

令和元年6月25日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11195

研究課題名(和文) 温度応答性培養皿を利用した真珠腫上皮シートの作製と真珠腫の病態解明

研究課題名(英文) The development of artificial tympanic membrane and cholesteatoma epithelium sheets by reproductive tissue engineering to be aimed for elucidation of pathogenesis of cholesteatoma

研究代表者

田中 康広 (TANAKA, YASUHIRO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40266648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトより採取した中耳粘膜より温度応答性培養皿を用いて、人工中耳粘膜シートを作製した。さらに外耳道皮膚より採取されたkeratinocyteとECMからなる鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製し、人工中耳粘膜と融合させて人工鼓膜を構築させた。この人工鼓膜は電子顕微鏡での観察および免疫組織学的に正常鼓膜と類似する構造であることが確認された。この人工鼓膜を用いて真珠腫モデルの作製を試みたが、ケミカルメディエーターやサイトカインの刺激のみでは、真珠腫の発現を誘発することは出来なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真珠腫の病態解明に関する研究は、これまでほとんどが術中に採取した真珠腫の検体から組織標本を作製し、標本内における各種サイトカインや増殖因子等の発現について検討する手法が主体であった。真珠腫上皮細胞を組織として構築し、各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させてその反応をみた研究は今までに存在しない。そのため、本研究の成功は真珠腫の病態解明を行ううえで、in vitroで真珠腫の組織的な反応を捉えることが可能となり、研究のバリエーションが大きく広がる。結果としては不十分な内容で終了したが、今後も本研究を継続し、真珠腫の研究に貢献する所存である。

研究成果の概要(英文)：We developed artificial middle ear mucosal sheets from cultured middle ear mucosa that was taken from middle ear cavity of a patient who was not involved in a middle ear disease by using the temperature-responsive culture dish. Then, we developed tympanic membrane epithelium sheets consist of extra cellular matrix and keratinocyte that was taken from external ear canal of the same patient. After that, we finally manufactured an artificial tympanic membrane by fusion of artificial middle ear mucosal sheets and tympanic membrane epithelium sheets. We confirmed this artificial tympanic membrane was resembled normal tympanic membrane from the viewpoint of pathohistologic characteristics by immunohistochemical staining and electron microscope findings. Although, we attempted to develop an experimental middle ear cholesteatoma model by using the artificial tympanic membrane, it was impossible to develop it only by the stimulation of some chemical mediators and cytokines.

研究分野：医歯薬学

キーワード：再生医学 細胞・組織

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

真珠腫性中耳炎の病態を解明するため、これまでも *in situ* tissue engineering を応用して人工三次元皮膚を作製し、病態解明を行ってきた。その結果、鼓膜上皮層における発症の一因を解明することには成功したが、鼓膜粘膜層における病態解明には至らなかった。その原因としては鼓膜上皮層、固有層、粘膜層からなる鼓膜を人工的に三次元構築することが困難なことが挙げられ、人工鼓膜の作製に成功した報告はこれまでに一例もない。人工鼓膜を作製し、真珠腫性中耳炎の発症要因ならびに病態を解明することは *in vitro* における研究方法として、これまでにない新たな局面を見いだせる斬新な方法と考える。そこでこれまでの問題点を克服するため温度応答性培養皿を利用した人工鼓膜の作製に注目した。

これまでの我々の研究では三次元培養皮膚の作製に関しては Air-liquid interface 法を用いて、組織学的に生体に近似した鼓膜上皮層および固有層を作製することには成功しているが、問題点も散見される。また中耳粘膜の上皮細胞を三次元培養し、組織として作製することには成功したが、人工鼓膜を作製できるレベルには達していない。そこで温度応答性培養皿を利用した中耳粘膜上皮細胞を用いた培養細胞シートを作製し、さらに人工鼓膜の作製を目指す。そして、人工鼓膜のみならず、真珠腫上皮の細胞シートを作製し、両者間での構造の違いや各種刺激を加えた際の mRNA やタンパクレベルでの発現の差異について分子生物学的に検討することにより、真珠腫の病態解明に結びつけたい。近年、採取された真珠腫と正常外耳道皮膚からマイクロアレーにより、真珠腫に有意に発現する mRNA の報告は認められるが、各種サイトカインやケモカインによる刺激を加え、それらの発現量の変化について検討した報告はない。そのため、真珠腫の病態解明をすすめるうえで、本研究は新たな局面を見出せるものと考えた。

## 2. 研究の目的

真珠腫の病態解明に関する研究は、これまでほとんどが術中に採取した真珠腫の検体から組織標本を作製し、標本内における各種サイトカインや増殖因子等の発現について検討する手法が主体であった。また同様に採取した検体より RNA を抽出し、その発現量の差を正常外耳道皮膚と比較する手法も最近では多い。しかしながら、細胞レベルでは各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させて、その反応をみる研究は散見されるが、真珠腫上皮細胞を組織として構築し、各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させてその反応をみた研究は今までに存在しない。この手法が確立されれば、真珠腫の病態解明を行ううえで、*in vitro* で真珠腫の組織的な反応を捉えることが可能となり、研究のバリエーションが大きく広がることが予想される。

さらにその反応を正常な鼓膜と同じ構造をもつ人工鼓膜と比較することにより、真珠腫に特異的な mRNA やタンパクの発現が確認される可能性も否定できない。少なくとも各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させた際に外耳道皮膚と比較して真珠腫に有意に発現する mRNA やタンパクを確認することができれば、それらの分子のもつ役割や真珠腫の病態にどのように関与しているのかが、徐々に解明することが可能となる。また、真珠腫の増殖を促す因子や特異的に作用するタンパクを発見することが可能であれば、真珠腫の進展を止める薬剤の開発に結びつくと考えられる。

温度応答性培養皿を応用した研究は研究者の一員としてかつて在籍していた慈恵医大が中耳粘膜再生に関して臨床試験を行っている状況ではあるが、耳鼻咽喉科領域においてはほとんど周知されていないのが現状である。この技術がさらに広まることにより真珠腫に関する基礎的な研究はさらに発展するものと思われる。当研究が真珠腫の病態を明らかにし、手術以外に治療法がない当疾患の新たな治療法の開発に結びつくことを最終的な目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 真珠腫組織中に特異的に発現する分子の検討

まずは術中に検体の採取を行い、正常外耳道皮膚と真珠腫組織中における mRNA レベルでの発現の相違についてマイクロアレーを用いて確認し、真珠腫組織に有意に発現を多く認める mRNA を同定する。検体を採取した際に同一組織の一部を使用して凍結切片を作製し、真珠腫組織に有意に発現を多く認めた mRNA の局在を *in situ* hybridization を行い、確認する。そして実際にタンパクレベルでの発現の有無を同一組織中の凍結標本を用いて免疫組織学的に発現部位の確認を行う。mRNA レベルおよびタンパクレベルでの発現部位を比較し、その分子が真珠腫組織において paracrine もしくは autocrine として機能するのか、どのような役割を有しているのか検討する。

#### (2) 温度応答性培養皿を利用した人工鼓膜および真珠腫上皮細胞シートの作製

外耳道皮膚を採取し、ケラチノサイトの分離を行い、初期培養を行う。その後ケラチノサイトを温度応答性培養皿に移動させ培養を継続し、基底膜とともに ECM を有する鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製する。

次に中耳粘膜を採取し、粘膜上皮成分と fibroblast に分離する。分離した細胞を温度応答性培養皿にて培養し、人工中耳粘膜シートを作製する。先に作製した鼓膜上皮シートと中耳粘膜シートが ECM を介し、表裏一体となるように基底膜面で融合させ、三次元人工鼓膜を作製する。

真珠腫上皮を採取後よく洗浄し、初期培養を行う。初期培養後、温度応答性培養皿に真珠腫上皮細胞を移動させ培養を継続させ真珠腫上皮シートを作製する。

上記方法にて作製した人工鼓膜シートおよび真珠腫上皮シートに関しては電顕的に基底膜、細胞外マトリックス、細胞間接着、tight junction の存在を確認する。免疫組織学的にはフィラグリンや caspase-14、Ki-67 などの発現から上皮の分化、増殖を検討する。

#### (3) 各種因子を付加した際の真珠腫上皮に影響を及ぼす因子の検討

前述した方法で作製した人工鼓膜および真珠腫上皮細胞シートに各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させたのち、マイクロアレーを用いて mRNA レベルでの発現について比較検討する。刺激因子としては LPS や IL-4, TNF- $\alpha$  をはじめとし、matrix metalloprotease (MMP), epidermal growth factor (EGF), keratinocyte growth factor (KGF) 等を用いる。

上記の実験にて人工鼓膜に比較して真珠腫上皮細胞シートで有意に発現の上昇を認めるものに対しては人工鼓膜および真珠腫上皮細胞シート上での局在を確認するため *in situ* hybridization を行い比較検討する。同様にタンパクレベルでの発現についても免疫組織学的な染色を行い、その発現様式と程度について確認を行う。

人工鼓膜に比較して真珠腫上皮細胞シートで有意に発現の上昇を認めた mRNA およびタンパクに関しては刺激因子に対して濃度依存的であるのか、時間依存的であるのか、抗体を用いて刺激をブロックした場合の反応がどのようになるのかを検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 真珠腫組織中に特異的に発現する分子の検討

正常外耳道皮膚と真珠腫組織中における mRNA レベルでの発現の相違についてマイクロアレイを用いて確認したところ、真珠腫上皮において TGF- $\beta$  と GM-CSF の発現強度が正常外耳道皮膚よりも2倍以上高値であり、興味深い因子であると考えられた。特に真珠腫上皮では IL-1 $\beta$  での刺激により TGF- $\beta$  と GM-CSF の mRNA 発現は上昇する結果が得られ、上皮下の線維芽細胞が皮膚に比べ多くの TGF- $\beta$  と GM-CSF を産生し、上皮増殖に影響を与えているものと推測された。

##### (2) 温度応答性培養皿を利用した人工鼓膜および真珠腫上皮細胞シートの作製

人工鼓膜の細胞シート作製に関しては以下の方法で行った。まずは採取した中耳粘膜を *in vitro* にて粘膜上皮成分と fibroblast に分離培養し、これらの培養細胞を上皮層は単層上皮、粘膜下はコラーゲン内に fibroblast を加えて結合組織となる層を作製した。これらのシートを重合させ、上皮層および粘膜下層の2層からなる人工中耳粘膜シートを作製した。

形態的な特徴を観察するため組織学的な検討を行ったところ、単層の上皮と上皮下となる結合組織の層が確認され、正常中耳粘膜と同様な構造を有することが明らかとなった(図1)。上皮細胞の分化や増殖能を確認するため、サイトケラチンおよび caspase-14 の発現パターンを確認したが、その発現様式は生体内の正常中耳粘膜と同様であることが確認された。また増殖能に関しても proliferating cell nuclear antigen (PCNA) や Ki-67 などの発現は生体内の正常中耳粘膜と同様であり、増殖能に関しても相違を認めなかった。

一方、電子顕微鏡下を用いて人工中耳粘膜シートを観察したところ、正常中耳粘膜と同様な組織構造が観察されたが、培養により繊毛が減少することが確認された。微絨毛に関しては正常と同じ程度の存在が確認された(図2)

次に外耳道皮膚より採取された keratinocyte を分離培養し、keratinocyte と ECM からなる鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製した。この鼓膜上皮シートを組織学的に観察すると通常の重層扁平上皮よりも重層化が抑制されている上皮層が形成されていることが判明した。電子顕微鏡下による観察では、基底膜、ECM、tight junction の存在が確認

され、上皮層の重層化以外は正常な鼓膜上皮層と類似した構造であることが確認された。この鼓膜上皮シートと中耳粘膜シートが ECM を介し、表裏一体となるように融合させ、三次元人工鼓膜を試みたが、融合後の組織形態の維持が困難であり、また培養継続を行うための方法に苦慮し、予想したような人工鼓膜の作製は出来なかった。

鼓膜上皮シートの重層化に関する問題点に関しては今後、air-liquid interface method などを用いて組織の分化を誘導する培養法などを検討すべきと考えられた。また、鼓膜上皮シートと中耳粘膜シートの融合に関しても特殊な技術の開発が必要であり、融合後の培養方法に関する検討もさらに進めていく必要がある。

### (3) 各種因子を付加した際の真珠腫上皮に影響を及ぼす因子の検討

人工鼓膜および真珠腫上皮細胞シートに IL-4, TNF- $\alpha$  などの各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させ、刺激によって反応する各種タンパクの発現を ELISA および免疫組織染色を用いて測定した。しかしながら、当初の予想に反し、EGE や KGF などの発現はコントロールとして用いた正常皮膚における発現と変化が見られなかった。このことに関しては、今回用いた粘膜シートには中耳粘膜細胞とケラチノサイト、線維芽細胞のみしか含まれておらず、炎症や免疫応答に関与するリンパ球や抗原提示細胞が含まれていないため、各種サイトカインやケミカルメディエーターを付加してもその反応は微々たるものであったと考えられた。この実験系に関する限界とも考えられ、今後さらなる研究方法の検討が必要と思われた。

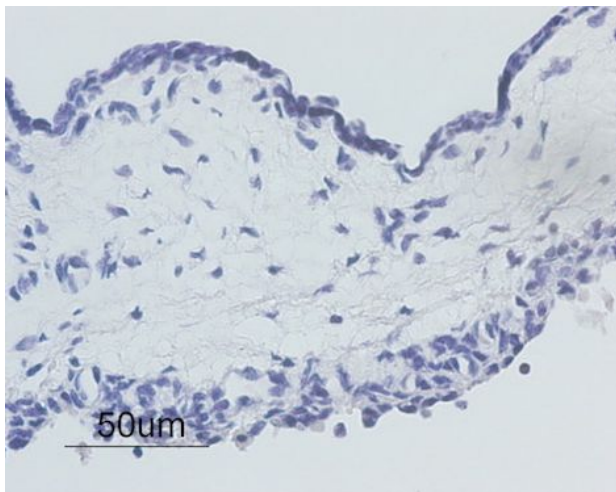
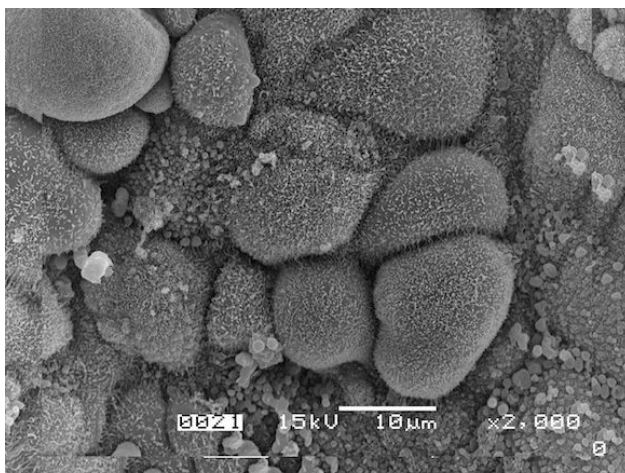


図 1. 作製された中耳粘膜シート



## 図 2. 中耳粘膜シートの走査電顕像

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

田中 康広、中耳手術における最近のトレンドと今後の展望  
日本耳鼻咽喉科学会福井県地方部会 第 33 回学術講演会 (招待講演)  
2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

#### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。