

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03806

研究課題名(和文) 中耳再生医療における鼻腔粘膜細胞シートの作用機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation for mechanism of the nasal mucosal cell sheet in middle ear regenerative therapy

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、移植後の鼻腔粘膜細胞シートの作用機序解明を目指した実験を行った。まず、Rho kinase inhibitorとCa²⁺の濃度を検討し、安定して作製する条件を見出した。この細胞シートはコラーゲンゲル上に接着して増殖することができ、創傷治癒能が備わっていることが示唆された。最適化した条件で培養を行うことでGFPラット由来の鼻腔粘膜細胞シート作製に成功した。ヌードラットの中耳に鼻腔粘膜細胞シートを移植するモデルを用いて、移植した細胞が一定期間存在し、中耳粘膜様の上皮細胞を呈することを確認できた。本研究成果として、接着および移植後の鼻腔粘膜細胞シートの挙動の一部を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト鼻腔粘膜細胞シートのコラーゲンゲル上へ接着して増殖していること、ならびにGFPラット由来鼻腔粘膜細胞シートが免疫不全ラットの中耳内で一定期間生着していることを示した。これより、生着して創傷面を覆うように増殖するという細胞シートの移植効果の一部を明らかにし、臨床結果の有効性を裏付けるエビデンス構築につながると考えられた。本研究成果により、頻繁に再発する中耳真珠腫に対する治療法として、実用化に向けた取り組みや、さらなる効果を持つ治療への発展につなげ、患者のQOLを向上させたい。また、粘膜の再生が治癒のカギとなり得る他領域の病態に向けての臨床応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting research where autologous nasal mucosal epithelial cell sheets are transplanted for severe middle ear diseases. In order to advance this novel therapy, the fabrication method and analysis for grafted cell sheets should be performed. First, we optimized of cell culture condition to fabricate human nasal epithelial cell sheets. We demonstrated that the combination of ROCK inhibitor and Ca²⁺ improved the fabrication of human nasal mucosal epithelial cell sheets. The human nasal cell sheet can be adhered on collagen gel and proliferated like as wound healing. Second, we succeeded to fabricate GFP rat-derived nasal mucosal cell sheets cultured with ROCK inhibitor. Using this cell sheet, we devised transplant assay that GFP rat-derived nasal mucosal cell sheets transplanted to middle ear of nude rat. We detected transplanted GFP-positive cell after several weeks. We anticipate that our findings will improve efficacy for transplantation of nasal mucosal cell sheets.

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 鼻腔粘膜 作用機序解明 動物実験

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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。癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎に対する治療は外耳道後壁保存型鼓室形成術を主体としているが、鼓膜の再癒着や真珠腫の再発を確実に防止する方法はなく、治療成績に限界がある。この現状を打破するべく、我々は温度応答性培養基材を用いて作製する「細胞シート」に着目した。これは、37°Cで培養した細胞を20°C程度まで下げることでコンフルエントの細胞のまま一枚の「細胞シート」として回収でき、これを患部に縫合することなく移植することができる。この技術の中耳粘膜の再生に応用させれば、術後の中耳腔の含気を保つことにつながり、真珠腫の再発や鼓膜の再癒着の防止が可能になると考えた。具体的には、患者自身の鼻腔粘膜から培養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粘膜欠損部に移植する。この新規治療は、2014～2015年は「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(First-in-Human Study)、2017年～現在は「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に準じ、現在までに合計12人の患者に細胞シート移植を施行した。移植後観察期間は12～27ヶ月で、全ての症例で合併症・有害事象は認めず、移植後に中耳腔内に良好な含気化が得られている(Yamamoto K, et al. NPJ Regen Med, 2017)。

このように、中耳への鼻腔粘膜細胞シート移植が有効であることが示唆されているが、細胞シートの生着による作用機序や移植後の培養細胞の運命に関しては未解明な部分が多い。根拠に基づいた治療効果を明らかにし、エビデンスに基づく治療法として確立するために、細胞シート移植後の治療のメカニズムや細胞動態の挙動を解明することが重要である。

2. 研究の目的

移植された培養細胞の運命は各再生医療研究において、重要な研究課題である。自家移植では培養細胞が一定期間残存して働くと考えられているが、他家では免疫細胞により除去されると考えられている。ただし、自家移植では周囲の細胞と見分けがつかなくなり、中耳へ移植したモデルにおいて移植した細胞を確実に評価された例はない。

本研究の目的は、鼻腔粘膜細胞シート移植による中耳再生治療の作用機序解明を目指し、移植後の培養鼻腔粘膜細胞が接着し、どのような変化をきたすかを *ex vivo* 実験および *in vivo* 実験によりアプローチする。

3. 研究の方法

鼻腔粘膜細胞シートは、ヒトおよび実験動物のいずれにおいても鼻腔粘膜組織をエクスプラント培養により上皮細胞を増殖させ、継代後に温度応答性培養基材に播種して作製する。細胞シートを用いた実験を安定して行えるように、この細胞シート作製の条件最適化を第一に行った。この際、組織および細胞シートが一定期間安定しているかどうかも評価した。

細胞シートの接着後の挙動を解析するため、豚由来コラーゲンゲルに細胞シートを接着させて再培養する方法を用いた。さらに、*in vivo* の実験として免疫不全動物のヌードラットに、GFPラット由来鼻腔粘膜細胞シートを移植するモデルを考案し、生着性の理解にアプローチした。また、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に準じて行った臨床試験における安全性や効果を評価した。

4. 研究成果

同一個体より作製した鼻腔粘膜細胞シートを比較検討するために、鼻腔粘膜細胞シートを安定した枚数確保可能な培養方法を検討した。ヒトの鼻腔粘膜のエクスプラント培養において、Rho kinase inhibitor (ROCKi)を添加すると細胞増殖が有意に増加することが確認できた。シート化培養の際は、ROCKi添加培地にCa²⁺濃度を高めることで細胞シートを安定して回収することに成

功した。豚由来コラーゲンゲル上に細胞シートを接着させる *ex vivo* 実験では、従来法で作製する細胞シートと比較してゲル上の細胞非存在部位に約 3 倍の面積の細胞遊走が確認され、創傷治癒効果が向上したと考えられた (Kasai Y, et al. *Sci Rep*, 2020)。鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートの保存安定性を評価した。この ROCKi を用いた培養方法により、培養液中で 5 日間冷蔵保存または凍結保存した鼻腔粘膜組織からも上皮細胞の増殖が見られ、細胞シートを作製することが可能であることを明らかにした。2 日間ハanks 緩衝液中で保存した細胞シートにおいてもコラーゲンゲルに接着して広く進展し、鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートのいずれにおいても一定期間保存し得ることを明らかにし、学術論文として報告した (Kasai Y, et al. *Front Bioeng Biotechnol*, 2021)。さらに、気相化培養によって鼻腔粘膜上皮細胞に線毛細胞および分泌細胞を形成する技術について、本研究においても確認することに成功した。これより、本鼻腔粘膜細胞シートに線毛細胞や分泌細胞への分化能が備わっているかを評価する研究へとつながった。

本研究の *in vivo* の実験として、免疫不全動物のヌードラットに、GFP ラット由来鼻腔粘膜細胞シートを移植するモデルを作製した。細胞の増殖や性質はしばしば動物の種間で大きく変動することがあることが知られているため (Kondo M, et al. *J Biomed Mater Res A*, 2014)、GFP ラット由来鼻腔粘膜細胞シートの作製を検討した。上述の ROCKi を用いるこの培養条件は、ウサギやラットの鼻腔粘膜細胞シートに応用可能であることが確認でき、GFP ラット由来鼻腔粘膜細胞シートを安定して作製することに成功した。次に、ラットの中耳骨を覆う粘膜剥離を行い、細胞シートを移植するモデルを作製した。ラットの個体は非常に小さく移植可能な細胞シートの大きさに限りがあるものの、移植モデルにおける組織学的解析では GFP 陽性細胞が一定期間存在し、移植した細胞は中耳粘膜様の細胞を呈することを確認できた。

臨床試験において、6 例移植した鼻腔粘膜細胞シートの臨床的な効果や安全性について評価した結果について学術論文として報告した (Yamamoto K, et al. *Regen Ther*, 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

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 -

1. 著者名 Kasai Yoshiyuki, Morino Tsunetaro, Dobashi Izumi, Mori Eri, Yamamoto Kazuhisa, Kojima Hiromi	4. 巻 9
2. 論文標題 Temporary Storage of the Human Nasal Tissue and Cell Sheet for Wound Repair	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 687946
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fbioe.2021.687946	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 Yamamoto Kazuhisa, Morino Tsunetaro, Kasai Yoshiyuki, Kikuchi Shun, Komori Manabu, Yamato Masayuki, Kojima Hiromi	4. 巻 18
2. 論文標題 Cell sheet transplantation prevents inflammatory adhesions: A new treatment for adhesive otitis media	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 457 ~ 463
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2021.10.001	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 6件／うち国際学会 2件）

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 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 葛西 善行, 森野 常太郎, 山本 和央, 小島 博己
2. 発表標題 中耳再生医療における鼻腔粘膜細胞シートの作用機序解明を目指した基礎的研究
3. 学会等名 第21回 日本再生医療学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y Kasai, T Morino, K Yamamoto, H Kojima
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 小島 博己
2. 発表標題 アナログな手術・研究に魅せられて
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会 (会長講演) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuhisa Yamamoto
2. 発表標題 Middle ear mucosal regenerative therapy by cell sheet transplantation
3. 学会等名 7th East Asian Symposium on Otology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野 常太郎
2. 発表標題 培養鼻腔粘膜細胞シートを用いた中耳粘膜再生医療 -トランスレーショナルリサーチおよびリバーストランスレーショナルリサーチ-
3. 学会等名 第122回 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森野 常太郎
2. 発表標題 中耳粘膜再生医療：鼻腔粘膜細胞シートを用いた鼓室形成術による臨床応用
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森野 常太郎
2. 発表標題 中耳粘膜再生医療 培養鼻腔粘膜シートを用いた鼓室形成術
3. 学会等名 第31回日本耳科学会総会・学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛西 善行
2. 発表標題 中耳再生医療における鼻腔粘膜細胞シートの作用機序解明を目指した基礎的研究
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022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
研究分担者	山本 和央 (Yamamoto Kazuhisa) (50408449)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	森野 常太郎 (Morino Tsunetaro) (00796352)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	葛西 善行 (Kasai Yoshiyuki) (60813889)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

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
---------	---------