

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09332

研究課題名（和文）難治性中耳炎に対する細胞シート治療の普及に向けた新規作製法の確立

研究課題名（英文）Establishment of new preparation method for popularization of cell sheet treatment for intractable otitis media

研究代表者

谷口 雄一郎（YAGUCHI, YUICHIRO）

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：30307475

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では難治性中耳炎に対する細胞シート治療の普及に向けて、鼻腔粘膜細胞シートの製品化をめざし、細胞シートの作製条件と輸送条件を最適化を行った。初代培養後の細胞を一時的に凍結保存し、この細胞を融解して培養することにより、鼻腔粘膜細胞シートの作製に成功した。これらの成果は、鼻腔粘膜細胞シートは輸送が可能であることを示し、今後の臨床試験や実用化において重要な成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔粘膜組織は5日間冷蔵保存ならびに凍結保存しても細胞の増殖が見られ、細胞シートを10枚作製するのに十分な細胞数が確保できた。これらの成果により、鼻腔粘膜細胞シートは輸送が可能であることを示し、今後の医師主導試験や実用化に向けた重要な臨床データを蓄積することに成功した。実用化後には、全国の病院で医療を展開することができる期待が高まった。凍結細胞を利用した鼻腔粘膜細胞シートの作製法を用いることで、再生医療等製品において問題となる細胞培養時期を容易に調整が可能となった。将来的には他家移植治療への応用展開も検討していきたい。

研究成果の概要（英文）：It is important to establish a transport system for cell sheets. In this study, we optimized the conditions of cell sheet fabrication and transportation with the aim of commercializing nasal mucosa cell sheets as a regenerative medicine product. In addition, we succeeded in producing nasal mucosa cell sheets by temporarily freezing and storing cells after primary culture, and then thawing and culturing these cells. These results show that nasal mucosa cell sheets can be transported, which is an important achievement for future clinical trials and practical applications.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：真珠腫性中耳炎 再生医療 細胞シート 細胞培養 凍結細胞 癒着性中耳炎

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真珠腫性中耳炎や癒着性中耳炎などの中耳手術において、病的粘膜を除去した後の骨面に自己の鼻腔粘膜細胞シートを移植して中耳粘膜を再生させることで、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ようになってきた。今後本研究の普及を見据え、細胞加工製品のプロトコル改良、並びに製品の輸送技術の開発が必要である。現在実施している多施設共同研究を遂行する中で、細胞加工製品を安全かつ効果的に運搬する輸送技術や、常に細胞加工製品を供給できる細胞培養手法、必要性を認識している。そこで本研究では、組織や細胞加工製品の輸送方法のプロトコルを確立するとともに、凍結細胞を用いた培養手法を確立することを目的とする。本研究の成果は再生医療の臨床応用のモデルケースとして、多くの患者に安全かつ有効な治療法を提供できるよう推進する。

現在本研究成果を普及させるためには臨床研究および再生医療新法に準拠したプロトコルを確立し、製品化することが課題とされている。そこで本研究では、東京慈恵会医科大学と共同で細胞シートの輸送条件を最適化して臨床研究を行うとともに、鼻腔粘膜細胞が凍結保存でき得るか検討する。

2. 研究の目的

臨床研究における細胞シートの作製は、無菌施設である Cell processing center (CPC) で行われている。この CPC は、空調、温度、機器等が高度に管理されているため、維持・管理費用が高く、全ての病院に設けるのは難しい。そこで、細胞シートの輸送システムを構築することが重要である。

本研究では、鼻腔粘膜細胞シートを再生医療等製品としての製品化をめざし、細胞シートの作製条件と輸送条件を最適化する。さらに、初代培養後の細胞を一時的に凍結保存し、この細胞を融解して培養し、鼻腔粘膜細胞シートを作製できるかを検証する。また、鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートの輸送を伴う臨床研究を実施する。

3. 研究の方法

採取したヒト鼻腔粘膜組織と全血を 3 時間輸送した。鼻腔粘膜は培養液に入れて 4 で輸送し、全血は 24 で輸送し、遠心分離し血清のみ抽出した。作製したヒト自己血清を用いて、初代培養として約 2 週間エクスプラント培養を行い、温度変化のみで細胞をシート状に回収することが可能な温度応答性培養皿に細胞を播種した。継代培養を行い、鼻腔粘膜細胞シートを作製し、作製した細胞シートの品質検査として、性状確認、剥離試験、総細胞数、細胞生存率、上皮細胞含有率を評価した。

次に継代時に凍結させた鼻腔粘膜細胞を用いて通常細胞と同様の手順で鼻腔粘膜細胞シートを作製し、性状確認、剥離試験、総細胞数、細胞生存率、上皮細胞含有率を評価した。

これらの輸送コールドランで確立した条件を元に、「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)」に準じ、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のもと、東京慈恵会医科大学と共同臨床研究を実施した(日医治促 IDJMA-11A00316)。聖マリアンナ医科大学で採取したヒト鼻腔粘膜組織と全血を上述の条件で輸送し、東京慈恵会医科大学内の CPC で培養した。約 3 週間後、細胞シートを輸送し、聖マリアンナ医科大学で移植手術を 3 例実施した。

4. 研究成果

ポピオンヨードで殺菌した後、抗生物質などを含んでいる培地で 3 時間輸送された鼻腔粘膜組織は、エクスプラント培養を行っても菌などのコンタミネーションがなく、通常通り上

皮細胞の増殖が観察された。この細胞を継代して鼻腔粘膜細胞シートを作製すると、細胞数、細胞生存率、上皮細胞純度等に影響なく移植基準を満たしていた。また、初代培養後の細胞を一時的に凍結保存し、この細胞を融解して培養した鼻腔粘膜細胞シートは、総細胞数および細胞生存率が通常の細胞シートと同等であることを確認した。性状確認、剥離試験では問題なく移植基準を満たす結果となった。

さらに、細胞シートを細胞培養時の培地を用いて3時間輸送し、形状の観察、細胞数、細胞生存率、上皮細胞純度を評価した。これらの試験結果は全て輸送前と比べて差はなく、鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートが3時間以内であれば輸送可能であることを示し、学術論文として報告した (Kasai Y, et al. Regen Ther, 2019)。

鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートの使用期限を解析するため、さらなる保存期間を設定して解析を行った。鼻腔粘膜組織は5日間冷蔵保存ならびに凍結保存しても細胞の増殖が見られ、細胞シートを10枚作製するのに十分な細胞数が確保できた。

鼻腔粘膜細胞シートはハックス緩衝液で2日間保存しても、保存前と同等の細胞生存率を示した。さらに、増殖能を評価するために、コロニーフォーミングアッセイおよび *in vitro* 接着実験の結果より、増殖能が保たれており、移植後に創傷治癒に働くと期待できると考えられた。このように、鼻腔粘膜組織と細胞シートの使用期限がそれぞれ5日以内、2日以内であることを示した。なお、初代培養後の細胞を一時的に凍結保存し、この細胞を融解して培養した鼻腔粘膜細胞シートも、総細胞数および細胞生存率が通常の細胞シートと同等であることも確認した。これらの結果について、現在論文投稿中である。

東京慈恵会医科大学と共同で実施した鼻腔粘膜組織および鼻腔粘膜細胞シートの輸送を伴う鼓室形成術後の中耳粘膜再生の臨床研究では3例中3例のいずれの症例においても合併症ならびに有害事象は認められておらず、高い安全性が示された。さらに、移植6ヶ月後のCT像から、中耳の含気化が再生している所見が得られ、治療の有効性データも蓄積された。この結果についても、論文投稿の準備中である。

これらの成果により、鼻腔粘膜細胞シートは輸送が可能であることを示し、今後の医師主導治験や実用化に向けた重要な臨床データを蓄積することに成功した。実用化後には、全国の病院で医療を展開することができる期待が高まった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Yoshiyuki Kasai, Tsunetaro Morino, Shun Kikuchi, Ryoto Mitsuyoshi, Masahiro Takahashi, Kazuhisa Yamamoto, Yuichiro Yaguchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Analysis of human nasal mucosal cell sheets fabricated using transported tissue and blood specimens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative therapy	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.reth.2019.05.001	査読の有無 有
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口 雄一郎
2. 発表標題 輸送システムを利用した培養上皮細胞シート
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口雄一郎
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 ～細胞シート治療の普及に向けた輸送システムの検討～
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	森野 常太郎 (MORINO TSUNETARO) (00796352)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	山本 和央 (YAMAMOTO KAZUHISA) (50408449)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	葛西 善行 (KASAI YOSHIYUKI) (60813889)	東京慈恵会医科大学・医学部・助教 (32651)	

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