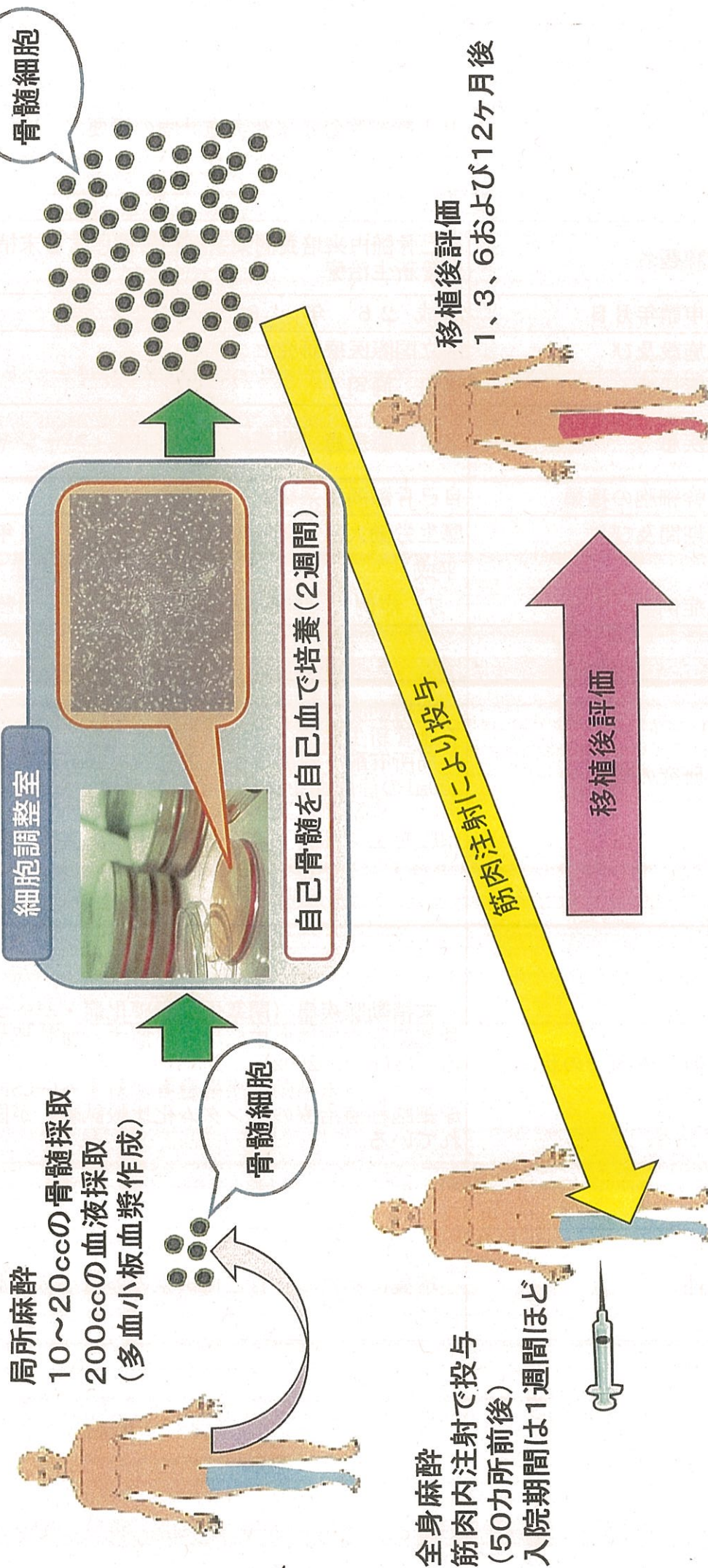


ヒト幹細胞臨床研究実施計画の概要

研究課題名	自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療
新規申請年月日	平成 26 年 8 月 22 日
実施施設及び 研究責任者	国立国際医療研究センター 福田 尚司
対象疾患	末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）
ヒト幹細胞の種類	自己骨髄間葉系細胞
実施期間及び 対象症例数	厚生労働大臣意見発出日から 3 年間 平成 年 月 日 まで 5 症例 （被験者群 症例 対照群 症例）
治療研究の概要	末梢動脈疾患に対する自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による血管新生治療の安全性を評価する。 局所麻酔下に腸骨から骨髄液を10ml程度採取する。また、約200mlの静脈血を採取する。静脈血から得られた多血小板血漿を用いて骨髄間葉系細胞を約2週間培養する。培養した骨髄間葉系細胞を全身麻酔下にて患部周辺の筋肉に注射する。
その他（外国での状況等）	末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）に対して骨髄細胞や末梢血単核球を移植する血管再生療法が行われている（Lancet, 2002）。 また、「末梢動脈疾患患者に対するG-CSF動員自家末梢血単核球細胞移植治療のランダム化比較試験」が国内において実施されている。
新規性	培養にあたって自己血由来の多血小板血漿を用いるところ。

自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による 末梢動脈疾患に対する血管新生治療

別紙1



ヒト幹細胞臨床研究実施計画申請書

平成 26 年 8 月 22 日

厚生労働大臣 殿

研究機関	所在地	〒162-8655 東京都新宿区戸山1-21-1
	名称	独立行政法人 国立国際医療研究センター
	研究機関の長 役職名・氏名	総長 春日雅人



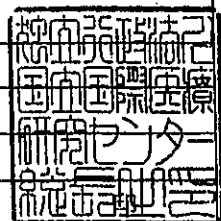
下記のヒト幹細胞臨床研究について、別添のとおり実施計画書に対する意見を求めます。

記

ヒト幹細胞臨床研究の課題名	研究責任者の所属・職・氏名
自己骨髄由来培養間葉系細胞移植 による末梢動脈疾患に対する血管 新生治療	独立行政法人 国立国際医療研究センター 心臓血管外科 医長 福田 尚司

ヒト幹細胞臨床研究実施計画書

臨床研究の名称		自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療		
研究機関				
	名称	独立行政法人国立国際医療研究センター		
	所在地	〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1		
	電話番号	03-3202-7181		
	FAX 番号	03-3207-1038		
研究機関の長				
	役職	総長		
	氏名	春日 雅人		
研究責任者				
	所属	独立行政法人国立国際医療研究センター病院 心臓血管外科		
	役職	医長		
	氏名	福田 尚司		
	連絡先	Tel/Fax	Tel : 03-3202-7181 /Fax : 03-3207-1038	
		E-mail	sfukuda@hosp.ncgm.go.jp	
	最終学歴	山梨大学医学部大学院 卒業		
	専攻科目	心臓血管外科学		
その他の研究者	「別紙2 研究者の略歴および研究業績」参照			
共同研究機関（該当する場合のみ記載してください）				
	名称			
	所在地	〒		
	電話番号			
	FAX 番号			
共同研究機関の長（該当する場合のみ記載してください）				
	役職			
	氏名			
臨床研究の目的・意義		60歳以上の日本人において1000万人いと言われている下肢壊疽や疼痛を呈する末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・パージョー病）患者を対象に、より低侵襲化した血管新生療法の安全性を確認する。 従前の血管新生療法においては、全身麻酔下に自己骨髄を大量採取し、あるいは、少量の自己骨髄をウシ血清を用い培養してきた。		



		今研究では、10cc程度の自己骨髄を自己血清を用い、当センター内の細胞調整室で培養し、増殖した間葉系細胞を末梢動脈疾患患者へ投与し、主に安全性を検討する。また可能な限り副次的に有効性についても検討する。
臨床研究の対象疾患		
	名称	末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）
	選定理由	末梢動脈疾患患者数は増加の一途を辿っているが、依然として既存の治療法では閉塞性動脈硬化症の重症患者においては死亡率が高く、下肢切断を余儀なくされる患者も多いのが現状であり、予後が非常に不良である。 近年、薬物治療や血行再建術に限界のある重症の末梢動脈疾患に対して、自己末梢血または自己骨髄由来の幹細胞を虚血四肢骨格筋へ筋肉内移植することにより、虚血部周辺の組織からの血管新生の増強や側副血行の発達を促すことで、虚血組織の血流を確保し、組織障害や壊死を軽減させようとする試みがなされている。しかし骨髄中に存在する幹細胞は非常に少ないために、大量の骨髄を採取することが問題とされている。その為、骨髄穿刺により患者から得た少量の骨髄液から、細胞を培養する研究が行われつつある。細胞を培養する事で、大量の骨髄を採取する必要が無く、患者への負担を軽減した低侵襲治療と言える。細胞培養には通常、ウシ胎児血清を用いることが多いが、自己末梢血から血小板を濃縮した多血小板血漿を用いる培養法が開発されている。この方法では動物由来の試薬を使わず患者自身の細胞を使用するために、安全性が高く免疫学的拒絶反応などを避けることが可能である。今研究では、患者から少量の骨髄液を採取し、患者自身の末梢血から調製した多血小板血漿を用いて培養を行うことで治療に必要な量の細胞数を確保する事を目的としている。この方法は他施設では行っていない、全く新しい試みである。以上から末梢動脈疾患に対し有用な治療法になると想定し選定した。
被験者等の選定基準		[選択基準] ・末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）患者 Fontaine 分類Ⅲ度およびⅣ度、Rutherford 慢性虚血肢臨床分類Ⅱ度4群、Ⅲ度5群および6群に属し、安静時疼痛または虚血性潰瘍、壊死を有する患者で、著しくQOLが障害されており血行再建術の適応が無く、将来、下肢切断が予想される患者。 ・性別：男性および女性 ・年齢：20歳以上75歳以下 [除外基準]

		・合併症により余命が著しく短いと考えられる患者 ・過去3ヶ月以内にアルコールもしくは薬物依存の既往のある患者 ・悪性新生物を有する患者および5年以内にその既往のある患者 ・諸検査により悪性腫瘍の可能性があると判断された患者 ・重症の糖尿病性網膜症を有する患者 ・妊婦または妊娠している可能性のある患者 ・インフォームドコンセントを得られない患者 ・その他、主治医が不適当と判断した患者
臨床研究に用いるヒト幹細胞		
	種類	自己骨髄間葉系細胞
	由来	自己 ・非自己・株化細胞 生体由来 ・死体由来
	採取、調製、移植又は 投与の方法	【採取】 (a)静脈血採取 患者から約200mlの静脈血を採取する。 (b)骨髄液採取 局所麻酔下に患者腸骨より骨髄液を10ml程度採取する。 【調製・培養】 (a)多血小板血漿の調製 遠心分離により多血小板血漿を調製し、分注後、-30°C以下で凍結保存する。 (b)細胞培養 比重遠心分離法にて骨髄細胞を分離・濃縮し、予め凍結保存しておいた自己血由来の多血小板血漿を用いて調製した培地にて、目標細胞数約$1.0 \times 10^7 \sim 8$個になるまで約1～2週間培養する。 【細胞の移植】 全身麻酔下にて、培養した骨髄細胞約$1.0 \times 10^7 \sim 8$個、総量約10～50mlの懸濁液を、27G針を用いて1箇所につき0.3～0.5mlずつ、虚血下肢骨格筋に約40～60箇所に分割して筋肉内注射を行う。 【品質の評価】 (a)中間評価 移植前の継代時にエンドトキシン定量を行う。 (b)最終調整時の評価 培養して得られた細胞の一部で無菌試験、マイコプラズマ否定試験、エンドトキシン定量を実施する。 【細胞の保管】 培養後の細胞（最終調製物）などは研究用と有害事象発生時の原因

	究明用の二つにわけ凍結保管とする。
調製（加工）工程	☒ 有・無
非自己由来材料使用	☒ 有・無 動物種（ブタ【ヘパリン】）
複数機関での実施	有・ ☒ 無
他の医療機関への授与・販売	有・ ☒ 無
安全性についての評価	細胞の培養や調製を行う細胞調製管理室は GMP に準拠した施設であり、衛生的な設備・環境を備えており製品の汚染及び品質低下を防ぐことができる施設である。培養した細胞は無菌試験・エンドトキシン試験・マイコプラズマ否定試験を行い、移植に用いる細胞の安全性を評価する。無菌性を保証できない結果が細胞の移植前に得られた際には、移植を取りやめる。移植後に上記試験において陽性反応が得られた場合、適切な抗生物質の投与等による感染症発生の予防や治療等を行う。 また、移植後 6 ヶ月までにおける有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG 版（略称：CTCAE v4.0 - JCOG）」に従い評価し、Grade2 以上の有害事象の発生頻度を求める。 術後の安全性および機能評価は 1 ヶ月後、2 ヶ月後、6 ヶ月後に経過観察を行い、安全性の評価は研究終了後も随時行う。検査は血液検査、眼底検査、CT 検査などを行う。
臨床研究の実施が可能であると判断した理由	ヒトに対する骨髄由来間葉系細胞を用いた血管新生療法において、自己血由来の多血小板血漿を用いると言う新規性以外、今研究においては基礎研究部分では新規性が認められないため、基礎研究部分の論文文化はしていない。このため、基礎研究データを「別紙 3 2 動物実験等の基礎的検討」として添付した。 本研究に先駆け我々はまず、第一段階として、C57BL/6 マウスの外腸骨動脈を結紮して後肢虚血モデルを作製し、マウス骨髄由来の間葉系細胞を後肢の筋肉内に移植した。間葉系細胞の培養には多血小板血漿の代わりにウシ胎児血清を用い、移植細胞数は一個体につき約 50 万個とした。2 週間後の組織学的検査では、一部の移植細胞は管腔構造を形成していた。また、血管内皮に発現する第Ⅷ因子 (von Willebrand factor) に対する抗体で免疫染色を行った結果、細胞移植群は対照群と比較して新生血管が多く認められた。 次にビーグル犬の下肢虚血モデル作成し、骨髄由来の間葉系細胞の培養と移植実験を行い安全性の検討を行った。2 週間後、筋肉内に移植細胞が認められ、周囲に異常所見は見られなかった。 更に多血小板血漿を用いての骨髄間葉系細胞の増殖を見る為、当センターの倫理委員会で承認を得た研究にて、健康人ボランティアから末梢血及び少量の骨髄液を採取した。骨髄由来間葉系細胞を末

	梢血より調製した多血小板血漿を用いて培養を行い、約2週間で目標の細胞数10^8個程度まで培養することができた。また品質確認のために、エンドトキシン定量、一般細菌・真菌培養同定、マイコプラズマ否定試験、細胞表面マーカーの確認、染色体検査、造腫瘍性の確認（マウスに培養細胞の投与）を行ったがいずれも異常は見られなかった。上記の方法で培養した健常人ボランティアの骨髓由来間葉系細胞を用いて、後肢虚血モデルマウスへの移植実験を行った。マウスは免疫不全マウスであるNOD SCIDを使用し、より安定したダメージが得られるよう結紮部位を総腸骨動脈とした。移植細胞数は一頭につき約100万個とした。2週間後の組織学的検査において、一部の移植細胞は管腔構造を形成し、また細胞移植群は対照群と比較して新生血管が多く認められた。（「別紙32 動物実験等の基礎的検討」参照） 以上から自己骨髓由来培養間葉系細胞の移植は末梢動脈疾患に対し有効な治療法になり得ると考えている。
臨床研究の実施計画	【研究デザイン】 単施設における自己骨髓培養間葉系細胞を用いた血管新生療法の前向き安全性確認試験。 【研究期間】 承認日から3年（登録期間2年、経過観察期間1年） 【対象症例数】 5例 【主要評価項目】 安全性、有害事象の有無（有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG 版に従い評価し、Grade2 以上を有害事象と定義） 【副次評価項目】 効果（救肢の可否、歩行距離、血流テスト等）
被験者等に関するインフォームド・コンセント	
手続き	文書を用いて説明し、説明した内容を被験者が理解していることを確認した上で、自由意思によるインフォームドコンセントを文書で取得する。その際、本研究に参加するか否かは被験者の自由意思に基づいて決定して良いこと、研究に参加しなくても上記文書で研究参加者に与えられると説明されている利益を受けられなくなる以外に不利益を受けないこと、一旦研究参加に同意した後でも特段の不利益を受けることなくいつでも同意を撤回できること、ただし、同意撤回以前に学会、論文等で発表した結果は取り消さないことを十分に説明する。なお、同意書は2部作成して、原本を診療録の原本保存ファイルに保管し、写を被験者に手渡す。

	説明事項	(1). 研究計画について (2). 「細胞移植治療」研究の実施にあたり (3). 「細胞移植治療」研究の辞退 (4). 「細胞移植治療」研究について (5). 除外基準 (6). 実施方法 (7). 副作用 (8). 研究の中止について (9). プライバシーの保護 (10). 他の治療について (11). 「細胞移植治療」研究の費用について (12). 健康被害が発生した場合について (13). 研究結果の公表について (14). 研究から生ずる知的所有権について (15). 研究用試料等の保管および使用方法ならびに保管期間について (16). 苦情申し出先および問い合わせ先 「別紙 8 同意説明書」参照
単独でインフォームド・コンセントを与えることが困難な者を被験者等とする臨床研究の場合		
	研究が必要不可欠である理由	
	代諾者の選定理由	
被験者等に対して重大な事態が生じた場合の対処方法		有害事象が生じた場合は、速やかに適切な治療を行う。 有害事象の判定基準として「有害事象共通用語規準 v4.0 日本語訳 JCOG 版 (略称 : CTCAE v4.0 - JCOG)」に従い評価し、Grade1～5に分類する。 治療開始後 30 日以内のすべての死亡、予期し得ない Grade4 以上の重篤な有害事象が認められた場合は、担当医師は適切な処置を講ずると共に、急送報告として速やかに研究代表者から臨床研究推進室を通じて総長と倫理委員会に報告する。 予期しない Grade3 の有害事象や既知の有害事象の頻度が上昇した場合、プロトコル治療と因果関係の否定できない治療開始後 31 日以降の死亡などに関しては発生から 2 週間以内に総長と倫理委員会に報告する。
臨床研究終了後の追跡調査の方法		臨床研究終了後は 2～3 ヶ月に一度、外来通院による経過観察を行う。
臨床研究に伴う補償		

	補償の有無	有・無
	補償が有る場合、その内容	本治療によって健康被害が生じた場合は、適切な治療を受けることができ、その費用は臨床研究保険で負担する。ただし、本治療と関わりを持たない原因による治療が必要となった場合には、通常の診療費を患者負担とする。「別紙 3 3 保険見積もり」参照
個人情報保護の方法		
	連結可能匿名化の方法	本治療では被験者の個人情報に連結可能匿名化を行い、被験者の個人情報を保護する。これらの被験者の個人情報は国立国際医療研究センター企画戦略局長が管理し、施錠できるキャビネットに保管するなど、適切に管理する。研究成果の公表に際しては、個人が特定されることのないように配慮する。 「別紙 8 同意説明書」参照
	その他	培養後の細胞（最終調製物）などは研究用と有害事象発生時の原因究明用の二つにわけ、ID を付与しチューブに分注する。保管は細胞調整室の液体窒素に凍結保管とする。研究用試料は保管期限を特に定めず、同意撤回がなされない限り保管を継続する。有害事象が発生した場合の原因究明用の試料は 10 年保管とする。被験者が同意を撤回した場合、研究用試料は廃棄し、原因究明用試料は 10 年間保管する。廃棄の場合、検体及び関連資料は連結不可能匿名化した後、法令・規則に従って適切に廃棄する。
その他必要な事項 (細則を確認してください)		① 当該研究に係る研究資金の調達方法
		本研究に関わる費用については独立行政法人国立国際医療研究センター国際医療研究開発費より支払われる。
		② 既に実施されているヒト幹細胞臨床研究と比較して新規性が認められる事項 自己骨髄間葉系細胞移植による治療は、国内での報告が複数されているが、今回の臨床研究では培養過程があり、また患者自身の末梢血を濃縮した多血小板血漿を用いることで動物由来の培養液を使わずに培養を行うことに新規性がある。

備考 1 各用紙の大きさは、日本工業規格 A4 とすること。

備考 2 本様式中に書ききれない場合は、適宜別紙を使用し、本様式に「別紙〇参照」と記載すること。

添付書類（添付した書類にチェックを入れること）

1) プロトコル関係書類

■①研究の流れを示した図やイラストなど（ポンチ絵）（別紙 1）

■②研究者一覧（別紙 2）

■③同様のヒト幹細胞臨床研究に関する国内外の研究状況（別紙 3）

■④臨床研究の概要をできる限り平易な用語をもちいて記載した要旨 (別紙4)

■⑤研究計画書 (別紙5)

2) 細胞品質関連書類

■①ヒト幹細胞臨床研究に用いるヒト幹細胞の品質等に関する研究成果 (別紙6)

■②製品概要書・製品標準書・原材料(試薬等)の品質保証書類 (別紙7)

3) 被験者説明文書・同意書

■①インフォームドコンセントにおける説明および同意文書様式(採取時と投与あるいは移植時に別々にお取りください。臨床研究に入るときにも同意書をとりますので3通になると思います)
(別紙8、9)

4) 研究施設基準

■①研究機関の基準に合致した研究機関の施設の状況(※参照) (別紙10～23)

■②CPC 平面図 (別紙24)

■③CPC 文書(バリデーション基準書、製造管理基準書、品質管理基準書、衛生管理基準書、標準作業手順書(SOP)等) (①と同様)

5) 倫理審査委員会関連書類

■①委員名簿 (別紙25、26)

■②委員会規定 (別紙27)

■③議事録 (別紙28、29)

■④結果通知書 (別紙30、31)

■ その他(資料内容:別紙32 動物実験等の基礎的検討)

■ その他(資料内容:別紙33 保険見積もり)

臨床研究の概要をできる限り平易な用語を用いて記載した要旨

本研究は、既存の治療に抵抗性の末梢動脈疾患（閉塞性動脈硬化症・バージャー病）患者を対象に、患者より採取した骨髄細胞を、患者自身の末梢血から調製した多血小板血漿を用いて培養を行い、培養した骨髄由来間葉系細胞を末梢動脈疾患患者の虚血下肢内へ筋肉注射にて移植を行い、主に安全性を検討することを目的としている。また可能な限り副次的に有効性についても検討する。

閉塞性末梢動脈疾患は四肢の血管に狭窄や閉塞が起こり血流が低下することで、足の冷えや痛み、さらには皮膚の潰瘍や壊死へと進行していく。この疾患に対する治療法は、禁煙・食事療法などの生活環境の改善の指導、薬物療法、カテーテルやステントを用いた血管拡張術、人工血管などを用いた血管バイパス術などが挙げられる。しかしながら、これらの治療法では治療できない場合もあり、下肢の切断を余儀なくされる患者が後を絶たない。

近年、これらの治療に限界のある重症の末梢動脈疾患に対して、自己末梢血または自己骨髄由来の幹細胞を虚血下肢の骨格筋へ移植することで、血流を改善させ、患者の症状を軽減させることを目標とした治療が行われている。他の施設で行われた自己骨髄由来単核球移植では顕著な副作用は見られず、良好な結果が報告されている。

しかし、この治療法では骨髄中に存在する幹細胞が非常に少ないがために、大量の骨髄を採取することが問題とされている。そこで骨髄穿刺により患者から得た少量の骨髄液を培養することで治療に必要な量の間葉系細胞を確保できるようになった。通常の細胞培養では、牛胎児血清を用いることが多いが、患者自身の末梢血より血小板を濃縮した多血小板血漿を用いての培養法が開発されている。血小板には種々の細胞成長因子が含まれており、また動物由来の試薬を避けることが出来る。そのため、患者自身の細胞を使用することから安全性が高く、免疫学的拒絶反応を避けることが可能となる。

我々はまず、マウスの下肢虚血モデルを作成し、マウスの骨髄細胞を培養して得られた間葉系細胞を大腿四頭筋に移植することにより、その効果について検討を行った。マウスの骨髄由来の間葉系細胞の培養には、多血小板血漿の代わりに牛胎児血清を用いた。2週間後に細胞移植した群としなかった群とを比較すると明らかに細胞移植群において新生血管の数が増加していた。GFP マウス由来の細胞を野生型マウスに移植した場合には移植細胞の一部は管腔構造を形成していることを確認した。

次にビーグル犬を用いて、骨髄採取と末梢血採取を行い、多血小板血漿を調製し、骨髄由来間葉系細胞の培養を行った。ビーグル犬の下肢虚血モデルを作成し、培養した骨髄間葉系細胞を移植して、安全性を検討した結果、異常は見られなかった。

更に多血小板血漿を用いての骨髓間葉系幹細胞の増殖を見る為、健常人ボランティアから末梢血及び骨髓液を採取した。骨髓由来間葉系細胞を用いて培養を行い、2週間で目標の細胞数まで増殖する事が出来た。

また品質確認を行ったがいずれも異常は見られなかった。

以上から骨髓由来培養間葉系細胞の移植は、末梢動脈疾患に対する有用な治療法になる可能性がある。

