

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**プロジェクトの総合推進  
(提供者・被験者が入院する病棟スタッフの教育・管理)**

**実施体制の確立と調整  
(細胞調整室を使用した習熟訓練)  
(症例選択会議の開催)**

**ADMPC の移植  
(スクリーニング、登録)  
(ADMPC の単離、培養、出荷)  
(被験者・提供者の経過観察)**

**研究結果の総合解析  
(研究結果の国民・社会への発表)**

**担当責任者：**

**大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学**

**教授 坂田泰史**

**大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学**

**特任研究員 小関正博、中谷和弘**

**研究要旨**

同種 ADMPC 移植療法の安全性を検討する臨床研究が、より安全に、より確実に行い得るよう、関連する病棟スタッフ、培養スタッフ等の教育・訓練を行う。

被験者・提供者の選定に際しては、直接患者を主治医として担当していない公平な立場から、患者選定の助言を行う。

## 研究協力者（順不同）

川瀬良太	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学
岡田健志	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学
嵯峨礼美	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学
小林卓哉	大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学

### A．研究目的

同種 ADMPC 移植療法の安全性を検討する臨床研究の実施に際しては、ADMPC を被験者へ経門脈的に移植するため、門脈塞栓症などの特殊な合併症がおりうる。病棟スタッフには、本臨床研究について十分に教育を行い、万全の態勢で、提供者からの脂肪採取、被験者への ADMPC 移植術に臨む。

ADMPC の分離・培養・出荷までの工程では多くの物品が必要である。これらの品質管理にも十分配慮しながら、必要な物品・試薬を発注し準備する。

また、提供者の脂肪組織を吸引採取したのち、約 3 週間臨床用の細胞培養室（CPC）内での培養作業が必要である。細胞培養は、専用の自動培養装置等とは規格が合わないため、全行程をすべて人の手で行うが、日常の非臨床の実験で行う細胞培養操作とは異なり、防護服を完全に着込んだ状態で操作を行うため、相当の習熟訓練が必要である。培養担当者が、万一、感染症等に罹患し CPC に入室できなくなっても、研究中止にならないよう、十分なバックアップ体制を構築する。

被験者・提供者の選定に際しては、直接患者を主治医として担当していない公平な立場から、患者選定の助言を行う。

### B．研究方法

病棟スタッフへの教育は、4 月に人事異動があることから、その後に行うこととした。

ADMPC の分離・培養・出荷までの工程で必要な物品についてはリストを作成し、品質保証期限に留意しながら発注を進めた。培養液については、ヒトに投与する細胞の培養で使用可能な BSE が発生していない国で作成された FBS（ガンマ線照射済）を発注した。次に、この FBS を含む ADMPC 用カスタムメEDIUMの作成を発注した。、2015 年 3 月中は、カスタムメEDIUMのロットの性能確認を兼ねたコールドランを実施するための、吸引脂肪組織が供与してもらえ乳房形成術の予定がなかったため、性能確認のためやむを得ず、凍結保管されている ADMPC を用いて性能確認を行った。

培養スタッフの習熟訓練については、上記、研究協力者一人一人について、まず、

研究室内で ADMPC の培養訓練を行い、次に CPC 内でコールドランを 2 回実施し、最終的に、培養スタッフについては、上記、研究協力者の誰が担当しても工程に支障が出ないように訓練した。

被験者・提供者の選定に際しては、直接患者を主治医として担当していない公平な立場から、患者選定に意見を述べた。

研究結果の国民・社会への発表については、世界中の家族性高コレステロール血症患者の診療を担当する医師が集結する、3 月の米国と欧州での国際学会で本臨床研究についての学会発表を行った。

### C . 研究結果

患者選定に関する助言については、業務責任者の項に記載した。

病棟スタッフへの教育は、4 月 1 日付けで研究分担者中谷和弘の病棟スタッフへの

移動を含む、人事異動が予定されたことから、新体制に移行した 4 月にキックオフミーティングを行うことが決まった。

ADMPC の分離・培養・出荷までの工程で必要な物品についてはリストを作成し、品質保証期限に留意しながら発注を進め、順調に納品された。

必要試薬の中では、ヒトに投与する細胞の培養で使用可能な BSE が発生していない国の牛から作成された FBS を発注し、ガンマ線照射ののちに納品（納期 1.5 ヶ月）された。この FBS を含有した ADMPC 用カスタムメディウム 400 本の作成をただちに発注し 2 月末にようやく納品され（納期 1 ヶ月）超低温フリーザーに保管した。（写真は、超低温ディープフリーザーと納品された FBS 含有カスタムメディウム：2 月末撮影）。

納品されたフリーザー



線照射済 FBS



FBS 含有カスタムメディウム



2015 年 5 月中は、カスタムメディウムの

ロットの性能確認と希釈したコールドランを

実施するための、吸引脂肪組織が供与してもらえない乳房形成術の予定がなかったため、性能確認のため、凍結保管されている ADMPC を用いて性能確認を行った。良好に ADMPC が培養できることが確認できた。

培養スタッフの習熟訓練については、上記、研究協力者一人一人について、まず、

研究室内で ADMPC の培養訓練を行った。次回手術予定日である 4 月 15 日（水）から、CPC 内であらためてカスタムメEDIUMの性能確認、及びコールドランを実施する。これにより誰が担当しても工程に支障が出ないように訓練する。

### <1<sup>st</sup> Cold Run>



研究結果の国民・社会への発表については、将来の国際的な展開を想定して、世界中の家族性高コレステロール血症患者の診療を担当する医師が集結する、3月の米国と欧州での国際学会で本臨床研究についての学会発表を行った。このうち欧州動脈硬化学会では、サテライト会合で家族性高コレステロール血症患者支援団体の会合に招待され、本臨床研究の実施について講演したが、これまで、脂質代謝領域に再生医療を治療法として提唱した意義は大きく、反響は非常に大きな反響を得たかった。

#### D . 考察

実際の ADMPC 移植療法実施に必要な準備

を順調に進めることができている。

#### E . 結論

次年度前期に 1,2 例目の臨床研究を行う準備が概ね整いつつある。

#### F . 健康安全情報

なし

#### G . 研究発表

##### G - 1 . 論文発表

なし

##### G - 2 . 学会発表

(国際学会)

1. M. Koseki, K. Nakatani, A. Saga, T. Okada, K. Tomita, K. Osuga, S. Ezoe, Y. Sakata, S.

Yamashita AN OPEN-LABEL, PHASE I TRIAL OF TRANSPLANTATION THERAPY WITH ALLOGENEIC ADIPOSE TISSUE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS IN HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS

Deuel Conference on Lipids 2015 2015 年 3 月 3 日 ~ 6 日, Monterey, CA, US

2. M. Koseki, K. Nakatani, A. Saga, K. Tomita, K. Osuga, S. Ezoe, Y. Sakata, S. Yamashita

AN OPEN-LABEL, PHASE I TRIAL OF TRANSPLANTATION THERAPY WITH ALLOGENEIC ADIPOSE TISSUE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS IN HOMOZYGOUS FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLEMIA PATIENTS

The 83<sup>rd</sup> EAS Congress 2015 (欧州動脈硬化学会) 2015 2015 年 3 月 22 日 ~ 25

日, Glasgow, Scotland

3. M. Koseki

Panelist (invited)

The 83<sup>rd</sup> EAS Congress 2015 SateFH Patients Advocacy Group Representatives Meeting 2015 年 3 月 21 日

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### H - 1 . 取得特許

なし

### H - 2 . 実用新案登録

なし

### H - 3 . その他

#### 【政策への提言】

なし。

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**プロジェクトの総合推進**

**(対象疾患についての最新情報収集)**

**担当責任者：**

**独立行政法人国立長寿医療研究センター**

**副院長 荒井秀典**

**研究要旨**

家族性高コレステロール血症ホモ接合体のような重症高コレステロール血症患者への治療は、既存の薬物治療では十分な効果が得られないため、LDL アフェレシスによるコレステロール低下治療に依存しているのが現状である。しかしながら、本治療法は患者負担が大きいため、より負担の少ない治療法の開発が求められている。本研究においては重症高コレステロール血症に対する新規治療法に関する最新のエビデンスを収集し、将来の combination therapy 実現に向けて、まとめることを目的とした。結果、アポBのアンチセンスである mipomersen や MTP 阻害薬である Iomitapide は、その効果が確認され、欧米ですでに家族性高コレステロール血症ホモ接合体に対する治療薬として承認されている。また、PCSK9 抗体薬に関しても、臨床試験の結果、著明な LDL コレステロール低下作用が示され、今後重症高コレステロール血症患者に対する治療薬として承認されることが期待されている。

**研究協力者(順不同)**

なし	
----	--

## A . 研究目的

家族性高コレステロール血症ホモ接合体のような重症高コレステロール血症患者への治療は、既存の薬物治療では十分な効果が得られないため、LDL アフェレシスによるコレステロール低下治療がなされているが、本治療法は患者への負担が大きく、より負担の少ない治療法の開発が求められている。本研究では、既存の薬物治療及び LDL アフェレシス以外の治療薬の開発状況をまとめることを目的とした。

## B . 研究方法

Pubmed 等の検索により、新規高コレステロール血症治療薬の開発状況をまとめた。

### 倫理的配慮

今回は該当なし

## C . 研究結果

現在開発中の薬剤に関する情報をまとめた。

### 1) PCSK9阻害薬

PCSK9(proprotein convertase subtilisin/kexin 9)はLDL受容体の分解に関わる蛋白であり、そのloss of function変異を持つ人はLDL受容体の分解が起こりにくくなるため、血中のLDLコレステロールが低下し、冠動脈疾患罹患率も低くなる。従って、PCSK9の機能を阻害する薬剤の開発が進められてきた。現在開発中のPCSK9阻害薬はすべて、遺伝子組換え技術によって作成された抗PCSK9モノクローナル抗体である。Sanofi とRegeneronによって開発された

AlirocumabやAmgenによるEvolocumabの前臨床試験の報告がある。最近発表されたLAPLACE-2試験によると、2067名の高コレステロール血症患者を中強度スタチン群（アトルバスタチン10mg、シンバスタチン40mgまたはロスバスタチン5mg）と高強度スタチン群（アトルバスタチン80mg、ロスバスタチン40mg）に分け、Evolocumabを隔週で140mgずつ投与する群と月に1回420mg投与する群に分けて、12週間投与した。その結果、プラセボと比べて、LDLコレステロールは隔週投与群で66%から75%、月1回投与群で63%から75%低下した。副作用としては背部痛、関節痛、頭痛、筋痙攣、四肢疼痛があったが、いずれも発現頻度は2%未満であった。一方、77名のFH患者を対象にして行われたAlirocumabの試験では、すべての患者が高用量のスタチンを投与され、うち71%がエゼチミブを服用していたが、Alirocumabの用量依存性にLDLコレステロールは29%から68%低下し、プラセボ群では11%であった。最も効果の高い用量は150mgの隔週投与であった。その際にアポBは50%、Lp(a)は23%低下した。

### 2) mipomersen

アポB-100は、LDLの構成成分であるが、このアポB-100の発現を抑制すると血中LDLコレステロールが低下する。mipomersenは、20ヌクレオチド鎖長のアポB-100遺伝子のアンチセンスである。スタチンが内服できない133名の患者を対象としてプラセボとの無作為化比較試験が行われた。その結果、26週間後にLDLコレステロールは47%減少し、アポBとLp(a)はそれぞれ46%、27%低下した。また、別のRCTにおいては、最大用量のスタチンにより治療中の脂質異常症患者

104名に対して、毎週200mgの mipomersen を皮下注射する群とプラセボを投与する群に分けて、26週間治療を行ったところ、 mipomersen 群で LDL コレステロールは 36.9% 低下したのに対し、プラセボ群では、4.5% の低下にとどまった。また、アポBが 38%、Lp(a) が 24% 低下した。副作用としては感冒様症状が実薬群で 34%、プラセボ群で 21% に認められた。本薬剤は FH ホモ接合体に対する治療薬として 2013 年 1 月 FDA により承認された。

### 3) lomitapide

Aegerion が開発したロミタピド (lomitapide) は microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 阻害剤であり、ホモ接合体家族性高コレステロール血症を対象としたコレステロール低下剤である。6 例のホモ FH 患者に 4 週間本剤を投与した結果、LDL コレステロールは 50.9% 低下し、アポB も 55.6% 減少した。副作用として肝酵素の上昇と脂肪肝が認められた。また、29 名の FH ホモ接合体患者が参加した他施設共同試験において、1 日 5 から 60mg の lomitapide により治療が行われたが、26 週後の LDL コレステロールは平均 50% 低下した。副作用としては消化器系の副作用が最も多く、93% の患者で副作用が認められた。うち、3 名が副作用のため試験を中止した。また、5 名の患者で肝酵素が正常上限の 5 倍以上に上昇した。肝内脂肪蓄積が最も重大な副作用と考えられている。本薬剤は FH ホモ接合体に対する治療薬として 2012 年 12 月 FDA により承認され、欧州でも 2013 年認可された。

### D . 考察

脂質異常症の治療はスタチンが発売されたのち、大きく変化した。心血管疾患の予

防効果がスタチンにより示されることにより、多くの患者が脂質低下療法による恩恵を受けるに至り、ハイリスク患者の管理に脂質管理は欠かせないものとなった。しかしながら、家族性高コレステロール血症のような重症高コレステロール血症患者の治療はまだまだ不十分な点もあり、現在開発中の薬剤がその期待に応えてくれることを切望する。

### E . 結論

重症高コレステロール血症に対する治療薬の開発は進んでおり、前臨床試験では副作用は認めるものの、著明な血中コレステロール低下効果を認めることが報告されている。本臨床研究との combination therapy に関しては、治験が進んでいる PCSK9 阻害薬については、ADMPC 移植療法との組み合わせ効果が推察でき、LDL アフェレーシスを中断するレベルまでの LDL-C 低下効果が期待できる可能性がある。同時により安全性が高く、効果に持続性のある治療法の開発を進めるべきである。

### F . 健康安全情報

なし

### G . 研究発表

#### G - 1 . 論文発表

- 1) Woo J, Arai H, Ng TP, Sayer AA, Wonga M, Syddall H, Yamada M, Zeng P, Wu S, Zhang TM. Ethnic and geographic



- variations in muscle mass, muscle strength and physical performance measures *Eur Geriatr Med* 5:155-164, 2014
- 2) Sewo Sampaio PY, Sampaio RA, Yamada M, Ogita M, Arai H. Comparison of frailty among Japanese, Brazilian Japanese descendants and Brazilian community-dwelling older women. *Geriatr Gerontol Int.* in press
  - 3) Nishiguchi S, Yamada M, Fukutani N, Adachi D, Tashiro Y, Hotta T, Morino S, Shirooka H, Nozaki Y, Hirata H, Yamaguchi M, Arai H, Tsuboyama T, Aoyama T. Differential Association of Frailty With Cognitive Decline and Sarcopenia in Community-Dwelling Older Adults. *J Am Med Dir Assoc*, in press.
  - 4) Sampaio PYS, Sampaio RAC, Yamada M, Arai H, Comparison of frailty between users and non-users of a day care center using the Kihon Checklist in Brazil, *J Clin Gerontol Geriatr*, 5:82-85, 2014
  - 5) Cruz-Jentoft AJ, Landi F, Schneider SM, Zúñiga C, Arai H, Boirie Y, Chen LK, Fielding RA, Martin FC, Michel JP, Sieber C, Stout JR, Studenski SA, Vellas B, Woo J, Zamboni M, Cederholm T. Prevalence of and interventions for sarcopenia in ageing adults: a systematic review. Report of the International Sarcopenia Initiative (EWGSOP and IWGS). *Age Ageing*, 43:748-59, 2014
  - 6) Tanigawa T, Takechi H, Arai H, Yamada M, Nishiguchi S, Aoyama T. Effect of physical activity on memory function in older adults with mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Geriatr Gerontol Int*, 14:758-62, 2014
  - 7) Chen LK, Liu LK, Woo J, Assantachai P, Auyeung TW, Bahyah KS, Chou MY, Chen LY, Hsu PS, Krairit O, Lee JS, Lee WJ, Lee Y, Liang CK, Limpawattana P, Lin CS, Peng LN, Satake S, Suzuki T, Won CW, Wu CH, Wu SN, Zhang T, Zeng P, Akishita M, Arai H, Sarcopenia in Asia: consensus report of the asian working group for sarcopenia, *J Am Med Dir Assoc*, 15(2): 95-101,2014.
  - 8) Yamada M, Moriguchi Y, Mitani T, Aoyama T, Arai H, Age-dependent changes in skeletal muscle mass and visceral fat area in Japanese adults from 40 to 79 years-of-age, *Geriatr Gerontol Int*, 14 Suppl 1:8-14, 2014.
  - 9) Sampaio RAC, Sampaio PYS, Yamada M, Yukutake T, Uchida MC, Tsuboyama T, Arai H, Arterial stiffness is associated with low skeletal muscle mass in Japanese community-dwelling older adults, *Geriatr Gerontol Int*, 14 Suppl, 1:109-14, 2014.
  - 10) Yamada M, Nishiguchi S, Fukutani N, Tanigawa T, Yukutake T, Kayama H, Aoyama T, Arai H, Prevalence of sarcopenia in community-dwelling Japanese older adults, *J Am Med Dir Assoc*, 14(12): 911-5,2013.
  - 11) Sampaio PYS, Sampaio RAC, Yamada M, Ogita M, Arai H, Validation and Translation of the Kihon Checklist (frailty index) into Brazilian Portuguese, *Geriatr*

- Gerontol Int, in press.
- 12) Tanigawa T, Takechi H, Arai H, Yamada M, Nishiguchi S, Aoyama T, Effect of physical activity on memory function in older adults with mild Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, Geriat Gerontol Int, in press.
- 13) Yukutake T, Yamada M, Fukutani N, Nishiguchi S, Kayama H, Tanigawa T, Adachi D, Hotta T, Morino S, Tashiro Y, Arai H, Aoyama T, Arterial stiffness determined by cardio-ankle vascular index (CAVI) is associated with poor cognitive function in community-dwelling elderly, J Atheroscler Thromb, in press.
- 14) Yamada M, Arai H, Nishiguchi S, Kajiwara Y, Yoshimura K, Sonoda T, Yukutake T, Kayama H, Tanigawa T, Aoyama T, Chronic kidney disease (CKD) is an

independent risk factor for long-term care insurance (LTCI) need certification among older Japanese adults: A two-year prospective cohort study, Arch Gerontol Geriatr, in press.

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

### **H - 1 . 取得特許**

なし

### **H - 2 . 実用新案登録**

なし

### **H - 3 . その他**

#### **【政策への提言】**

なし

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告 (業務項目)**

**ADMPC の安全性の検討**

**(安全性確保に関する助言)**

**担当責任者：**

**近畿大学薬学総合研究所 所長・特任教授**

**早川 勇夫**

**研究要旨**

「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」を目指し、その治療用細胞資材として肝要な同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) の安全性について検討する必要がある。本研究では、ADMPC を含むヒト幹細胞の観点を網羅した臨床応用に用いる細胞ソースとしての幹細胞の在り方および取り扱いについて、注意すべき事項や留意点など、必要事項の抽出や掌握及び国内外の状況調査、それらを総合的に取りまとめて情報を把握し、分析と考察を行った。

**研究協力者 (順不同)**

**森山博由**

**近畿大学薬学総合研究所 准教授**

## A.研究目的

再生医療実用化推進と安全性確保には研究開発の推進と規制環境の整備が車の両輪である。研究分担者はこれまで、薬事法及び医療法下のヒト細胞加工製品の品質・安全性確保に関する研究に従事し、現行の全ての関連指針の通知化に寄与してきた。これらの指針は、多種多様な製品で想定しうるあらゆる可能性を網羅できるよう作成されたものである。ところで、幹細胞を用いた基礎および臨床応用にわたる再生医療研究開発や承認審査においては、ヒト幹細胞の品質及び安全性を的確にかつ合理的に確保する必要があるのは言うまでもない。そこでは、細胞の種類や特性、臨床適用法などをふまえてリスクに基づく適切な試験の実施やデータの評価がなされるべきであり、過剰な試験やデータを求めず、その安全性を確保することが望ましい。しかし、現行の指針等で示されている網羅的事項の中から、これらに叶う必要かつ十分な項目の選択及びデータの評価を開発者・臨床医・研究者など実施に携わるものが自身で判断することは容易ではない。本研究で用いる細胞ソースであるところの同種脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)についても、まさに同様の障壁が存在する。そこで本研究では、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)およびこれらを含むヒト幹細胞を用いた再生医療のレギュラトリーサイエンスについて、その歩を進めるべく、広く国内外の情報を収集解析し、また現行の指針等と比べながら、「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)を用いた細胞移植療法の確立」のための安全性の確保等の在り方や留意点についての総合的な検討を行うこと

を目的とする。

## B.研究方法

2014年 IABS 理事会[国際生物製剤標準化連盟理事会](ストラスブルグ・フランス)、2014年 ISSCR[第12回国際幹細胞学会](カナダ・バンクーバー)、Translational Regenerative Medicine Congress 2014(再生医療実用化推進会議)2014(ドイツ・ライプツヒ)、国際脂肪療法科学会議 2014(International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) 2014)(オランダ・アムステルダム)、生体組織工学及び再生医療治療薬学会年会議 2014(Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society [Termis] Annual Conference - meeting 2014)(アメリカ合衆国ワシントン DC)に参加し、調査研究活動を実施する。それらの知見を加味し、研究分担者である早川堯夫が理事を務める IABS(国際生物製剤標準化連盟)ミーティングを主催し、国内外の研究者とともに国際調和を目指した研究発表および議論を行う。

これらの研究から得られた成果を参考とし、再生医療に大きく貢献する幹細胞5指針案への充当、ならびに現時点までに体系化された指針案の英文での情報発進をおこなうことで、本研究課題に肝要な戦略支援のための参考指針を取り纏める。

## C.研究結果

2014年 IABS 理事会[国際生物製剤標準化連盟理事会](ストラスブルグ・フランス)、Translational Regenerative Medicine Congress 2014(再生医療実用化推進会議)2014(ドイツ・ライプツヒ)に出席し、ヒト幹細胞加工製品を含む先端医療医薬品等の品質・安全性確保

に関する各国の最新の薬事規制の考え方についての意見交換と課題の抽出及び問題提起を行い、討議と意見交換を深める中で、臨床研究及び基礎研究に用いる体性幹細胞における基準や品質評価等に有用な情報交換と議論ならびに、それらの最新の知見を共有できる国際的ネットワークの構築に至った。続いて、2014年 ISSCR[第12回国際幹細胞学会](カナダ・バンクーバー)、国際脂肪療法科学会議 2014(International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) 2014)(オランダ・アムステルダム)に出席し、ヒト幹細胞利用再生医療の研究開発動向の調査・研究及び製品の品質・安全性確保に関するわが国の指針の紹介と意見交換を行うことで、幹細胞学全般から当該細胞(ADMPC)を見直すことで、本研究事業を進捗する上での有効と思しき幹細胞性状の知見等を蓄積した。同様に、生体組織工学及び再生医療治療薬学会年会議 2014(Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society [Termis] Annual Conference - meeting 2014)(アメリカ合衆国ワシントン DC)に於いては、ヒト幹細胞の臨床応用に関する欧米における最新の研究開発動向についての調査研究を実施し、欧州の動向を参考にしつつ、最新の研究開発動向、規制状況及び患者団体等を含めて開発支援を推進するアプローチを参考に、本研究に活用すべく方策を講ずるなどの結果を得た。また、これらの成果を、研究分担者である早川堯夫が理事を務める IABS(国際生物薬品標準化連盟)が主催した東京ミーティングにおける情報発信内容に加味し、国内外の幹細胞治療・基礎研究の専門家を含む、産官学で活躍する第一線の再生医療規制科学関係者・研究者とともに、再生医療の

国際調和を目指した研究発表および議論を行った。これは、ADMPCの安全性の検討に寄与するのみならず、本研究事業支援という意味でも大きく貢献するものとなった。また、ここまでの研究成果から得られた知見や幹細胞を用いた再生医療に係る薬事戦略支援の指針案となる幹細胞5指針の内容の充実、ならびに、現時点で取り纏めに至っている同指針を英文化(論文発表の項 15)し、その草稿をまとめるに至った。加えて、これらの成果は、当該年度の「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて(平成26年10月31日医政研発1031第1号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知)、生物由来原料基準の一部を改正する件(平成26年厚生労働省告示第375号)の政策提言としても反映された。

#### D.考察

本研究を通じて、主にヒト(同種・自己)体性幹細胞における安全性に関する項目を取り上げるに至った。これは、我々が別途草案し、平成24年9月に公表されたヒト幹細胞由来製品の品質及び安全性の確保に関する5つの薬事指針の報告とリンクして機能すると思われる。その要項を含んだ結果として、論文発表成果の2)に取り纏めるに至っている。また、平成26年度の再生医療等の安全性の確保等に関する法律(関係法令等:再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令(平成26年8月8日政令第278号)、再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則(厚生労働省令第110号)、再生医療の迅速かつ安全な研究開発及び提供並びに普及の促進に

関する基本的な方針(平成26年11月25日閣議決定)など)や幹細胞5指針を踏まえた本研究の確認申請制度要項精査が肝要であると思われる。これにより、本研究における安全性確保の側面は大幅に増強され、今後の臨床研究の展開を大きくサポートすることが考察できる。

#### E. 結論

本研究で見えてきた安全性に関する基本要素や最新の国内外の知見を的確に押さえつつ、当該年度までに築いた本件に関わる国際的ネットワークを最大限に活用し、広く国内外での最新動向を把握し、さらに、より有効で安全な幹細胞の在り方を検討できるであろう。また、成果として報告した最新の幹細胞の安全性の観点を包含した5指針案英語版は、上述の世界協調との背景も有しており、本研究のより具体的な方策を乗じていくことにこうげんできる。これこそが、本研究の目指す難治性疾患の先進医療への構築には重要であると結論づけられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Autologous Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
- 2) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices

Derived from the Processing of Allogenic Human Somatic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.

- 3) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Autologous Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
- 4) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Quality and Safety of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from Processing of Allogenic Human Induced Pluripotent Stem Cell (-Like Cells). Regenerative Therapy 2015 in press.
- 5) Takao Hayakawa, Takashi Aoi, Akihiro Umezawa, Keiya Ozawa, Yoji Sato, Yoshiki Sawa, Akifumi Matsuyama, Shinya Yamanaka, and Masayuki Yamato. Study on Ensuring the Safety and Quality of Pharmaceuticals and Medical Devices Derived from the Processing of Human Embryonic Stem Cells. Regenerative Therapy 2015 in press.
- 6) 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;23(18):2211-24.
- 7) 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.
- 8) Takayama K, Kawabata K, Nagamoto Y, Inamura M, Ohashi K, Okuno H, Yamaguchi T, Tashiro K, Sakurai F, Hayakawa T, Okano T, Furue MK, Mizuguchi H. CCAAT/enhancer binding

- protein-mediated regulation of TGF receptor 2 expression determines the hepatoblast fate decision. *Development*. 2014 Jan;141(1):91-100.
- 9) Yagi Y, Kakehi K, Hayakawa T, Suzuki S. Application of microchip electrophoresis sodium dodecyl sulfate for the evaluation of change of degradation species of therapeutic antibodies in stability testing. *Anal Sci*. 2014;30(4):483-8.
  - 10) Toshio Morikawa, Kiyofumi Ninomiya, Katsuya Imura, Takahiro Yamaguchi, Yoshinori Akagi, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Hepatoprotective triterpenes from traditional Tibetan medicine *Potentilla anserina*. *Phytochemistry*, **102**, 169–181 (2014).
  - 11) Toshio Morikawa, Yusuke Nakanishi, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Souichi Nakashima, Hisako Miki, Yu Miyashita, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka, Dimeric pyrrolidinoindoline-type alkaloids with melanogenesis inhibitory activity in flower buds of *Chimonanthus praecox*. *J. Nat. Med.*, **68**, 539–549 (2014).

## 2. 研究発表

- 1) Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa. 低酸素暴露を介する脂肪由来間葉系幹細胞のドーパミン産生細胞分化誘導. Mar, 4-6, 2014. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 2) Mariko Moriyama, Junki Uda, Hiroyuki Moriyama, Akifumi Matsuyama, Masatake Osawa, Takao Hayakawa. オートファジー関連分子 BNIP3 は、表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. Mar 4-6, 2014. 第 13 回日本再生医療学会総会. 京都.
- 3) 森山麻里子, 宇田純輝, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. オートファジーと皮膚構築. 皮膚の会(総会), Mar 15-16, 2014. 松山.
- 4) 森山博由. 再生医療を照らす脂肪由来幹細胞の製造法と派生效果. 5/14~5/16, 2014, BIO tech 2014 –国際バイオテクノロジー展/技術会議–アカデミックフォーラム. 東京.
- 5) Moriyama Hiroyuki, Moriyama Mariko, Ueda Ayaka, Nishibata Yusuke, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. ROLE OF NOTCH SIGNALING IN THE MAINTENANCE OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER HYPOXIC CONDITIONS. June 18 – 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 6) Uda Junki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Osawa Masatake, Hayakawa Takao. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. June 18 – 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 7) Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Sawaragi Kei, Okura Hanayuki, Matsuyama Akifumi, Hayakawa Takao. Development of a single tet-off lentiviral vector system with tightly regulated and homogeneous expression of target genes in human adipose-derived mesenchymal stem cells. June 18 – 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 8) Ohmori Shigenari, Taniguchi Yuki, Moriyama Mariko, Moriyama Hiroyuki, Hayakawa Takao. DIFFERENTIATION OF DOPAMINERGIC NEURONAL CELLS FROM HUMAN ADIPOSE-DERIVED MULTILINEAGE PROGENITOR CELLS. June 18 – 21, 2014, 12<sup>th</sup> ISSCR at Vancouver, CANADA.
- 9) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドーパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014 年 8 月 28 ~ 29 日, 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 東大阪.
- 10) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドーパミン産生細胞への誘導法の確立. 2014 年 8 月 28 ~ 29 日, 生体機能と創薬シンポジウム 2014. 東大阪.
- 11) 河野真有香, 森山麻里子, 中北和樹, 早川堯夫, 森山博由. 幹細胞資材における

- ウイルス混入及び残存試験法確立を目的とした高感度・高精度な新規核酸増幅基盤技術開発. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
- 12) 谷口祐紀, 森山麻里子, 大森重成, 早川堯夫, 森山博由. キンドラー症候群患者由来ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)より樹立したiPS細胞の皮膚ケラチノサイトへの分化誘導法確立. 2014年8月28~29日生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
  - 13) 山田 翼, 森山麻里子, 宇田純輝, 森山博由, 早川堯夫. BCL-2ファミリー分子BNIP3が表皮分化および表皮形態維持に及ぼす影響. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
  - 14) 百合祐樹, 森山麻里子, 森山博由, 早川堯夫. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在するOCT4陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか?. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
  - 15) 石原慎, 森山麻里子, 阪口公一, 石濱里穂, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の関係. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
  - 16) 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作製. 2014年8月28~29日, 生体機能と創薬シンポジウム2014. 東大阪.
  - 17) Tadashi Michiyama, Horoyuki Moriyama, Mario Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech, Toshio Morikawa. Inhibitory effects of oligostilbenoids from bark of *Shorea roxburghii* on malignant melanoma cell growth: implications for a candidate of novel topical anticancer agents. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
  - 18) MARIKO MORIYAMA, JUNKI UDA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. Sept 11-15, 2014. European society for dermatological research (ESDR). Copenhagen, Denmark.
  - 19) JUNKI UDA, MARIKO MORIYAMA, MASATAKE OSAWA, TAKAO HAYAKAWA, HIROYUKI MORIYAMA. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. Sept 22-26, 2014. Austrarian society for Dermatology Research (ASDR). Sydney, Australia.
  - 20) 宇田純輝, 森山麻里子, 北川綾弓, 野村昇吾, 早川堯夫, 森山博由. Bcl-2ファミリー分子BNIP3が表皮構築に及ぼす影響. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. [口頭発表] 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
  - 21) 雨宮有佑, 北野亮介, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 日本の新薬承認格差の現状とその打開策についての検討. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
  - 22) 山田翼, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. BCL-2ファミリー分子BNIP3と表皮分化および形態維持機構との関連性. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
  - 23) 石原慎, 森山麻里子, 阪口公一, 上村充香, 大石実央, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 低酸素状態におけるNotchシグナルと解糖系の相関性. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
  - 24) 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
  - 25) 曾根千晶, 森山麻里子, 大倉華雪, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたインスリン産生細胞の作成. [ポスター発表]第64回日本薬学会近畿支



- 部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
- 26) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表] 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
- 27) 道山 忠史, 森山 麻里子, 二宮 清文, Saowanee Chaipech, 村岡 修, 森川 敏生, 早川 堯夫, 森山 博由. 悪性黒色腫細胞に対する *Shorea roxburghii* 由来オリゴスチルベノイドの影響. 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
- 28) 北野亮介, 雨宮有佑, 古谷圭史, 村上健太, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 再生医療製品実用化における規制制度の課題について. [ポスター発表] 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
- 29) 野村昇吾, 森山麻里子, 宇田純輝, 早川堯夫, 森山博由. 表皮構築過程における Foxo3a の関与. [ポスター発表] 第64回日本薬学会近畿支部総会・大会. 10/11, 2011, 京都薬科大学, 京都.
- 30) 森山 麻里子, 宇田 純輝, 石濱 里穂, 大森 重成, 石原 慎, 曾根 千晶, 谷口祐紀, 百合 祐樹, 早川 堯夫, 森山 博由. 「贅肉は贅沢!? ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞の魅力」【講演】 Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 31) 宇田 純輝, 森山 麻里子, 早川 堯夫, 森山 博由. オートファジー制御関連分子 BNIP3 は表皮分化ならびに表皮形態維持に重要な働きをする. [口頭発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸. **[最優秀口頭発表賞受賞]**
- 32) 大森重成, 森山麻里子, 谷口祐紀, 深瀬堯哉, 松山晃文, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞 (hADMPC) を用いたドパミン産生細胞への誘導法の確立. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 33) 石濱里穂, 森山麻里子, 鈴木格, 早川堯夫, 森山博由. ヒト脂肪組織由来多系統前駆細胞(hADMPC)を用いたメラノサイトの作製. [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 34) 百合祐樹, 森山麻里子, 早川堯夫, 森山博由. 新規ヒト脂肪組織由来多能性前駆細胞に存在する OCT4 陽性細胞は真の多能性幹細胞たりうるのか? [ポスター発表] Nov 23, 2014, 第5回生命機能研究会, 甲南大学ポートアイランドキャンパス, 神戸.
- 35) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Oral presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 36) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 37) Shin Ishihara, Mariko Moriyama, Koichi Sakaguchi, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. [Oral presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 38) Shin Ishihara, Mariko Moriyama, Koichi Sakaguchi, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Role of Notch signaling in glycolysis regulation under hypoxic conditions. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 39) Riho Ishihama, Tadashi Michiyama, Hiroyuki Moriyama, Mariko Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya,

- Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech<sup>1,2</sup> and Toshio Morikawa. Inhibitory Effects of Oligostilbenoids from Bark of *Shorea roxburghii* on Malignant Melanoma Cell Growth: Implications for a Candidate of Novel Topical Anticancer Agents. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 40) Chiaki Sone, Mariko Moriyama, Hanayuki Okura, Akifumi Matsuyama, Takao Hayakawa, Hiroyuki Moriyama. Transdifferentiation of human adipose tissue-derived multilineage progenitor cells into insulin-producing cells. [Poster presentation] The 36<sup>th</sup> annual meeting of the molecular biology society of Japan. Nov 25-27, Pacifico-Yokohama, Yokohama, Japan.
- 41) Junki Uda, Mariko Moriyama, Hiroyuki Moriyama, Takao Hayakawa. BNIP3 PLAYS CRUCIAL ROLES IN THE DIFFERENTIATION AND MAINTENANCE OF EPIDERMAL KERATINOCYTES. [Oral presentation] The 39<sup>th</sup> annual meeting of the Japanese society for Investigative Dermatology. Dec 12-14, Expopark-Hankyu Osaka, Japan.
- 42) Mariko Moriyama. BNIP3 Plays Crucial Roles in the Differentiation and Maintenance of Epidermal Keratinocytes. Looking to the future of Notch signaling. December 18th, 2014. Institute for Protein Research, Osaka University, Osaka, Japan.
- 43) Kiyofumi Ninomiya, Toshio Morikawa, Taku Matsumoto, Mayumi Sueyoshi, Seiya Miyazawa, Shunsuke Saeki, Saowanee Chaipech, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka. Anti-inflammatory effects and mode of action of prenylcoumarins from Thai natural medicine *Mammea siamensis*. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 44) Toshio Morikawa, Ikuko Hachiman, Kiyofumi Ninomiya, Hisashi Matsuda, Yuki Hata, Kaoru Sugawara, Yuri Sakata, Masayuki Yoshikawa, Takao Hayakawa, Osamu Muraoka. Antiallergic principles from *Myristica fragrans*: inhibitors of degranulation and TNF- release in RBL-2H3 cells. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 45) Tadashi Michiyama, Horoyuki Moriyama, Mario Moriyama, Takao Hayakawa, Kiyofumi Ninomiya, Osamu Muraoka, Saowanee Chaipech, Toshio Morikawa. Inhibitory effects of oligostilbenoids from bark of *Shorea roxburghii* on malignant melanoma cell growth: implications for a candidate of novel topical anticancer agents. The 27th International Conference on Polyphenols (ICP2014), (Nagoya, Japan), 2014.9.
- 46) Kiyofumi Ninomiya, Toru Minamino, Kaiten Ozeki, Natsuko Matsuo, Chihiro Kawabata, Takao Hayakawa, Toshio Morikawa. Effects of constituents from hooks of *Uncaria rhynchophylla* on neurite outgrowth and TNF- -induced cell damage. The 8th JSP-CCTCM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, (Fukuoka, Japan), 2014.9.
- 47) 第四回ウィリアムハンコック賞 (4th William Hancock Award) 受賞 基調講演, On January 27-29, 2015 WCBP2015 (the CASSS Board). Mayflower Renaissance Hotel, Washington, DC.
- 48) 2015 IABS meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], Challenges for developing a minimum consensus package plus case by case approaches for evaluating cell therapy products. February 18-19th, 2015. Hitotsubashi Hall, Tokyo, Japan.
- 49) 2015 IABS meeting [International Regulatory Endeavor towards Sound Development of Human Cell Therapy Products], Specifications. February 18-19th, 2015. Hitotsubashi Hall, Tokyo, Japan.
- I. 知的財産権の出願・登録状況  
1) 記載事項なし

## II. 政策への提言

- 1) 「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令」及び「再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行規則」の取扱いについて(平成 26 年 10 月 31 日医政研発 1031 第 1 号厚生労働省医政局研究開発振興課長通知)
- 2) 生物由来原料基準の一部を改正する件」(平成 26 年厚生労働省告示第 375 号);
- 3) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成 25 年厚生労働省告示第 317 号)
- 4) ヒト(自己)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 2 号)
- 5) ヒト(同種)体性幹細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 3 号)
- 6) ヒト(自己)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 4 号)
- 7) ヒト(同種)iPS(様)細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 5 号)
- 8) ヒト ES 細胞加工医薬品等の品質及び安全性の確保について(平成 24 年 9 月 7 日薬食発 0907 第 6 号)(URL)  
<http://www.nihs.go.jp/cgtp/cgtp/sec2/sispsc/html/regulation.html>
- 9) 厚生科学審議会ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する検討の見直しに関する専門委員会での提言
- 10) 厚生労働省医薬食品局「薬事法改正における再生医療製品の位置づけに関する意見交換会」での提言

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**プロジェクトの総合推進**

**(プロジェクト全体のマネージメント)**

**ADMPC移植の実施**

**(免疫抑制療法に関する助言)**

**担当責任者：**

**大阪大学医学部附属病院・未来医療開発部・血液内科・講師**

**江副幸子**

**研究要旨**

本研究において、プロジェクトマネージャ (PM) としてプロジェクト全体のマネージメントを行っている。本年度は実施計画書の作成と、細胞培養における体制整備を行った。

実施計画書の作成においては、免疫抑制剤の設定についての検討を行った。また、試験物概要書の作成においては、適切な培養方法と試薬の選択に関与した。さらに培養工程においては、大阪大学医学部附属病院未来医療センター内細胞培養施設 (CPC) での培養について閉鎖経由ニットの利用について検討した。さらに、製品標準書、標準業務手順書の作成についてアドバイスを行った。今年度は再生医療等の安全性確保等に関する法律が制定されたため、それに併せて細胞調製施設の管理についても体制整備を行った。

**研究協力者 (順不同)**

なし

**A . 研究目的**

本研究においては、当初、ヒト幹細胞に関

する指針に則り正しくヒト幹細胞臨床研究

が実施されるよう、実施計画書の作成に参

画した。特に、血液疾患領域での移植経験等から免疫抑制剤の適正使用について検討した。さらに、大阪大学医学部附属病院未来医療センター内 CPC において臨床研究に用いる脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) が適切に培養されるよう体制整備を行った。

## B . 研究方法

### 1 . 実施計画書の作成

非臨床試験では免疫抑制剤をラビットに投与した成績が示されている。臨床研究期間において移植細胞の効果が検証できるよう、また、当該疾患患者における副作用の影響等を考慮し生体肝細胞移植などの文献を元に免疫抑制剤の選択について検討した。

### 2 . 試験物概要書の作成

培養方法における検討を行った。培養細胞の細胞数、dish の数が非常に多くなることから、安全キャビネットの利用法、品質管理のためのサンプリングについての最適化について検討した。さらに培養に用いる血清については、安定性を重視し、ウシ血清を用いることとしたが、安全なウシ血清の選択について検討した。

### 3 . CPC 利用についての検討

大阪大学医学部附属病院未来医療センター内 CPC には現在 6 つの開放系ユニットと 2 つの閉鎖系アイソレータがあり、細胞培養のスケールが大きいことから、開放形ユニットを利用することになるが、インキ

ュベータへの収納、細胞回収時の作業の流れについて検討した。

### 4 . 製品標準書、標準業務手順書の作成

最適な培養方法の確認を行い、標準業務手順書 (SOP) の作成に参画した。さらに、工程管理システムに載せるため、業者と交渉を行った。

### 5 . 再生医療新法への対応

大阪大学医学部附属病院未来医療センターにおける CPC の設置と体制、文書について新法への対応を行った。新法に定められた SOP の作成と新法に則した SOP の改訂を行いさらに新法に対応して実施体制の改正をおこなった。

## C . 研究結果

1 . 高脂血症モデルラビットを用いた前臨床試験では、シクロスポリン A、メチルプレドニゾロン、シクロフォスファミド、ラパマイシンの多剤併用による免疫抑制によりヒト ADMPC の効果を示すこと、さらに免疫抑制剤を off とすることにより、効果が消失することが示されている。なお、シクロスポリン、メチルプレドニゾロンには血糖上昇、脂質異常といった副作用が報告されており、病態をむしろ悪化させる可能性がある。また、ラパマイシンにも高脂血症の副作用が報告され、シクロフォスファミドは骨髄抑制の可能性がある。

生体肝移植においては、シクロスポリン

またはタクロリムス、副腎皮質ステロイド、プラス アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル、ミゾリビンなどが用いられている。

本研究においては、分権的に最も原病への影響が少ないと考えられるタクロリムス単独での免疫抑制が妥当と考えられた(1-4)。

また、投与期間については、非臨床試験の結果から免疫抑制剤を一生用いることが効果の持続には適切と考えられる。しかし、長期投与による感染症、腎障害、その他の副作用を考え、臨床研究期間内での効果の評価を可能とするため移植全日から移植後16週までとすることが妥当と考える。

2. 細胞数、純度の試験において、サンプリングの方法を検討し、1回目の回収細胞の一部を品質試験に供することを決定した。自己血清を用いることにより培養効率が安定しないことが判明したためウシ血清を用いることが妥当と考えられた。BSE 発症地域ではないオーストラリア産のウシ血清を用いることとした。

3. 最終培養 Dish 数は 300 にも及ぶことから、2つの安全キャビネットを用いることを検討し、細胞調製ユニット内での調整に問題が無いことを確認した。また、細胞回収に要する時間が長時間となることから、移植までの間放置することにより細胞のダメージがあり得ることを検証し、2~3回にわけて出荷することを検討した。

4. 製品標準書、標準業務手順書の作成を行った。今後、ドライラン、コールドランを実施し、工程が適切であることを確認する。

5. 2014年11月に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が施行され、これまでのヒト幹細胞臨床研究指針に取って代わることになる。この法律に合致させるため、従来大阪大学医学部附属病院未来医療センターCPCに備わっている品質マニュアル、3管理基準書、SOPの改訂を進め、さらに施設登録を行うため、規程の作成をおこなった。確保法に準拠した実施体制の整備を行った。

#### **D. 考察**

本研究は、First in humanの研究であり、安全性、有効性については不明である。再生医療の中でも同種(他家)移植はこれまで数少なく、免疫抑制剤の適正投与についてはいまだ確立したものがない。本研究の実施においては慎重に進め、安全性について確実に検証しながら実施することが必要である。本研究の対象疾患はきわめてまれな疾患であるが、難治性で患者は週に一回のアフェレーシスによりQOLを大きく損なわれている上、十分な効果がなく、多くは血管障害などにより命の危険にさらされているのが現状である。

そのような患者に新たな細胞を用いた治療法が確立されれば、患者だけでなく、家族や社会全体にとってもきわめて意義深いことである。

本研究を実施するに当たり、安全性、有効性を正しく評価できるように実施体制、細胞培養施設の衛生環境、倫理性について慎重に適切に実施することが肝要である。また、プロトコル、SOP が遵守されていること、安全性、倫理性の配慮が十分行えていることについては、モニタリング、監査等の実施の中で検証されていくことが必要である。

#### **E . 結論**

本研究が、法のもとに正しく行われ、倫理性を配慮し、安全性を確保しつつ、より有効な治療法の開発につながることを目的としてプロジェクトマネジメントを行った。

#### **F . 健康安全情報**

なし

#### **G . 研究発表**

なし

#### **H . 知的財産権の出願・登録状況**

なし

#### **参照**

- 1 . Hadded E, McAlister V, et al. Cyclosporin versus tacrolimus for liver transplanted patients. The Cochrane collaboration, 2009
- 2 . Starzl TE, Kintmalm GBG, Porter KA, et al. Live transplantation with use of cyclosporine A and prednisone. N Engl J med. 2009
- 3 . No author listed, A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression in liver transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Liver Study Group. N Engl J med, 1994
- 4 . O'Grady JG, Hardy P, Burroughs AK, et al. Randomized controlled trial of tacrolimus versus microemulsified cyclosporine (TMC) in liver transplantation: poststudy surveillance to 3 years. Am J Transplantation, 2007

#### **厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP) を用いた細胞移植療法の確立」**

## 委託業務成果報告(業務項目)

### 実施体制の確立と調整

(患者会での広報)

担当責任者：

国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部長

斯波真理子

#### 研究要旨

家族性高コレステロール血症(FH)ホモ接合体および重症ヘテロ接合体患者は、スタチンなどの薬剤に対して抵抗性を示すため、LDL コレステロールのコントロールにはLDL アフェレーシス治療が必要である。本研究においては、これらの患者を対象として、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPc)を用いた細胞移植療法の確立することを最終目的とし、臨床試験実施のための体制構築を行った。家族性高コレステロール血症・アフェレーシス患者会の総会において本研究についての資料を配布し、説明を行った。本研究への理解と協力を促す基盤を構築し、実施体制を確立した。

#### 研究協力者(順不同)

小倉正恒	国立循環器病研究センター研究所 病態代謝部
堀 美香	国立循環器病研究センター研究所 病態代謝部

#### A. 研究目的

家族性高コレステロール血症(FH)はLDL受容体関連遺伝子の変異による遺伝病で、高LDLコレステロール血症、皮膚および腱黄色腫、若年性動脈硬化症による冠動脈疾

患を特徴とする。動脈硬化症の発症や進展を予防するため、薬剤によるLDL-C値のコントロールが重要である。特にFHホモ接合体や重症ヘテロ接合体は、スタチンなどの薬剤に抵抗性を示し、LDLアフェレーシス



を施行が必要である。しかしながら、LDL アフェレーシスは精神的、身体的、時間的負担が大きく、新しい治療法の開発が望まれている。本研究では、これらの重症家族性高コレステロール血症に対して、新しい治療法として同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立することを最終目的とし、本年度は、臨床試験実施のための体制構築を行った。

## B . 研究方法

家族性高コレステロール血症・アフェレーシス患者会の総会 (2014 年 10 月 26 日開催) において、本研究についての資料を配布するとともに、内容、方法、参加のための条件、意義などについて説明した。その後、質疑応答を行い、参加者からの疑問に答えた。

## C . 研究結果

家族性高コレステロール血症・アフェレーシス患者会の総会において以下の内容で説明を行った。また、欠席者には、資料と説明の文書を送付した。

家族性高コレステロール血症は、肝臓の LDL 受容体の欠損により血中の LDL コレステロール値が高くなる病気であるが、今回の治療方法は、肝臓移植の代わりに LDL 受容体が正常の健常者の脂肪組織から一種の幹細胞を分離・培養し、患者の肝臓内に移植する治療方法である。平成 20 年より研

究を開始しており、昨年より大学の倫理委員会、今年 1 月に厚生労働省の倫理委員会に臨床研究試験の実施を申請し、最終的に 8 月に承認され、9 月に実施を許可する大臣意見書が公布された。本年 1 1 月以降に開始可能な状況になる予定である。

初めての治療法であり、安全性、有効性を示すデータはないが、モデル動物であるウサギにこの細胞を移植した実験では、LDL コレステロールは半分 (ヘテロ) 程度まで低下している。最終的には、スタチン、新規薬剤を併用して LDL アフェレーシスの回数を減らす、あるいは離脱するということを目標にしている。効果の持続期間に関してデータはないが、類似の治療法である膵島移植では、治療後に半数の患者では 2 年後までの効果が継続したという報告がある。

治療期間は、提供する側は「2 泊の入院」、治療を受ける患者は「1 ~ 2 週間の入院」臨床研究に関して、患者負担は発生しない。

これらの説明に対して、参加者から、以下の質問が寄せられた。

1. 細胞を提供する人は、家族でなければならぬのか？
2. LDL アフェレーシスは、普段行っている病院で続けてもよいのか？
3. この治療が成功すれば、LDL アフェレーシスをやめることができるのか？

## D . 考察

FH ホモ接合体および重症ヘテロ接合体は、スタチンなどの LDL コレステロール値のコントロールが困難であり、LDL アフェレーシス治療を必要とする。しかしながら、LDL アフェレーシスは精神的、身体的、時間的負担が大きく、より負担の少ない治療法が望まれている。本研究の、同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立は、これらの患者にとって極めて望まれている方法であり、実際、患者会での説明の際の期待感も高いものであった。来年度における臨床試験の実施のために、本年度は本研究への理解と協力を促す基盤を構築し、実施体制を確立することができた。

## E . 結論

同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立のための、候補となる患者の理解と協力を促す基盤を構築し、実施体制を確立した。

## F . 健康安全情報

なし

## G . 研究発表

### G - 1 . 論文発表

論文

- 1) Pang J, Sullivan D R, Harada-Shiba M, YA Ding P, Selvey S, Ail S, Watts G F, Significant Gaps in Awareness of

Familial Hypercholesterolaemia among Physicians in selected Asia-Pacific Countries: a Pilot Study, Journal of Clinical Lipidology, im press

- 2) Hori M, Ishihara M, Yuasa Y, Makino H, Yanagi K, Tamanaha T, Kishimoto I, Kujiraoka T, Hattori H, Harada-Shiba M. Removal of plasma mature and furin-cleaved proprotein convertase subtilisin/kexin 9 (pcsk9) by low-density lipoprotein-apheresis in familial hypercholesterolemia: Development and application of a new assay for pcsk9. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2014;jc20143066
- 3) Teramoto T, Sasaki J, Ishibashi S, Birou S, Daida H, Dohi S, Egusa G, Hiro T, Hirobe K, Iida M, Kihara S, Kinoshita M, Maruyama C, Ohta T, Okamura T, Yamashita S, Yokode M, Yokote K, Harada-Shiba M, Arai H, Bujo H, Nohara A, Oikawa S, Okada T, Wakatsuki A: Familial hypercholesterolemia, J Atheroscler Thromb, 21: 6-10, 2014.
- 4) Nagasaki Y, Yamazaki T, Kikuchi A, Harada-Shiba M: Elevated atherogenic index following oral administration of quaternized

polyamine nanogels, Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 113: 237-242, 2014.

- 5) Yuasa Y, Osaki T, Makino H, Iwamoto N, Kishimoto I, Usami M, Harada-Shiba M: Proeomic analysis of proteins eliminated by LDL-apheresis, Ther Apher Dial, 18(1): 93-102, 2014.
- 6) Yokoyama S, Ueshima H, Miida T, Nakamura M, Takata K, Fukukawa T, Goto T, Harada-Shiba M, Sano M, Kato K, Matsuda K: High-density lipoprotein levels have markedly increased over the past twenty years in japan, J Atheroscler Thromb, 21(2): 151-160, 2014.

#### 総説

- 1) 小倉正恒, 斯波真理子: 動脈硬化症の治療標的 - 脂質代謝を中心に, 臨床検査 Vol.59 No.2, 133-141, 2015.2
- 2) 安原秀典, 和田俊輔, 斯波真理子: 第6節 PCSK9, series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用 - 脂質代謝異常と関連疾患 <上巻> 180-194, 2015.1
- 3) 和田俊輔, 斯波真理子, 小比賀聡: 第5節 ARH, series モデル動物利用マニュアル 疾患モデルの作製と利用 - 脂質代謝異常と関連疾患 <上巻> 169-179, 2015.1
- 4) 小倉正恒, 斯波真理子: 重症高コレステロール血症の治療, Annual Review 2015 糖尿病・代謝・内分

泌, 133-140, 2015.1

- 5) 斯波真理子: 補助療法 LDL アフェレシス, 高 LDL-C 血症 低 LDL-C 血症 診断と治療の ABC 101, 196-203, 2015.1
- 6) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症への対応, 動脈硬化予防 Vol.13 No.4, 36-41, 2015.1
- 7) 榎野久士, 斯波真理子: Low density lipoprotein(LDL) アフェレシス, 人工臓器 43 巻 3 号, 197-201, 2014.
- 8) 和田郁人, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子: 新規人工核酸を基盤とした循環器疾患の新たな治療薬の開発, 循環器病の進歩 Vol.XXXV No.1, 60-68, 2014.11
- 9) 斯波真理子: すべては患者さんのために - 脂質代謝異常研究の最前線で, 糖尿病診療マスター Vol.12 No.8,772-778, 2014.11
- 10) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症, Current Therapy Vol.32 No.9, 95 ( 927 ), 2014.9
- 11) 榎野久士, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症に対する LDL アフェレシスの治療効果と臨床評価方法, 日本アフェレシス学会雑誌 33 巻 2 号, 129-134, 2014.5
- 12) 小倉正恒, 斯波真理子: 脂質異常症, 内科 Vol.113 No.6, 1558-1561, 2014.6
- 13) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症 ( FH ), 診断と治療 第

- 102 卷 第 5 号, 757-761, 2014.5
- 14) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症 (PCSK9, ARH) と黄色腫, 動脈硬化, The Lipid, Vol.25 No.2, 2014.4
  - 15) 斯波真理子., 家族性高コレステロール血症, あなたも名医! パターンで把握する脂質異常症治療, jmed31, 134-138, 2014.4
  - 16) 小倉正恒, 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症を再考する, Vascular Medicine, Vol.10 No.1, 2014.4

## G - 2 . 学会発表

(国際学会)

- 1) Ogura M, Hori M, Harada-Shiba M, Serum Total Bilirubin Levels in Japanese Patients with Familial Hypercholesterolemia, The 2<sup>nd</sup> World Congress of Clinical Lipidology, 2014 年 12 月 5 日 ~ 7 日, Vienna, Austria
  - 2) Harada-Shiba M, Management of pregnancy and delivery in 4 homozygous FH with LDL apheresis, 9<sup>th</sup> LIPIDCLUB & Therapeutic Apheresis 2014, 2014 年 6 月 6 日 ~ 7 日, Rome
  - 3) Harada-Shiba M, Yamamoto T, Yasuhara H, Wada F, Wada S, Shibata M.A, Obika S, Long Term Effect of Bridged Nucleic Acid(BNA)-Based Antisense Targeting PCSK9 on Metabolism and Inflammation, 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society, ポスター発表, 2014 年 5 月 31 日 ~ 6 月 3 日, Madrid Spain
- 4) Harada-Shiba M, Efficacy of Evolocumab(AMG145) in Patients with PCSK9 Gain-of-Function Mutations, 82<sup>nd</sup> European Atherosclerosis Society, Clinical and Late Breaking Session 1, 2014 年 5 月 31 日 ~ 6 月 3 日, Madrid Spain
- (国内学会)
- 1) 柴田映子, 柴田雅朗, 斯波真理子, 動脈硬化の治療実験モデルとして ApoE-KO マウスを用いるための基礎的解析, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日 ~ 11 日, 東京
  - 2) Ohta N, Hori M, Fujiwara A, Fujiyama H, Sano M, Tamanaha T, Makino H, Kishimoto I, Miyamoto Y, Harada-Shiba M, Characteristics of heterozygous familial hypercholesterolemia with mutations in between LDLR, PCSK9 and LDLRAP1 gene, 第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014 年 7 月 10 日 ~ 11 日, 東京
  - 3) 小倉正恒, 槇野久士, 玉那覇民子, 肥後諒, 菱田藍, 長谷川夕希子, 岸本一郎, 斯波真理子, 冠動脈三枝病変を合併した家族性高コレステロール血症ヘテロ接合体高齢初

- 産の1例, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 4) 道倉雅仁, 小倉正恒, 富家千鶴, 肥後諒, 菱田藍, 椽谷真由, 大畑洋子, 玉那覇民子, 槇野久士, 柴田映子, 堀美香, 岸本一郎, 斯波真理子, 超音波で測定したアキレス腱厚と頸動脈内膜中膜複合体厚の関連, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 5) Horii M, Yuasa Y, Makino H, Komai H, Yanagi K, Koezuka R, Tamanaha T, Kishimoto I, Hattori H, Harada-Shiba M, LDL apheresis treatment by both LDL adsorption and double membrane filtration reduces plasma levels of mature and furin-cleaved PCSK9s, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, ポスター発表, 2014年7月10日~11日, 東京
- 6) 斯波真理子, 荒井秀典, 山下静也, 石橋俊, 我が国における家族性高コレステロール血症ホモ接合体の実体調査, 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会, シンポジウム5, 2014年7月10日~11日, 東京

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### H - 1 . 取得特許

なし

### H - 2 . 実用新案登録

なし

### H - 3 . その他

#### 【政策への提言】

なし

## (資料)

### LDL アフェレーシス療法を受けている家族性コレステロール血症患者の会での配布資料

## LDLアフェレーシス療法実施中の家族性高コレステロール血症患者様に対する、多系統前駆細胞を用いた新治療法の臨床研究についてのお知らせ

### 【臨床研究の名称】

「重症家族性高コレステロール血症（主としてホモ接合体）に対する同種脂肪組織由来多系統前駆細胞移植療法の安全性の検討」

### 【研究を実施する主な医師】

山下静也：

大阪大学大学院医学系研究科 総合地域医療学寄附講座 循環器内科学：教授

小関正博

大阪大学大学院医学系研究科 総合地域医療学寄附講座 循環器内科学

ス波真理子

国立循環器病センター研究所 代謝部：部長

柳光司

健保連大阪中央病院 循環器内科：部長

ほか9名

### 【研究の概要】

家族性高コレステロール血症は、主としてLDL受容体の欠損により、血中LDLコレステロール値が異常高値を示す疾患です。ホモ接合体では30歳代で心筋梗塞などの冠動脈硬化症を発症することもあり、国の難治性疾患克服研究事業の特定疾患に指定されている難病です。

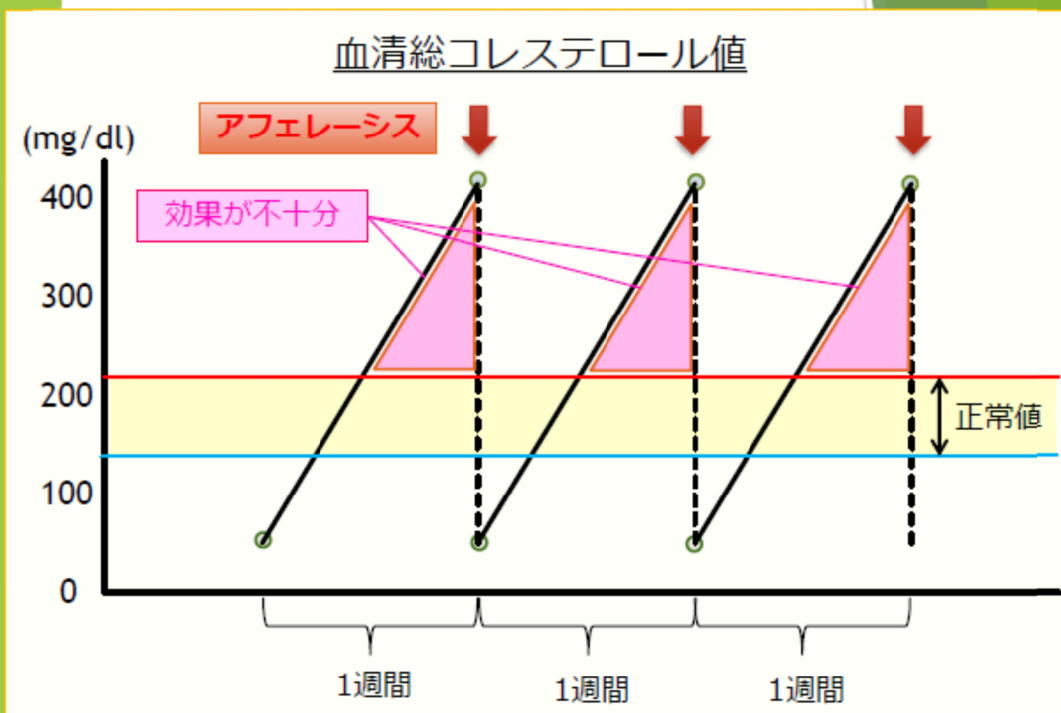
標準的治療として、週1回のLDLアフェレーシス(吸着)療法がおこなわれていますが、LDLの除去効果が一時的であり、患者さんの体力的・時間的負担も大きく完全な治療法とは言えません。これまでの根治的治療法として、肝臓移植があります。実際にはドナーの制約からほとんど実現していません。

そこで、大阪大学循環器内科を中心とする研究グループでは、健常提供者から肝臓を移植するかわりに、脂肪組織を吸引採取し、脂肪組織由来多系統前駆細胞（adipose tissue-derived multilineage progenitor cells；ADMPC）という体性幹細胞の一種を分離し、細胞調整室内で安全に3-4週間培養した後、患者さんの肝臓内にカテーテルから移植するという、まったく新しい治療法を考案し、これまで5年間にわたって、実験動物を用いて有効性、安全性を検討してまいりました。

その結果をもとに作成した臨床研究計画が、平成26年6月厚生労働省の倫理委員会で認められ、平成26年9月実施を許可する厚生労働大臣の大臣意見書が交付されましたので、ご紹介させていただきたいと思います。

我々は、この治療法により肝臓でのLDL処理機能を回復し、最終的に薬物療法との併用によりLDLアフェレーシスの頻度を減らす、予後を改善できる可能性があると考えています。

## 1. LDLアフェレーシス療法の課題



1. 効果：LDLコレステロールを取り除けているが、効果が一時的  
コレステロール低下効果が動脈硬化進展を抑制するのに  
十分とは言えない

週一回施行しても、1週間のうち正常値以下の期間が半分程度ある

2. 費用：一回約18万円と高額なコスト（年間約1000万円）
3. QOL：体力的な負担、週一回の通院、一回4-5時間の拘束

## 2. 同種ADMPC移植療法の流れ図

1. 説明と同意取得

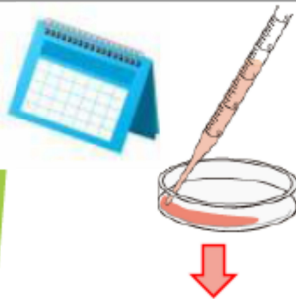
2. スクリーニング

3. 登録

4. 提供者から脂肪組織採取



6. ADMPCの培養(約1ヵ月間)

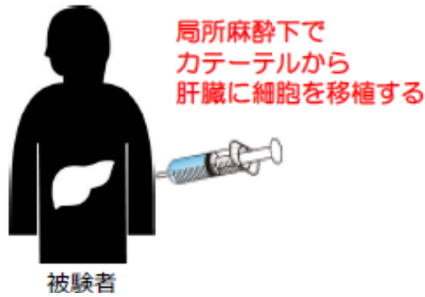


5. 脂肪組織からADMPCを単離

ADMPC: 脂肪組織由来多系統前駆細胞



7. 患者さんにADMPCを移植



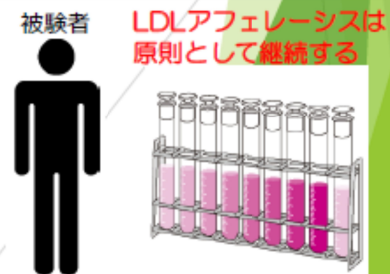
8. 免疫抑制剤内服(移植後-16週目)



10. 観察期間終了(移植後20週目)



9. 月一回通院(移植後20週目まで)

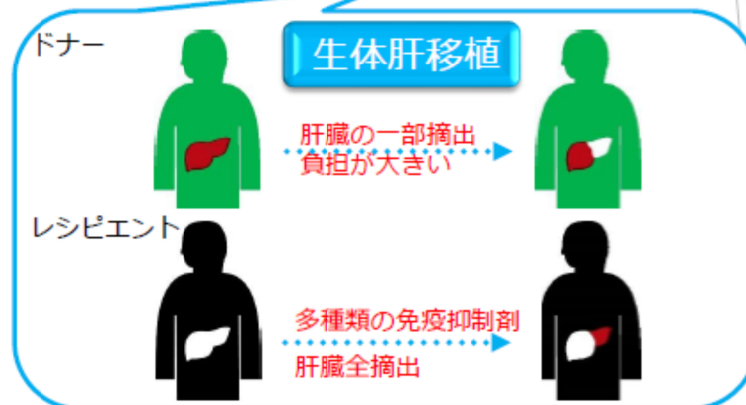




### 3. 肝臓移植との違い

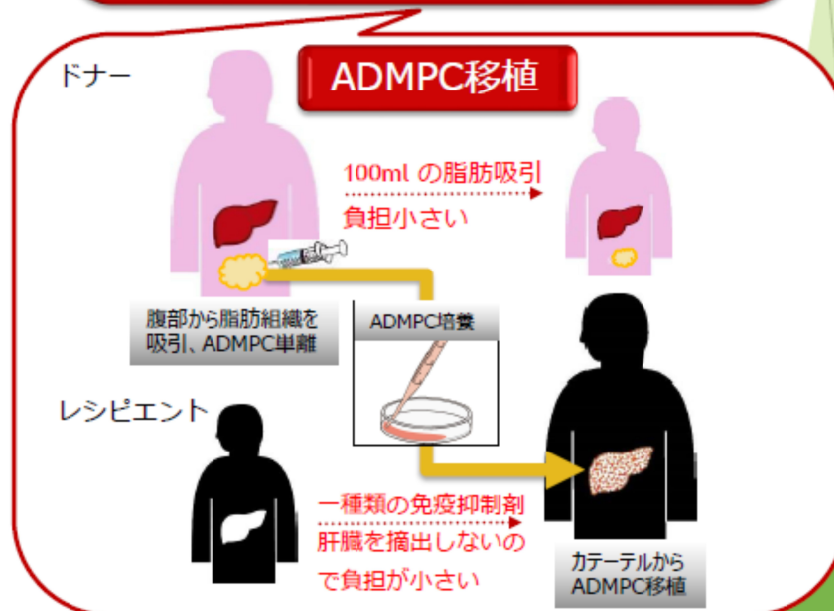
#### 根治療法としての肝臓移植術

- ・ 生体肝移植：ドナーへの負担が大きい
- ・ 脳死肝移植：ドナーの入手困難性
- ・ 免疫抑制による脂質代謝の悪化
- ・ レシピエントは肝臓全摘出による拒絶反応時のリスク



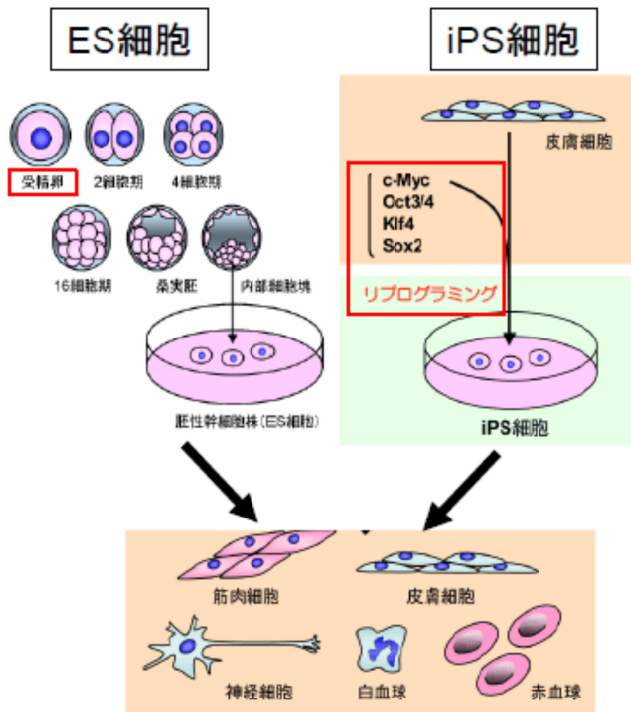
#### 根治療法としてのADMPC移植療法

- ・ ドナーからは肝の代わりに脂肪を吸引：ドナーへの負担が少ない
- ・ ADMPCは骨髄由来幹細胞数に比して多く採取できる
- ・ ADMPCは容易に細胞数を増やせる
- ・ ADMPCは免疫抑制作用がある可能性がある
- ・ 前駆細胞移植は肝細胞移植にくらべて効果が持続する可能性
- ・ 分化、生着、長期有効性が、完全には明らかでない



## 4. ADMPCとは

<いろいろな幹細胞の種類と違い>



体性幹細胞

体中に存在  
 骨髄  
 脂肪  
 心臓  
 ...

ADMPCは脂肪  
 組織由来の体性  
 幹細胞の一種です

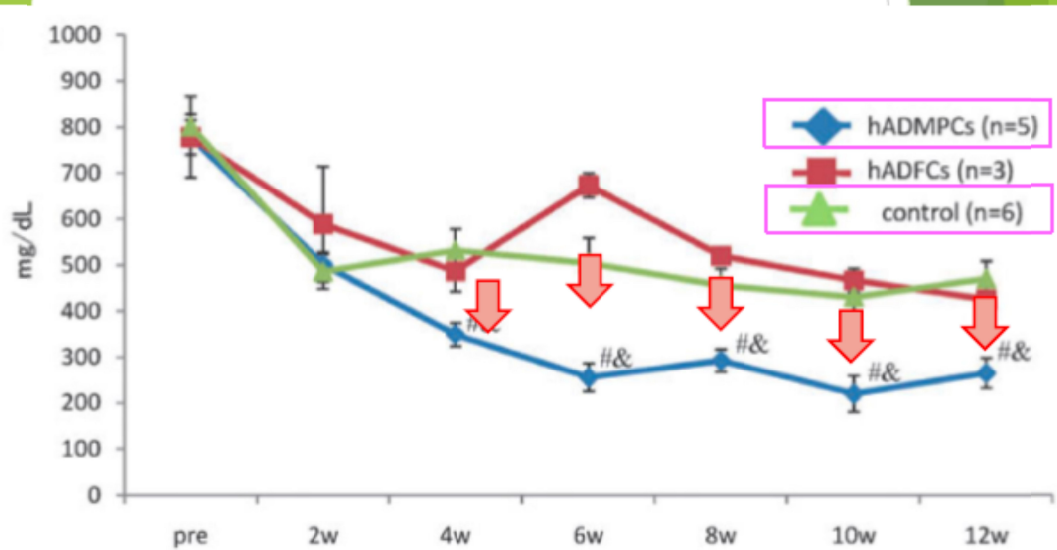
<幹細胞のまとめ>

	ES細胞	iPS細胞	体性幹細胞
作成方法	胚を壊して作成	Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc	体中に存在
免疫拒絶反応	おきうる (他人)	おきにくい (自己)	おきにくい (自己)
誘導できる細胞	あらゆる種類の 細胞	あらゆる種類の 細胞	ある程度限定
増殖能	高い	高い	ある程度限定
腫瘍化リスク	高い	高い	低い

脂肪組織にも体性幹細胞が存在します

## 5. 動物実験（ウサギ）のデータ

- 高コレステロール血症モデルウサギにヒトADMPcを移植した
- 移植後4週目以降に、有意な血清総コレステロール低下効果を確認した

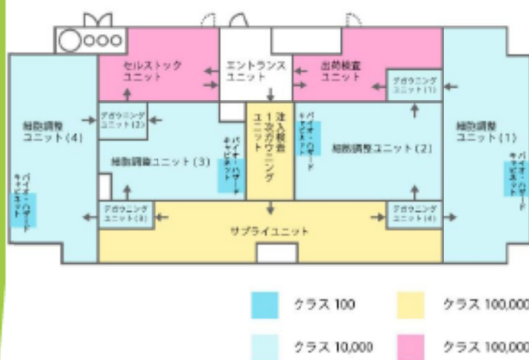


(Tissue Eng. Part C Okura et al 2011)

## 6. 治療用細胞を培養するための 専用施設

大阪大学医学部附属病院  
未来医療センター 細胞調整室

患者さんへ投与する細胞は、治療用細胞培養調製室（CPC）で  
期間中患者さん毎に専用で、培養されます。

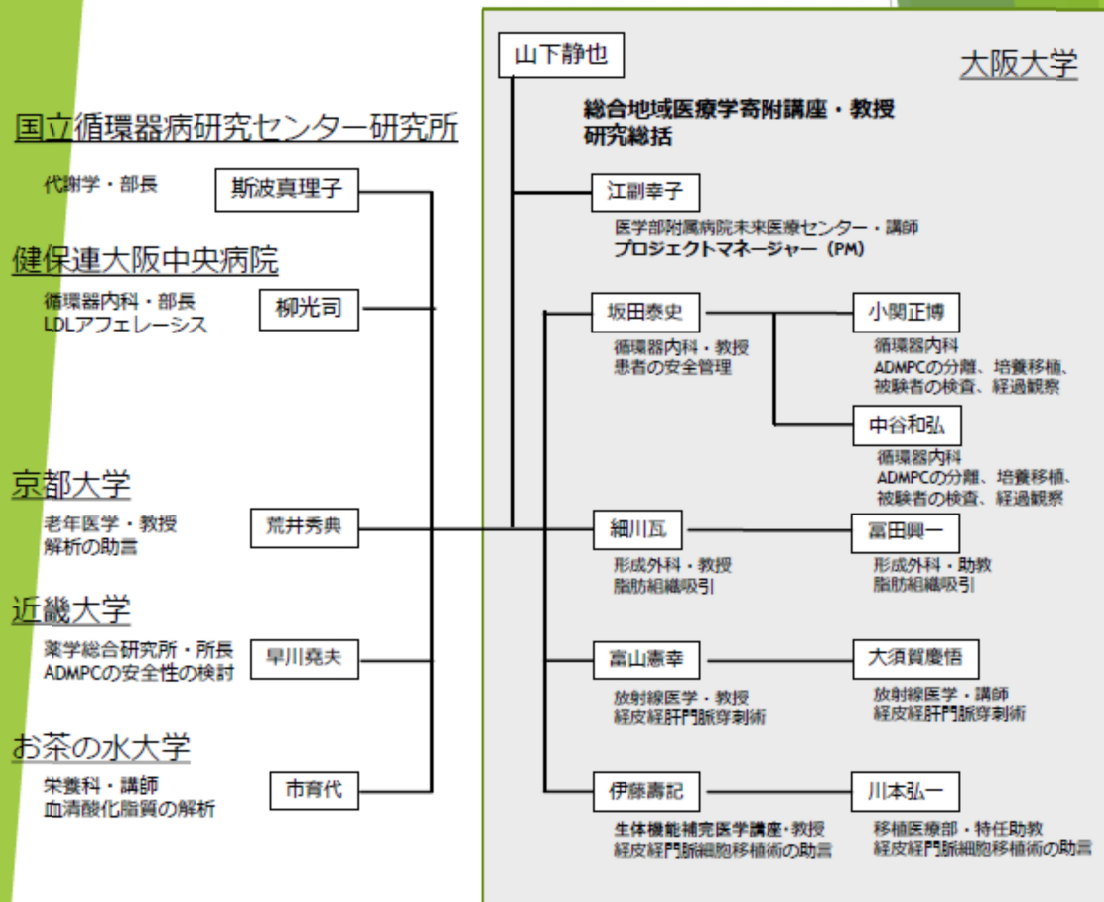


<細胞調整室内でのトレーニングの様子>



細胞調整室ないでは、いかなる混入物も防ぐため、**嚴重な防護服**を  
着用し、細胞を培養します。

## 7. 臨床研究の体制



お問い合わせ先：

大阪大学大学院医学系研究科  
循環器内科 循環器脂質・動脈硬化研究室  
山下静也・小関正博までお問い合わせください

〒565-0871  
大阪府吹田市山田丘2-2臨床研究棟6F  
06-6879-3633  
E-mail : koseki@cardiology.med.osaka-u.ac.jp (小関)

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**ADMPC 移植の実施**

**(脂肪組織吸引採取の最適化と実施)**

**担当責任者：**

**大阪大学大学院医学系研究科・形成外科学教授**

**細川 互**

**大阪大学大学院医学系研究科・形成外科学助教**

**富田 興一**

**研究要旨**

家族性高コレステロール血症においては現在対症療法としての LDL アフェレーシス療法が標準治療となっており、根治療法の確立が望まれる。これまで臨床応用報告のある同種肝移植術は患者・臓器提供者ともに大きな侵襲が加わることもあり一般的治療とはなっておらず、より侵襲の少ない根治療法の開発が望まれる。本研究においては、皮下脂肪より低侵襲に採取でき、短期間大量培養が可能である同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) 移植療法による根治療法の確立を目的とした。今年度は臨床試験の準備段階としてヒト患者より吸引により採取され、その後廃棄される脂肪から ADMPC 単離・培養を行い、得られた細胞の量・質の解析を行った。その後実際の細胞移植を想定し、未来医療センター Cell Processing Center におけるドライラン、コールドランを実施した。全ての手順の確認および得られた ADMPC の品質確認を行い、100ml 未満の吸引脂肪から約 3 - 4 週間で十分な細胞数 ( $3 - 6 \times 10^8$ ) が得られることを確認した。100ml 未満の吸引脂肪は局所麻酔下において十分採取可能な量であると考えられ、細胞提供者に対する侵襲は非常に小さいことが示唆された。

## 研究協力者（順不同）

西林章光	大阪大学医学部附属病院 形成外科 医員

### A . 研究目的

家族性高コレステロール血症においては現在対症療法としての LDL アフェレーシス療法が標準治療となっている。未治療例においては若年発症の心筋梗塞を来すなど、予後不良の疾患であり根治療法の確立が急務である。これまで数例の同種肝移植術の報告があるものの、患者・臓器提供者ともに大きな侵襲が加わることもあり一般的治療とはなっておらず、より侵襲の少ない根治療法の開発が望まれる。本研究においては、皮下脂肪より短時間・低侵襲に採取でき、短期間大量培養が可能である同種脂肪組織由来多系統前駆細胞（ADMPC）移植療法による根治療法の確立を目的とした。

### B . 研究方法

実際の臨床試験を想定し、ヒト脂肪組織から ADMPC を単離・培養しその量・質の解析を行った。具体的には、形成外科手術において吸引により採取、その後廃棄される脂肪組織を書面による患者の同意を得た上で研究に用いた。数回の実験室における単離・培養試験を行った上で、未来医療センターCell Processing Center においてドライラン、コールドランを順次施行し、細胞

調整手技の安全性、移植に用いる細胞の品質評価を行った。

### C . 研究結果

100ml 未満の吸引脂肪から約 3 - 4 週間で十分な細胞数（ $3 - 6 \times 10^8$ ）が得られることを確認した。その細胞数はおおむね吸引された脂肪量に依存することも確認した。表面細胞マーカー発現では CD45、CD105、CD166 をはじめとする間葉系幹細胞マーカーの発現を解析し、それぞれ 70% 以上の細胞において陽性であった。5 継代目における平均細胞生存率は約 97% であり、吸引による脂肪採取という手技の有効性が示唆された。

### D . 考察

脂肪吸引による脂肪採取法は乳房再建をはじめとする形成外科分野において既に確立された手技であり、安全に行うことが可能となっている。採取前には Tumescent local anesthesia という局所麻酔薬を大量の生理食塩水で薄めた液を皮下注する方法が一般的であり、100ml 程度の脂肪採取であれば局所麻酔下での採取も可能である。皮膚へは 2 - 3mm 程度の切開を 1 - 2 箇所行うのみであり、傷跡をほとんど残さず採取

することができる。術当日はテープ圧迫による固定を行い、翌日からは特に制限は設けず日常生活が可能となる。以上から、本手技による脂肪採取は非常に低侵襲であり、細胞提供者への負担を少ないものに行うことができると考えられる。

## E . 結論

ヒト患者から脂肪吸引により採取した脂肪組織から、3 - 4 週間以内に移植するに足る分量の ADMPG を単離・培養することができた。皮下脂肪からの脂肪吸引は形成外科領域において既に確立された低侵襲手技であり、細胞提供者への侵襲は少ないものと考えられた。

## F . 健康安全情報

なし

## G . 研究発表

### G - 1 . 論文発表

1. Tomita K, Yano K, Hata Y, Nishibayashi A, and Hosokawa K. DIEP Flap Breast Reconstruction Using 3-Dimensional Surface Imaging and a Printed Mold. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* , in press
2. Matsuda K, Shibata M, Kanazawa S, Kubo T, Hosokawa K. Eyebrow reconstruction using a composite skin graft from sideburns. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* , 3(1) e290, 2015
3. Matsuda K, Shibata M, Hosokawa K. Simple method to prevent retention of skin staples. *Eplasty*, 15:e2
4. Tomita K, Yano K, Sugio Y, Ishihara T, Nishibayashi A, Matsuda K, Hosokawa K. Breast reconstruction following breast-conserving surgery with a subcutaneous tissue expander and latissimus dorsi flap. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* , 2(10) e231, 2014
5. Minegishi Y, Sakai Y, Yahara Y, Akiyama H, Yoshikawa H, Hosokawa K, Tsumaki N. Cyp26b1 within the growth plate regulates bone growth in juvenile mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 454(1):12-8, 2014
6. Hata Y, Osuga K, Uehara S, Yano K, Kikuchi M, Tomita K, Matsuda K, Kubo T, Fujiwara T, Hosokawa K. Topological analysis for arteriovenous malformations via computed tomography angiography: Part 2: Practical application. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* , 2(9) e207 , 2014
7. Hata Y, Osuga K, Kubo T, Matsuda K, Tomita K, Kikuchi M, Fujiwara T, Yano K, Hosokawa K. Topological analysis for arteriovenous malformations via computed tomography angiography: Part 1: Mathematical concepts , Yuki Hata, et al. , *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* , 2(8) e205 , 2014 年 09 月 , 学術論文



8. Tanigawa T, Kanazawa S, Ichibori R, Fujiwara T, Magome T, Shingaki K, Miyata S, Hata Y, **Tomita K**, Matsuda K, Kubo T, Tohyama M, Yano K, **Hosokawa K**. (+)-Catechin protects dermal fibroblasts against oxidative stress-induced apoptosis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14:133, 2014
9. Ichibori R, Fujiwara T, Tanigawa T, Kanazawa S, Shingaki K, Torii K, **Tomita K**, Yano K, Osaka Twin Research Group, Sakai Y, **Hosokawa K**. Objective assessment of facial skin aging and the associated environmental factors in Japanese monozygotic twins. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 13(2):158-63, 2014
10. Imagawa Y, **Tomita K**, Kitahara K, Yano K, **Hosokawa K**. Repair of symptomatic perineal hernia with a titanium mesh. *Hernia*, 18(4):587-90, 2014
11. Tashima H, Fujikawa M, Izumi K, Matsuda K, **Tomita K**, **Hosokawa K**. Anatomic evaluation of the internal mammary vessels

using multidetector CT angiography images in 100 Asian patients. *ePlasty* 14:e9, 2014

## G - 2 . 学会発表

**富田興一**、西林章光、矢野健二、**細川亙**：幹細胞を融合した強化型自家神経グラフトの開発：グラフト内シュワン細胞に対する細胞治療法. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会 シンポジウム3、松本、2014

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### H - 1 . 取得特許

なし

### H - 2 . 実用新案登録

なし

### H - 3 . その他

#### 【政策への提言】

特になし

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**実施体制の確立と調整**

**(経皮経肝門脈穿刺術の最適化と実施)**

**担当責任者：**

**大阪大学大学院医学系研究科・放射線医学教授**

**高山憲幸**

**大阪大学大学院医学系研究科・放射線医学講師**

**大須賀慶悟**

**研究要旨**

家族性高コレステロール血症に対して LDL アフェレーシス療法が対象療法として行われるが、LDL の除去効果は一時的で十分とはいえない。根治療法として同種肝移植の報告もあるが高侵襲でドナーの制約があり本邦ではほとんど実現していない。従って、本研究では LDL 受容体を回復する根治療法として同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP) 移植療法の実施体制の確立を目指している。ADMP 移植療法では、健常提供者から採取した脂肪組織から分離・培養した ADMP を門脈内に注入することが必要なため、インターベンショナル・ラジオロジー (IVR) の技術を用いた経皮経肝的門脈穿刺術を施行予定である。今年度は、臨床試験の準備段階として、当施設で過去 10 年間に 46 例の成人肝癌患者に実施された経皮経肝的門脈塞栓術における技術的成功と有害事象について後方視的に調査した。全例で門脈穿刺は成功し門脈内にカテーテルが挿入された。有害事象として、少量の胆汁漏 3 例、胆管誤穿刺 2 例、動脈誤穿刺 1 例、穿刺路からの血液や胆汁漏による腹膜刺激症状 (強い疼痛及び呼吸苦) 3 例、感染胆汁の血中移行による悪寒戦慄 1 例、非標的門脈の閉塞 1 例を認めたと、いずれも保存療法にて軽快した。文献的には同様の経路による細胞移植療法である 1 型糖尿病に対する膵島細胞移植療法において、稀ではあるが重篤な有害事象として輸血や開腹止血を要する穿刺路からの腹腔内出血、開腹ドレナージを要する胆汁漏、門脈

血栓症などが報告されている。ADMPC 移植療法における経皮経肝的門脈穿刺術は低侵襲で高い成功率が期待されるが、重篤な有害事象は起こり得るため、経皮的穿刺やカテーテル抜去の際の穿刺路塞栓など細心の注意を払う必要があると考えられた。

## 研究協力者（順不同）

なし	

### A . 研究目的

ADMPC 移植療法では、健常提供者から採取した脂肪組織から分離・培養した ADMPC を最終的に門脈内に注入することが必要とされる。門脈への到達経路として、開腹による外科的アプローチは侵襲が大きいため、低侵襲的な IVR の技術を用いた経皮経肝的門脈穿刺術が妥当と考えられる。今年度は、臨床試験の準備段階として、当施設で過去に実施された経皮経肝的アプローチによる門脈穿刺術の技術的成功率と安全性について検討した。

### B . 研究方法

過去 10 年間に当施設において施行した門脈塞栓術における経皮経肝的門脈穿刺術の技術的成功率と手技に関連した有害事象の発生について後方視的に調査した。

### C . 研究結果

2004 年 7 月～2014 年 11 月の間に成人肝癌患者 46 例に対して拡大肝切除前に経皮経

肝的門脈塞栓術が行われた。全例で処置の必要性和方法・危険性に関するインフォームドコンセントにより同意書が取得された。門脈穿刺術は超音波及び X 線透視ガイド下に行われ、42 例は右葉の門脈に対し右肋間より穿刺し、標的血管は P4 1 例、P5 7 例、P6 4 例、P7 3 例、P8 7 例、前区域枝 16 例、後区域枝 2 例、右枝 2 例であった。4 例は左葉の門脈に対して心窩部より穿刺し、標的血管は P3 3 例、門脈臍部 1 例であった。9 例で 2 回～5 回の複数回の穿刺を要したが、全例で門脈穿刺は成功しカテーテルが門脈内に留置された。カテーテルの抜去時にはゼラチンスポンジによる穿刺路の塞栓を行った。穿刺に伴う有害事象として、少量の胆汁漏 3 例、胆管誤穿刺 2 例、動脈誤穿刺 1 例、穿刺路からの血液や胆汁漏による腹膜刺激症状（強い疼痛及び呼吸苦）3 例、感染胆汁の血中移行による悪寒戦慄 1 例、非標的門脈の閉塞 1 例を認めたが、いずれも保存療法にて軽快した。

### D . 考察

ADMPC 移植療法において経皮経肝的門脈穿刺術は細胞注入に不可欠な経路であり技術的成功と安全性が要求される。手技の目的や患者背景は異なるものの、過去 10 年間における当院の成人患者に対する経皮経肝的門脈穿刺術は高い成功率(100%)で施行されていた。但し、複数回の穿刺を要する場合もあり、動脈や胆管の誤穿刺、少量の胆汁漏による腹膜刺激症状などの有害事象も認められた。カテーテル抜去時の穿刺路塞栓を行うことにより輸血やドレナージを要する腹腔内出血や胆汁漏は回避できたと考えられる。同様の経路で細胞注入が行われる細胞移植療法として I 型糖尿病患者に対する膵島細胞移植療法があり、稀ではあるが重篤な有害事象として輸血や開腹止血を要する穿刺路からの腹腔内出血、開腹ドレナージを要する胆汁漏、門脈血栓症などが報告されている。

## E . 結論

当施設における成人患者における経皮経肝的門脈穿刺術は成功率が高く安全に施行されていた。ADMPC 移植療法における経皮経肝的門脈穿刺術においても高い成功率が期待されるが、重篤な有害事象は起こり得るため、画像ガイド下の穿刺やカテーテル抜去に際しての穿刺路塞栓など細心の注意を払って施行する必要があると考えられた。

## F . 健康安全情報

なし。

## G . 研究発表

### G - 1 . 論文発表

Osuga K, Kishimoto K, Tanaka K, Nakamura M, Ono Y, Maeda N, Higashihara H, Nakazawa T, Tomiyama N. Initial experience with use of hydrogel microcoils in embolization of pulmonary arteriovenous malformations. SpringerPlus 2014;3:609

Hata Y, Osuga K, Uehara S, Yano K, Kikuchi M, Tomita K, Matsuda K, Kubo T, Fujiwara T, Hosokawa K. Topological Analysis for Arteriovenous Malformations via Computed Tomography Angiography: Part 2: Practical Application. Plast Reconstr Surg Glob Open 2014;2:e207

Hata Y, Osuga K, Kubo T, Matsuda K, Tomita K, Kikuchi M, Fujiwara T, Yano K, Hosokawa K.

Topological Analysis for Arteriovenous Malformations via Computed Tomography Angiography: Part 1: Mathematical Concepts. Plast Reconstr Surg Glob Open. 2014;2:e205

Nakamura M, Osuga K, Maeda N, Higashihara H, Hamada K, Hashimoto N, Uehara S, Tomiyama N.

Percutaneous sclerotherapy for venous malformations in the extremities: clinical outcomes and predictors of patient satisfaction. Springerplus. 2014;3:520

Tanaka K, Maeda N, Osuga K, Higashi Y, Hayashi A, Hori Y, Kishimoto K, Morii E, Ohashi F, Tomiyama N. In Vivo Evaluation of Irinotecan-Loaded QuadraSphere Microspheres for Use in Chemoembolization of VX2 Liver Tumors. J Vasc Interv Radiol. 2014;25:1727-1735

Kishimoto K, Osuga K, Maeda N, Higashi Y, Hayashi A, Hori Y, Nakamura M, Ohashi F, Morii E, Tomiyama N. Embolic effects of transcatheter mesenteric arterial embolization with microspheres on the small bowel in a dog model. J Vasc Interv

Radiol. 2014;25:1767-1773

## **H . 知的財産権の出願・登録状況**

### **H - 1 . 取得特許**

なし。

### **H - 2 . 実用新案登録**

なし。

### **H - 3 . その他**

#### **【政策への提言】**

なし。

**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**ADMPC移植の実施**

**(経門脈細胞移植術の最適化と実施)**

**担当責任者：**

**大阪大学大学院医学系研究科統合医療学寄附講座・特任教授**

**伊藤壽記**

**大阪大学大学院医学系研究科・医学科教育センター・特任助教(常勤)**

**川本弘一**

**研究要旨**

臨床膵島移植は、主に1型糖尿病の患者に対し、脳死あるいは心停止ドナー膵から分離した膵島を移植する同種膵島移植と、難治性の慢性膵炎で膵全摘を必要とする患者に対し、摘出した患者自身の膵臓から分離した膵島を患者本人に返す自家膵島移植とに大別される。膵島移植はドナーあるいは患者自身から摘出した膵臓を移植施設内の Cell Processing Center (CPC)で分離・精製し、その結果得られた膵島を患者の門脈内に点滴投与する。Collaborative Islet Transplant Registry (CITR) の8回目の報告(2012年)では、全世界的には、864例の患者に対し、1679回の同種膵島移植が、また525回の自家膵島移植が施行されている。すなわち、これまでに計算上2000回以上の膵島移植が施行されている。門脈内に膵島組織を投与する場合は、門脈圧をモニタリングし門脈圧の上限を設定することで、門脈圧亢進症を回避し、また、組織注入量の上限を設けることで、肝不全を予防している。膵島は、様々なホルモンを産生する内分泌組織であり、1個の膵島は1000個前後の細胞の集合体である。このため、脂肪組織由来の多系統前駆細胞を移植する場合には、膵島移植とまったく同一の基準が適応されるかどうかについては不明であるが、膵島移植における経験が活かされることが期待される。

## 研究協力者（順不同）

野口洋文	琉球大学医学部再生医学講座・教授
江口英利	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学・講師
永野浩昭	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学・准教授
森 正樹	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学・教授
土岐祐一郎	大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学・教授

### A．研究目的

細胞移植では、移植時の安全性を確保することが重要である。そのため、移植する細胞に一定の基準を設定することで、安全性を担保している。しかし、移植する細胞の安全性が担保されても、移植手技が不適切である場合は、患者のリスクとなるので注意が必要である。本研究では、門脈内に投与される臨床膵島移植における安全性および有害事象について検討した。

### B．研究方法

世界的な膵島移植の安全性については、臨床膵島移植のレジストリーである CITR (<http://www.citrregistry.org/>)の報告を参照した。また、本邦での膵島移植の報告（膵・膵島移植研究会、膵島移植班）も参考とした。

### C．研究結果

世界的な臨床膵島移植のレジストリーである CITR によれば、年次的に膵島移植における重篤な有害事象（Serious Adverse

Event : SAE）は継時的に低下傾向にあり、死亡例は 2011 年から 2014 年では、報告されていない。

本邦では、2004 年に施行された臨床膵島移植第 1 例目で、腹腔内出血のため再開腹止血術を要したが、以降の報告では、移植手技による SAE は報告されていない。教室では、2013 年 7 月に、内科的治療無効で外科的手術も複数回施行されてもなお、膵炎発作を繰り返す難治性遺伝性膵炎の患者に対し、残膵全摘および自家膵島移植を施行し、患者は膵炎発作から完全に解放され、鎮痛剤投与も不要となった。この患者でも、膵島を経門脈的に移植したが、移植手技中、門脈圧をモニターしたが、施設基準値を超えなかったため、分離膵島全量を安全に移植している。

### D．考察

欧米ならびに本邦での臨床膵島移植安全性およびそれに伴う有害事象については問題ないと考えられた。

一方、脂肪組織由来多系統前駆細胞の門

脈内投与については報告がみられないが、  
膵島に比して、サイズが小さく門脈末梢に  
塞栓を起こす可能性は少ないと考えられ、  
すなわち IBMIR("instant blood mediated  
inflammatory reaction") が起こる可能性は低  
いとする。従って、門脈内への脂肪組織  
由来多系統前駆細胞移植においても、膵島  
移植と同様に門脈圧をモニターすることで、  
比較的安全に移植することが可能であると  
考えられる。

## E . 結論

門脈内への脂肪組織由来多系統前駆細胞  
を移植する場合、組織移植での膵島移植の  
経験が役立つ可能性が示唆された。

## F . 健康安全情報

なし

## G . 研究発表

### G - 1 . 論文発表

1. Hamabe A, Konno M, ..., Kawamoto K, (6番目,全14人中)...., Doki Y, Mori M, Ishii H. The role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation and epithelial-mesenchymal transition. Proc Natl Acad Sci U S A 111:15526-31, 2014.
2. Maeda S, ..., Kawamoto K, (12番目,全19人中)...., Mori M, Ishii M.

Interferon- $\alpha$  acts on the S/G2/M phases to induce apoptosis in the G1 phase of an IFNAR2-expressing hepatocellular carcinoma cell line. J Biol Chem 289: 23786-95, 2014.

### G - 2 . 学会発表

Koichi Kawamoto, et al. 2014年1月26日~27日 The Qatar-Japan Symposium on Tissue Regeneration Therapy (**invited lecture**) Islet Cell Biology, Regeneration, and Transplantation. Doha, Qatar in 2014.

## H . 知的財産権の出願・登録状況

### H - 1 . 取得特許

なし

### H - 2 . 実用新案登録

なし

### H - 3 . その他

#### 【政策への提言】

膵島移植は組織移植であるため、膵島移植での経験がそのまま脂肪組織由来多系統前駆細胞移植に適応される訳ではないが、組織移植での経験も当然参考となるため、研究協力体制の確立が重要であるが、大阪大学では診療科間の連絡体制が強力であるため。



**厚生労働科学研究委託費(再生医療実用化研究事業)**

**「LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症に対する、  
同種脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMPC) を用いた細胞移植療法の確立」**

**委託業務成果報告(業務項目)**

**ADMPC移植の実施**

**(血清酸化脂質測定最適化と実施)**

**担当責任者：**

**お茶の水女子大学大学院・人間文化創成科学研究科・講師**

**市育代**

**研究要旨**

生体に存在する過酸化脂質である酸化コレステロールは動脈硬化巣に多く存在し、動脈硬化惹起性の物質であることが指摘されている。本研究では、LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症患者の血清酸化コレステロールの詳細を明らかにし、ADMPC 移植後にそれらの酸化脂質がどのように変化するかを明らかにする。さらに、酸化コレステロール以外のステロールについても網羅的な解析を行い、病態との関連について明らかにする。

今年度は、ヒト血漿サンプル中のステロールを測定するための前処理法およびガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を用いた高感度な分析法の確立を行った。過酸化脂質の測定にあたり、前処理に用いる抗酸化剤の濃度検討とともに、加温による酸化反応を回避するため、常温による反応の検討を行った。また、GC-MS を用いた測定では寄与率の高い検量線を作製することができ、ヒト血漿において 10 種類の酸化コレステロールと 6 種類のステロールを高感度に定量できる測定系を確立した。

**研究協力者 (順不同)**

なし	

## A . 研究目的

生体内の過酸化脂質は、ガンや老化、動脈硬化の原因物質であることが知られている。酸化コレステロールは動脈硬化巣や酸化 LDL に多く存在することが知られており、生体内において活性酸素やフリーラジカルを生じさせることで、更なる過酸化脂質を発生させることが示唆されている。さらに最近では、酸化コレステロール自身が生理活性を持つ脂質であることが分かってきており、動脈硬化と酸化コレステロールとの関連性が注目されている。LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症患者では、顕著なコレステロールおよび LDL コレステロールの増加がみられるが、酸化コレステロールなどコレステロール以外のステロールの詳細は分かっていない。最近、コレステロールの前駆物質である Desmosterol が動脈硬化発症マウスの腹腔マクロファージで増加することが報告されている (Cell, 2012)。したがって、動脈硬化患者ではコレステロール以外のステロールも動脈硬化の発症や進展に関わっている可能性がある。

本研究では、従来の LDL アフェレーシスを定期的に試行している際の過酸化脂質である酸化コレステロールの血清分布と、ADMPC 移植療法前後の酸化コレステロールの血清分布を検証し、有害な変化が生じないか安全性確保の点から検討する。他のステロールについても網羅的な解析を行う

予定である。脂質の解析を行うにあたり、酸化コレステロールなどの過酸化脂質は不安定な物質であることから、安定した測定系の確立が求められる。そこで今年度は、酸化コレステロールを安定して測定できるサンプルの前処理と GC-MS による分析法の確立を目指す。さらに、他のステロールについても同様に GC-MS による高感度な測定系の確立を行う。

## B . 研究方法

酸化コレステロールは不安定な物質で、コレステロールの 1/1000 以下とごく微量な成分であり、質量分析装置による安定した測定系を確立する必要がある。サンプルの前処理ではコレステロールの酸化防止のため、脂質抽出の段階で抗酸化剤の濃度検討を行った。また、前処理中の加温は酸化を促進させる可能性があることから、常温による反応条件の検討も行った。

## C . 研究結果

GC-MS による酸化コレステロール及びステロールの測定系の確立

血清酸化コレステロールの測定にあたり、以下の手順で測定を行った。

血清からの脂質抽出 不ケン化物の抽出 固相カラムによるステロールと酸化コレステロールの分画 トリメチルシリル誘導体化 GC-MS による測定

血清からの脂質抽出は 0.01%

dibutylhydroxytoluene 含有の有機溶媒を用いて、Bligh & Dyer 法にて行った。

脂質抽出物からの不ケン化物抽出では、通常 60~70 °C での加温条件下で水酸化カリウムによるケン化を行うが、本研究では脂質の酸化反応を防ぐため、遮光下で常温にて一晩ケン化を行った。

微量な酸化コレステロールを正確に測定するには、コレステロールと酸化コレステロールを事前に分ける必要がある。本研究では固相カラムを用いてコレステロールと酸化コレステロールの分画を行うことにした。

常温にてトリメチルシリル誘導体化を行う方法を確立した。

GC-MS による測定では、寄与率 0.999 以上の検量線を作製し、内部標準法による定量を行った。

上記の方法によって、100 µL の血清を用いて 10 種類の酸化コレステロールと 6 種類のステロールを測定する系を確立した。

#### <酸化コレステロール>

7 $\alpha$ -hydroxycholesterol,  
7 $\beta$ -hydroxycholesterol,  
7-ketcholesterol, Epoxycholesterol,  
Cholestanetriol,  
4 $\alpha$ -hydroxycholesterol,  
22(R)-hydroxycholesterol,  
24-hydroxycholesterol,

25-hydroxycholesterol,  
27-hydroxycholesterol

#### <ステロール>

Cholesterol, Desmosterol,  
Lathosterol, Lanosterol,  
-sitosterol, Campesterol

## D. 考察

**今年度は**ヒトの血清酸化コレステロールおよびステロールを高感度に測定できる系を確立することができた。来年度はこの測定系を用いて LDL アフェレーシス療法施行中の重症家族性高コレステロール血症患者の血清酸化コレステロールおよびステロールの詳細な解析を行う。また、測定できるステロールをさらに増やす予定である。来年度以降は、重症家族性高コレステロール血症患者のステロール代謝の特徴を明らかにし、病態との関連性について検討する。

## E. 結論

今年度はヒトの血漿において 10 種類の酸化コレステロールと 6 種類のステロールを高感度に定量できる測定系を確立した。重症家族性高コレステロール血症患者において、血清中の過酸化脂質に関する知見は非常に少ない。したがって、本研究における血清酸化コレステロールの網羅的な解析は家族性高コレステロール血症の病態に関する新たな知見を提示できる可能性がある。

**F . 健康安全情報**

特になし

**G . 研究発表**

**G - 1 . 論文発表**

なし

**G - 2 . 学会発表**

なし

**H . 知的財産権の出願・登録状況**

**H - 1 . 取得特許**

なし

**H - 2 . 実用新案登録**

なし

**H - 3 . その他**

**【政策への提言】**

なし