

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592061

研究課題名(和文) 小児重症心不全に対する小児用補助人工心臓および再生治療を用いた集学的治療の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapeutic strategy for pediatric heart failure patients using ventricular assist devices and cardiac regenerative therapy.

研究代表者

上野 高義 (UENO, Takayoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60437316

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児重症心不全患者に対する新たな治療法を確立するため、これまで当科で開発してきた成人に対する再生医療を小児に適応すべく非臨床研究を行った。心筋再生新規治療薬の効果や、幼若動物由来の自己骨格筋芽細胞シート移植の安全性と有効性を示すことができた。幼若動物特有の性質や成獣動物との治療効果の違いを確認することで、小児患者に対する本治療法の有効性を示すことができた。これらの結果から、臨床研究で小児拡張型心筋症患者に対して細胞シート治療を実施した。治療に関連する重篤な有害事象は認めず、心機能や臨床症状の改善を認めた。今後、本治療の保険診療化を目指して医師主導治験の実施を計画している。

研究成果の概要(英文)：To establish novel therapeutic strategy for pediatric severe heart failure, we have completed pre-clinical studies regarding cardiac regenerative therapy. We have proved the safety and feasibility of novel synthetic prostacyclin agonist therapy for DCM rat and juvenile autologous skeletal muscle stem cell therapy for young ICM animal model. Those results implied the stem cell therapy for young patients will have greater therapeutic potentials than adult patients. We experienced a case of myoblast sheet implantation for DCM pediatric patient. No severe adverse events were found and her cardiac function and performance status improved during follow up period. Now we have been preparing for PI initiated clinical trial for approval to expand indication of the therapeutic strategy to pediatric heart failure patients.

研究分野：小児心臓血管外科

キーワード：再生医療 小児心不全 幹細胞治療

## 1. 研究開始当初の背景

小児心不全患者の予後は不良であり、難治性疾患としてその治療に対する問題は多い。重症例に対しては、心臓移植が究極の治療である。2010年に臓器移植法が改正されたものの、それ以後の小児ドナーからの臓器提供は未だに少なく、心臓移植の実施例は諸外国と比べると稀有である。そのため、心臓移植待機期間は長期間に及び、我が国では心臓移植に到達するまでの橋渡しとして新たな治療法を開発する必要がある。

成人の心不全患者に対する補助人工心臓治療及び再生治療は、心臓移植までのブリッジングとしての集学的治療として一定の効果をあげてきている。

小児心不全の特有の病態を解析し、これらの治療を小児患者に適用することが、新たな小児心不全治療体系の確立に大きな影響を与えると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、成人重症心不全患者に対して標準的に行われている補助人工心臓治療や再生医療を小児患者に適用するために、小児特有の病態やメカニズムを解析し、それに見合った新たな小児心不全治療体系を確立することである。

## 3. 研究の方法

(1) 小動物を用いた新規心不全治療薬の模索

DCM ハムスターに対する新規治療薬プロスタサイクリンアゴニスト (ON01301) の有効性の検討

DCM ハムスターに対して、心表面を覆うようにアテロコラーゲン ON01301 含有シートを移植し、生存率、心機能評価、病理組織学的検討を行い、対照群と比較した。

肺高血圧モデルラットに対する新規治療薬プロスタサイクリンアゴニスト (ON01301) の有効性とそのメカニズムの検討

モノクローリンを用いた肺高血圧モデル Wistar ラットに対して、ON01301 マイクロスフィア製剤を静脈注射し、生存率、血行動態評価、肺の病理組織学的検討を行い、対照群と比較した。また、肺高血圧症のヒト肺動脈より単離した平滑筋細胞に、*in vitro* で ON01301 を投与し、病理組織学的、分子生物学的に増殖能へ与える影響を検討した。

(2) 幼若動物を用いた骨格筋芽細胞シート移植における安全性と有効性の検討

幼若動物虚血性心疾患モデルを作成し、骨格筋芽細胞シート移植前後での心機能評価を行った。病理組織学的に細胞シート移植前後での検討を行った。それぞれの結果は、成獣動物を用いた同実験結果と比較し、幼若動

物での本治療法の効果について検証を行った。

幼若動物から作成した筋芽細胞シートの特性を、免疫染色を用いて成獣動物のものと比較検討した。

本治療法の医師主導治験を実施するため、非臨床安全性試験を実施した。同モデルに対して、骨格筋芽細胞シート移植前後での心室性不整脈の発生頻度と重症度の変化を確認した。

(3) 骨格筋芽細胞シート移植による小児重症心筋症に対する臨床研究

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に沿って、臨床研究計画書作成を行った。

小児重症心筋症患者を対象として、標準的心不全治療を行っても有症状の患者に対して、骨格筋芽細胞シート移植術に基づく再生療法の安全性を評価することを目的とした。選択基準として、1) 18歳以下、2) 重症心筋症の診断、3) NYHA Ⅱ度以上の重症心不全、4) 左室駆出率 35%以下などの項目を設定した。主要評価項目は、研究期間中の有害事象の発現の有無等の観察で安全性を評価することとした。

(4) 骨格筋芽細胞シート移植による小児重症拡張型心筋症に対する医師主導治験

各種の法令・告示・通知に基づき、実施計画書、治験物概要書の作成を行った。先行する成人患者を対象とした、臨床研究や企業治験で本治療法の安全性と有効性は示されており、保険診療化へ向けた開発が進んでいた。小児患者に対する適応拡大を目指して、再生医療新法に基づき、治験物を GCTP 準拠で作成する準備、実施体制整備を行った。

(5) 左室補助人工心臓装着患者における心筋再生メカニズムの病理組織学的検討

小児心筋症患者に対する左室補助人工心臓装着手術を実施し、その際に採取した左室心筋組織と、心臓移植到達後の左室心筋の組織を病理組織学的に比較検討した。また、劇症型心筋炎患者に対する補助人工心臓装着時に採取した心筋組織の免疫染色を行い、カルシウム代謝を中心とした心筋炎の発症メカニズムの検討を行った。

動物実験においては、本学動物実験規程に従って行った。

臨床研究の実施に際しては、研究計画書、試験薬概要書、手順書など臨床研究に必要な文書は、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守して作成し、院内ヒト幹細胞臨床研究審査委員会での承認を受けた。その後、厚生労働大臣の承認を受け実施を行った。本研究の対象は小児であるために、同意説明には十分に配慮を行い、容易な文章を用いて作成した補助文書 (アセント) などを使用し、可能な限り患者本人への説明も十分に行ったうえで、代諾者への informed consent

を行い、同意を得て実施した。

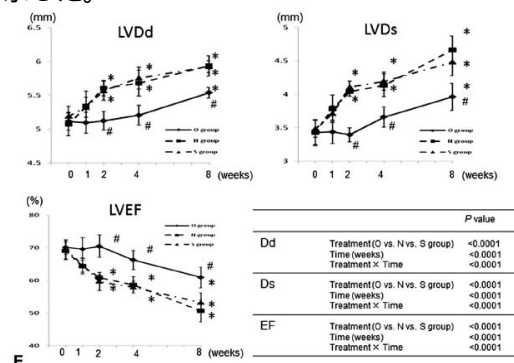
医師主導治験においては、各種法令・告示・通知に基づき実施し、研究計画書（プロトコル）に関して PMDA での審査、院内治験審査委員会での承認を受け、再生医療新法に基づき実施を予定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 小動物を用いた新規心不全治療薬の模索

DCM ハムスターに対する新規治療薬プロスタサイクリンアゴニスト（ON01301）の有効性の検討

ON01301 アテロコラーゲンシート移植群は、対照群と比べて有意に生存率を改善させた。心臓超音波検査では、心収縮能の改善、左室拡張末期径の縮小を示し、心機能改善効果を示した。組織学的には、シート移植群において有意に線維化の抑制を血管新生の促進を示した。



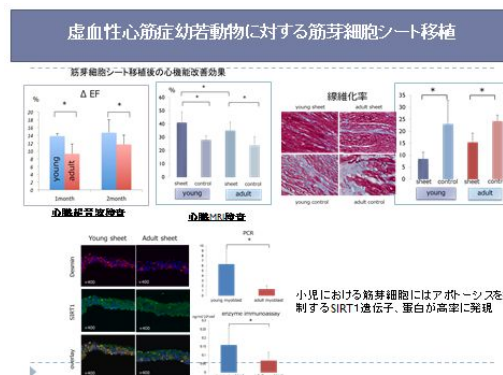
肺高血圧モデルラットに対する新規治療薬プロスタサイクリンアゴニスト（ON01301）の有効性とそのメカニズムの検討

ON01301 投与群は対照群と比べ有意に生存率を改善させた。心臓カテーテル検査では、右室圧の低下を認めた。組織学的には、肺動脈中膜肥厚は改善を認めた。In vitro では、ON01301 投与群で、平滑筋細胞増殖を抑制した。

##### (2) 幼若動物を用いた骨格筋芽細胞シート移植における安全性と有効性の検討

幼若動物に対する骨格筋芽細胞シート移植では、治療前後で有意な心機能改善効果を確認した。線維化率の検討等、組織学的検討でも、有意な心機能改善効果を確認した。これらの結果は、成獣動物の結果と比べても、幼若動物での結果の方が、有意に心機能改善効果が高い結果が得られた。

幼若動物から作成された骨格筋芽細胞シートからは、成獣動物のものとは比べ、HGF、VEGF など、本治療法の中心的役割となるパラクライン効果を示すサイトカイン分泌が有意に多いことが分かった。また、アポトーシス抑制遺伝子の一つである Sirtuin1 蛋白の発現が高率であることが分かった。



骨格筋芽細胞シート移植に伴う、重篤な有害事象として心室性不整脈の増悪が懸念されているが、幼若動物虚血性心筋症モデルを用いた筋芽細胞シート移植において、治療前後での心室性不整脈の発生頻度、重症度に関して、有意な変化は認められなかった。

##### 3) 骨格筋芽細胞シート移植による小児重症心筋症に対する臨床研究

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」を遵守し研究計画書など臨床研究に必要な文書作成を行った。これらは、平成 24 年 11 月に実施された大阪大学ヒト幹細胞臨床研究審査委員会において、承認された。その後、厚生労働省へ実施承認申請。平成 25 年に厚生労働省より実施承認を受けた、小児重症心筋症に対する骨格筋芽細胞シート移植のヒト幹細胞臨床研究（HM1401 号）を実施した。プロトコルに沿って、患者選定ならびに 1 例の被験者登録とシート移植術を施行し、6 カ月のフォローアップを終了した。

小児拡張型心筋症患者 1 例に対して、骨格筋芽細胞シート移植術を行い、プロトコルに沿って 6 カ月間のフォローアップを完了した。フォローアップ期間中、シート移植治療が原因となる重篤な有害事象は認めなかった。左室収縮能は、増悪を認めず、拡張能に関しては軽度の改善を認めた。臨床症状の改善（NYHA 度から 度へ）と、運動耐容能の改善を認めた。

##### (4) 骨格筋芽細胞シート移植による小児重症拡張型心筋症に対する医師主導治験

小児患者に対する本治療法の適応をめざし、前述した非臨床試験結果をもとに、医師主導治験実施のための準備を行った。平成 26 年 3 月 27 日に、薬事戦略相談（対面助言）を PMDA と行った。その結果を受け、プロトコルの改正等を行って、平成 26 年 6 月 16 日フォローアップ面談を実施した。治験文書の作成、CRO との業務契約締結などを行い、院内 IRB 申請準備と実施体制の整備を行った。

(5) 左室補助人工心臓装着患者における心筋再生メカニズムの病理組織学的検討  
補助人工心臓装着患者の左室心筋の検討に関しては、症例数の集積が不十分であり、未

だに一定の傾向を示す結果を得られていない。引き続き、症例蓄積を行い、検討を行う。劇症型心筋炎のカルシウム代謝に関して、Von Kossa 染色を行ったところ、高度の炎症時に、細胞内カルシウム沈着を示す例が存在した。不全心筋とカルシウム代謝の関係性を示唆する所見が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Cell-sheet therapy with omentopexy promotes arteriogenesis and improves coronary circulation physiology in failing heart.

Kainuma S, Miyagawa S, Fukushima S, Pearson J, Chen YC, Saito A, Harada A, Shiozaki M, Iseoka H, Watabe T, Watabe H, Horitsugi G, Ishibashi M, Ikeda H, Tsuchimochi H, Sonobe T, Fujii Y, Naito H, Umetani K, Shimizu T, Okano T, Kobayashi E, Daimon T, Ueno T, Kuratani T, Toda K, Takakura N, Hatazawa J, Shirai M, Sawa Y.

Mol Ther. 2015 Feb;23(2):374-86. 査読有 doi: 10.1038/mt.2014.225.

Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure due to Ischemic Heart Disease.

Yoshiki Sawa, MD, PhD1, Yasushi Yoshikawa, MD, Koichi Toda, MD, PhD1; Satsuki Fukushima MD, PhD1, Kenji Yamazaki, MD, PhD2; Minoru Ono, MD, PhD3; Yasushi Sakata, MD, PhD4; Nobuhisa Hagiwara, MD, PhD5; Koichirou Kinugawa, MD, PhD6; Shigeru Miyagawa, MD, PhD1

Circ J. vol.79(2015)No.5 991-999

査読有

doi.org/10.1253/circj.CJ-15-0243

Targeted delivery of adipocytokines into the heart by induced adipocyte cell-sheet transplantation yields immune tolerance and functional recovery in autoimmune-associated myocarditis in rats.

Kamata S, Miyagawa S, Fukushima S, Imanishi Y, Saito A, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y.

Circ J. 2015 5;79(1):169-79. 査読有 doi: 10.1253/circj.CJ-14-0840.

Synthetic prostacyclin agonist, ONO1301, enhances endogenous myocardial repair in a hamster model of dilated cardiomyopathy: a promising regenerative therapy for the failing heart.

Ishimaru K, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Sakai Y, Ueno T, Sawa Y.

J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 146(6): 1516-25. 査読有 doi: 10.1016/j.jtcvs.2013.02.045.

[学会発表](計6件)

遠隔期から見た小児心臓移植待機患者に対する補助人工心臓の有用性の検討  
平 将生、上野 高義、澤 芳樹、他  
第45回日本心臓血管外科学会学術集会  
2015年2月17日 国立京都国際会館  
京都府 京都市

Surgical management for secondary pulmonary hypertension in a pediatric restrictive cardiomyopathy patient.

平 将生、上野 高義、澤 芳樹、他  
第18回日本心不全学会学術集会  
2014年10月12日 大阪国際会議場  
大阪府 大阪市

小児重症心不全に対する補助人工心臓使用経験

平 将生、上野 高義、澤 芳樹、他  
第42回人工心臓と補助循環懇話会学術集会  
2014年3月7日 ナスパニユーオ  
ータニ 新潟県 南魚沼郡

幼若ブタ虚血性心筋症モデルに対する自己骨格筋芽細胞シート移植の有効性の検討

小澤 秀登、宮川 繁、上野 高義、澤 芳樹、他

第13回再生医療学会学術集会  
2014年3月4日 国立京都国際会館 京  
都府 京都市

Juvenile Skeletal Myoblast Has Greater Therapeutic Potentials of Regenerative Therapy than Adult Sheet for Treating Chronic Myocardial Infarction in Infarct Porcine

Ozawa H, Miyagawa S, Ueno T, Sawa Y, et al

American Heart Association Scientific Sessions 2013

2013年11月16日 Dalas Convention center, USA

Novel Synthetic Prostacyclin Agonist ONO1301, Inhibits Proliferation of

Pulmonary Arterial Smooth Muscle  
Cells by Suppressing Raf signal  
pathway  
Taira M, Miyagawa S, Ueno T, Sawa Y,  
et al  
American Heart Association Scientific  
Sessions 2012  
2012年11月3日 Los Angels, USA

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等：特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上野 高義 (UENO, Takayoshi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座  
准教授  
研究者番号：60437316

### (2) 研究分担者

宮川 繁 (MIYAGAWA, Shigeru)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任准教  
授(常勤)  
研究者番号：70544237

井出 春樹 (IDE, Haruki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教  
研究者番号：90600122  
(H25年7月24日削除)