

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

2020年 2月 3日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団  
会 長 藤 洋 作 様

所属部局・研究科 医学研究科 耳鼻咽喉科頭頸部外科学

職 名・学 年 特別研究学生

氏 名 多田 剛志

|            |  |                |
|------------|--|----------------|
| 助成の種類      | <b>令和元年度 ・ 国際研究集会発表助成</b>  |                |
| 研究集会名      | 第43回米国耳鼻咽喉科研究会議  |                |
| 発表形式       | <input type="checkbox"/> 招待 ・ <input type="checkbox"/> 口頭 ・ <input checked="" type="checkbox"/> ポスター ・ <input type="checkbox"/> その他( )           |                |
| 発表題目       | Generation of Multi-ciliated Airway Cell Sheet Derived from Pluripotent Stem Cells for Middle Ear Regeneration on Temperature-responsive Polymer |                |
| 開催場所       | サンノゼ(アメリカ合衆国)  |                |
| 渡航期間       | 2020年 1月 23日 ~ 2020年 1月 31日  |                |
| 成果の概要      | タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )              |                |
| 会計報告       | 交付を受けた助成金額   | 20万円           |
|            | 使用した助成金額   | 20万円           |
|            | 返納すべき助成金額  | 0円             |
|            | 助成金の使途内訳   | 交通費(飛行機): 13万円 |
|            |  | 宿泊費: 7万円       |
| 当財団の助成について | (今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 特にございませぬ。   |                |

## 成果の概要/多田 剛志

### 【学会の概要】

貴財団に採択された令和元年度 海外発表研究集会発表助成を利用し、令和2年1月25日から1月29日までにアメリカ合衆国・カリフォルニア州・サンノゼで開催された第34回米国耳鼻咽喉科研究学会冬季集会に参加させて頂いた。本年度の演題登録は1328件（内口演数 232件、ポスター1096件）であり、耳鼻咽喉科関連の国際研究集会の中でも世界最大規模の学術会議です。

### 【発表内容】

私は Generation of Multi-ciliated Airway Cell Sheets Derived from Pluripotent Stem Cells for Middle Ear Regeneration Using Temperature-responsive Polymer という演題名でポスター発表を行った。

中耳粘膜は気道上皮組織に大別され、受動的なガス交換を有する。この生理機能の喪失は中耳炎による繰り返す炎症や手術によって障害され、真珠腫性中耳炎の再発を含めた中耳炎術後合併症の潜在的なリスクであるとされる。我々の研究グループでは過去に鼻粘膜細胞から作成した上皮細胞シートを中耳内に移植し、術後早期に中耳粘膜再生を促す方法を報告した。この鼻粘膜細胞シートを用いた試みはこれまでに家兎モデルでの基礎研究のみならず、ヒト臨床試験においても良好な成績を確認している。一方で、患者本人からの鼻粘膜の切除を必要とする点に改善の余地があると考え。そこで組織採取の際の患者負担をより低くするための試みとして、現在我々は鼻腔粘膜の代替として多能性幹細胞から誘導した気道上皮を用いた移植治療の可能性を探る研究に取り組んでおり、今回の発表においては *in vitro* における移植組織作成方法について発表した。

移植組織を作成するためには、*in vitro* で目的の組織を誘導した後、上皮シートの構造を保持して回収することが必要である。一般に温度応答性培養機器は、表面に固定化された温度応答性高分子の構造を、温度変化に応じて変形させることで、組織構造や機能を保持したまま、表面で培養した組織を回収することができる。iPS細胞から気道上皮細胞を作成するためには段階的な分化誘導が必要であり、42日目からは細胞培養インサート上で14日間の Air-liquid interface culture を行うことにより線毛細胞を含む気道上皮細胞を作成するプロトコルが2014年に小西らによって報告されている。我々はこの温度応答性ポリマーの足場上でiPS細胞から気道上皮細胞の分化誘導を行い、既報告されたPET culture insert と上皮細胞における線毛細胞の誘導効率を比較した。また免疫蛍光染色と電子顕微鏡を用いて形態について比較した。

免疫蛍光染色では E-cadherin 抗体と Acetyl-tubulin 抗体両陽性の線毛細胞を温度応答性インサート群と PET インサート群の両群において観察できた。線毛細胞の誘導効率には実

験ごとのばらつきが見られたが、毎回 PET insert 群の方が温度応答性インサート群に比べて誘導効率が高い傾向があった。走査型電子顕微鏡においては、両群で頂端部に線毛様構造を持つ細胞が観察された。透過型電子顕微鏡(TEM)で線毛に特異的な「9+2」と呼ばれる構造を観察でき、どちらのカルチャーインサート内で誘導された細胞も線毛上皮細胞であることが確認された。結論として、温度応答性インサートは目的細胞 (hiPSC-MCACs) の分化誘導を行うことが可能な足場であった。しかし、PET インサート上での誘導効率の方が比較的安定していた。過去の報告では同じ気道上皮細胞を別の足場材料に変更して分化誘導した際に、同様の誘導効率低下が比較されており、足場素材の細胞接着性や表面構造の影響が考えられた。今後の課題として、免疫不全動物を用いた移植実験を予定する。

本学会の特徴としてポスター発表での議論が非常に活発であることが挙げられ、米国のみならず世界各国から参加した研究者との討論を十分な時間をもって行うことができた。他のポスター演題では多能性幹細胞を用いた再生医療を目指す研究や中耳の音伝達機構の解析や新規デバイスの開発、一次線毛不全症候群の病態モデル解析などが印象的であった。講演ではアデノウィルスベクターによる遺伝子治療や R N A-Seq を用いた網羅的解析に関する内耳領域の演題が多く、当該研究領域への関心の高まりを感じた。またポスター会場や会食において日本からアメリカ留学中の研究者とも交流し、研究環境や現地で生活する上で苦労した点や順応するための工夫など留学についての多岐に渡る話を聞くことができた。

#### 【謝辞】

今回の国際学会への参加、研究成果の発表は研究者としてのキャリアを考える上で、大変貴重な経験となりました。このような機会を与えて下さった公益財団法人京都大学研究振興財団の皆様には、この場をかりて厚く御礼申し上げます。