

機関番号：32651

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010年度

課題番号：20591993

研究課題名 (和文) 組織再生工学を用いた人工鼓膜の作製と中耳真珠腫の病態解明

研究課題名 (英文) The development of artificial tympanic membrane by tissue engineering for reproduction and pathologic elucidation of middle ear cholesteatoma.

研究代表者

田中 康広 (TANAKA YASUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：40266648

研究成果の概要 (和文)：

ウサギより採取した中耳粘膜より温度応答性培養皿を用いて、人工中耳粘膜シートを作製した。さらに外耳道皮膚より採取された keratinocyte と ECM からなる鼓膜上皮層にあたる鼓膜上皮シートを作製し、人工中耳粘膜と融合させて人工鼓膜を構築させた。この人工鼓膜は電子顕微鏡での観察および免疫組織学的に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真珠腫モデルの作製を試みたが、ケミカルメディエーターやサイトカインの刺激のみでは、真珠腫の発現を誘発することは出来なかった。

一方、人工中耳粘膜の移植実験では人工中耳粘膜シートを家兎に移植することにより、移植後の bulla における骨増生や肉芽増生が抑制されることが確認された。

研究成果の概要 (英文)：

We developed artificial middle ear mucosal sheets from cultured middle ear mucosa that was taken from middle ear bulla of a white rabbit by using the temperature-responsive culture dish. And also, we developed tympanic membrane epithelium sheets consist of extra cellular matrix and keratinocyte that was taken from external ear canal of the same rabbit. After that, we finally manufactured an artificial tympanic membrane by fusion of artificial middle ear mucosal sheets and tympanic membrane epithelium sheets. We confirmed this artificial tympanic membrane was resembled normal tympanic membrane from the viewpoint of pathohistologic characteristics by immunohistochemical staining and electron microscope findings. Although, we attempted to develop an experimental middle ear cholesteatoma model by using the artificial tympanic membrane, it was impossible to develop it only by the stimulation of some chemical mediators and cytokines.

On the other hand, we confirmed the suppression of bone and granulation tissue hyperplasia in the middle ear bulla after implantation of artificial middle ear sheets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：①再生医学 ②細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 中耳真珠腫の病態を解明するため、これまでも *in situ tissue engineering* を利用した人工三次元皮膚を作製し、真珠腫の病態解明を行ってきた。その結果、鼓膜上皮層における真珠腫発症の一因を解明することには成功したが、鼓膜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もない。人工鼓膜を作製し真珠腫の成因を解明することは *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) 一般に中耳真珠腫では、術後に中耳腔及び乳突腔の正常粘膜を保存することが困難な症例も多く、術後鼓膜の再癒着や病変の再発が起りやすい。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癒着や再発の予防になりうる。そのため、中耳粘膜の再生を目的とし、これまでも *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近似しているものの、いくつかの問題点が存在することが判明した。人工粘膜の作製までに1ヵ月以上と長い期間が必要であること、粘膜の厚さが生体の粘膜に比較してかなり厚いこと、移植の際に生着が不十分であることなどが挙げられる。これらの問題点に対しても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開発することにより解決できるものと考えている。そこで、今回この手法を用いて中耳粘膜培養細胞シートを作製後、シート移植による中耳粘膜の再生に関しても研究を行うことを検討した。

2. 研究の目的

(1) 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

などの蛋白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 (*extracellular matrix: ECM*) を保持しているため、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* で真珠腫の発症を誘導することを目的として研究を行う予定である。

(2) 温度応答性培養皿を用いて中耳粘膜細胞シートを作製し、その組織学的検討を行う。また、鼓膜上皮層由来のケラチノサイトから鼓膜上皮細胞シートを作製し、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細胞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、実験的に真珠腫の作製を行う。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観察を行う。

また中耳粘膜の再生に関しては、中耳粘膜細胞シートの移植を *in vivo* にて行う。粘膜上皮の再生が促進され、中耳腔の含気が保たれることで術後鼓膜の再癒着や再発を予防することが可能になると考えている。動物実験において組織学的、機能的に良好な結果が得られれば、ヒトでも同様に細胞シートを作製し、その組織学的、免疫学的検討を行う。さらにヒト臨床における安全性を確立するために、*FBS* を必要としない自己血清を用いた新規の中耳細胞シートの開発を行い、臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

まず、*in vitro* では温度応答性培養皿を用いて中耳粘膜細胞シートを作製し、その組織学的検討を行う。また、鼓膜上皮層由来のケラチノサイトから鼓膜上皮細胞シート

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。作製した人工鼓膜に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、実験的に真珠腫の作製を行う。更に陰圧や外力などの物理的影響下による人工鼓膜の変化についても観察を行う。また中耳粘膜の再生に関しては、中耳粘膜細胞シートの移植を *in vivo* にて行う。以下に研究方法の詳細を記す。

(1) *in vitro*

①採取した中耳粘膜を *in vitro* にて粘膜上皮成分と fibroblast に分離培養する。これらの培養細胞を用いて、上皮層は単層上皮、粘膜下はコラーゲン内に fibroblast を加えて結合組織を作製し、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。

②外耳道皮膚を採取し、keratinocyte の分離を行い、keratinocyte と ECM からな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 ECM を介し、表裏一体となるように融合させ、三次元人工鼓膜を作製する。

③作製した人工中耳粘膜に対しては、免疫染色を施行し単層上皮と上皮下の組織を確認する。また電顕的にも正常中耳粘膜との相違の有無につき観察を行う。

④人工鼓膜に関しては電顕的に基底膜、細胞外マトリックス、細胞間接着、tight junction の存在を確認する。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。

⑤作製した人工鼓膜に LPS や IL-4, TNF- α などによる化学的刺激を付加した場合の分化や増殖能に関しても検討を行う。

(2) *in vivo*

対象動物として、成熟白色家兎 (New Zealand White rabbit) 2~2.5kg を用いる。家兎は手術前に必ず硬性内視鏡を用いて外耳道を観察し、耳垢、外耳炎、鼓膜穿孔、中耳炎がないことを確認する。

① 粘膜除去単独群: 麻酔法としてペントバルビタールを静脈注射し、その後 1%塩酸リドカインを左耳下部に局所注射する。家兎は左下顎の後方を縦切開し中耳骨胞を露出する。顕微鏡下に耳手術用ドリルを用いて bulla 下面の骨を 5mm 円形に開放し、鼓膜下端から耳管鼓室口までの bulla 内腔の粘膜を剥離し除去する。

鼓室内を洗浄したのち、シリコンにて骨面を覆い、閉鎖する。感染予防のため、操作は全て無菌操作で行う。術後は抗菌剤を約 1 週間にわたり投与する。

② 粘膜除去+コラーゲン膜移植群: 粘膜除去群と全く同様に、静脈麻酔、局所麻酔下に bulla 開放し、中耳粘膜を同様に除去する。除去した部位にコラーゲン膜を移植し、シリコン、筋肉片を用いて開放した骨面を覆い、閉鎖する。

③ 粘膜除去+三次元人工中耳粘膜: 粘膜除去群と全く同様に、中耳粘膜を除去する。採取した中耳粘膜を *in vitro* にて粘膜上皮成分と fibroblast に分けて培養を行う。除去した部位に三次元人工中耳粘膜を自家移植する。すべての群において、2週間後、1ヶ月後、3ヶ月後、6ヶ月、9ヶ月、12ヶ月後にそれぞれ断頭し、粘膜再生の状態、骨増生、肉芽増生、鼓膜所見の状態を確認する。

4. 研究成果

(1) 作製された人工中耳粘膜および人工鼓膜の形態と組織学的特徴について

中耳真珠腫の病態解明を行う目的として、まず *in vitro* で的人工鼓膜の作製を試みた。具体的には採取した中耳粘膜を *in vitro* にて粘膜上皮成分と fibroblast に分離培養し、これらの培養細胞を用い上皮層は単層上皮、粘膜下はコラーゲン内に fibroblast を加えて結合組織を作製し、上皮層および粘膜下層の2層からなる人工中耳粘膜シートを作製した。電子顕微鏡下の観察では、正常中耳粘膜と同様な組織構造が観察されたが、培養により繊毛が減少することが確認された(図1)。一方、免疫組織学的な検討では caspase-14 や proliferating cell nuclear antigen (PCNA) などの発現様式は正常中耳粘膜と同様であり、上皮の分化や増殖能の点では特に相違を認めなかった。

次に外耳道皮膚より採取された keratinocyte を分離したのち培養を行い、keratinocyte と ECM からなる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を電子顕微鏡下に観察したところ、基底膜、ECM、tight junction の存在が確認され、正常な鼓膜上皮層と類似した構造であることが判明した(図2)。この粘膜上皮シートと中耳粘膜シートが ECM を介し、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。この人工鼓膜における involucrin 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明らかとなり、正常に分化する機能を有していることが理解された(図3)。また、人工鼓膜の鼓膜上皮層の

増殖能に関して Ki-67 や PCNA などの発現からは、真珠腫のような増殖能の亢進は認められず、正常鼓膜と同様の発現であった(図4)。このことより、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。

(2) 真珠腫の発症モデルの検討

作製した人工鼓膜に PS や IL-4, TNF- α などによる化学的刺激を加え、鼓膜上皮の分化や増殖能を検討したところ、PCNA や Ki-67 の発現は亢進を認めたものの、特異的な変化は認めなかった。また、真珠腫において過剰発現を認めると報告がある EGF receptor の発現についても上記による化学的刺激の反応では EGF receptor の過剰発現は認めなかった。このことは上記のケミカルメディエーターやサイトカインによる刺激のみでは真珠腫の発現を誘発するには不十分であると考えられた。

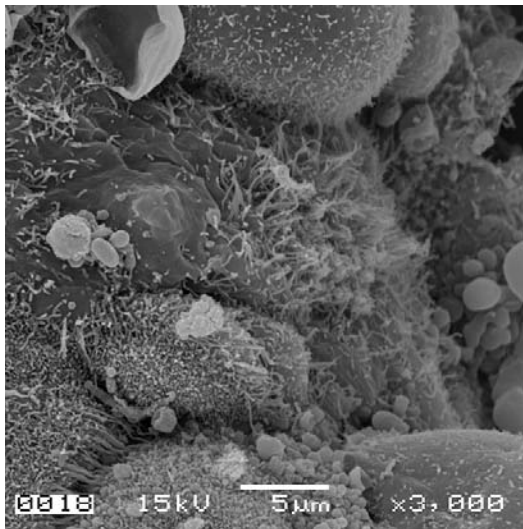


図1：人工中耳粘膜の走査電顕像



図2：鼓膜上皮シートの電顕像

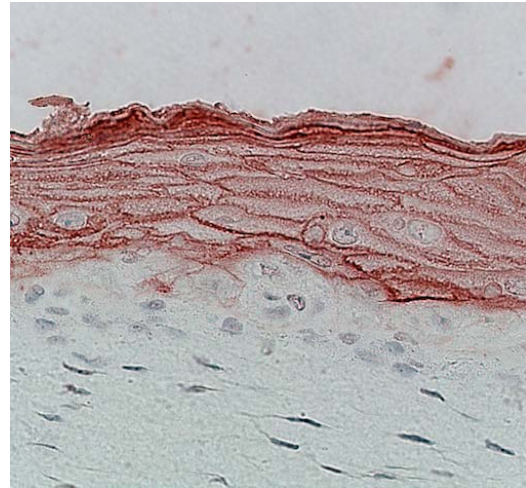


図3：人工鼓膜における involucrin の発現 (免疫組織染色)

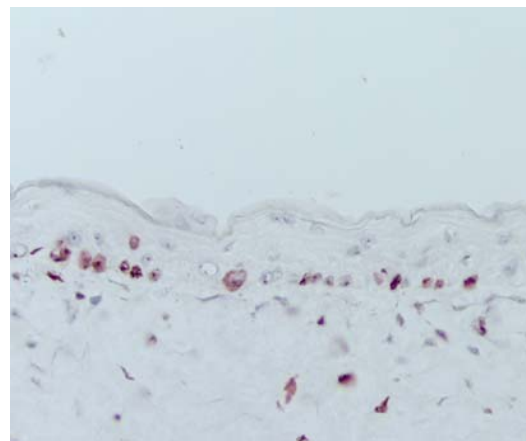


図4：人工鼓膜における Ki-67 の発現 (免疫組織染色)

(2) 人工中耳粘膜の移植実験

中耳粘膜の再生を確認するために中耳粘膜シートを白色家兎の bulla に移植することで粘膜再生が行われるかの検討を行った。その結果、粘膜を除去したのみの群および粘膜除去後にコラーゲン膜を移植した群と比較すると人工中耳粘膜シートを移植した群では、移植後の bulla における骨増生や肉芽

増生が抑制されることが判明した。このことは人工中耳粘膜シートが bulla において再生し、良好なガス換気を行っていることも示唆される。しかしながら、本実験においては移植した中耳粘膜シートが生着しないケースや術後の感染などを来すこともあり、有意なデータを得ることが出来なかった。今後は中耳粘膜を移植した後の創部の感染を十分に予防し、症例数を増やして更に検討してゆく必要があると考えられる。

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3件)

(1) 田中康広、中耳真珠腫. 医学と薬学 62: 965-971, 2009

(2) 田中康広、真珠腫とは. 日本医事新報 4391: 94-95, 2008

(3) Tanaka Y, Middle ear mucosa regeneration by grafting of three-dimensional middle ear mucosal organ. Surgery of the ear current topics: 97-99, 2008.

[学会発表] (計1件)

Tanaka Y, Middle ear mucosa regeneration by grafting of three-dimensional middle ear mucosal organ. 8thInternational conference on cholesteatoma and ear surgery 2008年6月18日. Antalya

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 康広 (TANAKA YASUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号: 40266648