

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16907

研究課題名（和文）鼻腔粘膜細胞シート移植後の作用機序解明をめざしたin vitro解析

研究課題名（英文）In vitro studies on the action mechanism of grafted nasal mucosal cell sheet

研究代表者

葛西 善行（Kasai, Yoshiyuki）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60813889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、まず安定して鼻腔粘膜細胞シートを作製する条件を検討した。従来の培地に加えてRho kinase inhibitor (ROCKi)を添加すると、十分量の細胞数を確保することができた。しかし、ROCKiが副次的に持つミオシンのリン酸化阻害作用も働いて細胞間接着が低下し、細胞シートに穴があく問題点が浮上した。そこで、ROCKi添加培地にCa²⁺を加えてミオシンのリン酸化を補填させると、細胞間接着強度が増し、細胞シートとして回収することができた。この細胞シートをコラーゲンゲル上に接着させて1週間培養して面積を測定すると、従来法よりも広く伸展しており、高い創傷治癒効果も期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔粘膜細胞シートはROCKiとCa²⁺の組み合わせは、上皮細胞シートの枚数を増加させるとともに、性質も向上させる培養条件を確立することに成功した。さらに、接着後初期の細胞シートは創傷治癒に働く可能性が高まり、作用機序の一部を解明できたと考えられる。ROCKiは生体へ投与された臨床研究もあるため、残留量や安全性を確認すれば、高い創傷治癒効果を持つ細胞シートとして移植にも用いられると考えられる。さらに、高い創傷治癒効果を持つ上皮細胞シートは、中耳再生医療だけでなく、その他のガンや腫瘍切除後の創傷治癒にも高い効果が期待でき、多くの再生医療に応用できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Previously, we succeeded to regenerating middle ear using cultured autologous nasal mucosal cell sheet. The cell sheet is fabricated two steps, explant culture and cell sheet culture. Although keratinocyte culture medium (KCM) which Green H, et al. developed was used, the number of cell sheet and its quality were unstable. In this study, we added Rho-associated kinase inhibitor (ROCKi) and Ca²⁺ to KCM, and examined the effect for both explant culture and cell sheet culture. In explant culture, we observed that ROCK inhibitor and Ca²⁺ significantly promoted for adhesion rate of tissue and epithelial cell expansion as cell expansion step. In cell sheet culture, we reveal the combination also improved cell sheet detachment. Moreover, we performed cell sheet grafting assay in vitro, which demonstrated that the new cell sheet showed three hold expansion like as effective wound healing. We reported these results as original article (Kasai Y, et al. Sci Rep, 2020).

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：細胞シート 中耳再生治療 ミオシン ROCKインヒビター カルシウムイオン

1. 研究開始当初の背景

再生医療は、機能が失われた組織を補填する新しい治療法として注目されている。中でも細胞を培養して作製する細胞シートは、さまざまな部位へ臨床応用されている。例えば、30%以上再発するとされる癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎の術後に鼻腔粘膜細胞シートを移植すると、含気化が進み、再発防止に良好な経過が得られている。しかし、治療途中の再生組織を繰り返し採取することが困難であるため、移植された細胞シートの挙動や機能の解析が進んでおらず、作用機序が正確に決定されていない。

我々はこれまでに上皮細胞シートをコラーゲンゲルに接着させ、その後培養して細胞遊走をリアルタイムに観察する、*in vitro* 接着実験を確立してきた (Kasai Y, et al. FEBS Open Bio, 2017)。この実験系はパラフィン切片として接着断面を解析することができ、各タイムポイントで働いたタンパク質を特定することができた。さらに RNA を抽出し、定量 PCR で解析することができた。

これらの取り組みにより、上皮細胞シートの基底層は E-cadherin の発現が低下して Vimentin が発現しており、partial epithelial-to-mesenchymal transition が起こっていることを明らかにした。さらに、上皮細胞シートの基底層細胞がゲル内に浸潤することなく、生体の皮膚が創傷治癒するかのように上皮細胞の集団を維持したままゲル上に被覆することを示した。このように、シンプルに経時的な解析が容易な細胞シートの *in vitro* 接着実験を確立し、上皮細胞シート接着後の作用機序の一部を明らかにした (Kasai Y, et al. FEBS Open Bio, 2017)。この実験系は、様々な細胞シートに応用可能であると考えられた。

鼻腔粘膜細胞シートは、約 1-1.5cm² の大きさの鼻腔粘膜組織をエクスプラント培養して鼻腔粘膜上皮細胞を増殖させ、これを温度応答性培養基材上に継代してシート化培養を行うという 2 段階で培養される。その後、ピンセットで剥離し、形態を維持させながら移植/接着を行っている。しかし、その枚数や形状は、安定していない問題点があった。

2. 研究の目的

本研究で解析対象とする、鼻腔粘膜細胞シートは一定の性質を持ち、多くの解析や評価を行うために、少なくとも 1 つの鼻腔粘膜組織から、10 枚以上確保することが重要である。鼻腔粘膜細胞シートを作製する際に用いている培地は、全ての工程で上皮細胞の培養に広く使われている上皮増殖用培地 (Keratinocyte culture medium; KCM) を用いる、作製される細胞シートの枚数や性質が不安定であった。そこで、まずは 10 枚以上の細胞シートを安定して作製できる培養条件を確立することを目的とした。

さらに、これまでに確立した、*in vitro* 接着実験を確立してきた (Kasai Y, et al. FEBS Open Bio, 2017)。この手法を鼻腔粘膜細胞シートの創傷治癒能を評価する実験へと応用させた。これらの取り組みにより、鼻腔粘膜細胞シートの創傷治癒効果を向上させることを目的とした。

本研究では、元々は ROCK 経路による平滑筋の収縮を阻害する「弛緩剤」として開発され、iPS 細胞、ES 細胞などの増殖能を飛躍的に向上させることができる添加因子である、Rho kinase inhibitor (ROCKi) に着目し、鼻腔粘膜細胞シートの安定した作製および創傷治癒能の向上につながるか評価した。

3. 研究の方法

ヒト検体を用いる研究であるため、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認を得て行った。研究に参加する被験者に対して研究内容の説明を行い、インフォームドコンセントを得てから進めた。鼻腔粘膜細胞シートの作製は、手術検体時に得た約 1.5cm のヒト鼻腔粘膜組織を洗浄した後、まずは、エクスプラント培養を 13 日間行い、十分量の細胞数を確保する。その後、温度応答性培養基材上でシート化培養を 7 日間行い、鼻腔粘膜細胞シートを作製した。この日数や培養皿の数は固定し、最適な培地について検討を行った。

また、作製した鼻腔粘膜細胞シートの創傷治癒能を評価するため、鼻腔粘膜細胞シートをコラーゲンゲルへ接着させ、1 週間後に伸展した面積を測定した。

4. 研究成果

従来の KCM を用いてエクスプラント培養して得られる細胞数は、平均で細胞シート約 4 枚分程度であり、経時的な変化や条件ごとの詳細な解析をすすめる上で不十分であった。そこで Rho kinase inhibitor (ROCKi) を添加すると、平均で細胞シート約 19 枚分の細胞数が確保され、十分量の細胞数が確保することを可能にした。得られた細胞は、温度応答性培養基材上に播種してシート化させたが、ROCKi が副次的に持つミオシンのリン酸化阻害作用も働いて細胞同士の収縮が

弱まって細胞間接着が低下し、細胞シートに穴があく問題点が浮上した。そこで、ROCKi 添加培地に Ca^{2+} を添加してミオシンのリン酸化を補填させると、細胞間接着強度が増し、細胞シートとして回収することができた。

次に、この細胞シートをコラーゲンゲル上に接着させて1週間培養して面積を測定すると、従来法で作製する細胞シートの3倍もの面積を覆っていた。ROCKi の効果で増殖能が維持されながら、 Ca^{2+} でシートの形状を維持するというこの組み合わせによっては、従来法で作製する細胞シートよりも、高い効果を持つ細胞シートになったと考えられた。また、細胞同士の接着を維持させながら進展した挙動は、生体の上皮組織の創傷治癒挙動に類似しており、生体に移植した際にも創傷治癒に働く可能性が高まったと考えられる。

これらの結果により、鼻腔粘膜細胞シートはROCKi と Ca^{2+} の組み合わせは、上皮細胞シートの枚数を増加させるとともに、性質も向上させる培養条件を確立することに成功した。さらに、接着後初期の細胞シートは創傷治癒に働く可能性が高まり、接着後の鼻腔粘膜細胞シートの作用機序の一部を解明できたと考えられる。これらの結果は、学術論文として報告した(Kasai Y, et al. Sci Rep, 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kasai Yoshiyuki, Morino Tsunetaro, Kikuchi Shun, Mitsuyoshi Ryoto, Takahashi Masahiro, Yamamoto Kazuhisa, Yaguchi Yuichiro, Yamato Masayuki, Kojima Hiromi	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of human nasal mucosal cell sheets fabricated using transported tissue and blood specimens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.05.001	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 Kasai Yoshiyuki, Morino Tsunetaro, Mori Eri, Yamamoto Kazuhisa, Kojima Hiromi	4. 巻 10
2. 論文標題 ROCK inhibitor combined with Ca ²⁺ controls the myosin II activation and optimizes human nasal epithelial cell sheets	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73817-3	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Kasai Y, Morino T, Yamamoto K, Kojima H
2. 発表標題 Two-way control of non-muscle myosin light chain activity plays a crucial role in epithelial cell sheet
3. 学会等名 Cell symposium: Engineering Organoids and Organs (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛西 善行, 森野 常太郎, 山本 和央, 小島 博己
2. 発表標題 治験を目指した鼻腔粘膜細胞シートの作製法の検討
3. 学会等名 第18回 再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島 博己, 山本 和央, 森野 常太郎, 葛西 善行
2. 発表標題 培養鼻腔粘膜上皮細胞シートによる中耳粘膜再生を目的とした治療と製造販売に向けた試み
3. 学会等名 第18回 再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口 雄一郎, 山本 和央, 森野 常太郎, 葛西 善行, 稲垣 太朗, 小島 博己, 肥塚 泉
2. 発表標題 培養上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生治療 ~細胞シート治療の普及に向けた輸送システムの検討~
3. 学会等名 第28回 日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai Y, Morino T, Yamamoto K, Kojima H
2. 発表標題 Ex vivo studies of the behavior of nasal mucosal cell sheet after grafting
3. 学会等名 5th Tissue engineering and regenerative medicine international society world congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yamamoto K, Kasai Y, Morino T, Kojima H
2. 発表標題 Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheets transplantation
3. 学会等名 6th East Asian Symposium on Otology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 葛西 善行, 森野 常太郎, 山本 和央, 小島 博己
2. 発表標題 ROCK inhibitorとカルシウムイオンの組み合わせによる上皮細胞シート培養法の改良
3. 学会等名 第19回 再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 葛西 善行, 森野 常太郎, 森 恵莉, 山本 和央, 小島 博己
2. 発表標題 鼻腔粘膜組織と細胞シートの保存法開発
3. 学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

〔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

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