濃度			○[4]		○[5]	○[6]	○[7]				
安全性評価	有害事象			○	○	○	○	○	○	○	○	○
	術中・術後合併症			○	○	○	○	○	○	←	△	→

○[1]　登録前 4 週以内
○[2]　登録前 6 か月以内
○[3]　投与 2 週前～投与前日
○[4]　試験薬投与後 24 時間
○[5]　試験薬投与後 72 時間
○[6]　試験薬投与後 1 週
○[7]　試験薬投与後 2 週
△　必要に応じて

評価基準
［主要評価項目］
安全性評価基準：有害事象及び副作用の発生
有効性評価基準：経皮的酸素分圧（TcO_2）の上昇（主たる仮説検定は、投与前と投与後4週のTcO_2の差とし、有意水準5%の片側対応のあるt検定を行った）
［副次評価項目］
安全性評価基準：該当なし
有効性評価基準：上肢下肢血圧比（ABI）、上肢足趾血圧比（TBI）、虚血性潰瘍の面積、6分間歩行距離（投与前と投与後4週又は投与後24週の差に関して、有意水準5%の片側対応のあるt検定を行った）
チアノーゼ、Rutherford慢性虚血肢臨床分類、疼痛スケールによる安静時疼痛（投与前に比べ投与後に1段階でも改善が見られた割合とその95%信頼区間を求めた）

結果の要約
安全性の評価結果：
安全性の解析対象集団10例において、有害事象の発生割合は50%（5/10例）、副作用の発生割合は30%（3/10例）であった。複数の患者で見られた有害事象は、アラニンアミノトランスフェラーゼ増加及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加（各30%、3例）であった。いずれの有害事象も試験薬との因果関係は不明であり、副作用と判断された。その他の有害事象は1例のみの発生であった。
重症度別の有害事象では、重度の有害事象はなく、中等度の有害事象は1例（視床出血、蜂巣炎）のみであった。
副作用は、3例（3例ともアラニンアミノトランスフェラーゼ増加及びアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加：試験薬との因果関係は不明）に発生した。
重篤な有害事象は1例に2件発生したが、いずれも試験薬との因果関係は否定された。
試験薬の投与中止に至るような有害事象は、観察されなかった。

有効性の評価結果：
有効性の解析対象集団であるFAS 10例において、有効性の主要評価項目である試験薬投与前後のTcO_2の差の平均値は、投与後4週では14.4 mmHg（$p < 0.01$）（TcO_2の平均値は投与前28.4 mmHgから42.8 mmHgに上昇）、投与後24週では17.9 mmHg（$p < 0.01$）（TcO_2の平均値は投与前28.4 mmHgから46.2 mmHgに上昇）であり、有意に上昇した。
副次評価項目では、試験薬投与前後のABIの差の平均値は、投与後4週が-0.01、投与後24週が0.03であり、有意な変化は見られなかった。試験薬投与前後のTBIの差の平均値は、投与後4週が0.04、投与後24週が-0.03であり、有意な変化は見られなかった。試験薬投与前後の虚血性潰瘍の面積の差の平均値は、投与後4週が-32.9 mm^2、投与後24週が-290.4 mm^2であり、投与前と比べ減少したものの、その差は有意ではなかった。試験薬投与前後の6分間歩行距離の差の平均値は、投与後4週が80.7 m（$p < 0.01$）、投与後24週が62.2 m（$p = 0.02$）であり、有意に増加した。試験薬投与前に比べ投与後にチアノーゼが改善した患者は、投与後4週が5例（50%、95%信頼区間 18.7～81.3%）、投与後24週が7例（70%、95%信頼区間 34.8～93.3%）であり、有意な改善が認められた。試験薬投与前に比べ投与後にRutherford慢性虚血肢臨床分類による臨床症状が改善した患者は、投与後4週が6例（60%、95%信頼区間 26.2～87.8%）、投与後24週が6例（60%、95%信頼区間 26.2～87.8%）であり、有意な改善が認められた。試験薬投与前に比べ投与後に疼痛スケールによる安静時疼痛が改善した患者は、投与後4週が5例（50%、95%信頼区間 18.7～81.3%）、投与後24週が5例（50%、95%信頼区間 18.7～81.3%）であり、有意な改善が認められた。

発生した有害事象：

有害事象

	重篤				非重篤				合計			
	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計
視床出血	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
皮膚潰瘍	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
蜂巣炎	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
腎性貧血	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
アラニンアミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
血中クレアチンホスホキナーゼ増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
血中クレアチニン増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
C-反応性蛋白増加	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1

副作用

	重篤				非重篤				合計			
	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計	軽度	中等度	重度	合計
アラニンアミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ増加	0	0	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3

結論：

以上の結果から、bFGF 徐放化ゼラチンハイドロゲル細粒は、下肢末梢性血管疾患患者に対して虚血組織の血流を確保し、有効であることが示された。また、発生した有害事象はほとんどが軽度であり、重篤な副作用もなかったことから、安全性にも問題はないと考えられた。

報告書作成日：2013 年　2 月 12 日

Ⅱ．分担研究報告