

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861597

研究課題名(和文) 中耳手術における移植用細胞シートの臨床応用化にむけて

研究課題名(英文) Establishment of clinically applicable middle ear mucosal regeneration using cell-sheet

研究代表者

山本 和央 (Yamamoto, Kazuhisa)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50408449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：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、鼓膜の再癒着を防止することができ、中耳真珠腫の再発を予防することが可能になり、これまで困難であった再発の防止が格段に期待できる。そこで我々は鼻腔粘膜を用いて温度応答性培養皿で自己の培養上皮細胞シートを作製し、術後の中耳腔へ移植する新たな治療法を開発した。

前臨床試験における良好な結果を踏まえ、この新規治療のヒトでの臨床応用に成功した。現在までに真珠腫性中耳炎の患者5例に対して、自己鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した中耳手術を施行した。いずれも移植後経過は非常に良好で細胞シート移植による有害事象も認められていない。

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. I developed a novel method combining canal wall up tympanoplasty and autologous nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation for postoperative regeneration of the middle ear mucosa. I validated the safety and efficacy of human nasal mucosal epithelial cell sheets for use in clinical trials.

I have started clinical trial and performed this procedure on five 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 細胞シート 温度応答性培養皿 鼻腔粘膜 真珠腫 癒着性中耳炎 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

小児期の繰り返す中耳炎の罹患は中耳腔や乳突洞の粘膜の発育を抑制し、このことが癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎の成因の一つと言われている。これらの中耳炎に対する治療は鼓室形成術といわれる中耳手術が主体である。中耳腔は音を効率よく内耳に伝達する構造になっており、手術を成功させるにあつては、術後の中耳腔の含気を保つことが重要で、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経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極めて重要である。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中耳の骨面が露出してしまうため、正常粘膜の温存が非常に困難となる。このため癒着性中耳炎は他の中耳疾患と比較して治療成績が非常に悪い。

また真珠腫性中耳炎の代表的な術式に外耳道後壁保存型鼓室形成術があり、外耳道の生理的形態を維持できるという点で優れているが、この術式の問題は術後の再発が多いことである。遺残性再発は内視鏡の使用などにより予防できるが、真珠腫の再形成性再発を確実に予防することは困難である。理想的な術式は外耳道後壁を保存し、かつ術後の気胞化が良好な乳突腔を形成することである。真珠腫の再形成性再発の主な原因は中耳腔や乳突腔の粘膜再生が阻害され、肉芽の増生などにより中耳腔のガス交換能が破綻することである。従来の鼓室形成術では術後の乳突腔の粘膜は再生されないことが多く、肉芽の増生などが生じる。特に気胞化が抑制されている乳突腔における粘膜再生は極めて

困難である。鼓膜の再癒着や真珠腫の再発を確実に防止する方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治療成績には限界がある。

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、真珠腫の再形成性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。

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臨床実現化が可能な視点から、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。我々は家兎のモデルにおいて培養鼻腔粘膜上皮細胞シートの移植が中耳粘膜の再生を促進することを示した。細胞シート技術を用いた再生医療は、すでに角膜上皮幹細胞疲弊症治療や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ヒト臨床応用に成功し良好な結果が得られている。

これまで中耳手術においては、粘膜の再生を期待して鼻粘膜、頬粘膜移植やシリコン膜、ゼルフォームなどが使用されてきたが十分な効果は得られていない。自己の鼻粘膜上皮細胞シートの移植で中耳粘膜の再生が促進され、これまでコントロールすることが困難であった肉芽増生や骨増生が抑制されることが予想される。今後この細胞シートが利用できることで、これまでの術式が大きく変わる可能性がある。中耳真珠腫では再発のリスクが高く通常2回に分けて手術が行われてきた。しかし、この細胞シートの移植が可能になれば術後の乳突腔の粘膜が再生され、含

気腔が確保されることで再発は著しく低下することが予想され、一期的手術が可能になる。このように中耳手術における患者への侵襲も軽減され、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。

将来的に細胞シート移植を併用する術式を用いることで、癒着性中耳炎術後の粘膜再生が期待され鼓膜の再癒着を予防できる可能性が高い。また真珠腫においては細胞シート移植により粘膜欠損部位の粘膜再生が促され乳突腔の含気化が生じ、術後の再形成性再発の予防が期待できる。生理的な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予防できる癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎の革新的な治療法の開発につながる成果の創出が期待できる。

## 2. 研究の目的

厚生労働省より告示されている「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じ、前臨床試験を行う。ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シートの実際にヒトへの臨床研究における移植を前提とした品質と安全性、有効性を満たすかどうかを検証する。それらの結果をふまえ、大学の倫理委員会承認後、厚生労働省への申請準備を行い、ヒトへの細胞シート移植の臨床応用を開始する。

## 3. 研究の方法

細胞シートの詳細な製造工程を決定し、採取した提供者の鼻腔粘膜組織を、東京慈恵会医科大学 GMP 対応施設にて、提供者の自己血清を用いて培養し、培養上皮細胞シートを作製する。作製した細胞シートが、今後のヒトでの臨床研究における移植を前提とした品質と安全性と有効性を満たすかどうかを検証する。その後、厚生労働省より告示されている「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い、

ヒトでの臨床研究を開始する。

### (1) ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シートの試験製造およびその品質確認

東京慈恵会医科大学付属病院耳鼻咽喉科で鼻副鼻腔手術を実施する患者で、口頭および文書で説明後、患者本人から文書で同意を取得できる成人より手術時に切除される正常鼻腔粘膜を回収する。細胞シートの作製は東京慈恵会医科大学 GMP 対応施設での無菌操作で行う。

細胞シートの詳細な製造工程を決定し、あらかじめ作成した製造指図・製造記録書に沿って、ヒト鼻腔粘膜組織およびヒト血清を用いて、鼻腔粘膜上皮細胞シートを作製する。

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」の品質基準で挙げられている工程内試験（性状確認、物理的構造確認、細胞数、細胞生存率、細胞純度、エンドトキシン試験や無菌試験などの各種否定試験）を施行し、設定した規格値を満たすかを確認する。

細胞純度測定にはフローサイトメトリー法を用いて、サイトケラチン陽性率を測定する。

GMP 対応施設において細胞シートの試験製造を数例行い、最終製品においても各種否定試験を施行し、全工程において良好な品質管理下での細胞シートの作製が可能かを検証する。

作製した細胞シートの病理組織学的に解析を行い、先行の基礎実験で作製した細胞シートと変わらない良好な細胞シートであることを確認する。

### (2) ヒト臨床研究の開始

先行の基礎実験、細胞シート試験製造の品質確認、前臨床試験などの結果を踏まえて、大学の倫理委員会の承認をた後に、『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、厚生労働省への申請を行う。厚生労働省から適合性が承認された後に、ヒト臨床研究を開始する。

#### 対象

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)を必要とする癒着性中耳炎もしくは真珠腫性中耳炎疾患と診断されていること。
- ・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。

#### 方法

口頭および書面にて十分なインフォームドコンセントを取得した後、患者血液より感染症がないことを確認し、患者血液より自己血清を作製する。外来にて内視鏡下に約 10 × 10 mm 大のヒト鼻粘膜組織を採取し、自己血清含有 KCM (Keratinocyte Culture Medium) 培地を用いて、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 CPC での無菌操作によりヒト鼻腔粘膜上皮細胞シートの作製を行う。採取した鼻腔粘膜上皮を explant culture 法により 2 週間培養した後、増殖した上皮細胞を温度応答性培養皿に播種し、12 日間継代培養を行い、細胞シートを作製する。培養過程に感染症がないことを確認し、移植前日に細胞純度試験などを行い、移植前日までに各種品質検査結果を確認し、規格値の基準を満たした細胞シートを、鼓室形成術の際に粘膜が欠損し露出した骨面上に移植する

#### 4. 研究成果

(1) ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シートの試験製造およびその品質確認

東京慈恵会医科大学内の GMP (good manufacturing practice) に準拠した細胞培

養施設 (cell processing center: CPC) の設備を整え、培養スタッフの教育と訓練を行い、移植にいたるまでの一連の工程が、一貫して円滑に稼働するようなシステムを構築した。ボランティアドナーから提供されたヒト鼻腔粘膜組織を用いて、実際に CPC でヒト鼻腔粘膜上皮細胞シートを作製し、数例の試験製造を行った。作製した製造指図・製造記録書に沿った作業工程で、CPC での無菌操作でヒト鼻粘膜上皮細胞シートの作製に成功し、作製した細胞シートは性状確認、物理的構造確認、細胞数、細胞生存率、細胞純度はいずれも良好な結果であり、エンドトキシン試験や無菌試験などの各種否定試験もいずれも基準を満たすものであった。また、作製した細胞シートは病理学的にも基礎実験で作製した細胞シートと変わらない良好なものであることが確認された。移植を前提とした品質試験結果と一連の作業工程が問題ないことを十分確認した。

#### (2) ヒト臨床研究の開始

前臨床試験の良好な結果を踏まえ、この新規治療のヒトでの臨床実現化の為に、「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た。この承認をもって、ヒト臨床研究を開始した。

現在までに真珠腫性中耳炎の患者 5 例に対して、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。通常の鼓室形成術施行時に、術後中耳粘膜の再生を促し鼓膜の再癒着を防止する目的として、中耳粘膜が欠損し露出した骨面上に作製した自己の培養上皮細胞シートの移植を行った。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。狭い中耳腔内の骨面上に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。いずれも移植後経過は非常に良好で、真珠腫の再発や鼓膜の再癒着も認めていない。また、細胞シート移植による有害事象や副作用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)

Hama T, Yamamoto K, Kojima H, et al. Autologous human nasal epithelial cell sheet using temperature-responsive culture insert for transplantation after middle ear surgery. *J Tissue Eng Regen Med* 2015, doi 10. 1002/term. (査読あり)

山本和央, 小島博己. 鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いた中耳粘膜の再生医療. *医学のあゆみ* 2015; 254 (3): 232-233.

山本和央, 小島博己. 鼻腔粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生医療. *細胞* 2015; 47 (8): 390-393.

山本和央, 小島博己. 鼻腔粘膜上皮細胞シートを応用した鼓室形成術. *再生医療*. *日本臨床* 2015; 73 Suppl 5: 452-456.

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

Yaguchi Y, Hama T, Yamamoto K, et al. 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.

##### [学会発表](計 9 件)

Yamamoto K. Middle Ear Mucosal Regeneration by Nasal Mucosal Epithelial Cell Sheets Transplantation. The 6th meeting of Asian Cellular Therapy Organization. -Symposium (招待講演) - Gwangju (Korea). Aug 2015.

Yamamoto K. Canal wall up tympanoplasty with tissue-engineered cell sheets transplantation. 30<sup>th</sup>

Polizer Society Meeting. Niigata (Japan). July 2015

山本和央. 細胞シート移植を併用した鼓室形成術. 第25回日本耳科学会総会. 長崎. 2015年10月

山本和央. ヒト鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した中耳手術. 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会. 東京. 2015年5月

山本和央. 自己鼻腔粘膜上皮細胞シート移植を併用した中耳手術. 第14回日本再生医療学会総会. 横浜. 2015年3月

山本和央. 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. 第24回日本耳科学会総会. 新潟. 2015年10月

Yamamoto K. The effect of transplantation of tissue-engineered cell-sheets after middle ear surgery in a rabbit model. AAO-HNSF annual meeting & OTO EXPO 2014. Orland (USA). Sept 2014

山本和央. 中耳手術における移植用細胞シートの開発. 第115回日本耳鼻咽喉科学会総会. 福岡. 2014年5月

山本和央. 難治性中耳疾患に対する細胞シート移植による中耳粘膜再生. 第13回日本再生医療学会総会. 京都. 2014年3月

##### [図書](計 1 件)

山本和央. 11 感覚器 耳鼻 中耳真珠腫・線毛細胞・癒着性中耳炎・中耳粘膜・鼻粘膜. *再生医療用語ハンドブック* 2015: 207-211.

##### [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:  
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

山本 和央 (Yamamoto, Kazuhisa)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50408449

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：