

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

総括研究報告書

「先天性巨大色素性母斑を母地とした悪性黒色腫に対する予防的低侵襲治療方法  
の開発」に関する研究

研究代表者 森本尚樹 関西医科大学形成外科講師

研究要旨

巨大色素母斑は巨大な母斑が存在し治療に難渋する疾患である。母斑が体表面積の数十%以上を占める症例では、移植する皮膚を採取できず治療が断念されることも多く、また母斑を母地とした悪性黒色腫の発生も8%にもあるとされる。悪性黒色腫の診断は、病変の大きさ、色調、形の変化からダーマスコプを用いて組織生検の必要性を判断し、組織検査で確定診断される。しかし、病変の一部切除は転移を誘発する可能性もありむやみには実施できない。そもそも母斑は黒色であり、悪性腫瘍の発生を早期に発見することは極めて困難である。母斑全層切除以外の方法、キュレティング（乳児期に行われる母斑上層の切除）やレーザー治療では母斑細胞は必ず残存するため、根治的治療とはならない。本研究では、母斑組織を廃棄せず、手術室内で切除した母斑組織内の細胞を完全に不活化し、得られた不活化組織そのものを用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発する。

組織内の細胞を除去する脱細胞化には、界面活性剤、高張食塩水などの方法があるが、代表者らの検討では、高張食塩水では母斑細胞の除去が困難、界面活性剤では細胞は除去可能だが、活性剤が残留し表皮細胞の生着が障害された。そこで本研究で用いる高圧処理に注目した。本研究で用いる高圧法は数千気圧以上の高圧を利用する物理的な脱細胞化方法である。分担者の藤里らにより当初は同種及び異種移植を目的に開発されたが、研究代表者らは平成23年より母斑組織の自家移植にも応用する研究を開始した。平成25年度までの研究で、皮膚の不活化に必要な加圧条件をある程度まで特定できた。また、この加圧処理を病院手術室で使用可能な小型加圧機器のプロトタイプを企業と共同で試作済みである。本研究ではまず、本治療法の非臨床POC取得を目的として、プロジェクトの総合的推進、臨床試験で実際に使用する高圧機器の作製、加圧が細胞活性に与える効果の検討、印加組織内細胞活性の長期評価、印加方法・機器に関する検討会の実施を行う。非臨床POCが得られれば、臨床試験実施に移行し、臨床試験準備、すなわち本技術の先進医療化に結びつくようにエンドポイントを定めた臨床試験プロトコルの作成し、IRBなどの承認を得て試験を実施する。

本研究の最終目標は本治療法の臨床試験を実施し有効性と安全性を確認することである。平成26年度は本治療法の臨床試験の実施に向けた、非臨床POC取得及び臨床試験準備として非臨床POCを踏まえた臨床試験プロトコルの作成を開始することが目標である。

分担研究者	所属施設名
楠本健司	関西医科大学形成外科教授
覚道奈津子	関西医科大学形成外科助教
山岡哲二	国立循環器病研究センター 研究所生体工学部部長
馬原淳	国立循環器病研究センター 研究所生体工学部研究員
藤里俊哉	大阪工業大学工学部 生命工学科教授
鈴木茂彦	京都大学大学院医学研究科 形成外科教授
清水章	京都大学医学部附属病院 臨床研究総合センター 開発企画部教授

## A. 研究目的

巨大色素母斑は巨大な母斑が存在し治療に難渋する疾患である。母斑が体表面積の数十%以上を占める症例では、移植する皮膚を採取できず治療が断念されることも多く、また母斑を母地とした悪性黒色腫の発生も8%にもあるとされる。悪性黒色腫の診断は、病変の大きさ、色調、形の変化からダーマスコプを用いて組織生検の必要性を判断し、組織検査で確定診断される。しかし、病変の一部切除は転移を誘発する可能性もありむやみには実施できない。そもそも母斑は黒色であり、悪性腫瘍の発生を早期に発見することは極めて困難である。母斑全層切除以外の方法、キュレティング（乳児期に行われる母斑上層の切除）やレーザー治療では母斑細胞は必ず残存するため、根治的治療とはならない。本研究では、母斑組織を廃棄せず、手術室内で切除した母斑組織内の細胞を完全に不活化し、得られた不活化組織そのものを用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発する。

組織内の細胞を除去する脱細胞化には、界面活性剤、高張食塩水などの方法があるが、代表者らの検討では、高張食塩水では母斑細胞の除去が困難、界面活性剤では細胞は除去可能だが、活性剤が残留し表皮細胞の生着が障害された。そこで本研究で用いる高圧処理に注目した。本研究で用いる

高圧法は数千気圧以上の高圧を利用する物理的な脱細胞化方法である。分担者の藤里らにより当初は同種及び異種移植を目的に開発されたが、研究代表者らは平成23年より母斑組織の自家移植にも応用する研究を開始した。平成25年度までの研究で、細胞の不活化に必要な加圧条件を特定している。また、この加圧処理を病院手術室で使用可能な小型加圧機器のプロトタイプを企業と共同で試作済みである。本研究ではまず、本治療法の実用化POC取得を目的として、プロジェクトの総合的推進、加圧が細胞活性に与える効果の検討、印加組織内細胞活性の長期評価、印加方法・機器に関する検討会の実施を行う。非臨床POCが得られれば、臨床試験実施に移行し、臨床試験準備、すなわち本技術の先進医療化に結びつくようにエンドポイントを定めた臨床試験プロトコルの作成し、IRBなどの承認を得て試験を実施する。

本研究の最終目標は本治療法の臨床試験を実施し有効性と安全性を確認することである。平成26年度は本治療法の臨床試験の実施に向けた、非臨床POC取得及び臨床試験準備として非臨床POCを踏まえた臨床試験プロトコルの作成を開始することが目標である。

## B. 研究方法

### 1. 非臨床POC取得

#### 1.1. プロジェクトの総合推進

本プロジェクトは関西医科大学を中心に、国立循環器病研究センター研究所、大阪工業大学、京都大学（医学研究科形成外科及び医学部附属病院臨床研究総合センター）の4機関の共同研究である。それぞれの施設で役割分担を行いながら目的を共有し、本技術の臨床試験実施を目標とする。

#### 1.2. 印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

手術で切除されたヒト母斑組織を用いて検討を行う。不活化の確認は、細胞活性アッセイ（WST8アッセイ）、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）で行う。（母斑検体数3以上を目標）。0,100,200,500,1000 MPaで印加した母斑組織を免疫不全マウス（ヌードマウス）に埋入し、半年後に組織を摘出、母斑細胞の残存、増殖がないことを免疫染色で確認する。また、悪性腫瘍株細胞をヌードマウスに移植し皮膚癌モデルを作成し、この組織を採取、印加することで細胞が不活化されることも確認する。

### 1.3. 印加ブタ皮膚の生着確認、印加ヒト皮膚・母斑皮膚への培養表皮の生着確認

ブタ正常皮膚(腹部より採取)を採取し、母斑組織の不活化確認と同様に0,100,200,500,1000MPaで印加し、WST8アッセイ、組織培養を行い、不活化を確認する。この後ブタ正常皮膚(腹部より採取)を1辺1~1.5cmの正方形とし、印加する(0,100,200,500,1000MPa)。これをブタ背部に作成した皮膚欠損創(筋膜上)に自家移植する。移植4週後に生着を確認する。

また、ヒト正常皮膚、母斑組織を印加する(0,100,200,500,1000MPa)。印加皮膚の上にJTEC社が臨床使用条件と同じ方法作製、提供する培養表皮を移植する。In vitroで1週間程度培養、また免疫不全マウス(ヌードマウス)に埋入し、2~4週後に不活化組織、培養表皮の生着を確認する。

### 1.4. 印加方法・機器に関する検討会の実施

研究代表者(関西医科大学)を中心に、国立循環器病研究センター研究所、大阪工業大学、京都大学(医学研究科形成外科及び医学部附属病院臨床研究総合センター)。それぞれの施設で役割分担を行い進捗に関する検討会を実施した。本研究で得られた非臨床POCに基づいて臨床試験で使用する臨床用小型加圧装置の開発を製造企業(北岡鉄工株式会社)と共に行った。

## 2. 臨床試験準備(プロトコル作成)

京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターの支援を受けて臨床試験プロトコルの作成を開始する。この際、厚生労働省・先進医療に係る相談を実施し、本研究の出口である本技術の先進医療化に結びつくようにエンドポイントを定め、プロトコルを作成する。

### (倫理面への配慮)

本研究ではヒト正常皮膚検体、ヒト母斑検体を用いた検討を行う。このため、ヒト検体の採取および動物への移植実験、細胞培養実験については、関西医科大学、京都大学の倫理委員会でのヒト検体採取についての承認、関西医科大学、京都大学、国立循環器病研究センター、大阪工業大学でヒト検体を用いた研究計画(動物実験計画を含む)の承認を各施設で得て研究を実施した。

## C. 研究結果

### 1. 非臨床POC取得

#### 1.1. プロジェクトの総合推進

1.2、1.3に述べるように臨床試験に必要な非臨床POCは各施設の共同研究によってほぼ得られた。

### 1.2. 印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

手術で切除されたヒト母斑組織(4検体)を用いて検討を行った。0,100,200,500,1000MPaで10分間印加し、印加後の母斑組織のWST8アッセイ、組織よりの細胞増殖の有無(explant培養)を確認した。この結果、培養細胞の結果と同様に200MPa以上で母斑組織は不活化されていることを確認した。次に、印加した母斑組織をヌードマウスに埋入し、6ヶ月後に組織を摘出した。ヒト細胞の残存を確認するため、抗ヒトビメンチン抗体を用いて免疫染色を行った。この染色で200MPa以上の印加でヒト細胞の残存がないこと、すなわち印加直後に不活化された母斑組織から細胞が再度増殖はしないことを確認した。

### 1.3. 印加ブタ皮膚の生着確認、印加ヒト皮膚・母斑皮膚への培養表皮の生着確認

ブタ正常皮膚(腹部より採取)を採取し、母斑組織の不活化確認と同様に0,100,200,500,1000MPaで印加し、WST8アッセイ、組織培養を行い、ヒト母斑組織と同様に200MPa以上の印加で不活化することを確認した。ブタ正常皮膚(腹部より採取)を1辺1.5cmの正方形とし、0,100,150,200,500,1000MPa)で10分間印加したこれをブタ背部筋膜上に自家移植し、移植1,4週後に組織を採取した。肉眼的にすべての印加組織は生着した。組織学的に検討した結果、150MPaまでの印加では表皮が残存したが、200MPa以上では表皮は存在しなかった。これらより200MPa以上ではブタ皮膚組織内の細胞は死滅していること、しかしながら、生体に再移植すると生着することが確認できた。ヒト正常皮膚、母斑組織を印加し(0,100,200,500,1000MPa)、印加皮膚の上にJTEC社が臨床使用条件と同じ方法作製、提供する培養表皮を移植し生着するかどうかの検討も行っており、ある程度の印加条件で生着するという予備的な結果を得ており、組織評価など詳細について検討中である。

### 1.4. 印加方法・機器に関する検討会の実施

本研究で得られた非臨床POC試験の結果、に基づいて臨床試験で使用する臨床用小型加圧装置の開発を製造企業(北岡鉄工株式会社)と共に行った。臨床試験で行う印加条件として200MPa、10分間が必要であることが非臨床試験で確定したため、印加工程の記録・保存、油圧を用いた印加が手術

室内で可能な臨床用小型装置を作製できた。

## 2. 臨床試験準備 (プロトコル作成)

京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターの支援を受けて臨床試験プロトコルの作成を開始した。近畿厚生局に本治療法について問い合わせ、高圧処置自体は再生医療等に該当しないことを確認した。3月中旬現在、プロトコル骨子は完成し、各種手順書の作成を行っており、平成27年4月の関西医科大学IRB申請を予定している。

## D. 考察

高圧処理による皮膚の不活化及び生着についてはいままで詳細な検討がされていなかった。ヒト正常皮膚、母斑組織、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を印加すると、200MPaで不活化する、すなわち皮膚に含まれる細胞が死滅することを確認した。また、細胞が死滅しても再度生体に移植可能であることはブタ皮膚で確認でき、培養表皮と組み合わせる方法も検討中であるが、ブタ皮膚と同様に生着するという結果を現段階で得ている。これらに基づいて臨床試験プロトコルの作成も開始しており、平成27年度の臨床試験開始を目標としている。

これまでの検討によって、200MPaの印加によって皮膚組織の不活化することが証明されたが、培養母斑細胞、悪性腫瘍細胞(細胞株細胞:悪性黒色腫、扁平上皮癌など)で必要な圧力が異なるのかどうかについては検討できていない。これらの検討は平成27年度に実施する予定である。印加による悪性腫瘍細胞の不活化も確認できれば、将来の皮膚悪性腫瘍に対する高圧処理の治療法の開発にもつながると考えている。

## E. 結論

200MPa、10分間の高圧処理(印加)によって、ヒト皮膚、ヒト母斑組織、ブタ皮膚の不活化されることが確認された。また、印加皮膚を再度移植すると生着することも確認できた。臨床試験に使用する小型加圧機器も試作できており、平成27年度の臨床試験開始を目標に本研究を行っていく予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Mahara A, Morimoto N, Sakuma T, Fujisato T, Yamaoka T., Complete cell killing by applying high hydrost

atic pressure for acellular vascular graft preparation. Biomed Res Int. 2014;379607

- 2) Morimoto N, Mahara A, Shima K, Jinn o C, Kakudo K, Kusumoto K, Fujisato T, Suzuki S, Yamaoka T., The rapid inactivation of porcine skin by applying high hydrostatic pressure without damaging the extracellular matrix. Biomed Res Int. in press
2. 学会発表
  - 1) Atsushi Mahara, Naoki Morimoto, Toshiya Fujisato, Tetsuji Yamaoka, Complete Cell Killing by Applying high hydrostatic pressure for Extracellular Matrix Preparation, TERMIS-AM Annual Conference & Exposition 2014, 2014/12/5, Washington, D.C., US
  - 2) Jinno C, Morimoto N, Sakamoto M, O gino S, Mahara A, Fujisato T, Yamaoka T, Shigehiko S. Preparation of inactivated dermis from melanocytic nevi using high-hydrostatic pressure. TERMIS-AM Annual Conference & Exposition 2014, 2014/12/5, Washington, D.C., US
  - 3) 森本尚樹, 馬原淳, 神野千鶴, 小川真実, 覚道奈津子, 楠本健司, 鈴木茂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二. 超高圧法による皮膚の不活化方法の検討及び今後の治療戦略. 第53回日本人工臓器学会大会, 2014/10/18, 札幌
  - 4) 神野千鶴, 森本尚樹, 坂本道治, 荻野秀一, 馬原淳, 藤里俊哉, 山岡哲二, 鈴木茂彦. 高圧を用いた母斑組織の不活化方法の検討. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会, 2014/10/9, 松本
  - 5) 森本尚樹, 馬原淳, 神野千鶴, 覚道奈津子, 楠本健司, 鈴木茂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二. 高圧を用いた皮膚の不活化の検討及び今後の臨床応用. 第23回日本形成外科学会基礎学術集会, 2014/10/9, 松本
  - 6) 馬原淳, 森本尚樹, 神野千鶴, 鈴木茂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二. 高圧処理による皮膚腫瘍治療を目指した細胞死滅メカニズムの検討. 第14回日本再生医療学会総会, 2015/3/21, パシフィコ横浜(神奈川)
  - 7) 神野千鶴, 森本尚樹, 馬原淳, 坂本道治, 荻野秀一, 鈴木茂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二. 高圧処理による母斑組織の不活化条件の検討. 第14回日本再生医療学会総会, 2015/3/21, パシフィコ

- 横浜（神奈川県）
- 8) 森本尚樹, 馬原淳, 神野千鶴, 小川真実、  
覚道奈津子, 楠本健司, 鈴木茂彦, 藤里  
俊哉, 山岡哲二. 高圧を用いた皮膚の  
不活化および移植方法の検討. 第14回  
日本再生医療学会総会, 2015/3/21、パ  
シフィコ横浜（神奈川県）

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況**

##### **1. 特許申請**

「移植用皮膚組織片の作製方法」  
(出願番号2014-201855、出願日2014/9/30)