

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09357

研究課題名(和文) 中耳粘膜再生医療－経粘膜換気能の評価による最適な細胞ソースの検討－

研究課題名(英文) Regenerative medicine for middle ear mucosa - Investigation of optimal cell source to regenerate middle ear aeration-

研究代表者

山本 裕 (Yamamoto, Yutaka)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10313545

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、GFPラット由来の鼻粘膜細胞シート、口腔粘膜細胞シート、脂肪由来間葉系幹細胞シートを作製する条件を確立した。次に、この各種細胞シートをヌードラット移植し、それぞれの細胞シートにおける治療効果の差異を観察した。鼻粘膜細胞シートは長期に渡って中耳粘膜に類似した非角化上皮組織として生着している様子を捉えた。口腔粘膜上皮細胞シートの移植では重層化および角化物の形成、脂肪由来間葉系幹細胞シートの移植では中耳骨骨新生による中耳腔の狭小化がみられた。これより、細胞ソースの性質が移植後の効果に反映すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞シートを用いた多くの再生医療では、移植後、移植先の環境に応じる仮説や性質を維持する仮説があり、この解明は大きな課題として掲げられている。本研究では、異なる3ヶ所の細胞ソースから作製した細胞シートを用いて形態に着目して挙動を解析した研究であり、細胞ソースの性質の差異が移植後の効果に大きく反映することを示した。これより、比較的採取可能な部位由来の組織の中で中耳の再生医療には鼻粘膜が適することが確認できたとともに、各治療方法の目的に沿って細胞ソースを選定することに非常に重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we succeeded to treat middle ears by using nasal mucosal cell sheet. However, it was controversial whether the best cell source of the cell sheet. In this study, we fabricated three types of cell sheet derived from nasal mucosa, oral mucosa, and adipose derived stem cell of GFP transgenic rat and transplanted into middle ear cavity of nude rat. The GFP positive transplanted cell sheet derived from nasal mucosal tissue was observed non-keratinized epithelial tissue like as surrounding middle ear mucosal tissue. The results of transplantation of oral mucosal cell sheet, keratinized epithelial tissue was observed. Moreover, the results of transplantation of adipose derived stem cell sheet, hyperostosis-like form was observed in middle ear cavity. We considered that as non-keratinized epithelial regeneration is important to keep or regenerate aeration in middle ear cavity, nasal mucosal cell is the best cell source among these three tissues.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：細胞シート 中耳再生治療 鼻腔粘膜 口腔粘膜 脂肪由来間葉系幹細胞

## 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難治性中耳疾患の手術治療で、術中に中耳腔および乳突腔の粘膜を保持することが困難な症例では、高率に真珠腫の再形成再発や鼓膜の再癒着を来す。しかし近年、術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。中耳腔の恒常性を維持するためには粘膜を介した換気作用(経粘膜換気能)が重要な因子となる。中耳粘膜は、ガス換気を効率良く行うために、単層上皮に薄い間質が裏打ちされている。鼻腔粘膜上皮細胞シートを用いた先行する基礎研究では、移植後の中耳腔は単層の中耳粘膜で覆われており、中耳圧測定を用い経粘膜換気能を有することが確認された。しかし他の細胞ソースを中耳腔に移植した場合に同様の中耳粘膜の再生がえられるのかどうかは不明である。本研究では、種々の培養細胞シートを中耳腔に移植した際の中耳腔粘膜の形態を動物実験で明らかにする。中耳腔への移植粘膜の形態学的検討を行うことにより、中耳粘膜移植に適した細胞ソースの検証につながる探索的研究となるものと考ええる。

### 2. 研究の目的

本研究では、移植された代用組織の上皮細胞が移植後に周囲の微小環境により中耳粘膜様の表現型を獲得するか明らかにするために、動物実験を用いて中耳粘膜の形態学的解析を評価した。

移植する培養細胞は、酵素処理せず温度の変化のみで培養細胞をシート状に回収することができる温度応答性培養基材を利用した。シートの剥離面には接着蛋白が付着しており、大量の培養細胞を瞬時に移植部位である中耳腔に生着させることができる。この技術を利用することで、鼻粘膜、口腔粘膜、間葉系幹細胞を細胞ソースとした培養シートを作製した。本研究の成果は、適切な細胞ソースの検証ならびに中耳粘膜の機能解明につながる探索的研究と考える。

### 3. 研究の方法

#### (1) GFP トランスジェニックラット由来細胞シートの作製

8週齢雄の GFP トランスジェニックラットから鼻粘膜、口腔粘膜、脂肪を採取した。培地は鼻粘膜、口腔粘膜はケラチノサイトカルチャーメディアウムを用い、脂肪は基礎培地に 10%FBS を使用した。鼻粘膜細胞シートの作製では、細胞培養皿上でエクスプラント培養を行い、培養鼻腔粘膜上皮細胞を得た。その後、温度応答性培養基材に継代培養を行い、細胞シートとして回収できるか検討した。口腔粘膜上皮細胞シートの作製法では、ディスペルゼ処理で口腔粘膜上皮を分離後、トリプシンを用いて細胞を単離し、温度応答性培養基材に直接細胞播種した。初代培養後、細胞シートとして回収できるか検討した。間葉系幹細胞シートの作製では、MSC の供給源として、脂肪を使用した。鼠径部の脂肪組織より細胞を単離し、初代培養簿に継代し、新しいディッシュに移した。今回の研究では、温度応答性培養基材に継代 4~5 の細胞を播種し、細胞シートとして回収できるか検討した。

#### (2) ラット細胞シート移植モデルの作製

8週齢のヌードラットを用いて、顕微鏡下で耳介後部から中耳骨胞に到達し、中耳骨を開窓後、中耳腔後方から下壁部位の中耳粘膜を剥離除去した。作製した細胞シートを 5mm 角にトリミングし、針を用いて開窓部より移植した。励起光下で観察しながら、中耳粘膜剥離部位に細胞シートを移植した。移植モデルを犠牲死後、摘出した中耳骨に対して励起光を用いて GFP 発現部位を観察した。中耳骨の脱灰は EDTA を使用した。パラフィン包埋した検体より薄切標本作製し組織学的解析を行った。

### 4. 研究成果

GFP トランスジェニックラットを犠牲死後、鼻腔粘膜、口腔粘膜、鼠径部脂肪を採取した。鼻粘膜細胞シートの作製では、初代培養で 2 週間培養することで、十分な量の上皮細胞を得ることができた。回収した細胞を温度応答性培養基材に播種し、1 週間培養したところ、細胞シートを回収することができた。回収した細胞シートは、2-3 層の上皮系のマーカー蛋白を発現する細胞

群であり、細胞シート 1 枚あたりの細胞数は約 100 万 cells、生存率は 90%以上であった。

口腔粘膜上皮細胞シートの作製では、酵素法により得た上皮細胞を温度応答性基材へ播種し、1 週間培養したところ、細胞シートを回収することができた。回収した細胞シートは、2-3 層の上皮系のマーカー蛋白を発現する細胞群であった

脂肪由来間葉系幹細胞シートの作製では、温度応答性培養基材に継代数が 4~5 の細胞を播種し、3 日間培養したところ、細胞シートを回収することができた。

ヌードラットの中耳骨胞へのアプローチは、耳後部切開にて、顔面神経を同定して、これをメルクマールとすることで安定して中耳骨胞へ到達でき、中耳骨胞に小孔を開けて顕微鏡下で中耳粘膜を剥離することができた。中耳粘膜剥離部位に細胞シートを移植した。GFP 励起光で観察しながら移植することで、中耳粘膜剥離部位を細胞シートで被覆することができた。細胞シート移植モデルを犠牲死後、摘出した中耳骨胞に対して励起光で観察したところ、中耳骨を透過し細胞シート移植部位を観察することができた。中性脱灰液で処理後、中耳骨を半割し内腔を観察したところ、中耳腔内に GFP の発現を確認することができた。

鼻粘膜細胞シート移植 3 日目の組織学的解析では、中耳粘膜剥離部位を GFP 陽性細胞が被覆しており、宿主側の骨の病態を抑制していた。生着した細胞は 2-3 層の上皮細胞が確認された。移植 8 週間後の組織学的解析では、残存する生着細胞は 2 層の丈の短い上皮細胞が観察された。

口腔粘膜上皮細胞シート移植 14 日目の組織学的解析では、生着した細胞は 5-6 層の上皮細胞が確認された。また、表層には角化細胞が存在し、中耳腔内にも角化物がみられた。

脂肪由来間葉系幹細胞シート移植 7 日目の組織学的解析では、中耳粘膜剥離部位に間葉系細胞の遊走が観察され、移植細胞も遊走細胞内に存在していた。また、一部中耳骨より類骨形成がみられた。移植 14 日後の組織学的解析では、骨化が進み、中耳腔内全体に新生骨形成がみられた。

本研究では臨床応用と同様の方法で、GFP トランスジェニックラット由来の培養細胞シートを作製することができた。培養鼻粘膜細胞シート移植による治療効果として、露出した骨面に移植した細胞が生着することで骨の炎症を抑え、中耳粘膜の修復を促していることを確認することができた。また、他分野で臨床応用が進められている口腔粘膜および間葉系幹細胞を細胞ソースとした細胞シートの移植に関して、口腔粘膜上皮細胞シートの移植では重層化および角化物の形成、脂肪由来間葉系幹細胞シートの移植では中耳骨骨新生による中耳腔の狭小化がみられた。一方、鼻粘膜上皮細胞シートの移植では残存する移植細胞は 2 層の丈が短い細胞が観察され、中耳骨新生も抑えられていた。ガス換気に効率の良い薄い中耳粘膜で被覆された含気骨を再生させることには現時点では鼻粘膜が最適であることが示唆された。今後、培養細胞の移植後の細胞動態を解析することで、中耳粘膜再生治療の作用機序に迫る。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 8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 Takahashi Masahiro, Yamamoto-Fukuda Tomomi, Akiyama Naotaro, Motegi Masaomi, Yamamoto Kazuhisa, Tanaka Yasuhiro, Yamamoto Yutaka, Kojima Hiromi	4. 巻 40
2. 論文標題 Partial Epithelial?Mesenchymal Transition Was Observed Under p63 Expression in Acquired Middle Ear Cholesteatoma and Congenital Cholesteatoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otology & Neurotology	6. 最初と最後の頁 e803 ~ e811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002328	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 -
1. 著者名 Motegi Masaomi, Yamamoto Yutaka, Tada Takeshi, Takahashi Masahiro, Sampei Sayaka, Sano Hiromi, Morino Tsunetaro, Komori Manabu, Miura Masahiro, Yamamoto Kazuhisa, Yaguchi Yuichiro, Sakurai Yuika, Kojima Hiromi	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Pars Tensa Cholesteatoma: A Comparative Study of Area-Based Classification Systems Proposed by the Japanese Otological Society and the European Academy of Otology & Neuro-Otology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of International Advanced Otology	6. 最初と最後の頁 184 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao.2019.6349	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 -
1. 著者名 Takahashi Masahiro, Yamamoto Yutaka, Koizumi Hiromi, Motegi Masaomi, Komori Manabu, Yamamoto Kazuhisa, Yaguchi Yuichiro, Kojima Hiromi	4. 巻 139
2. 論文標題 A quantitative study of the suppression of the development of the mastoid air cells by the presence of congenital cholesteatoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Oto-Laryngologica	6. 最初と最後の頁 557 ~ 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2019.1606439	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 -
1. 著者名 Morino Tsunetaro, Kasai Yoshiyuki, Kikuchi Shun, Mitsuyoshi Ryoto, Takahashi Masahiro, Yamamoto Kazuhisa, Yaguchi Yuichiro, Yamato Masayuki, Kojima Hiromi	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 -

1. 著者名 Morino Tsunetaro, Takagi Ryo, Yamamoto Kazuhisa, Kojima Hiromi, Yamato Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Explant culture of oral mucosal epithelial cells for fabricating transplantable epithelial cell sheet	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 36~45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2018.10.006	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 -

1. 著者名 山本 裕	4. 巻 22
2. 論文標題 鼓室形成術の基本手技(解説)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本耳鼻咽喉科学会会報	6. 最初と最後の頁 1439-1442
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 James AL, Tono T, Cohen MS, Iyer A, Cooke L, Morita Y, Matsuda K, Yamamoto Y, Sakagami M, Yung M.	4. 巻 40
2. 論文標題 International Collaborative Assessment of the Validity of the EAONO-JOS Cholesteatoma Staging System.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otol Neurotol	6. 最初と最後の頁 630-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MAO.0000000000002168	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 Motegi M, Yamamoto Y, Tada T, Takahashi M, Sampei S, Sano H, Morino T, Komori M, Miura M, Yamamoto K, Yaguchi Y, Sakurai Y, Kojima H.	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Characteristics of Pars Tensa Cholesteatoma: A Comparative Study of Area-Based Classification Systems Proposed by the Japanese Otological Society and the European Academy of Otolology - Neuro-Otology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Int Adv Otol	6. 最初と最後の頁 184-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5152/iao.2019.6349	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 -

1. 著者名 Morino T, Takagi R, Yamamoto K, Kojima H, Yamato M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Explant culture of oral mucosal epithelial cells for fabricating transplantable epithelial cell sheet.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 36-45
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 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 -

1. 著者名 Morita Y, Tono T, Sakagami M, Yamamoto Y, Matsuda K, Komori M, Hato N, Hashimoto S, Takahashi H, Kojima H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Nationwide survey of congenital cholesteatoma using staging and classification criteria for middle ear cholesteatoma proposed by the Japan Otological Society	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 346-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2018.10.015.	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 森野常太郎, 小島博己	4. 巻 17
2. 論文標題 “患者まで届いている再生医療” 中耳粘膜再生治療 培養鼻腔粘膜上皮細胞を用いた日本癩の再生医療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 再生医療	6. 最初と最後の頁 422-428
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15件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高橋 昌寛, 福田 智美, 茂木 雅臣, 穂山 直太郎, 山本 和央, 田中 康広, 山本 裕, 小島 博己
2. 発表標題 中耳真珠腫におけるタイトジャンクション関連分子発現の検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原 涉(東京慈恵会医科大学 耳鼻咽喉科), 藤岡 正人, 平林 源希, 小川 郁, 山本 裕, 小島 博己
2. 発表標題 小型霊長類コモンマーモセット側頭骨の解剖学的解析による内耳薬剤投与経路の検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 茂木 雅臣, 栗原 涉, 高橋 昌寛, 三瓶 紗弥香, 佐野 博美, 山本 和央, 櫻井 結華, 山本 裕, 小島 博己
2. 発表標題 弛緩部型真珠腫術後の中耳腔含気についての検討
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 裕
2. 発表標題 中耳手術 顕微鏡下
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Yamamoto
2. 発表標題 Round table: Nationwide Survey of Middle Ear Cholesteatoma using Staging and Classification Criteria proposed by the Japan Otological Society
3. 学会等名 32th Politzer Society Meeting - 2nd World Congress of Otology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yutaka Yamamoto
2. 発表標題 テーマセッション: Current state of ossiculoplasty in Japan and clinical factors related to the hearing results
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 裕
2. 発表標題 教育セミナー：外耳道後壁削除型鼓室形成術
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 裕
2. 発表標題 側頭骨手術手技研修WG報告
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本 裕
2. 発表標題 用語委員会報告
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Kasai Y, Morino T, Yamamoto K, Kojima H
2. 発表標題 Ex vivo studies of the behavior of nasal mucosal cell sheet after grafting
3. 学会等名 5th Tissue engineering and regenerative medicine international society world congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小島博己
2. 発表標題 培養鼻腔粘膜上皮細胞シートによる中耳粘膜再生治療と製造販売に向けた試み
3. 学会等名 第28回日本耳科学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷口雄一郎, 山本和央, 森野常太郎, 葛西善行, 稲垣太朗, 小島博己, 肥塚泉
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 第28回日本耳科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森野常太郎, 葛西善行, 山本和央, 谷口雄一郎, 小島博己
2. 発表標題 中耳粘膜再生医療の普及に向けた培養鼻腔粘膜上皮細胞シートの輸送条件の検討
3. 学会等名 第28回日本耳科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森野常太郎, 葛西善行, 山本和央, 小島博己
2. 発表標題 治験を目指した鼻腔粘膜細胞シートの作製法の検討
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島博己, 山本和央, 森野常太郎, 葛西善行
2. 発表標題 培養鼻腔粘膜上皮細胞シートによる中耳粘膜再生を目的とした治療と製造販売に向けた試み
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会(招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 森野 常太郎、山本 裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 JOHNS	5. 総ページ数 4
3. 書名 【耳管のすべて】耳管処置、耳管機能検査のリスクマネジメント	

1. 著者名 山本 和央、山本 裕	4. 発行年 2019年
2. 出版社 耳鼻咽喉科・頭頸部外科	5. 総ページ数 4
3. 書名 【救急・当直マニュアル-いざというときの対応法】当直での術後急変への対応 耳科手術後の血腫	

〔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  (Tsunetaro Morino)  (00796352)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師    (32651)	
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	小島 博己  (Kojima Hiromi)  (60234762)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授    (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