

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) 再生医療の産業化に向けた評価基盤技術開発事業
再生医療等の産業化に向けた評価手法等の開発
(英語) Project Focused on Developing Key Evaluation Technology:
Evaluation for Industrialization in the Field of Regenerative Medicine
- 研究開発課題名：(日本語) 皮膚再建に用いる同種培養皮膚の基礎研究ならびに製品開発
(英語) Research and product development of allogeneic cultured skin for
dermal reconstruction
- 研究開発担当者 (日本語) 株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (J-TEC)
再生医療事業 (皮膚領域) 首席 井家 益和
- 所属 役職 氏名：(英語) Head of RM Skin Business, Japan Tissue Engineering Co.,Ltd [J-TEC]
Masukazu Inoie
- 実施期間：平成 28 年 5 月 17 日 ～ 平成 28 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 微生物学的試験の実施および手法の評価
開発課題名：(英語) Practice of microbiological tests and evaluation of their protocols
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 東京医科歯科大学 再生医療研究センター
准教授 清水 則夫
- 所属 役職 氏名：(英語) Associate Professor, Center for stem cells and Regenerative Medicine,
Tokyo Medical and Dental University
Norio Shimizu, Ph.D.
- 分担研究 (日本語) 皮膚組織の採取、動物試験の実施および手法の評価、医師主導治験の実施
開発課題名：(英語) Collection of skin tissues, performance of animal studies and
evaluation of their protocols, and starting of investigator-initiated
clinical trial

研究開発分担者 (日本語) 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) Professor and Chairman, Department of Plastic and Reconstructive
Surgery, Graduated School of Medicine, Kyoto University
Shigehiko Suzuki, MD., Ph.D.

II. 成果の概要（総括研究報告）

本研究では、大量生産を前提とする同種細胞を用いた再生医療製品の開発を行う。同種培養皮膚の開発を通じて、製品の品質管理、セルバンク等の構築、ならびに管理方法等を標準化することによって、同種細胞を用いた製品を輩出しやすい国内環境を構築することが目標である。

同種細胞ソースの確保

同種細胞ソースとなるヒト皮膚を採取する際のドナースクリーニングに関する安全性評価スキームを構築し、2016年7月に薬事戦略相談対面助言を行った上で、ウインドウピリオドを勘案した再検査を含む検査項目の詳細についてPMDAと合意した。これまでに京都大学が計7例の多指症、副耳、不全唇裂の患者から商業的臨床利用可能な皮膚組織に関する同意を得て採取した乳幼児由来組織を、J-TECが受け入れて表皮細胞と線維芽細胞を分離して培養を開始した。組織採取時のウイルス検査の結果、何れも直ちに不適合となるドナーはなく培養経過も順調で、予定本数のセルストックを作製することができた。東京医科歯科大学はNATによるウイルス検査を実施する体制を整備した。

商業用セルバンクの構築

予備検討として京都大学より受け入れた研究用の9例の皮膚組織を用いて、表皮細胞の特性解析を行った。症例毎に増殖速度の違いが認められたが、全ての症例で5継代まで増殖速度は低下しなかった。サイトカインアレイによる網羅的解析の結果、ヒト表皮細胞は44種類のサイトカインを産生していた。ドナーの妥当性を判断する目的で、多指症患者由来の表皮細胞3症例のGバンド解析による核型分析の結果、疾患に共通の染色体異常は確認されなかった。

臨床用の表皮細胞のセルストック2例を継代培養し、製造原材料の候補となるマスターセルバンク、ワーキングセルバンク、およびCAL（製造のためにin vitro細胞齢の上限にまで培養された細胞）を作製した。

研究用の皮膚組織由来の線維芽細胞の特性解析として、専用培地の評価、細胞分類および血管新生誘導能を評価した。その結果、10%ウシ胎児血清含有培地と比較して、市販の線維芽細胞専用培地の細胞増殖能は著しく高く、低血清線維芽細胞分化培地では細胞増殖能は低かった。線維芽細胞を血管内皮細胞と共培養して評価する血管新生誘導能を評価した結果、市販の線維芽細胞専用培地を用いた未成熟型の線維芽細胞のみが血管新生誘導能を有していた。

同種培養皮膚の設計

同種培養皮膚の製品化にあたり、表皮細胞を用いた「培養表皮」、線維芽細胞を用いた「培養真皮」および両方の細胞を用いた「複合型培養皮膚」を試作した。

京都大学は、同種培養表皮の有効性評価試験として、糖尿病マウスの全層欠損モデルとラット全層皮膚欠損網状自家植皮併用モデルに対するヒト培養表皮の移植試験を行った結果、対照群に比較して培養表皮移植群の明らかな創収縮が確認された。

J-TECは、同種培養真皮の有効性評価試験としてラット全層欠損モデルに対するヒト培養真皮の移植試験を行った結果、生分解性メッシュのみを移植するよりも、ヒト線維芽細胞が組み込まれた培養真皮を移植した方が、肉芽の形成が良好で、創傷部位の表皮の伸展が発達することを確認した。

医師主導治験の実施

Ⅲ度熱傷創、深達性Ⅱ度熱傷創および採皮創を対象とした同種培養表皮のFeasibility試験を医師主導治験として京都大学が行う内容について、生物統計学的に妥当性のあるエンドポイントと症例設計について京都大学と検討した。

In this study, mass-produced regenerative medicines were developed using allogeneic cells. The goal is the establishment of a nation-wide environment in Japan that favors the development of products using allogeneic cells. This process was based on the research of allogeneic cultured skin and on the standardization of quality control for procedures, cell bank establishment and operation practices.

SECUREMENT OF ALLOGENEIC CELL SOURCE

The safety evaluation scheme for the screening of skin biopsy donors, including a second blood drawing that accounts for a window period of viral infections, was established and agreed by the PMDA at the regulatory strategy consultation held on July 2016. A surgeon from Kyoto University obtained informed consent from the legal guardians of 7 infants with polydactyly, accessory auricle or cleft lip, for the commercial clinical use of excised tissues. Keratinocytes and fibroblasts were isolated from each skin tissue and cultivated at J-TEC. All donors passed the checks and inspections at the time of tissue excision, and the estimated required number of cryopreserved cell stocks was obtained thanks to well-poliferating cells. The virus assessment systems based on the NAT method were prepared at Tokyo Medical and Dental University.

MANUFACTURING OF CELL BANK FOR COMMERCIAL USE

In a preliminary study, the characteristics of keratinocytes isolated from 9 skin tissues donated for research were analyzed. Although rates varied, all keratinocytes maintained high cell proliferation until the 5th passage. Growth factors and cytokines produced by keratinocytes were measured with an antibody array, and 44 cytokines were detected in the culture supernatant. In order to determine the donors' suitability, the karyotype of keratinocytes isolated from 3 polydactyly patients was examined by the G-banding method. The results showed that no chromosomal abnormalities common to the disease were detected.

Keratinocytes from 2 donors considered source material candidates for the production of allogeneic products, were serially subcultured. These cells were used in the establishment of the master cell bank, the working cell bank, and preparation of CAL (cells at the limit of in vitro cell age)

Fibroblasts derived from skin tissues donated for research were characterized by the analysis of proliferation, morphology and angiogenic activities using different culture media. It was found that fibroblasts proliferated faster and showed morphologies with immature cytoskeletons when cultured with commercial medium specifically designed for fibroblasts, in comparison to fibroblasts cultured with conventional medium supplemented with 10% fetal bovine serum. In contrast, fibroblasts cultured with medium supplemented with low serum showed slower proliferation and flattened morphologies with mature stress fibers. Fibroblasts cultured with commercial medium possessed high angiogenic activities, whereas fibroblasts cultured with neither conventional medium nor low serum medium did not show any angiogenic activity.

DESIGN OF ALLOGENEIC CULTURED SKIN

The prototypes of "cultured epidermis" using keratinocytes, "cultured dermis" using fibroblasts, and "cultured composite skin" using both of keratinocytes and fibroblasts were developed.

In Kyoto University, the effectiveness of allogeneic cultured epidermis was evaluated by grafting human cultured epidermis to full-thickness wounds of diabetic mellitus mice or full-thickness wound with meshed autograft in rats. It was found that cultured epidermis promoted epithelialization more effectively than the control model.

At J-TEC, the efficacy of human cultured dermis in rat full-thickness wound was assessed. It was found that the cultured dermis enhanced granulation tissue formation and epithelialization more efficiently compared to biodegradable mesh alone.

STARTING OF INVESTIGATOR-INITIATED CLINICAL TRIAL

The endpoint and protocol design of a feasibility study implemented at Kyoto University as an investigator-initiated clinical trial for the potential treatment for deep burn wounds, deep dermal burns or donor site wounds are under consideration.

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 件、国際誌 件）
（なし）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 培養皮膚をアログラフトとして用いた重症熱傷“ハイブリッド治療”，口頭，坂本道治，森本尚樹，井家益和，篠原力，伊藤蘭，荻野秀一，神野千鶴，鈴木茂彦，第42回日本熱傷学会総会，2016/6/2，国内.
2. 糖尿病マウス皮膚欠損創における凍結保存ヒト培養表皮の創傷治癒促進効果，口頭，坂本道治，森本尚樹，井家益和，高萩みき，篠原力，伊藤蘭，鈴木茂彦，第25回日本形成外科学会基礎学術集会，2016/9/15，国内.
3. 同種培養表皮の開発～細胞治療を標準治療へ～，口頭，坂本道治，森本尚樹，井家益和，篠原力，鈴木茂彦，第46回日本創傷治癒学会，2016/12/10，国内.
4. 同種細胞を用いた皮膚組織の再生，口頭，坂本道治，森本尚樹，井家益和，篠原力，鈴木茂彦，第16回再生医療学会，2017/3/7，国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 再生医療の世界，井家益和，蒲郡市立海の科学館ミニ展示，2016/8/1-31，国内.
2. 小学生のための再生医療体験講座，井家益和，蒲郡市生命の海科学館，2016/8/13，国内.
3. 再生医療ラボ見学ツアー，梶賢一郎，蒲郡再生医療産業化推進委員会生徒派遣事業，2017/2/4，国内.

(4) 特許出願
（なし）