

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実用化研究事業
(英語) Research Project for Practical Applications of Regenerative Medicine

研究開発課題名： (日本語) 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞
移植による血管・組織再生治療
(英語) Vascular and tissue regenerative therapy using autologous ex vivo
expanded peripheral blood mononuclear cell therapy for non-healing extremity wound patients.

研究開発担当者 (日本語) 順天堂大学医学部形成外科学講座 准教授 田中 里佳
所属 役職 氏名： (英語) Juntendo University School of Medicine Department of Plastic and
Reconstructive Surgery Associate Professor Rica Tanaka

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞
開発課題名： 移植による血管組織再生治療 (臨床研究患者のリクルート、臨床評価の
総括)
(英語) Vascular and tissue regenerative therapy using autologous ex vivo
expanded peripheral blood mononuclear cell therapy for non-healing extremity wound patients
(Clinical trial patient recruitment, Management and evaluation of clinical trial)

研究開発分担者 (日本語) 順天堂大学大学院医学研究科形成・再建外科学 教授 水野 博司
所属 役職 氏名： (英語) Juntendo University School of Medicine Department of Plastic and
Reconstructive Surgery Professor Hiroshi Mizuno

分担研究 (日本語) 血管・組織再生治療に資するレギュラトリーサイエンス研究
開発課題名： (レギュラトリーサイエンス研究の統括)
(英語) Regulatory science research related to vascular and tissue regenerative
therapy (Management of Regulatory Science)

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 産学連携本部 予防医療・診断技術開発プログラム

所属 役職 氏名: マネージャー 向後 泰司

(英 語) RIKEN Preventive Medicine and Diagnosis Innovation Program, Cluster for Industry Partnerships Program Regulatory Manager Yasushi Kogo

分担研究 (日本語) 血管・組織再生治療に資するレギュラトリーサイエンス研究

開発課題名: (ゲノム医学に関する助言)

(英 語) Regulatory science research related to vascular and tissue regenerative therapy (Research related to Genomic Medicine)

研究開発分担者 (日本語) 理化学研究所 産学連携本部 予防医療・診断技術開発プログラム

所属 役職 氏名: プログラムディレクター 林崎 良英

(英 語) RIKEN Preventive Medicine and Diagnosis Innovation Program, Cluster for Industry Partnerships Program Director Yoshihide Hayashizaki

II. 成果の概要(総括研究報告)

- ・ 研究開発代表者による報告の場合

和文

(I) 研究開発目的及び内容

本研究開発の目的は、低侵襲でかつ高い効果が期待できる次世代型血管再生治療を臨床研究にて安全性と効果を検証することで、本再生医療を早期に実現するとともに、難治性四肢潰瘍患者の四肢切断を回避し救済することである。このため、平成 28 年度末までに、わずか 200mL の血液で得られる血管再生治療用のヒト幹細胞を用いた臨床研究を再生医療等安全性確保法下にて実施し、臨床 POC を取得する事を目標としている。その後は医師主導型治験・先進医療等への移行を計画している。

(II) 研究開発成果の内容

(ア) ヒト幹細胞臨床研究および再生医療等安全性確保法に基づく臨床研究の実施に関して

平成 27 年度に実施した 2 症例と同様の方法にて、平成 28 年度に 5 症例の臨床研究を実施した。第一例目に生じた有害事象は、入院期間の延長、歩行制限、周術期の抗生剤投与を実施することでその後同様の有害事象を発症していない。平成 28 年度までに合計 7 症例の臨床研究を完了しているが、Grade3 以上の有害事象や細胞治療との因果関係を否定できない有害事象の発症は認めず、本臨床研究における一定の安全性が示唆されている。本臨床研究の有効性については、全例で痛みの軽快または改善、局所の血流改善、歩行機能の維持、下肢切断の回避を認めている。

(イ) 先進医療承認に向けた活動に関して

難治性潰瘍患者における有識者を集めた Key Opinion Leader 会を発足し、先進医療のプロトコル作成を行った。さらに、平成 28 年度の臨床研究にて 5 症例の安全性・有効性に関する知

見が得られたため、新規にプロトコール作成した先進医療Bの申請書をもとに先進医療事前相談を実施した。平成29年度に先進医療を開始すべく、申請準備を行っている。

(ウ) 再生医療等製品の製造販売承認に向けた活動

① 平成27年度に引き続き、PMDAの薬事戦略相談や大阪大学未来医療センターの開発相談を受けながら製造方法・規格の決定、追加の非臨床試験を実施した。現在までに実施した非臨床安全性試験の結果と今後の試験計画に関しては、PMDAによる再生医療等製品の品質及び安全性に関わる相談における対面助言を実施し一定の見解一致を得た。

② 順天堂医院CPCにおける製造体制の整備を実施し、GCTP基準を担保する治験実施施設および運用体制を構築した。

(エ) 細胞特性解析

収集された血液由来細胞を用いた特性解析を行い、得られた結果から有効性・安全性の指標となる細胞特性を探索し重要品質特性に資する因子の同定を行った。現在、データの解析を実施している。さらに平成28年度の追加予算にて実施した、培養上清を用いた網羅的タンパク解析の結果より、重要品質特性に係る候補因子が複数得られた。

I. Research and Development (R&D) Purpose and Content

The purpose of this R&D is, together with realizing this regenerative therapy at an early stage, to avoid and relieve limb amputation in patients with intractable limb ulcer by verifying its safety and efficacy in clinical research, so that we can expect a minimally invasive yet highly effective next-generation vascular regeneration therapy. For this reason, by the end of FY2016, we aim to acquire clinical POC and conduct clinical research under the Regenerative Medicine Safety Assurance Act using human stem cells for vascular regeneration therapy obtained from just 200 mL of blood. After that, we plan to shift towards investigator-initiated clinical trials and advanced medical care.

II. Contents of R&D Results

(a) Human Stem Cell Clinical Research (10 cases)

5 cases of clinical studies were carried out in FY2016 with the same methods as the 2 cases carried out in FY2015. After implementing extended hospitalization periods, walking restrictions, and the administration of perioperative antibiotics, the adverse events that occurred in the first case did not occur. Although a total of 7 clinical study cases were completed by the end of FY2016, the onset of adverse events of Grade 3 and above, as well as those that cannot deny the causal relationship with cell therapy were not observed, and certain safety measures have been suggested in this clinical study. Regarding the effectiveness of this clinical study, in all cases, we observed pain improvement or pain relief, improvement in blood flow, maintenance of walking function, and avoidance of lower limb amputation.

(b) Actions for Advanced Medical Care Approval

We launched a Key Opinion Leader Meeting with experts in patients with intractable ulcer, and prepared a protocol for advanced medical care. In addition, since knowledge was obtained

on safety and efficacy from the 5 cases of the FY2016 clinical research, prior advanced medical care consultation was conducted on the basis of the application form for advanced medical care B that was drawn up based on the new protocol. We are preparing to proceed with the application so that advanced medical treatment can be started in FY2017.

(c) Actions for the Approval of the Manufacture and Sales of Regenerative Therapy

- ① Following on from FY2015, at the same time as receiving consultation on pharmaceutical strategy from PMDA and on the development of the Osaka University Hospital Medical Center for Translational Research, the determination of production methods and standards as well as additional non-clinical tests were carried out. With regard to the results of non-clinical safety tests carried out up until now and to future experimental plans, through face-to-face advisory consultation with PDMA on the quality and safety of regenerative therapy products, we obtained a set agreement of opinion.
- ② A clinical trial site was prepared, implementing the Juntendo Hospital CPF manufacturing system and GCTP standard security measures.

(d) Cell Characterization Analysis

Characterization analysis was performed using cells obtained from collected blood samples, and cell characteristics that are indicative of efficacy and safety were searched for from the obtained results. With the additional budget of FY2016, several candidate factors related to important quality characteristics were obtained from the results of comprehensive protein analysis carried out using culture supernatant.

・ 研究開発分担者による報告の場合

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 4 件、国際誌 2 件）

1. 田中里佳、門真起子、福田太郎、市川佑一、水野博司。糖尿病足潰瘍・壊疽の治療、新時代の臨床糖尿病学(下)―より良い血糖管理をめざして―。日本臨牀、2016、74 巻:363-367
2. 田中里佳、金澤成行、水野博司。Wound bed preparation における再生医療の役割。医学のあゆみ、2016、258: 860-864
3. Lin Luo, Rica Tanaka, Shigeyuki Kanazawa, Feng Lu, Ayato Hayashi, Takehiko Yokomizo, Mizuno Hiroshi. A synthetic leukotriene B4 receptor type 2 agonist accelerates the cutaneous wound healing process in diabetic rats by indirect stimulation of fibroblasts and direct stimulation of keratinocytes. Journal of Diabetes and its Complications, 2016, dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2016.09.002
4. Hiroko Hagiwara, Tanaka R, Evolution of autologous endothelial progenitor cell therapy for tissue regeneration and vasculogenesis. Personalized Medicine Universe, 2016, 5:8-15
5. 田中里佳。実用化への挑戦。形成外科、2016、59 巻 : 1277-1285

6. 田中里佳。末梢血単核球生体外培養増幅法（QQc 法）を用いた血管再生治療。メディカル・サイエンス・ダイジェスト、2017、43 巻 2 号：2-3

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Challenges of stem cell therapy clinical trial for non-healing extremity wounds. Efficacy and safety evaluation of QQc cultured ex vivo expanded peripheral blood stem cell therapy prior to clinical translation, 口頭, Tanaka R, Kado M, Fujimura S, Arita K, Tono-Okada K, Hagiwara H and Mizuno H, The 13th Japan-Korea Congress of Plastic and Reconstructive Surgery, 2016/5, 国内.
2. 再生新法下における難治性潰瘍に対する次世代血管再生治療の研究再開までの道のりと今後の展望、口頭、田中 里佳、藤村 聡、有田 佳代、門 真起子、市川 佑一、萩原 裕子、水野 博司、第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会、2016/4、国内。
3. 細胞治療が担う創傷治癒の役割、口頭、門 真起子、田中里佳、岡田佳世子、有田佳代、藤村 聡、向後泰司、水野博司、第 8 回日本下肢救済・足病学会学術集会、2016/5、国内。
4. Vascular Stem Cells Therapy for Tissue Regeneration, 口頭, Rica Tanaka
Introduction to Bone Marrow Derived Stem Cells, 口頭, Rica Tanaka
Harvesting and Isolation of Bone Marrow Stem Cells, 口頭, Rica Tanaka
Clinical Application of Bone Derived Marrow Stem Cells, 口頭, Rica Tanaka
20th Annual Scientific Meeting of Indonesian Association of Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgeons, 2016/5, 国外.
5. Clinical Application of Bone Derived Marrow Stem Cells, 口頭, Rica Tanaka, First Indonesian International Stem Cells Conference, 2016/5, 国外.
6. 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞移植による血管・組織再生治療、ポスター、田中里佳、向後泰司、水野博司、林崎良英、大阪大学ポスター情報交換会、2016/5、国内
7. EFFICACY AND SAFETY EVALUATION OF QQc CULTURED EX VIVO EXPANDED PERIPHERAL BLOOD STEM CELL THERAPY PRIOR TO CLINICAL TRANSLATION, ポスター, Rica Tanaka, ISSCR, 2016/6, 国外.
8. Next Generation Autologous Vascular Stem Cell Therapy for Diabetic Limb Salvage, 口頭, Rica Tanaka, Makiko Kado, Kayo Arita, Satoshi Fujimura, Kayoko Okada, Hiroko Hagiwara, Hiroshi Mizuno, 1st Congress of Diabetic Limb Salvage in Asia, 2016/7, 国外.
9. 細胞再生治療の奥義：実用化を見据えた技術の確立、口頭、田中 里佳、門 真起子、有田 佳代、藤村 聡、萩原 裕子、向後 泰司、水野 博司、第 8 回日本創傷外科学会総会・学術集会、2016/7、国内。
10. 血管再生治療が担う血管形成の役割とその限界、口頭、田中里佳、門 真起子、藤村 聡、有田 佳代、岡田 佳世子、向後 泰司、水野 博司
糖尿病皮膚組織 Macrophage 活性異常による創傷治癒遅延分子メカニズムの解明、口頭、門 真起子、田中 里佳、沈 燕、金澤 成行、岡田 佳世子、水野 博司
血管内皮前駆細胞を含む末梢血単核球の微小重力環境下における培養法の確立、口頭、萩原 裕

子、田中 里佳、東端 晃、小川 志保、金澤 成行、水野 博司

無血清体外培養増幅膠原病マウス血管内皮前駆細胞の機能解析、口頭、平野 理恵、田中 里佳、播野 裕子、水野 博司

Effect of quality and quantity control cultured murine EPCs in fat grafting、口頭、Maxim Geeroms, Rica Tanaka, Michiko Takahashi, Kayoko Okada, Rie-Ito Hirano, Hiroshi Mizuno.

形成外科領域における再生医療臨床研究の新法対応～その対策と課題、口頭、藤村 聡、田中 里佳、向後 泰司、水野 博司

組織再生修復における脂肪組織幹細胞の直接的効果と間接的効果、口頭、田島聖士、飛田護邦、堀越久子、大下高志、田中里佳、水野博司

第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会、2016/9、国内。

11. New Generation Peripheral Blood Stem Cell Therapy for Non-healing Extremity Wounds, 口頭, Rica Tanaka, ASPS 2016, 2016/9, 国外。

12. 難治性四肢潰瘍を対象とした新・血管組織再生治療の開発、口頭、田中 里佳、平野 理恵、播野 裕子、有田 佳代、藤村 聡、水野 博司、第 31 回日本臨床リウマチ学会、2016/10、国外。

13. 再生医療臨床研究の新法対応～その対策と課題、口頭、田中 里佳、藤村 聡、水野 博司、第 21 回日本臨床毛髪学会学術集会、2016/11、国内。

14. CLI に対する次世代型血管・組織再生治療の開発、口頭、門真起子、田中里佳、有田佳代、藤村 聡、向後泰司、水野博司、第 64 回日本心臓病学会、2016/9、国内。

難治性四肢潰瘍患者を対象とした新規血管・組織再生治療法の開発、口頭、田中里佳、藤村 聡、有田佳代、萩原裕子、平野理恵、門真起子、水野博司

血管内皮前駆細胞の培養効率化を目指した微小重力環境下生体外増幅培養法の確立、口頭、萩原裕子、田中里佳、東端 晃、小川志保、金澤成行、水野博司

QQc cultured endothelial progenitor cells (EPC) improve the fat graft vascularization and survival, 口頭, Geeroms M, Tanaka R, Moustapha H and Mizuno H

膠原病マウス無血清生体外増幅培養血管内皮前駆細胞の機能解析、口頭、平野理恵、田中里佳、萩原裕子、播野裕子、水野博司

アカデミアにおける再生医療研究開発の現状と対策、口頭、田中里佳

第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3、国内。

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 生体外培養増幅末梢血単核球を用いた新しい創傷治療の開発、田中里佳、第 3 回お茶の水サイエンス倶楽部、2016/1、国内。
2. 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞移植による血管・組織再生治療、田中里佳、AMED 再生医療公開シンポジウム、2016/1、国内。
3. 幹細胞基礎研究から臨床応用への発展～我々の大型動物を用いた前臨床研究の経験～、門 真起子、田中里佳、岡田 佳世子、有田 佳代、藤村 聡、水野 博司、第 4 回再生再建外科研究会 (TEARS)、2016/1、国内。
4. フットケアから最先端血管再生治療を駆使した下肢救済トータルマネジメント、田中里佳、第

- 10 回信濃町フットケア講演会、2016/2、国内。
5. 救肢で一生を得る集学的治療最先端技術～地域連携を駆使して～、田中里佳、第 7 回西湘フットケアを考える会、2016/1、国内。
 6. 順天堂大学再生医療第 1 臨床研究プロジェクト：開始のための準備方法と今後の展望、田中里佳、お茶の水再生医療懇話会、2016/3、国内。
 7. 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞移植による血管・組織再生治療の臨床研究、田中里佳、先端医療振興財団研修、2016/3、国内。
 8. 難治性四肢潰瘍患者を対象とした自己末梢血単核球生体外増幅培養細胞移植による血管・組織再生治療、田中里佳、平成 28 年度再生医療プログラム間連携のための情報交換会、2016/5、国内。
 9. 難治性潰瘍のベストプラクティス、田中里佳、第 6 回横須賀三浦下肢創傷研究会、2016/6、国内。
 10. 難治（糖尿尿・虚血）性足潰瘍・壊疽の治療、田中里佳、第 32 回日本義肢装具学会研修セミナー、2016/8、国内。
 11. 「フットケアのコツ」明日から出来る早期診断と治療、田中里佳、フットケア地域連携セミナーin 両国～皆で足を守ろう！～、2016/9、国内。
 12. 創傷管理の HOW TO～基本から最先端治療まで～、田中里佳、チーム医療で足救済に挑む！、2016/11、国内。
 13. 下肢救済治療への挑戦：地域連携から最先端治療を駆使して、田中里佳、第 19 回多摩腎不全フォーラム、2016/11、国内。
 14. 難治性潰瘍に対する次世代型血管・組織再生治療の開発、田中里佳、東京都研究成果講演会、2016/3、国内。
 15. 難治性潰瘍に対する次世代型血管・組織再生治療の開発、田中里佳、2017 ワールド・アライアンス・フォーラム I Tあわじ会議、2016/3、国内。

（４）特許出願