

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11313

研究課題名（和文）自己幹細胞誘導を用いた中耳粘膜再生による中耳真珠腫根治治療へ向けての研究

研究課題名（英文）Study for the curative treatment of middle ear cholesteatoma by regeneration of middle ear mucosa using autologous stem cell induction

研究代表者

伊藤 吏（Ito, Tsukasa）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：50344809

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）：モルモットを用いて中耳粘膜障害モデルを確立した。全身麻酔下に1.9mm硬性内視鏡を用いて、経外耳道的操作で鼓膜前方を開窓後、耳管周囲にある線毛上皮領域の中耳粘膜を搔爬した。術後2週でHE染色で粘膜搔爬部位の組織学的評価を行うと、粘膜障害モデルでは線毛上皮細胞は消失しており、正常粘膜は再生していなかった。

この障害モデルに対して、自己の骨髄間葉系間細胞の誘導を介して組織修復に働く分子であるhigh-mobility group box 1（HMGB1）を局所投与し、中耳粘膜再生を試みたが、粘膜障害部位の肉芽組織の増生と粘膜下の骨肥厚を認め、HMGB1はむしろ炎症反応を促進してしまうと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中耳粘膜再生の研究を進めることにより、耳科手術後の中耳粘膜再生治療が可能となれば、これまで予防困難であった真珠腫再形成再発を比較的簡便な方法で制御できるとともに、術後聴力成績の向上も期待され、中耳炎症例のQOLにも貢献できる。本研究では内視鏡下経外耳道操作による低侵襲な方法で、HMGB1局所投与による内在性骨髄間葉系間細胞（MSC）誘導を介した中耳粘膜再生を試みたが、結果としては逆に障害後の炎症を促進させるものであった。現在、HMGB1に代わる薬剤として、鼻粘膜での線毛上皮細胞の回復効果が報告されているレチノイドを用いた中耳粘膜再生のための研究を開始している。

研究成果の概要（英文）：A model of middle ear mucosal damage was established using guinea pigs. Via transcanal approach using a 1.9 mm rigid endoscope under general anesthesia, the middle ear mucosa in the ciliated epithelial region around the Eustachian tube was scraped after opening the anterior tympanic membrane. Histological evaluation of the mucosal damage site by HE staining at 2 weeks postoperatively showed that the ciliated epithelial cells had disappeared and the normal mucosa had not regenerated in the mucosal damage model.

We attempted to regenerate the mucosa of the middle ear by topically administering high-mobility group box 1（HMGB1）, a molecule that acts in tissue repair through induction of autologous bone marrow mesenchymal stromal cells, but found increased abnormal granulation tissue and submucosal bone thickening at the site of mucosal damage, suggesting that HMGB1 rather promotes an inflammatory response.

研究分野：耳鼻咽喉科頭頸部外科

キーワード：中耳粘膜再生 HMGB1 内視鏡下耳科手術 真珠腫性中耳炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、中耳真珠腫の根治治療は手術(鼓室形成術・乳突削開術)による真珠腫の完全摘出と鼓膜再建、耳小骨連鎖再建が行われている。中耳真珠腫は再発も少なくない疾患であるが、真珠腫の再発には病変の不完全摘出による遺残性再発と、術後の中耳換気不全に伴う鼓膜上皮の再陥凹に角化物が堆積する再形成再発がある。従来行われてきた顕微鏡下耳科手術では、顕微鏡の視野が直線的であるという光学特性から、広範な骨削開による術野確保の必要性和死角の存在による遺残性再発のリスクという課題があった。遺残性再発への対応として、広角な視野をもち近接拡大可能で死角を減少できるという内視鏡の利点をいかし、顕微鏡下手術での内視鏡による補助的操作や経外耳道の内視鏡下耳科手術 transcanal endoscopic ear surgery(以下 TEES)が行われるようになった(Ito T, et al. Int J Pediatr Otorhinolaryngol, 2015)。耳科手術における内視鏡の利用は遺残性再発の減少に貢献できる手術方法であることを報告してきたが、術後の中・長期観察では中耳換気不足による鼓膜の再陥凹と癒着による難聴、そして再形成再発を十分にコントロールできなかった。

(2) 鼓膜の再癒着防止や真珠腫再形成再発の予防には、中耳粘膜再生による中耳換気機能の回復が必須であるが、近年、組織工学の技術を用いて術前に採取した自己の粘膜から粘膜細胞を培養し、粘膜細胞シートを手術時に中耳へ移植するという斬新な治療法が報告され(Yaguchi Y, et al. J Tissue Eng Regen Med, 2013、山本和央ら、細胞, 2015)。その効果が今後期待されるが、移植までの準備期間や高水準の培養施設の必要性、高額な費用など一般的な臨床応用までには高いハードルがある。中耳粘膜再生は真珠腫再形成を制御する重要な因子であると共に、中耳手術で術後聴力成績を大きく左右する因子でもある。現在、術後の中耳粘膜再生については有効な対処方法がなく、根本的な中耳真珠腫治療を目指すためには、手術治療に加えてより効果的な中耳粘膜再生を促進する治療が必要である。high-mobility group box 1 (HMGB1)(Aikawa E, et al. Sci Rep 2015)は自己の骨髄に存在する内在性 MSC を末梢へ誘導することで、生理的反応に近い組織修復が期待される因子であり、マウス皮膚では非癒着性の修復が報告されている(金田安史ら、実験医学, 2013 図 3)。本研究では内視鏡を用いた低侵襲な経外耳道操作で HMGB1 投与することにより、実用的な中耳粘膜再生治療の開発をめざす。

2. 研究の目的

中耳真珠腫は中耳腔の陰圧化により嚢状に陥凹した重層扁平上皮に角化物が堆積し、感染と骨破壊を起こしながら、難聴やめまい、顔面神経麻痺などをきたす疾患である。中耳真珠腫に対する根治治療は手術による完全摘出であるが、手術による骨削開と中耳粘膜搔爬により、本来の中耳粘膜によるガス交換能・圧調節能が失われれば、再び鼓膜上皮が陥凹して真珠腫の再形成を生じてしまう。真珠腫再形成を防ぐには、効率的かつ実践的な中耳粘膜の再生治療が必要と考えられ、本研究では自己の骨髄 MSC の誘導を介して組織修復に働く蛋白として注目を集めている high-mobility group box 1 (以下 HMGB1)を用いた中耳粘膜再生による中耳真珠腫の根本的治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 実験動物は Hartley 系モルモットを用いる。モルモットは齧歯類のなかでは比較的大きく、中耳腔および蝸牛構造が明瞭であるため耳科領域の研究で良く用いられる動物である。当科ではモルモットの中耳、内耳解剖に精通しており手術法や組織評価法も確立している。全身麻酔下にモルモットの中耳粘膜を搔爬することにより真珠腫手術を再現し、中耳局所に HMGB1 の投与、コントロール群として生理食塩水を投与する。術後は定期的に鼓膜所見を観察し、組織評価を行う。組織評価は H-E 染色と各種マーカー抗体による免疫組織染色を予定した。」

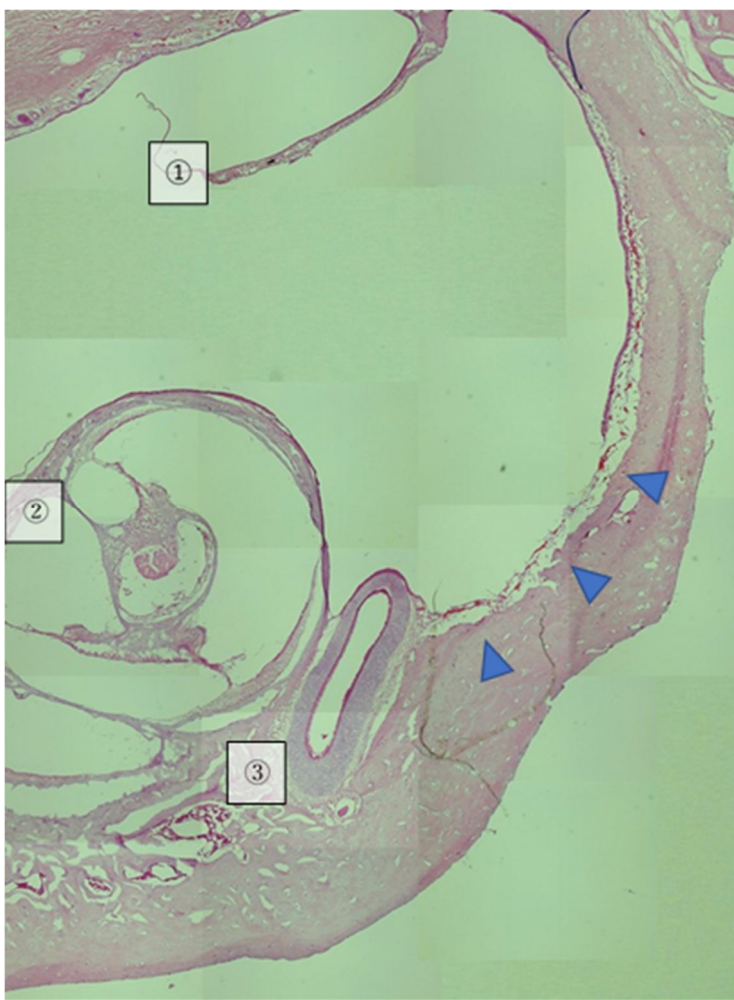
(2) 中耳粘膜障害モデルの作製。動物は 4 週齢の Hartley 系モルモットを使用した。塩酸メデトミジン(0.3mg/kg; 共立製薬, Japan)、ミダゾラム(4mg/kg; アステラス製薬, Japan)、酒石酸ブトルファノール(5mg/kg; Meiji Seika ファルマ, Japan)の3種混合麻酔薬を腹腔内投与し、全身麻酔下にすべての処置を行った。手術は、耳後切開・骨削開アプローチによる一般的な方法と、耳科内視鏡手術で使用されている 1.9mm 耳用硬性内視鏡を用いて経外耳道のアプローチによる方法で行った。後者では鼓膜前方を開窓後、内視鏡下に耳管を確認し、耳管周囲にある線毛領域の中耳粘膜を搔爬した。

(3) HMGB1 の投与。内視鏡下経外耳道操作による中耳粘膜障害モデル作製方法を確立したのち、HMGB1 (R&D Systems, USA) 投与モデルを作製した。HMGB1 は予備実験を参考に生理食塩水 40 μ l に希釈後、ゼラチンハイドロゲル(メドジェル P15, MedGEL, Japan) 4mg に含浸した。モルモットの左耳を HMGB1 含浸ゼラチンハイドロゲル投与群(HMGB1 群)とし、右耳を生理食塩水含浸ゼラチンハイドロゲル投与群(コントロール群)とした。

(4) 組織学的評価。術後2週で、組織学的評価を行った。前述の3種混合麻酔薬を腹腔内投与したのち、モルモットを4%パラホルムアルデヒド (pH 7.4) で還流固定し、断頭後に側頭骨を摘出した。その後側頭骨を一晩4%パラホルムアルデヒドに浸漬した。十分に固定されたのを確認し、0.25M EDTAで7日間脱灰した。脱灰した側頭骨はO.C.T.コンパウンドに包埋し凍結させ、Cryosection法で8 μmの薄切切片を作製した。作製した薄切切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、観察した。

4. 研究成果

(1) 中耳粘膜障害モデルの作製。はじめに、一般的な耳後切開・骨削開アプローチによる中耳粘膜障害モデル作製を試みたが、解剖学的に耳管周囲の線毛円柱上皮のみを障害することは困難であった。さらに鼓室胞の骨削開が必要なため、削開部からの骨増生や肉芽増生により本来の障害部位の組織評価が正当に行えないという問題点があり、耳後切開・骨削開アプローチによる障害モデルは中耳腔の肉芽増生が著しく、障害部位の組織評価は困難であった。これに対して、経外耳道的内視鏡下アプローチによる障害モデルでは、本来存在している線毛上皮細胞が障害部位から消失しており、余分な炎症性肉芽もなく、再現性のある中耳粘膜障害モデルを確立することができた(図)。



中耳粘膜障害モデルの組織像。①鼓膜 蝸牛 耳管 粘膜障害部位。障害部位に明らかな上皮の再生を認めない。

(2) HMGB1投与による中耳粘膜再生。上記のごとく、経外耳道的内視鏡下アプローチで中耳粘膜障害モデルを作製し、HMGB1を投与したが、全てのサンプルで中耳粘膜障害部位を基部とする肉芽増生、粘膜が組織の肥厚や骨増生を認め、HMGB1はむしろ縁膜障害に起因する炎症反応を助長すると考えられ、正常な線毛上皮細胞をとまなう粘膜再生は得られなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 | 窪田 俊憲 (KUBOTA TOSHINORI) (80536954) | 山形大学・医学部・講師 (11501) | |

| | 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 |
|-------|-------------------------------|---------------------------------|----|
| 研究協力者 | 寺田 小百合 (TERADA SAYURI) | 山形大学・医学部 (11501) | |

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 |
|---------|---------|
| | |