

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

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

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 王 英正

平成26(2014)年 4月

# 目 次

## I . 総括研究報告

先天性心疾患由来心臓内幹細胞の分離培養に関する研究

王 英正----- 3

## II . 分担研究報告

先天性心疾患の心臓手術および組織採取に関する研究

佐野 俊二 ----- 10

冠動脈内注入法による心臓内幹細胞の自家移植に関する研究

大月 審一 ----- 17

III . 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 26

IV . 研究成果の刊行物・別刷 ----- 29

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

総括研究報告書

先天性心疾患由来心臓内幹細胞の分離培養に関する研究

研究代表者 王 英正 岡山大学病院教授

研究要旨

本研究では、心臓手術後の長期予後が極めて不良の小児心不全に対する心臓内幹細胞の自家移植療法に関して、有効性検証目的の第2相臨床研究を実施する。さらに、本細胞治療法の標準化医療に向けて、先進医療ならびに企業連携による医師主導臨床試験の実施開始を目指す。

研究分担者：

佐野 俊二

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 教授

大月 審一

岡山大学病院 教授

を踏まえ、臨床試験を見据えた先進医療による第2相臨床試験を実施し、世界初の小児心不全に対する心筋再生医療法の早期実用化を目的とする。

A. 研究目的

心臓移植の適応と判断された小児心不全の1年生存率は30%と極めて予後不良であるが、国内での小児心臓移植の実施はドナー不足などの問題で、これまでの乳幼児への移植実施例はない。一方、近年における目覚ましい心臓シャント手術法や術後管理法の改良により機能的単心室症の短期予後は著明に改善してきたが、長期予後を左右する心予備能の改善は依然として重要な研究課題である。本研究では、2011年より「ヒト幹細胞を用いた臨床研究に関する指針」で実施承認された「機能的単心室症に対する自己心臓内幹細胞移植療法によるTICAP第1相臨床試験(NCT01273857)」の研究成果

B. 研究方法

**試験デザイン**

目標症例数 : 34 症例

登録期間 : 承認後、試験開始から 4 年

試験期間 : 登録最終症例の移植後 1 年

試験デザインの概要 : ランダム割り振り試験

対照群の設定 : 非細胞移植群（標準治療単独）

対照群の対処法 : 3 か月間の経過観察後、救済的移植の実施

**適格基準**

被験者は心不全を有する機能的単心室症の患者さんのうち、第 II 期の Glenn 手術または第 III 期 Fontan 手術適応例で、以下の基準を満たし、かつ以下の除外基準のいずれにも該当しない小児心不

全を適格として登録する。

### **選択基準**

- 1) 年齢： 症例登録時において年齢 0 歳以上 20 歳以下。
- 2) 症例登録時において心駆出率が 70%以下の症例。
- 3) 試験参加について文書による説明がなされ、文書同意の得られた者。

### **除外基準**

- 1) 心原性ショック
- 2) 術後体外循環から離脱できない症例
- 3) 致死性不整脈がコントロールできない症例
- 4) 冠動脈疾患を合併している症例
- 5) Eisenmenger 症候群
- 6) 循環不全などによって脳機能障害を合併する症例
- 7) 悪性新生物を有する症例
- 8) 重篤な神経疾患合併の症例
- 9) 高度な肺塞栓症や肺高血圧症例
- 10) 高度腎不全症例
- 11) 多臓器不全疾患
- 12) 活動性感染症（心内膜炎を含む）
- 13) 敗血症
- 14) 活動性出血性疾患(消化管出血、外傷その他)

### **症例登録**

- 1) 試験責任医師または試験分担医師は、候補となる患者が適格基準を満たすと考えられた場合、試験担当医師は研究コーディネーターとともに、インフォームドコンセント手続きの作業に入る。

- 2) 試験担当医師は研究コーディネーターとともに、候補となる患者からインフォームドコンセントを得る。
- 3) 試験担当医師はインフォームドコンセントが得られた症例に対し、適格性を判断するために必要な検査（スクリーニング検査）の結果を行う。
- 4) スクリーニング検査の結果、候補となる患者が適格基準を満たす場合、試験担当医師は症例検討委員会に諮り本治療の対象としての適格性を検討する。
- 5) 症例検討委員会の結果、候補となる患者が適格基準を満たしていると判断された場合、試験担当医師は eClinical Base に必要事項を記入の上、データセンターに登録する。

### **主要エンドポイント**

#### **有効性**

第 2 相臨床試験における主要エンドポイントとして、細胞移植による 3 か月目での有効性を検証する。評価項目として、治療前後で実施した心エコー図法、心室造影ならびに心臓 MRI で算出された心駆出率の改善を検証する。また、上記の 3 つの検査法によって求められた心駆出率の治療前後における改善度の絶対値を算出し、移植群および非移植群の 2 群間で比較検証する。

#### **評価法**

患者背景を知らされていない試験外院内医師 1 名及び試験外院外医師 2 名により構成されたエンドポイント評価委員会により、心エコー図法、心室造影ならびに心臓 MRI を用いた心機能検査によって得られた心駆出率について盲検的に評価する。

## **副次エンドポイント**

### **有効性**

第2相臨床試験における副次エンドポイントは、細胞移植による1年目での有効性を上記項目に沿って検証する。また、本治療前後において得られたその他の有効性に関する心機能の改善とする。評価項目として、心拍出量、心室拡張末期および収縮末期容量とする。

### **評価法**

患者背景を知らされていない試験外院内医師1名及び試験外院外医師2名により構成されたエンドポイント評価委員会により、以下の評価項目について盲検的に評価する。臨床症状、BNP値、心室拡張末期および収縮末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値、心筋重量。

### **登録連絡先**

データセンター：臨床研究情報センター  
〒650-0047 神戸市中央区港島南町1-5-4

### **移植細胞（心臓内幹細胞）の調製**

- 1) 細胞の調製・保存・運搬については品質管理者の監督の下、製造管理責任者または試験細胞作成者が行う。
- 2) 採取された心臓組織サンプルは搬送後、直ちに探索的医薬品開発室において、「岡山大学病院・探索的医薬品開発室心臓内幹細胞 調製手順書」に定められた方法にて心臓内幹細胞を単離し、精製・増幅培養を行う。
- 3) 培養は心臓組織採取後28日までとし、 $5.0 \times 10^6$ 個以上の細胞が確保できた時点で、培養を終了する。培養21日までに必要細胞数( $3.0 \times 10^6$ 個)に達しない場合は、細胞の適格性を不適と判断し、本治

療対象から除外する。

#### 4) 移植細胞の調製

移植用の細胞は細胞単離から単一細胞の付着培養系で第3継代まで増幅培養した、増殖能規格に適合した細胞とする。移植用の細胞の調製は、探索的医薬品開発室で試験細胞作成者が手術当日の移植30分前に、下記の方法で実施する。

培地をピペットで吸引し、これを品質管理用に提出する。

培養皿にPBSを加え洗浄する。

リコンビナントトリプシン(0.25%)を用いて細胞を培養皿から解離し、10%血清を含むDMEMにてトリプシン反応を停止させたのち50mL遠沈管に回収し、1500g、4、5分間遠心する。

上清を破棄し、PBSで洗浄し再び遠心動作を行う(2回)。

上清を破棄し、1mLの生理食塩水で懸濁し、生細胞数を測定、 $3.0 \times 10^5$ 個/kgの心臓内幹細胞を抽出する。

抽出された $3.0 \times 10^5$ 個/kgの心臓内幹細胞を生理食塩水に懸濁し合計を3mLとしたのち、1.5mLのエッペンドルフチューブ6本に0.5mlずつ移入する。

心臓内幹細胞の品質保証について、以下に規定された品質管理が行われたことを保証する書類を品質管理者が発行する。品質保証書、取り扱い説明書とともに心臓内幹細胞を滅菌袋にいれ、試験細胞作成者が常温(20~25℃)で手術室に搬送する。

#### 5) 余剰細胞の取り扱い

余剰細胞は手術延期時の移植用及び細胞の品質管理用に探索的医薬品開発室内で凍結保存する。保存にあたっては細胞の取り違えがな

いように照合認識システムと台帳を用いて製造管理者が管理する。

#### 6) 細胞の凍結保存

予定数に到達後、培養皿より余剰心臓内幹細胞を回収、速やかに凍結する。凍結細胞は、探索的医薬品開発室内の冷凍保管庫にある-150 の超低温槽保存容器内にて保管する。細胞の取り違えがないように照合認識システムと台帳を用いて製造管理者が管理する。

#### 8) 凍結細胞の解凍・再培養

移植術予定日の7日前に、超低温槽保存容器内から凍結細胞を取り出し、37 のヒートブロックで解凍する。解凍後、培養を再び開始する。

### **細胞移植施設への運搬**

調製した移植細胞入り滅菌チューブを滅菌袋に入れ、速やかに試験細胞作成者が手術室に運搬する。運搬時の温度は常温（20～25 ）とする。

### **臨床研究終了後の追跡調査**

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。

#### （倫理面への配慮）

臨床研究プロトコルは「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」（平成 22 年告示第 380 号）を遵守して作成し、外部審査委員を含めた体制で審査される。

臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。

試験責任/分担医師は臨床研究保険に加入し、万一、本臨床試験参加によって患者さんに健康被害が生じた場合に対応できるようにする。

独立モニタリング委員会は、責任研究者から6か月ごとに試験進捗状況の報告を受け評価する。勧告すべき事項が提案された場合、委員長が必要に応じて試験の早期中止等の手段を講じる。

データマネジメントは eClinical Base Web 入力システムを活用し、臨床研究情報センターにおいたデータセンターによる中央登録制とする。

### C. 研究結果

2013年4月8日に厚生科学審議会の承認後、2014年4月18日まで合計28症例を登録した。うち、移植群14症例、非移植群14症例であった。移植群の14症例中10症例に細胞移植(stage 1)を実施し、非移植群の14症例中3ヶ月目の検査の終了した7症例に対し救済移植(stage 2)を追加した。また、細胞移植を実施した移植群の10症例のうち4症例、非移植群の14症例中7症例が3ヶ月目の各種検査を終えており、統計学的に非移植群( $p=0.12$ )に比べ、移植群( $p=0.03$ )において有意な心機能改善を認めた。さらに、心機能改善の機序として、心室拡張末期容積( $p=0.01$ )ならびに心室収縮末期容積( $p=0.002$ )の有意な縮小が細胞移植群のみに観察された。

本第2相臨床研究において、特記すべき心機能評価法の一つとして、ガドリニウムを用いた造影MRIが挙げられる。本第2相臨床研究から適応対象者全員に対して、心臓手術前、術後1ヶ月後ならびに細胞移植3ヶ月目と1年目に実施するが、これまでの成果からMRIの造影遅延(LGE+)を伴う症例は、全試験参加症例の1/3を示し、心筋の線維化と潜在的

心不全予備群であることが示唆され、細胞移植による治療効果が乏しいことが予測される。これまでの解析結果より、LGE+群は心駆出率が低く、心室末期容積が有意に大きいことが明らかになった。

さらに LGE+ 症例の特徴として、circumferential strainの解析により、局所心筋の壁運動障害を認め、臨床病態像はBNP値の有意な上昇と高いgradeでの心不全症状の顕在化が示唆されている。LGE+で検出された心筋性状の線維化は単心室循環による容量負荷が大きな要素であり、多変量解析により、第2期手術までの待機時間と有意に相関することが明らかとなった。

また、既に実施終了した第1相臨床研究の成果とともに、本治療法に関してNKメディコ株式会社の企業参入が決定しており、既に治験薬製造委託先も選定され、今後PMDAとの再度事前相談を経て、医師主導臨床治験に向けたPMDAとの対面助言と臨床治験届の申請を現在準備中である。本臨床研究の着実な遂行により、国内外との多施設共同臨床研究に展開させ、本治療法の薬事法承認を目指す。

#### D. 考察

平成23年から平成25年まで世界初の小児心不全に対する冠動脈注入法による心臓内幹細胞自家移植のTICAP第1相臨床試験を実施し、全7症例の移植後1年目までの安全性を確認かつ有効性を示唆する所見を得た。有効性を検証する本第2相臨床研究(PERSEUS)では、1:1のランダム化比較対照臨床研究となっており、これまでの中間成績から細胞移植を受けた症例は非移植群に比べ、有意な心機能改善を認めた。

現在進行中の第2相臨床研究であるが、これまでの初期成績の結果から、細胞移植による心不全の救済効果が明らかにされた。一方、ランダム化による群分けで非移植群に割り振りされた症例に対

しても、3ヶ月目の各種検査終了後に希望対象者に対し積極的に救済移植を行い、全体的な評価として、これまでに細胞移植を受けた症例の3ヶ月目での初期成績は概ね良好であった。

今後、自己幹細胞を用いた心不全への新たな治療法として、医師主導臨床治験を経て、薬事法承認に向けて臨床成果を活用していく。

#### E. 結論

既に実施終了したTICAP第1相臨床研究と同様に、ランダム化第2相臨床研究の中間成績からも、小児心不全に対する心臓内幹細胞移植療法は安全で、細胞移植後3ヶ月目より心室機能を有意に改善させ、1年目までの長期観察期間においても、その治療効果は継続していることが明らかとなった。

今後予定症例数の34症例までの登録と心臓手術の実施を踏まえ、ランダム化に沿った細胞移植と対照比較群との有効性検証を詳細に行い、自家幹細胞移植療法の臨床的意義を明らかにし、薬事法承認を目指した医師主導臨床治験の実施根拠となる治療実績を積み重ねていく。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T. MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by  $\alpha 1$ -adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(10):3811-6.

Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.

*Methodist DeBakey Cardiovascular*

*Journal*, 2014 (in press).

樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療  
月刊循環器 9月号 3(9): 69-76 医学出版(2013)

## 2. 学会発表

王 英正 先天性心疾患に対する自己心臓内幹細胞による再生医療 第116回日本小児科学会学術集会 広島 (2013.4.19)

Oh H, Tarui S, Ohtsuki S, Sano S.

Intracoronary delivery of cardiac progenitor cells in patients with hypoplastic left heart syndrome. The 30<sup>th</sup> International Society for Heart Research (2013. 6.29) San Diego.

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 第3回先端医学研究会 at OU 直島 (2013.8.3)

王 英正 心不全への幹細胞移植療法 岡山先端医学研究会 岡山 (2013.7.19)

王 英正 希少難治性心不全への心臓内幹細胞を用いた再生医療 青森臨床循環器研究会 青森 (2013.10.26)

王 英正 希少難治性心不全に対する心臓内幹細胞を用いた再生医療 岡山大学知恵の見本市2013 岡山 (2013.11.1)

王 英正 子どもの難治性心不全に対する幹細胞移植療法の取り組み 公開セミナーはあとネット兵庫 神戸市 (2013.11.24)

Factors-based human cardiomyocytes differentiation exhibits defective maturation

and excitation through aberrant calcium handling proteins. Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Yoshida M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, Ito H, Sano S, Oh H. *The 21<sup>st</sup> annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Patient-specific induced pluripotent stem cells recapitulate the models of hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *The 21<sup>st</sup> annual meeting of the Asian society for cardiovascular and thoracic surgery*, Kobe (2013. April. 7)

Cardiac progenitor cell therapy in patients with hypoplastic left heart syndrome. S Sano, H Oh, S Tarui, S Ohtsuki, S Kasahara. *American Association for Thoracic Surgery*. Minneapolis. (2013. May 4)

Lineage induction of patient-specific iPS cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in HLHS. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *TAKAO Symposium* Tokyo (2013. July. 16)

Directed differentiation of patient-specific induced pluripotent stem cells identifies the cardiac transcriptional repression during myocardial growth and patterning in hypoplastic left heart syndrome. Kobayashi J, Yoshida M, Tarui S, Hirata M, Tateishi A, Arai S, Kasahara S, K Takahashi, K Naruse, Sano S, Oh H. *American Heart Association Suppl.* (2013). Dallas

疾患特異的 iPS 細胞の樹立と左心低形成症候



群の心臓発生異常の解明 小林純子, 樽井 俊, 平田昌敬, 川畑拓也, 黒子洋介, 立石篤史, 吉積 功, 新井禎彦, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 日本外科学会 Young Researcher Award (2013)

樽井俊、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞を用いた自家移植療法 第 13 回心血管再生外科治療研究会 熊本 (2.19.2014)

奥山倫弘, 逢坂大樹, 石神修大, 小林純子, 笠原真悟, 佐野俊二, 王 英正 3D 細胞外マトリックスを利用したヒト幹細胞再播種によるバイオ人工心臓の作成 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

樽井俊、石神修大、大月審一、逢坂大樹、栄徳隆裕、近藤麻衣子、小林純子、奥山倫弘、馬場健児、川畑拓也、吉積 功、黒子 洋介、新井禎彦、岩崎達雄、佐藤修平、笠原真悟、佐野俊二、王 英正 左心低形成症候群に対する心臓内幹細胞自家移植療法：第 1 相試験 (TICAP) 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

小林純子, 吉田 賢司, 樽井 俊, 永井祐介, 笠原真悟, 成瀬恵治, 伊藤 浩, 佐野俊二, 王 英正 患者由来 iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における疾患発症機序の解明 日本再生医療学会 京都 (3.5.2014)

Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Yusuke Nagai, Shingo Kasahara, Keiji

Naruse, Hiroshi Ito, Shunji Sano, Hidemasa Oh Assessment of genetic and epigenetic modifications in hypoplastic left heart syndrome by disease-specific iPS cells 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京

Suguru Tarui, Shinichi Ohtsuki, Daiki Ousaka, Takahiro Eitoku, Maiko Kondo, Junko Kobayashi, Michihiro Okuyama, Shunta Ishigami, Kenji Baba, Sadahiko Arai, Takuya Kawabata, Ko Yoshizumi, Yosuke Kuroko, Tatsuo Iwasaki, Shuhei Sato, Shingo Kasahara, Shunji Sano, and Hidemasa Oh. Intracoronary Cardiac Progenitor Cell Transfer to Treat Univentricular Heart Disease: A Phase 2 Randomized Controlled Clinical Trial (PERSEUS) 第 78 回 日本循環器学会総会学術集会 *Circulation Journal* (2014.3.21) 東京

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

Preparation for treating heart disease used in cell therapy. Patient No: US8414924 B2, Apr. 9. 2013.

細胞移植療法に用いられる心疾患治療薬 特許第5496675号 2014年3月14日登録

##### 2. 実用新案登録

該当なし。

##### 3. その他

該当なし。

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

分担研究報告書

先天性心疾患の心臓手術および組織採取に関する研究

研究分担者 佐野俊二 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

単心室循環を呈する機能的単心室症は比較的稀な先天性心疾患であるが、ここ20数年来の外科的手術法の進歩により、臨床的に大きく注目されてきたが、術後長期予後はまだ満足できる内容でなく、成人した症例におけるQOLも重要な問題である。近年提唱されたこれらの臨床的課題に対し、心臓血管外科側からの早期の手術法や術後管理法の改良とともに、細胞治療を取り入れた再生医療法と組み合わせることで、実質的な長期での手術成功症例の増加を目指す。

A. 研究目的

機能的単心室症は単心室循環を呈し、左右どちらかの流入路の血流障害を伴い、しばしば流出路の形態異常と肺動脈や大動脈レベルでの閉塞を合併する。1940年代にB-Tシャント（第1期）が考案され、肺動脈流出路閉鎖に対する肺動脈血流が部分的に確保できるようになった。1950年代になるとGlenn手術（第2期）が考案され、上大静脈と肺動脈吻合による肺血流の確保が安定化してきたが、静脈血と動脈血の混入により、体血流は依然と低酸素状態であった。1970年代に入るとFontan手術（第3期）が取り入れられ、すべての循環静脈血が直接肺動脈内に流入することで酸素化不良の問題が改善した。

しかしながら、機能的単心室症の心室機能は経

時的に低下していくものであり、心筋細胞微小構造の変化、低酸素状態、3度にわたる開心術などがその原因と考えられている。また、拡張障害が初期の心不全の原因と考えられ、実質心筋細胞の線維化がその進行過程を司っている。早期の心臓手術は心室の容量負荷軽減につながり、心筋細胞障害の緩和とよい循環動態で第3期手術に移行できる点で、幼若期での心臓手術が勧められているものの、長期的には心収縮能や運動耐用能の改善にまでつながらないという報告が多い。

Fontan術後の肺血流や体血流変化は第3期術後の長期予後を規定する重要な因子の一つである。肺血流量は心室拡張末期圧、肺血管抵抗、人工血管の抵抗などに依存し、単心室循環にとって適性の前負荷は良好な体循環につながる重要な指標で

ある。このため、第3期手術後急性期にみられる静脈圧の上昇は、胸水や腹水の貯留、心拍出量の減少として現れ、10年単位での長期的観測では肝硬変門脈線維化、蛋白漏出性腸症を合併し、細胞間マトリックスの破壊から重篤な炎症疾患を併発する。

学童期における機能的単心室症症例においても様々な問題は存在し、心機能異常以外にも、呼吸機能、学習能力、神経発達障害、認識障害、追視能力、言語発達や注意力の低下など様々な問題が明らかとなっている。幼少時での無酸素条件下での運動耐用能は通常人の約65%と言われ、成人とともにさらに低下すると報告されている。

外科的治療後の維持管理法として、beta-遮断薬、ACE、アルドステロン拮抗薬が使われている。最近ではホスホジエステラーゼ5阻害薬、エンドセリン拮抗薬の投与がFontan術後の運動耐用能を改善することが示唆され現在臨床試験中である。しかしながら、現在までのところ、単心室循環の術後長期予後を促進させる新たな治療法はとして、機械的な体循環の維持管理法以外は見当たらない。機能的単心室症に対する幹細胞自家移植による自己再生能を促す本臨床研究は、幼少期から年長期にかけての心機能改善を含めた臨床的予後への影響を検証することで、難治性心疾患に対する新たな治療法を開発する。

## B. 研究方法

### 目標症例数

第2相臨床試験の目標症例数は34例とする。

第2相臨床試験の主要エンドポイントである有効性を検証するために必要な症例数を目標症例数とする。目標症例数は試験適格症例で患者の同意を得られた症例のうち、心臓組織採取が適切に行われかつ、

単離した心臓幹細胞が使用試験細胞基準に適合し、全プロトコル治療が遂行された症例とする。

### 保存血より血清の採取

移植術日の前日までに、岡山県血液赤十字センターより手術時に使用する保存血の入手を依頼し、手術当日、岡山大学病院・中央手術部において血清採取を行う。

心臓手術時に人工心肺の回路にprimingする前の自己血を20mlの採取し、10mlの血清を分離する。採取した血清は岡山大学病院・探索的医薬品開発室の冷凍保管庫において-20℃で冷凍保存する。

### 心臓組織採取

細胞移植予定日の3週前の週に、心臓手術のため、岡山大学病院・心臓血管外科に入院する。岡山大学病院・中央手術部において、試験担当医師によって、手術中に100～250mgの右心房心臓組織を採取する。

### 細胞培養施設への運搬

8-1-3で採取した心臓組織は、滅菌された培養液の入った容器に入れ、速やかに試験細胞作成者により探索的医薬品開発室へ運搬される。運搬時の温度は常温（20～25℃）とする。

### 解析方法

#### 主要エンドポイント

評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

## 副次エンドポイント

1) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後1年目の時点において以下の基準において評価し比較検討する。

心室駆出率：心エコー図法によるsimpson法、心室造影と心臓MRIに基づいて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

2) 評価項目としてプロトコル治療による治療効果を、手術前と術後3ヶ月、1年の時点において以下の基準において評価し、比較検討する。

臨床症状:チアノーゼ症状、蛋白漏出性腸症。

房室弁逆流：心エコー図法、心室造影。

心不全症状：BNP値。

心機能評価：心臓カテテル検査による心室拡張末期圧、心室収縮末期圧、肺動脈圧、肺動脈圧格差、肺血管抵抗値の計測。

心筋重量：心臓MRI検査にて算出。

統計的解析方法としては、治療前後の改善を paired t-test、2群間の心機能に関する改善度の絶対値は2 sample t-testを用いてそれぞれ検定を行う。

## 臨床研究終了後の追跡調査

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。

被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。

(倫理面への配慮)

ヒト心臓組織の心筋生検による採取は、岡山大学医学部の倫理委員会にて審査承認された臨床研究プロトコル(承認番号766)に従順して行い、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について」(平成10年厚生科学審議会答申)を遵守する。

各関係者は臨床研究を遂行にあたり、「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年厚生労働省告示第415号)を遵守して行う。

臨床研究プロトコルは「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成22年告示第380号)を遵守して作成し、外部審査委員を含めた体制で審査される。

臨床研究に参加する患者さんへのインフォームドコンセントを徹底して行い、危険性の説明と研究内容に関する理解を得る。同意書原本は説明文書と共にカルテに添付して岡山大学病院で保管する。同意の撤回が生じた場合は、同意撤回文書を独立データモニタリング委員会に提出する。

本臨床試験の実施に起因して有害事象が発生し、被験者に健康被害が生じた時には、独立データモニタリング委員会に報告する。すみやかに適切な治療を受けることが出来るように、責任研究者/分担医師と岡山大学病院が対応する。

試験責任/分担医師は臨床研究保険に加入し、

万一、本臨床試験参加によって患者さんに健康被害が生じた場合に対応する。

有害事象発生時には、試験責任/分担医師は「重篤な有害事象発生時対応マニュアル」に沿って対応し、一次、二次と最終報告を行う。監査が行われる場合にすみやかに対応できるよう、原医療記録閲覧について患者説明を行う。

### C. 研究結果

平成25年4月8日に承認されたヒト幹細胞臨床研究実施計画に基づき、機能的単心室症由来の小児心不全に対する心臓内幹細胞の冠動脈内自家移植による第2相臨床試験 (PERSEUS 試験: NCT01829750)の登録実施を開始した。平成25年6月に第1症例目の心臓手術を実施、平成26年4月現在まで合計30の適応症例に対し心臓手術を行った。

うち、1症例は心臓手術前に臨床研究参加の同意を得たものの、術後1か月目（細胞移植前）の心機能検査により、適格基準である心室機能が規定の70%以上を上回ったため、登録除外症例とした。もう1症例は同じく心臓手術前に臨床研究参加の同意を得たものの、家庭内事情による心臓手術後の早期退院を強く希望され、患児のご両親による参加撤回となった。したがって、合計30症例手術した30症例のうち、28症例が現在も登録中であり、ランダム化によるプロトコル治療に沿って、治療及び経過を観察中である。

また、心臓手術を実施し登録された28症例に関しては、術後一過性のくも膜下出血が3例、菌血症1例を認めたが、概ね臨床的経過良好となり、現在プロトコル治療継続中である。

### D. 考察

登録された適応症例の全28症例から、心臓内幹細胞の分離培養に必要な余剰組織量である100mg~250mgの採取が充分臨床的に可能であった。また、組織採取による心臓の解剖学的影響や術後心機能の回復度に相違はなかった。

合計34症例を登録する臨床研究であるが、約10か月間でこれまでに28症例の心臓手術を実施できたことは、研究事業期間内に、十分に本研究事業の達成目標に到達できると考える。

### E. 結論

小児心不全に対する心臓内幹自家移植に必要な組織量を心臓手術中に採取することは臨床的に可能であった。実施予定症例設定数も統計学に基づいて算出されており、研究期間内に充分臨床的遂行完了できる計画内容である。

### F. 健康危険情報

該当なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, Sano S. Long-term effects of transcatheter closure of atrial septal defect on cardiac remodeling and exercise capacity in patients older than 40 years with a reduction in cardiopulmonary function. *J Interv Cardiol*. 2013 Apr;26(2):195-9.

Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondo M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T. Usefulness of balloon angioplasty for the right

ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2013 Apr;81(5):837-42.

Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, Sano S, Ito H. Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation. *Cardiovasc Interv Ther.* 2014 Jan 31. [Epub ahead of print]

Tarui S, Sano S, Oh H. Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology. *Methodist DeBakey Cardiovascular Journal*, 2014 (in press).

Ündar A, Wang S, Palanzo D, Weaver B, Pekkan K, Agirbasli M, Zahn JD, Luciani GB, Clark JB, Wilson RP, Kunselman AR, Sano S, Belli E, Pierce WS, Myers JL. Outcomes of the ninth international conference on pediatric mechanical circulatory support systems and pediatric cardiopulmonary perfusion. *Artif Organs.* 2014 Jan;38(1):5-10.

Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S. Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Mar;45(3):549-55.

Tateishi A, Kasahara S, Kawabata T, Kuroko Y, Yoshizumi K, Takagaki M, Arai S, Sano S. The effect of pulmonary root translocation on the left ventricular outflow tract. *Ann Thorac Surg.* 2013 Oct;96(4):1469-71.

Kanamitsu H, Fujii Y, Mitsui H, Sano S.

Effects of atrial natriuretic peptide after prolonged hypothermic storage of the isolated rat heart. *Artif Organs.* 2013 Nov;37(11):1003-8.

Kijima Y, Akagi T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, Sano S, Ito H. Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cerebrovascular accidents: initial experiences in Japan. *Cardiovasc Interv Ther.* 2014 Jan;29(1):11-7.

黒子洋介、佐野俊二 先天性心疾患 完全大血管転位症 今日の循環器疾患 治療指針 pp531-532, 2013.

服部 滋、吉積 功、川畑拓也、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二 先天性右室瘤の外科治療：乳児期に急速な瘤拡大を示した1例 日本小児循環器学会雑誌, 29:194-199, 2013.

樽井俊、佐野俊二、王 英正 心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療 月刊循環器 9月号 3(9): 69-76 医学出版(2013)

## 2. 学会発表

Kasahara S, Goto T, Okuyama M, Hirata M, Kobayashi J, Tarui S, Ishigami S, Kawabata T, Kuroko Y, Masuda Z, Zenichi, Yoshizumi K, Arai S, Sano S. SURGICAL RESULTS FOR THE PATIENTS WITH FUNCTIONAL SINGLE VENTRICLE HAVING HIGH PULMONARY ARTERY PRESSURE ASCVTS 2013 2013.4.4.7. 神戸

Tarui S, Kobayashi J, Hirata M, Takahashi K, Iribe G, Naruse K, Kasahara S, Sano S, Oh H Factors-based human cardiomyocytes

differentiation exhibits incomplete maturation and excitation through aberrant calcium handling proteins The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.4.7 神戸

Junko Kobayashi, Masashi Yoshida, Suguru Tarui, Masataka Hirata, Ken Takahashi, Shingo Kasahara, Kenji Naruse, Hiroshi Ito, Shinji Sano, Hidemasa Oh. PATIENT-SPECIFIC INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS RECAPITULATE THE MODELS OF HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Surgery 2013.4.7 神戸

Goki T, Miyata H, Murakami A, Tomotaki A, Goki T, Matsumura G, Sano S, Takamoto S DOSE SURGICAL APPROACHES HAVE ANY IMPACT ON MORTALITY AND MORBIDITY AFTER BLALOCK-TAUSSIG SHUNT PROCEDURES. RISK MODELS BASED ON THE JAPAN CONGENITAL CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4.7 神戸

Goto T, Yoshizumi K, Kasahara S, Arai S, Tateishi A, Kuroko Y, Kawabata T, Sano S SURGICAL REPAIR FOR DOUBLE OUTLET RIGHT VENTRICLE WITH INTACT VENTRICULAR SEPTUM 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Ishigami S, Kasahara S, Takagaki M, Arai S, Sano S SALVAGE PROCEDURE FOR HIGH RISK PATIENTS WITH COMPLEX CARDIAC ANOMALY 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S, Kasahara S, Yoshizumi K, Tateishi A, Kawabata T, Kuroko Y, Fujii Y, Arai S SANO MODIFICATION WITH A RIGHT VENTRICLE-TO-PULMONARY ARTERY SHUNT TO THE PATIENTS WITH HYPOPLASTIC LEFT HEART SYNDROME ASCVTS 2013 2013.4. 7 神戸

Murakami A, Takamoto S, Miyata H, Morita N, Sano S JAPAN CONGENITAL CARDIOVASCULAR SURGERY DATABASE FOR QUALITY IMPROVEMENT 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S PARACHUTE MITRAL VALVE The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Sano S FIRST STAGE PALLIATION UNITY RU-PA SHUNT TO HLHS The 21st Annual Meeting of the Asian Society for Cardiovascular Thoracic Surgery 2013.4. 7 神戸

Douguchi T, Itoh H, Taka H, Yagi T, Sano S VENO-VENOUS BYPASS 中に高カリウム血症の是正を目的として CHD を使用した脳死肝腎移植術の 1 症例 The 21st Annual Meeting of The Asian Society for

Cardiovascular and Thoracic Surgery  
2013.4.7 神戸

笠原真悟、吉積 功、高垣昌巳、新井禎彦、  
佐野俊二 複雑心奇形を有する成人期再手術  
例の治療成績ならびに現状の問題点 第  
113 回日本外科学会定期学術集会  
2013.4.11 福岡

小林純子、樽井 俊、平田昌敬、川畑拓也、  
黒子洋介、立石篤史、吉積 功、新井禎彦、  
笠原真悟、佐野俊二、王 英正 疾患特異的  
iPS 細胞を用いた左心低形成症候群における  
心臓発生異常の解明 第 113 回日本外科学  
会定期学術集会 2013.4.11 福岡

Sano S, Kasahara S, Fujii Y, Tateishi A,  
Kuroko Y, Yoshizumi K, Arai S  
Atrioventricular valve Repair in  
Heterotaxy syndrome 2013 AATS Mitral  
Conclave 2013.5.2 New York

Sano S, Oh H, Tarui S, Kobayashi J, Hirata  
M, Kawabata T, Tateishi A, Kuroko Y,  
Yoshizumi K, Arai S, Kasahara S Annual  
Meeting of American Association for  
Thoracic Surgery 2013.5.4 Minneapolis

Sano S. Stem Cell Therapy In Children  
With HLHS 9th International  
Conference on Pediatric Mechanical  
Circulatory Support System & Pediatric  
Cardiopulmonary Perfusion 2013.5.8  
Hershey

Yoshizumi K, Kasahara S, Tateishi A,

Kawabata T, Kuroko Y, Arai S, Sano S The  
influence of Lower Body Circulatory Arrest  
on the Acute Kidney Injury after Surgery for  
Congenital Heart Disease in Neonate 9th  
International Conference on Pediatric  
Mechanical Circulatory Support Systems &  
Pediatric Cardiopulmonary Perfusion  
2013.5.8 Hershey

佐野俊二 先天性心疾患治療の最前線 第 6  
回先天性心疾患シンポジウムイン岡山  
2013.5.18 岡山

Sano S 日本における心疾患治療の最新状況  
について International contribution of  
Cardio Surgery starts with training young  
surgeon Medical Excellence JAPAN  
Seminar -Vietnam~Japan Medical  
Collaboration- 2013.8.26 Hanoi

Sano S RV-PA conduit for Stage I  
Hypoplastic Heart Syndrome The 5th  
Congress of Asia Pacific Oediatric Cardiac  
Society 2014.3.6. New Delhi.

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 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。



冠動脈内注入法による心臓内幹細胞の自家移植に関する研究

研究分担者 大月 審一 岡山大学病院教授

研究要旨

先天性心疾患に対する治療法として、従来 of 姑息的心臓手術以外に、最近では経皮的な心臓カテーテル法を用いたインターベンションにより、器質的な形態修復が可能となり全身の血行動態の改善につながっている。特に、小児心臓疾患は多様性に富み、疾患別の解剖学的特徴を踏まえた治療戦略の選択が重要である。本研究では、これまでに臨床的治療法として未確立の心筋再生医療法が心臓手術後の心室機能改善に寄与するかについて、ランダム化された34症例を対象に冠動脈内注入法による心臓内幹細胞自家移植療法を実施することで、安全性と有効性を焦点に通常的心臓手術単独群と比較検証する。

A. 研究目的

機能的単心室症のうち、左心低形成症候群は重症度が高く、その解剖学的分類によって多彩であるが、潜在的に心予備能が低い症例が多く、様々な心臓カテーテル治療を併用することで心不全の発症を予防する治療戦略がとられている。

具体的には左心低形成症候群に合併する血行動態異常として、出生後からの動脈管の狭小化による肺血管抵抗の低下に伴う肺動脈と体循環バランスの破綻が起り、プロスタグランジン投与やステント留置による動脈管の開存維持が臨床上よく行われる治療法である。

また、出生直後よりチアノーゼが重度で血行動態が不安定な症例は心房中隔欠損口が小さいま

たは開存していない場合には、緊急外科的手術もしくはカテーテルによるステント留置で中隔壁の閉鎖を解除することで酸素化を図る。

左心低形成症候群に対して、通常は従来 of NorwoodやSano手術を第1期手術として行うことが標準治療であるが、最近では上述のカテーテル治療を組み合わせたハイブリッド手術法が新しいオプション治療法として登場した。本疾患に対するハイブリッド手術法とは、新生児期に肺動脈絞扼術に加え、動脈管および心房中隔内にステントを留置するで、心臓カテーテルと心臓手術が同時に実施できるハイブリッド手術室で行う。このアプローチの優位性は現在検証中であるが、少なくとも最終手術に至るまでの期間に心房中隔、肺動脈や大動脈弓に対する追加の心臓カテーテル治療が

必要になることが多く、新生児期の入院期間が短いことが現在のところ明らかな利点である。いずれの初期治療法においても、集約的にはFontan第3期手術が必要であることに変わりなく、施設によっては新生児期にハイブリッド手術治療を行い、小児心臓移植実施まで待機する治療方針を選択している。

このように小児心臓病に対するカテーテル治療は有用で心臓手術に比べ低侵襲であることも大きな利点である。対象疾患は左心低形成症候群のみならず、大動脈弁狭窄、大動脈縮窄症、心室中隔欠損症、肺動脈や弁自身の器質的狭窄、冠動静脈ろう、肺動脈内における人工血管の閉塞に対するステント留置や逆流への肺動脈弁置換、各種血管奇形や側副血行路への塞栓術など広い領域で用いられる治療法である。

小児冠動脈病変に対するカテーテル治療は上記の疾患以外に川崎病などがあるが、医療技術的には、小児心疾患に対する冠動脈インターベンションは充分可能であると考えられる。本研究では、上記のステント留置術、コイル塞栓術、バルーン拡張術以外に、心臓内幹細胞の冠動脈注入法による心筋再生医療の安全性と有効性を検証することで、新たな小児心不全治療法の確立を目指す。

## B. 研究方法

### **冠動脈造影**

- 1) 試験治療として、全身麻酔下に4Fのシースを右下腿動脈より挿入する。
- 2) 術前診断に基づき、冠動脈造影を行い、機能的心室への支配冠動脈の走行及び瘤形成や器質的狭窄の有無を確認する。

### **冠動脈内への自己心臓内幹細胞移植**

心臓幹細胞の適格基準を自己心臓内幹細胞に関する概要書に定められた手順にて評価、適応有りの症例において以後のプロトコル治療を行う。適応無しと判定された場合は、脱落と判定され、直ちにデータセンターに結果を報告する。

治療法：

- 1) カテーテル検査時には、初期にヘパリン急速飽和量（100 単位/kg）を投与する。
- 2) 移植する幹細胞の冠動脈内への接着及び浸透のため、perfusion balloon カテーテルを用いて移植する。
- 3) 自己心臓内幹細胞  $3.0 \times 10^5$  個/kg を合計 3ml の 10%自己血清含む細胞用培養液に懸濁させる。
- 4) 低圧で膨らましたバルーンの中を通じて、幹細胞を注入する。
- 5) 冠動脈内注入は 1ml ずつ合計 3 回に分け、一回当たりの注入時間は 3 分とする。
- 6) それぞれの幹細胞注入後、3 分間の休止時間を置き、心筋虚血時間を最小限にする。

### **試験治療に対する補助治療及びモニタリング**

- 1) 細胞移植時の冠動脈内注入する 30 分前にアンカロン注 150 を塩酸アミオダロンとして、10microgam/kg/min を容量型の持続注入ポンプ用いて、末梢静脈より投与する。
- 2) 術翌日より、アンカロンを 4mg/kg を 2 回/日で術後 7 日まで内服投与とする。
- 3) 細胞移植時に補助循環（人工心肺）は必ずしも必要とはしないが、致命的合併症の出現に備えて常に使用可能な状態に待機する。
- 4) 細胞移植時に収縮期血圧 80mmHg 以下の時

は投与を一時中断し、昇圧剤その他の開心術時に必要とされる補助療法で回復の後、投与を再開する。

### **試験スケジュール変更基準**

#### 1) 治療前

患者理由により手術が延期される場合  
心臓内幹細胞精製過程の準備期間にて、  
明らかな心不全の再発などにより、治療が必要となった場合(この場合、細胞は試験再開まで凍結保存とする)。

#### 2) 治療後細胞移植後

明らかな心不全の再発などにより、治療が必要となった場合は、救命治療を最優先とし、心機能評価などの定期的評価はスキップ可能とする。

### **プロトコル治療中止基準**

- 1) 被験者が試験参加の同意を撤回した場合、あるいは試験継続の意思を表明できない意識障害や混迷状態に陥った場合。
- 2) 登録後に不適格症例であることが判明した場合。
- 3) 心臓幹細胞採取において以下の合併症にて遂行不能の場合。  
心臓組織採取不能例  
心タンポナーデ  
心室性不整脈(散発性の心室性期外収縮は除く)  
心原性ショック
- 4) 心臓幹細胞培養工程において、培養 21 日までに必要細胞数( $3.0 \times 10^6/\text{kg}$  個)に達しない場合。
- 5) 培養開始時、細胞凍結時、及び細胞解凍時の

エンドトキシン、細菌、真菌、マイコプラズマ検査、細胞上清ウイルス検査で陽性の場合。なお細胞移植後に上記検査結果が陽性と判定された場合は、被験者にその旨説明し、支持療法として創感染に対処する。

- 6) 試験治療待機期間及び、試験治療後の観察期間中に何らかの侵襲的治療(補助循環装置、心室再同期療法、心臓移植等)が必要とされた場合(術後回復期間中の集中治療室における一過性ペースメーカー埋め込み、補助循環装置の使用は除く)。
- 7) 細胞移植治療中に致死的合併症(心室細動含む)が発生した場合。
- 8) 死亡した場合。
- 9) その他試験担当医師が被験者の安全性確保及び自己決定権尊重のためにプロトコル治療の中止を判断した場合。

### **支持療法**

以下の予想される有害事象に対して、適切な治療を行う。

- 1) 採血部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 2) 採血後の貧血：鉄剤の投与。
- 3) 鼠径穿刺部の疼痛・皮下出血：局所圧迫及び消炎鎮痛外用剤の投与。
- 4) 鼠径穿刺後の後腹膜腔血腫、腰部皮下血腫：必要な場合はドレナージ。
- 5) 術中の不整脈(心室細動を含まない)：抗不整脈薬の投与。
- 6) 術中、術後回復期間においての遷延性低血圧もしくは心原性ショック：昇圧剤、強心剤の投与、補助循環装置の使用。
- 7) 創感染(縦隔炎含む)：菌同定・抗生物質

の投与、無効な場合は病巣洗浄・搔爬。

8) 全身麻酔に関連した有害事象：

アナフィラキシーショック：ステロイド剤等の投与。

肝機能検査異常：肝庇護剤の投与。

腎機能検査異常：輸液による電解質補正、重篤な場合は透析。

### **併用禁止薬**

被験者において、試験前、試験期間中において併用禁止とする薬剤は特に規定しないが以下に挙げる薬剤は、心臓手術前後 1 週間の休薬が望ましい。

パナルジン、プレタール等の抗血小板薬  
バイアスピリン

### **後療法**

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

### **予想される有害事象**

#### **心臓カテーテル検査に関連した有害事象、合併症**

- 1) 鼠径穿刺部の疼痛、出血。
- 2) 局所麻酔薬によるアレルギー反応。
- 3) 術後の止血不良による穿刺部の血腫。
- 4) 極めて稀ではあるが術後穿刺部出血による後腹膜血腫。
- 5) 極めて稀ではあるが穿刺部の感染。

#### **造影・心内圧検査による有害事象**

- 1) 造影剤アレルギー。
- 2) 極めて稀ではあるが、カテーテル操作による心室、血管の穿孔。

- 3) 検査後の心タンポナーデ。
- 4) 房室ブロック（脚ブロックを含む）。
- 5) 心室性不整脈。
- 6) 極めて稀ではあるが死亡。
- 7) 感染症。

### **冠動脈内への幹細胞注入に関する有害事象**

- 1) 培養上清中に細菌が検出され、同一の細菌により術部感染が発生した場合。
- 2) 細胞移植部からの腫瘍発生(間葉系幹細胞を体外で培養したのち、ヒトに投与した臨床試験はいくつか報告されているが、現在のところ腫瘍発生はない)。
- 3) 細胞移植時、冠動脈内注入する際に生じる心室性不整脈（前臨床試験ブタ全 70 頭への心筋局注に際し、初期の 1 例目においてのみ穿刺関連の心室性不整脈の発生を認めたが、穿刺前のアミオダロン前投薬によるプロトコル改変治療後は、心室性不整脈の発生は一例も認めていない）。

### **幹移植術後の心室性不整脈への対応について**

これまでに報告された骨髄幹細胞の冠動脈内注入による臨床試験では、小児及び成人心不全を含め、致死性不整脈の発生は報告されていない。

一方、本研究で用いられる心臓内幹細胞については、心臓幹細胞自体の再生機序、gap-junction 蛋白を介したホスト心筋との電氣的融合の形成、前臨床試験での不整脈監視試験の結果からは、その心室性不整脈の発生の危険性は低いと思われる。また、最近報告された大型動物用いた類似の心臓内幹細胞移植の冠動脈注入法による前臨床試験においても、致死性不整脈の発生は認められていない。さらに、TICAP 第 1 相臨床試験ならびに成人

虚血性心不全を対象にした SCPIO や CADUCEUS 臨床試験のように、冠動脈注入法による不整脈惹起の報告もないことから、本第 2 相臨床試験において致死性不整脈の発生の可能性は低いと考えられる。

また、従来報告されている骨格筋芽細胞移植による催不整脈作用（心室性不整脈）と同様の不整脈発生の危険性に関して、日本循環器学会の不整脈治療のガイドラインに則り、標準的抗不整脈治療を行う。この抗不整脈治療に対して抵抗性の致死性不整脈の発生を認めた場合は、埋め込み型除細動器の移植適応ガイドラインに則り、適応とされる症例には埋め込み型除細動器の移植を行う。

## **有害事象の報告と対応**

### **報告義務のある有害事象**

報告義務のある有害事象は、初回の心臓カテーテル検査から幹細胞移植手術後 1 年の間に発生したものとす。

### **報告・対応手順**

試験責任 / 分担医師は、一次報告( 72 時間以内 ) 二次報告 ( 7 日以内 ) 詳細調査報告、最終報告を行う。

### **対応手順**

主任研究者、研究事務局および独立データモニタリング委員は、一次報告後の対応、二次報告後の対応、独立データモニタリング委員会による評価・勧告、対策の決定、最終報告後の対応を行う。

### **臨床研究終了後の追跡調査**

3年間の臨床研究終了後も通常の保険診療行為として被験者の追跡を、10年以上を目安として行う。

被験者に病原体感染等の有害事象が生じた場合は、適切な医療措置を行うとともに、最終調製物に関する確認を行い、原因究明に努める。他の被験者の健康状態も確認し、被験者の安全性確保に努める。

## **観察・検査・報告項目とスケジュール**

### **心臓カテーテル検査当日（細胞移植日）**

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 冠動脈造影： 主要冠動脈の有意狭窄の検証
- 3) 心機能： 心内圧測定、心血管造影
- 4) 心電図
- 5) 24 時間心電図モニター監視（術後から術後 1 週目まで）

### **心臓カテーテル検査翌日（細胞移植後）**

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
- 3) 生化学検査  
GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質 ( Na、K、Cl )、CRP、CPK、CPK-MB、BS
- 4) 心電図
- 5) 胸部 X 線検査： 胸部前後撮影
- 6) 24 時間心電図モニター監視： 致死性・非致死性不整脈の検証

### **細胞移植後 1 週目**

- 1) 身体所見： 体重、血圧、脈拍数
- 2) 血液学的検査：白血球数、好中球数、赤血球数、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血小板
- 3) 生化学検査  
GOT(AST)、GPT(ALT)、LDH、総ビリルビン、直接ビリルビン、総タンパク、アルブミン、血清クレアチニン、BUN、電解質 ( Na、K、Cl )、CRP、CPK、CPK-MB、BS、BNP
- 4) 凝固系： PT、APTT、D-dimer
- 5) 24 時間心電図モニター監視： 致死性・非致死性不整脈の検証
- 6) 心電図
- 7) 胸部 X 線検査： 胸部前後撮影
- 8) 臨床症状： 心不全、チアノーゼ

( 倫理面への配慮 )

## **遵守すべき諸規則**

本研究に携わるすべての者は、ヒトを対象とする全ての医学研究が準拠すべき「世界医師会ヘルシンキ宣言」(1964年第18回世界医師会ヘルシンキ総会で起草、2004年10月第56回東京総会で最新改訂)や「臨床研究に関する倫理指針」(平成15年7月30日厚生労働省公布、改正：平成16年厚生労働省告示第459号)の内容を遵守し、更に「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(平成18年7月3日 厚生労働省公布)の内容に準じて施行する。

## **説明と同意(インフォームド・コンセント)**

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

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

試験参加中の被験者が同意の撤回を申し出た場合、試験責任/分担医師はその旨をカルテに記載し、記録を残す。被験者は同意を撤回する場合、試験責任者に対し同意撤回文書の交付を要求し、必要事項を記入した後に、提出する。試験責任医師は同意撤回文書を独立データモニタリング委員会に提出報告する。独立データモニタリング委員

会は同意撤回手続きが正しく行われたことを確認、担当の試験責任医師にこれを通知する。試験責任医師は被験者に通知し、同意撤回手続きが完了する。同時に試験責任医師は登録・データセンターに試験中止報告書を提出する。

## **個人情報の保護**

個人情報の保護については、岡山大学に適用される法令、条例等を遵守する。試験に係わる関係者は、ヒト幹細胞臨床研究を行う上で知り得た被験者等に関する個人情報を正当な理由なく漏らしてはならないものとする。職を退いた後も同様とする。

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

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

## **健康被害に対する補償**

本臨床試験の実施に起因して有害事象が発生し、被験者に健康被害が生じた時には、すみやかに適切な治療その他最善の措置を受けることが出来るように、主任研究者、試験分担医師と岡山大学病院が対応する。

## C. 研究結果

本第2相臨床研究の開始以降、2014年4月までに、ランダム化により割振りされた細胞移植群10症例と非移植群のうち3か月目の評価検査を終了しかつ救済移植を希望された7症例の合計17症例に対して、患者さん由来の心臓内幹細胞の冠動脈内注入を実施した。移植細胞数はプロトコル通り体重kgあたり30万個の幹細胞を3等分し、右冠動脈、左前下行枝ならびに回旋枝内に選択的に合計3mLとなるように注入した。うち、解剖学的に低形成の冠動脈を示した3症例においては選択的注入を断念し残りの2本の冠動脈内にそれぞれ1.5mLずつ注入した。

一回当たりの冠動脈内注入時間は0.5～1.5分であったが、5分以上の休止期間をはさみ、全予定細胞数をそれぞれ冠動脈内に移植できた。右冠動脈起始部注入時に一過性の洞性徐脈を5症例に認め、バルーンによる1分以上の冠動脈閉塞の際には、ほぼ全症例において心電図上一過性のST-T変化と血圧の低下を観察した。これらの事象はバルーンdeflationにより速やかに基本調律やカテーテル前の心電図に回復し、持続的後療法を必要とする有害事象の発生は認めなかった。

また、プロトコル治療に則り不整脈予防のため、カテーテル後のアンカロン内服を全症例に実施しているが、うち2症例はアンカロンによる陰性変時作用により、1度の房室ブロックを術後2日目から検出し、同症例のアンカロン中止により速やかに房室ブロックの改善を認めた。また、1症例においては心臓手術後より投与開始されたワーファリンと移植手術中の抗凝固療法（ヘパリン）により、心臓カテーテル後一過性の脳内出血と脊椎内出血を認めたが、抗凝固療法中止により回復した。全症例において細胞注入に伴う催不整脈作用を認めず、術後心タンポナーデ、感染症

やアレルギーの合併も観察されなかった。

#### D. 考察

冠動脈注入法による心臓内幹細胞移植法は、安全で、これまでに経験した17症例において、心臓関連の有害事象の発生は認められなかった。有効性検証は現在症例登録実施中であるが、これまで移植した17症例のうち、3か月目の評価カテーテル検査を終了した11症例に関しては、非移植群の7症例に比べ統計学的に有意に心機能は改善していた( $p=0.03$ )。今後、予定症例数の34人まで継続的に細胞移植を実施し、カテーテル治療の安全性と細胞治療の有効性についてより詳細に検討していく。

#### E. 結論

冠動脈内注入法による心臓内幹細胞移植は、技術的に実施可能で安全である。本臨床研究開始初年度内に予定症例数の50%に当たる17人に移植できたことにより、研究計画2年目に全予定症例数に移植することが充分可能であり、臨床治験に向けた細胞移植における安全性及び有効性に関する臨床的エビデンス構築の推進を今後も継続していく。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondo M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T. Usefulness of balloon angioplasty for the right ventricle-pulmonary artery shunt with the

modified Norwood procedure. Catheter Cardiovasc Interv. 2013 Apr;81(5):837-42.

## 2. 学会発表

Baba, K. Ohtsuki. S : Pulmonary flow control using balloon angioplasty for right ventricular-pulmonary artery shunt with a hemoclip in Hypoplastic left heart syndrome. Pediatric and adult interventional cardiac symposium, Florida, (6.8.2013)

馬場 健児[1], 大月 審一[1], 岡本 吉生 [1], 近藤 麻衣子[1], 栗田 佳彦[1], 栄徳 隆裕[1], 小寺 亜矢[1], 笠原 真悟[2], 佐野 俊二[2], 岩崎 達雄[3], 森島 恒雄[4] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 心臓血管外科学, [3] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 麻酔・蘇生学, [4] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 小児医科学: Hemoclipとballoon angioplastyを組み合わせたNorwood術後の肺血流コントロール: 第24回JPIC学術集会 愛媛 (1.25.2013)

近藤 麻衣子[1], 大月 審一[1], 馬場 健児 [1], 岡本 吉生[1], 栗田 佳彦[1], 栄徳 隆裕[1], 小寺 亜矢[1], 佐野 俊二[2], 笠原 真悟[2], 岩崎 達雄[3], 戸田 雄一郎[3], 清水 一好[3] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 心臓血管外科, [3] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 麻酔蘇生科: clip付きBTshuntに対するバルーン拡大術の有用性: 第24回JPIC学術集会 愛媛 (1.25.2013)

栄徳 隆裕, 大月 審一, 馬場 健児, 岡本 吉生, 近藤 麻衣子, 栗田 佳彦, 小寺 亜

矢 岡山大学病院 小児循環器科: カテーテルインターベンションによって完全閉塞した肺動脈やshuntを再開通させる効果について: 第24回JPIC学術集会 愛媛 (1.25.2013)

栗田 佳彦[1], 大月 審一[1], 小寺 亜矢 [1], 栄徳 隆裕[1], 近藤 麻衣子[1], 岡本 吉生[1], 馬場 健児[1], 森嶋 恒雄[2], 佐野 俊二[3], 笠原 真吾[3], 岩崎 達雄[4], 戸田 雄一郎[4] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 小児医科学, [3] 岡山大学病院 心臓血管外科, [4] 岡山大学病院 麻酔・蘇生科: 心房中隔・fenestrationに対するstent留置術: 第24回JPIC学術集会 愛媛 (1.26.2013)

大月 審一[1], 馬場 健児[1], 岡本 吉生 [1], 栗田 佳彦[1], 近藤 麻衣子[1], 栄徳 隆裕[1], 小寺 亜矢[1], 森島 恒雄[2] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 小児医科学: ASD with Deficient Rim: 小児例における適応と試み: 第24回JPIC学術集会 シンポジウム 愛媛 (1.26.2013)

栗田 佳彦[1], 大月 審一[1], 栄徳 隆裕 [1], 近藤 麻衣子[1], 大野 直幹[1], 馬場 健児[1], 森嶋 恒雄[2], 佐野 俊二[3], 笠原 真吾[3], 岩崎 達雄[4], 戸田 雄一郎 [4] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 小児医科学, [3] 岡山大学病院 心臓血管外科, [4] 岡山大学病院 麻酔・蘇生科: 当院での術中肺静脈ステント症例の検討: 第49回日本小児循環器学会学術集会 東京 (7.11.2013)

馬場 健児[1], 大月 審一[1], 栄徳 隆裕 [1], 栗田 佳彦[1], 近藤 麻衣子[1], 大野



直幹[1], 森嶋 恒雄[2], 佐野 俊二[3], 笠原 真吾[3], 岩崎 達雄[4], 戸田 雄一郎[4] [1] 岡山大学病院 小児循環器科, [2] 岡山大学大学院医歯薬総合研究科 小児医科学, [3] 岡山大学病院 心臓血管外科, [4] 岡山大学病院 麻酔・蘇生科: 両側肺動脈 banding 後 Norwood 手術と初回 Norwood 手術との肺動脈成長に関する検討: 第 49 回日本小児循環器学会学術集会 東京 (7.11.2013)

#### H. 知的財産の出願・登録状況

##### 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。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 (王 英正)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
樽井俊、 佐野俊二、 王 英正	心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療	福田恵一	月刊循環器	医学出版	東京	2013	69-76

書籍 (佐野俊二)

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
黒子洋介、 佐野俊二	先天性心疾患完全大血管転位症	井上 博、 許 俊鋭、 檜垣實男、 代田浩之、 筒井裕之	今日の循環器疾患	医学書院	東京	2013	531-532
服部 滋、吉積 功、川畑拓也、新井禎彦、笠原真悟、佐野俊二	先天性右室瘤の外科治療：乳児期に急速な瘤拡大を示した1例	中西敏雄	日本小児循環器学会雑誌	株式会社協和企画	東京	2013	194-199
樽井俊、 佐野俊二、 王 英正	心筋幹細胞を用いた先天性心疾患に対する心筋再生医療	福田恵一	月刊循環器	医学出版	東京	2013	69-76

雑誌 (王 英正)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogata T, Naito D, Nakanishi N, Hayashi YK, Taniguchi T, Miyagawa K, Hamaoka T, Maruyama N, Matoba S, Ikeda K, Yamada H, Oh H, Ueyama T.	MURC/Cavin-4 facilitates recruitment of ERK to caveolae and concentric cardiac hypertrophy induced by $\alpha 1$ -adrenergic receptors.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i>	111	3811-3816	2014

Tarui S, Sano S, <u>Oh H.</u>	Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.	<i>Methodist DeBakey Cardiovascular Journal</i> ,	in press		2014
-------------------------------	---	---	----------	--	------

雑誌（佐野俊二）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takaya Y, Taniguchi M, Akagi T, Nobusada S, Kusano K, Ito H, <u>Sano S.</u>	Long-term effects of transcatheter closure of atrial septal defect on cardiac remodeling and exercise capacity in patients older than 40 years with a reduction in cardiopulmonary function	<i>J Interv Cardiol</i>	26	195-199	2013
Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondou M, <u>Sano S</u> , Kasahara S, Honjo O, Morishima T	Usefulness of balloon angioplasty for the right ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure	<i>Catheter Cardiovasc Interv</i>	81	837-842	2013
Tarui S, <u>Sano S</u> , Oh H.	Stem cell therapy in patients with single ventricle physiology.	<i>Methodist DeBakey Cardiovascular Journal</i> ,	in press		2014
Takaya Y, Akagi T, Kijima Y, Nakagawa K, Taniguchi M, Ohtani H, <u>Sano S</u> , Ito H.	Transcatheter closure of right-to-left atrial shunt in patients with platypnea-orthodeoxia syndrome associated with aortic elongation.	<i>Cardiovasc Interv Ther.</i>	Epub ahead of print		2014
Ündar A, Wang S, Palanzo D, Weaver B, Pekkan K, Agirbasli M, Zahn JD, Luciani GB, Clark JB, Wilson RP, Kunselman AR, <u>Sano S</u> , Belli E, Pierce WS, Myers JL.	Outcomes of the ninth international conference on pediatric mechanical circulatory support systems and pediatric cardiopulmonary perfusion.	<i>Artif Organs.</i>	38	5-10	2014

Sano S, Fujii Y, Kasahara S, Kuroko Y, Tateishi A, Yoshizumi K, Arai S.	Repair of Ebstein's anomaly in neonates and small infants: impact of right ventricular exclusion and its indications.	<i>Eur J Cardiothorac Surg.</i>	45	549-555	2014
Tateishi A, Kasahara S, Kawabata T, Kuroko Y, Yoshizumi K, Takagaki M, Arai S, Sano S.	The effect of pulmonary root translocation on the left ventricular outflow tract.	<i>Ann Thorac Surg.</i>	96	1469-1471	2013
Kijima Y, Akiyama T, Nakagawa K, Taniguchi M, Ueoka A, Deguchi K, Toh N, Oe H, Kusano K, Sano S, Ito H.	Catheter closure of patent foramen ovale in patients with cryptogenic cerebrovascular accidents: initial experiences in Japan.	<i>Cardiovasc Interv Ther.</i>	29	11-17	2014
Kanamitsu H, Fujii Y, Mitsuhashi H, Sano S.	Effects of atrial natriuretic peptide after prolonged hypothermic storage of the isolated rat heart.	<i>Artif Organs.</i>	37	1003-1008	2013

雑誌（大月審一）

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ohno N, Ohtsuki S, Kataoka K, Baba K, Okamoto Y, Kondo M, Sano S, Kasahara S, Honjo O, Morishima T.	Usefulness of balloon angioplasty for the right ventricle-pulmonary artery shunt with the modified Norwood procedure.	<i>Catheter Cardiovasc Interv.</i>	81	837-842	2013