

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09725

研究課題名（和文）低侵襲な中耳粘膜再生技術による中耳真珠腫根治へ向けての研究

研究課題名（英文）Development of a minimally invasive technique to regenerate the middle ear mucosa in the treatment of middle ear cholesteatoma.

研究代表者

伊藤 吏（Ito, Tsukasa）

山形大学・医学部・教授

研究者番号：50344809

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は中耳真珠腫の再形成性再発を予防する新たな中耳粘膜再生治療法の開発である。本研究では独自の中耳粘膜障害動物モデルを用いて、レチノイドによる中耳粘膜の再生効果を検討した。その結果、レチノイドの局所投与により、正常と同様の特徴を持った中耳の線毛上皮細胞が再生することを組織学的に確認した。さらにその再生した線毛上皮細胞は機能的にも正常に近い運動性を有していた。また、レチノイドの内耳毒性についても検討し、本研究では明らかな内耳毒性を認めなかった。レチノイドはすでに臨床で広く使用されている薬剤であり、今後は臨床応用に向けて、ヒトへの臨床研究などを進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はこれまで初めて、中耳粘膜におけるレチノイド受容体の存在を明らかにし、さらにレチノイドが中耳粘膜の線毛上皮再生に有効であることを示した研究であり、中耳真珠腫に対する新たな治療法開発の第一歩になったと考えられ、その社会的意義は大きいと考えている。レチノイドはすでに臨床で広く使用されている薬剤であり、本研究の結果をもとに臨床応用できれば、より実践的な中耳粘膜再生治療法となりうる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a regenerative therapy for the middle ear mucosa to prevent recurrence of middle ear cholesteatoma. In this study, we used a unique animal model with middle ear mucosal defects to investigate the regenerative effects of retinoids on the middle ear mucosa. As a result, local administration of retinoids regenerated middle ear lineage epithelial cells with characteristics histologically similar to those of normal cells. In addition, the regenerated lineage epithelial cells functionally had motility similar to that of normal mucosa. We also evaluated the inner ear toxicity of retinoids and found no obvious inner ear toxicity in this study. Retinoids are already widely used in clinical practice, and clinical trials in humans will be conducted in the future for clinical application.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳真珠腫 中耳粘膜 レチノイド 再生医療 線毛上皮

## 1. 研究開始当初の背景

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。

現在、中耳真珠腫の根治治療は手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。真珠腫ははまだ再発率の高い疾患であり、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の再陥凹に角化物が堆積する再形成再発がある。近年新たな手術方法の開発や工夫により遺残性再発は減少傾向であるが、再形成再発の制御は臨床上大きな課題である。

現在、術後に陥凹・癒着のない中耳腔を形成するためにシリコン膜を留置する二段階手術が行われているが、実際に中耳腔を形成するのは粘膜上皮ではなく癒着組織であり、ガス交換能は持っていなかった。他にも硬い軟骨板による鼓膜形成など様々な手術の工夫が報告されているが、再形成再発を制御できた方法はなく、手術法の工夫だけでは解決できない問題である。近年では、組織工学を応用した粘膜細胞シートの中耳移植も検討されているが、長い準備期間や高水準培養施設の必要性、高額な費用など臨床応用までには高いハードルがある。このような根治が難しい中耳真珠腫を克服するための、聴力改善と真珠腫再発抑制を兼ね備えた新しい治療法の開発が問われている。

## 2. 研究の目的

中耳真珠腫は既存の手術治療だけでは術後の鼓膜陥凹、中耳癒着を制御することができず、聴力改善と真珠腫再発抑制を兼ね備えた新しい治療法が求められている。本研究はその第一歩として、中耳粘膜障害動物モデルを利用して、低侵襲かつ内耳障害の副作用を持たず、正常な中耳粘膜再生をもたらす治療法を開発することが目的である。

## 3. 研究の方法

我々は2017年より中耳粘膜再生に関する基礎研究の第一歩として、モルモットを用いて骨髄間葉系幹細胞の誘導因子である high-mobility group box 1 (HMGB1) による中耳粘膜再生研究を開始した(基盤研究C 課題番号 17K11313)。この研究において、低侵襲な経外耳道的内視鏡下操作により中耳粘膜に局限した障害を起こすモルモットモデルを独自に開発した。残念ながら HMGB1 の中耳粘膜再生効果を示すことはできなかったが、我々はラビット副鼻腔粘膜で再生効果が報告されているビタミン A 誘導体(レチノイド)(Hwang PH, et al. Laryngoscope 2006)に着目し、レチノイドによる中耳粘膜再生治療研究を行った。

研究方法は大きく4つに分けられる。

### ①中耳粘膜障害モデルに対するレチノイドによる中耳粘膜再生治療の評価

モルモット中耳粘膜障害モデルの粘膜搔爬部位に0.02%レチノイドを局所投与し、治療を行った。動物は、レチノイドと軟膏基剤を混和したものを投与した群(レチノイド群)と、軟膏基剤のみを投与した群(コントロール群)とに分け、各群6匹ずつ作製した。術後2週で、HE染色と免疫染色による組織学的評価を行った。

レチノイドにより再生した中耳粘膜の機能評価

再生した中耳粘膜は組織学的に線毛上皮細胞の特徴を有していた。再生した線毛上皮細胞の機能を評価するため、中耳粘膜障害モデルへレチノイドを投与し、2週間後に再生した中耳粘膜を採取した。これを位相差顕微鏡で観察し、レチノイド群と正常粘膜群で線毛機能の指標のひとつである線毛運動周波数を測定した。

レチノイドの内耳毒性の評価

レチノイドの内耳毒性を評価するため、聴力評価を行った。動物を、鼓膜を穿破し中耳にレチノイドを投与した群(レチノイド群)と、鼓膜穿破のみを行い、薬剤は投与しない群(鼓膜穿破群)に分けた。各群ともに術前、術後2週、術後4週、術後6週、術後8週に聴性脳幹反応 Auditory brainstem response (ABR) による聴力評価を行った。

また、組織学的評価として、レチノイド投与後2週におけるコルチ器の有毛細胞とらせん神経節の免疫染色を行った。

モルモットの中耳粘膜におけるレチノイド受容体の発現の確認

モルモットの中耳粘膜におけるレチノイド受容体の mRNA 発現を確認するため、RT-PCR を行った。レチノイド受容体にはレチノイン酸受容体 (retinoic acid receptor ; RAR) とレチノイド X 受容体 (retinoid-X receptor ; RXR) があり、ともに 、 、 のサブタイプがあるが、すべてのサブタイプについて発現を確認した。

## 4. 研究成果

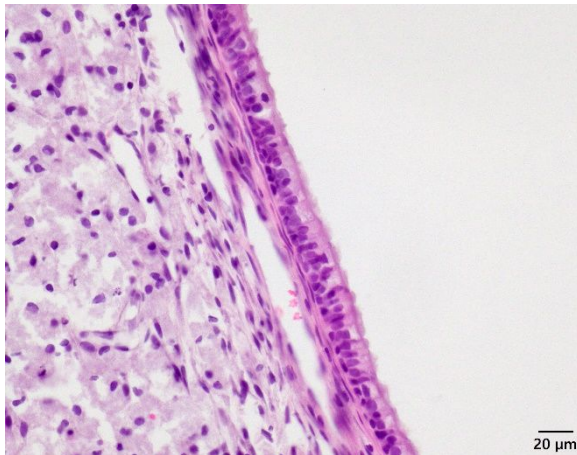
### ①中耳粘膜障害モデルに対するレチノイドによる中耳粘膜再生治療の評価

レチノイド群、コントロール群の代表的な組織画像を図1に示す。HE染色では、レチノイド群の6匹中5匹で正常中耳粘膜と同様な線毛上皮の再生を認めた。コントロール群で

は6匹すべてで明らかな上皮の再生を認めなかった。免疫染色では、レチノイド群において線毛上皮の再生を認めた5匹すべてで、上皮細胞マーカーである E-Cadherin と Pan Cytokeratin (PCK-26)、線毛マーカーである Tubulin が陽性であった(図2)。

図1：レチノイド群、コントロール群における HE 染色画像

(A) レチノイド群



(B) コントロール群

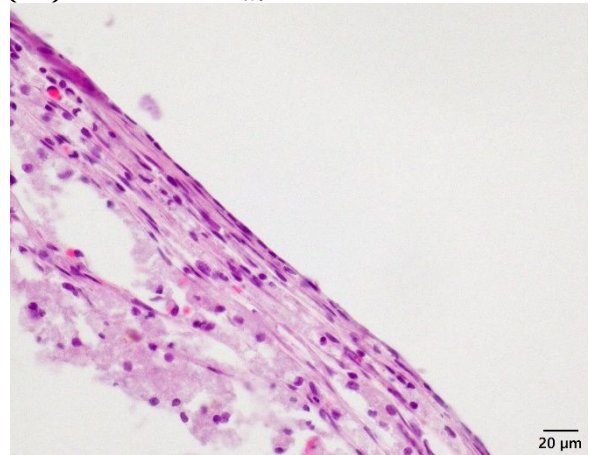
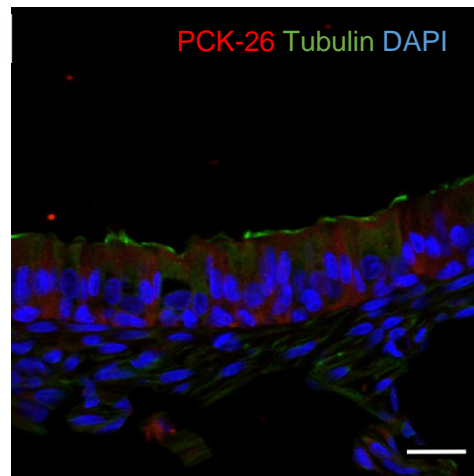
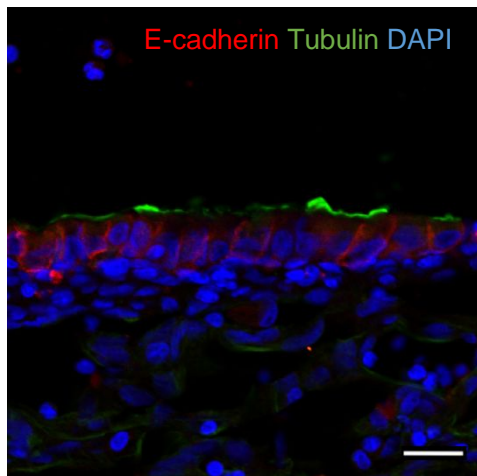


図2：レチノイド群の再生中耳粘膜における E-Cadherin、Pan Cytokeratin (PCK-26)、Tubulin の発現



#### レチノイドにより再生した中耳粘膜の機能評価

レチノイド群において線毛運動周波数の平均値は  $8.02 \pm 0.60\text{Hz}$  であり、正常群では  $8.24 \pm 0.34\text{Hz}$  であった。両群間に統計学的有意差を認めなかった。

#### レチノイドの内耳毒性の評価

レチノイド群では術後2週時点で4kHz、8kHz、32kHzにおいて15dB程度の閾値上昇を認めたが、徐々に回復し、8週時点ではほぼ術前聴力まで回復した。鼓膜穿破群では術後2週時点で4kHz、8kHzにおいて10dB程度の閾値上昇を認めたが、8週時点ではほぼ術前まで回復した。

また、組織学的評価では、レチノイド投与後も外有毛細胞、内有毛細胞ともに脱落を認めなかった。また、らせん神経節も、正常と比較して神経細胞の脱落を認めなかった。

#### モルモットの中耳粘膜におけるレチノイド受容体の発現の確認

モルモットの中耳粘膜においては、すべてのレチノイド受容体の mRNA 発現を認めた。

以上の結果から、レチノイドが中耳粘膜の線毛上皮再生に有用であることが、組織学的にも機能的にも示された。また、本研究においてレチノイドによる明らかな内耳毒性は確認されなかった。レチノイドはすでに臨床応用されている薬剤であり、本研究で得られた結果をもとに臨床応用できれば、比較的簡便で実践的な治療法となることが期待できる。今後は線毛機能のさらなる検討やレチノイド受容体の下流経路の解析を行うとともに、ヒトへの臨床応用に向けて研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 寺田小百合, 伊藤 吏, 小泉 優, 天野 彰子, 新川智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 レチノイドを用いた中耳粘膜再生治療について
3. 学会等名 第70回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田小百合, 伊藤 吏, 小泉 優, 天野 彰子, 新川智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 TEESによるレチノイド局所投与により再生した中耳粘膜の機能評価
3. 学会等名 第32回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺田小百合, 伊藤 吏, 小泉 優, 天野 彰子, 新川智佳子, 欠畑 誠治
2. 発表標題 レチノイドを用いた中耳粘膜上皮の創傷治癒効果について
3. 学会等名 第 31 回日本耳科学会 総会・学術講演会
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	窪田 俊憲  (Kubota Toshinori)  (80536954)	山形大学・医学部・客員研究員    (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
---------	---------