

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18784

研究課題名（和文）家兎鼻腔疾患モデルの作成および鼻粘膜上皮細胞シートによる粘膜再生の検討

研究課題名（英文）Creation of a rabbit nasal disease model and investigation of mucosal regeneration using nasal mucosal epithelial cell sheets

研究代表者

菊地 瞬（Kikuchi, Shun）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：70817262

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：内視鏡下鼻副鼻腔手術で骨が露出した部位に骨増生が生じ、副鼻腔炎症状の再燃が生じることがある。露出した骨面に鼻粘膜上皮を速やかに再生させることで骨増生を抑え、副鼻腔炎症状の再燃を予防できると考える。露出した骨面に鼻腔粘膜上皮細胞シートを移植することにより鼻粘膜上皮の速やかな再生が可能であると考えた。鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いた副鼻腔疾患の再生治療の前臨床研究として、家兎の病態モデルおよび治療モデルを作成し、その効果を解明することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副鼻腔炎等の疾患では手術後であったとしても骨増生やポリープの再燃や鼻粘膜肥厚が起こることは臨床の場でもよく経験することである。骨増生、ポリープの再燃・鼻粘膜肥厚が起こると副鼻腔の閉鎖が起こり鼻閉・嗅覚障害・疼痛といった副鼻腔炎の症状が再燃する可能性がある。鼻腔粘膜上皮細胞シートを利用することにより正常粘膜の早期の再生が起こり骨増生の抑制され、手術後の症状の再燃することを防ぐことが期待される。これにより副鼻腔炎の治療に細胞シートによる治療という新たな選択肢が加えられることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Endoscopic sinus surgery can cause bone hyperplasia at the site of exposed bone, resulting in a recurrence of sinusitis symptoms. Rapid regeneration of nasal mucosal epithelium on the exposed bone surface may reduce bone hyperplasia and prevent recurrence of sinusitis symptoms. We hypothesized that rapid regeneration of nasal mucosal epithelium could be achieved by transplanting nasal mucosal epithelial cell sheets to the exposed bone surface. As a preclinical study of regenerative treatment of sinus disease using nasal mucosal epithelial cell sheets, we aim to create a pathological model and a therapeutic model in rabbits to elucidate the efficacy of this treatment.

研究分野：耳鼻咽喉

キーワード：副鼻腔炎 骨増生 再生医療 細胞シート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、耳鼻咽喉科領域では鼻副鼻腔疾患に対して内視鏡下副鼻腔手術が標準的な術式となっている。近年、内視鏡下副鼻腔手術の適応は広がっており、両側前頭洞単洞化手術・頭蓋底手術等が行われるようになった。これらの手術を行う上では鼻粘膜を除去し骨の露出がすることは避けられない。鼻腔内において骨が露出することにより骨増生が起こることは知られている。臨床の場では鼻粘膜の温存や粘膜弁の利用により、骨増生が起こらないように対応している。また、難治性の好酸球性副鼻腔炎等の疾患では手術後であったとしても鼻腔内においてポリープの再燃や鼻粘膜肥厚が起こることは臨床の場でもよく経験することである。骨増生、ポリープの再燃・鼻粘膜肥厚が起こると副鼻腔の閉鎖が起こり鼻閉・嗅覚障害・疼痛といった副鼻腔炎の症状が再燃する可能性がある。副鼻腔の閉鎖・症状の再燃が起こると、内服による治療や再手術が必要になってくる。しかし、投薬・再手術を行っても副鼻腔の閉鎖が再発することもある。

我々の教室では、現在ヒト臨床研究が行われている中耳粘膜再生の先行研究で家兎を用いた動物実験を報告している(Yaguchi Y et al. J Tissue Eng Regen Med 2013)。この研究では温度応答性培養皿で作成した中耳粘膜上皮細胞シートの中耳への移植により非常に良好な粘膜再生が起こり、骨や肉芽の増生が抑制することを検証した。

内視鏡下鼻副鼻腔手術において鼻腔粘膜上皮細胞シートを利用することにより骨増生の抑制が起こり、手術後の症状の再燃することを防ぐことが期待される。また、先行研究の肉芽増生を抑制する効果のように、鼻腔内においてもポリープの再燃や鼻粘膜肥厚が抑制することが期待される。これにより厚生労働省より難病指定されている好酸球性副鼻腔炎の治療に細胞シートによる治療という新たな選択肢が加えられることが期待される。

「問い」 家兎において炎症性鼻疾患のモデルが作成できるか。

鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いて家兎の病態モデルで治療ができるか。

2. 研究の目的

(1)病態モデルの作成および検討

副鼻腔疾患の動物モデルは炎症性副鼻腔炎のモデルや好酸球浸潤を伴うポリープのモデルなどは報告されている。しかし、家兎の鼻腔内の骨増生モデル作成の報告はまだない。実際の手術においても、手術操作による鼻腔内の骨露出が骨増生の原因となっている可能性が高い。副鼻腔の入口部に骨増生が生じれば、副鼻腔内で炎症が惹起されやすい状況となり、症状が再燃する可能性がある。このことから動物モデルを用い骨増生が生じることを確認する。モデル作成により、骨増生の発生の時期や発生機序の解明が進むと考える。また、このモデルに対して、後述の鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いた治療が有効であるか検討を行う。

(2)鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いた治療モデルの作成および検討

上述の病態モデルを作成し、温度応答性培養皿で作成した鼻腔粘膜上皮細胞シートによる治療側と未治療側との比較検討を行い、細胞シート治療の有効性を示す。骨増生モデルの作成は初めての報告になる。このモデルは今回の研究以外にも汎用性の高いものになると考える。鼻科領域において細胞シートを含む再生医療はまだ行われていない。本研究で細胞シート治療の有用性が示されれば、鼻科領域の再生医療研究が大きく一歩進むと考える。我々の教室では、中耳粘膜再生のヒト臨床研究を行っている段階である。この経験と実績を活かし、本研究を行い鼻副鼻腔疾患に対するヒト臨床研究の段階へ移行することを目指す。

3. 研究の方法

(1)骨増生モデル

我々の教室の先行研究である家兎の鼻腔粘膜上皮シートの中耳腔への自家移植実験では、中耳腔の粘膜を物理的に除去することにより中耳の骨増生が起こることが示されている。同様に家兎の副鼻腔上顎洞にあたる部分の粘膜を除去することにより骨増生を起こす。片側をコントロール、片側を粘膜除去し左右で骨増生の有無を検討する。モデル作成後は、小動物用CTによる骨増生の有無・時期・度合の検討、組織染色(HE染色)による増殖した骨細胞の検討をすることにより骨増生の機序の解明を行う。

(2)鼻腔粘膜上皮細胞シート作成

我々の教室では、家兎の温度応答性培養皿を使った鼻腔粘膜上皮細胞シートの作成の技術はす

でに確立されている。温度応答性培養皿は温度応答性高分子が表面にコーティングされた特殊な培養皿で温度変化のみで親水性・疎水性の性質が変化する。37℃では弱い疎水性を示し細胞が接着するのに対して、32℃以下では培養皿が親水性に変化する。これにより細胞が自発的に脱着する。細胞をコンフルエントな状態にまで培養した後に温度を下げることにより培養細胞全体を一枚の細胞シートとして回収できる。この技術は様々な分野で研究および臨床応用が行われている。我々の教室で行われている従来の方法で家兔の鼻腔粘膜上皮細胞シートを作成する。

(3)脂肪由来間葉系幹細胞シート作成

鼻粘膜以外の細胞ソースの検討として、脂肪由来間葉系幹細胞を選択する。家兔の鼠径部より採取した脂肪より脂肪由来間葉系幹細胞を抽出し培養する。上記と同じ手法により脂肪由来間葉系幹細胞シートを作成する。

(4)治療モデル作成

骨増生抑制の検討として、片側を粘膜剥離のみ施行、もう片側は粘膜剥離後に細胞シートを移植する家兔のモデルを作成する。炎症抑制の検討としては、片側を病的粘膜処理し正常粘膜は残存させる、もう片側はすべての粘膜剥離後シートを移植するモデルを作成する。小動物用 CT および組織染色(HE 染色、cytokeratin, vimentin)を行い、骨増生・炎症抑制の評価をする。

4．研究成果

(1)骨増生モデル

家兔の副鼻腔上顎洞にあたる部分に外切開ってアプローチし鼻粘膜を除去することは可能であった。片側をコントロール、片側を粘膜除去し左右で骨増生の有無を検討した。粘膜剥離後4週間で、粘膜剥離側のみ上顎洞の内腔を埋め尽くすような骨増生を認めた。これらの結果は組織染色、CT によって確認した。このモデルは再現性が良く、手技も簡便であるため汎用性の高いモデルが作成できたと考える。

(2)鼻腔粘膜上皮細胞シート作成

以前より確立されている手技により鼻腔粘膜上皮細胞シート作成可能であった。

(3)脂肪由来間葉系幹細胞シート作成

家兔の鼠径部より採取した脂肪より脂肪由来間葉系幹細胞を抽出し培養し、細胞をシート状に回収することは可能であった。

(4)治療モデル作成

骨増生抑制の検討として、片側を粘膜剥離のみ施行、もう片側は粘膜剥離後に細胞シートを移植する家兔のモデルを作成した。細胞はシート状になっているために移植が可能であった。しかし、当初の予想とは違い鼻腔粘膜上皮細胞シートのための移植では骨増生は抑制できなかった。脂肪由来間葉系幹細胞シート移植群では軽度の骨増生抑制を示した。今後はより早期の粘膜再生を行う細胞シート治療について検討していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kikuchi Shun, Morino Tsunetaro, Takagi Ryo, Nobuyoshi Otori, Kojima Hiromi, Yamato Masayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Development of a nasal mucosa-removal model for evaluating cell therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 32～41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2020.12.004	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊地 瞬
2. 発表標題 家兔鼻疾患モデルに対する鼻粘膜上皮細胞シート移植による粘膜再生の検討
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 瞬
2. 発表標題 細胞治療を評価するための鼻粘膜除去モデルの開発
3. 学会等名 日本鼻科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 瞬
2. 発表標題 鼻粘膜除去モデルの開発と同モデルに対する細胞シート移植効果について
3. 学会等名 日本鼻科学会
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
---------	---------