

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Inactivation of human nevus tissue using high hydrostatic pressure for autologous skin reconstruction:a novel treatment for malignant melanoma arising in giant congenital nevi.
- 研究開発担当者 (日本語) 学校法人関西医科大学形成外科学講座 講師 森本尚樹
所属 役職 氏名： (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Kansai Medical University, Associate professor, Naoki MORIMOTO
- 実施期間： 平成 26 年 11 月 4 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人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
所属 役職 氏名： (英語) Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and
Cardiovascular Center Research Institute (NCVC),
Director, Tetsuji Yamaoka
- 研究開発分担者 (日本語) 独立行政法人国立循環器病研究センター研究所生体医工学部室長 馬原淳
所属 役職 氏名： (英語) Department of Biomedical Engineering, National Cerebral and
Cardiovascular Center Research Institute (NCVC),
Laboratory chief, Atsushi Mahara
- 研究開発分担者 (日本語) 学校法人常翔学園大阪工業大学 工学部生命工学科 教授 藤里俊哉
所属 役職 氏名： (英語) Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology,
Professor, Tishia FUJISATO

- 研究開発分担者 (日本語) 関西医科大学医学部形成外科学講座 講師 覚道奈津子
所属 役職 氏名: (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Kansai Medical University, Senior Lecturer, Natsuko KAKUDO
- 研究開発分担者 (日本語) 関西医科大学医学部形成外科学講座 教授 楠本健司
所属 役職 氏名: (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Kansai Medical University, Professor, Kenji KUSUMOTO
- 研究開発分担者 (日本語) 関西医科大学医学部形成外科学講座 研究員 尾川武史
所属 役職 氏名: (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Kansai Medical University, Research associate, Takeshi OGAWA
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院医学研究科形成外科 教授 鈴木茂彦
所属 役職 氏名: (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Graduate School of Medicine, Kyoto University,
Professor, Shigehiko SUZUKI
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 京都大学医学部附属病院臨床研究総合センター
教授 清水 章
所属 役職 氏名: (英語) Institute for Advancement of Clinical and Translational Science, Kyoto
University Hospital, Professor, Akira, SHIMIZU
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学大学院医学研究科形成外科 大学院 神野千鶴
所属 役職 氏名: (英語) Department of Plastic and Reconstructive Surgery,
Graduate School of Medicine, Kyoto University,
Ph.D student, Chizuru Jinno

II. 成果の概要 (総括研究報告)

山岡哲二部長 (国立循環器病研究センター研究所生体医工学部)、藤里俊哉教授 (大阪工業大学工学部生命工学科)、鈴木茂彦教授 (京都大学大学院医学研究科形成外科) らのグループとともに巨大色素性母斑患者に対する新規治療法の開発を行った。

先天性巨大色素性母斑では、広範囲に存在する体表面の母斑 (ほくろ) が整容上の問題となり、思春期までに母斑を母地として悪性黒色腫が発生するリスクが8%にもものぼるが、既存治療では母斑細胞の完全な切除はそもそも困難であり、再建する自家皮膚が不足して手術治療が行われずに、悪性黒色腫が発生し致死的となることがある。本研究では、母斑組織を高圧処理し母斑細胞を除去、切除した部位に再移植する、いわば「皮膚のリサイクル治療法」の開発を目標とする。本治療法では、切除した母斑組織を高圧処理 (200MPa≒2000 気圧) して母斑細胞を含めたすべての細胞を不活化した後に再度移植して自家真皮を再建し、表皮はヒト細胞使用医療機器である自家培養表皮 (ジ

エイズ™)を使用する。臨床研究開始に必要な非臨床 POC の検討を主に平成 26,27 年度に実施した。まず、200MPa 以上の加圧でブタ皮膚、ヒト皮膚及びヒト母斑組織の細胞活性が消失し、組織培養を行っても細胞が遊走しない、すなわちこれらの皮膚組織が不活化されることを証明した。また、1000MPa まで処理圧力を上げて真皮のコラーゲン・毛細血管構造及び表皮基底膜(タイプ IV コラーゲン)に変性がないこと、高圧処理ブタ自家移植皮膚が生着することを確認した。一方で、200~500MPa での高圧処理した後には、ヒト皮膚・母斑にはヒト培養表皮が生着するが、1000MPa 処置後には培養表皮が生着しないことを確認した。母斑細胞の再発については、200MPa 加圧処置後ヌードマウスに移植した母斑組織に移植後 1 年の時点でヒト細胞の残存が無いことを免疫染色で確認している。これらの検討は据え付け式の高圧処理装置で行ったが、本治療では高圧処理は病院手術室内で実施する必要があるため、可搬式の高圧処置装置を企業と共同で開発し、この機器を用いてもヒト母斑組織の不活化が可能であることも確認した。将来的な悪性腫瘍治療への展開に必要な非臨床 POC も実施しており、ヒト株化悪性黒色腫細胞を用いた検討を行ない、細胞が 200MPa で不活化されること、ヌードマウスに細胞を移植し悪性黒色腫を作成し、この腫瘍組織を 200MPa で加圧処理すると不活化され、再度ヌードマウスに移植しても腫瘍が再発しないことを確認した。これらの非臨床 POC の結果を得て平成 26 年度末から本治療法の First-in-human 試験となる臨床研究実施計画書の作成を開始した。基本デザインは単群試験とし、適格基準は・単純切除できない色素性母斑患者(体表面積の 0.25%以上)・年齢 7 ヶ月以上で全身麻酔もしくは局所麻酔下で手術可能な患者、を対象とする。試験の方法は、母斑組織を切除、高圧処理によって不活化後再移植、4 週間後に自家培養表皮を移植し皮膚全層の再生を行う。主要エンドポイントとして、培養表皮移植後 8 週間後の生着を評価し、副次エンドポイントとして有害事象の発生を観察する。母斑のメラニン色素が残存するため、移植後 1 年までの長期経過観察および色素除去に対するレーザー治療も行い、1 年後の移植組織の生着(瘢痕化および拘縮の有無)および母斑の再発を観察、評価する。目標症例数は 10 部位(1 患者で 2 回実施可能とするので患者数は 5 から 10 症例)である。関西医科大学医学倫理委員会承認は平成 27 年 8 月、京都大学特定認定再生医療等委員会の審査を書類審査終了が 10 月、補償保険契約など諸手続を行い、平成 28 年 2 月の症例登録開始を開始した。平成 29 年 3 月現在で 6 例目の試験を実施しており、平成 29 年 8 月の症例登録完了を目標としている。本治療法について、先進医療に係る事前相談及び PMDA 薬事戦略相談も実施済みであり、本研究終了後は先進医療申請を行い、その後開発企業の協力を得て医療機器としての承認・保険収載を目指す予定である。

英文

Congenital melanocytic nevi are light brown to black patches or plaques that appear at birth. Giant congenital melanocytic nevi (GCMN) are usually larger in diameter and GCMN have been defined as nevi of more than 20cm in diameter. GCMN are associated with a risk of malignant transformation, which usually results in malignant melanoma. The incidence of melanoma among GCMN patients has been reported to be from several percent to 8% or more. Surgical excision of all nevi in early childhood is usually recommended, although it is usually difficult to excise the nevus tissue completely because of the lack of autologous skin to cover the skin defects. To overcome this problem, we intended to prepare decellularized dermis from nevus tissue. To prepare transplantable autologous dermis from nevus tissue, only the cell inactivation process is indispensable because the residual autologous cellular components do not possess any

immunogenicity. Therefore, we focused our attention on the inactivation technique using high hydrostatic pressure (HHP) technology.

In 2014 and 2015, we have shown that HHP at 200MPa for 10 min was sufficient to induce the complete killing of mammalian cells and the complete inactivation of skin and nevus without damaging the ECM. We also reported that the human-cultured epidermis took and survived on the pressurized skin and nevus after pressurization at 200 MPa and 500MPa. Skin consists of the epidermis, which acts as a barrier against infection and water loss, and the dermis, which supports and supplies nutrition to the epidermis. We also confirmed that HHP at 200MPa could inactivate the malignant melanoma prepared using athymic mice. Therefore, we started to prepare the protocol of the clinical trial of our treatment in 2015. We designed an exploratory clinical study to investigate the safety and efficacy of a novel treatment combining autologous nevus tissue inactivated by HHP and a cultured epidermal autograft (CEA). This trial is the first-in-man clinical trial to reuse and apply autologous nevus inactivated by HHP to reconstruct autologous dermis after the removal of the nevus itself without discarding the nevus tissue. Patients 7 months of age and older who are able to undergo surgery under general or local anesthesia and can give informed consent are included. Patients must have a congenital melanocytic nevi that is not expected to be closed by primary closure with a target pigmented nevus area of 0.25% or more of the total body surface area. The primary endpoint is engraftment of the CEA at 8 weeks after its transplantation. The CEA is considered to be engrafted when the engraftment area of the inactivated nevus is 60% or more of the pretransplantation nevus area and 80% or more of the transplanted inactivated nevus is epithelialized. The event name, grade, and outcome of adverse events and adverse reactions will be assessed according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events version 4.0. Adverse events and adverse reactions occurring from the day of the transplantation of the inactivated nevus until the end of follow-up will be assessed. The target number of grafted sites of the inactivated nevus is 10 sites. We started this trial in February of 2016 and this trial is still on going in March of 2017. Our objective is to get the approval of our treatment by public healthcare insurance in Japan, and we are going to apply our treatment to the advanced medical 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 1 件、国際誌 3 件)

1. Morimoto N, Jinno C, Sakamoto M, Kakudo N, Yamaoka T, Kusumoto K. An Exploratory Clinical Trial of a Novel Treatment for Giant Congenital Melanocytic Nevi Combining Inactivated Autologous Nevus Tissue by High Hydrostatic Pressure and a Cultured Epidermal Autograft: Study Protocol. JMIR Res Protoc. 2016,5(3),e162.
2. Morimoto N, Jinno C, Mahara A, Sakamoto M, Kakudo N, Inoie M, Fujisato T, Suzuki S, Kusumoto K, Yamaoka T. The Alteration of the Epidermal Basement Membrane Complex of

Human Nevus Tissue and Keratinocyte Attachment after High Hydrostatic Pressurization. Biomed Res Int. 2016;2016:1320909.

3. Morimoto N, Mahara A, Jinno C, Ogawa M, Kakudo N, Suzuki S, Fujisato T, Kusumoto K, Yamaoka T. The superiority of the autografts inactivated by high hydrostatic pressure to decellularized allografts in a porcine model. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2016 Oct 27

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 高圧処理による母斑組織の不活化および再移植：巨大色素性母斑の新規治療、口頭、神野千鶴 第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会、2016/4/13、国内
2. 高圧処理母斑皮膚と自家培養表皮を用いた色素性母斑に対する新規皮膚再生治療、ポスター、森本尚樹、第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会、2016/4/13、国内
3. レーザーアブレーションによる多孔化脱細胞組織の作製、口頭、馬原淳、第 65 回高分子学会年次大会、2016/5/25、国内
4. 高圧処理皮膚と自家培養表皮を用いた皮膚再生、口頭、森本尚樹 第 42 回日本熱傷学会総会・学術集会、2016/6/2、国内
5. Enhanced tissue infiltration into porous scaffolds by active growth factor-immobilizing technology, 招待講演、山岡哲二、11th International Conference Medical Applications of Novel Biomaterials and Nanotechnology, 2016/6/7、海外
6. 多孔質スキャホールド内部への組織誘導に及ぼす表面特性の影響、口頭、山岡哲二、第 45 回医用高分子シンポジウム、2016/7/25、国内
7. 高圧殺細胞処理による非変成真皮組織の調整と腫瘍治療、口頭、山岡哲二、第 26 回バイオ・高分子シンポジウム、2016/7/28、国内
8. High pressure engineering for acellular blood vessel preparation and cancer therapy, 招待講演、山岡哲二、2016 ADATE Tissue Engineering Symposium: Crossing Boundaries to Propel Tissue Engineering into the Clinic, 2016/9/14、海外
9. 高圧処理による悪性黒色腫治療の基礎的検討、口頭、神野千鶴、第 25 回形成外科学基礎学術集会、2016/09/16、国内
10. 高圧処理の細胞への影響と不活化メカニズムの解明、ポスター、尾川武史、第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ、2016/11/29、国内
11. 高圧処理による悪性黒色腫治療にむけた基礎的検討、口頭、神野千鶴、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、国内
12. 真皮再生方法は未確立である、口頭、森本尚樹、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/7、国内
13. 細胞残渣を含む不活化自家皮膚と脱細胞化同種皮膚の移植後経過の比較、口頭、森本尚樹、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、国内
14. 5 種の細胞に対する高圧処理の影響と不活化メカニズムの解明、口頭、尾川武史、第 16 回日本再生医療学会総会、2017/3/9、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 「将来を支える生命工学のちから」, 藤里俊哉, 大阪工業大学化学・環境・生命工学連携連続講座, 2016/6/15, 国内
2. 「生命工学について」, 藤里俊哉, 大阪府立桜塚高校, 2016/7/8, 国内
3. 「高圧処理で腫瘍をなくす～色素性母斑（黒あざ）の再生医療」, 森本尚樹, 関西医科大学オープンキャンパス, 2016/7/30, 国内
4. 「再生医療は工学!？」, 藤里俊哉, 大阪工業大学オープンキャンパス, 2016/8/7, 国内
5. 「生命工学科がわかる」, 小川真実・藤里俊哉, 大阪工業大学オープンキャンパス, 2016/8/27, 国内
6. 「生命工学について」, 藤里俊哉, 大阪府立久米田高校, 2016/11/24, 国内オープンキャンパス総会の話題提供

(4) 特許出願

なし