

令和元年6月15日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11199

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞による組織増量と耳管組織リモデリング 耳管障害の新治療戦略

研究課題名(英文) Tissue augmentation and remodeling of the eustachian tube by using dedifferentiated fat cells

研究代表者

大島 猛史 (OSHIMA, Takeshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40241608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はDFATを耳管粘膜下に移植することによりその組織増量効果および組織修復、リモデリング作用を利用した耳管閉鎖障害の治療法を確立するために開始された。第一に、これまで耳管閉鎖障害については信頼のおける適切なモデル動物が存在しなかった。そのため、本研究ではモデル動物の確立から行うこととなった。ラット下顎神経切断モデルを作製し、本研究期間全般を通じて形態学的および生理学的に解析した。受動的耳管開大圧の有意な低下をきたすことを示した。さらに形態学的には、耳管周囲の軟部組織の著明な萎縮、耳管粘膜の分泌細胞の不変を明らかにし、DFATのラット耳管への移植への展望の道筋をつけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

耳管閉鎖障害は真珠腫性中耳炎をはじめとする難治性中耳疾患の重要な危険因子である。しかも、その有症率は高く、聴覚障害の大きな原因の一つとなっており、国民衛生上からも看過できない。しかし、これまで耳管閉鎖障害については信頼のおける適切なモデル動物が存在しなかった。本研究では再現性良く下顎神経を切断することにより耳管閉鎖障害の動物モデルの作製に成功した。今後はこれを用いて耳管障害の診断、治療、予防のための研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was the establishment of treatments for eustachian tube closing failure by transplantation of dedifferentiated fat cells (DFAT) into the eustachian tube. In this study, an animal model for the eustachian tube closing failure could be developed by the mandibular neurectomy. Mandibular nerve resection in rats may be an effective method for generating an animal model of the eustachian tube disorder. It was suggested that this rat model may be useful for verifying new treatments for the eustachian tube disorder.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：耳管開放症 中耳炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 耳管は中耳と鼻咽頭を連結する約 3.5cm の管状構造物であり、中耳の正常機能の維持に中心的役割を演じている。耳管は「閉鎖」と「開放」の両立という高度かつ繊細な機能を要求されるため、その均衡はわずかなきっかけで破綻する。それにより中耳に炎症を生じ、難聴をきたす。また、耳管を介する音声、気圧の病的な中耳への侵入は耐え難い苦痛をもたらすことにもなる。多くの先人の努力により多くの抗菌薬が開発され、手術法も進歩してきたが、現在でもなお難聴の主原因となっており耳科学におけるトピックである。耳管の病的な狭窄、開放は、耳管粘膜および周囲構造の質的变化が大きく関与している。現在、耳管機能を補完するために、鼓膜にシリコンチューブを留置して耳管の代用をさせること、バルーンで耳管を開大させる方法、耳管内にシリコンを留置する方法などが行われているが、根本的に耳管を正常化する治療とは言えない。また、耳管障害を研究するための適切な動物モデルもない。

(2) 脱分化脂肪細胞 (DFAT) は日本大学 (医学部細胞再生・移植医学分野) で開発された新しい再生医療用の細胞である。すでに臨床応用に向けて精力的に研究されている。iPS 細胞と比較してコストが格段に安く、癌化の心配もない。

2. 研究の目的

耳管障害を研究するための適切な動物モデルを作製し、脱分化脂肪細胞 (DFAT) を耳管粘膜下に移植することによりその組織増量効果を利用した耳管内腔の狭小化による耳管閉鎖障害の治療法の確立をめざす。さらに DFAT の多分化能、サイトカイン分泌に着目し、その優れた組織修復、リモデリング作用による反復性中耳炎、鼻すすり型耳管開放症 (floppy tube)、コレステリン肉芽腫という難治性疾患の新治療戦略へと展開することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 下顎神経切断による耳管障害モデルラットを作製した。出来る限り卵円孔に近い位置で下顎神経の各分枝を切断した。各分枝は神経再生を防止するため約 2 mm の長さをもって切断した。

(2) 手術直前 (0 週)、術後 2 週、4 週、8 週、12 週、16 週で手術側、対照側の耳管開大圧 (POP) を測定した。

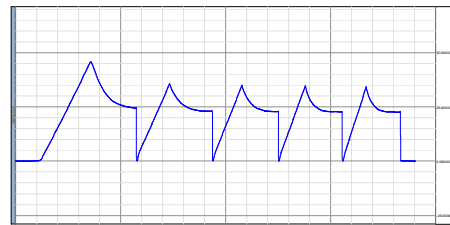


図 1 耳管圧の変化

(3) 術後 16 週 (週齢 28 週) の耳管圧測定後に組織標本を作製した。三種混合麻酔の深麻酔下でラットを開胸し、右心耳を切開後、心尖部より 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を注入して脱血した。次に 10%ホルマリン液を注入し還流固定を行った。末梢まで十分に固定されたことを確認し断頭した。さらに 10%ホルマリン液で頭部を常温で固定し、2 倍希釈した脱灰液 (K-CX[®], FALMA, Tokyo, Japan) にて 4 で 3 日間脱灰を行い、パラフィンで包埋した。切片は冠状断で中耳骨包から頭側方向に 300 μm 毎に 5 μm の厚さで作成し、耳管内腔が耳管咽頭口から最も長く検出されているスライスピックアップした。染色はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) とマッソン・トリクローム染色 (MT) を行った。

4. 研究成果

(1) 耳管障害モデルラット POP の経時的変化：術前の POP は手術側で 40.9mmHg、対照側は 40.0mmHg であった。手術側では術後 2 週から有意に低下し、16 週では 34.9 mmHg となった。対照側では 16 週で 37.8mmHg であり術前と比べ有意差がなかった。

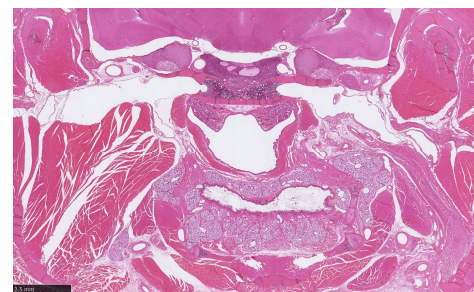


図 2 耳管周囲組織の変化

(2) 耳管障害モデルラットの組織変化：耳管周囲の構造物には脱神経後の組織変化が認められた。内側翼突筋面積は手術側で有意に低下していた。外側翼突筋面積、口蓋帆張筋面積、口蓋帆挙筋面積、耳管径で明らか有意差は認めなかった。分泌組織である耳管腺面積、杯細胞数にも有意差は認めなかった。MT 染色では手術側の内側翼突筋の周囲や内部に膠原線維が増生しているのが確認された。さらに頭側のスライスでは卵円孔より出る下顎神経本幹と、その分枝が切断されているのが組織学的に確認できた。

(3) 本研究ではまず再現性、持続性の高い耳管障害モデル動物を確立することを目的とした。POP は正常側に比べ手術側の有意な低下を認め、術後 16 週まで持続し、全個体で再現性高く

POP が低下した。組織学的には主に内側翼突筋の萎縮を認め、耳管周囲の器質的変化が耳管圧に影響を与えることが確認された。今後新たな治療法を検証していく上で、このラットがモデル動物として利用できる可能性が示唆された。

(4) 耳管障害モデルとして用いる際には、耳管圧低下が一時的な機能的変化ではなく、持続的な器質的変化であることが求められる。組織学的には不可逆的な組織変化が認められたが、今後は各週数での組織評価を行い、モデルとして利用できる最適な週数を検証する必要がある。

(5) モデル動物作製の上では、持続性、再現性に加え、動物に対する侵襲を考えなければならない。下顎神経切断術の侵襲は小さくないと考えたが、術後感染を起こしたり途中で死亡した個体はいなかった。また下顎神経切断により咀嚼筋麻痺や口腔内知覚の低下による経口摂取量低下、発育不全の恐れがあったが、全個体で体重は正常に増加した。今後はより低侵襲な方法として、下顎神経の感覚枝は温存し運動枝のみの切断を行うことを検討している。

(6) 難治性の耳管閉鎖障害に対する外科的治療法は自家軟骨挿入術、自家脂肪注入術、耳管咽頭口結紮術、耳管ピン挿入術などが主流であるが、生理的な方法で根治性の高い治療法は未だ確立されていない。今後は新治療法の開発のためにこのモデルラットを用いた細胞治療の検証を行っていく予定である。具体的には脱分化脂肪細胞を経鼻内視鏡下に耳管粘膜下に注入し耳管の病的開大を改善させる方法を検討している。本研究期間ではこの点について結果を集約できなかった。この方法をヒト耳管障害に対し臨床応用できれば、感染や効果の持続性の課題を克服し、より根治的な治療が期待できる。耳管障害の病態解明と新たな治療法の確立にあたり、本研究で開発したモデル動物が利用できる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Harada H, Hirai R, Matsumoto T, Oshima T. Development of a Rat Model of Patulous Eustachian Tube by Mandibular Nerve Resection. **Auris Nasus Larynx** 査読あり e-pub DOI: 10.1016/j.anl.2019.03.001

〔学会発表〕(計 2 件)

Oshima T: New techniques in treating eustachian tube dysfunction. 31st Politzer Society Meeting, Auditorio Alfredo Kraus (Las Palmas de Gran Canaria, Spain) 2018/2/22

原田 英誉、平井 良治、大島 猛史: 下顎神経切断による耳管開放症モデルラット確立の試み. 第 27 回日本耳科学会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 2017/11/24

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松崎 洋海

ローマ字氏名：MATSUZAKI, Hiroumi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00451328

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。