

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

「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

平成26年度総括・分担研究報告書

研究代表者 森本尚樹

(関西医科大学)

平成 27 年 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、学校法人関西医科大学 関西医科大学が実施した平成26年度「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」の成果を取りまとめたものです。

目次

．総括研究報告書 p.1

．分担研究報告書

1. プロジェクトの総合推進..... p.9

森本尚樹、楠本健司、山岡哲二、鈴木茂彦、藤里俊哉

2 . 印加による母斑組織内の細胞の不活化確認..... p.11

馬原淳、覚道奈津子

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..... p.14

鈴木茂彦

4. 印加方法・機器に関する検討会の実施..... p.17

山岡哲二

5 . 臨床試験準備（プロトコル作成） p.19

森本尚樹、清水章

．研究成果の刊行に関する一覧表 p.23

. 研究総括報告書

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的推進

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, Jinnō 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, Oginō 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)

.分担研究報告

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）
分担研究報告

プロジェクトの総合推進

研究代表者 関西医科大学 形成外科講師 森本尚樹
研究分担者 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部部長 山岡哲二
研究分担者 関西医科大学 形成外科教授 楠本健司
研究分担者 京都大学医学研究科 形成外科教授 鈴木茂彦
研究分担者 大阪工業大学工学部生命工学科教授 藤里俊哉

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。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ている。本研究は高圧法を用いた母斑治療の臨床試験実施、先進医療申請から加圧機器の医療機器としての開発を目標としている。本プロジェクトは機器の開発、高圧処理の基礎を開発した2工学部（国立循環器病研究センター研究所、大阪工業大学）、2医学部（関西医科大学、京都大学）および臨床試験支援部門（京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター）の実質5施設での共同プロジェクトである。このため、非臨床試験、機器開発、臨床試験準備、規制当局との交渉などのプロジェクト実施上での課題に対して研究代表者（森本）及び分担者（山岡）が中心となり、研究に関する検討会（班会議）を実施し、課題の克服を行った。この結果、試験実施に必要な非臨床POCはほぼ得られており、当初計画よりも早期に臨床試験プロトコルの作成も開始できている。

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。今年度の成果を受け、平成27年度は本治療法の臨床試験の開始を目標とする。

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。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ことを目的としている。

本プロジェクトは機器の開発、高圧処理の基礎を開発した2工学部（国立循環器病研究センター研究所、大阪工業大学）、2医学部（関西医科大学、京都大学）および臨床

試験支援部門（京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター）の実質5施設での共同プロジェクトであり、研究を推進するためには、各施設での目的共有が必須となる。

B．研究方法

1. プロジェクトの総合推進

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。

本プロジェクトでは、関西医科大学が臨床サイドの中心、国立循環器病研究センター研究所が基礎サイドの中心として研究を実施した。関西医科大学、京都大学の手術症例からヒト皮膚およびヒト母斑組織を研究に提供し、高圧印加処理は国立循環器病センター研究所に設置した超高压処理機器を用いて実施した。大型動物実験（ブタ）は国立循環器病研究センター研究所で行い、小型動物実験（マウス）は京都大学で実施した。大阪工業大学では主として組織解析を行った。臨床試験実施に向けては、関西医科大学と京都大学医学部附属病院臨床研究総合センターを中心に実施した。

（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

1.1. プロジェクトの総合推進

検討会（班会議）は1ヶ月に1回程度実施した。非臨床POCはほぼ得られ、臨床用機器の作製も終了し、臨床試験プロトコルの作成も開始した。参加5施設の共同研究が順調に進行している。

D．考察

非臨床試験、臨床試験準備と順調に進捗している。平成27年度以降も臨床試験実施、皮膚腫瘍細胞を用いた非臨床試験実施と共同研究を実施し研究を推進する予定である。さ

E．結論

参加5施設の共同研究は順調に進行した。平成27年度は、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. 総括研究報告書に記載
2. 学会発表
1. 総括研究報告書に記載

H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請
1. 総括研究報告書に記載

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）
分担研究報告

印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

研究分担者 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部部長 馬原淳

研究分担者 関西医科大学 形成外科助教 覚道奈津子

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。

本研究では、加圧処理（0,100,200,500,1000MPa）によってヒト母斑組織の不活化が可能であるか、手術で切除されたヒト母斑組織を用いて検討を行った。不活化の確認は、細胞ミトコンドリア活性アッセイ（WST-8アッセイ）、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）で行った。また、印加した母斑組織をヌードマウス皮下に埋入し、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した。これらの結果、200MPa、10分間の加圧処理によって、母斑組織内の細胞が不活化され、ヌードマウスに移植しても不活化された細胞が増殖しないことが確認できた。

A . 研究目的

本プロジェクトでは、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ことを目的としている。

本研究ではまずヒト母斑組織が、培養細胞を不活化する印加条件、すなわち200MPa、10分間の高圧処理で不活化できることを確認することを目的とした。

B . 研究方法

1. 印加による母斑組織内の細胞の不活化確認

京都大学医学部附属病院形成外科手術で切除されたヒト母斑組織（4症例よりの検体）を用いて検討を行った。

生検トレパンを用いて直径8ミリの円形的全層母斑組織を準備した。0,100,200,500,1000MPa、10分間印加した。不活化の確認

は、細胞のミトコンドリア活性（WST-8アッセイ）、組織よりの細胞増殖の有無（explant培養）で行った。また、1辺15mmの正方形の母斑組織を準備、0,100,200,500,1000MPaで印加した後にヌードマウス背部皮下に埋入、半年後に組織を摘出、母斑細胞の残存、増殖がないことを抗ヒトビメンチン抗体免疫染色で確認する。

（倫理面への配慮）

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

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。0,100,200,500,1000 MPa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以上で細胞の生死を示す母斑組織のWST-8活性がなくなる、すなわち不活化していることを核にした（図1）。また、200MPa以上で印加した組織からは線維芽細胞が遊走せず、母斑組織内の細胞が深部まで不活化されていることを確認した。

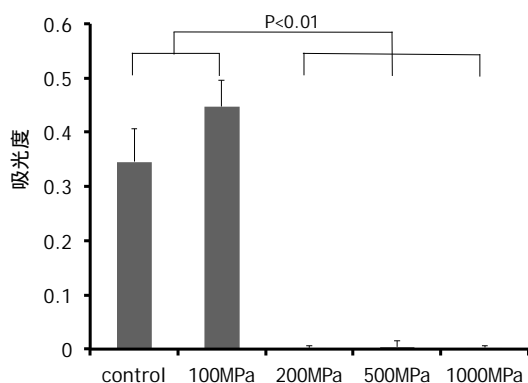


図1. 印加圧力と組織活性（吸光度）

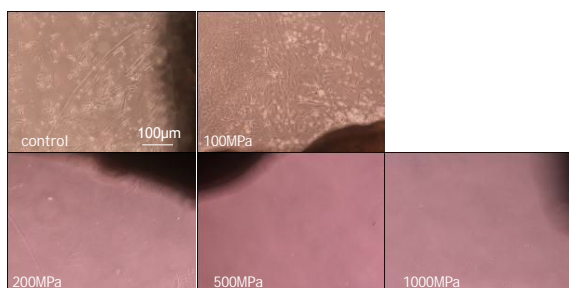


図2. 各印加後組織での遊走細胞を示す。200MPa以上では細胞は観察されなかった。

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（図3）。

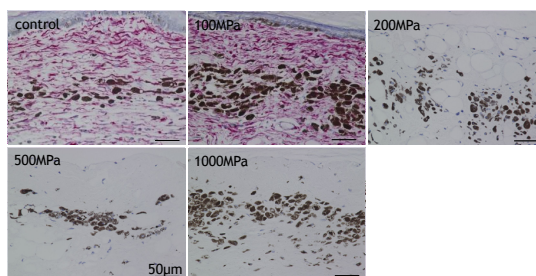


図3. 埋入6ヶ月後の組織（抗ヒトビメンチン免疫染色）

D. 考察

印加処理と細胞死滅に関して、ヒト臍帯静脈内皮細胞、3T3細胞、ヒト大動脈平滑筋細胞を印加すると、200MPa以上でのWST8活性（ミトコンドリア活性）が無くなり死滅すること、生細胞と死細胞を染め分けるlive and dead染色でも200MPa以上で細胞の死滅することを報告している（Mahara A, Morimoto N, Sakuma T, Fujisato T, Yamaoka T., Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation. Biomed Res Int. 2014）。本研究で、培養細胞と同様に母斑組織内の細胞も200MPa以上で死滅することが確認され、高圧処理が組織の深部まで不活化可能な有効な組織の不活化方法であることが示された。今後、印加により不活化された母斑組織に培養表皮を生着させ皮膚全層を再生させることができるかの検討を行う。また、悪性腫瘍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検討する予定である。

E. 結論

200MPa以上、10分間の印加で、母斑組織内の細胞が死滅することが確認された。高圧処理が組織の深部まで、短時間で不活化可能な有効な組織の不活化方法であることが示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 1. 総括研究報告書に記載

- 2. 学会発表
 - 1. 総括研究報告書に記載

- 1. 総括研究報告書に記載

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1. 特許申請

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）

分担研究報告

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

研究分担者 京都大学大学院医学研究科 形成外科 教授 鈴木茂彦

研究協力者 京都大学医学研究科 形成外科 大学院生 神野千鶴

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。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、得られた自家不活化母斑組織そのものを用いて患者の真皮再生を行い、表皮の再生は患者の自家培養表皮を用いて皮膚再生を行う新規治療法を開発することを目的としている。本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討、及び不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するか検討し、200MPa以上で印加した不活化ブタ皮膚が印加していない皮膚と同様に生着することを確認した。ヒト正常皮膚を不活化し、この不活化皮膚組織上にヒト培養表皮を移植しても200MPaで印加した組織には培養表皮が生着した。

A. 研究目的

本研究は平成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、細胞および皮膚の不活化に必要な加圧条件をある程度まで特定し、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開発している。本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討を行う。次に、不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するかどうか検討し、本研究で開発する治療法が実施可能であるか、大型動物モデルとして検討する。次に、ヒト正常皮膚、ヒト母斑皮膚を不活化し、この不活化組織上にヒト培養表皮が生着するかどうか検討する。これは実際に行う治療に準じた移植方法であり、臨床試験実施前には非必要な非臨床試験である。

B. 研究方法

ブタ正常皮膚(Göttingenミニブタ)を腹部より採取し、母斑組織の不活化確認と同様

に0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した後、WST8アッセイ、組織培養を行い、不活化を確認する。次に、1辺1.5cmの正方形のブタ皮膚を準備し、0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した。印加後、ブタ背部に筋膜上に自家移植し、移植4週後に生着を確認した。

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。免疫不全マウス(ヌードマウス)背部皮下に埋入し、2週後に不活化組織、培養表皮の生着を確認する。

(倫理面への配慮)

ヒト正常皮膚検体、ヒト母斑検体を用いた検討を行うため、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。ブタを用いた実験については国立循環器病研究センター研究書で実験計画の承認後実施した。

C. 研究結果

ミニブタ正常皮膚(Göttingenミニブタ)に0 (control), 100, 200, 500, 1000MPaで印加した。WST8アッセイの結果、200MPa以上で皮膚は不活化されていた(図1)。

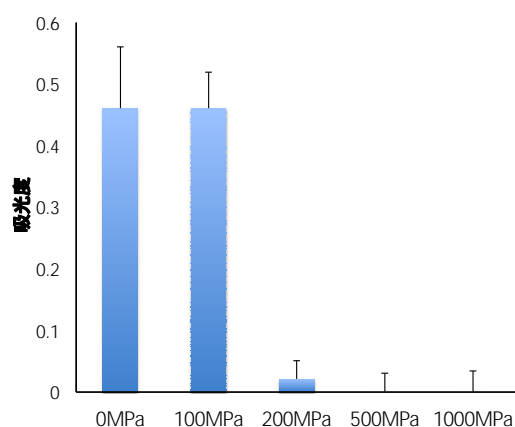


図1. 印加圧力と組織 WST-8 活性 (吸光度)

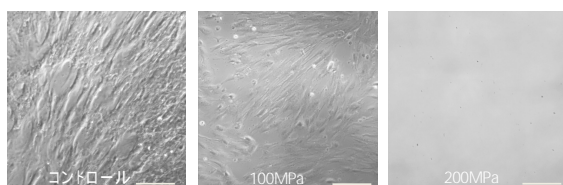


図2. 遊走細胞を示す。200MPa 以上では遊走細胞は観察されなかった(bar=50 μm)

また、母斑での検討と同様に200MPa以上で遊走細胞は観察されなかった(図2)。これらの所見からブタ皮膚も200MPa以上の印加で不活化していると考えられた。

次に、1.5cmの正方形のブタ皮膚を印加後移植死4週後の肉眼写真を示すが、肉眼的にはすべての群で生着していた(図3)。

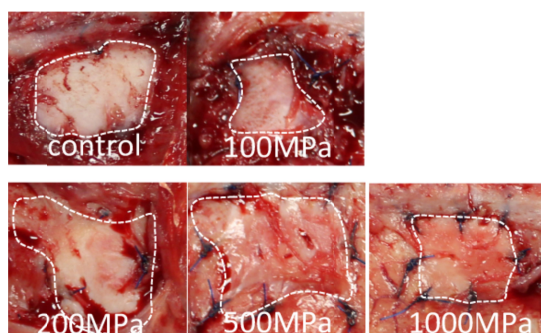


図3. 移植4週後の各群の印加皮膚

ヘマトシキリンエオジン切片では、コントロール、100MPaの不活化されていない移植片では表皮が存在していたが、200MPa以上では真皮組織は生着しているのが観察されたが、表皮は観察されなかった(図4)。

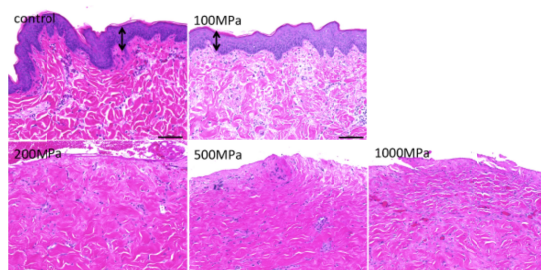


図4. 移植4週後の各群のHE組織切片

ヒト正常皮膚を200MPaで印加後、培養表皮を移植し、ヌードマウス背部皮下に埋入した組織の2週後のヘマトシキリンエオジン切片を図5に示す。200MPa処理では表皮は生着していた。他群についても検討を行っている。

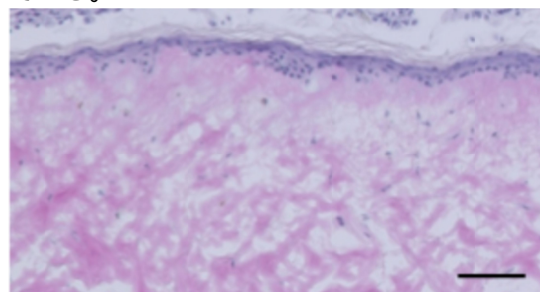


図5. 移植2週後の200MPa印加皮膚

物モデル（ミニブタ）で確認された。

D . 考察

本研究では、ヒト皮膚と類似した構造をもつブタ皮膚を用いて高圧処理による不活化条件の検討、及び不活化された皮膚も含めて生体に移植した場合に生着するか検討し、200MPa以上で印加した不活化ブタ皮膚が印加していない皮膚と同様に生着することを確認した。ヒト正常皮膚を不活化し、この不活化皮膚組織上にヒト培養表皮を移植しても200MPaで印加した組織には培養表皮が生着した。現在母斑組織への培養表皮移植実験も行っているが、これらの結果は本治療法が実際に臨床使用できる治療法であることを示していると考えられた。

E . 結論

高圧処理によって不活化された皮膚を生体に移植した場合、生着することが大型動

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表
.研究総括報告書に記載
2. 学会発表
.総括研究報告書に記載

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請
.総括研究報告書に記載

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）
分担研究報告

印加方法・機器に関する検討会の実施

研究分担者 国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部部長 山岡哲二

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。

本研究班で実施した非臨床試験の結果、200MPa、10分間の加圧処理（印加）で皮膚組織及び母斑組織内の細胞を不活化できることが証明された。この結果を受けて、臨床試験を行うためには、200MPa、10分間の高圧処理を手術室内で実施できる小型加圧機器の開発を行う必要があり、臨床用機器の開発を行った。既に手術室で使用可能な小型加圧機器のプロトタイプを作成していたが、更に改良し、臨床試験で使用できる処理過程の記録機能を付加した臨床用小型加圧機器を開発、作成した。本小型機器の性能確認も行き、臨床試験に使用する予定である。

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。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ことを目的としている。

本研究班では平成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し、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、加圧組織の不活

化に加えて組織生着可能な加圧条件を斑全体で解明する。このため、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、臨床試験に使用する小型機器を実際開発し、作成することを目的としている。

B．研究方法

1. プロジェクトの総合推進及び臨床用小型加圧装置の開発

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。

（倫理面への配慮）
機器の開発については特に必要なし。

図 2 小型加圧機器図面

D .
考察

C . 研究結果

非臨床POCについて、200MPa, 10分間加圧処置で皮膚組織が不活化され、また生体に再移植しても生着することを確認した。

本研究班では研究開始までに、図1に示す手動型小型加圧装置（プロトタイプ）を開発していた。



図 1. 既開発の手動型小型加圧装置

本装置を用いて、臨床試験の際の加圧処理が実施可能である。実際の臨床試験までに、処理の手順書を作成し、実際に手術室に搬入して処理に問題がないことを確認する予定である。

E . 結論

今年度の研究によって非臨床POCの取得、臨床試験での加圧(印加)条件が確定した。この加圧処理を実施可能な臨床用小型機器の作製が終了した。

F . 健康危険情報

該当なし

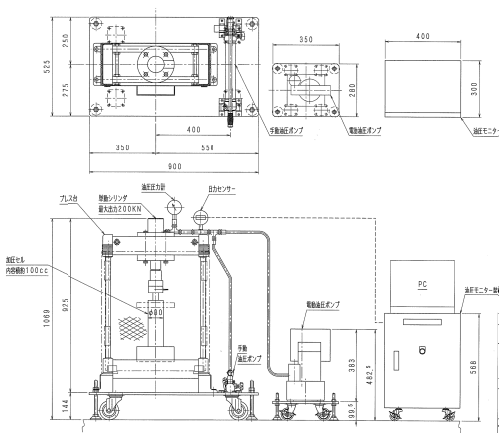
G . 研究発表

1. 論文発表
 1. 総括研究報告書に記載
2. 学会発表
 1. 総括研究報告書に記載

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請
 1. 総括研究報告書に記載

しかしながら、手動式であるため、加圧過程が一定でないこと、加圧処理の記録機能がないこと、という問題があった。本研究では、加圧を油圧ポンプで行い処理過程を一定化させること、加圧の記録機能を付加した小型加圧機器を開発（図2 小型加圧機器図面）した。実際に関西医科大学と京都大学に各1台ずつ設置（平成27年3月中に）できる予定である。



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）

分担研究報告

臨床試験準備（プロトコル作成）

研究代表者 関西医科大学 形成外科講師 森本尚樹

研究分担者 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 清水章

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。本研究班では母斑組織そのものを不活化して真皮再生に「再利用」し、表皮再生は自家培養表皮を行う新規治療法の開発を行っている。非臨床試験において、200MPa以上の印加でヒト皮膚、ブタ皮膚、ヒト母斑組織がいずれも不活化されることを証明し、これらの不活化皮膚が生体再移植しても生着することを示した。これらの非臨床試験の結果を受けて、臨床試験支援部門（京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター）の支援の元、実際の臨床試験のプロトコル作成を開始した。平成27年3月現在、プロトコル骨子は完成しており、4月の倫理申請を目標に準備を進めている。

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。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ことを目的としている。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.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）

臨床試験はfirst-in-human の臨床試験となる。また、自家培養表皮は再生医療製品であるため、本試験の実施には施設のIRB承認に加えて、特定認定再生医療等委員会での審査も必要となる。これらを踏まえたプロトコル作成及び臨床試験実施体制の構築が必要となる。

C．研究結果

1.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

臨床試験のプロトコル作成は順調に進行している。京都大学での特定認定再生医療等委員会の審査を受ける予定であるが、この委員会がまだ立ち上がっていない。委員会が立ち上がり次第申請できるように準備を行う予定である。

E . 結論

高圧処理を行う新規治療法の臨床試験プロトコル作成を開始した。

F . 健康危険情報

該当なし

G . 研究発表

1. 論文発表
 1. 総括研究報告書に記載
2. 学会発表
 1. 総括研究報告書に記載

H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許申請
 1. 総括研究報告書に記載

.研究成果の刊行に関する一覧表等

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
Complete Cell Killing by Applying high hydrostatic pressure for Extracellular Matrix Preparation. (ポスター)	Atsushi Mahara, Naoki Morimoto, Toshiya Fujisato, Tetsuji Yamaoka	TERMIS-AM Annual Conference & Exposition 2014	2014.12月	国外
Preparation of inactivated dermis from melanocytic nevi using high-hydrostatic pressure. (ポスター)	Jinno C, Morimoto N, Sakamoto M, Ogino S, Mahara A, Fujisato T, Yamaoka T, Shigehiko S	TERMIS-AM Annual Conference & Exposition 2014	2014.12月	国外
超高压法による皮膚の不活化方法の検討及び今後の治療戦略(口演)	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	第53回日本人工臓器学会大会	2014.10月	国内
高圧を用いた母斑組織の不活化方法の検討(口演)	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	第23回日本形成外科学会基礎学術集会	2014.10月	国内
高圧を用いた皮膚の不活化の検討及び今後の臨床応用(口演)	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	第23回日本形成外科学会基礎学術集会	2014.10月	国内
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(口演)	馬原淳, 森本尚樹, 神野千鶴, 鈴木茂彦, 藤里俊哉, 山岡哲二	第14回日本再生医療学会総会	2015.3月	国内
高圧処理による母斑組織の不活化条件の検討(口演)	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	第14回日本再生医療学会総会	2015.3月	国内
高圧を用いた皮膚の不活化および移植方法の検討(口演)	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	第14回日本再生医療学会総会	2015.3月	国内

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
Complete cell killing by applying high hydrostatic pressure for acellular vascular graft preparation.	Mahara A, Morimoto N, Sakuma T, Fujisato T, Yamaoka T.	Biomed Res Int.	2014.4月	国外
The rapid inactivation of porcine skin by applying high hydrostatic pressure without damaging the extracellular matrix.	Morimoto N, Mahara A, Shima K, Jinno C, Kakudo K, Kusumoto K, Fujisato T, Suzuki S, Yamaoka T	Biomed Res Int.	2015.3月	国外