

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10766

研究課題名(和文)細胞シート技術を用いた難治性中耳疾患に対する粘膜再生治療の開発

研究課題名(英文)Mucosal regenerative medicine for middle ear by using cell sheet technology

研究代表者

小島 博己(Hiromi, Kojima)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60234762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：中耳真珠腫や癒着性中耳炎術後、早期に中耳粘膜が再生できれば、術後鼓膜の再癒着や再形成性真珠腫の予防が可能と考えられる。温度応答性培養皿を用いて自己の鼻腔粘膜細胞シートを作製し、外耳道後壁保存型鼓室形成術の際に、中耳の粘膜欠損部へ移植する新たな術式を開発した。平成27年度までは「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、平成29年度からは「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(再生医療新法)」に準じてヒト臨床研究を行った。中耳真珠腫7例、癒着性中耳炎3例の患者に対して、自己鼻腔粘膜細胞シート移植を併用した外耳道後壁保存型鼓室形成術を施行した。すべての症例で有害事象や合併症を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The recurrence of cholesteatoma and re-adhesion of the tympanic membrane are often occurred after conventional tympanoplasty. Although regenerated middle ear mucosa plays a key role in prevention of recurrence, much of mucosa is lost in the process of the tympanoplasty. To overcome this problem, we considered that the middle ear mucosa can be regenerated rapidly, the results of treatment can potentially be improved.

After basic research, we developed a novel regenerative medicine combining tympanoplasty and autologous nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation for regeneration of the middle ear. We performed this procedure on seven patients with middle ear cholesteatoma and three patients with adhesive otitis media in this study. All patients showed favorable postoperative course with no adverse events or complications and the patients' hearing ability post-transplantation remained good.

研究分野：耳科学

キーワード：中耳粘膜 粘膜再生 細胞シート 中耳真珠腫 癒着性中耳炎 温度応答性培養皿 再生医療 鼻腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

中耳粘膜は生理的なガス換気能を有し、中耳腔に含気を保たせることで音を効率よく伝達させている。癒着性中耳炎や中耳真珠腫に対する治療は鼓室形成術が主体であるが、術後の中耳腔の含気を保つための中耳粘膜の再生および生理的なガス換気能の回復が極めて重要である。しかし中耳炎を伴った症例では粘膜機能は元来障害されているため術後の粘膜上皮の再生は遅延し、有効な含気腔を作ることが困難である。特に癒着性中耳炎は他の中耳疾患と比較しても鼓膜の再癒着を引き起こし、治療成績が非常に悪い。また中耳真珠腫における理想的な術式は外耳道後壁を保存し、かつ含気化が良好な中耳腔、乳突腔を形成させることであるが、もともと気胞化が抑制されている乳突腔における粘膜再生は極めて困難なことが多く、結果的に真珠種の再発を引き起こしてしまう。鼓膜の再癒着や真珠腫の再発を確実に防止する方法や統一された手術法はいまだ存在せず、従来の治療法には限界がある。そこで我々は、術後早期に中耳粘膜の再生を促し鼓膜の再癒着や真珠腫の再発を防止するために、再生医療において近年実用化が進められている細胞シート技術の中耳への応用を考えた。安全かつ容易に採取でき、患者への負担が少ないという臨床実現化が可能な視点から鼻腔粘膜を用いて自己の鼻腔粘膜細胞シートを作製し、鼓室形成術の際に粘膜欠損部に移植するという新規治療法を開発した。

2. 研究の目的

今回のヒト臨床研究ではヒトの鼻腔粘膜細胞シートを用いた中耳再生医療の clinical trial を実施する。さらに、輸送を伴う多施設共同臨床研究で複数術者でのデータも蓄積する。これらの取り組みにより、安全性の客観的評価と臨床効果に関するデータを収集することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 27 年度には、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じて平成 26

年度より開始した臨床研究を行った。患者より鼻腔粘膜を採取して 26 日間培養して細胞シートを作製し、鼓室形成術後の中耳に移植した。

平成 28 年度からは、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（再生医療新法）」に準じ、聖マリアンナ医科大学特定認定再生医療等委員会での審査を受けて承認を取得した。平成 27 年度までに行った先行研究よりも発展させて、聖マリアンナ医科大学との多施設共同臨床研究とした。患者の鼻腔粘膜組織を採取して東京慈恵会医科大学の CPC へ輸送し細胞シートを作製する。作製した細胞シートを聖マリアンナ医科大学へ輸送し、細胞シートを移植する。東京慈恵会医科大学内で 7 例、輸送を伴う聖マリアンナ医科大学で 3 例の計画とした。

平成 29 年度には、この臨床研究のコールドランとして、ボランティアドナー 3 例の輸送試験を行い、輸送容器や輸送温度を検討した。平成 29 年 7 月からは、臨床研究を再開した。以下に臨床研究の対象患者について記載する。

【選定基準】

次の選択条件をすべて満たす患者を被験者として選択する。

中耳手術（鼓室形成術）を必要とする次に挙げる疾患のいずれかが診断されていること。

癒着性中耳炎 中耳真珠腫

年齢 20 歳以上

患者本人による署名および日付の記載入りの同意文書を得ていること。

【除外基準】

次のいずれかの条件に該当する者は除外する。

感染症（細菌・真菌・ウイルスなど）を有する症例

鼻腔ポリープを合併した鼻副鼻腔疾患に罹患している人

抗血小板薬・抗凝固剤を内服している人

妊婦および妊娠の可能性のある人

その他、何らかの理由により本研究を実施するのに不相当と考えられる症例

- 1) 移植約3週間前に、外来にて鼻腔粘膜組織および血液を採取する。
- 2) 採取した鼻腔粘膜組織および回収した血清を用いて、試験製造時に十分検証された製造工程に従い、GMP 対応施設での無菌操作で自己鼻腔粘膜細胞シートを作製する。
- 3) 移植前にあらかじめ各種品質確認試験を施行し、作製した細胞シートが規格した基準値を満たすことを確認する。
- 4) 中耳手術(鼓室形成術)の際に、粘膜欠損部である露出した骨面に細胞シートを移植する。
- 5) 術後は、通常の中耳手術後と同様に、鼓膜所見、CT 所見による再発の有無や、聴力検査などによる機能的評価を行う細胞シートの有効性を検証する。また、有害事象の発現の有無の確認も行い、細胞シートの人臨床における安全性についての評価も行う。

4. 研究成果

平成27年度には、中耳真珠腫4例、癒着性中耳炎1例の患者を対象とする臨床研究(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じる)を行った。患者より鼻腔粘膜を採取し、GMP 対応施設内で26日間培養して細胞シートを作製した。全ての症例の細胞シートにおいて細胞数 $>1.0 \times 10^5$ 個、細胞生存率 $>70\%$ 、ケラチン陽性率 $>70\%$ という設定した規格値を満たしており、安全に移植することに成功した。日本耳科学会が定める術後成績に沿って、移植1年後に聴力やCT 評価を行った。いずれも移植後経過は良好で真珠腫の再発や鼓膜の再癒着、有害事象や副作用も認めなかった。さらに、聴力改善や中耳腔の含気化も認められ、鼻腔粘膜細胞シートの移植が術後成績に重要であると考えられた。

平成28年度からは、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(再生医療新法)」に準じ、聖マリアンナ医科大学特定認定再生医療等委員会の承認を取得した。

この輸送を伴う臨床研究をめざし、輸送した場合にも同等の鼻腔粘膜細胞シートを作製できるかどうかを試す、3例の輸送コ

ールドランを行った。36°C に保温できる輸送容器を用いることで、5時間の輸送を経ても輸送前と同等の性質であることを確認した。

7月より、聖マリアンナ医科大学と共同臨床研究を開始した(日医治促IDJMA-IIA00316)。輸送を伴っても細胞シートは問題なく回収することができ、移植することに成功した。これまでに聖マリアンナ医科大学で2例、東京慈恵会医科大学で3例の、合わせて5例の細胞シート移植手術を成功させた。いずれの症例においても合併症ならびに有害事象は認められておらず、高い安全性が示されている。今後、各移植手術の1年後に聴力、CT、鼓膜所見などの臨床研究成績をまとめる。

現在まで蓄積した細胞シート移植症例のまとめについて、以下の図に示す。

症例	年齢/性別	診断	再発	聴力 (移植前 vs 移植後 dB)	手術日	術後期間	合併症	備考
ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(2014年1月～2015年5月)								
1	28/F	中耳真珠腫	なし	23.3 18.3	2014.1	2年3ヶ月	なし	
2	61/F	中耳真珠腫	なし	56.7 35.0	2014.7	1年8ヶ月	なし	
3	38/M	中耳真珠腫	なし	26.7 25.0	2014.12	1年4ヶ月	なし	
4	54/M	中耳真珠腫	なし	53.3 31.7	2015.2	1年2ヶ月	なし	
5	52/F	癒着性中耳炎	なし	61.7 56.7	2015.5	1年0ヶ月	なし	
再生医療等の安全性の確保等に関する法律(2017年7月～)								
6	39/M	中耳真珠腫	未評価	18.8 未評価	2017.8	8ヶ月	なし	
7	58/M	癒着性中耳炎	未評価	57.5 未評価	2017.10	6ヶ月	なし	
8	38/M	中耳真珠腫	未評価	30.0 未評価	2017.11	5ヶ月	なし	聖マリアンナ医大
9	38/M	癒着性中耳炎	未評価	42.5 未評価	2017.11	5ヶ月	なし	
10	62/F	中耳真珠腫	未評価	10.0 未評価	2018.3	1ヶ月	なし	聖マリアンナ医大

今後の発展として、造腫瘍性試験や一般毒性試験などのPMDAが定める非臨床安全性試験データを蓄積することで医師主導治験につながり得ると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

1. Hama T, Yamamoto K, Yaguchi Y, Murakami D, Sasaki H, Yamato M, Okano T, Kojima H. Autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert for transplantation after middle ear surgery. J Tissue Eng Regen Med. 2017, 11: 1089-1096. (査読あり)

2. Yamamoto K, Yamato M, Morino T, Sugiyama H, Takagi R, Yaguchi Y, Okano T, Kojima H. Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheet transplantation. NPJ Regen Med, 2017, Article number: 6. (査読あり)

〔学会発表〕(計10件)

1. Hiromi Kojima. The new technology: canal wall up tympanoplasty with transplantation of tissue-engineered cell sheets. Politzer Society(招待講演), 2015, Niigata, Japan.

2. Hiromi Kojima. The new technology: canal wall up tympanoplasty with transplantation of tissue-engineered cell sheets. 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and neck surgery(招待講演), 2015, Tokyo, Japan.

3. 小島 博己. 難治性中耳疾患に対する再生医療(ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した鼓室形成術). 日本再生医療学会総会(招待講演), 2016, 大阪.

4. Hiromi Kojima. The new technology: Canal up tympanoplasty with transplantation of tissue-engineered cell sheets. 5th East Asian Symposium on Otology & 2nd Asian Otology Meeting(招待講演), 2016, Sha Tin, Hong Kong.

5. Hiromi Kojima. Moving forward toward the clinical use of cell-sheet regenerative medicine. (Corporate Seminar) The 22nd Annual Meeting of Japan Society of Gene and Cell Therapy(招待講演), 2016, Tokyo, Japan.

6. 小島 博己. 鼻粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生. 第26回日本耳科学会(招待講演), 2016, 長野.

7. 小島 博己. モーニングセミナー「耳小骨形成」, 第118回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2017, 広島.

8. Hiromi Kojima. Realization of middle ear mucosal regeneration by cultured nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation, JSRM-ACTO Joint Symposium(招待講演), 2017, Tokyo, Japan.

9. 小島 博己. 鼓室形成術のコツ, 日本耳鼻咽喉科学会 第31回専門医講習会(招待講演), 2017, 兵庫.

10. 小島 博己. 「中耳真珠腫の治療戦略」～従来の手術の限界と再生医療による新規治療の試み～.(耳鼻咽喉科専門医領域講習), 第2回青葉・愛宕耳鼻咽喉科研究会(招待講演), 2018, 宮城.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: 中耳粘膜様細胞シート、その製造方法及びその利用方法

発明者: 濱 孝憲、小島 博己、森山 寛、大和 雅之、岡野 光夫

権利者: 学校法人東京女子医科大学、東京慈恵会医科大学、株式会社セルシード

種類: 特許

番号: 特許第6021643号

取得年月日: 平成28年11月9日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

Medical Note ホームページ

<https://medicalnote.jp/contents/171128-004-BJ>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小島 博己 (KOJIMA, Hiromi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：60234762

(2)研究分担者

和田 弘太 (WADA, Kota)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：20307482

山本 和央 (YAMAMOTO, Kazuhisa)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：50408449

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()