

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) 成育疾患克服等総合研究事業
(英語) Project for Baby and infant Research of health and Development to Adolescent and Young adult
- 研究開発課題名 : (日本語) 脳性麻痺に対する臍帯由来間葉系細胞治療に関する研究
(英語) Regenerative therapy for cerebral palsy: transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名 : (日本語) 大阪市立大学大学院医学研究科発達小児医学 教授 新宅治夫
(英語) Osaka City University Graduate school of Medicine, Department of Pediatrics, Professor, Shintaku Haruo
- 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) 脳性麻痺に対する臍帯由来間葉系細胞 (MSC) 投与のプロトコール検討
臍帯由来 MSC 投与後安全性確認
- 開発課題名 : (英語) Study for protocol of transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells
Safety assessment of transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 淀川キリスト教病院ホスピス・こどもホスピス病院 院長 鍋谷まこと
(英語) Yodogawa Christian Hospital Hospice Children's Hospice Hospital, Director, Nabetani Makoto
- 分担研究 (日本語) 自己・同種臍帯由来間葉系細胞 (MSC) の製剤化に関する検討
- 開発課題名 : (英語) Study for the formulation of autologous and allogeneic umbilical cord mesenchymal stromal cells
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 東京大学医科学研究所附属病院セルフ・ロセッシング・輸血部 准教授 長村登紀子
(英語) Department of Cell Processing and Transfusion, IMSUT Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Associate professor, Nagamura Tokiko ,

分担研究 (日本語) 新生児脳性麻痺の神経学的予後の検討
開発課題名: (英語) Study for neurological prognosis of neonatal cerebral palsy
研究開発分担者 (日本語) 東京大学小児科 教授 岡 明
所属 役職 氏名: (英語) University of Tokyo, Department of Pediatrics, Professor, Oka Akira,

分担研究 (日本語) 自己臍帯採取・冷蔵保存・配達システムの構築
開発課題名: (英語) Construct a system for sampling, cryopreservation and delivery of autologous umbilical cord

研究開発分担者 (日本語) 倉敷中央病院 総合周産期母子医療センター主任部長 渡部 晋一
所属 役職 氏名: (英語) Kurashiki Central Hospital, Perinatal Center, Director, Watabe Shinichi

分担研究 (日本語) 脳性麻痺治療用臍帯由来間葉系細胞の特性解析項目の検討
開発課題名: (英語) Study for characteristic analysis items of transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells for therapy for cerebral palsy

研究開発分担者 (日本語) 国立成育医療センター 政策科学研究部 部長 森 臨太郎
所属 役職 氏名: (英語) National Center for Child Health and Development, Department of Health policy, Director, Mori Rintaro

分担研究 (日本語) 脳室周囲白質軟化症に対する臍帯由来間葉系細胞治療における炎症に関する評価項目の検討

開発課題名: (英語) Study for evaluation points of the inflammation for transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells for therapy for cerebral palsy for periventricular leukomalacia

研究開発分担者 (日本語) 東京医科歯科大学小児科 講師 滝 敦子
所属 役職 氏名: (英語) Department of Pediatrics and Developmental Biology, Tokyo Medical and Dental University, Junior Associate Professor, Taki Atsuko

分担研究 (日本語) 脳性麻痺に対する臍帯由来間葉系細胞 (MSC) 治療の拡大と発信

開発課題名: (英語) Communication of information for transplantation of umbilical cord mesenchymal stromal cells for therapy for cerebral palsy

研究開発分担者 (日本語) 東京女子医科大学 新生児科 教授 楠田 聡
所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Women's Medical University, Department of Neonatology, Professor, Kusuda Satoshi

II. 成果の概要（総括研究報告）

新宅治夫教授（大阪市立大学 大学院医学研究科）は、分担研究者の長村登紀子（東京大学医科学研究所 附属病院セルプロセッシング・輸血部）、鍋谷まこと（淀川キリスト教病院 小児科）、濱崎考史（大阪市立大学 大学院医学研究科）、渡部晋一（倉敷中央病院 総合周産期母子医療センター）、岡明（東京大学 大学院医学研究科）らのグループとともに、AMED 研究（臍帯血・臍帯由来間葉系細胞（MSC）製剤を用いた新規免疫療法・再生医療の開発 H26-再生-一般-010 代表 長村登紀子：長村班）と連携しながら、脳性麻痺に対する医師主導治験用の臍帯由来 MSC 製造および提供体制を確立した。同種健康人臍帯由来MSCの製剤化については、長村班において重症急性移植片対宿主病(GVHD)を対象としたPMDA 薬事戦略相談（対面助言）を受け、品質・安全性および非臨床研究項目について概ね合意に至った後、新生児脳性麻痺に対する臍帯由来 MSC の医師主導治験用の工程内試験や規格試験、特性解析項目の追加を検討した。分担研究者の長村、鍋谷、岡らは研究代表者と共に薬事戦略相談の事前面談および対面助言（書面）を受けた。事前面談では、新生児に特化した非臨床安全性薬理試験は特に必要ないとの見解を得、対面助言では、これまでの神経障害モデルおよび *in vitro* において上昇を認めた肝細胞増殖因子（HGF）と脳由来神経栄養因子（BDNF）の遺伝子発現を *realtime PCR* により確認する試験を規格として追加することで合意に至った。その他、追加支援をうけ非特異的ウイルス否定試験を実施し、製品の安全性を確認した。

分担研究者の岡明（東京大学 小児科）、楠田聡（東京女子医科大学 新生児科）らのグループは、脳性麻痺予防研究会を開催し、韓国のソウル大学から Kim 教授を招いて新生児の脳症とその治療について特別講演を行い、国際共同研究について討論した。米國小児科学会（PAS2017）でシンポジウムを企画し、日本と世界各国の実施状況について討論し、治療法に関する最新の情報を得て治療プロトコールについて調整した。

分担研究者の滝敦子（東京医科歯科大学 小児科）らのグループは、分担研究者の長村らが培養調整した同種健康人由来 MSC を脳室周囲白質変性症（PVL）モデルマウスに腹腔内投与し、MSC は脳に到達しないものの神経症状を回復させる効果があることを見いだした。また、研究代表者らは、分担研究者の長村から MSC の提供を受け効果・安全性を新生児 HIE モデルマウスと新生児 HIE モデルラットで検討し、2つの異なる病態モデルにおいて安全性を確認した。効果については両モデルにおいて概ね同じであったが、一部異なる点もあることを明らかにし、作用メカニズムとしては、細胞治療による急性期の脳血流改善、ミクログリアの活性化抑制などを確認した。

分担研究者の森臨太郎（国立成育医療研究センター政策科学研究部）は、稀少疾患の治療に関する臨床研究の実施には困難を伴うが、革新的な手法を組み合わせた研究デザインを検討し、必要サンプルサイズを最小化する手法と、治療を受ける症例数を最大化するためにネットワークによる多施設共同研究としての実施など工夫して安全性についての第1相試験を計画、実施することとした。

Professor Haruo Shintaku (Osaka City University Graduate School of Medicine) established a production and supply setup for umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (MSC) to be used in physician-led clinical trials on cerebral palsy, together with research groups of the co-investigators Tokiko Nagamura (Department of Cell Processing and Transfusion, IMSUT Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo), Makoto Nabetani (Department of Pediatrics, Yodogawa Christian Hospital), Takashi Hamazaki (Osaka City University Graduate School of Medicine), Shinichi Watabe (Perinatal Center, Kurashiki Central Hospital) and Akira Oka (Department of Pediatrics, The University of Tokyo). This research work has been carried out in association with the

AMED Study (Development of novel immunotherapy and regenerative medicine using formulations of umbilical cord blood and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells), and H26-Regeneration, General-010, leader Tokiko Nagamura: Nagamura Group. With regard to making medical products out of allogeneic umbilical cord-derived MSC from healthy persons, the Nagamura group had PMDA pharmaceutical affairs consultations (face-to-face clinical trial consultations) regarding severe and acute graft-versus-host disease (GVHD) and arrived at a broad agreement on quality, safety and non-clinical research items. Then, the group examined the addition of in-process tests, specifications tests and characterization items to be used in physician-led clinical trials on umbilical cord-derived MSC for treating neonatal cerebral palsy. The co-investigators Nagamura, Nabetani, Oka and others, along with the principal investigator, had prior assessment consultations and face-to-face clinical trial consultations (in writing) of the pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy at PMDA. In the prior assessment consultations, the PMDA opined that non-clinical pharmacological safety tests specific for neonates are not particularly required. In the face-to-face clinical trial consultation, an agreement was reached on adding tests to verify, through real-time PCR, the gene expression of hepatocyte growth factor (HGF) and brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which were seen to be elevated in animal models of neuropathy studied so far and also *in vitro*, as a standard feature. Apart from this, with the additional support received, the group conducted tests to rule out non-specific viruses and confirm the safety of the medical product.

The research groups of co-investigators Akira Oka and Satoshi Kusuda (Department of Neonatology, Tokyo Women's Medical University) held a seminar on the prevention of cerebral palsy, where they invited Professor Kim from Seoul University of South Korea to deliver special lecturer on neonatal encephalopathy and its treatment. They also discussed international joint research. They organized a symposium at the American Academy of Pediatrics (PAS 2017) where they discussed the status of treatment in Japan and other parts of the world and on the basis of the latest information they obtained, they made some adjustments in their treatment protocol.

Co-investigator Atsuko Taki (Department of Pediatrics and Developmental Biology, Tokyo Medical and Dental University) intraperitoneally administered allogenic, healthy person-derived MSC that had been cultured and prepared by co-investigator Nagamura and her associates to a mouse model of periventricular leukomalacia and found that the MSC had the effect of reducing neurological symptoms, although the cells had not reached the brain. The principal investigator and his associates examined the effectiveness and safety of MSC in the mouse model and rat model of neonatal HIE using the MSC obtained from co-investigator Nagamura and confirmed that they were safe in these two animal models of this disease. They showed that the effectiveness was about the same in the two models, but have also pointed out some differences. As the action mechanism of this cell therapy, they confirmed that it improved cerebral blood flow in the acute phase and that it suppressed the activation of microglia.

Co-investigator Rintaro Mori (Department of Health Policy, National Center for Child Health and Development) examined the study using a combination of innovative techniques, although implementation of a clinical study on the treatment of a rare disease generally poses difficulties. Based on his studies, the Phase 1 study, which examines the safety of the treatment, will be planned and executed by employing creativity, such as using the technique of minimizing the required sample size and making it a multi-center joint study that leverages a network in order to maximize the number of cases that might require the new treatment.

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 2件、国際誌 23件）

1. Ohnishi S, Ichiba H, Tanaka Y, Harada S, Matsumura H, Kan A, Asada Y, Shintaku H. Early and intensive nutritional strategy combining parenteral and enteral feeding promotes neurodevelopment and growth at 18months of corrected age and 3years of age in extremely low birth weight infants. *Early Hum Dev.* 100:35-41. 2016.
2. Yanai S, Tokuhara D, Tachibana D, Saito M, Sakashita Y, Shintaku H, Koyama M. Diabetic pregnancy activates the innate immune response through TLR5 or TLR1/2 on neonatal monocyte. *J Reprod Immunol.* 117:17-23. 2016.
3. K Tsuda, M Nabetani, O Iwata et.al. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy: A report from the first 3 years of the Baby Cooling Registry of Japan. *Scientific Report* 2016 in press
4. Mukai T., Mori Y., Shimazu T., Takahashi A., Tsunoda H., Yamaguchi S., Kiryu S, Tojo A., and Nagamura-Inoue T. Intravenous injection of umbilical cord derived mesenchymal stromal cells attenuates reactive gliosis and hypomyelination in a neonatal intraventricular hemorrhage model, *Neuroscience*, *in press*, 10.1016/j.neuroscience.2017.05.006
5. Mukai T, Nagamura-Inoue T, Shimazu T, Mori Y, Takahashi A, Tsunoda H, Yamaguchi S, Tojo A. Neurosphere formation enhances the neurogenic differentiation potential and migratory ability of umbilical cord-mesenchymal stromal cells. *Cytherapy.* 18:229-241, 2016. doi: 10.1016/j.jcyt.2015.10.012.
6. Nagamura-Inoue T, Mukai T. Umbilical Cord is a Rich Source of Mesenchymal Stromal Cells for Cell Therapy. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 11, 634-642,2016
7. Morioka C, Komaki T, Taki A, Honda I, Yokoyama N, Iwasaki K, Iseki S, Morio T, Morita I. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on periventricular leukomalacia-like brain injury in neonatal rats *Inflammation and Regeneration* 2017;37(1):2-10.
8. Kelly LE, Shah PS, Håkansson S, Kusuda S, Adams M, Lee SK, Sjörs G, Vento M, Rusconi F, Lehtonen L, Reichman B, Darlow BA, Lui K, Feliciano LS, Gagliardi L, Bassler D, Modi N. Perinatal health services organization for preterm births: a multinational comparison. *J Perinatol* 2017[Epub ahead of print]
9. Sasaki H, Yonemoto N, Mori R, Nishida T, Kusuda S, Nakayama T. Assessing archetypes of organizational culture based on the Competing Values Framework: the experimental use of the framework in Japanese neonatal intensive care units. *Int J Qual Health Care.* 2017;28:1-8.
10. Darlow BA, Lui K, Kusuda S, Reichman B, Håkansson S, Bassler D, Modi N, Lee SK, Lehtonen L, Vento M, Isayama T, Sjörs G, Helenius KK, Adams M, Rusconi F, Morisaki N, Shah PS; International Network for Evaluating Outcomes of Neonates. International variations and trends in the treatment for retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 2017 [Epub ahead of print]
11. Ago M, Masumoto K, Uchiyama A, Aihara Y, Okada Y, Kusuda S. Serial Measurement of Superior Vena Cava Flow in Evaluation of the Clinical Severity of Pial Arteriovenous Fistula in an Infant. *AJP Rep.* 2017;7:e1-e4.
12. Mochizuki H, Kusuda S, Okada K, Yoshihara S, Furuya H, Simões EA. Palivizumab Prophylaxis in Preterm Infants and Subsequent Recurrent Wheezing: 6 Year Follow Up Study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017[Epub ahead of print]

13. Uchiyama A, Kushima R, Watanabe T, Kusuda S. Effect of L-thyroxine supplementation on very low birth weight infants with transient hypothyroxinemia of prematurity at 3 years of age. *J Perinatol*. 2017[Epub ahead of print]
14. Hines D, Modi N, Lee SK, Isayama T, Sjörs G, Gagliardi L, Lehtonen L, Vento M, Kusuda S, Bassler D, Mori R, Reichman B, Håkansson S, Darlow BA, Adams M, Rusconi F, San Feliciano L, Lui K, Morisaki N, Musrap N, Shah PS; International Network for Evaluating Outcomes (iNeo) of Neonates. Scoping review shows wide variation in the definitions of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants and calls for a consensus. *Acta Paediatr*. 2017;106:366-374.
15. Gemmell L, Martin L, Murphy KE, Modi N, Håkansson S, Reichman B, Lui K, Kusuda S, Sjörs G, Mirea L, Darlow BA, Mori R, Lee SK, Shah PS. Hypertensive disorders of pregnancy and outcomes of preterm infants of 24 to 28 weeks' gestation. *J Perinatol*. 2016;36:1067-1072.
16. Nakanishi H, Uchiyama A, Kusuda S. Impact of pulmonary hypertension on neurodevelopmental outcome in preterm infants with bronchopulmonary dysplasia: a cohort study. *J Perinatol*. 2016;36:890-6.
17. Matsumoto Y, Nakai A, Nishijima Y, Kishita E, Hakuno H, Sakoi M, Kusuda S, Unno N, Tamura M, Fujii T. Absence of neonatal intensive care units in secondary medical care zones is an independent risk factor of high perinatal mortality in Japan. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42:1304-1309.
18. Shah PS, Lui K, Sjörs G, Mirea L, Reichman B, Adams M, Modi N, Darlow BA, Kusuda S, San Feliciano L, Yang J, Håkansson S, Mori R, Bassler D, Figueras-Aloy J, Lee SK; International Network for Evaluating Outcomes (iNeo) of Neonates. Neonatal Outcomes of Very Low Birth Weight and Very Preterm Neonates: An International Comparison. *J Pediatr*. 2016;177:144-152.
19. Martin LJ, Sjörs G, Reichman B, Darlow BA, Morisaki N, Modi N, Bassler D, Mirea L, Adams M, Kusuda S, Lui K, Feliciano LS, Håkansson S, Isayama T, Mori R, Vento M, Lee SK, Shah PS; International Network for Evaluating Outcomes (iNeo) of Neonates Investigators. Country-Specific vs. Common Birthweight-for-Gestational Age References to Identify Small for Gestational Age Infants Born at 24-28 weeks: An International Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2016;30:450-61.
20. Uchiyama A, Sugihara S, Kusuda S. National survey on concepts for congenital hypothyroidism screening in neonatal intensive care units in Japan. *Pediatr Int*. 2016;58:1311-1315.
21. Sasaki H, Yonemoto N, Mori R, Nishida T, Kusuda S, Nakayama T. Use of the ICU Nurse-Physician Questionnaire (ICU N-P-Q): testing reliability and validity in neonatal intensive care units in Japan. *BMJ Open*. 2016;6(5):e010105.
22. Nakamura T, Yonemoto N, Nakayama M, Hirano S, Aotani H, Kusuda S, Fujimura M, Tamura M; and The Neonatal Research Network, Japan. Early inhaled steroid use in extremely low birthweight infants: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2016[Epub ahead of print]
23. Cheong SM, Totsu S, Nakanishi H, Uchiyama A, Kusuda S. Outcomes of peripherally inserted double lumen central catheter in very low birth weight infants. *J Neonatal Perinatal Med*. 2016;9(1):99-105.
24. 新宅治夫：新しい再生医療を目指して『臍帯血幹細胞から臍帯間葉系幹細胞へ』、大阪小児科医学会会報、178；5,2016
25. 新宅治夫：新生児への再生医療の導入、*Fetal & Neonatal Medicine*, 8(3):104-111, 2016

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Overview of Current Status of UCB-Derived Stem Cell Therapy: A New Neuroprotective Therapy. 口演 (シンポジウム), Shintaku H, PAS/ASPR2016, 2016/4/30-5/3, 国外.
2. Hypothermia Therapy and Autologous Cord Blood Therapy for Newborns with HIE in Japan. 口演 (シンポジウム), Nabetani M, PAS/ASPR2016, 2016/4/30-5/3, 国外.
3. A novel therapeutic strategy for cerebral palsy: feasibility of umbilical cord blood stem cells and umbilical cord mesenchymal stromal cells. ポスター, Shintaku H, Nabetani M, Hamazaki T, Kusuda S, Tamura M, Watabe S, Hayakawa M, Sato Y, Tsuji M, Taguchi A, Ichiba H, Oka A, Mori R, Taki A, Mukai T, Nagamura IA, The 2nd Congress of the International Neonatology Association (INAC2016), 2016/7/15-17, 国外.
4. Clinical trial study of autologous cord blood cell therapy for newborn with hypoxic ischemic encephalopathy in japan. ポスター, Nabetani M, Shintaku H, Tamura M, Kusuda S, Hayakawa M, Watabe S, Ichiba H, Hamazaki T, Tsuji M, Nagamura IT, Taguchi A, Sato Y, Oka A, Mori R, The 6th of the European Academy of Paediatric Societies (EAPS2016), 2016/10/21-25, 国外.
5. Temporal profiles of cerebral blood flow after hypoxic-ischemic insult in immature rats: evaluation with ¹⁵O gas positron emission tomography について, ポスター, Masahiro Tsuji, Jun-ichiro Enmi, Tetsuaki Moriguchi, Makoto Yamazaki, Tsutomu Zeniya, Kazuhiro Koshino, Makiko Ohshima, Hidehiro Iida. 21st Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience, Antibes, France, 2016/5/12, 国外
6. Hypothermia Therapy and Autologous Cord Blood Therapy for Newborns with HIE in Japan. 口演, Nabetani M, FAOPS, 2016/11/2.
7. 向井丈雄、長村登紀子、森有加、高橋敦子、島津貴久、東條有伸、角田肇、山口暁、脳性麻痺に対する臍帯由来間葉系細胞治療：新生仔脳出血モデルマウスでの検討(口演) 第16回再生医療学会学術集会 2017/3/7-9, 国内.
8. Mukai, T, Tokiko Nagamura-Inoue, T, and Tojo, A. Neurotropism and Neuroprotective effect in umbilical cord-Mesenchymal Stromal Cells, 第3回東京大学内科学専攻大学院セミナー (東京) 2017/2/25
9. Nagamura-Inoue T, Mori Y, Takahashi A, Shimazu T, Mukai T, Nagayama H, Nagamura F, Tojo A. Anti-inflammatory effect of umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells through IDO and PGE2, 第78回日本血液学会総会, 2016/10/14, 国内.
10. 長村登紀子 シンポジウム Umbilical Cord is a rich source of Mesenchymal stromal cells for Cell Therapies (口演) 第22回日本遺伝子細胞治療学会 2016/7/30, 国内.
11. 長村登紀子, 日本輸血・細胞治療学会と日本造血細胞移植学会共同による細胞治療認定管理師制度について、シンポジウム「細胞治療管理師認定制度導入について」、第64回日本輸血・細胞治療学会総会 2016/4/29, 国内.
12. 新生児低酸素性虚血性脳症に対する治療－障害を防ぐための取り組み－, 口頭, 渡部晋一, 第43回日本脳性麻痺研究会 (教育講演), 2016/6/11, 京都, 国内
13. 森丘千夏子、本多 泉、滝 敦子、森尾友宏、森田育男、脳室周囲白質軟化症モデルラットに対する間葉系幹細胞培養上清投与による治療効果の検討 (口演) 第52回 日本周産期新生児学会 2016/7/16, 国内.

14. 本多 泉、森丘千夏子、滝 敦子、宮坂尚幸、森田育男、マウス早産モデルに対する間葉系幹細胞培養上清の治療効果の検討（口演）第 52 回 日本周産期新生児学会 2016/7/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. Overview of Current Status of UCB-Derived Stem Cell Therapy. シンポジウム、口演、Shintaku H., PAS/ASPR2016, 2016/4/30-5/3, 国外.
2. 再生医療を用いた脳性麻痺の新しい予防法、特別口演、新宅治夫、第60回全国肢体不自由児療育研究大会、2015/10/15, 国内
3. 脳性麻痺の治療と再生医療について、会長口演、新宅治夫、第 4 回臍帯血による再生医療研究会、2016/7/24, 国内.

(4) 特許出願