

穉山直太郎 論文内容の要旨

In situ tissue engineering with synthetic self-assembling peptide nanofiber scaffolds, PuraMatrix, for mucosal regeneration in the rat middle ear

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

穉山直太郎
福田 智美
高橋 晴雄
小路 武彦

(International Journal of Nanomedicine 8 巻 1-12 (in press) 2013 年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員：高橋 晴雄教授)

緒 言

中耳手術では、削開乳突腔などにおいて粘膜の温存が困難であることが多く、術後形成鼓膜の再陥凹、癒着および再形成性真珠腫などが問題となる。削開乳突腔の含気を維持し、ガス産生能などの生理機能を回復するために手術方法において様々な工夫がなされているが未解決の部分も多い。自家細胞を用いた中耳粘膜組織の自家移植が確立されれば、将来的に中耳手術後の問題点を抜本的に解決することが期待できる。

われわれは将来的なヒトへの臨床応用を視野に入れ、移植部位の複雑な形状への対応、より生体環境に近い組織再生、移植方法の簡素化といった観点から組織再生の 3 要素である、細胞、足場、調節因子を移植し、生体内で組織再生を図る *in situ tissue engineering* に注目した。ペプチドハイドロゲル (PuraMatrix™, BD Bioscience, California, USA) は様々な細胞培養に対し、三次元のマイ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 C.E., *et al.* Differentiation 71: 262, 2003)。われわれは動物実験モデル (ラット) においてペプチドハイドロゲルを用いた中耳粘膜培養細胞の中耳粘膜障害モデルへの移植、中耳粘膜組織再生について、その有効性を検討した。

対象と方法

ドナー細胞に SD-TG ラット (グリーンラット) (♂, 4 週齢, 90~100 g, 10 匹)、レシピエントに SD ラット (♂, 6 週齢, 150~160 g, 14 匹) を用いた。初代培養は explant culture 法で行い、培地は DMEM:BEGM=1:1 の混成とし、添加因子としてヒドロコチゾン (0.5 µg/ml)、インスリン (5.0 µg/ml)、トランスフェリン (10 µg/ml)、トリヨードチロニン (6.5 ng/ml)、hEGF (0.5 ng/ml)、レチノイン酸 (0.1 ng/ml)、エピネフリン (0.5 µg/ml)、ゲンタマイシン/アンフォテリシン B (50 µg/ml)、BPE (50 µg/ml) を加えた。I 型コラーゲンでコーティングされた培養皿を用い、環境設定は 37 °C, 5% CO₂ とし、1 日おきに培地を交換し、第 3 代まで継代した細胞を移植に用いた。培養細胞は免疫組織学的に解析し、上皮系のマーカーとして抗 **pancytokeratin** 抗体、間葉系のマーカーとして抗 **vimentin** 抗体を用いた。レシピエントには中耳骨胞の粘膜を可及的に除去した中耳粘膜障害モデルを作製し、ハイドロゲルに培養細胞と培地を加え、 0.5×10^6 cells/ml (n=9)、 1.0×10^6 cells/ml (n=9) の 2 群に分けて同モデルに移植した。ハイドロゲルを用いずに培地に混ぜた培養細胞を移植したものをコントロールとして用いた (1.0×10^6 cells/ml (n=3))。移植後の免疫抑制は FK506 (0.32 mg/kg) (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) を使用し、術後 7 日目、14 日目、28 日目で移植後の解析を行った。ドナーであるグリーンラット由来の蛍光 (enhanced green fluorescence protein (EGFP)) をトレーサーとし、再生中耳粘膜組織の構成細胞の起源を明らかにした。また、免疫組織学的解析には培養細胞と同様に上皮系のマーカーとして抗 **pancytokeratin** 抗体、間葉系のマーカーとして抗 **vimentin** 抗体を用い、組織リモデリングのマーカーとして抗 **collagen typeIII** 抗体、基底膜のマーカーとして抗 **collagen typeIV** 抗体、上皮間接着の評価に細胞間接着分子のマーカーとして抗 **E-cadherin** 抗体を用いて評価した。また、中耳粘膜上皮の機能評価としてムチン産生の確認に PAS 染色を用いた。さらに再生上皮の形態学的評価として走査型顕微鏡および透過型顕微鏡を用いた評価も行った。

結 果

グリーンラット由来の中耳粘膜上皮培養細胞は、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)、免疫組織学的にも **pancytokeratin** 陽性且つ **vimentin** 陰性で上皮系の細胞であることが確認できた。 0.5×10^6 cells/ml で移植した群では生着率が 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した細胞の生着が確認されなかった。再生組織の解析ではトレーサーとして用いた EGFP 陽性部位が免疫組織学的に **pancytokeratin** 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 typeIII** 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 日目には **collagen typeIV** 陽性部位が移植細胞直下に認められ、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。また、機能解析では PAS 染色で陽性部位が確認され、中耳粘膜の機能を有していることが示唆された。

考 察

ラット中耳粘膜上皮細胞を無血清培地で培養し、ラット中耳粘膜障害モデルへの移植実験を行った。組織再生の方法として *in situ* tissue engineering に注目し、足場としてペプチドハイドロゲルを用い、その有用性が示唆された。