

平成 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) 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

(英語) Medical Research and Development Programs Focused on Technology Transfer

Acceleration Transformative Research for Medical Innovation

研究開発課題名：(日本語) 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

(英語) Innovative human elastic cartilage device creation using the three-dimensional cell culture system aiming at a clinical trial

研究開発担当者 (日本語) 細胞培養センター センター長 植村壽公

所属 役職 氏名：(英語) Cell Culture Marketing & Research Center Manager, Toshimasa Uemura

実施期間：平成 28 年 10 月 4 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

津村尚史(研究開発代表者、株式会社ジェイテックコーポレーション(以下、ジェイテック) 代表取締役)、植村壽公(研究開発担当者、ジェイテック 細胞培養センター長)、谷口英樹(研究開発担当者、公立大学法人横浜市立大学(以下、横浜市立大学) 医学部 臓器再生医学 教授)、小林眞司(研究開発担当者、独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立こども医療センター(以下、こども医療センター) 形成外科 部長)らは、横浜市立大学の臓器再生医学及び形成外科が世界で初めて成功した弾性軟骨(ヒト軟骨デバイス)の再構築を可能とする“ヒト耳介弾性軟骨膜から分離同定した軟骨前駆細胞”と、ジェイテックが開発した独自の回転浮遊培養技術“CELLFLOAT”<図1参照>による3次元細胞培養システムを用いることで10mm大のヒト弾性軟骨デバイスの創出に成功している。しかしながらこの10mm大の弾性軟骨デバイスによる治療可能な対象疾患は、例えば鼻咽腔閉鎖機能不全症ぐらいであり、非常に限られている現状がある。

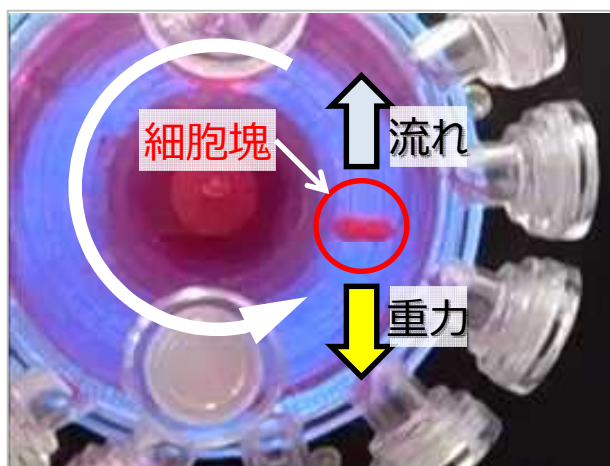
そこで本研究開発において、鼻等の弾性軟骨(疾患としては重度顔面変形、鼻変形(鞍鼻)等が挙げられる)や膝軟骨等の疾患に治療対象を拡大するために、約20~30mm大の世界で唯一の大型ヒト弾性軟骨デバイスを実用化するための分離培養技術を確立することを目指している。また、本培養システムを用いた細胞培養においてのGCTP準拠プロトコルを作成し、鼻咽腔閉鎖機能不全症だけでなく重度顔面変形、鼻変形(鞍鼻)の治療までも想定し、サル皮下移植による弾性軟骨再構築の長期安定性評価等を実施する(前臨床研究)。さらに本ヒト弾性軟骨デバイスによる鼻咽腔閉鎖不全症等の治療に向けた臨床試験の準備に着手する。

平成 28 年度において、ジェイテックでは表 1 に示す平成 28 年度の到達目標（規格値）を満足するヒト弾性軟骨デバイスの再構築に向けて 15mm 大を超える大きなヒト弾性軟骨デバイスに対応させた回転浮遊培養ベッセル（培養器）とそのベッセルに対応する回転浮遊培養装置の開発に成功した<図 2 参照>。またこの回転浮遊培養装置自体を収納するために既存のセルプロセッシングアイソレータに付属する CO₂ インキュベータの改良を実施し、さらに新ベッセルに対応した細胞を一定の位置に浮遊制御するための浮遊培養制御ソフトウェア Cell Float Control（CFC）の改良と検証についても実施した。

また横浜市立大学では、従来型の回転浮遊培養ベッセルを用いた 15mm 大のヒト弾性軟骨デバイスの培養検証を実施し、表 1 の平成 28 年度に示す到達目標をほぼ達成した。さらにジェイテックが H28 年度に開発した新ベッセルならびに回転浮遊培養装置<図 2 参照>を用いて、平成 29 年度の達成目標としていた 20mm 大のヒト弾性軟骨デバイスの検討を前倒して実施し、表 1 に示す到達目標のうちで“最大長”、“最短長”、“投影面積”、“湿重量”について目標を達成した。

さらに横浜市立大学及びこども医療センターにおいて鼻咽腔閉鎖機能不全症を初めてとするヒト弾性軟骨デバイスを用いた疾患治療の臨床試験に向け、GCTP 準拠プロトコルの修正・完成のための検討も実施し、複数の作業員（施術者）であっても大差なくヒト弾性軟骨デバイスの創出が確立できることを示した。今後、デバイス形状のさらなる安定化に向けて、GCTP 準拠プロトコルの策定を推進する予定としている。

ヒト弾性軟骨デバイスを用いた治療法の確立を目指すには、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（以下、PMDA）への薬事戦略相談／対面助言を数回行うことで非臨床試験／臨床試験での検証内容（実験デザイン）を確定させることが必要となる。したがって平成 28 年度においてジェイテックが再生医療等製品の承認に際し、機器開発・製造に求められる要件について PMDA との相談を実施し、ヒト弾性軟骨デバイスの承認には求められる臨床的有効性ならびに品質・安全性の評価項目を完全に満たすことであり、機器開発・製造に関しての要求事項は特段無いということまでを確認している。平成 29 年度以降での薬事戦略相談／対面助言については臨床医としての知見を多数有するこども医療センターが主導する形で具体的な相談内容を決定し、臨床的有効性ならびに品質・安全性を実証するための評価内容の構築を目指す。



【補 足】回転浮遊培養技術「CELLFLOAT」とは、回転浮遊培養ベッセル（培養器）内の細胞塊に掛かる重力を打ち消すように回転中の円形ベッセル内で発生する培養液の流れにより、細胞塊はベッセルの底に沈むことなく培養液中をふわふわ浮いた状態で徐々に 3 次元集合体を形成する培養技術。徐々に成長する細胞塊に対して浮遊状態を安定させる（一定領域に浮遊させる）ための画像処理による浮遊細胞塊の特徴抽出や位置認識の技術が備わっている。

なお本ベッセルは、外周周囲には複数の培養液交換口を備えており、一度培養液交換使った交換口を使わないことでカビなどからの汚染防止（コンタミネーション防止）に対応している特長を有している。

図 1 独自の回転浮遊培養技術「CELLFLOAT」



図 2(a) 回転培養ユニット

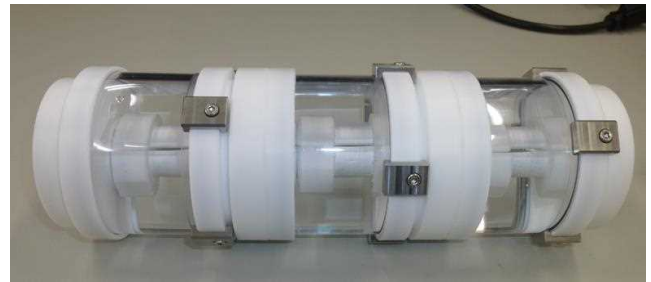


図 2(b) 円筒型回転培養ベッセル

図 2 回転培養ユニットと円筒型回転培養ベッセル

表 1 本研究開発でのヒト弾性軟骨デバイスの年度ごとの到達目標（規格値）

		H28 年度	H29 年度	H30 年度
In vitro	最大長	15 mm	20 mm	30 mm
	最短長	3 mm	4 mm	5 mm
	投影面積（理論的近似値）	30 mm ²	70 mm ²	200 mm ²
	ヒアルロン酸量	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml
	MIA 分泌量	80 ng/ml	80 ng/ml	80 ng/ml
	湿重量	70 mg	150 mg	250 mg
	力学安定性試験	※0.05 N	0.05 N	0.05 N
In vivo (移植後 2 ヶ月)	最大長	10 mm	15 mm	20 mm
	最短長	2 mm	3.5 mm	4 mm
	投影面積（理論的近似値）	15 mm ²	40 mm ²	100 mm ²
	組織中 GAG 量	4 mg/mg	4 mg/mg	4 mg/mg
	湿重量	50 mg	100 mg	180 mg
	力学安定性試験	※0.1 N	0.1 N	0.1 N

※現在は用手圧迫試験に基づく予測値

II. Summary of results

Our group including Mr. Takashi Tsumura (Project Leader; CEO, JTEC CORPORATION, abbreviated hereafter by JTEC) , Dr. Toshimasa Uemura (R&D Staff of this project; Head Office/Research Center, JTEC) , Dr. Hideki Taniguchi (R&D staff of this project; Professor, Department of Regenerative Medicine, Yokohama City University Graduate School of Medicine) and Dr. Shinji Kobayashi (R&D Staff of this project; Head of Department of Plastic Surgery, Kanagawa Children' s Medical Center (abbreviated hereafter by Children' s Medical Center) has already succeeded in generating 10mm size human elastic cartilage from cartilage precursor cells isolated from human auricular perichondrium by 3D cell culture system. Those cartilage precursor cells are capable of reconstructing elastic cartilage (human cartilage device), which was first in the world developed at Department of Regenerative Medicine and Plastic Surgery of Yokohama City University Graduate School of Medicine. Rotating float culture technology "CELLFLOAT" (Fig. 1) for this 3D system was developed by JTEC. At present, medical treatment by this 10 mm size human cartilage device is limited to several diseases such as Nasopharynx closing dysfunction.

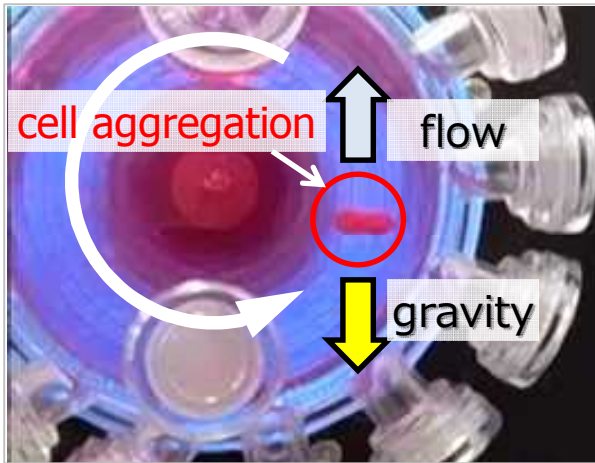
In order to extend its application to other cartilage disease such as in knee joints and nose such as serious facial deformity and saddle nose, etc., we are planning to establish an isolation culture technology, which is required for practical implementation of large sized (about 20~30mm size) human elastic cartilage device. Also, the protocol on cell culture by this new system conforming to GCTP shall be prepared and long term stability evaluation on elastic cartilage reconstruction shall be conducted by subcutaneous transplantation on monkeys, expecting future treatment of diseases including not only Nasopharynx closing dysfunction but serious facial deformity and nasal trauma as saddle nose. (preclinical study) Moreover, clinical tests on the treatment of Nasopharynx closing dysfunction by this new system shall be prepared.

In the 2016 fiscal year, aiming at reconstructing human elastic cartilage device satisfying the goal of the year - the target value shown in Table 1, JTEC successfully developed the rotating float culture vessel applicable for large-sized human elastic cartilage device exceeding 15 mm in size and the rotating float culture system suitable for the vessel (Fig.2). Also, to storage this system, CO2 incubator to be attached to the cell processing isolator was improved. In addition, the software called Cell Float Control (CFC) which controls the floating position of the cells and is applicable to this new vessel was improved and evaluated.

At Yokohama City University, culture validation on 15mm size human elastic cartilage device using ordinary rotating float culture vessel was conducted, achieving the goal of the 2016 fiscal year shown in Table 1. Moreover, the goal of the 2017 fiscal year – generating 20mm size human elastic cartilage device - was moved forward and tried by means of new basic technology, using the new vessel developed by JTEC in the 2016 fiscal year and rotating float culture system (Fig.2). The goal shown in Table 1 is partly achieved, which suggests the possibility of this new basic technology to be a proper method for producing 20mm size elastic cartilage.

At Yokohama City University and Children's Medical Center, toward the clinical tests for medical treatment using human elastic cartilage device on some diseases including Nasopharynx closing dysfunction, the modification and completion of the protocol conforming to GCTP was studied. There found no great difference in the human elastic cartilage device generated by multiple operators. In future, they plan to promote the formulation of the protocol, striving to obtain more stability on the device shapes.

To establish the therapeutic method using human elastic cartilage device, it is required to have consultation and interview several times on pharmaceutical strategy with PMDA(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency) and confirm the evaluation items (test design) on nonclinical and clinical tests. Accordingly, in getting approval of some product of regenerative medicine in the 2016 fiscal year, JTEC had a consultation with PMDA on the requirements of the development and production of the medical device and confirmed that for the approval of human elastic cartilage device the evaluation items on clinical efficacy, quality and safety must be completely satisfactory but there are no special requirements on the development and production of medical devices. In future consultation and interview on pharmaceutical strategy after the 2017 fiscal year, Children' s Medical Center shall take the lead with their great knowledge and experience as clinicians and make every specific consult with PMDA to help formulate the evaluation standard which demonstrates clinical efficacy, quality and safety.



Supplementation: Rotational Floating Culture System (CELLFLOAT) is a bioreactor which generates stress by the horizontal rotation of a cylindrical vessel equipped with a gas exchange membrane. This bioreactor compensates for the effect of gravity, resulting in homogenous cell growth without sinking, and cells aggregate and form a three-dimensional aggregates. For stabilizing the growing cell aggregate in a vessel, the system has functions of feature extraction and position recognition of the aggregate by imaging software.

This vessel is equipped with several ports for exchanging culture medium at the outer circle of the vessel. Each port is single use for avoiding contamination.

Fig.1 Rotational Floating Culture System(CELLFLOAT)



Fig.2(a) Rotational Culture Unit

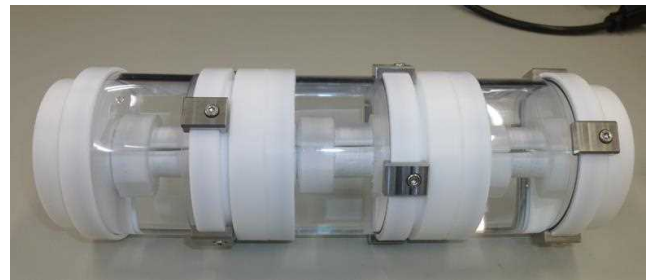


Fig.2(b) Cylindrical Rotational Culture Vessel

Fig.2 Rotational Culture Unit and Cylindrical Rotational Culture Vessel

Table 1 Attainment target every year of the human elastic cartilage device for these research and development (Value of standard)

		FY2016	FY2017	FY2018
In vitro	maximum length	15 mm	20 mm	30 mm
	minimum length	3 mm	4 mm	5 mm
	projected area	30 mm ²	70 mm ²	200 mm ²
	hyaluronic acid content	8 µg/ml	8 µg/ml	8 µg/ml
	MIA secretion	80 ng/ml	80 ng/ml	80 ng/ml
	weight	70 mg	150 mg	250 mg
	mechanical property	※0.05 N	0.05 N	0.05 N
In vivo (two month after tx)	maximum length	10 mm	15 mm	20 mm
	minimum length	2 mm	3.5 mm	4 mm
	projected area	15 mm ²	40 mm ²	100 mm ²
	GAG content	4 mg/mg	4 mg/mg	4 mg/mg
	weight	50 mg	100 mg	180 mg
	mechanical property	※0.1 N	0.1 N	0.1 N

※Predicted value

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0件）

1. 植村寿公、森田健一、津村尚史 「臨床用3次元培養装置」Medical Science Digest, 2017, 43(1) 44-47.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし