

令和 4 年 6 月 20 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：19K18785

研究課題名（和文）培養鼻粘膜上皮細胞の異所移植による in vivo 解析：再生医療の応用展開に向けて

研究課題名（英文）In vivo analysis by heterotopic transplantation of cultured nasal mucosal epithelial cells: Efforts for further development of regenerative medicine

研究代表者

森野 常太郎 (Morino, Tsunetaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：00796352

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）：培養上皮細胞を用いた細胞治療は様々な分野で有効性を示しており、これまで治療が困難であった難治性の疾患に対して、飛躍的な治療効果を期待できる。我々は、中耳手術により生じた粘膜欠損部位に自己の培養鼻粘膜上皮細胞シートを移植することで、中耳粘膜を再生する治療法を開発した。動物実験による前臨床研究、ヒト臨床研究において良好な治療効果が得られているが、これまで自家移植後における培養鼻粘膜上皮細胞シートの運命は明らかではない。本研究では、Tg-GFPラット由来鼻腔粘膜上皮細胞シートを免疫不全ラットの皮下に移植し、免疫組織化学的变化を中心に観察することで、移植後の培養細胞の挙動を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、培養細胞の移植後の挙動を確実に評価できる皮下組織への異所移植を実施し、培養鼻粘膜上皮細胞の移植後の挙動を解析した。細胞ソースとして用いる鼻粘膜の採取には、耳鼻咽喉科領域の知識、技術を要するため、培養鼻粘膜上皮細胞の知見は耳鼻咽喉科医が中心となり発信する必要がある。耳鼻咽喉科発世界初の細胞治療として、本研究で培養鼻粘膜上皮細胞の移植効果を検証することで、再生医療の発展に貢献したいと考えている。

研究成果の概要（英文）：Cell therapy using cultured epithelial cells has shown efficacy in various fields and is expected to dramatically improve the treatment of refractory diseases that have been difficult to treat. We have developed a treatment method to regenerate the middle ear mucosa by transplanting autologous cultured nasal mucosal epithelial cell sheets to the site of mucosal defect caused by middle ear surgery. Although good therapeutic effects have been obtained in preclinical animal studies and human clinical studies, the fate of cultured nasal mucosal epithelial cell sheets after autologous transplantation has not been clear. In this study, we transplanted nasal mucosal epithelial cell sheets derived from Tg-GFP rats subcutaneously into immunodeficient rats and analyzed the behavior of the cultured cells after transplantation, focusing on immunohistochemical changes.

研究分野：耳科学、再生医療

キーワード：再生医療 鼻腔粘膜上皮細胞シート 細胞治療 組織工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、多分野にわたり培養細胞を用いた再生治療が注目されている。培養上皮細胞を用いた再生医療では、培養表皮細胞による熱傷治療、培養口腔粘膜上皮細胞シートによる角膜上皮再生治療において、患者への臨床応用を実現させている。自己由来の培養細胞を用いた治療では、移植に伴う免疫拒絶反応が誘発される可能性は極めて低く、患部に高い生着率を期待することができる。また、自己より作製した細胞加工製品であるため、未知の感染症に罹患するリスクが低く、臨床応用に繋げやすい。

我々は以前より中耳の粘膜再生の研究を行っており、中耳粘膜再生治療のヒトでの臨床実現化を見据え、細胞シート工学に基づいた温度応答性培養皿による自己の細胞を用いた中耳粘膜の再生の研究を進めてきた。我々は、この細胞シート技術を利用することで、鼻粘膜より採取した細胞を用いて培養鼻粘膜上皮細胞シートを作製し、中耳手術の際に生じる粘膜欠損部に移植するという新規治療法を開発した。中耳粘膜再生のための細胞ソースとして、耳鼻咽喉科の外来診療で安全かつ容易に採取でき、十分な組織量を確保できる自己鼻腔粘膜を原料とした。鼻粘膜は発生学的にも中耳粘膜と同様に呼吸上皮に属しており、培養後は繊毛細胞や杯細胞がみられない数層の上皮性細胞で構成された細胞グラフトとなる (Hama T, et al. J Tissue Eng Regen Med, 2017)。本研究の前臨床研究として、家兎を用いた中耳粘膜剥離モデルに対して培養鼻粘膜上皮細胞シートを自家移植したところ、中耳粘膜の再生に伴う治療効果を見出すことができた (Yamamoto K, et al. Biomaterials, 2015)。これらの前臨床研究を経て、12名の中耳真珠腫、癒着性中耳炎の患者に細胞シート移植を施行した。全ての症例で有害事象はみられず、術後の鼓膜の再癒着もなく、乳突腔の含気化も良好である。現在、安全性の高い自家移植によるこの細胞加工製品の上市を目指し、臨床試験を計画している。

細胞シートを中耳腔に移植する中耳粘膜再生の治療効果は、動物実験、ヒト臨床研究より有効性が明らかとなっているが、移植後の培養細胞の挙動は明らかではない。鼻粘膜上皮細胞シートの異所移植における運命は不明であり、移植後の培養細胞における生着の状況、細胞増殖能、分化の程度に関する経時的な変化は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、培養鼻粘膜上皮細胞の移植後の表現型の変化を解析することで、本細胞治療の適応拡大に向けて展開することである。上皮組織は培養するとその表現型が大きく変化し、移植によりその挙動が再度変化する。鼻粘膜上皮は様々な表現型に分化しうるため、異所性移植後の解析が他の上皮組織以上に重要である。

本研究では、培養細胞の移植後の挙動を確実に評価できる皮下組織への異所移植を実施し、培養鼻粘膜上皮細胞の移植後の挙動を解析する。表皮欠損モデルに対して、培養鼻粘膜上皮細胞の移植による治療効果の検証を行う。

3. 研究の方法

本研究では、移植後の培養鼻粘膜上皮細胞がどのような表現型に変化しうるのか検証するために、培養鼻粘膜上皮細胞を皮下に移植し、培養細胞の生着状況、増殖能、分化度、移植先の足場の変化を経時的に解析した。

本研究では、Tg-GFP ラット由来鼻腔粘膜上皮細胞シートを免疫不全ラットの皮下に移植し、移植後の培養細胞、移植先の皮下組織に関して組織学的に解析した。皮下移植の方法は、先行研究を参考とし、背部皮膚をコの字に皮膚切開し作製した皮膚フラップ部分に移植した (Barrandon Y, et al. J. Invest. Dermatol, 1988. Pirraco R, et al. Tissue Eng. Part A, 2011)。皮膚フラップ側の皮下組織に細胞シートを移植した。皮下移植後、皮膚フラップを外気に接触するモデル、皮膚フラップ

を皮下に埋入するモデルを作成した。移植直前の細胞シートの一部および、移植モデルの皮膚フラップの標本作成を行い、移植後の変化を経時的に解析した。

4. 研究成果

ラットにおいては細胞シートを作製するための鼻粘膜を採取するために、生存下で十分量採取することは困難であった。GFP トランスジェニックラットを犠牲死後、外切開により両側の鼻腔粘膜を採取した。初代培養で 2 週間培養することで、十分な量の上皮細胞を得ることができた。回収した細胞を温度応答性培養基材に播種し、1 週間培養したところ、細胞シートを回収することができた。回収した細胞シートは、上皮系のマーカー蛋白を発現する細胞群であり、細胞シート 1 枚あたりの細胞数は約 100 万 cells、生存率は 90% 以上であった。ヌードラットの皮下へのアプローチは、背部皮膚をコの字に皮膚切開し作製した皮膚フラップ部分に移植した。GFP 励起光で観察しながら移植することで、皮下移植部位の細胞シートを確認できた。細胞シートを移植した皮膚フラップごと皮下に埋入したところ、移植 7 日目までは細胞シートを観察することができたが、移植 14 日目では観察できなかった。観察し得た細胞シートは 2-3 層であるものの表層は脱核もみられた。細胞シートを外気に接触させたモデルでは、移植 3 日目より重層化し、移植 7-10 日目までに 7-8 層の重層化がみられた。移植 14 日目以降は 2-3 層となり、移植 21 日目までは観察し得たが、移植 28 日目では周囲の皮膚細胞のマイグレーションにより観察が困難となった。皮下移植では全ての観察期間において杯細胞、線毛細胞への分化はみられなかった。

GFP でトレースした細胞シートを移植することで、生存下で細胞シートの生着を観察できた。本研究結果より皮下への移植では細胞シートは外気への暴露により重層化することが確認された。我々の先行研究において、細胞シートには線毛細胞、杯細胞への分化能が確認されているが、皮下への移植では呼吸上皮特有の繊毛形成、分泌細胞への分化はみられなかった。鼻粘膜上皮は様々な表現型に分化でき、移植先の場の環境によりその表現型に違いがあることを確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Morino Tsunetaro, Kikuchi Shun, Inagaki Taro, Komori Manabu, Yamamoto Kazuhisa, Kojima Hiromi, Yamato Masayuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Lessons learned from conventional animals: Encouragement to use specific-pathogen-free animals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 296 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.03.003	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 Morino Tsunetaro	4. 巻 15
2. 論文標題 Make your garage laboratory with a microscope during the COVID-19 pandemic	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 90 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2020.07.006	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 Morino T, Takagi R, Yamamoto K, Kojima H, Yamato M	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Explant culture of oral mucosal epithelial cells for fabricating transplantable epithelial cell sheet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regen Ther	6. 最初と最後の頁 36 - 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.10.006	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 Morino T, Kasai Y, Kikuchi S, Mitsuyoshi R, Takahashi M, Yamamoto K, Yaguchi Y, Yamato M, Kojima H	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 Regen Ther	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 M Motegi, Y Yamamoto, T Tada, M Takahashi, S Sampei, H Koizumi, T Morino, M Komori, M Miura, K Yamamoto, Y Yaguchi, Y Sakurai, H Kojima	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 Clinical characteristics of pars tensa cholesteatoma: a comparative study of area-based classification systems proposed by the Japanese Otological Society and the European Academy of Otolology & Neurofibromatosis-Otology.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int Adv Otol	6. 最初と最後の頁 184-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao.2019.6349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森野 常太郎, 山本 和央, 小島 博己
2. 発表標題 エクスプラント培養法を用いた口腔粘膜上皮細胞シートの新規作製法の検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森野 常太郎, 山本 和央, 谷口 雄一郎, 小島 博己
2. 発表標題 ラット中耳への鼻腔粘膜細胞シート移植モデルの開発 : 中耳粘膜再生治療の作用機序解明に向けて
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲垣 太郎, 森野 常太郎, 谷口 雄一郎, 肥塚 泉
2. 発表標題 家兎外耳道上皮剥離モデルに対する自己由来口腔粘膜上皮細胞シート移植による治療効果の検証
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 家兔副鼻腔骨増生モデルを用いた培養鼻粘膜上皮細胞シート移植
2. 発表標題 菊地 瞬, 森野 常太郎, 山本 和央, 鴻 信義, 小島 博己
3. 学会等名 第58回日本鼻科学会総会・学術講演会 2019年10月
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 輸送システムを利用した培養上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生治療
2. 発表標題 谷口 雄一郎, 山本 和央, 森野 常太郎, 稲垣 太朗, 小島 博己, 肥塚 泉
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会 2019年10月
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森野常太郎	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版(株)	5. 総ページ数 683-688
3. 書名 医学のあゆみ【難聴の治療-再生医療から人工聴覚器まで】中耳粘膜再生を併用した鼓室形成術	

1. 著者名 森野 常太郎, 山本 裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 JOHNS	5. 総ページ数 4
3. 書名 耳管処置, 耳管機能検査のリスクマネジメント	

〔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
---------	---------