

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
産学連携医療イノベーション創出プログラム 基本スキーム (ACT-M)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：臨床試験を目指す 3次元細胞培養システムを用いた革新的ヒト弾性軟骨デバイス創出
Innovative human elastic cartilage device creation using the three-dimensional cell culture system aiming at a clinical trial

研究開発実施期間：2016年10月4日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：津村 尚史

Takashi Tsumura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

株式会社ジェイテックコーポレーション 代表取締役社長

JTEC CORPORATION President

II 研究開発の概要

【背景と目的】

頭頸部の先天的形状不全や交通外傷による耳鼻等欠損の修復には自家肋軟骨の移植術が行われているが、過度な侵襲性や移植量の制限という問題があり、移植後においても長期形態維持性や移植組織量不足の問題があった。そこで低侵襲的かつ長期形態維持性に優れたヒト弾性軟骨再生治療の開発が待望されていた。なかで、横浜市立大学が世界で初めて発見したヒトの耳介軟骨膜に存在する軟骨前駆細胞からヒト弾性軟骨デバイスを再構築する培養技術とジェイテックコーポレーションが開発に成功した大型組織培養を可能にする3次元回転浮遊培養技術を用いて10mm大のヒト弾性軟骨デバイスの再構築に成功していた。

本委託事業では上記成果を基に耳鼻部の再生医療を実現するために必要となる30mm大のヒト弾性軟骨デバイスの培養プロトコルの開発と既に再構築に成功した10mm大のヒト弾性軟骨デバイスを用いて鼻咽腔閉鎖機能不全症を対象とした医師主導治験を実施するにあたっての品質規格項目の決定や非臨床安全性試験等の準備を目的として研究開発を行った。

【研究成果】

(1) 30mm大のヒト弾性軟骨デバイスの培養プロトコルの開発

30mm大のヒト弾性軟骨デバイスを達成するためにまず20mm大のデバイスの培養検討から着手した。その際に臨床応用的に優位となるように開発済みの従来プロトコルで使用していた足場（スキャフォールド）を用いずに平面培養皿内で複数層の弾性軟骨シートを形成する「積層化シート法」と3次元回転浮遊培養技術を組み合わせた新しいヒト弾性軟骨デバイスの培養プロトコルを見出し、その結果20mm大のヒト弾性軟骨デバイスの再構築に成功した。また、30mm大のヒト弾性軟骨デバイスの培養検討では、大型デバイスに対応した3次元回転培養装置ならびに培養容器の開発を進めたうえ、新しく見出した培養プロトコルにおける至適条件を探索し、その最適化した

培養条件によって 30mm 大のヒト弾性軟骨デバイスの再構築にも成功した。また本プロジェクトにおいて再構築したデバイスの特性評価として力学的特性を設定しており、その評価のためにひずみゲージを用いた新たなデバイス硬度評価系を確立した。再構築したデバイスの力学的特性はヒトプライマリー弾性軟骨組織よりも低硬度であり未成熟であることが示唆されたが、一方で組織学的解析を実施したところ弾性軟骨組織特有の軟骨小胞が確認できた。そこで、このヒト弾性軟骨デバイスの成熟を図るために NOD/Scid マウスの背部皮下に 4 週間埋植したところ移植前の力学的特性はほぼヒト耳介での弾性軟骨組織と概ね同じ程度の硬度になることが明らかになり、さらには免疫染色評価においてヒト耳介の弾性軟骨組織と同様に軟骨膜の形成が確認された。ところが、本プロトコルで培養したデバイスは成熟にともない移植前のサイズから収縮することが認められた。そこで移植部位に直接移植するのではなく 1 期移植としてあらかじめ収縮ならびに成熟目的で本デバイスを例えばヒト腹部皮下などの部位において 4 週間以上埋植し、そして 2 期移植として収縮ならびに成熟した後に移植部位に移植する「2 期移植法」や、さらに 1 期移植において収縮するデバイスサイズの問題を解決する複数デバイスを連結して埋植することで組織的に融合させる「連結移植法」の検討を実施した。その結果、「2 期移植法」の検討において本デバイスは埋植後 4 週間で収縮傾向が見られなくなり、移植前のサイズと比較して概ね 50%収縮することが明らかになった。これは安定的な特性を要求される再生医療等製品としては好ましい制御可能な収縮であることが示唆され、実際の移植では最終形態サイズの 2 倍量の移植で対応可能であると考えられる。また、「連結移植法」の検討において埋植後のデバイスを組織学的解析したところ組織学的に融合していることが明らかになり、「2 期移植法」と「連結移植法」によって将来的に移植組織量の問題を解決し、移植部位の大きさに合わせたデバイス製造の可能性を見出した。

(2) ヒト弾性軟骨デバイスによる鼻咽腔閉鎖機能不全症 (VPI) の臨床試験の準備

臨床試験の準備として独立行政法人医薬品医療機器総合機構 (PMDA) との RS 戦略相談において求められる科学的根拠となるヒト弾性軟骨デバイスの品質ならびに非臨床安全性のデータ蓄積のための各種試験や測定を本事業において推進した。

まずは、これら試験に供するためのヒト弾性軟骨デバイスを試験数だけ培養する必要があるが、本事業において同時に 12 個のデバイスが培養できる 3 次元回転浮遊培養装置ならびに培養容器の開発を実施した。VPI に必要なデバイスサイズは小児の咽頭後壁の移植部位領域の面積から 10mm 大のデバイスが必要であると考えたうえで、先に述べたように移植後に約 50%収縮することから今回培養するデバイスのサイズを 2 倍量の 20mm 大と設定しており、開発した培養装置と培養容器により 20mm 大のデバイスを同時に 12 個培養可能なことを示した。またこれら培養したデバイスが VPI 治療用の再生医療等製品として適合/不適合を判断するための品質規格項目ならびに規格値や規格範囲を臨床試験までに概ね決定させる必要があり、品質規格項目候補にあたるサイズや湿重量や力学的特性等の物理的データまたはデバイスが産生するタンパク質の培地中濃度等の生物学的データの蓄積を実施した。デバイスのサイズや湿重量は顔面修復用の移植デバイスとして重要な品質項目であると考えている。本プロジェクトで 12 個同時に培養した 20mm 大のデバイスにおいて、バラつきはあるものの $20 \pm 4\text{mm}$ 、 $600 \pm 100\text{mg}$ に収まっていることを確認した。

次に非臨床安全性については、横浜市立大学において動物移植に供するヒト弾性軟骨デバイスを培養したうえで免疫不全マウスの一つである NOD/Scid マウスを実験動物とし、投与経路をマウス背部皮下、埋植期間を 8 週間とする単回移植試験を実施し、その後デバイスを回収した。今回の試験では移植した NOD/Scid マウス全頭において死亡例等の有害事象は発生せず、また移植部位において目立った過増殖や腫瘍形成も見られず、一般毒性ならびに造腫瘍性について確認されなかった。またカニクイザルの耳介軟骨膜からカニクイザル弾性軟骨デバイスを培養し、同じカニクイザルの鼻梁、頬粘膜下、咽頭後壁粘膜下への単回移植試験を実施したが、死亡例等の有害事象は今回の試験においても発生しなかった。さらに最終的な科学的根拠を示すデータは GLP (Good Laboratory Practice) 基準に則った試験機関においてデータ取得することが求められるため、本プロジェクトでは非臨床安全性試験に関する PMDA との RS 戦略相談の事前面談を実施したうえで、GLP 施設を有する非臨床試験受託機関 (非臨床 CRO) での一般毒性試験を実施した。その結果移植による死亡例等の有害事象、投与経路での腫瘍、主要臓器での腫瘍形成は確認されなかった。この結果を基に改めて PMDA との RS 戦略相談の対面助言の申請ならびに相談資料の作成までを行った。

【今後の展開】

- 「2期移植法」による臨床試験に資する品質及び非臨床安全性の科学的データの取得を目指す。
- ヒト弾性軟骨デバイスの品質に関する PMDA との RS 戦略相談の対面助言での評価項目の妥当性の確認を実施、その後その評価項目に沿ったデータ取得の推進。
- 臨床治験届の作成。

【英文要約】

[Background and Purpose]

Autologous cartilage transplantation has been applied to repair defects such as congenital malformations and traffic injuries of the head and neck, but there are problems of excessive invasiveness and limitations on the amount of transplantation. And there are also problems of morphology maintenance and insufficient amount of transplanted tissue. Therefore, development of a human elastic cartilage regeneration treatment that is minimally invasive and excellent in long-term shape maintenance has been long-awaited. We have developed a large-scale tissue culture that has been successfully developed by JTEC CORPORATION, a culture technology that reconstructs a human elastic cartilage device from cartilage progenitor cells present in human auricular perichondrium, which was first discovered in the world by Yokohama City University. We succeeded in reconstructing a 10 mm-sized human elastic cartilage device using a three-dimensional rotating suspension culture technology. The purpose of this research, on the base of above results, is to develop a culture protocol for a 30mm-sized human elastic cartilage device, which is necessary for regenerative medicine of the ear and nose and to prepare for doctor-led clinical trial for velopharyngeal incompetency (VPI) using a 10mm-sized human elastic cartilage device that has already been successfully reconstructed.

[Research outcome]

(1) Development of culture protocol for 30mm-sized human elastic cartilage device

First, we started with the development of a culture protocol for a 20 mm-sized human elastic cartilage device, and found a new culture protocol of the device that does not use the scaffold used in the conventional culture method. In order to cultivate a 30mm-sized human elastic cartilage device, we developed a new culture device and a new culture vessel. After that, we optimized the conditions of the found new protocol and succeeded in culturing a 30mm-sized device. It was revealed that the 30 mm-sized device immediately after the culture was lower than the hardness of human elastic cartilage tissue, but the hardness of the device implanted subcutaneously on the back of NOD / Scid mice for 4 weeks was almost the same as that of human elastic cartilage tissue. Thus, maturation of cartilage after transplantation was observed. However, it was revealed that when implanted for 4 weeks, it contracted gradually after transplantation up to about 50%. In the future, we believe that the problems of insufficient hardness of cultured devices and the amount of transplanted tissue due to device contraction can be solved by maturing multiple devices in a human body different from the transplant site.

(2) Preparation for clinical trial of VPI using human elastic cartilage device

Various tests and measurements were promoted in this project for accumulating quality and non-clinical safety data for human elastic cartilage devices, which are the scientific basis for RS strategy consultations with the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) in preparation for clinical trials.

First of all, we showed that the 3D rotating suspension culture device we developed capable of culturing multiple devices for use in quality and non-clinical safety tests, and its culture container, so that 12 human elastic cartilage devices of 20mm size can be cultured simultaneously.

In addition, the quality evaluation item candidates determined in advance such as the size and wet weight of the cultured 20 mm-sized human elastic cartilage device were measured for each device.

These 20mm-sized human elastic cartilage devices were subjected to general toxicity tests at a

non-clinical testing contract organization that has a testing facility in compliance with GLP standards. As a result, no adverse events such as transplant death due to subcutaneous transplantation occurred, and no tumor formation was found in the body. After that, based on the results of this general toxicity study, a consultation document was prepared to provide face-to-face advice on RS strategy consultation with PMDA.

III 事後評価総合所見

目標とする耳鼻部等に適用可能な 30mm 大の弾性軟骨デバイス構築のための 3 次元培養装置、培養プロトコルの検討がなされ、おおむね目標が達成できたことは評価されました。

一方で、移植後の弾性軟骨の収縮や融合など再生医療特有の課題や発見があり、これら課題への検討を進め、実臨床で求められる製品につながるよう、今後の開発に期待します。また、上記課題の早期解決とともに、社会実装に向けた、より明確な戦略構築が望まれます。