

## 中耳真珠腫の病態解明と粘膜再生による新たな治療戦略

東京慈恵会医科大学 耳鼻咽喉科学教室 小島 博己

### Key Takeaways (重要ポイント)

- ✓ 再発防止のために、術後に粘膜を再生させ理想的な含気を維持した中耳腔を形成することを可能にする自己由来鼻腔粘膜細胞シート移植による中耳粘膜再生治療を開発した。
- ✓ 真珠腫成因として、エピジェネティクス変化が一端を担っていることが明らかにされ、中耳真珠腫の構成細胞として新しく p75 陽性神経堤由来細胞を同定し、新規保存的治療法の可能性が見出した。
- ✓ 得られた研究成果を社会実装していくための大学発ベンチャー企業を設立した。

中耳真珠腫の治療において術後再発は大きな問題であるが、遺残性再発は内視鏡の併用により、ある程度予防が可能となった。一方で再癒着や再陥凹から引き起こされる再形成性再発を確実に抑えることは困難であった。この課題を解決するために、中耳粘膜再生の研究を行い、自己培養上皮細胞シートを作製し中耳腔へ移植するという新たな治療法を開発した。すでに臨床研究において有効性・安全性の確認ができ、現在は医師主導治験を行っている。移植したシートの運命やソースの問題など解決すべき課題へも取り組んだ。加えて、真珠腫の成因についても研究成果が得られ、神経堤由来細胞をターゲットとした保存的治療の提案に至った。さらには、これまで得られた研究成果の社会実装を目指し、大学発ベンチャー企業を設立した。これらの概要について説明する。

### 治療の現状と限界

後天性の中耳真珠腫では、弛緩部型・緊張部型ともに遺残性再発よりも再形成性再発が多い傾向が見られた。遺残の発生は術後3年以内にピークに達していたが、再形成は術後3年以降にも継続して発生する傾向がみられた。遺残性再発、再形成性再発ともに、進展度の上昇に伴って増える傾向にあった。先天性真珠腫では、進展度が上がるにつれ遺残性再発が増加するだけでなく、術後の鼓膜陥凹による再形成性再発のリスクも増加する可能性があった。また進展度が上がるほど聴力予後が不良であった。

中耳真珠腫においては、未だに遺残性再発、再形成性再発の頻度は高く、他の中耳炎症性疾患に比し聴力予後も不良である。高度な炎症を伴うことも多い中耳真珠腫では、鼓室粘膜、乳突腔粘膜を温存することは容易ではない。手術操作や病変により粘膜が欠損し骨面、骨膜が露出した中耳腔では健常な粘膜が自然に再生することは多くの症例で望めない。そのような部位では炎症性肉芽や癒着組織、あるいは石灰化、骨化、あるいは鼓膜の癒着が生じ、換気経路が閉塞し、さらに経粘膜換気も大きな障害を受ける。術後乳突腔、鼓室腔の含気を担保することが本術式における再形成性再発の防止策、聴力予後の改善策となることは間違いない。そのためには、耳管からの乳突腔への経路の粘膜を温存・再生し換気路を確保すること、鼓膜の癒着を防止すること、乳突腔の粘膜を温存・再生し経粘膜換気を確保することが極めて重要であると考えられた。

## 細胞シートを用いた中耳粘膜再生

術後に粘膜を再生させ理想的な含気を維持した中耳腔を形成することが可能となれば、真珠腫の再形成性再発を予防でき、鼓膜の再癒着も防止することができると考えられるが、これまでに粘膜を再生させる確立された治療法は存在しない。そこで我々は、中耳粘膜に対する培養細胞を用いた再生医療的アプローチを追求し、温度制御のみで移植可能な組織を作製できる温度応答性培養皿を用いた細胞シート技術に着目した。

### 1. 前臨床研究

家兎を用いた中耳粘膜細胞シートの移植実験で中耳粘膜の再生効果を確認した。次に、臨床応用への課題克服のために細胞ソースとして鼻粘膜に着目し、自己の鼻粘膜細胞シートを中耳に移植する家兎の実験系で粘膜の再生効果も確認した。さらに、ヒト鼻粘膜上皮細胞の培養に適した培養方法の検討を進め、ヒトの鼻粘膜上皮細胞シートの作製にも成功した。

### 2. 移植後細胞シートの運命と細胞ソースの検証

鼻粘膜上皮細胞シートの接着後の *in vitro* の挙動評価では、接着した細胞シートは細胞の遊走と増殖が起こっており、生体に移植した際にも手術創の表面を修復し得ると考えられた。さらに、細胞シートは周囲の環境に应答し、起源の細胞へは分化する能力を持つことも明らかとなった。

ラットを用いた細胞動態の検証では、細胞シートの生着部位で肉芽組織および中耳骨骨増生を予防し、大部分の移植細胞が周囲の正常中耳粘膜に置き換わり、残存する移植細胞は中耳粘膜の環境に合わせて杯細胞や線毛細胞が存在しない上皮細胞へ分化することが明らかとなった。また、口腔粘膜、脂肪組織に由来する細胞シートの移植実験と比較し、現時点で中耳粘膜を再生させる適切な細胞ソースは鼻粘膜であると考えられた。また、新たな細胞ソースの検討として、ヒト iPS 細胞由来気道上皮細胞に着目し、ラットでの移植実験を行い、中耳腔表面に生着した移植細胞の生存には移植部位の微小環境が影響を与える可能性が示唆された。

### 3. ヒト臨床研究

前臨床研究の成果から鼓室形成術の際に術後の中耳粘膜の再生を目的として自己の培養鼻粘膜上皮細胞シートの移植を併用するという新たな技術を開発し臨床研究を開始した。2014年1月に First-in-human study となる1例目の細胞シート移植を施行し、中耳へ培養細胞を移植する世界初の医療として、2015年5月までに全5例の細胞シート移植に成功した。全例で有害事象は認めず、臨床の現場で組織採取から移植に至るまで実施可能な医療であることが明らかとなった。

その後は東京慈恵会医科大学および CPF を有しない聖マリアンナ医科大学との多施設共同臨床研究体制による新規の臨床研究を開始し、2017年8月から2019年3月までに全10症例の細胞シート移植（3症例は聖マリアンナ医科大学で移植）に成功し、組織と細胞シートの輸送を伴い、異なる術者と施設でも細胞シートが安全に移植できることが確認された。中耳真珠腫では全例で乳突腔の含気化がみられ、癒着性中耳炎では全例で鼓室内の含気が改善し、先行臨床研究よりも高い治療効果や有効性を示唆する結果となった。

### 4. 医師主導治験の開始

臨床研究の成果をもとに、治験開始に向けた鼻粘膜細胞培養の条件最適化と、組織と細胞シートそれぞれの保存条件の最適化も行った。非臨床試験などの準備を経て、中耳真珠腫を代表とする慢性中耳炎症性疾患に対する治療として、手術において粘膜除去後の骨面に自己の培養鼻粘膜上皮細胞シートを移植する新規治療法の製品化に向けた治験を開始した。有効性を評価する単群の臨床試験であり、耳鼻咽喉・頭頸部外科領域で初となる再生医療等製品の医師主導治験として「慢性中耳

炎症性疾患（中耳真珠腫）に対する自家鼻腔粘膜上皮細胞シートの多施設共同試験」を現在実施している。

## 保存的治療へのトビラ

ここまでは、臨床の視点からの課題点に基づいた治療法について述べてきたが、真珠腫の根治を目指すのであれば、その発症機序の解明は不可欠である。我々は新たに中耳真珠腫の細胞起源の探索と発症および増殖に関する分子機構の解明を行い、それに基づいた新規保存的治療法の可能性を探索した。

### 1. 起源細胞の探索

我々は、中耳真珠腫の構成細胞として新しく上皮幹細胞/前駆細胞と神経堤由来細胞を同定した。中耳真珠腫においては真珠腫上皮細胞の増殖亢進が原因とされてきた。真珠腫上皮細胞の増殖に関与するとされている KGF の過剰発現が上皮幹細胞/前駆細胞の細胞動態に及ぼす影響について 2 種類のチミジンアナログを用いた標識法で検討した。その結果、KGF の過剰発現で前駆細胞の増殖が誘導された。ヒト中耳真珠腫組織においても上皮系幹細胞/前駆細胞マーカーである p63 陽性細胞が多数存在することを示した。すなわち、中耳真珠腫では KGF 過剰発現により上皮前駆細胞の増殖が促進し、真珠腫組織の増殖を促す可能性が示された。

一方、神経堤細胞に由来する中耳上皮細胞は、中耳炎からの修復および中耳上皮の恒常性を制御することが知られている。神経堤由来細胞において EGFP を条件付きで発現するトランスジェニックマウスを用いて、中耳真珠腫動物モデルを作製し解析した。結果、マウス中耳真珠腫組織において p75 陽性神経堤由来細胞が検出できた。ヒト中耳真珠腫組織においても多数の p75 陽性細胞が検出された。

### 2. 発症および増殖に関する分子機構の解明

中耳真珠腫の病期を大きく「正常」「鼓膜陥凹」「中耳真珠腫」に分けて考え、中耳真珠腫発症起点として鼓膜陥凹に関する機構を解析した。結果、①中耳陰圧により惹起されるメカノセンシング ②炎症や細菌感染で誘導されるサイトカインネットワークで発現した KGF のパラクライン作用、により鼓膜陥凹が誘導されることを報告した。中耳陰圧と真珠腫発症の関連性は古くから着目されてきたが、その分子メカニズムについては不明な点が多い。力学的刺激を受容し生化学的シグナルへ変換するメカノセンシングは近年急速に解析が進んでいる領域である。メカノセンサーの一つである転写共役因子 Yes-associated protein (YAP) は、核内移行することで細胞増殖関連遺伝子の発現を亢進させ、細胞増殖を誘導する。中耳陰圧による鼓膜陥凹のメカノセンシングにおいて L1 cell adhesion molecule、Integrin-linked protein kinase、YAP を介した上皮と間質の相互作用の重要性が示唆された。また、動物実験において KGF のパラクライン作用単体で鼓膜陥凹が誘導されることが観察された。

中耳真珠腫発症後の病態増悪期では、これまで報告されている①炎症や細菌感染で誘導されるサイトカインネットワークによる上皮細胞および線維芽細胞の過剰増殖に加え、新たに②エピジェネティクス変化 ③p63 発現による部分的上皮-間葉転換 (partial Epithelial-Mesenchymal Transition: p-EMT) による基底細胞乳頭状増殖が示唆された。エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列を変化させることなく、細胞内外の環境に応じてゲノムの高次構造を変化させ、転写を調節するシステムである。加齢、環境、ストレスなどに影響され、その異常はさまざまな疾病と関わる。我々は、転写活性化と関係のあるヒストン修飾の変化をヒト中耳真珠腫検体で明らかにした。更に

中耳真珠腫増殖起点について p-EMT の観点から解析を行なった。p-EMT は上皮細胞が細胞間接着を部分的に失い、遊走能を得るために変化するプロセスである。後天性真珠腫検体における EMT マーカー (N-cadherin)、細胞間接着マーカー (E-cadherin, claudin1, claudin4, occludin)、遊走能マーカー (Snail) の解析結果より、中耳真珠腫上皮細胞の増殖への p-EMT 関与が示唆された。

### 3. 抗体療法

中耳真珠腫の構成細胞として新しく p75 陽性神経堤由来細胞を同定できたため、p75 陽性神経堤由来細胞をターゲットとする治療薬の開発目的で中耳真珠腫動物モデルを用い投与実験を行った。細胞死を誘導するサポリンを抗 p75 抗体に付加した mu-p75-SAP を経外耳道的に局所投与した結果、KGF 誘導性中耳真珠腫が消失した。中耳炎病態において、p75 シグナルを制御することが、中耳真珠腫の増殖を減少させ、治療標的となりうると考えられた。

### 4. エピジェネティクス薬

新たにエピジェネティクス変化が病因の一端を担っていることが明らかにされたことから、培養細胞と中耳真珠腫動物モデルを用い、エピジェネティクス制御化合物 MI503 の投与実験を行った。結果、MI503 投与により *in vitro* 実験では DNA 合成期の細胞数が減少する傾向を認め、*in vivo* 実験では中耳真珠腫幹/前駆細胞 (p63 陽性上皮細胞) の減少と鼓膜組織の正常化を認めた。今後の中耳真珠腫の根治療法への臨床応用が期待される。

## さらなる発展を目指して (大学発ベンチャー企業の設立)

得られた研究成果の実用化や製品の開発には、資金調達、知財戦略、PMDA 相談、事業開発、業務提携、承認準備など様々な課題があり、社会実装するためには企業力は不可欠で、大学と企業とのシームレスな連携が必要となるが、実際に実用化に至るケースはごく一握りという現状である。大学の最先端研究を持続するためには、企業と有利な契約条件を結ぶこと、研究成果の利益を大学に還元させることが重要で、そこで、我々は研究者自らが中心となって、企業と交渉し、事業開発を進めていくという大学発ベンチャー「株式会社 ReeNT」を設立した。大学発ベンチャーを成功させ、事業で生まれた利益を大学に還元するサイクルを整備し、最先端の研究開発を持続可能にするエコシステム作りを目指していく。

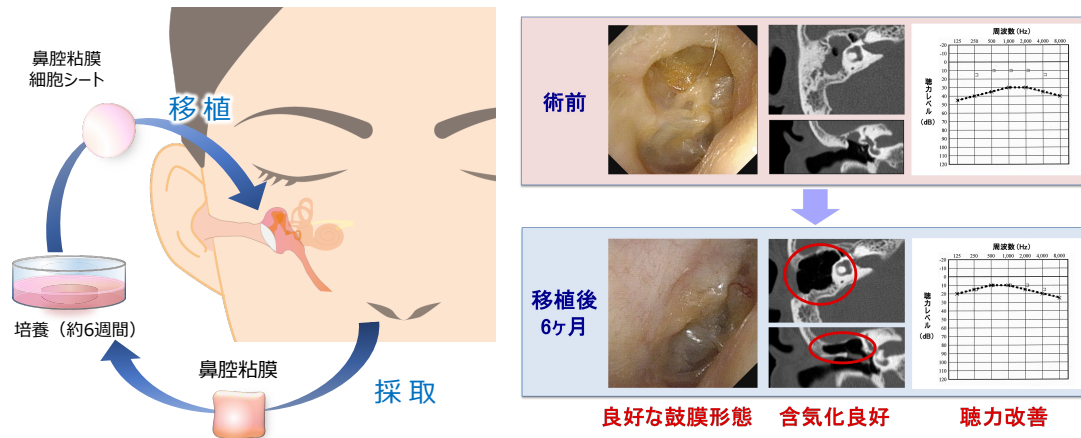
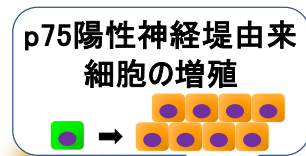


図 1. 真珠腫に対する細胞シートを用いた中耳粘膜再生治療

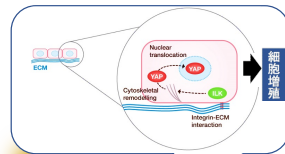
あらかじめ外来で真珠腫の患者の鼻粘膜を採取し、約 6 週間培養し作製した自己の細胞シートを手術の際に移植する。

Q1. 起源細胞は？



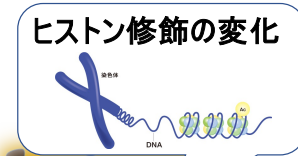
p75陽性神経堤由来細胞

Q2. 陰圧から陥凹へのメカニズムは？



メカノセンシング作用

Q3. 進展機序は？



エピジェネティクス

図 2. 真珠腫の成因と発症機序

新たに p75 陽性神経堤由来細胞の存在、鼓膜に対するメカノセンシング作用、エピジェネティクスの中でもヒストン修飾の変化が重要である。