

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11198

研究課題名(和文)細胞シート移植を用いた中耳粘膜再生医療の実現

研究課題名(英文) Realization of middle ear mucosal regenerative therapy by cell sheet transplantation

研究代表者

山本 和央 (Yamamoto, Kazuhisa)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50408449

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)：中耳真珠腫や癒着性中耳炎の術後早期に中耳粘膜を再生させ真珠腫の再発や鼓膜再癒着を防止する目的として、中耳に自己の培養上皮細胞シートの移植する治療法を開発した。この細胞シートは患者由来の鼻腔粘膜上皮細胞を生体外で加工したヒト体細胞加工製品である。培養細胞をヒトの中耳へ移植する初の再生医療として再生医療安全性確保法に従って臨床研究を実施した。これまでに患者15人の全ての症例において安全に細胞シートを移植することに成功した。全例において有害事象を認めず、新たな治療法の可能性が示唆された。これらの成果のもとに、この新規治療法の実用化のために医師主導治験開始に向けた準備を進めることができている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は培養細胞をヒトの中耳へ移植する初の再生医療(First-in-human study)であり、将来的に鼻腔粘膜上皮細胞シートを製品化させ、年間6000人も患者に提供する未来を想定して治験の準備を進めることを目的とした研究であり、中耳真珠腫や癒着性中耳炎に対する治療成績を格段に改善させると考えられ、研究成果により中耳手術における新たな治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： If regeneration of the damaged middle ear mucosa were possible in the early postoperative period, it would be possible to prevent recurrence of adhesive otitis media and cholesteatoma. We developed a novel treatment method combining tympanoplasty and autologous nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation for postoperative regeneration of the middle ear mucosa. Tissue-engineered autologous nasal mucosal epithelial cell sheets were fabricated by culturing the harvested cells. The cell sheets were transplanted, during tympanoplasty, to the middle ear cavity. We performed this procedure on fifteen patients with cholesteatoma and adhesive otitis media. All patients showed favorable postoperative course with no adverse events or complications. This treatment simultaneously preserves the external ear canal morphology, as in standard canal wall up tympanoplasty, and incorporates autologous cell sheet transplantation, which enables prevention of recurrent cholesteatoma.

研究分野：耳鼻咽喉科学

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

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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たっては、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機能が破綻することである。従来の中耳手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。

これらの結果をふまえ、われわれは外耳道後壁保存型鼓室形成術の際に、自己の培養上皮細胞シートの移植を併用するという新たな術式のヒト臨床実現化に成功しており(「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」に準じ、厚生労働省より承認取得)、先行臨床研究として、5人の真珠腫性中耳炎の患者に細胞シート移植を施行した。全ての症例で合併症、有害事象は認めない。

本邦では現在、ヒト幹細胞指針の廃止に伴い、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(再生医療新法)」が施行されているため、今後は本ヒト臨床研究を施行するためには、再度申請手続きが必要となるが、将来的に医師主導治験や先進医療の導入に向けた探索的臨床試験として本研究を遂行する。将来的に中耳手術における細胞シート治療の展開普及や産業化に繋げていくことができるように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。本研究の出口としては医師主導治験を想定しており、着実に医師主導治験の導入につなげるための本研究でのデータ収集は今後の展開の非常に重要な足がかりであると考えられる。

### 2. 研究の目的

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自己の鼻腔粘膜上皮細胞シートを移植して中耳粘膜を再生させ、中耳腔とそれに連続する乳突腔を正常に機能させることで癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎の術後の鼓膜の再癒着や真珠腫の再形成性再発を防止し、これまで限界とされてきた手術成績の向上が期待できる。癒着性中耳炎や真珠腫性中耳炎の革新的治療法の開発に向けての成果の創出を目的とし、将来的に中耳手術におけるこの細胞シート技術を用いた中耳粘膜再生の新規治療の確立と展開普及を目指し、本研究を医師主導治験や先進医療の導入に向けた探索的臨床試験と位置づけて遂行する。

### 3. 研究の方法

将来的に医師主導治験や先進医療の導入に向けた探索的臨床試験として本臨床研究を遂行する。本細胞シート治療は、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(再生医療新法)」における第2種の中リスクに分類されると考えられ、特定認定再生医療等委員会への申請、承認取

得後、厚生労働大臣への届出を行い、ヒト臨床研究を開始する。安全性と効果に関する評価を行い、有害事象や問題点を抽出するとともに改良点を抽出する。中耳手術における細胞シート治療の将来的な普及展開に向けて、本臨床研究の次のステップを見据え、PMDA（医薬品医療機器総合機構）との薬事戦略相談を実施し、将来的には医師主導治験に着実に繋げていくためのデータを収集する。

### 1) ヒト臨床研究の実施

「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(ヒト幹細胞指針)」に準じ厚生労働省から適合性が承認され、先行研究として平成 26 年よりヒト臨床研究を開始しており、再生医療新法の成立に伴いヒト臨床研究の行うために厚生労働省から認定を受けた特定認定再生医療等委員会への申請を行う。具体的には、先行研究として行った細胞シート移植 5 症例の詳細なデータを添付し聖マリアンナ医科大学の特定認定再生医療等委員会へ申請する。委員会から適合性が承認され、厚生労働大臣へ報告後に、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

移植約 3 週間前に、外来にて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自己血清を用いて、試験製造時に十分検証された製造工程に従い、東京慈恵会医科大学の細胞加工施設（cell processing facility: CPF）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。

術後は、有害事象の発現の有無の確認も行い、細胞シート移植のヒト臨床における安全性についての評価を行う。また、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乳突腔の含気化、聴力検査などの各種臨床検査を行い、細胞シートの有効性を検証する。

### 2) 安全性と効果に関する評価

細胞シート移植後 1 年経過した症例について安全性と効果に関する評価を行い、実施中の有害事象や問題点を抽出するとともに改良点を抽出する。臨床効果に関するパラメーター・評価期間・術後管理などを客観的に評価し臨床評価指標を策定し臨床成績を踏まえて評価系を確立する。

#### 安全性の評価

細胞シート移植後における副作用の発現および臨床検査値の異常変動を考慮して、安全性を次の 4 段階で判定する。

- ・安全である(副作用なし、臨床検査値異常変動なし)
- ・ほぼ安全である(使用継続できる程度の副作用あるいは臨床検査値異常変動)
- ・安全性に問題あり(使用中止すべき程度の副作用)
- ・安全でない(他医療行為による治療を要する程度の副作用あるいは臨床検査値異常変動)

#### 効果に関する評価

移植後の効果に関する評価法としては、通常の鼓室形成術後と同様に外来通院で各種臨床検査を施行しスコアにて判定する。特に術後の鼓膜の再癒着、再陥凹、真珠種の再形成性再発、乳突腔の含気化については従来の外耳道後壁保存型鼓室形成術を施行した症例との比較検討を行い、臨床効果の可能性について検証する。

細胞シート移植部位の組織学的評価

### 3) PMDA との薬事戦略相談の実施

治験実施やその後の製造販売承認申請には、製品の品質や安全性に関する試験が必要である。しかし、当該細胞シートのような再生医療等製品においてはその試験方法や評価方法は明確には定まっていない。また、我々が適切と考えた方法が医薬品医療機器法の規制要件を満たしているかの判断も困難であることから、再生医療等製品の製造販売実績を持つ協力企業の支援のもと臨床研究で得られたデータを用いて独立行政法人医薬品医療機器総合機構（Pharmaceuticals and Medical Devices Agency: PMDA）との薬事戦略相談を実施し、将来的に医師主導治験に着実に繋げていくうえでの課題や非臨床試験に関する論点を明確にする。

## 4. 研究成果

2016 年度に聖マリアンナ医科大学特定認定再生医療等委員会の承認を取得し、再生医療等安全性確保法に基づく臨床試験実施体制を整備し、2017 年度より新規ヒト臨床研究を開始した。

これまでに先行研究も含め中耳真珠腫および癒着性中耳炎の患者全 15 症例(弛緩部型中耳真珠腫 8 例、緊張部型中耳真珠腫 1 例、癒着性中耳炎 6 例)に対して細胞シート移植を実施した。そのうち 3 例は多施設共同研究として細胞シート輸送技術により聖マリアンナ医科大学で細胞シート移植を実施しており、細胞シート輸送技術の確立の足がかりとなった。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、全ての症例において安全に移植することに成功した。真珠腫症例 9 例中 8 例は移植後 6 ヶ月時点で、CT 上乳突腔までの含気が得られていた。移植後観察期間は平均 2 年 9 ヶ月(10 ヶ月～5 年 11 ヶ月)であり、1 例で真珠腫の再発を認めたため再手術を要したが、通院を自己中断した 1 例を除く他の 7 例は現在までのところ中耳腔の含気が得られ真珠腫の再発は認めておらず、細胞シート移植による有害事象も認めていない。また、細胞シート移植全 15 症例中 3 例は多施設共同研究として細胞シート輸送技術により聖マリアンナ医科大学で細胞シート移植を実施しており、この結果から CPF を持たない施設を含めた多施設での本治療の可能性が高まったと考えられた。

再生医療等製品の製造販売実績を持つ協力企業の支援のもと PMDA のレギュラトリーサイエンス戦略相談における事前相談と対面助言を受け、その結果、我々が想定した GCTP(Good Gene, Cellular, and Tissue-based Products Manufacturing Practice)製造の品質規格の設定および非臨床安全性試験における検討項目は全て受け入れ可能との回答を PMDA より得ることができた。今後は、設定された GCTP 製造の品質規格に合わせた原料の選定と、製造手順の標準化を行っていく予定である。この新規治療法の実用化のために医師主導治験を計画中であり、治験に向けた非臨床安全性試験、治験プロトコール作成、臨床 POC (proof-of-concept study) 取得に向けて目下準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 山本和央	4. 巻 32号
2. 論文標題 細胞シートによる中耳粘膜再生治療の実現	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 未来医学	6. 最初と最後の頁 46-52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 山本和央	4. 巻 28
2. 論文標題 耳科領域の再生医学:臨床応用へのロードマップ 培養鼻腔粘膜上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生の実現	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto K, Yamato M, Morino T, Sugiyama H, Takagi R, Yaguchi Y, Okano T, Kojima H	4. 巻 2
2. 論文標題 Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheet transplantation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 npj Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-017-0010-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 山本和央, 小島博己.	4. 巻 37
2. 論文標題 培養上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生治療	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Progress in Medicine	6. 最初と最後の頁 583-587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kazuhisa Yamamoto
2. 発表標題 Middle ear mucosal regeneration by cultured nasal mucosal epithelial cell sheets transplantation.
3. 学会等名 AAO-HNSF 2018 Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本和央
2. 発表標題 細胞シートを用いた中耳粘膜再生治療の実現
3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本和央
2. 発表標題 細胞シートによる中耳粘膜再生治療の実現
3. 学会等名 第41回未来医学研究会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本和央
2. 発表標題 培養上皮細胞シート移植による中耳粘膜再生治療の実現
3. 学会等名 第118回 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamamoto K.
2. 発表標題 Realization of middle ear mucosal regeneration by cultured nasal mucosal epithelial cell sheet transplantation
3. 学会等名 第27回 日本耳科学会 (シンポジウム)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山本和央
2. 発表標題 難治性中耳疾患に対する細胞シート移植を用いた粘膜再生治療
3. 学会等名 第16回日本再生医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kazuhisa Yamamoto
2. 発表標題 Middle Ear Middle ear mucosal regeneration by nasal mucosal epithelial cell sheets transplantation.
3. 学会等名 The 7th meeting of Asian Cellular Therapy Organization. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazuhisa Yamamoto
2. 発表標題 Middle ear mucosal regeneration by tissue-engineered cell sheets transplantation.
3. 学会等名 2016 International Symposium for Recent Advances in Cell Therapy and 3rd Taiwan Association for Cell Therapy Annual Meeting. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Kazuhisa Yamamoto
2. 発表標題 Middle Ear Mucosal Regeneration by Nasal Mucosal Epithelial Cell Sheets Transplantation.
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society - Asia Pacific Meeting 2016. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yamamoto K, Kojima H	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 108
3. 書名 Innovations in Endoscopic Ear Surgery (Chapter9: Regeneration of Middle Ear Mucosa for TEES)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----