

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791787

研究課題名(和文) 中耳粘膜上皮細胞の培養とその臨床再生学への応用

研究課題名(英文) Evaluation of in situ tissue engineering of the middle ear mucosa

研究代表者

穉山 直太郎 (Akiyama, Naotaro)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90554238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：中耳粘膜は中耳生理機能維持に重要であると考えられている。そこで、ラット中耳粘膜障害モデルにおいて、組織工学的手法を用いた中耳粘膜再生を試みた。合成ペプチド水素ゲルを組織再生の足場に用い、ラット中耳粘膜上皮培養細胞と配合して移植実験を行った。全細胞で蛍光タンパクEGFPを発現するトランスジェニックラット由来の中耳粘膜上皮培養細胞をドナー細胞に用い、中耳粘膜を除去した中耳粘膜障害ラットに移植した。移植後7日目、14日目、28日目においてEGFPを発現する細胞が移植部位に確認され、それらが組織学的な解析により、上皮細胞の性質を有し、基底膜の形成、細胞間接着の形成を示唆する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Middle ear mucosa is essential in the maintenance of middle ear function. In the present study, we evaluated in situ tissue engineering for the mucosal regeneration in the rat middle ear. We prepared donor cells from SD-transgenic rats which expressed EGFP systemically. The cultured cells were encapsulated into the synthetic peptide hydrogel and transplanted into the middle ear of SD rats, where middle ear mucosa was eliminated surgically. At 7, 14, and 28 days after transplantation, the middle ear bullae with transplanted cells were collected and analyzed. In many cases, EGFP expressed cells were found on the surface of the bone of host-middle ear bullae and retained the character of epithelial cells immunohistochemically. Ultrastructural analysis revealed the adhesion junction like structure between adjacent cells. In conclusion, these findings suggested that transplanted donor cells had migrated into the host tissue and reorganized normal structure of the middle ear epithelial cells.

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：中耳 中耳粘膜上皮 再生 培養細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)中耳伝音系が正常に機能するには振動する為の空間が保たれ、かつ平圧を維持することが重要である。中耳の一部である乳突蜂巣は肺と類似した構造を持ち、その中耳粘膜が中耳の調圧の役割を担っている(Takahashi H, 2001)。真珠腫性中耳炎に代表される中耳疾患の手術において病巣を十分に除去するために中耳粘膜を温存することは困難な場合が多く、それに伴って、術後に中耳腔の確保および調圧機能の維持に障害をきたした場合は術後形成鼓膜や上皮の再陥凹、癒着といった悪循環に陥り、再形成性真珠腫などの重篤な合併症に発展する場合がある。対策としては中耳腔を確保する目的にシリコン板を留置し、空間が確保されたのちに二期的に手術を行う段階的手術難尾が挙げられるが、手術を2回に分けて行うという不利益な臨床の状況を生じており、自家の軟骨を用いて空間を確保しようとしても間隙から鼓膜が陥凹することもしばしばあり、この問題に対する抜本的解決とは言えないのが現状である。中耳粘膜欠損部への自己組織由来培養細胞の移植による中耳粘膜組織再生の臨床応用が可能となれば中耳手術における術後の問題を抜本的に解決することが期待される。

(2)合成ペプチドハイドロゲルは様々な細胞培養に対し、三次元のミクロ環境を提供する合成マトリックスであり、組織再生の生体内研究への応用が報告されている(Semino CE *et al.*, 2003)。用いたペプチドハイドロゲル(PuraMatrix™, BD Bioscience)はRADA、すなわちアルギニン、アラニン、アスパラギン酸、アラニンの繰り返し構造を有する16アミノ酸から成っており、生体環境など1価の陽イオン存在下で自己重合を生じ、安定したシート構造をとり、超親水のハイドロゲルを形成する。ポアサイズが細胞外マトリックスと同等のナノレベルの三次元網目構造をとり、RADA配列は細胞外マトリックスのRGD配列(アルギニン、グリシン、アスパラギン酸)と類似していることから、細胞接着、発育に有利で、高い生体適合性と生体吸収性を兼ね備えているという特徴も有している。さらに合成ペプチドであることから未知の感染のリスクも回避される。合成ペプチドハイドロゲルに被包した細胞移植は、生理的環境下での組織再生が期待され、移植部位の形状にこだわらない効率的な組織再生につながる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1)合成ペプチドハイドロゲルを用いた培養細胞による中耳粘膜組織再生の可能性を追求することが本研究の目的である。

(2)ドナー細胞については全細胞で蛍光タンパク enhanced green fluorescent protein (EGFP)を発現するトランスジェニックラット(グリーンラット)[Sprague-Dawley (SD)-transgenic (TG) rat](Japan SLC)

由来の中耳粘膜上皮初代培養細胞を用い、EGFPをトレーサーとすることで、再生組織の起源を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ラット中耳粘膜上皮細胞培養

4~5週のグリーンラット(SD-TG rat)(、90-140g)をペントバルビタール致死量(200mg/kg)の腹腔内投与で安楽死させ、断頭後に中耳骨胞を摘出後、中耳骨胞を2-3mmに細切し、型コラーゲンでコートされた培養皿上で組織片培養法(Moon SK *et al.*, 2000)により培養した。培地組成はDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco)とBronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) (Lonza)の1:1混成とし、添加因子にhydrocortisone (0.5µg/ml), insulin (5.0µg/ml), transferrin (10µg/ml), triiodothyronine (6.5ng/ml), epidermal growth factor (0.5ng/ml), retinoic acid (0.1ng/ml), epinephrine (0.5µg/ml), gentamycin (50µg/ml), amphotericin B (50ng/ml)を用いた。環境設定は37℃、5%CO₂とし、培地交換は1日おきに行った。免疫組織化学的解析用の細胞はサイトスピン法(800rpm, 2min)により収集し、抗pancytokeratin抗体(上皮系マーカー)、抗vimentin抗体(間葉系マーカー)を用いて解析した。

(2)移植の実際

中耳粘膜障害モデル

レシピエントに6~7週のSDラット(、150-160g)をペントバルビタールの腹腔内投与(35mg/kg)による鎮静下に耳介後部から中耳骨胞に到達後、手術用ドリルで小孔を作成し、手術的に中耳粘膜を剥離除去した。粘膜剥離の確認は免疫組織化学法で評価した。ペントバルビタール致死量を腹腔内投与し、安楽死させ、断頭後に中耳骨胞を摘出し、4% paraformaldehyde (PFA)/ phosphate buffered saline (PBS)を用いて固定した。10% ethylenediaminetetraacetic acidで1週間脱灰後、パラフィンに包埋し、5µmの連続切片を作成し、免疫組織化学法により中耳粘膜剥離の確認を行った。

移植群

以下の移植群を作製した。それぞれ右耳に移植を行い、左耳はコントロールとした。

i)細胞+培地+ハイドロゲル(n=9)

0.5×10⁶ cells/ml (0.5×10⁵ cells/ear)

ii)細胞+培地+ハイドロゲル(n=9)

1.0×10⁶ cells/ml (1.0×10⁵ cells/ear)

iii)細胞+培地(n=3)

1.0×10⁶ cells/ml (1.0×10⁵ cells/ear)

免疫抑制

移植後の免疫抑制はFK-506(Astellas Pharma Inc.)0.32mg/kgを1週間に5日間投与、2日休薬のスケジュールで反復投与(筋注)した。なお、移植後は抗菌剤としてPenicillin G (22U/g/day)を連日投与した。

(3)移植後の解析

移植後 7、14、28 日目に移植後の解析を行った。ペントバルビタール致死量を腹腔内投与し、安楽死させ、断頭後に中耳骨胞を摘出し、凍結標本作製した。フィルム法により 5 μ m の連続切片を作成し、免疫組織化学法用サンプルの固定は 4% PFA/ PBS を用い、電子顕微鏡用サンプルの固定は 2.5% glutaraldehyde/ PBS を用いた。免疫組織学的解析に上皮系マーカーとして抗 pancytkeratin 抗体 (上皮系マーカー) (Novocastra)、間葉系マーカーとして抗 vimentin 抗体 (Dako)、リモデリングマーカーとして抗 collagen type III 抗体 (Abcam)、基底膜のマーカーとして抗 collagen type IV 抗体 (LSL)、細胞間接着マーカーとして抗 E-cadherin 抗体 (BD Biosciences) を用い、機能解析として PAS 染色による粘液産生能の確認を行った。また、形態学的解析には走査型顕微鏡及び透過型顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1)ドナー細胞の検定

グリーンラット由来の中耳粘膜上皮培養細胞は、上皮細胞に特徴的な敷石状の形態を示し、第 3 代まで形態学的に問題なく安定した増殖が得られ (倍加速度: 22.1hr)、免疫組織化学的にも pancytkeratin 陽性且つ vimentin 陰性で上皮系の細胞であることが示された。また、第 3 代継細胞まで EGFP の発現も十分であった。

(2)レシピエントの検定

粘膜を剥離した中耳腔内面において、パンサイトケラチン陽性細胞は認めず、ビメンチン陽性細胞が認められ、中耳内腔面において粘膜下組織を残して目的とする中耳粘膜は十分に剥離除去されていることが示された。

(3)移植成績

細胞 + 培地 + ハイドロゲル移植群において移植部位に EGFP を発現する細胞群が認められ、0.5 \times 10⁵ cells/ ear 移植群で 88.9% と良好な結果だった。ハイドロゲルを用いずに移植したコントロール群では移植部位に EGFP を発現する細胞群は確認されなかった。免疫組織化学法による解析では EGFP 陽性部位の細胞は pancytkeratin 陽性且つ vimentin 陰性で上皮系の細胞であることが確認でき、粘膜下の collagen type III 陽性領域は移植後 14 日目がピークであり、活発なリモデリングが示唆された。また、移植後 7 日目で移植細胞直下に collagen type IV 陽性部位が認められ、基底膜の形成が移植後早期に形成されることが示唆され、さらに同時期の移植細胞間には E-cadherin が陽性であり、電子顕微鏡を用いた解析でも透過型顕微鏡でアドヘレンスジャンクション様の構造が確認された。同部位の走査型顕微鏡による観察では微絨毛に囲まれた多角形の細胞形態を示し、中耳粘膜上皮細胞に特徴的な像が得られた。また、機能解析では PAS 染色で陽性

部位が認められ、中耳粘膜の機能を有していることが示唆された。以上の結果から、合成ペプチドハイドロゲルを中耳粘膜上皮細胞移植の足場に用いた場合、高率に移植細胞が生存できる可能性が示唆され、移植後 7 日目の段階で基底膜の形成、アドヘレンスジャンクションの形成が示唆され、移植後早期において移植細胞による組織再生がもたらされる可能性が考えられた。中耳粘膜欠損に対するペプチドハイドロゲルを足場とした細胞治療は本動物実験モデルにおいて有効であることが示唆された。

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 1 件)

(1) Naotaro Akiyama, Tomomi Yamamoto-Fukuda, Haruo Takahashi, Takehiko Koji, In situ tissue engineering with synthetic self-assembling peptide nanofiber scaffolds, PuraMatrix, for mucosal regeneration in the rat middle ear, International Journal of Nanomedicine, 査読あり, 8, 2013, 2629-2640.

DOI:

<http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S47279>

[学会発表](計 5 件)

(1) 種山 直太郎、ペプチドハイドロゲルを用いたラット中耳粘膜培養細胞による中耳粘膜再生の検討、第 119 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2014 年 03 月 27 日 ~ 03 月 29 日、栃木

(2) Naotaro Akiyama, Otoendoscopic Examination and Micro-computed Tomography Image Analysis of a New Animal Model of Continuous Negative Pressure in the Middle Ear, 1st Global Otology Research Meeting/ the 29th Politzer Society Meeting, November 13-17, 2013, Antalya, Turkey.

(3) 種山 直太郎、外耳道後壁軟組織再建術に M-meatoplasty を併用した手術症例の検討、第 22 回日本耳科学会総会学術講演会、2012 年 10 月 04 日 ~ 10 月 06 日、名古屋

(4) Naotaro Akiyama, Evaluation of in situ tissue engineering for mucosal regeneration of rat middle ear, 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, August 26-29, 2012, Kyoto, Japan.

(5) Naotaro Akiyama, Ultrastructure of regenerated middle ear mucosa after transplantation of cultured epithelial cells, the 9th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery, June 3-7, 2012, Nagasaki, Japan.

6. 研究組織

(1)研究代表者

穰山直太郎 (Akiyama Naotaro)

長崎大学・大学病院・助教

研究者番号：90554238