

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592498

研究課題名(和文) 組織再生工学を利用した人工鼓膜および中耳粘膜の作製と癒着性中耳炎治療への応用

研究課題名(英文) The development of artificial tympanic membrane and middle ear mucosa by reproductive tissue engineering to be aimed for new treatment of adhesive otitis media.

研究代表者

田中 康広 (TANAKA, YASUHIRO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40266648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：ウサギの外耳道皮膚を採取し、培養したケラチノサイトより温度応答性培養皿を用いて人工鼓膜上皮シートを作製した。一方、同種のウサギの中耳骨胞より中耳粘膜を採取し、中耳粘膜と細胞外マトリックスからなる人工中耳粘膜シートの作製を行った。最終的に人工鼓膜上皮シートと中耳粘膜シートを融合させ、人工鼓膜を作製した。電子顕微鏡での観察および免疫組織学的染色にて組織学的な特性を調べたところ、この人工鼓膜は正常鼓膜と類似する構造であることが確認された。この人工鼓膜を用いて癒着性中耳炎モデルの作製を試みたが、サイトカインや各種成長因子の刺激のみでは、癒着性中耳炎の発症を誘発することは出来なかった。

研究成果の概要(英文)：At first, we developed artificial tympanic membrane epithelium sheets from cultured keratinocytes obtained from external ear canal of a white rabbit by using the temperature-responsive culture dish. On the other hand, we developed artificial middle ear mucosal sheets consist of extra cellular matrix and cultured middle ear mucosa that was obtained from middle ear bulla of a homogeneous rabbit. We finally manufactured an artificial tympanic membrane by fusion of artificial middle ear mucosal sheets and tympanic membrane epithelium sheets. As we confirmed the pathohistologic characteristics of the manufactured artificial tympanic membrane by electron microscope and immunohistochemical staining, it resembled characteristics of normal tympanic membrane. Although we attempted to develop an experimental adhesive otitis media model by using the artificial tympanic membrane, we could not accomplish to develop it only by the stimulation of some cytokines and growth factors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：再生医学 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 癒着性中耳炎は難治な慢性の中耳疾患として知られており、手術治療による術後成績は極めて不良といえる。癒着上皮の剥離が困難な場合が多く、術後の中耳腔に正常な粘膜を温存できないため、術後鼓膜の再陥凹や再癒着を起こしやすいことが原因といえる。そこで、このような症例に対し、術後の露出した骨面上に正常な機能を有する粘膜を移植もしくは再生させることが可能であれば再癒着の防止として有用と考える。これまでも癒着性中耳炎の病態を解明し、新たな治療法を開発するため、*in situ* tissue engineering を応用して人工三次元皮膚を作製し、それらの病態解明を行ってきた。その結果、鼓膜上皮層においては中耳の慢性炎症が発症するメカニズムの一端を解明することには成功したが、鼓膜固有層および粘膜層における病態解明には至らなかった。その原因として鼓膜上皮層、固有層、粘膜層からなる鼓膜を三次元的に構築することが困難なことが挙げられ、人工鼓膜の作製に成功した報告はこれまでに一例もない。三層からなる人工鼓膜を作製し、癒着性中耳炎の成因ならびに病態を解明することは *in vitro* における研究に新たな局面を見いだせる斬新な方法と考える。そこでこの問題点を克服するため温度応答性培養皿を利用した人工鼓膜の作製に注目した。

(2) 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、温度変化のみで培養皿表面の親水性、疎水性制御が可能である。すなわち、培養温度である 37 度では弱い疎水性を示し細胞が接着、進展するのに対し、32 以下では表面が高度に親水化するためトリプシンなどのタンパク分解酵素を用いることなく培養細胞全体を一枚の細胞シートとして回収できる。細胞シートの底面には、細胞が培養の間に分泌した細胞外マトリックス (Extra cellular matrix: ECM) を保持しており、作製したシートは容易に他の組織に再接着できる利点を有する。細胞シートを用いた再生医療は皮膚、角膜ではすでにヒトでの臨床応用に成功しており、心筋、肝臓、食道、膀胱など様々な組織を対象に新規技術の開発が進んでいる。この技術を応用し、鼓膜上皮細胞由来の培養細胞シートと中耳粘膜の培養シートから人工鼓膜を作製したのち、実験的に *in vitro* で癒着性中耳炎の発症を誘導することを考えている。

(3) 癒着性中耳炎では、先にも述べたが癒着上皮の剥離が難しく、術後の中耳腔に正常粘膜を保存することが困難な症例が多い。そのため、術後鼓膜の再陥凹や再癒着が起こりやすく、症状の再燃を繰り返す。このような症例に対し術後の露出した骨面

上に早期に粘膜を再生させることは再癒着の防止として有用である。そこで中耳粘膜の再生を目的とし、これまでは Air-liquid interface 法による三次元人工中耳粘膜を作製し、粘膜の欠損部位への移植実験を行ってきた。その結果、作製した人工粘膜は組織学的に生体に類似してはいたが、改善すべきいくつかの問題点が存在することが判明した。生体の粘膜に比較して厚いこと、移植の際に生着が不十分なこと、作製に時間がかかること、などが挙げられる。これらの問題点を解決するため、温度応答性培養皿を利用した中耳粘膜上皮細胞を用いた培養細胞シートを作製した。最終的には癒着性中耳炎に対し中耳粘膜シートを移植することにより術後鼓膜の再癒着を防止させ、臨床応用させることが目標である。

2. 研究の目的

(1) 癒着性中耳炎の発症に関する研究は、これまでほとんどが動物実験によるものであった。文献的にみても *in vitro* での研究は報告が少なく、現在までその成因や進展機序は明らかにされていない。今回の *in situ* tissue engineering による人工鼓膜の作製により、*in vitro* においても癒着性中耳炎に関する研究が可能となるため、その発症や進展機序解明に新たな視点から検討が行えるようになる。このことは、今後の癒着性中耳炎の研究に際し、極めて重要な役割を担う。一方、中耳手術においては、粘膜の再生を期待して鼻粘膜、頬粘膜移植やゼルフームなどが使用されてきたが治療として決定的なものは未だ開発されていない。中耳腔の含気化を期待し、形成鼓膜の再陥凹を予防するため、軟骨を使用した cartilage tympanoplasty が行われている現状である。しかしながら、今回の研究において中耳粘膜シートの移植により粘膜の再生が促進され、中耳腔が含気化されようになれば、これまでの術式が大きく変わる可能性がある。癒着性中耳炎では術後中耳粘膜の保存が難しく骨面が露出され、そのため形成鼓膜の再癒着が大きな問題となっていた。しかし、中耳粘膜シートの移植により中耳腔の含気腔が確保されると術後鼓膜の再癒着は著しく低下することが予想される。このように中耳手術における術後合併症も軽減され、さらに再発率、術後聴力などに関しても予後が良好となることが期待される。

3. 研究の方法

温度応答性培養皿を用いて中耳粘膜シートを作製し、組織学的な検討を行う。また、鼓膜上皮層由来のケラチノサイトから鼓膜上皮シートを作製し、中耳粘膜シートと融合させ、人工鼓膜の作製を行う。作製された中耳粘膜シートおよび人工鼓膜の形態に

関し、電子顕微鏡を用い、基底膜、細胞外マトリックス、細胞間接着、tight junctionの存在を確認し、構造が生体の中耳粘膜および鼓膜に近似することを確認する。その後、人工鼓膜に対しては、各種サイトカインやケミカルメディエーターを作用させ、実験的に癒着性中耳炎を発症させたのち、癒着上皮の進展を観察する。その他、陰圧などの物理的影響下による人工鼓膜の変化についても検討する。また中耳粘膜の再生に関しては、中耳粘膜シートの移植を *in vivo* にて行う。中耳粘膜の移植に関しては生着率を向上させるため、上皮促進因子や basic FGF などのサイトカイン類の付加も行う。以下に具体的な研究方法を記載する

(1) *in vitro*

中耳粘膜を採取し、粘膜上皮成分と線維芽細胞に分離し、それぞれについて培養を行う。上皮層には中耳粘膜上皮細胞を用い、粘膜下は線維芽細胞にコラーゲンを加えた結合組織モデルを作製し、上皮層及び粘膜下層の2層からなる三次元人工中耳粘膜を作製する。

ケラチノサイトの分離を行うため外耳道皮膚を採取し、ケラチノサイトの分離培養を行う。その後、培養ケラチノサイトを用い ECM を有する鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製する。先に作製した中耳粘膜シートと鼓膜上皮シートが基底膜側で ECM を介し、表裏一体となるように接合させ、三次元人工鼓膜を作製する。

上記方法にて作製した人工中耳粘膜に免疫染色を施行し、組織学的な特徴を観察する。免疫組織学的染色を行い、生体における中耳粘膜との相違点があるか、確認を行う。また線毛や微絨毛の有無などについて電顕的にも観察を行い、比較検討を行う。

人工鼓膜に関しては免疫組織学的にはサイトケラチンの発現パターンや caspase-14、Ki-67 および PCNA などから上皮の分化、増殖を検討する。また、電子顕微鏡を用い、基底膜、細胞外マトリックス、細胞間接着、tight junction の存在などを確認する。

サイトカインや増殖因子を付加させた場合の組織の反応を調べるため、EGF や KGF、IL-1 などによる化学的刺激を人工鼓膜に付加させた場合の人工鼓膜の組織学的な変化や他のサイトカイン産生について検討する。

作製した人工鼓膜を用い、実験的に癒着性中耳炎を誘導するようなサイトカインやケモカイン、その他のケミカルメディエーターが存在するのかを確かめ、さらには鼓

膜陥凹の原因と癒着性中耳炎が進展する機序にはどのような因子が深く関与するのかについて分子生物学的な検討を行う。

(2) *in vivo*

成熟白色家兔 (New Zealand White rabbit) 2 ~ 2.5kg を対象動物として用いる。硬性内視鏡を用いて耳垢、外耳炎、鼓膜穿孔、中耳炎などの異常所見がないことを確認したのち中耳骨胞の削開を行い、中耳粘膜を全て除去する。鼓膜の陥凹および癒着を誘導し、癒着性中耳炎モデルを作製する。中耳骨胞を開放し、粘膜を完全に除去した群と中耳粘膜シートの移植を行った群で移植シートが生着し、粘膜再生が誘導されるのかについて検討を行う。移植後の粘膜再生の状態、骨増生、肉芽増生、鼓膜所見の状態を観察し、各群での比較を行う。

4 . 研究成果

(1) 中耳粘膜シートおよび人工鼓膜の形態学的な特徴と組織学的な検討

癒着性中耳炎の病態解明を行う目的として *in situ* tissue engineering を応用し人工鼓膜の作製を試みた。また人工鼓膜の作製には鼓膜粘膜層にあたる中耳粘膜シートの開発が不可欠であるため、人工鼓膜の作製に先立ち中耳粘膜シートを作製した。中耳粘膜シートは上皮層が単層上皮である採取した中耳粘膜細胞からなり、粘膜下層にはコラーゲン内に線維芽細胞を加えた2層の構造よりなる。この形態学的な構造を確認するため電子顕微鏡下にて観察したところ、SEM では細胞は多角形で辺縁は明瞭であり、敷石状の形態を呈していた。微絨毛は細胞の辺縁に多く認められたが線毛は殆ど認められず、培養することにより線毛が減少することが明らかとなった(図1)。一方、形態だけではなく組織としての上皮の分化度や細胞の増殖能を検討するため、免疫組織学的な検討を行ったところ、分化のマーカーである caspase-14 や増殖能の指標となる Ki-67 などの発現様式は正常中耳粘膜とほとんど変化がないことが示された。よって上皮の分化や増殖能の点では正常な中耳粘膜の組織と比較しても相違ないことが明らかとなった。

次に鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製した。この鼓膜上皮シートは外耳道皮膚より採取されたケラチノサイトと ECM から構成される。この鼓膜上皮シートを電子顕微鏡下に観察したところ、正常な重層扁平上皮が有する層構造に加え、最上層の角化した細胞や基底膜の存在などが認められた。さらにこの細胞間にはデスモソーム結合や tight junction の存在が確認され、正常な鼓膜上皮層と同様に細胞間接着が密である構造となっていることが判明した(図2)。この粘膜上皮シートと中耳粘膜

シートが ECM を介して表裏一体となるように融合させ、三次元人工鼓膜を作製した。人工鼓膜において鼓膜上皮層と固有層との間には通常、上皮層の底部に基底膜が存在し、この2層を分離しているが、この人工鼓膜においても laminin5 の発現より基底膜が正常どおり構築されていることが確認された(図3)。また、この人工鼓膜における分化について検討したところ、caspase-14 の発現様式は正常鼓膜における上皮層と同様であることが判明した。このことは人工鼓膜においては組織学的に正常に分化する機能を有していることを意味している。さらに人工鼓膜における鼓膜上皮層の増殖能に関して Ki-67 を用いてその発現について検討したところ、増殖能の亢進は認められず、正常鼓膜と同様の発現様式であることが明らかとなった。(図4)。これらのことより、人工鼓膜は形態的にも組織学的にも正常鼓膜と類似していると考えられた。

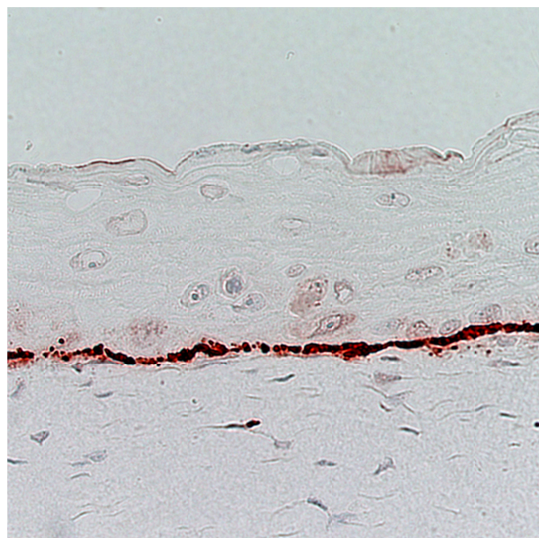


図3：人工鼓膜上皮層における laminin5 の発現（免疫組織染色）

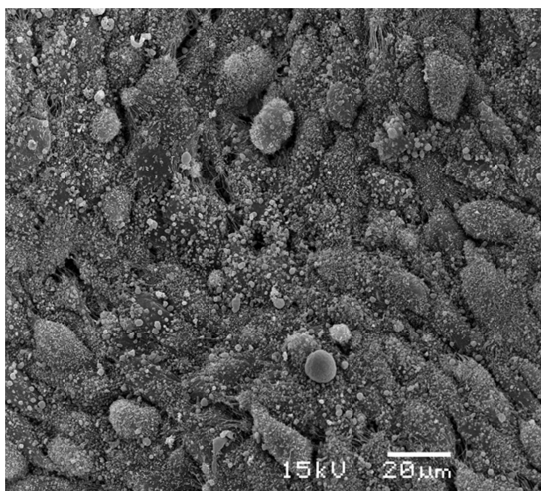


図1：中耳粘膜シートの走査電顕像

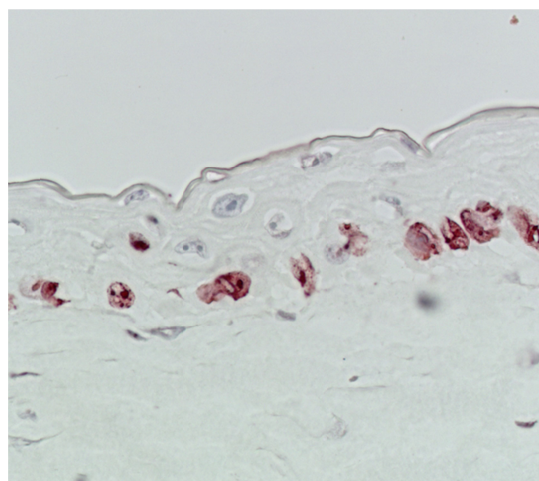


図4：人工鼓膜上皮層における Ki-67 の発現（免疫組織染色）

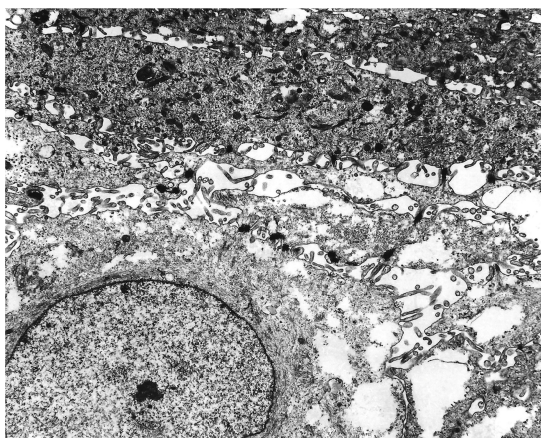


図2：鼓膜上皮シートの透過電顕像

(2) 実験的癒着性中耳炎モデルの作製
 作製した人工鼓膜に EGF や KGF, IL-1 などによる化学的刺激を加え、鼓膜上皮の組織学的な変化を観察したが、特異的な変化は認めなかった。鼓膜が癒着する前段階と考えられる鼓膜の陥凹についても化学的刺激のみでは認められなかった。上記のサイトカインを付加した場合に他のケモカインやサイトカインの発現が上昇するかについて検討したが、今回の検討では際立った発現の上昇を認めるタンパクを同定することはできなかった。今後も種々のサイトカインやケモカインを付加した場合に他のサイトカインがどのように変化するのか、DNA チップを用いて網羅的に解析してゆく。

(3) 癒着性中耳炎モデルにおける人工中耳粘膜の移植について

中耳粘膜シートを白色家兎の bulla に移植した際に中耳粘膜シートが中耳骨胞内で生着し、粘膜再生が行われるか、検討を行った。今回の結果では、粘膜を除去したのみの群と粘膜除去後に人工中耳粘膜シートを移植した群で比較したところ、予想に反して bulla における骨増生や肉芽増生には明らかな差が認められなかった。本来人工中耳粘膜を移植した場合、きちんと生着することにより中耳粘膜よりガス交換が起こり中耳骨胞は含気化され、肉芽増生や骨増生は起こらないと推測さえる。しかしながら、この2群間に差が見られなかった原因としては、作製した中耳粘膜シートが中耳骨胞内で遊離してしまい生着しなかったことや中耳粘膜シートを移植後に感染を来たしたことが考えられた。今後は中耳粘膜を移植した後の創部の感染を予防するため、移植前後に抗菌薬を投与し、感染を防止する工夫が必要と考える。本実験の結果を十分に顧みて、さらに研究をすすめて行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) 田中康広、組織再生工学を応用した中耳疾患の病態解明。耳鼻咽喉科・頭頸部外科、査読無、85: 10-18, 2013

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 田中康広、中耳手術の変遷と今後の展望。大分耳鼻咽喉科臨床研究会(招待講演)。2014年2月27日。大分市。

(2) 田中康広、当科における小児真珠腫性中耳炎の検討。第23回日本耳科学会学術講演会。2013年11月24-26日。宮崎市。

(3) 田中康広、鼓膜癒着症に対する cartilage tympanoplasty。第22回日本耳科学会学術講演会。2012年10月12-14日。名古屋市。

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康広 (TANAKA YASUHIRO)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：40266648