

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04360

研究課題名(和文) 高圧処理技術を用いた巨大色素性母斑治療～不活化機序解明と生着率向上

研究課題名(英文) A novel treatment for giant congenital melanocytic nevi using inactivated autologous sevus tissue by high hydrostatic pressure

研究代表者

森本 尚樹 (Morimoto, Naoki)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：40378641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らが開発した、200MPa(2000気圧)で10分間加圧処理することで、通常破棄される患者自身の色素性母斑組織内の細胞を死滅処理(不活化)した後皮膚再生に用いる新規治療法の検討を行った。200MPa、10分間処理では悪性腫瘍細胞も含めネクローシス、50MPa、36時間の加圧処理ではアポトーシスを誘導することが判明し、アポトーシス組織の方が生着が良好となる可能性が示唆された。また、塩基性線維芽細胞増殖因子を併用することで、高圧処理皮膚の生着が良好となることも示された。これらの結果、この高圧処理は皮膚以外の悪性腫瘍組織にも応用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、また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数%以上報告されている。既存治療では母斑細胞の完全な切除は困難である。申請者等が開発した200MPaで10分間加圧処理することで母斑組織を不活化し、再移植することで真皮再生を行う新規皮膚再生療法について、臨床研究及び基礎検討を実施した。本治療法はいままで困難であった巨大母斑の新規治療法となるだけでなく、皮膚以外の悪性腫瘍組織再建手術にも応用可能な方法となると予想している。

研究成果の概要(英文)：In this study, we conducted the first-in-human trial using a novel treatment to reconstruct full-thickness skin defects by combining an inactivated nevus by high hydrostatic pressure(HHP) as the autologous dermis and a cultured epidermal autograft. We showed that HHP at 200 MPa for 10 min completely induced necrosis of keratinocytes, fibroblasts and malignant melanoma cells death via necrosis. In addition, we found that HHP at 50 MPa for 36 h induced fibroblast cell death via apoptosis. This study showed the possibility for HHP technology to be used for the reconstruction surgery including malignant tumors of skin or bone tissue.

研究分野：形成外科学

キーワード：皮膚再生 高圧処理 培養表皮

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は二層性人工真皮(コラーゲンスポンジ)を組織再生の足場(Scaffold)として利用し、細胞を組み合わせた組織再生研究を一貫して行ってきたが、人工材料で再生した真皮様組織上には自家培養表皮が生着しない、という根本的な課題があった。この現状を打破するため申請者が開発した皮膚再生方法が高圧処理による自家皮膚腫瘍組織の不活化及び再利用(皮膚リサイクル治療)である。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、また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数%以上報告されている。このため早期(小児期)の予防的切除が推奨される(日本皮膚科学会ガイドライン)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、母斑が大きい場合は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命的となることがある。申請者らは、皮膚に含まれる全細胞を不活化(死滅処理)可能な条件を明らかにしており、本治療法を用いた臨床研究を既に開始している。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発した、200MPa(≒2000気圧)で10分間加圧処理することで、通常破棄される患者自身の色素性母斑組織内の細胞を死滅処理(不活化)した後再利用し、患者自身の真皮を再建する低侵襲かつ安全性の高い新規治療法の基礎検討を行うことを目的とする。具体的には、高圧処理による細胞不活化機序及び不活化組織の生着機序の詳細を解明し、腫瘍細胞のみの不活化を目指すと共に、細胞・細胞成長因子の併用、同種皮膚併用も見据え、より正常に近い皮膚再生方法の確立を最終的な目的とする。

3. 研究の方法

申請時、不活化母斑組織を用いた臨床研究を実施中であり、臨床研究の完遂を目的とする。また、皮膚リサイクル治療の確立が最終目標であり、高圧処理による細胞種毎の細胞死機序を解明し、不活化皮膚・母斑の生着率向上させるため以下の検討を行う。具体的には以下の検討を行う。

1. 皮膚・皮下組織の正常細胞、悪性腫瘍細胞の細胞種毎の高圧処理細胞死条件を検討する
2. 現行の200MPa、10分間処理よりも低圧・長時間での細胞・組織不活化及び生着率の検討
3. 不活化皮膚への血流再開機序解明・血流促進方法検討(徐放性細胞成長因子付加、細胞播種)
4. 脱細胞化同種皮膚の生着率向上に向けた基礎的検討

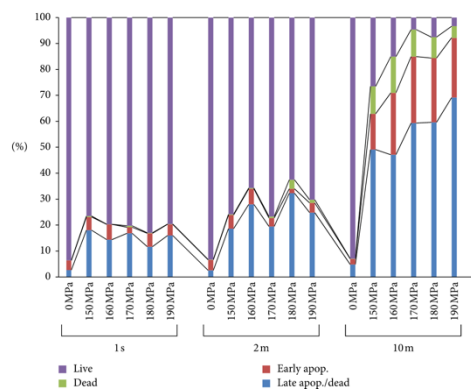
4. 研究成果

臨床研究については10例の患者で実施し、母斑細胞の再発は無いこと、上皮化が得られることを確認し、論文報告を行った。以下、各研究項目の結果を示す。

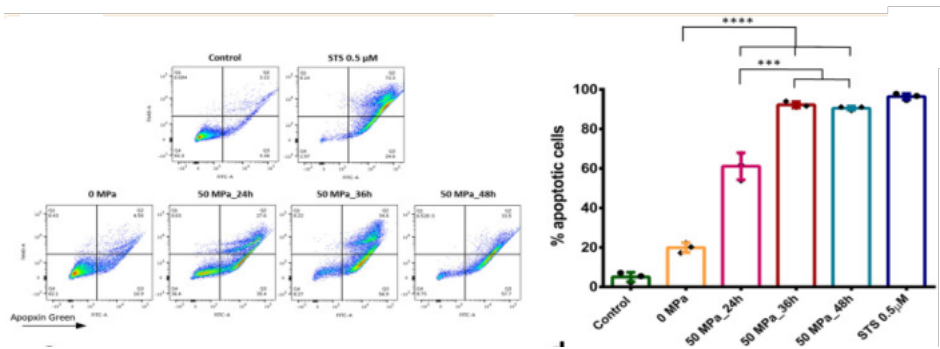
1. 皮膚・皮下組織の正常細胞、悪性腫瘍細胞の細胞種毎の高圧処理細胞死条件を検討する

ヒト表皮細胞(keratinocytes:HEKas), ヒト皮膚線維芽細胞(dermal fibroblasts:HDFas), ヒト脂肪由来幹細胞(adipose tissue-derived stem cells:ASCs), ヒト表皮色素細胞(epidermal melanocytes:HEMA-LPs), ヒト悪性黒色腫細胞株(malignant melanoma cells:MMs)それぞれを150,160,170,180,190MPaの圧力で、1秒、2分、10分加圧処理し、細胞の生死を検討した。Live/Dead染色、Apoptosis Assay(Annexin V)、透過型電顕(TEM)による評価を行い、いずれの細胞も、2分間の処理では死滅しないが、190MPa、10分間の高圧処理で死滅すること、細胞死の機序としてはネクローシスであることを解明した。

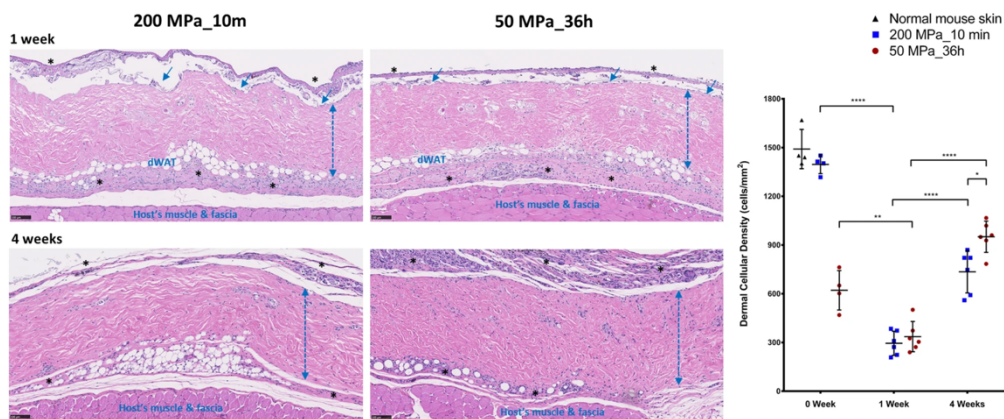
また、特定の細胞、特に悪性腫瘍細胞のみを死滅させうる処理条件は確認できなかった。



2. 現行の200MPa、10分間処理よりも低圧・長時間での細胞・組織不活化及び生着率の検討
200MPaよりも低圧の条件として、50MPaを設定し、ヒト線維芽細胞を用いて48時間まで圧処理を行った。この結果、36時間以上の加圧で、ヒト線維芽細胞が死滅すること、またこの機序をApoptosis/Necrosis Detection Kit、透過型電顕(TEM)で検討したところ、アポトーシスであることを示した。



3. 不活化皮膚への血流再開機序解明・血流促進方法検討 (徐放性細胞成長因子付加、細胞播種) 50 MPa、36 h 処理及び 200MPa、10 分処理をしたマウス皮膚 (C57BL6J/Jcl mice) を同マウス皮下に埋入した。TUNNEL 染色、抗 Capase-3 染色で、50 MPa、36 h 処理した皮膚はアポトーシスとなっていることを確認した。4 週間後に組織を摘出し検討した結果、50 MPa、36 h 処理皮膚の方が、真皮厚が厚いこと、線維芽細胞の侵入が早いことが確認できた。



また、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) と併用することで、200MPa、10 分処理をした皮膚の生着 (厚み、血管侵入) が良好となることも示した。

4. 脱細胞化同種皮膚の生着率向上に向けた基礎的検討 本検討を行うため、ミニブタ皮膚を用いた検討を行った。200MPa、10 分処理では組織中の細胞死滅が確認できたが、50 MPa、36 h 処理では完全には死滅ができなかった。このため、これ以上の検討ができていない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mitsui T, Morimoto N, Mahara A, Notodihardjo SC, Le TM, Munisso MC, Moriyama M, Moriyama H, Kakudo N, Yamaoka T, Kusumoto K.	4. 巻 Jan 30;2020
2. 論文標題 Exploration of the Pressurization Condition for Killing Human Skin Cells and Skin Tumor Cells by High Hydrostatic Pressure.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomed Res Int	6. 最初と最後の頁 9478789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/9478789.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Le TM, Morimoto N, Mitsui T, Notodihardjo SC, Munisso MC, Kakudo N, Kusumoto K	4. 巻 14
2. 論文標題 he sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the inactivated dermis by high hydrostatic pressure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0208658.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Le Tien Minh, Morimoto Naoki, Ly Nhung Thi My, Mitsui Toshihito, Notodihardjo Sharon Claudia, Munisso Maria Chiara, Kakudo Natsuko, Moriyama Hiroyuki, Yamaoka Tetsuji, Kusumoto Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Hydrostatic pressure can induce apoptosis of the skin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74695-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mitsui Toshihito, Morimoto Naoki, Mahara Atsushi, Notodihardjo Sharon Claudia, Le Tien Minh, Munisso Maria Chiara, Kakudo Natsuko, Yamaoka Tetsuji, Kusumoto Kenji	4. 巻 2020
2. 論文標題 High Hydrostatic Pressure Therapy Annihilates Squamous Cell Carcinoma in a Murine Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/3074742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Morimoto Naoki, Mitsui Toshihito, Sakamoto Michiharu, Mahara Atsushi, Yoshimura Kenichi, Arata Jun, Jinno Chizuru, Kakudo Natsuko, Kusumoto Kenji, Yamaoka Tetsuji	4. 巻 148
2. 論文標題 A Novel Treatment for Giant Congenital Melanocytic Nevi Combining Inactivated Autologous Nevus Tissue by High Hydrostatic Pressure and a Cultured Epidermal Autograft: First-in-Human, Open, Prospective Clinical Trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery	6. 最初と最後の頁 71e ~ 76e
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PRS.00000000000008084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jinno C., Morimoto N., Mahara A., Sakamoto M., Ogino S., Fujisato T., Suzuki S., Yamaoka T.	4. 巻 15
2. 論文標題 Extracorporeal high-pressure therapy (EHPT) for malignant melanoma consisting of simultaneous tumor eradication and autologous dermal substitute preparation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 187 ~ 194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 競争的的外部資金の獲得: 高圧処理不活化母斑プロジェクトの場合
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tien Minh Le, Naoki Morimoto, Nhung Thi My Ly, , Toshihito Mitsui1, Sharon Claudia Notodihardjo, Maria Chiara Munisso, Natsuko Kakudo, Kenji Kusumoto
2. 発表標題 The sustained release of basic fibroblast growth factor accelerates angiogenesis and the engraftment of the Inactivated dermis by high hydrostatic pressure
3. 学会等名 2019 TERMIS-AM Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T. Mitsui, N. Morimoto, A. Mahara, S. C. Notodihardjo, T. M. Le, M. C. Munisso, N. Kakudo, T. Yamaoka, K. Kusumoto
2. 発表標題 High hydrostatic pressure therapy kills squamous cell carcinoma cells
3. 学会等名 2019 TERMIS-AM Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光井俊人、森本尚樹、馬原淳、覚道奈津子、楠本健司、山岡哲二
2. 発表標題 高压処理により有棘細胞癌組織は不活化される
3. 学会等名 第28回日本形成外科学基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光井俊人、森本尚樹、馬原 淳、覚道奈津子、楠本健司、山岡哲二
2. 発表標題 高压処理による有棘細胞癌不活化の検討
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoki Morimoto, Toshihito Mitsui, Atsushi Mahara, Natsuko Kakudo, Tetsuji Yamaoka, Kenji Kusumoto
2. 発表標題 A new strategy for the treatment of giant congenital melanocytic nevus using culture epithelial autograft (JACE)
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress - 2018 Kyoto, Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihito Mitsui, Naoki Morimoto, Natsuko Kakudo, Atsushi Mahara, Kenji Kusumoto, Tetsuji Yamaoka
2. 発表標題 The Evaluation of Apoptosis and Necrosis of Human Skin Cell Induced By High Hydrostatic Pressure
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress - 2018 Kyoto, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tien Minh Le, Naoki Morimoto, Natsuo Kakudo, Toshihito Mitsui, Sharon Claudia Notodihardjo, Kenji Kusumoto
2. 発表標題 The acceleration of angiogenesis into inactivated dermis by high hydrostatic pressure using the sustained release basic fibroblast growth factor
3. 学会等名 5th TERMIS World Congress - 2018 Kyoto, Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 光井俊人, 森本尚樹, 馬原淳, 覚道 奈津子, Tien Le Minh, Sharon Claudia Notodihardjo, 楠本 健司, 山岡哲二
2. 発表標題 高圧処理をした有棘細胞癌組織はマウス体内でどう変化するのか
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Le Minh Tie, 森本尚樹, 光井俊人, Sharon Claudia Notodihardjo, 覚道奈津子, 楠本 健司
2. 発表標題 The sustained release of bFGF accelerates angiogenesis and survival of the inactivated dermis by HHP
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光井俊人、森本尚樹、馬原淳、覚道奈津子、楠本健司、山岡哲二
2. 発表標題 高圧処理による皮膚細胞死及び皮膚悪性腫瘍細胞死の検討
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 光井俊人、森本尚樹、馬原淳、覚道奈津子、楠本健司、山岡哲二
2. 発表標題 高圧処理による細胞死の機序についての検討
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本尚樹、馬原淳、神野千鶴、光井俊人、覚道奈津子、坂本道治、鈴木茂彦、楠本健司、山岡哲二
2. 発表標題 色素性母斑に対する皮膚再生治療法：第二種再生医療等技術を用いた臨床研究
3. 学会等名 第47回日本創傷治癒学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 高圧処理による母斑組織の不活化・再移植と自家培養表皮を用いた皮膚再生研究
3. 学会等名 第7回DDS再生医療研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 自家培養表皮を用いた古くて新しい皮膚再生治療
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 細胞又は組織にアポトーシスを誘導する方法	発明者 森本尚樹、光井俊 人、レミンティ ン、覚道奈津子、楠	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-154137	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	覚道 奈津子 (Kakudo Natsuko) (00509490)	関西医科大学・医学部・准教授 (34417)	
研究 分 担 者	楠本 健司 (Kusumoto Kenji) (20161630)	関西医科大学・医学部・教授 (34417)	
研究 分 担 者	山岡 哲二 (Tetsuji Yamaoka) (50243126)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・部長 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------