

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592565

研究課題名(和文) 鼻粘膜上皮細胞シートを用いた鼓室形成術の開発

研究課題名(英文) Tympanoplasty with nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation

研究代表者

小島 博己 (Kojima, Hiromi)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：60234762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：中耳真珠腫や癒着性中耳炎術後の露出した骨面上に早期に粘膜が再生されれば、術後鼓膜の再癒着や再形成性真珠腫の予防が可能と考えられる。温度応答性培養皿を用いて自己の鼻腔粘膜上皮細胞シートを作製し、外耳道後壁保存型鼓室形成術の際に、中耳の粘膜欠損部へ移植し術後の粘膜を再生させる新たな術式を開発し、厚生労働省からの承認を取得後、ヒト臨床研究を開始した。これまでに弛緩部型中耳真珠腫2例、緊張部型中耳真珠腫2例の患者に対して、自己鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した外耳道後壁保存型鼓室形成術を施行した。すべての症例で鼓膜の再癒着や真珠腫の再発は認めておらず、有害事象や合併症も認めていない。

研究成果の概要(英文)：Recurrence of cholesteatoma is mainly caused by poor mucosal regeneration in the middle ear cavity and mastoid cavity, and changes such as granulation tissue formation can occur, which impair gaseous exchange in the middle ear cavity. If middle ear mucosa can be preserved and the rapid postoperative regeneration of mucosa on the exposed bone surface can be achieved after middle ear surgery, surgical treatment for otitis media including cholesteatoma can be potentially improved, and the physiological function of middle ear can be recovered. Therefore, I developed a novel method combining canal wall up tympanoplasty and autologous epithelial cell sheet transplantation for postoperative regeneration of the middle ear mucosa. We obtained the approval of the Ministry of Health, Labor, and Welfare.

We have performed this procedure on four patients with middle ear cholesteatoma. All patients showed a favorable postoperative course, with no adverse events or complications.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：中耳粘膜 粘膜再生 中耳真珠腫 癒着性中耳炎 細胞シート 鼻腔粘膜 温度応答性培養皿 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

中耳炎に対する鼓室形成術の大きな目的の一つは聴力の改善である。このためには鼓膜の裏面に含気腔が存在し、鼓膜の振動がロスなく耳小骨を經由して内耳まで伝わる必要がある。術後に正常な中耳腔を形成するためには中耳粘膜の再生および生理的なガス換気能の回復と鼓膜の癒着防止がなされることが最も重要である。しかし中耳炎を伴った症例では中耳粘膜機能は元来障害されているため術後の中耳粘膜上皮の再生は遅延し、有効な含気腔を作ることが困難なことが多い。特に鼓膜が陥凹し中耳腔の内側壁と癒着した癒着性中耳炎症例では手術時に上皮を剥離除去した時に中耳の骨面が露出してしまうため、中耳粘膜の温存が困難となる。このため癒着性中耳炎は他の中耳疾患と比較して手術成績が非常に悪い。

また真珠腫性中耳炎においては、形態的な構造を保存する外耳道後壁保存型鼓室形成術では、削開した乳突腔における粘膜再生が不良な場合は再形成性真珠腫を生じやすいという問題が生じる。一方、外耳道後壁削除型鼓室形成術では再形成性再発は予防できるが、外耳道の生理的な形態は損なわれ、術後の cavity problem などを生じる可能性がある。したがって、これらの疾患に対しては決め手となる手術法や統一された手術法はいまだ存在せず、現在広く普及している鼓室形成術を行うだけでは術後成績に限界がある。

このような経緯から、術後に障害された中耳粘膜を早期に再生させることが可能になれば、癒着性中耳炎では鼓膜の再癒着を防止することができ、真珠腫性中耳炎では外耳道後壁を保存した上で、真珠腫の再発を予防することが可能になり、手術成績が向上すると思われる。

基礎実験として中耳骨胞を有する家兎を用いて人工中耳粘膜及び中耳粘膜シートの

作製に成功し、移植により粘膜再生が促進されることを確認している。またヒト中耳粘膜シートの作製にも成功した。しかし、実際の臨床応用を考えた場合、中耳では十分な量の組織の採取が困難なこと、外来での採取が困難なため2期的手術が必要となること、患側の耳では正常な組織の採取が困難なことなどの問題点が挙げられる。

そこで我々は中耳への他の移植原材料として、鼻腔粘膜は外来で容易に安全に採取でき、何より患者への負担が少ないという利点がある為、鼻腔粘膜の上皮細胞を用いて細胞シートを作製し、中耳粘膜欠損部に移植して、粘膜の再生を促すことにより真珠腫の再発や鼓膜の再癒着の防止ができないかと考えた。中耳粘膜は発生学的に鼻腔を含めた上気道由来であり、内胚葉性で呼吸上皮に類似しており、解剖学的にも中耳腔は鼻腔と耳管を通じて連続している。また、免疫組織学的にも鼻腔粘膜と中耳粘膜は非常に近似していることが確認されている。これらの理由より、細胞シートの原材料として、鼻腔粘膜組織を選択した。

移植用の鼻粘膜上皮細胞シートの作製には、東京女子医大先端生命医科学研究所で開発された温度応答性培養皿に着目した。細胞シートを用いた再生医療は、すでに大阪大学医学部眼科と東京女子医科大学先端生命医科学研究所の共同研究での角膜上皮幹細胞疲弊症治療や東京女子医科大学消化器外科、東京女子医科大学先端生命医科学研究所での内視鏡的粘膜切除術(EMR)にともなう人工食道潰瘍の治療において臨床応用に成功している。

先行実験においてウサギを用いた動物実験を行い、温度応答性培養皿で作製した鼻腔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おり、骨や肉芽の増生は抑制されることを検証した。また、大学の倫理委員会の承認を得て、ヒトにおける

鼻腔粘膜上皮細胞シートの作製にも成功している。

このような理由から、中耳手術（鼓室形成術）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正常な粘膜を再生し、創傷治癒の促進および術後再癒着の予防が期待される。

癒着性中耳炎の手術に関しては、癒着上皮を除去した後に生じる粘膜欠損部位に対して細胞シートを移植することにより、粘膜再生が生じると期待され、鼓膜の再癒着を予防できる可能性が高い。また真珠腫の手術においても、真珠腫上皮を摘出した部位に生じる骨欠損が細胞シート移植により、粘膜が再生すると考えられ、術後の再形成性真珠腫の予防と乳突腔の含気化も生じると考えられる。本臨床研究の遂行により、外耳道保存型鼓室形成術という形態的に正常に近い外耳道形態を残しながら、鼓膜の再癒着や真珠腫の再発を確実に予防できる新しい手術法の開発に大きく寄与できるものと考えられる。

## 2．研究の目的

本研究では患者の鼻粘膜より採取した粘膜上皮細胞から粘膜細胞シートを作製し、術中に骨露出部位（粘膜欠損部位）に移植することにより、将来的に手術成績を向上させることを目的とする。中耳手術（鼓室形成術）において病的粘膜を除去した後の骨面に鼻腔粘膜上皮細胞シートを移植して正常な粘膜を再生させ、中耳腔とそれに連続する乳突腔が正常に機能させることで、真珠腫性中耳炎の再発や鼓膜の再癒着を防止する。

細胞シート移植を併用した中耳手術のヒト臨床研究を開始し、臨床研究実施計画に基づき本臨床研究を遂行し、まずは第1相、第2相試験の位置付けとして、細胞シート移植の安全性の客観的評価と臨床効果に関するデータを収集する。

## 3．研究の方法

ヒト臨床研究を開始するために、『厚生労働省医政局長通知「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成 22 年厚生労働省告示第 380 号)」平成 22 年 11 月 1 日付け 医政発 1101 第 11 号(平成 18 年 7 月 3 日付け通知の平成 18 年厚生労働省告示第 425 号を全部改正したもの)』に準じ、本臨床研究についての厚生労働省からの適合性の承認を得る。

厚生労働省からの承認および厚生労働大臣からの意見書得後、ヒト臨床研究を開始する。

### (1) 対象

#### 【選定基準】

次の選択条件をすべて満たす患者を被験者として選択する。

- 中耳手術(鼓室形成術)を必要とする次に挙げる疾患のいずれかが診断されていること。  
癒着性中耳炎 真珠腫性中耳炎
- 年齢 20 歳以上
- 患者本人による署名および日付の記載入りの同意文書を得ていること。

#### 【除外基準】

次のいずれかの条件に該当する者は除外する。

- 感染症(細菌・真菌・ウイルスなど)を有する症例
- 鼻腔ポリープを合併した鼻副鼻腔疾患に罹患している人
- 抗血小板薬・抗凝固剤を内服している人
- 妊婦および妊娠の可能性のある人
- その他、何らかの理由により本研究を実施するのに不適當と考えられる症例

## (2) 方法

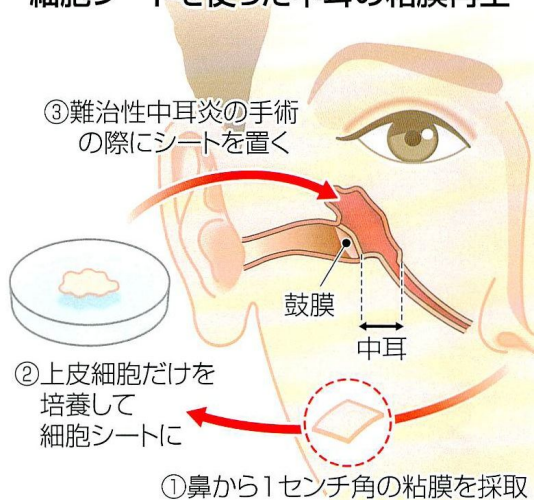
移植約 3 週間前に、外来にて内視鏡下に約 10×10mm 大のヒト鼻腔粘膜組織および血液を採取する。

採取した鼻腔粘膜組織および回収した血清を用いて、あらかじめ作製した製造指図・製造記録書に沿って、東京慈恵会医科大学の GMP ( Good Manufacturing Practice ) 対応施設である細胞培養センター (CPC: Cell Processing Center) での無菌操作で培養自己鼻腔粘膜上皮細胞シートを作製する。

移植前にあらかじめ各種品質確認試験を施行し、作製した細胞シートが規格した基準値を満たすことを確認する。

中耳手術 ( 鼓室形成術 ) の際に、粘膜欠損部である露出した骨面に細胞シートを移植する。

### 細胞シートを使った中耳の粘膜再生



術後は、通常の中耳手術後と同様に、鼓膜所見、CT 所見による再発の有無や、聴力検査などによる機能的評価を行う細胞シートの有効性を検証する。また、有害事象の発現の有無の確認も行い、細胞シートのヒト臨床における安全性についての評価も行う。

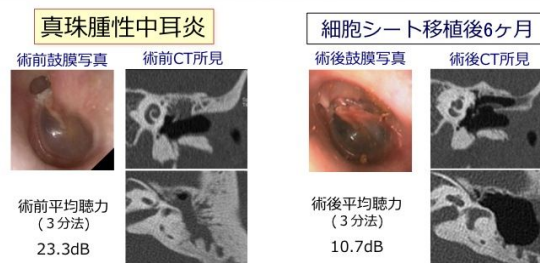
## 4 . 研究成果

前臨床試験の良好な結果を踏まえ、「ヒト

幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じ、厚生労働省に申請を行った。第 78 回厚生科学審議会科学技術部会で正式に承認され、厚生労働大臣からの意見書も取得し、ヒト臨床研究を開始した。これまでに耳鼻咽喉科において「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じて承認されたヒト幹細胞臨床研究はなく、耳鼻咽喉科領域における本邦初のヒト幹細胞臨床研究となった。

現在までに弛緩部型中耳真珠腫 2 例、緊張部型中耳真珠腫 2 例の患者に対して、自己鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した鼓室形成術を施行した。作製した自己の培養上皮細胞シートはいずれも設定された品質基準を満たし、中耳手術の際に安全に移植することに成功した。狭い上鼓室の骨面やアブミ骨周囲に対しては移植用デバイスを用いることで細胞シートを移植することが可能であった。移植後 6 ヶ月以上経過し CT を施行した弛緩部型中耳真珠腫症例では、細胞シートの移植した部位に一致して中耳腔、乳突腔の含気化が始まり、CT 所見で非常に良好な中耳腔、乳突腔の含気化が確認され、理想的な術後形態が得られた。現在までのところ、すべての症例で鼓膜の再陥凹や再癒着はなく、真珠腫の再発も認めておらず、術後聴力成績判定基準においても成功耳となっている。また、細胞シート移植による有害事象や合併症も認めていない。

### 細胞シート移植 症例1



- 中耳粘膜の再生により非常に良好な中耳腔の含気化が認められ、良好な経過が得られている。
- 聴力も改善している。
- 再発もなく、有害事象も認められていない。

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 7 件)

Yamamoto K, Yamato M, Kojima H, et al.  
The effect of transplantation of nasal mucosal epithelial cell sheets after middle ear surgery in a rabbit model. *Biomaterials* 2015; 42: 87-93. (査読あり)

Yamamoto K, Yaguchi Y, Kojima H.  
Clinical analysis of secondary acquired cholesteatoma. *Am J Otolaryngol* 2014; 35: 589-593. (査読あり)

小島博己、耳鼻科と再生医療-難治性中耳疾患、先進医療フォーラム、2014、pp. 125-127

Yaguchi Y, Murakami D, Yamato M, Hama T, Yamamoto K, Kojima H, Okano T, Moriyma H. Middle Ear Mucosal Regeneration with Three-Dimensionally Tissue-Engineered Autologous Middle Ear Cell Sheets in Rabbit Model. *J Tissue Eng Regen Med* 2013. (査読あり) DOI:10.1002/term.

Yoshikawa M, Kojima H, Yaguchi Y, Okada N, Saito H, Moriyama H. Cholesteatoma fibroblasts promote epithelial cell proliferation through overexpression of epipegulin. *PLoS One* 2013; 8: e66725. (査読あり)

山本和央、小島博己、医療の現場が求めているバイオマテリアル 難聴疾患における再生医療と将来展望、バイオマテリアル-生体材料-、vol. 1、2013、pp. 116-118

濱孝憲、山本和央、谷口雄一郎、小島博己、患者まで届いている再生医療難治性中耳炎に対する粘膜上皮細胞シート移植、再生医療、vol. 11、2012、pp. 367-371

〔学会発表〕(計 6 件)

Kojima H. Middle ear regeneration using transplantation of tissue-engineered cell sheet. The 5th meeting of Asian Cellular Therapy Organization. -Symposium-Osaka(Japan). Nov 2014

小島博己。難治性中耳疾患に対する再生医療(ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した鼓室形成術)～招待講演～細胞シートティッシュエンジニアリングセンター(CSTEC)第7回シンポジウム。10月。2014年

小島博己。中耳粘膜の再生医療。鼻粘膜上皮細胞シートを応用した耳科手

術。～シンポジウム～日本再生医療学会(京都)。3月。2014年

小島博己。中耳真珠腫の病態と治療、今後の展開～特別講演～。島根耳鼻咽喉科フォーラム(松江)。7月。2014。  
小島博己。日本耳鼻咽喉科学会第27回専門医講習会 アドバンストコース 新規医療技術の保険診療化を目指して 再生医療。11月 2013年。

Hiromi Kojima. Middle ear regeneration of grafting of epithelial cell sheet. 9th International Conference of Cholesteatoma and Mastoid Surgery. (Mini Lecture) Nagasaki (Japan). June 2012.

〔図書〕(計 1 件)

小島博己、メディカルトリビューン、再生医療用語ハンドブック 11 感覚器耳鼻、2015、pp. 198-199

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
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

小島博己 (KOJIMA, Hiromi)  
東京慈恵会医科大学・耳鼻咽喉科・教授  
研究者番号：60234762

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：