

201435006A

厚生労働科学研究委託費

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)

難治性角結膜疾患に対する

培養自家口腔粘膜上皮シート移植

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務責任者 木下 茂

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究委託費

医療技術実用化総合研究事業

難治性角結膜疾患に対する
培養自家口腔粘膜上皮シート移植

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務責任者 木下 茂

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の医療技術実用化総合研究事業による委託業務として、京都府立医科大学大学視覚機能再生外科学教授 木下茂 が実施した平成26年度「難治性角結膜疾患に対する培養自家口腔粘膜上皮シート移植（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I.	委託業務成果報告（総括）	
	難治性角結膜疾患に対する培養自家口腔粘膜上皮シート移植 ……………	1
	木下 茂	
II.	委託業務成果報告（業務項目）	
	1. ICH-GCP準拠国内多施設臨床試験 ……………	5
	外園千恵	
	2. 培養口腔粘膜上皮シートに関わる研究開発 ……………	7
	郷 正博	
	3. 本治療を広めるための基盤整備 ……………	10
	今井浩二郎	
III.	学会等発表実績 ……………	15
IV.	研究成果の刊行物・別刷 ……………	17

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業）

委託業務成果報告（総括）

難治性角結膜疾患に対する培養自家口腔粘膜上皮シート移植

業務責任者 木下 茂

京都府立医科大学大学院医学研究科 視覚機能再生外科学 教授

研究要旨 培養自家口腔粘膜上皮シート移植の薬事申請を目的として、難治性角結膜疾患を対象に培養自家口腔粘膜上皮シート移植を先進医療Bとして実施した。先端医療振興財団の先端医療センター内細胞培養施設（CPC）において上皮シートを作成して京都府立医科大学に移送、平成27年3月末までに6例の移植手術を行い、順調に経過中である。培養自家口腔粘膜上皮シート移植の保険化に向けて、口腔粘膜上皮シート製造に使用する原料の精査を行い、また実用化を前提として前臨床研究および本臨床試験の手術ビデオのライブラリー化を開始した。

各業務項目および担当責任者氏名・所属研究
機関名及び所属研究機関における職名

①ICH-GCP準拠国内多施設臨床試験

a. プロジェクトの総合推進

木下 茂 京都府立医科大学大学院医学研
究科 視覚機能再生外科学 教授

b. 培養口腔粘膜上皮シート移植の実施

外園 千恵 京都府立医科大学大学院医学
研究科 視覚機能再生外科学 講師

（支援）

川本 篤彦 先端医療振興財団 再生治療
ユニット ユニット長

中村隆宏 同志社大学 生命医科学部 炎症
再生医療センター 准教授

雨宮 傑 京都府立医科大学大学院 医学
研究科 歯科口腔科学 助教

c. 治験移行

郷 正博 先端医療振興財団 細胞療法研
究開発センター 専門役

②培養口腔粘膜上皮シートに関わる研究開 発

郷 正博 先端医療振興財団 細胞療法研
究開発センター 専門役

（支援）

中村隆宏 同志社大学 生命医科学部 炎症
再生医療センター 准教授

③本治療を広めるための基盤整備

今井浩二郎 京都府立医科大学大学院医学
研究科 医療フロンティア展開学 講師

（支援）

外園 千恵 京都府立医科大学大学院医学
研究科 視覚機能再生外科学 講師

A. 研究目的

角膜疾患のうち、難治性角結膜疾患と呼ばれる疾患群は角膜上皮ステムセルの疲弊により重篤な視力障害を招く。しかし従来型の角膜移植では効果を得られず、視力改善に有効な治療法がなかった。

業務責任者である木下茂は、難治性角結膜疾患の新規治療法として培養自家口腔粘膜上皮シート移植を開発、2002年に世界で初めて移植に成功した。初回からの全72例を対象としたレトロスペクティブ調査では、難治性角結膜疾患の中でも最重症の三疾患（重症熱・化学外傷、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡）に有用であった。

本研究の目的は、1) 薬事対応できる臨床データを蓄積し、薬事申請に繋げること、さらに2) 日本発の再生医療技術として国際展開すること、である。単年度での委託である今年度においては、前者を中心に展開した。

B. 研究方法

対象を難治性角結膜疾患の中でも最重症の三疾患（重症熱・化学外傷、Stevens-Johnson症候群(SJS)、眼類天疱瘡)に限定し、多施設かつプロスペクティブに培養自家口腔粘膜上皮シート移植を実施する。移植目的は視力改善、上皮欠損の修復、眼表面癒着の解除のいずれかである。

培養自家口腔粘膜上皮シート移植を実施して、有効性と安全性を評価する。また臨床実施に向けて口腔粘膜上皮シートの輸送

及び保存安定性の検討を行う。本治療を広めるための基盤整備として、術式及び術後管理等の教育に向けた準備を進める。

(倫理面への配慮)

本研究は厚生労働省によるヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に従い、大学倫理審査委員会の承認を得て行った。また本医療技術は先進医療技術審査部会において平成25年6月21日に「適」の評価を受け、平成25年7月5日に先進医療の届出の受理について通知を受けたものである（厚生労働省発保0621第12号）。

C. 研究結果

難治性角結膜疾患に対する口腔粘膜上皮シート移植治療法の確立に向けて、京都府立医科大学附属病院眼科を実施医療機関の中心とし、先端医療振興財団の先端医療センターに整備した細胞培養施設(CPC)を製造施設として、臨床研究を先進医療Bとして実施中である。

本研究期間中、平成27年3月末までに6例の移植手術を実施した。全例において移植された口腔粘膜上皮は患者の眼表面に生着した。

本治療法を保険治療化し普及させるためには、口腔粘膜上皮シートの薬事開発を行い、検証的治験を行うことで再生医療等製品としての薬事承認を得る必要がある。そのため、先進医療B実施と並行して、検証的治験の準備を進めた。最初の段階として、

口腔粘膜上皮シート製造に使用する原料の精査を行った。

保険治療で実施された際の安全な普及のために術式のトレーニングが必要である。前臨床研究および本臨床試験の手術ビデオのライブラリー化に着手した。

D. 考察

ICH-GCP 準拠国内多施設臨床試験を患者の協力のもとに順調に進めることができた。

E. 結論

培養自家口腔粘膜上皮シート移植の実用化に向けて、ICH-GCP 準拠国内多施設臨床試験としての手術を実施し、順調に経過中である。将来の保険化、安全な普及を目指して研究開発、基盤整備を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表（平成 26 年度）

1. Kinoshita S. Treatment of Ocular Surface Disorders: Stevens-Johnson Syndrome, World Ophthalmology Congress (WOC) 2014, Tokyo, Japan, April 4, 2014.
2. Kinoshita S. Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Stevens-Johnson

Syndrome. What's new in cornea ocular surface surgery APGC-ISOHK 2014, Hong Kong, China, September 26, 2014.

3. Sotozono C. Management of Stevens-Johnson syndrome. AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting in Kyoto, Kyoto, Japan, November 30, 2014.
4. Sotozono C. Cultivated Oral Mucosa Epithelial Transplantation. ACS The 4th Biennial Scientific Meeting, Taipei, Taiwan, December 11, 2014.

論文発表

1. Sotozono C, Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Yokoi N, Ueta M, Matsuyama K, Kaneda H, Fukushima M, Kinoshita S: Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity. *Acta Ophthalmol.* 92(6):e447-53, 2014.

H. 知的所有権の取得状況

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

ICH-GCP 準拠国内多施設臨床試験

担当責任者 外園千恵
京都府立医科大学大学院 視覚機能再生外科学 講師

研究要旨 ICH-GCP 準拠国内多施設臨床試験として難治性角結膜疾患（重症熱・化学外傷、Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡）を対象に、培養自家口腔粘膜上皮シート移植を先進医療 B で実施した。先端医療振興財団の先端医療センター内細胞培養施設（CPC）で上皮シートを作成して京都府立医科大学に移送、平成 27 年 3 月末までに 6 例の移植手術を行った。全例において移植された口腔粘膜上皮は患者の眼表面に生着、術後経過は良好である。

A. 研究目的

先進医療制度による ICH—GCP 準拠臨床試験を実施し、培養自家口腔粘膜上皮シート移植の有効性と安全性を検討する。薬事申請に向けた準備を進める。

B. 研究方法

1) 難治性角結膜疾患の中でも最重症の 3 疾患（重症熱・化学外傷、Stevens-Johnson 症候群、眼類天疱瘡）を対象として、ICH—GCP 準拠臨床試験としてプロスペクティブに培養自家口腔粘膜上皮シート移植を実施する。

2) 口腔粘膜上皮シートの薬事開発を進めるために、シート製造に使用する原料の精査を行った。本品製造には、羊膜から調製する羊膜基質を使用するが、実施中の先進

医療 B では、先端財団は府立医大の羊膜バンクから羊膜を購入している。しかし、この羊膜バンクはもともと組織移植用の羊膜で、再生医療製品の原料として使用するのではなく、調製工程も GMP 非準拠のため、治験時には不適である。そこで、本品の治験準備のために、羊膜を病院（産婦人科）から直接入手して、羊膜基質の製造・品質管理を GMP 準拠で実施することを計画した。

3) 治験実施に向けて、民間企業との協議を進める。

C. 研究結果

1) 本研究の採択後、平成 26 年 9 月から平成 27 年 3 月までに、最重症の難治性角結膜上皮症 6 例に対して培養口腔粘膜上皮

シート移植を実施した（表）。内訳は、上皮修復目的が2例2眼、視力改善目的が2例2眼、癒着解除目的が2例2眼であり、疾患内訳は Stevens-Johnson 症候群5例、眼類天疱瘡1例である。京都府立医科大学において口腔粘膜採取と口腔粘膜上皮シート移植を実施した。

具体的には、京都府立医科大学眼科に通院する難治性角結膜上皮症の患者に対して、十分な説明のもとに文書同意を取得、症例検討会において適応を検討し、課題の抽出を行った。適応と判断された5症例についてデータセンター（先端医療振興財団の臨床研究情報センター）に登録した。同大学歯科で患者自身の口腔粘膜を採取、粘膜組織を京都から神戸へ搬送し、先端医療センター内細胞培養施設（CPC）において口腔粘膜上皮シートの製造・品質試験を実施した。出荷試験を手術前日あるいは前々日に実施し、手術当日に上皮シートを搬送し、手術を施行、モニタリングを行った。全例で移植された口腔粘膜上皮細胞は患者の眼表面に生着し、平成27年3月時点において経過は順調である。

2) 神戸市立医療センター中央市民病院（中央市民病院）と関西医科大学附属枚方病院（関西医大病院）の産婦人科と協議し、帝王切開時に廃棄する羊膜の採取・提供・入

手について合意した。両病院の倫理委員会に対する申請・審査後、中央市民病院倫理委員会の承認を受けた。関西医大病院については、現在、照会事項対応中である。

3) 検証的治験を実施するために、再生医療ベンチャー企業との協議を進めた。治験の具体的な方法・内容に関する詳細は未定であるが、先端医療センターCPCを製造施設とすることでほぼ合意に至った。なお、PMDA 薬事戦略相談については、羊膜入手等の予定が遅れたことから、今年度は実施に至らず、来年度から実施する予定である。

D. 考察

先端医療振興財団CPCにおいて口腔粘膜上皮シートを作成、5例で上皮シート移植を実施、経過良好である。薬事申請に向けて羊膜基質の製造・品質管理をGMP準拠で実施する。

E. 結論

今後さらに、実施計画書通りに経過観察及び治療を実施し、本治療法の有効性と安全性を評価する。PMDA 薬事戦略相談に必要なデータを蓄積する。

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

培養口腔粘膜上皮シートに関わる研究開発

担当責任者 郷 正博
先端医療振興財団 細胞療法研究開発センター グループリーダー

研究要旨 本研究の採択後、最重症の難治性角結膜上皮症 5 例の口腔粘膜組織を用いて、培養自家口腔粘膜上皮シート製造を実施した。府立医大歯科で被験者自身の口腔粘膜組織を採取、組織試料を京都から神戸へ搬送し、先端医療センターCPC において口腔粘膜上皮シートの製造・品質試験を実施した。出荷試験は、手術前日あるいは前々日に実施し、手術当日に製造施設から病院へ上皮シートを搬送した。並行して、製造・品質管理工程の改善を行った。さらに上皮シートの薬事開発を開始した。

A. 研究目的

培養自家口腔粘膜上皮シートの製造・品質管理工程を先端医療センターにおいて実施するために必要な整備・検討を行う。また、先進医療 B において移植に用いる培養自家口腔粘膜上皮シートを製造する過程の中で、課題の抽出を行い、今後の薬事開発に向けた製造・品質管理工程の改善・確立を目的とする。

B. 研究方法

患者の口腔粘膜組織から酵素処理により口腔粘膜上皮細胞を単離する過程は、本シート製造工程の中でも最も重要な過程のひとつである。本研究

においては、口腔粘膜処理に使用する酵素の性能評価を行うとともに、薬事開発にも対応可能な酵素の探索も行った。検討には、ウサギ口腔粘膜組織とヒト口腔粘膜組織を利用する。

先進医療 B 実施においては、被験者自身から口腔粘膜を採取、京都から神戸に組織を搬送して先端医療センターCPC で培養自家口腔粘膜上皮シートを製造する。また、上皮シートの品質・特性データを取得し、その過程において製造・品質管理工程の課題の抽出および、その解決に向けた研究を行う。

C. 研究結果

先進医療 B の実施に際しては、厚労

省ヒト幹審査委員会の指導により、口腔粘膜上皮細胞単離目的に動物由来成分フリーのトリプルセレクト (TrypLE Select) を使用することで承認を得ていたが、実際にはトリプルセレクトでは上皮細胞単離が困難であることがわかった。そこで、過去の先行臨床研究時に約100例の実績を有するブタ膵臓由来トリプシンへの変更申請を行い、承認を得た。ただし、今後の薬事申請を考慮し、代替品として、動物成分フリーでGMPグレードのリコンビナントブタトリプシン(組換え型ブタトリプシン)の検証実験を、親不知抜歯時に破棄される口腔粘膜上皮組織を利用して実施した。その結果、組換え型ブタトリプシンは、ブタ膵臓由来トリプシンよりも活性が強いが、ブタ膵臓由来トリプシンと同等の作用・効果が得られることを確認した。また、組換え型ブタトリプシンにより単離した口腔粘膜上皮細胞を羊膜基質上に播種し、13日間培養して上皮シート作製を試みた結果、3層以上に重層化された口腔粘膜上皮シートを作製できることを確認した。すなわち、本品の薬事開発に対応可能な酵素を同定することができた。

先進医療Bの実施に伴い、重症例の被験者由来細胞を用いて口腔粘膜上皮シートを製造し、そのデータを取得することができた。その結果、高齢か

つ重症の被験者の場合にも、細胞増幅は可能であり、移植可能な上皮シートを作製できることが確認できた。また、細胞増幅率(培養終了時の細胞数と培養開始時の比率)は、個人差が極めて大きいことも明らかになった。すなわち、シートにおける細胞層の重層化については、1~2層のシートから3~5層のシートまでの差異が認められた。また、羊膜基質の厚み等の品質が細胞増殖に与える影響が極めて大きいことも確認できた。

また、先進医療Bの実施過程において、健常者由来細胞を用いて設定してきたシートの工程内品質試験規格や出荷試験規格の問題点等が明らかになった。例えば、上皮シートの確認試験として実施している抗体染色について、染色方法の改善を行った。現在、上皮シートの確認試験としては、2種類のケラチンに対する抗体により、上皮細胞及び重層化上皮細胞層の表層を確認している。それに加えて、上皮シートのバリア機能を確認する目的で、タイトジャンクション蛋白質の確認を行っている。ただし、タイトジャンクション構成蛋白質(Occludin、ZO-1など)の染色結果は、固定方法や染色方法に強く依存することが知られていて、シグナル陽性部位のサイズが小さいこともあり、染色結果が不安定な状況が続いていた。そこで、抗

体の選択を含めて、固定方法（パラホルム固定、メタノール固定など）や染色方法の検討を行った結果、通常のパラホルム固定と界面活性剤処理を組み合わせるにより、安定した染色結果を得られるようになった。

さらに、口腔粘膜上皮シートの原料を精査した結果、現在使用している上皮シート用培地の主要な成分（基礎培地とサプリメント）のひとつであるDK-SFM(ライフテクノロジー社)が、薬事開発すなわち治験時には使用できない可能性があることが明らかになった。そのため、株細胞を用いて、現在の培地との比較検討を行うことにより、新規の代替基礎培地及びサプリメントを探索した。その過程において、培地の受入試験及び性能試験方法を検討した。

なお、先進医療Bにおいては、現在まで、口腔粘膜上皮細胞の回収数が十分でないことから、シートを2枚（移植用と品質試験用）しか作製できないことが多い。そのため、核型分析の実施に至っていない。安定性試験（培養終了後2日間）については、唯一回収したシート1例について、コロニー形成試験により上皮細胞の増殖能を調べた。その結果、コロニー形成率は約3.5%であり、健常者の試験における値

よりやや低いが、有意な差はなく、個人差の範囲内であった。今後、例数を増やすことで健常者の場合と比較した上皮シート安定性について評価する。また、今後余剰シートを回収する機会を利用して、上記試験を含む特性解析を実施する。なお、シートを3枚作製する機会が得られない場合においても、核型分析実施については検討することとする。

D. 考察

口腔粘膜上皮細胞の細胞増幅率は、羊膜基質の品質に強く影響されることが確認できた。すなわち、口腔粘膜上皮シートの品質を保証するためには、羊膜基質の品質管理が極めて重要であることが明らかになった。

E. 結論

先進医療Bにおいて、培養自家口腔粘膜上皮シートの製造と品質管理を先端医療センターにて実施した。その過程において、製造・品質管理工程の問題点を明らかにし、改善することができた。さらに、口腔粘膜上皮シートの製品化に向けて、本シートの薬事開発を開始し、治験への準備を進めた。

厚生労働科学研究委託費（医療技術実用化総合研究事業）

委託業務成果報告（業務項目）

本治療を広めるための基盤整備

担当責任者 今井浩二郎

同京都府立医科大学大学院医学研究科 医療フロンティア展開学 講師

研究要旨 本治療法の普及に欠かせない手術手技の教育のために、手術ビデオの品質を確認した。また術後管理として必須な事項の整理を行った。特定認定再生医療等委員会の設置に向けて取り組み、再生医療等安全性確保法へ対応できる体制を整えた。

A. 研究目的

本治療法の安全な普及を目的に、手術手技および術後管理の教育に向けた準備を進める。また、再生医療等安全性確保法に対応し本治療を実施できる体制を整備する。

B. 研究方法

今年度実施の4例および過去の先行臨床研究の約100例の手術ビデオの品質及び内容を確認し、教育に有用なビデオを選別する。

難治性角結膜疾患の術前・術後管理として、知っておくべき内容を検討する。

本技術は、第2種の再生医療等技術となり、特定認定再生医療等委員会での審議が必要であるため、整備する。

C. 研究結果

過去の先行臨床研究の手術ビデオはDVDに記録されており、手術時間は1-5時間であった。

術前、術後管理には角膜所見の適切な把握、重症度の判定、術後上皮の状態を理解すること、治療用ソフトコンタクトレンズを適切に管理することが必要である。

再生医療等安全性確保法に対応できることを目的に、特定認定再生医療等委員会の整備を進め、委員への委嘱と規定の策定を行っている。委員の選定は、本学のみならず他医療機関からの申請についても、適正な審査が可能となるよう配慮した。

D. 考察

教育用として、手術ビデオの編集と目的別のライブラリー化が必要である。術前・術後管理の標準化を図って

いく必要がある。

特定認定再生医療等委員会は、再生医療等技術の安全性を確保するための審議が必要であり、本学では医学倫理審査委員会等、審議の体制が整っている仕組みに則り整備することができた。委員には、再生医療の専門家である神戸大学の青井教授や医薬基盤研の古江先生を迎えることができ、質の高い審査を実施することが可能である。つ本治療法の普及にむけて、企業治験のみならず、医師主導治験も可能とする体制整備を行う予定であ

る。

E. 結論

約100例の手術ビデオのライブラリ一化を開始した。各手術ビデオの編集、術前・術後管理の標準化を行っていく。また、本学における再生医療等安全性確保法に対する体制整備を行った。

平成 26 年度 培養自家口腔粘膜上皮シート移植

臨床実施症例 サマリー

年齢	性別	病名	目的	再建部位	口腔粘膜採取日	手術日	QC評価	上皮シート評価(術日)
52	女性	SJS	上皮修復	角膜	2014年9月8日	2014年9月24日	不適合/不承認	25%以上 50%未満が脱落
37	男性	SJS	上皮修復	角膜	2014年10月6日	2014年10月21日	不適合/承認	細胞の脱落なし
65	女性	SJS	癒着解除	結膜嚢	2014年10月14日	2014年10月28日	適合/承認	細胞の脱落なし
26	女性	SJS	視力改善	角膜	2015年1月13日	2015年1月28日	適合/承認	細胞の脱落なし
83	女性	眼類天疱瘡	癒着解除	結膜嚢	2015年2月2日	2015年2月17日	不適合/承認	細胞の脱落なし
52	男性	SJS	視力改善	角膜	2015年3月2日	2015年3月18日	不適合/承認	細胞の脱落なし

SJS: スティーブンス・ジョンソン症候群

QC 評価=品質部門責任者の出荷可否判定/品質管理者の出荷判定
(不適合/承認は、すべて細胞数規格の不適合)

Ⅲ. 学会等発表実績

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Treatment of Ocular Surface Disorders: Stevens-Johnson Syndrome（口頭）	木下茂	World Ophthalmology Congress (WOC) 2014	2014.4.4	国内
Cultivated Oral Mucosal Epithelial Transplantation for Stevens-Johnson Syndrome（口頭）	木下茂	APGC-ISOHK 2014	2014.9.26	国外
Management of Stevens-Johnson syndrome（口頭）	外園千恵	AAPOS-JAPO-JASA Joint Meeting	2014.11.30	国内
Cultivated Oral Mucosa Epithelial Transplantation（口頭）	外園千恵	ACS The 4th Biennial Scientific Meeting	2014.12.11	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Cultivated oral mucosal epithelial transplantation for persistent epithelial defect in severe ocular surface diseases with acute inflammatory activity.	外園千恵	Acta Ophthalmol.	2014.6	国外

IV. 研究成果の刊行物・別刷