

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18325

研究課題名（和文）難治性中耳炎に対する繊毛細胞シートの開発

研究課題名（英文）Development of ciliated cell sheets for refractory otitis media

研究代表者

宇田川 友克（Udagawa, Tomokatsu）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60328292

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）：ヒト鼻粘膜からPneumaCult-Air-Liquid Medium培地（P-ALM）を用いて、繊毛細胞や杯細胞、基底細胞を有する安定した培養方法を確立した。従来のヒト鼻腔粘膜由来の無繊毛細胞シートにおいて、自己複製能と様々な細胞に分化する能力（多分化能）を有する上皮のマーカーX陽性細胞に、繊毛細胞の分化に必要な転写因子Yが発現していることを見出した。次に、ヒト鼻粘膜由来の単細胞群からP-ALMを用いて繊毛細胞等を創造した。この創造物において、繊毛細胞の発生に関与する候補分子の情報収集と選定作業をおこない、繊毛細胞の発生に重要な遺伝子Zが顕著に発現していることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癒着性中耳炎は長年、術式が議論・改良されているが、未だ術後再発率の高い疾患である。本研究成果であるP-ALMを用いたヒト鼻腔粘膜由来繊毛細胞シートを術中創部に移植することで、懸案となっている癒着性中耳炎の術後再発を予防できる可能性がある。また、本繊毛細胞シートは難治性の鼻副鼻腔疾患を有する患者個々の病態を解析するスフェロイドとして有用なツールになり得ると我々は考えている。

研究成果の概要（英文）：With the ultimate goal of developing a cell sheet for intraoperative transplantation to improve the postoperative recurrence rate of refractory otitis media, we developed ciliary cell sheets from human nasal mucosa using PneumaCult-Air-Liquid Medium (P-ALM). We revealed that, in the conventional ciliated cell sheets without cilia from human nasal mucosa, self-renewal (proliferation) marker X-positive cells which have ability to differentiate into various cells (pluripotency) express transcription factor Y that is required for ciliated cell differentiation. Next, using P-ALM, we generated ciliated cell sheets derived from surgical specimens, expressing Z gene which is crucial for development of ciliated cells.

研究分野：Otorhinolaryngology

キーワード：難治性中耳炎 細胞シート 繊毛細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者が所属する細胞シートグループは、難治性の中耳炎として最もよく知られている疾患の一つである真珠腫性中耳炎に対して、術中創部(乳突腔)に鼻腔粘膜細胞シートの自家移植を施行することで良好な治療成績が得られている。一方、癒着性中耳炎症例に従来の鼻腔粘膜由来無繊毛細胞シートを創部(鼓室)に移植しても術後再発するケースが少なくない。この原因としては、無繊毛細胞シートには繊毛が生えていないため、繊毛が豊富な鼓室の正常粘膜と同等の役割ができていない可能性がある。

2. 研究の目的

癒着性中耳炎症例の術後再発率を改善させることが本研究の最終目標である。この目的を達成するために、温度応答性培養「基材」を用いて容易に移植可能な鼻腔粘膜由来繊毛細胞シートの開発を目指している。

3. 研究の方法

I. 無繊毛細胞シートの新奇発現マーカーの探索

すでに臨床応用されている鼻腔粘膜由来無繊毛細胞シートにおいて、現在まで報告されておらず、かつ、呼吸上皮粘膜の発生・再生に関与する分子の発現解析を行った。

II. 繊毛細胞シートの開発と発現解析

研究協力者である葛西らは作製した無繊毛細胞シートにトリプシン処理によって細胞を回収した後に、気道上皮の分化誘導条件である PneumaCult-Air-Liquid Medium 培地(P-ALM)に再培養し、繊毛細胞・杯細胞への分化能を有することを報告した(Kasai et al. FASEB Bioadv. 2022)。この方法に準じて、今年度は、鼻副鼻腔疾患を有する患者の手術検体(鼻粘膜)から、一度無繊毛細胞シートを作製しない培養方法を考案し、より短期的に繊毛細胞シートを作製する条件を探索した。さらに、この創造物の特性を観察するため、鼻粘膜に特異的に発現する遺伝子量やマーカータンパク等の様々な分子の発現解析を行った。

4. 研究成果

I. 無繊毛細胞シートの新奇発現マーカーの探索

ヒト鼻腔粘膜由来の無繊毛細胞シートにおいて、自己複製(増殖)能と様々な細胞に分化する能力(多分化能)を有する上皮のマーカーX陽性細胞に、繊毛細胞の分化に必要な事が知られている転写因子Yが発現していることを発現量解析(図1)と発現局在解析から見出した。この結果は無繊毛細胞シートのマーカーX陽性細胞は繊毛細胞に分化する能力があることを示唆している。

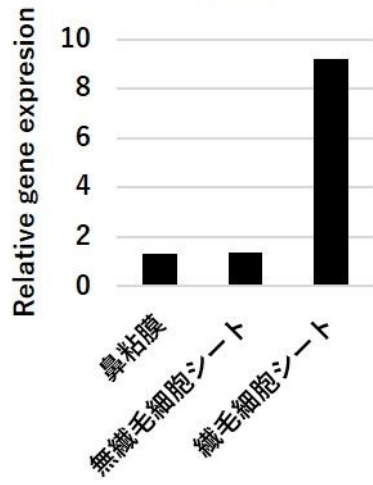
II. 繊毛細胞シートの開発と発現解析

鼻副鼻腔疾患を有する患者の手術検体(鼻粘膜)から、エクスプラント培養によって細胞を増殖させた。その細胞をトリプシン処理によって回収後、P-ALMを用いて分化誘導を行った。位相差顕微鏡で運動性のある繊毛細胞が多く観察された。免疫染色では、繊毛細胞マーカーY(図1)だけではなく、呼吸上皮マーカーや杯細胞マーカー、鼻粘膜の幹細胞と考えられている基底細胞の特異的マーカーがすべて発現していた。さらに、繊毛細胞の発生に関与する候補分子の情報収集と選定作業を行った。候補分子として、繊毛細胞の発生に特異的な役割を演じていることが知られているAシグナルの伝達カスケードで重要な役割を演じている分子Zを筆頭に発現の時期や局在、量等を調査する方法を検証した。検証方法としては、まず、遺伝子発現量の解析としてqPCRを行い、コントロールと比較して繊毛細胞シートは遺伝子Z(Z receptorをコード)が顕著に発現していることが分かった。また、タンパク発現局在の解析のため二重染色を行い、Z receptorは既知の鼻粘膜マーカー群と共発現していることを明らかにした(論文投稿準備中)。

現在、本繊毛細胞シートのクオリティーを検証する目的で、繊毛の動画解析と電子顕微鏡による微細構造を観察中である。今後の研究の推進方策として、温度応答性培養「基材」を用いて作製したヒト鼻腔粘膜由来の繊毛細胞シートの移植によって、癒着性中耳炎症例の術後再発率を改善させることが可能であるかを検討している。また、本繊毛細胞シートは鼻副鼻腔疾患を有する患者個々の病態を解析するスフェロイドとして有用なツールになり得ると我々は考えている。

図1

転写因子Y



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------