

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

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

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 坂田 隆造

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金

医療技術実用化総合研究事業（臨床研究・治験推進研究事業）

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

I．総括研究報告	-----	1
・総括研究報告	-----	2
研究代表者 京都大学大学院医学研究科 坂田 隆造		
研究分担者 天理よろづ相談所病院 心臓血管外科 丸井 晃		
・平成 26 年度 坂田班 班会議開催状況報告	-----	9
・先進医療に係る定期・総括報告書	-----	10
II．分担研究報告	-----	17
・分担研究報告 1	-----	18
研究分担者 京都大学再生医科学研究所 田畑 泰彦		
・分担研究報告 2	-----	21
研究分担者 京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 清水 章		
・分担研究報告 3	-----	23
研究分担者 京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター 横出 正之		
・分担研究報告 4	-----	26
研究分担者 京都大学大学院医学研究科 森田 智視		
・分担研究報告 5	-----	27
研究分担者 京都大学医学部附属病院 松原 和夫		
III．研究成果の刊行に関する一覧	-----	30
IV．研究成果の刊行物・別刷	-----	34

・ 総括研究報告

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

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

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

我々は遺伝子や細胞の代わりに、安全かつ細胞増殖因子を必要十分に作用できる「ゼラチンハイドロゲル」を開発した。この最大の利点はゼラチンハイドロゲルが生体内吸収性であり臨床における安全性が期待できる点にある。また様々な細胞増殖因子を組み合わせることで効果的な徐放投与が可能であり、遺伝子治療・細胞移植治療と比べて手技が非常に簡便・低コストであることも特徴である。我々は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)徐放化ゼラチンハイドロゲルの有効性を多くの基礎研究で検証し、臨床治験に向けた治験薬 GMP 基準での製剤施設を立ち上げ、平成 22 年 6 月には「生体内吸収性高分子担体と bFGF による血管新生療法」が第三項先進医療（現先進医療 B）の承認を受け、臨床試験を開始した。平成 24 年 3 月に目標の 10 症例の登録を完了し、同年 8 月に全例の 24 週の観察を終了した。結果として治療に関連する明らかな有害事象はなく、主要エンドポイントの下肢の経皮的酸素飽和度(TcO₂)の有意な改善を認めた。平成 25 年 3 月には「先進医療に係る定時・総括報告書（別項）」の提出を完了した。平成 25 年 11 月には PMDA 薬事戦略相談事前面談を行い、今後の治験における方向性として下肢切断率に代わる TcO₂の妥当性の検証が必要とされ、今年度はその検証を行った。また当該技術の重症虚血性心疾患における応用では、平成 24-26 年度で大動物での安全性・有効性の検証を完了し、現在臨床研究のプロトコル作成中であり、今年度中の開始にむけて準備を進めている。

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

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

成 24 年度に指摘されたため、平成 25 年度以降は当研究費による前臨床研究以外の基礎的検討は行なっていない。

今年度は臨床研究 および における前臨床研究について報告する。

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

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

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

平成25年11月にはPMDA薬事戦略相談事前面談を行い、今後の治験における下肢切断率に代わるTcO₂の妥当性の検証が必要とされた。そこで今年度はこの研究の成果を学術誌に報告するとともに(Kumagai M, et al. Heart and Vessels, in press)、今後の治験に向けてTcO₂の主要エンドポイントとしての妥当性を臨床研究総合センターと共同で検証した。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

重症下肢虚血患者において、虚血の重症度とTcO₂との相関に関する約200本の文献から、解析可能なデータを含む文献を対象とした。カットオフ値20 mmHgに関しては13文献、カットオフ値30、40 mmHgに関しては12文献が対象となった。統計解析はdiagnostic odds ratio(DOR)に対するDerSimonian and Laird (1986)法によるメタアナリシスを行った。

C. 研究結果

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

D. 考察

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

そのため平成25年のPMDA薬事戦略相談で

は、「下肢切断率の代替指標としてTcO₂の妥当性を証明できれば、治験における主要エンドポイントとすることは可能」との意見を頂いた。そこで、今回のメタアナリシスはTcO₂を主要エンドポイントとすることを目指し、その下肢切断率との相関性を補強することを目的として解析した。

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

E. 結論

TcO₂は下肢切断回避率の代替指標となり得る可能性が示され、今後の治験においてTcO₂を主要エンドポイントとする妥当性の根拠となりえた。今後はさらにPMDAとの相談をすすめ薬事承認・保険診療化を目指した企業との折衝、医師主導治験・国際共同治験などの方向性を検討していく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表 論文発表

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

著書
なし

学会発表

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録

- なし
3. その他
なし

【臨床研究】

先進医療当該技術の重症虚血性心疾患への応用

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

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

【試験デザイン】

単施設前向き介入研究。単一容量の単回投与試験

【適格基準】

- 1) 虚血性心疾患と診断され冠動脈バイパス術を必要とする患者
- 2) 心筋虚血部位を持つ、またはその部位の心筋 viability が心エコー、MRI または心筋シンチグラフィなどによって証明されている
- 3) 右冠状動脈、左前下行枝、左回旋枝の 3 領域のうち、少なくとも一つの領域で冠状動脈の性状不良のため、バイパスが困難または不相当と考えられる部位を有する

4) 年齢 20-80 歳

【治療箇所の決定】

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

【治療法】

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

【エンドポイント】

有害事象および副作用の発生と有効性の評価

【観察期間】

6 ヶ月

C. 研究結果

なし

D. 考察

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

E. 結論

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

F. 健康危険情報

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

G. 研究発表 論文発表

1. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Percutaneous coronary

intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with end-stage renal disease requiring dialysis (5-year outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). Am J Cardiol. 2014;114:555-61

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

著書

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

学会発表

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

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

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

15-19, 2014

8. Marui A, Nishiwaki N, Komiya T, Hanyu M, Tanaka S, Kimura T, Sakata R, The CREDO-Kyoto CABG Registry Cohort-2 Investigators. Impact of Left Ventricular Diastolic Dysfunction on Long-Term Outcomes Following Coronary Artery Bypass Grafting: 5-Year Outcomes of the CREDO-Kyoto CABG Registry Cohort-2. American Heart Association Scientific Sessions 2014, Chicago, USA. November 15-19, 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

【基礎研究】

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

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

A. 研究目的

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

B. 研究方法

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

ックスラボラトリーズに委託し評価を行った。

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

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

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

C. 研究結果

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

続いて、von Willebrand Factor(vWF)を用いた免疫組織学的評価では、対照群とbFGF群のそれぞれにおけるCapillary(血管<25 μ m)、Arteriole(25 μ m 血管径<100 μ m)を心筋梗塞境界部、心筋梗塞部、及び心表面においてそれぞれ測定したところ、Capillaryに関しては、心筋梗塞境界部(対

照:110.7 \pm 39.9 個/mm² vs bFGF 群:197.5 \pm 76.5 個/mm²、p<0.01)、心筋梗塞部(対照群:96.3 \pm 45.2 個/mm² vs bFGF 群:155.5 \pm 53.0 個/mm²、p=0.02)、心表面(対照群:72.9 \pm 34.1 個/mm² vs bFGF 群:136.6 \pm 55.8 個/mm²、p<0.01)とbFGF群で有意に多く認められた。Arteriole に関しても、心筋梗塞境界部(対照:4.37 \pm 1.64 個/mm² vs bFGF 群:7.27 \pm 2.23 個/mm²、p<0.01)でbFGF群で有意に多く、心筋梗塞部(対照群:3.70 \pm 2.01 個/mm² vs bFGF 群:5.76 \pm 4.32 個/mm²、p=0.22)、心表面(対照群:3.69 \pm 3.00 個/mm² vs bFGF 群:4.63 \pm 3.83 個/mm²、p=0.55)では有意差はなかったもののbFGF群で多い傾向にあった。

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

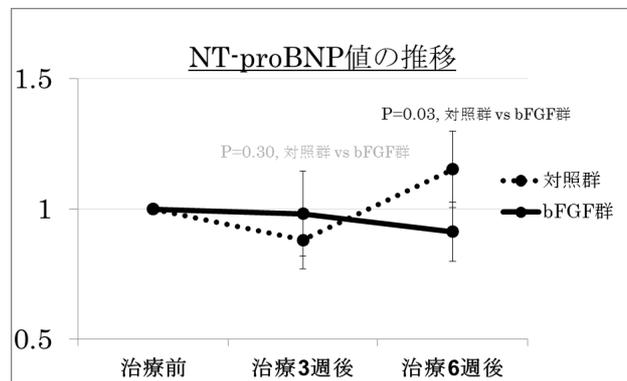


図1 NT-pro BNP 値の推移

D. 考察

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

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

臨床効果として期待できる。

今後は臨床試験を行い、当該技術の臨床効果を検討していく。

E. 結論

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

F. 研究発表

論文発表

なし

著書

なし

学会発表

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

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

. 分担研究報告

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

所 属 京都大学再生医科学研究所
分担研究者 田畑 泰彦

研究要旨

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、治験薬 GMP に準じて製剤化したシート状ゼラチンハイドロゲルとこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。その結果、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGF の徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることがわかった。

A. 研究目的

われわれは、これまでに細粒状のゼラチンハイドロゲルから、細胞増殖因子を徐放化することによって、重傷下肢虚血性疾患に対する血管新生療法の先進医療を行ってきた。本研究の目的は、治験薬 GMP に準じて製剤化したゼラチンハイドロゲル徐放技術の末期虚血性心疾患への応用を目指して、ゼラチンハイドロゲルの品質を評価することである。そこで、本研究では、*in vitro* における bFGF の徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について、治験薬 GMP に準じて製剤化したシート状ゼラチンハイドロゲルとこれまでに先進医療で用いてきた細粒状ゼラチンハイドロゲルとを比較した。

B. 研究方法

シート状ゼラチンハイドロゲルの作製

治験薬 GMP に準じた施設において、シート状ゼラチンハイドロゲルを作製した。すなわち、豚皮由来酸性ゼラチン (等電点 5.0) 水溶液へグルタルアルデヒドを加えた後、4℃にて 12 時間静置することによって化学架橋したゼラチンハイドロゲルを作製した。得られたハイドロゲルを 100 mM グリシン水溶液で 37℃にて 1 時間処理し、未反応のアルデヒド基を不活化した。蒸留水にて 3 回洗浄後、凍結乾燥することでシ

ート状ゼラチンハイドロゲルを得た。

細粒状ゼラチンハイドロゲルの作製

上述したシート状ゼラチンハイドロゲルを 8000 rpm で 10 分間粉碎後、凍結乾燥することによって、細粒状ゼラチンハイドロゲルを作製した。

in vitro における bFGF の徐放性

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro* における bFGF の徐放性について比較するために、ゼラチンハイドロゲルからの bFGF 徐放試験を行った。すなわち、2 mg のゼラチンハイドロゲルに対して、クロラミン T 法により ¹²⁵I 放射ラベル化した bFGF 水溶液を 20 μl 滴下し、室温で 3 時間静置することで、¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを得た。得られた ¹²⁵I ラベル化 bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中、37℃で浸漬し、経時的に上清に対する放射活性を測定することによって、bFGF の徐放性を評価した。さらに、bFGF 含浸ゼラチンハイドロゲルを 10 μg/ml のコラゲナーゼ水溶液中、37℃で浸漬することによって、ゼラチンハイドロゲルを分解させ、bFGF の徐放性の変化について評価した。

ゼラチンハイドロゲルの分解性

シート状ならびに細粒状のゼラチンハイドロゲルに対して、*in vitro*における分解性について比較するために、コラゲナーゼを用いたハイドロゲルの分解試験を行った。すなわち、5 mgのゼラチンハイドロゲルをPBS中、37℃で浸漬させ、一晩静置することにより、ゼラチンハイドロゲルを膨潤させた。次に、膨潤させたゼラチンハイドロゲルを10 µg/mlのコラゲナーゼ水溶液中、37℃で浸漬させ、上清を経時的に回収した。上清に対して、260 nmの吸光度を測定することによって、ゼラチンハイドロゲルから溶出したゼラチンを定量した。得られたゼラチンの溶出量を用いて、ゼラチンハイドロゲルの分解性を評価した。

C. 研究結果

*in vitro*におけるbFGFの徐放性

図1にシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルからの*in vitro*におけるbFGFの徐放性を示す。図から明らかなように、コラゲナーゼ添加前では、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、30%程度のbFGFが初期に徐放化されるが、それ以降、徐放化されることがなかった。一方、ゼラチンハイドロゲルをコラゲナーゼ水溶液に浸漬したところ、いずれのゼラチンハイドロゲルについても、吸着したbFGFが徐放化されることがわかった。

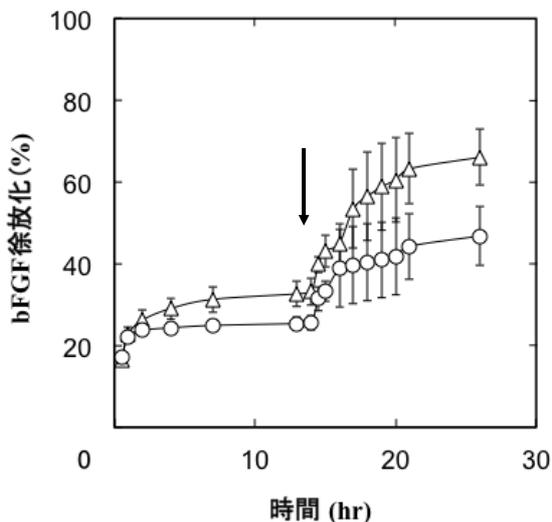


図1 *in vitro*におけるゼラチンハイドロゲルからのbFGFの徐放性
シート状(○) 細粒状(△)
コラゲナーゼ水溶液の添加(矢印)

ゼラチンハイドロゲルの分解性

図2にコラゲナーゼによるシート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルの分解性を示す。

図から明らかなように、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、コラゲナーゼを添加することによって2時間程度でゼラチンハイドロゲルが分解されることがわかった。

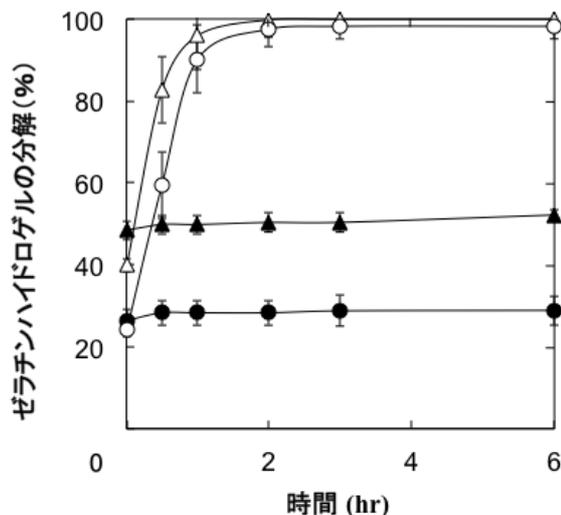


図2 ゼラチンハイドロゲルの分解性
シート状(○) 細粒状(△)
コラゲナーゼ水溶液(●) PBS(▲)

D. 考察

シート状ならびに細粒状ゼラチンハイドロゲルに対して、bFGFの徐放性ならびにゼラチンハイドロゲルの分解性について評価した。その結果、ゼラチンハイドロゲルの形状によらず、bFGFは、ゼラチンハイドロゲルの分解とともに徐放化されることがわかった。これまでに、われわれは、細粒状ゼラチンハイドロゲルからbFGFを徐放化することによって、重傷下肢虚血疾患の再生誘導治療に成功している。本研究結果は、シート状ゼラチンハイドロゲルが、bFGFの徐放性ならびに分解性において、細粒状ゼラチンハイドロゲルと同等であることを示している。

E. 結論

本研究により、末期虚血性心疾患の再生誘導治療に用いるシート状ゼラチンハイドロゲルに対して、bFGFの徐放性ならびにその分解性を明らかにすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

松井 誠、田畑泰彦：ゼラチンハイドロゲルから徐放された多血小板血漿の生物活性の評価。第14回日本再生医療学会総会(2015年3月19日~21日、横浜)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

所 属 京都大学医学部附属病院
臨床研究総合センター
分担研究者 清水 章

研究要旨

難治性虚血性疾患の新たなオーダーメイド治療法として、生体吸収性の高分子担体であるゼラチンハイドロゲルと細胞増殖因子である塩基性繊維芽細胞増殖因子の組み合わせによる再生医療を開発、実用化するため、難治性下肢虚血に対する先進医療B制度の下での臨床試験（第3項先進医療）の実施、結果の取り纏め（総括報告書作成および論文出版）ならびに治験準備の支援を行った。更にこの方法を虚血性心疾患に応用するための臨床試験の実施に向け、試験計画の立案・設計、非臨床データの収集に対する支援を行った。

A. 研究目的

難治性虚血性疾患に対して、生体吸収性の高分子担体と細胞増殖因子を用いた新たな再生医療を開発することにより、同疾患に対する、オーダーメイド医療の実現に向けた検討を行う。このために行う臨床試験の準備、実施、結果の取り纏めなどについて、これを実施する医師・研究者に必要な支援を行い、試験の円滑な実施と結果の取り纏めを目指す。

B. 研究方法

医学部附属病院の研究者などが、難治性下肢虚血患者を対象とし、先進医療B制度の下での臨床試験結果の取り纏め、論文化、治験における評価基準の策定等について実践的支援を行うとともに、虚血性心疾患を対象とした臨床試験を開始するために必要な支援活動を行う。

（倫理面への配慮）

上記の臨床試験（難治性下肢虚血を対象とする第3項先進医療）の申請・実施に必要な倫理審査を受け、承認された。実施ならびに結果についても必要な報告などを行うとともに、虚血性心疾患に応用するための臨床試験について、改訂された医学研究倫理指針に適合した試験計画の策定を支援した。

C. 研究結果

昨年度に完成、提出した、難治性下肢虚血に対する先進医療B制度の下での臨床試験の総括報告書（治験のものに準じて作成された）において記載、解析されたデータをもとにこれを分化する支援を行った。またこの結果を踏まえ、医薬品としての承認を目指す治験について、その予定主要評価項目の妥当性を裏付ける既報論文等の資料収集とその論文化に向けた支援を行った。

難治性下肢虚血に対する臨床試験の結果を虚血性心疾患にも応用し、新たな臨床試験を開始するため、安全性等必要となる非臨床データの取得ならびに改訂後の医学研究倫理指針に沿った試験計画の立案を支援した。

D. 考察

新規・先端医療の開発・実用化における、試験の立案・遂行・取り纏めとその報告についてノウハウを得るとともに、適切な支援活動は必須であることを再認識できた。

E. 結論

臨床試験の基盤を形成し、完遂を促進することならびに的確な成果の取り纏めを行うには、

十分なノウハウを持ってこれを支援することが不可欠であり、本研究によりその実をあげつつある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kumagai, M., Marui, A., Tabata, Y., Takeda, T., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Tanaka, S., Yanagi, S., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Murayama, T., Teramukai, S., Katsura, T., Matsubara, K., Kawakami, K., Yokode, M., Shimizu, A. and Sakata, R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart and Vessels* **30** 2015 online, doi 10.1007/s00380-015-0677-x.
2. Nakagawa, T., Kumakawa, K., Usami, S., Hato, N., Tabuchi, K., Takahashi, M., Fujiwara, K., Sakaki, A., Komune, S., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Yamamoto, N., Tanaka, S., Tada, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Shimizu, A., Tabata, Y. and Ito, J. A randomized control clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med.* 2014 **12**, 219.
3. Ohashi, S., Kikuchi, O., Tsurumaki, M., Nakai, Y., Kasai, H., Horimatsu, T., Miyamoto, S., Shimizu, A., Chiba, T. and Muto, M. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014 **9** e103126.
4. Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebpb deficiency. *J. Biomed Sci* 2014 **21** 44.
5. Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.,

Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation. *PLoS ONE* 2014 **9** e96938.

6. Ariyasu, H., Iwakura, H., Yukawa, N., Murayama, T., Yokode, M., Tada, H., Yoshimura, K., Teramukai, S., Ito, T., Shimizu, A., Yonezawa, A., Kangawa, K., Mimori, T. and Akamizu, T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocrine J.* 2014 **61** 735-742.
7. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 2014 **289**, 1564-1579.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特になし

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

所 属 京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター
早期臨床試験部
分担研究者 横出 正之

研究要旨

標記研究の一環として、第3項先進医療(現 先進医療 B)「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施経験に基づき、大学間の連携推進がもたらす臨床研究の推進への役割につき検証を行った。

A. 研究目的

本研究の目的は、京都大学医学部附属病院単施設による先進医療 B「生体内吸収性高分子担体を用いた塩基性線維芽細胞増殖因子による血管新生療法」の実施経験に基づき、大学間の連携推進の意義につき、京都大学が構築している「開花プロジェクト」参加大学との意見交換を通して検証をおこなうことである。

B. 研究方法

「開花プロジェクト」参加大学(岐阜大学、滋賀医科大学、長崎大学、大阪市立大学、福井大学、和歌山県立医科大学、鳥取大学、京都府立医科大学、山口大学、三重大学、岡山大学、徳島大学、鹿児島大学、熊本大学、奈良県立医科大学)と合同で平成26年度に集合形式の情報交換会を1回、インターネット回線による遠隔会議を全体会議として5回、特定のテーマにつき3回開催した。さらに参加大学において、本プロジェクトに関する講演を10大学で実施し、その中で多数寄せられた意見、質問を抽出した。さらにその結果として得られた成果につき解析した。

(倫理面への配慮)

世界医師会ヘルシンキ宣言、薬事法、臨床研究に関する倫理指針、第3項先進医療に関する

諸通知等を遵守して、本研究を遂行した。

C. 研究結果

参加大学からは ICH-GCP 準拠の臨床研究を実施する上での情報共有、平成27年4月1日施行予定の「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に対する準備に関する情報提供要請、各機関において臨床研究を実施・運営するための経費獲得に関する現状報告と情報交換の必要性などが多く寄せられた。

研究費に関しては、参加大学と京都大学の連携により、日本医師会治験促進センターのA研究(治験の計画に関する研究)、厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業)、橋渡しシーズC、それぞれ各1件を本プロジェクトの連携により獲得することができた。

D. 考察

わが国ではこれまで早期探索的臨床試験拠点、臨床研究品質確保体制整備病院などの整備が進んできたが、平成27年度に予定されている医療法に基づく臨床研究中核病院制度においては、拠点となる医療機関と他の機関の連携強化をさらに推進することが求められており、今回の「開花プロジェクト」での意見交換、情報共有に加えて、拠点以外の大学の研究費の獲得を含めた臨床研究の展開を促進すると期待される。

E. 結論

「開花プロジェクト」に参加する大学間の連携は意見交換、情報共有を通じた各施設の臨床研究の基盤構築推進と共に、研究費獲得などを通じて更なる研究の発展につながる事が期待できると考えられた。

参考文献

- 1) Marui et al. A novel approach to therapeutic angiogenesis for patients with critical limb ischemia by sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogel: an initial report of the phase I-IIa study. *Circ J* 2007;71:1181-1186.
- 2) Aronow WS et al. Prevalence of coexistence of coronary artery disease, peripheral arterial disease, and atherothrombotic brain infarction in men and women ≥ 62 years of age. *Am J Cardiol*. 1994;74:64-65.
- 3) McDermott et al. Recruiting participants with peripheral arterial disease for clinical trials: experience from the Study to Improve Leg Circulation (SILC). *J Vasc Surg*. 2009;49:653-659.e4.
- 4) Hobbs et al. The Exercise vs Angioplasty in Claudication Trial (EXACT): reasons for recruitment failure and the implications for research into and treatment of intermittent claudication. *J Vasc Surg* 2006;44:432-433.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem Biophys Res Commun*. 2014; 446(2):460-464.
- 2) Sumi E, Yamazaki T, Tanaka S, Yamamoto K, Nakayama T, Bessho K, Yokode M. The increase in prescriptions of bisphosphonates and the incidence proportion of osteonecrosis of the jaw after risk communication activities in Japan: a hospital-based cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*.

2014;23(4):398-405.

- 3) Ariyasu H, Iwakura H, Yukawa N, Murayama T, Yokode M, Tada H, Yoshimura K, Teramukai S, Ito T, Shimizu A, Yonezawa A, Kangawa K, Mimori T, Akamizu T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocr J*. 2014;61(7):735-742.
- 4) Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M, Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. *Sci Rep*. 2014;4:5094.
- 5) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep*. 2014;4:5312.
- 6) Tsusaka T, Guo T, Yagura T, Inoue T, Yokode M, Inagaki N, Kondoh H. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells*. 2014;19(10):766-777.
- 7) Mikawa T, LLeonart ME, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M, Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci*. 2015.
- 8) Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism. *Circ J*. 2015.

2. 学会発表

国際会議

- 1) Yasui M, Minami M, Yokode M. Role of EP4 signaling in obesity-related inflammation (Poster presentation). The 18th International Vascular Biology Meeting (IVBM2014), 4.14-17 (4.14), 2014, Kyoto, Japan.

- 2) Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33 deficiency reduces atherosclerotic plaque progression in apoE knockout mice. The 18th International Vascular Biology Meeting, 2014 April 14th, Kyoto.
- 3) Yasui M, Minami M, Yokode M. EP4 receptor regulates obesity-related Inflammation and insulin sensitivity (Poster presentation). The 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress (MSDA 2014), 9.12-14 (9.13), 2014, Kyoto, Japan.
- 4) Fujikawa R., Minami M, Higuchi S, Yasui M, Ikedo T, Nagata M, Yokode M. EP4 receptor-associated protein (EPRAP) in microglia promotes inflammation in the brain. (Poster presentation). Neuroscience2014 (Annual Meeting of Society for Neuroscience), 11.15-19 (11.18), 2014, Washington, DC, USA.
- 5) Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b Knock-in Mice for an Intron of Sterol Regulatory Element-Binding Factor 1 (Srebf1) Exhibit Reduced HDL-C in vivo. American Heart Association Annual Scientific Sessions 2014, November 15-19, Chicago, Illinois.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

国内会議

- 1) 安井 美加、南 学、横出 正之. 肥満による脂肪組織の炎症およびインスリン抵抗性における EP4 受容体の役割 第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日(11 月 26 日) 横浜.
- 2) 藤川 理沙子、南 学、樋口 聖、横出 正之. EPRAP 欠損マウスは行動異常を示す ブレインサイエンス研究会、2014 年 6 月 28-29 日 沖縄.
- 3) 藤川 理沙子、樋口 聖、南 学、安井 美加、池堂 太一、永田 学、横出 正之. EPRAP exerts anti-inflammatory effects through dephosphorylation by PP2A 第 88 回日本薬理学会年会 2015 年 3 月 18-20 日 愛知.

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

所 属 京都大学医学部附属病院
臨床研究総合センター
分担研究者 森田 智視

研究要旨

重症下肢虚血治療に関する治験の主要評価項目として、経皮的酸素分圧(TcO₂)の妥当なカットオフ値の検討をメタアナリシスにより行った。結果として、TcO₂<30mmHg が下肢切断回避率と最も関連があると示唆された。

A. 研究目的

重症下肢虚血治療に関する治験の主要評価項目として、経皮的酸素分圧(TcO₂)を下肢切断回避率の代替指標(サロゲートマーカー)として使用する際に、そのカットオフ値に関する二つの世界的なガイドラインの記述(30 or 35 mmHg)に加えて、統計学的にもカットオフ値の検討を行う事を目的とした。

B. 研究方法

TcO₂ に対する3つのカットオフ値(20, 30, 40 mmHg)に関して文献的検索によって収集した複数の論文からデータを収集し、diagnostic odds ratio(DOR)に対する DerSimonian and Laird (1986)法によるメタアナリシスを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は文献データに基づく統計学的解析であるために倫理面には問題ない。

C. 研究結果

収集された文献は、カットオフ値=20 に関しては13文献、カットオフ値=30、40 に関しては12文献であった。統合された対数 DOR は、カットオフ値=20、30、40 それぞれに対し、1.61 (95%CI: 0.73-2.49)、2.07 (95%CI: 1.17-2.97)、1.67 (95%CI: 1.05-2.29)となり、カットオフ値=30 で一番高い値を示した。

D. 考察

統合する指標に関しては複数存在するが、本研究では一元的に評価でき、多くの研究で用いられている DOR をした。また、文献数に関しては、TcO₂ と下肢切断回避率を同時に評価している文献は少なく、本研究で用いた文献数が限界である。しかし、ガイドラインの補助としてこの解析結果を位置づけているので、本研究の方法によって得られた結果は価値があると考えられる。

E. 結論

重症下肢虚血の評価において、下肢切断回避率の代替指標として TcO₂<30mmHg を用いる事は妥当であると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

所 属 京都大学医学部附属病院
研究分担者 松原 和夫

研究要旨

治験薬 GMP に準拠してゼラチンハイドロゲルの製造方法を確立してきた。昨年度、治験薬 GMP 管理の適合性について外部評価を受け、適合するとの判定を受けたが、より適切かつ信頼度の高い製造を行うために、外部評価の際に指摘された事項にもとづき、製造施設の改善および手順書の改訂を行った。また、次年度製造予定のゼラチンハイドロゲル製造における教育訓練を行った。

A. 研究目的

これまでに研究代表者及び分担者のグループでは、下肢虚血性疾患に対して、生体吸収性高分子担体（細粒）を用いた高度医療を実施してきた。虚血性心疾患へ生体吸収性高分子担体を用いた臨床研究を実施するにあたり、生体吸収性高分子担体（シート）の製造方法を確立し、安全性を担保することが必要である。

昨年度、治験薬 GMP 管理について外部評価を受け、「医療機関での治験薬（試験薬）製造という特殊性を考慮して、PMDA による治験薬 GMP 基準では今回の判定は適合に相当する」と評価を受けたが、自立化に向けた研究支援基盤の確立のため、外部評価の際に指摘された「軽度の不備事項」について検討・改善し、治験薬 GMP 対応製造施設としてのさらなる充実を図る。また、日本薬局方改訂に伴う手順書を改訂する。さらに次年度の製造に向けて、教育訓練を行う。

B. 研究方法

1. 元 PMDA・GMP エキスパート（査察官）による治験薬 GMP 調査の監査報告書（図 1）において、「軽度の不備事項」として指摘された部分について、修正可能か否か検討を行い、製造施設（ハード）の整備

や手順書（ソフト）の改訂を適宜行った。

また日本薬局方改正に伴い、衛生管理手順書についても改訂した。
2. 次年度、ゼラチンハイドロゲルを使用した新たな臨床試験が予定されているため、ゼラチンハイドロゲル使用量に応じたエンドトキシン規格値の設定や、製造のための教育訓練などを行った。

（倫理面への配慮）

分担者松原の実施した研究において、倫理面で問題となる内容は含まれていない。

C. 研究結果

治験薬 GMP 調査の監査報告書（図 1）において、ハード面で指摘されたのは 4 点であった。それぞれ、図 2 のような対応をすることとし、 に関しては手順書を改訂した。また、ソフト面で指摘された 5 点であり、それぞれ図 2 のような対応をすることとし、 と に関してはそれぞれ手順書を改訂した。

さらに日本薬局方第 16 改正にもとづき、区分別評価方法の記載等を修正し、衛生管理手順書第 5 版を発行した。

また次年度の製造に向けて、ゼラチンハ

イドロゲルの教育訓練を3回行った(プロセスバリデーション含む)。また、ゼラチンハイドロゲル使用量に応じたエンドトキシン規格値や無菌試験についても、日本薬局方第16改正にもとづいて設定し、SOPを作成した。

2014年2月24日

京都大学医学部付属病院薬剤部御中

元PMDA GMPエキスパート(査察官)
宮本 晃

治験薬GMP調査の確認結果報告書

さて先般、実施しました貴京都大学医学部付属病院薬剤部における試験薬製造施設のハード及びソフト面の確認につきまして、下記の通り報告申し上げます。
なお、半日の監査の中でいくつか気がついた点を講評事項として報告させていただきますので、対応等の検討をお願い申し上げます。

1. 一般事項

1. 目的
貴京都大学医学部付属病院薬剤部が進めている治験薬GMP基準に即した試験薬製造が治験薬GMP基準のハード・ソフト面を満たしているかどうかを調査した第三者監査である。

2. 調査対象施設
名称&施設：京都大学医学部付属病院薬剤部
所在地：京都市左京区聖護院川原町5-4

3. 調査実施日
2014年2月3日(月) 12:40~17:30

4. 主たる対応者等(敬称略)
対応者：米澤 洋
大村 友博
主な対応者：梶原 望義
南 いく子

5. 調査日程
2月3日(月)
12:40~13:00 自己紹介と出席者の紹介
治験薬GMP体制の整備・試験薬製造等の概要説明
13:00~15:00 ツアー・ハード(無菌試験室)
15:00~17:10 書面(ソフト)調査
17:10~17:30 ラップアップとQ&A

II. 確認結果

治験薬GMPに関するハード・ソフト状況を確認した結果、いくつかの軽度の不備事項が認められましたので、以下に示します。
不備事項につきましてはできるだけ速やかに改善されることを希望致します。

1. 重度の不備事項(Critical)
なし

2. 中程度の不備事項(Major)
なし

3. 軽度の不備事項(Minor)

<ハード>

①無菌試験室内の天秤(メトラ一製)に貼付する校正シールを業者より発行してもらうこと。
●対応：次回のバリデーションから、発行を依頼することとした。

②天秤の日常点検を行っているチェックリストに「清掃状態の確認」を付け加えること。
●対応：「清掃状態の確認」をチェックすることを文書及び機器使用記録書を手順書に加え、分析天びん(XP205DRV)及びBT-P42プリンタ(BT-P42)の取扱及び保守・点検に関する手順書を改訂した。

③掲示している着換え手順には責任者の日付とサインをすること。
●対応：「いつの、どこの手順書からの抜粋かが不明」というのが意図であり、必ずしも日付とサインをする必要がないと判断した。なお、手順書の出典がわかるよう、手順書名と版数がヘッダーに入ったものに「写」の判子を押して掲示し直した。

④製造用水区域には用水のフロー図を作成して貼付しておくこと。(日付とサインをすること)
●対応：取り扱い説明書名と「写」の判子を押して掲示し直した。(③と理由は同じ)

<ソフト>

①「治験薬製造指図・記録書」の滅菌チャートと秤量記録紙に記録者の日付とサインをすること。
●対応：次回の製造(教育訓練)から記録者(製造部門)がすることとした。

②「治験薬製造品質試験記録書」の試験成績書(無菌試験、エンドトキシン)に確認者の日付とサインをすること。
●対応：次回の治験薬製造で品質試験を行った際に、試験成績書が発行されてから確認者(品質部門)がすることとした。また、治験薬品質管理手順書を改訂し、試験成績書に確認日を記入し署名する手順を加えた。

③「出荷許可書」を「出荷可否判定書」に変更して様式を作成すること。なお「出荷判定手順書」に出荷の可否を判定するという文書を加えること。
●対応：手順書に出荷の可否を判定する文書を加え、出荷判定手順書を改訂した。

④「逸脱管理手順書」にフローチャート図を添付すること。
●対応：文書のみで説明可能と判断し、添付しないこととした。

⑤「自己点検手順書」のチェックリストを逐次改訂すること。PIC/S GMPを参考にしてください。
●対応：治験薬GMPの範疇ではチェック内容は網羅しており、改訂不要と判断し改訂しないこととした。

<ソフト>

1) 前もってお送りした「GMP事前査察スケジュール(案)」と「GMP事前査察に必要とする事前資料」の各項目に赤字で現況及び手順書名を記載していたので監査が速やかに進めることができた。

・総評

1) 医療機関での治験薬(試験薬)製造という特殊性を考慮して、PMDAによる治験薬GMP基準では今回の判定は適合に相当する。
今後は講評事項の細かい点を着実に改善されることを期待する。

2) ソフト面は予想以上に充実していた。今後さらなる向上を期待する。

3) 治験薬GMPの観点から大きな問題となる点は見られなかった。

3) ハード面・ソフト面でいくつかの改善点があるので、できるだけ早く完了することが望ましい。

・終わりに
今回の治験薬GMPの監査で主に会いと説明をしていただきました梶原望義様と南いく子様そしてその他の皆様のご協力に対して深く感謝を申し上げます。

軽度の不備事項に対する対応

2014年0月18日

<ハード>

①無菌試験室内の天秤(メトラ一製)に貼付する校正シールを業者より発行してもらうこと。
●対応：次回のバリデーションから、発行を依頼することとした。

②天秤の日常点検を行っているチェックリストに「清掃状態の確認」を付け加えること。
●対応：「清掃状態の確認」をチェックすることを文書及び機器使用記録書を手順書に加え、分析天びん(XP205DRV)及びBT-P42プリンタ(BT-P42)の取扱及び保守・点検に関する手順書を改訂した。

③掲示している着換え手順には責任者の日付とサインをすること。
●対応：「いつの、どこの手順書からの抜粋かが不明」というのが意図であり、必ずしも日付とサインをする必要がないと判断した。なお、手順書の出典がわかるよう、手順書名と版数がヘッダーに入ったものに「写」の判子を押して掲示し直した。

④製造用水区域には用水のフロー図を作成して貼付しておくこと。(日付とサインをすること)
●対応：取り扱い説明書名と「写」の判子を押して掲示し直した。(③と理由は同じ)

<ソフト>

①「治験薬製造指図・記録書」の滅菌チャートと秤量記録紙に記録者の日付とサインをすること。
●対応：次回の製造(教育訓練)から記録者(製造部門)がすることとした。

②「治験薬製造品質試験記録書」の試験成績書(無菌試験、エンドトキシン)に確認者の日付とサインをすること。
●対応：次回の治験薬製造で品質試験を行った際に、試験成績書が発行されてから確認者(品質部門)がすることとした。また、治験薬品質管理手順書を改訂し、試験成績書に確認日を記入し署名する手順を加えた。

③「出荷許可書」を「出荷可否判定書」に変更して様式を作成すること。なお「出荷判定手順書」に出荷の可否を判定するという文書を加えること。
●対応：手順書に出荷の可否を判定する文書を加え、出荷判定手順書を改訂した。

④「逸脱管理手順書」にフローチャート図を添付すること。
●対応：文書のみで説明可能と判断し、添付しないこととした。

⑤「自己点検手順書」のチェックリストを逐次改訂すること。PIC/S GMPを参考にしてください。
●対応：治験薬GMPの範疇ではチェック内容は網羅しており、改訂不要と判断し改訂しないこととした。

図1. 監査報告書
図2. 指摘事項に対する対応

D. 考察

昨年度、GMPに関する専門家に調査を依頼し、GMP体制の監査を受けた。不備事項は認められなかったことから本手順書ならびに本施設での運用が妥当であると判断された。また、「製薬会社の試験検査区域(QC)と同等である」とコメントを受けた。しかしながら、治験薬GMP管理の製造施設としての更なる充実を図るために、「軽度の不備事項」として指摘された部分についても適宜修正・改善し、手順書も3通改訂した。さらに、日本薬局方第16改正にもとづいた衛生管理手順書も改訂した。これにより、治験薬GMP管理にもとづく院内製造施設としてより充実させることができ、自立化に向けた研究支援基盤を確立できたと考えられる。また、今後起業等へ導出する際に、試験結果だけでなく製造方法のノウハウを含めた契約締結も可能であると考えられる。

次年度の製造に向けて、ゼラチンハイドロゲルの教育訓練を3回行い、またエンド

トキシン規格値や無菌試験の SOP を作成することで製造の準備も完了しており、次年度はより早期に製造することが可能となったと考えられる。

E. 結論

本施設の治験薬 GMP への適合性がより強固となり、研究成果の信頼性が確保された。今後、臨床試験用試験薬の製造方法を確定し、臨床試験を実施していく。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

III．研究成果の刊行に関する一覧

論文

1. Kumagai M, Marui A, Tabata Y, Takeda T, Yamamoto M, Yonezawa A, Tanaka S, Yanagi S, Ito-Ihara T, Ikeda T, Murayama T, Teramukai S, Katsura T, Matsubara K, Kawakami K, Yokode M, Shimizu A, Sakata R. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. Safety and efficacy of sustained release of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel in patients with critical limb ischemia. *Heart Vessels* in press.
2. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in patients with end-stage renal disease requiring dialysis (5-year outcomes of the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2014;114:555-61
3. Minakata K, Bando K, Tanaka S, Takanashi S, Konishi H, Miyamoto Y, Ueshima K, Yasuno S, Ueda Y, Okita Y, Masuda I, Okabayashi H, Yaku H, Okamura Y, Tanemoto K, Arinaga K, Hisashi Y, Sakata R. Preoperative chronic kidney disease as a strong predictor of postoperative infection and mortality after coronary artery bypass grafting. *Circ J*. 2014;78:2225-31
4. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Mitsudo K, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Comparison of five-year outcomes of coronary artery bypass grafting versus percutaneous coronary intervention in patients with left ventricular ejection fractions $\leq 50\%$ versus $>50\%$ (from the CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2). *Am J Cardiol*. 2014;114:988-96
5. Marui A, Kimura T, Nishiwaki N, Komiya T, Hanyu M, Shiomi H, Tanaka S, Sakata R; CREDO-Kyoto PCI/CABG Registry Cohort-2 Investigators. Three-year outcomes after percutaneous coronary intervention and coronary artery bypass grafting in patients with heart failure: from the CREDO-Kyoto percutaneous coronary intervention/coronary artery bypass graft registry cohort-2. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015;47:316-21
6. 丸井 晃, 坂田 隆造 . 【低心機能例に対する血行再建(PCI vs CABG)】 低左心機能例に対する血行再建 PCI vs CABG わが国でのレジストリーデータを含むこれまでのエビデンス . *日本冠疾患学会雑誌*. 2014;20:67-74
7. Nakagawa, T., Kumakawa, K., Usami, S., Hato, N., Tabuchi, K., Takahashi, M., Fujiwara, K., Sakaki, A., Komune, S., Sakamoto, T., Hiraumi, H., Yamamoto, N., Tanaka, S., Tada, H., Yamamoto, M., Yonezawa, A., Ito-Ihara, T., Ikeda, T., Shimizu. A., Tabata. Y. and Ito, J. A randomized control clinical trial of topical insulin-like growth factor-1 therapy for sudden deafness refractory to systemic corticosteroid treatment. *BMC Med*. 2014 **12**, 219.
8. Ohashi, S., Kikuchi, O., Tsurumaki, M., Nakai, Y., Kasai, H., Horimatsu, T., Miyamoto, S., Shimizu. A., Chiba, T. and Muto, M. Preclinical validation of talaporfin sodium-mediated

- photodynamic therapy for esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2014 **9** e103126.
9. Huang, B., Takahashi, K., Jennings, E. A., Puntang-on, P., Kiso, H., Togo, Y., Saito, K., Sugai, M., Akira S., Shimizu, A. and Bessho, K. Prospective signs of cleidocranial dysplasia in Cebpb deficiency. *J. Biomed Sci* 2014 **21** 44.
 10. Kiso, H., Takahashi, K., Saito, K., Togo, Y., Tsukamoto, H., Huang, B., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y., Economides, A. N., Slavkin, H. C. and Bessho, K. Interactions between BMP-7 and USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1) regulate supernumerary organ formation. *PLoS ONE* 2014 **9** e96938.
 11. Ariyasu, H., Iwakura, H., Yukawa, N., Murayama, T., Yokode, M., Tada, H., Yoshimura, K., Teramukai, S., Ito, T., Shimizu, A., Yonezawa, A., Kangawa, K., Mimori, T. and Akamizu, T. Clinical effects of ghrelin on gastrointestinal involvement in patients with systemic sclerosis. *Endocrine J.* 2014 **61** 735-742.
 12. Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H. Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells. *J. Biol. Chem.* 2014 **289**, 1564-1579.
 13. Ashida N, Kishihata M, Tien DN, Kamei K, Kimura T, Yokode M. Aspirin augments the expression of Adenomatous Polyposis Coli protein by suppression of IKK β . *Biochem Biophys Res Commun.*2014; 446(2):460-464.
 14. Sumi E, Yamazaki T, Tanaka S, Yamamoto K, Nakayama T, Bessho K, Yokode M. The increase in prescriptions of bisphosphonates and the incidence proportion of osteonecrosis of the jaw after risk communication activities in Japan: a hospital-based cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2014;23(4):398-405.
 15. Tien DN, Kishihata M, Yoshikawa A, Hashimoto A, Sabe H, Nishi E, Kamei K, Arai H, Kita T, Kimura T, Yokode M., Ashida N. AMAP1 as a negative-feedback regulator of nuclear factor- κ B under inflammatory conditions. *Sci Rep.* 2014;4:5094.
 16. Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Usami S, Izuhara M, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Sowa N, Yahagi N, Shimano H, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M., Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b knock-in mice for an intron of sterol regulatory element-binding factor 1 (Srebf1) exhibit reduced HDL-C in vivo. *Sci Rep.* 2014;4:5312.
 17. Tsusaka T, Guo T, Yagura T, Inoue T, Yokode M., Inagaki N, Kondoh H. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells.* 2014;19(10):766-777.
 18. Mikawa T, LLeonart ME, Takaori-Kondo A, Inagaki N, Yokode M., Kondoh H. Dysregulated glycolysis as an oncogenic event. *Cell Mol Life Sci.* 2015.

19. Ono K, Horie T, Nishino T, Baba O, Kuwabara Y, Yokode M, Kita T, Kimura T.
MicroRNA-33a/b in Lipid Metabolism. Circ J. 2015.

著書

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