

令和 6 年 5 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03099

研究課題名(和文) 高静水圧処理を応用した皮膚、骨、神経の再生-自家腫瘍組織の再生医療への応用

研究課題名(英文) Study of the regenerative therapy for skin tumor, bone tumor, and nerve tumor using a novel high hydrostatic pressure device

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨分化能を有するMC3T3-E1細胞を用い、BMP-2(骨形成タンパク質)を高圧処理(200MPa,500MPa)凍結処理、パステル処理及び未処理群での骨分化を検討した。この結果、高圧処理群と凍結処理群ではBMPの骨分化能が低下しないことが確認できた。また、Wisterラット頭蓋骨を直径8mmで切除し、それぞれの骨を高静水圧処理、パステル処理、凍結処置及び未処理骨の4群で処理した骨の再移植実験を行った。移植16週間まで経過観察を行いどの群でもCTによる骨形成、一部では骨癒合が確認できた。神経移植では、高圧処理神経の回復が人工神経よりも優れているという結果が得られている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らが開発、臨床展開してきた新規治療法「高静水圧処理を利用した自家腫瘍細胞の再利用治療」は、自家腫瘍組織中の腫瘍細胞を殺細胞処理し、腫瘍組織を再移植し、自家組織として再生させる新規再生治療である。本法は、マトリックス構造を損傷すること無く、深部に存在する腫瘍細胞をすべて死滅処理できる優れた方法である。これまで皮膚腫瘍に対して臨床応用してきたが、今回の検討により、症例数の多い骨腫瘍、あるいは神経腫瘍に対する適用拡大の可能性が示唆された。今後は更に研究を進め、非臨床POCを取得し臨床試験に向けた準備を進めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Using MC3T3-E1 cells with osteogenic potential, we examined the osteogenic differentiation ability of BMP-2 (bone morphogenetic protein) treated by high hydrostatic pressure (HHP:200 MPa, 500 MPa), freeze, Pasteurized, and untreated groups. The results showed that the osteogenic differentiation ability of BMP was not decreased in HHP and freeze groups. Next, skull bones of Wister rat were excised in a diameter of 8 mm, and each bone was subjected to reimplantation experiments with four groups of HHP, Pasteurized, freeze, and untreated bones. Animals were followed up until 16 weeks after transplantation, and in all groups. CT showed bone formation and bone fusion. In the nerve transplantation, the recovery of HHP treated nerves was superior to that of the artificial nerves.

研究分野：形成外科学

キーワード：高静水圧処理 殺細胞処理 再生医療 骨腫瘍

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は吸収性合成材料を用いた皮膚軟部組織再生の研究及び臨床を継続的に行ってきた。生体組織の再生は、三次元組織構造をもつ足場材料と細胞及び細胞成長因子を組み合わせるというのが 1990 年代から提唱された組織工学 (Tissue Engineering) の基本的な考えである。しかし、コラーゲンなどの天然高分子は細胞の足場となるが、生体の三次元構造組織と同等の強さは無く、ヒト組織には劣っている。このため、同種組織、異種組織の応用が注目されているが、本邦でのヒト同種組織の入手は困難であり、異種組織はもちろん、ヒト同種組織でも免疫拒絶の問題から完全に逃れることは不可能と考えている。

そこで、正常皮膚がなく再建に難渋する先天性巨大色素性母斑の新規治療法として、腫瘍組織である母斑組織中の細胞を確実に死滅させ、かつ真皮コラーゲン構造を損傷しない方法として高圧処理に着目した。組織中の細胞を死滅させる、あるいは細胞を取り除く脱細胞化の方法として、界面活性剤で洗浄する方法、高温処理あるいは凍結融解、放射線照射などの方法があるが、どの方法も組織深部にある細胞を確実に死滅させることは困難である。細胞を確実に死滅させるには、数日から 1 週間と長時間の処理を要する、あるいは処理によって組織構造を損傷する、などの問題が生じる。高圧処理は、組織深部まで均一の圧力処理が可能 (パスカルの法則) で、細胞を死滅させる力学的エネルギーが熱に較べると格段に低く、組織構造を損傷することが少ない優れた方法である。現在までの研究で、200MPa、10 分間の高圧処理で、悪性腫瘍細胞を含む培養細胞が死滅すること、ヒト皮膚、ブタ皮膚、ヒト母斑組織中の全細胞が死滅すること、不活化皮膚を再移植すると生着することを確認済みである 8-11。また、先天性巨大色素性母斑に対する本治療法の First-in-human 臨床研究も終了し、高圧処理機器の医療機器としての承認を目指す医師主導治験を 2021 年度に予定している。生体組織を高圧処理可能な機器も複数台所有しており、本研究の実施に問題はない。また、骨組織の再生については、金沢大学医学部整形外科と、神経再生については京都大学医学部整形外科と既に意見交換を行っており、研究代表者らが得意とする皮膚以外の研究、解析についてもなんらかの問題が生じてもこれらの協力者と議論することで克服可能であると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者らが開発、世界で初めて臨床展開してきた新規治療法である「高静水圧処理を利用した自家腫瘍細胞の再利用治療」を更に展開することである。申請者らは食品加工分野で非加熱殺菌などに用いられる高静水圧処理 (以下高圧処理) 技術を皮膚再生に応用し、200MPa (≒2000 気圧)、10 分間高圧処理すれば、真皮マトリックス構造を損傷すること無く、皮膚に含まれる全細胞を深部に存在するものまで均一に死滅処理できることを発見した 8-10。更に、高圧処理した自家皮膚を、細胞を取り除く脱細胞化処理を行わずに生体に再移植しても生着すること、不活化皮膚に含まれる細胞残渣は移植後 3 週間以内に吸収され、移植床より健全な線維芽細胞と毛細血管が侵入し、自家培養表皮を移植すれば生着することを報告した 9,10。実施に、高圧処理を皮膚良性腫瘍である巨大母斑治療に臨床応用し、母斑組織を高圧処理し、腫瘍細胞も含め全細胞を不活化して廃棄すること無く「再利用」し、移植すると、実際に生着し、再建された真皮上に自家培養表皮を移植すると生着することを First in human 臨床研究で確認済みである。現在、高圧処理装置を医療機器として開発中であり、2021 年度初頭に高圧処理装置の医療機器承認を目的とした医師主導治験を開始する予定である。First in human 臨床研究では良性腫瘍を対象としたが、非臨床試験では代表的な皮膚悪性腫瘍である悪性黒色腫と扁平上皮癌細胞を用いて検討し、200MPa、10 分間の高圧処理で細胞が死滅すること、悪性腫瘍動物モデルで高圧処理後に腫瘍は消滅し再発しないことを報告している。

臨床研究で判明した高圧処理移植の課題として、高圧処理母斑が 20/1000inch 程度の厚みまでしか生着しないことがある。これは申請者らが確認したように 200MPa、10 分間の高圧処理では細胞が壊死 (ネクロシス) することと関連している可能性がある。このため、組織損傷が少ないとされるアポトーシスを起こす高圧処理条件も検討済みで、50MPa、36 時間で細胞がアポトーシスすることを確認している (左図) 17。これらの高圧処理条件による組織中の細胞死滅、組織損傷の程度、細胞成長因子などの生理活性変化などを検討し、再移植した際の最適な条件を決定し、将来的な臨床使用にむけた非臨床 POC (Proof of concept) を得ることを本研究の第一の目的とする。

「高静処理による組織再利用治療」と同様の再利用治療としては、腫瘍骨を液体窒素中で 20 分凍結処理し、再移植する治療が令和 2 年度より保険収載されて、整形外科分野で実施されている。高圧処理の利点は、処理が 10 分間と短いこと、深部まで確実に、また均一に処理できること、更に凍結よりもマトリックス構造の損傷がより少ないと予想されることである。骨を採取するとその大きさの骨欠損が生じ、整容上、力学上の制限が生じる、また神経再建では採取した知覚神経の領域に知覚麻痺が生じるなど、組織採取は患者への負担が大きく、健康な自家組織は採取しないことが望ましい。本研究では、皮膚以外の骨、神経再建にも高圧処理を展開し、有効性を確認することを第二の目的とする。腫瘍組織の再利用治療が一般的となれば、頭頸部腫瘍などで

多くの組織採取をした場合でも、骨、神経など形態的、機能的に重要な組織の再利用が可能となり、患者にもたらす福音は大きいと考えている。

3. 研究の方法

本研究で実施する項目は以下の通りである。

①高圧処理皮膚の生着率向上検討

②高圧処理の骨への応用

③高圧処理の末梢神経への応用

以下、各項目について述べる。

①高圧処理皮膚の生着率向上検討

高圧処理不活化皮膚の生着・血流再開については、ミニブタ自家移植モデルを用いて、200MPa、10分処理不活化高圧処置皮膚で移植3ヶ月まで生着することを確認している(12)。一般的に、壊死を起こすと細胞が溶解、細胞内容が流出し、局在の炎症を惹起し、組織の生着が不良となる。アポトーシスの場合は、細胞内容の流出前にマクロファージ等に短時間で貪食処理され、細胞内容が流出しないため炎症を惹起せず、組織の生着は良好とされている。本項目では、クラウンミニブタ腹部皮膚を採取し全層皮膚(一辺15mm正方形)を用いて、

・壊死皮膚(200MPa、10分処理)・アポトーシス皮膚(50MPa、36時間)・未処理皮膚

を作成する。この処理は現在所有している高圧処理装置(サーボプレッシャ500、スギノマシン(株))を用いて行う。全身麻酔下で皮膚採取し、まずアポトーシス皮膚を作成、2日後に再度全身麻酔を行い、皮膚採取し壊死皮膚を作成、コントロールとしての未処置皮膚も含め、背部筋膜上に3種類の皮膚片をランダムに移植する(各群n=9)。移植1週、1ヵ月、3ヵ月後に、n=3ずつ組織採取する。生着は、以下の項目で評価する。

・移植片面積(肉眼写真)・移植片断面積、厚み(組織切片)・移植片内血管新生数、面積(抗CD31免疫染色)

②高圧処理の骨への応用

この項目はi.正常骨の高圧処理による不活化、細胞成長因子評価、ii.骨悪性腫瘍モデルでの高圧処理の有効性の確認、の二項目を検討する。

i.正常骨の高圧処理による不活化、細胞成長因子評価

Wisterラット頭蓋骨及び大腿骨を採取、破碎後、4群の不活化処理・壊死条件(200MPa、10分処)・アポトーシス条件(50MPa、36時間)・高温処理(80度、30分)・凍結処置(-196度、20分)及び未処理骨の5群で検討を行う。各群で以下の検討を行う。

・不活化確認: explant培養(7日間程度)で細胞遊走がないことを確認

・細胞成長因子定量: ホモジナイズ後、BMP2(Bone Morphogenetic Protein2)、VEGF(Vascular Endothelial Growth Factor)、TGF- β (Transforming Growth Factor- β)の定量(ELISA法)、及び残存活性評価は、MSC: Mesenchymal Stem Cell、その他株細胞を用いて増殖あるいは骨分化等を評価

・ラット頭蓋骨に直径5mmの骨欠損を作成、それぞれの処理をした骨を移植、4週、12週でCT撮影、組織採取を行い、骨癒合、組織形成を評価

上記によって4種類の不活化処理の中で、最も骨形成が優れている方法を評価する。

ii.骨悪性腫瘍モデルでの高圧処理の有効性の確認

悪性腫瘍株細胞を用いて、壊死条件(200MPa、10分処)・アポトーシス条件(50MPa、36時間)を用いて不活化を確認する。具体的には骨肉腫株細胞 murine osteosarcoma cell line(LM8)、乳癌株細胞 murine breast cancer cell line(MMT)を用いて、両条件での不活化を確認(培養及びWST-8アッセイ)する。次にヌードマウス(BALB/cAJcl-nu/nu)大腿骨骨髄に移植し、不活化処理をすると腫瘍が発生しないこと、また、不活化せずに移植、発生した骨腫瘍を採取し、両条件で不活化した後に再移植し、不活化処理群では再発生しないことを確認する。

③高圧処理の末梢神経への応用

F344ラット座骨神経を採取し、壊死条件(200MPa、10分処)・アポトーシス条件(50MPa、36時間)を用いて不活化を確認する。これらを explant 培養し、WST-8アッセイで評価する。また、座骨神経欠損(10mm)を作成し、両条件で処理した神経、自家移植(他ラットより採取)群と神経線維系(組織切片)、知覚、運動機能等を比較する。

4. 研究成果

①高圧処理皮膚の生着率向上検討

先行マウス実験で確認された壊死条件(200MPa、10分処理)でクラウンミニブタ皮膚が不活化されたが、アポトーシス条件(50MPa、36時間)では完全に不活化できなかった。これは元々長時間処理であり、組織の小さいマウス皮膚では組織が大きいブタ皮膚よりも容易にアポトーシスが誘導されやすかったと考えられる。この検討をこれ以上実施しても得られる成果は少ないため、追加実施はしなかった。高圧処理装置を作製している企業の協力も得られず、アポトーシス条件(50MPa、36時間)での処理が実施できなくなったことも影響している。このため、本項目は実施できなかった。以前の報告で、高圧処理皮膚と塩基性線維芽細胞増殖因子含浸基材を併用することで高圧処理皮膚の生着が改善されることを報告しており、既報告の方法を用いる

のがよいと考えている。

② 高圧処理の骨への応用

この項目は i. 正常骨の高圧処理による不活化、細胞成長因子評価、ii. 骨悪性腫瘍モデルでの高圧処理の有効性の確認、の二項目を検討した。本検討においても、上述の理由からアポトーシス条件 (50MPa、36 時間)、は実施しなかった。

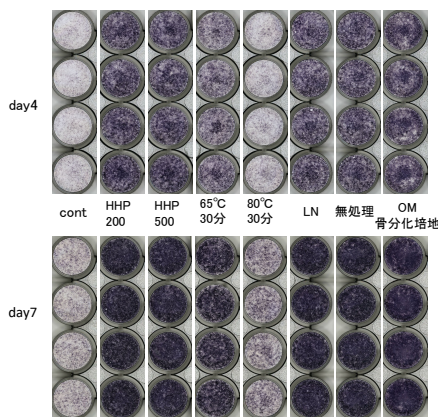
i. 正常骨の高圧処理による不活化、細胞成長因子評価

Wister ラット頭蓋骨の 4 群の不活化処理、すなわち高圧処理 (200MPa、10 分)、高圧処理 (500MPa、10 分)、高温処理 (65 度、30 分)・凍結処置 (-196 度、20 分) 及び・未処理骨の 4 群で検討を行った。

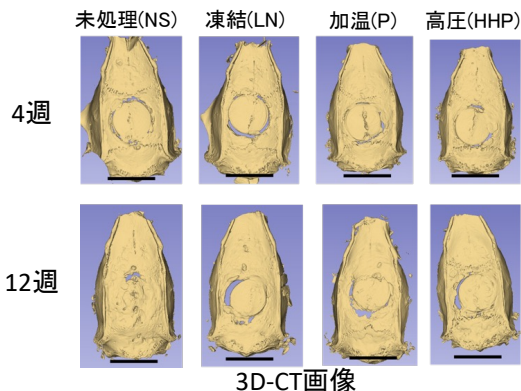
・不活化確認：explant 培養 (7 日間程度) で細胞遊走がないことを確認

不活化は確認できた。

・細胞成長因子定量：ホモジナイズ後、BMP2 (Bone Morphogenetic Protein2)、VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)、TGF- β (Transforming Growth Factor- β) の定量 (ELISA 法)、を実施した。しかし、細胞成長因子量が ELISA 法の検出限界以下であることが判明した。このため、MC3T3-E1 (マウス骨芽細胞様細胞) を培養し、それぞれの処理を行った骨形成タンパク (BMP-2) を培地に添加し、細微成長因子活性の計測を行った。この結果、高圧処理 (200MPa、10 分)、高圧処理 (500MPa、10 分)、凍結処置 (-196 度、20 分) では細胞成長因子活性が保持されるが、高温処理 (65 度、30 分) では活性が落ちることが判明した。



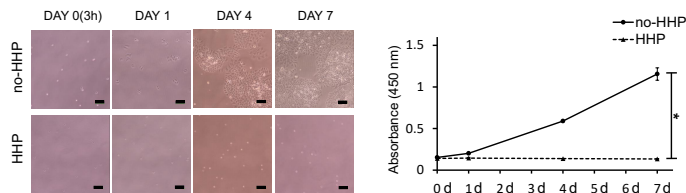
・ラット頭蓋骨に直径 5 mm の骨欠損を作成、それぞれの処理をした骨を移植、4 週、12 週で CT 撮影、組織採取を行い、骨癒合、組織形成を評価



本項目では、12 週まで経過観察を行ったが、有意差がみられなかった。このため、16 週までの経過観察期間を延長したが、どの群でも骨形成が確認され、有意差はなかった。

ii. 骨悪性腫瘍モデルでの高圧処理の有効性の確認

悪性腫瘍株細胞を用いて、壊死条件 (200MPa、10 分処理) を用いて不活化を確認する。具体的には骨肉腫株細胞 murine osteosarcoma cell line (LM8)、乳癌株細胞 murine breast cancer cell line (MMT) を用いて、両条件での不活化を確認 (培養及び WST-8 アッセイ) する。次にヌードマウス (BALB/cAJcl-nu/nu) 大腿骨骨髄に移植し、不活化処理をすると腫瘍が発生しないこと、また、不活化せずに移植、発生した骨腫瘍を採取し、両条件で不活化した後に再移植し、不活化処理群では再発しないことを確認した。



③ 高圧処理の末梢神経への応用

F344 ラット座骨神経を採取し、壊死条件 (200MPa、10 分処理) を用いて不活化を確認する。これらを explant 培養し、WST-8 アッセイで評価する。また、座骨神経欠損 (10mm) を作成し、両条件で処理した神経、自家移植 (他ラットより採取) 群と神経線維系 (組織切片)、知覚、運動機能等を比較を行った。本検討では、不活化は確認できており、神経への応用について、ラット

座骨神経に 10mm の欠損を作成し、高静

水圧処理自家神経（200MPa、10 分）自家神経移植、凍結処理自家神経（-196 度、20 分）を自家脱細胞化神経、人工神経を移植した。移植 15 週で評価を実施しており、高圧処理神経が肉眼的に分解されることなく移植 8 週まで現在機能評価を実施している段階である。組織学的、機能的評価は現在実施中である。現在結果の取りまとめを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

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 & 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 Li Yuanjiaozi, Katayama Yasuhiro, Nie le, Nakano Takashi, Sawaragi Eiichi, Sakamoto Michiharu, Yamanaka Hiroki, Tsuge Itaru, Demura Satoru, Yamada Yohei, Tsuchiya Hiroyuki, Morimoto Naoki	4. 巻 22
2. 論文標題 Development of a novel regenerative therapy for malignant bone tumors using an autograft containing tumor inactivated by high hydrostatic pressurization (HHP)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 224-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.02.002	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 Yamanaka Hiroki, Sawaragi Eiichi, Nakano Takashi, Katayama Yasuhiro, Ito Tatsuya, Tada Harue, Hidaka Yu, Morita Satoshi, Funakoshi Chihiro, Kinoshita Akemi, Watanabe Mieko, Tsuge Itaru, Katsube Motoki, Sakamoto Michiharu, Yamaoka Tetsuji, Morimoto Naoki	4. 巻 24
2. 論文標題 A high-hydrostatic pressure device for nevus tissue inactivation and dermal regeneration for reconstructing skin defects after giant congenital melanocytic nevus excision: a clinical trial	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2023.06.012	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小川興、馬原淳、山岡哲二、森本尚樹
2. 発表標題 腫瘍切除で摘出された自家神経を再利用する治療法の開発 自家高圧処理神経移植の有用性
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Naoki Morimoto
2. 発表標題 4.Cultured epithelial autografts for the treatment of giant congenital melanocytic nevus
3. 学会等名 The 6th Asian Congress of Dermatologic Surgery (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 高圧処理母斑組織を用いた皮膚再生
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 皮膚全層再建の取り組み
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本尚樹
2. 発表標題 高压殺細胞装置の開発
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 密閉容器	発明者 森本尚樹、国立循環器病研究センター、 阪神化成工業株式会社	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-030575	出願年 2023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	山中 浩気 (Yamanaka Hiroki) (70760833)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	片山 泰博 (Katayama Yasuhiro) (80842434)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	仲野 孝史 (Nakano Takashi) (50892634)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	

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
---------	---------