

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：74314

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K20287

研究課題名（和文）鼓膜組織幹細胞の同定と動態の解明

研究課題名（英文）Cellular Dynamics of Tympanic Membrane and Identification of tympanic membrane tissue stem cells

研究代表者

金井 理絵 (Rie, Kanai)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 神経・感覚運動器研究部・主任研究員

研究者番号：30574008

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：C57/BL6マウスに鼓膜穿孔を作成し、経時的に（Day0,1,5,10,15,20）にsacrificeし、中耳組織を免疫組織学的にて評価した。鼓膜穿孔閉鎖過程の初期では残存鼓膜の上皮層の辺縁（鼓膜輪側）に前駆細胞を示唆するKi67陽性細胞が出現し、上皮層全体が増殖していた。閉鎖の中期には固有層の先端（穿孔縁側）にKi67陽性細胞が出現し、特に穿孔縁側が増殖していた。組織幹細胞の同定には至らなかったが、このように上皮層と固有層では閉鎖過程の細胞動態が異なることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼓膜の組織幹細胞の同定にはいたらなかったが、穿孔が閉鎖する過程における上皮層と固有層の細胞動態、ならびに両者の差異が明らかになった。このことは鼓膜穿孔が残存するメカニズムの解明や、鼓膜穿孔閉鎖治療の開発において有用な情報になりうると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Tympanic membrane perforations (TMP) were created in C57/BL6 mice and sacrificed over time (Day 0, 1, 5, 10, 15, 20), and middle ear tissues were evaluated immunohistochemically.

Early in the process of TMP closure, Ki67-positive cells, suggestive of progenitor cells, appeared at the annulus side of the epithelial layer, and the entire epithelial layer was proliferating. In the middle stage of closure, Ki67-positive cells appeared at the perforation edge side of the lamina propria, and fibroblast was proliferating especially on that site. Although we could not identify tissue stem cells of TMP, we found that the cellular dynamics during the closure process differed between the epithelial layer and the lamina propria.

研究分野：耳科学

キーワード：tympanic membrane tissue stem cell identification cellular dynamics

1. 研究開始当初の背景

鼓膜は外耳道からの音波を受け、振動することによって耳小骨に音を伝える重要な役割をになっている。上皮層、固有層、粘膜層の3層構造からなるが厚さ0.06mm～0.1mmの薄い膜状構造であるため外傷や中耳炎によって容易に穿孔が生じてしまう。また鼓膜穿孔は難聴、耳漏、耳閉感、耳鳴などの症状をきたす。鼓膜穿孔は自然閉鎖する場合も多いが、穿孔がそのまま残存し、閉鎖治療を要する場合もある。自然閉鎖しない場合は穿孔閉鎖治療を要し、新鮮創化を行って細胞を誘導する必要がある。鼓膜にも自己複製能と組織を構成する細胞への分化能をあわせ持つ組織幹細胞が存在し、それらが細胞の供給源となっている可能性が推定されるが、組織幹細胞の同定や局在については十分に知られていない。鼓膜穿孔が自然閉鎖する場合、しない場合の差異や鼓膜再生療法などの方法で閉鎖が成功する場合、しない場合の差異についてはいまだ不明な点が多いが、鼓膜の組織幹細胞がいかに効率的に誘導されるかが、鼓膜穿孔閉鎖のカギを握っていると考えられる。

2. 研究の目的

鼓膜の組織幹細胞の局在や穿孔閉鎖時の動態を明らかにし、鼓膜穿孔閉鎖における効率的な細胞誘導の手技を確立する。

3. 研究の方法

C57/BL6 マウスに全身麻酔をかけて正常鼓膜を鼓膜輪ごと採取、あるいは穿孔を作成し、閉鎖途中にある鼓膜を採取する。鼓膜は上皮層、膠原線維からなる固有層、粘膜層の3層構造であり、上皮層と固有層が主な構成要素である。上皮層と固有層を免疫染色で染め分け、上皮系(1-integrin, CK19 など)、間葉系(CD105, CD73, CD90 など)幹細胞マーカーを用いて採取した鼓膜を免疫組織学的に評価し、鼓膜輪、ツチ骨柄周囲、臍部、緊張部、弛緩部などの部位ごとにマーカー発現の有無を評価する。さらに BrdU, Ki-67 による染色で、細胞分裂の盛んな領域を同定する。

4. 研究成果

上皮層を Keratin5 で、固有層を vimentin で蛍光免疫染色を行った。さらに Ki67 で染色し、増殖中の細胞を同定した。幹細胞マーカーは試みたが、有意な結果をえられなかった。Ki67 による染色では上皮層は鼓膜輪側の辺縁かつ、基底細胞層の付近に、固有層は穿孔縁の先端に Ki67 陽性細胞が出現した。上皮層は鼓膜輪側～穿孔縁側の全体が増殖するのに対し、固有層は穿孔縁の Ki67 陽性細胞が見られ部位から増殖することがわかった。また、上皮層の方が固有層にくらべて単位面積あたりの Ki67 陽性細胞が多く、増殖能が高い可能性が示唆された。幹細胞マーカーについては抗体の濃度や性能によって染色される細胞がみられなかった可能

性があり、もともと鼓膜に組織幹細胞が存在しないのか、染色手技の問題なのかは今回の結果からは判別困難であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金井理絵
2. 発表標題 マウス鼓膜閉鎖過程の細胞動態に関する検討
3. 学会等名 第37回京都耳鼻咽喉科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金井理絵
2. 発表標題 マウス鼓膜閉鎖過程の細胞動態に関する検討
3. 学会等名 第37回京都耳鼻咽喉科研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------