

平成 30 年 8 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10813

研究課題名(和文) 癒痕声帯における筋線維芽細胞の解析とその活性調節による声帯癒痕化抑制

研究課題名(英文) Potential treatment for vocal fold scar with pirfenidone.

研究代表者

熊井 良彦 (Kumai, Yoshihiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授

研究者番号：00555774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症に対して薬事承認されている抗線維化薬ピルフェニドンに適応拡大できないかまずすでに確立したフェレットの癒痕声帯を用いて検証した。結果はコラーゲン収縮アッセイによりピルフェニドンの濃度依存性にコラーゲンの収縮抑制が認められ、In vitroにおいて本薬剤が癒痕声帯形成抑制に働く可能性が示唆された。また免疫染色結果によりピルフェニドンはTGF- $\beta$ の下流域に存在する転写因子であるp-SMAD2/3の核内移行を阻害することで癒痕形成抑制に働いている可能性も示唆される結果となった。ピルフェニドンの癒痕声帯に対する適応拡大の可能性がIn vitro実験により示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pirfenidone(PFD) treatment significantly ( $P < .05$ ) decreased mRNA expression of collagen type I, significantly increased mRNA expression of TGF- $\beta$ 1 and HAS2, and significantly suppressed collagen gel contraction. However, it did not have a significant effect on the expression of SMA. The expression of p-Smad2/3 in the nucleus was faded with PFD, possibly demonstrating the suppression of translocation of p-Smad2/3 from cytoplasm to nucleus with PFD. In conclusion, this is the first report to demonstrate the in vitro antifibrotic effects of PFD on fibroblasts isolated from scarred VF of ferrets.

研究分野：喉頭基礎

キーワード：癒痕声帯 抗線維化薬 ピルフェニドン 動物モデル フェレット 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### 研究の学術的背景

#### 癒痕声帯の病態、現在の治療法および着想に至った経緯

声帯粘膜固有層に含まれるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等の細胞外マトリックスの量のバランスが、声帯の粘弾性に大きく影響を及ぼすことはよく知られている。癒痕声帯では、これらのバランスが著しく崩れ、発声障害がもたらされる。現段階では、癒痕組織に対する抗炎症作用を期待したステロイドの局所注入、粘弾性に富む物質の癒痕声帯への注入、癒痕組織の増生を抑制することを期待した特定の成長因子の局所投与などが試みられているが(Laryngoscope 2003, Ann Otol Rhinol Laryngol 2004.) その有効性には賛否両論があり治療法は確立されていない。申請者は、癒痕声帯への脂肪幹細胞の治療応用を目指して、脂肪幹細胞が抗線維化作用を有するかを検証するために、ヒト声帯と組織学的構造が似通っているフェレットの癒痕声帯のIn Vitroモデルを確立し癒痕組織と脂肪幹細胞の相互作用を検証した。フェレットの腹部脂肪から分離培養した脂肪幹細胞を、フェレットの癒痕声帯より分離培養した線維芽細胞と共培養して解析し、脂肪幹細胞より分泌される肝細胞増殖因子により筋線維芽細胞の細胞増殖率および総コラーゲンの産生量が抑制されること(抗線維化作用)を明らかにし報告した[Kumai et al. Laryngoscope. 2009, 2010]。一方倫理的および技術的な側面から幹細胞の早期臨床応用は現実的に困難であるのも事実である。そこで我々は早期に臨床応用可能という観点から、他領域の線維化疾患に対して有効であることがすでに実証され、さらに臨床試験をクリアし線維化病変、特に近年特発性肺線維症に対する有効な薬剤(2008年国内認可取得)ピルフェニドンが開発されたことに着目した。

#### ピルフェニドンの学術的および臨床応用の背景

ピルフェニドンは特発性肺線維症に対する抗線維化作用を有した治療薬として1999年に臨床応用され、日本においても同疾患に対する治療薬として2008年に薬事承認された。動物実験では肺線維症モデルのみならず、腎線維症、肝硬変、心筋梗塞、皮膚熱傷など各領域の線維化疾患モデルに対して、In vitroおよびIn vivoの実験系でその有効性が証明されている。これらの研究を総合すると、ピルフェニドンは組織の線維化過程に関連した様々な成長因子やサイトカイン(TGF- $\beta$ , PDGF, SDF-1a/CXCL12, TNF- $\alpha$ など)の動態に影響して組織の線維芽細胞の増殖および、細胞外マトリックスの産生を抑制することで抗線維化作用を発揮し、最終的に各臓器の線維化病変の軽減と機能改善をもたらすことが明らかになっている。(Eur Respir Rev 2011; 20: 85-97)

#### ピルフェニドンの癒痕声帯治療への応用(吸入および注入)

ピルフェニドンの吸入治療については、肺線維症に対するラットでの基礎実験で経口投与よりも少量で局所での薬剤濃度が有効域に達するという報告があり吸入治療での局所への効果が期待できる。(Pharm Res 2013) 粒子径が10 $\mu$ m以上では気管内への薬剤到達量が減少するため(Br J Clin Pharmacol. 2003) 気管への薬物吸入を避け、喉頭への薬物到達量を増加させるには粒子径10 $\mu$ m程度に調整することが必要と考えられる。

本研究は以下の2点において独創的であると考える

1) フェレット癒痕声帯から分離培養した筋線維芽細胞を用いること、ピルフェニドンの癒痕声帯へ抗線維化作用が明らかとなり、癒痕声帯に対する新たな治療法としての可能性を明らかにすること。

2) ピルフェニドンはすでに薬事承認されている治療薬であり、組織移行性もよく、全身投与での副作用も少ない。同時に吸入治療であるため、臨床応用にあたって煩雑な手技は不要であり癒痕声帯に対する全く新たな治療法として即応用可能であること。

#### 2. 研究の目的

1) フェレットの声帯を顕微鏡下に電気凝固して作成したフェレット癒痕声帯モデル(図1))を用いて癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞について以下の ~ を検討する。

線維化を促進する成長因子である TGF

1の発現量、

声帯の粘弾性に重要な細胞外マトリックスであるコラーゲンおよびヒアルロン酸の産生能、

筋線維芽細胞の特異的マーカーである smooth-muscle actin (図2))の発現量

2) 次に、ピルフェニドンが上記 ~ にもどのように影響するかを定量的に評価する。

3) 上記のフェレット癒痕声帯モデルで、同薬剤の吸入実験によりフェレット癒痕声帯に対する吸入実験を行い、摘出喉頭の組織学的検証により細胞外マトリックスの変化を指標にその効果を評価する。

以上の3点を本研究の目的とした。

具体的には

1) フェレットの癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞に対して各種濃度のピルフェニドンを添加し、

線維促進作用を有する TGF 1

細胞外マトリックスとしてのコラーゲンおよびヒアルロン酸

筋線維芽細胞(SF)の細胞マーカーである smooth-muscle actin

の産生量、発現量を ELISA および免疫染色にて計測する。また細胞毒性についても検証する。

2)上記1)の癭痕声帯を作製後4週間後より、動物用に作製された吸入器を用いて4週間、12週間に渡って週5日、1日2回ピルフェニドンを吸入させる。その後安楽死させ摘出した喉頭の冠状断切片を作製し、無処置側と比較したときの癭痕声帯における

維化促進作用を有するTGF- $\beta$ 1  
細胞外マトリックスとしてのコラーゲンおよびヒアルロン酸

筋線維芽細胞の細胞マーカーであるsmooth-muscle actinの産生量、発現量を免疫組織学的に検証する。

### 3. 研究の方法 In vitro study

#### 第一段階 声帯の観察と癭痕声帯の作成

21-23週令のオスフェレット2頭を使用する。

1. フェレットをキシラジンとケタミンの筋肉注射により麻酔下にする。
2. 次に所定の手術台に仰臥位に寝かせ固定する。
3. フェレット用に改良した長鼻鏡を用いて喉頭展開を行い顕微鏡下に声帯を観察し病変がないことを確認する。
4. 右声帯膜様部全長を電気メスで電気凝固する。

以上の処置を行なった後4週間待機する。

#### 第二段階 癭痕声帯の観察

第一段階に記述した手順でフェレットを麻酔し、癭痕声帯が作製されたことを確認する。

#### 第三段階 癭痕声帯より筋線維芽細胞の分離

1. 麻酔の過量投与にてフェレットを安楽死させる。
2. 頸部を切開し喉頭を速やかに摘出し冷温下に耳鼻科研究室まで輸送する。
3. 清潔操作にて右声帯の声帯癭痕組織を分離し、筋線維芽細胞を培養する。(2頭からそれぞれより計2 cell lineを作製する)
- 対側の正常左声帯より正常の声帯線維芽細胞を培養しコントロールとする。
4. 培養した細胞(癭痕筋線維芽細胞、正常線維芽細胞)に各種濃度(0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/ml)のピルフェニドンを添加し(24, 48, 72)時間待機した後、以下の項目について定量的に比較検討を行う。

コラーゲン : 転写活性(realtime PCR)、細胞外マトリックス分泌量(Dye binding method)

ヒアルロン酸 : 細胞外マトリックス分泌量(ELISA)

筋線維芽細胞の細胞マーカーであるsmooth-muscle actin(SMA)

: 転写活性(realtime PCR)、細胞免疫染色  
線維化促進作用を有するTGF- $\beta$ 1

: 転写活性(realtime PCR)、細胞外マトリックス内分泌量(ELISA)

癭痕収縮抑制作用 : コラーゲンゲル収縮アッセイ

#### 第一段階 癭痕声帯作成

21-23週令オスフェレット20頭を使用する。

1. 前述の方法で麻酔をかけ喉頭展開し、声帯に病変がないことを確認する。

2. 前述と同様に電気メスを用いて右声帯に癭痕を作成する。

#### 第二段階 ピルフェニドン吸入

癭痕作成したフェレットをピルフェニドン投与群(生理食塩水に溶解したピルフェニドン(実質量10mg)を吸入)とピルフェニドン非投与群(生理食塩水のみ吸入)に分け、4週間および12週間、週5日(1日2回)吸入させる。

吸入方法 : 右図のように吸入器のホースを特注のケージに接続し、

ケージ内にフェレットをいれ薬剤を含む蒸気を吸入させる。

#### 第三段階 ピルフェニドンの吸入前後での声帯振動の変化の定性的検討

処置後4週、12週後に、フェレットを安楽死させ摘出喉頭を用いて声帯振動を観察する。

また、正常の声帯粘膜波動の観察のため25週令、33週令オスフェレットのそれぞれ3頭を安楽死させ喉頭を摘出し声帯振動を観察する。

#### 声帯振動観察方法 :

摘出喉頭声門下より湿潤させた空気を注入し、声帯を振動させて声帯粘膜波動を記録する。

記録には音声に同期させたストロボ光を用いて粘膜波動を詳細に記録する。

記録した声帯粘膜波動について正常喉頭のコントロールと合わせて、【左右声帯振動の1】振幅、【2】対称性、【3】声門間隙の程度の変化について数名のストロボ所見解析に習熟した耳鼻咽喉科医、言語聴覚士により定性的評価を行う。

#### 第三段階 摘出喉頭の組織学的検討

1. ストロボ光での観察のあと、摘出喉頭を凍結保存する。

2. 摘出喉頭の冠状断薄切片を作製し、

コラーゲン : 免疫染色(type1, type3)、Elastica-van-Gieson 染色

ヒアルロン酸 : Alcian-blue 染色

SMA : 免疫染色

TGF- $\beta$ 1 : 免疫染色

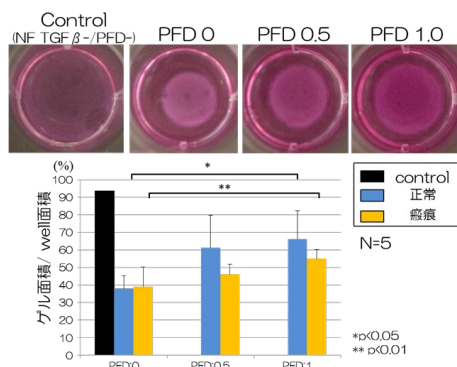
## HE 染色

の声帯粘膜固有層について、投与群と非投与群で組織学的に比較検証する。

## 4. 研究成果

In vitro の研究は上記記載の通りに行って以下の結果を得たが In vivo に関しては吸入実験の実施の困難さを理由にまず可能な注入実験を上記方法に記載した通りの実験設定で行い現在データを解析中でありこちらも論文として報告する予定である。さらにその前段階としてフェレットの癒痕声帯に薬剤を注入する動物モデルの妥当性を他の動物モデルと比較検討する実験を前段階として行いその成果は論文として報告した。いかに結果の要旨を記載する

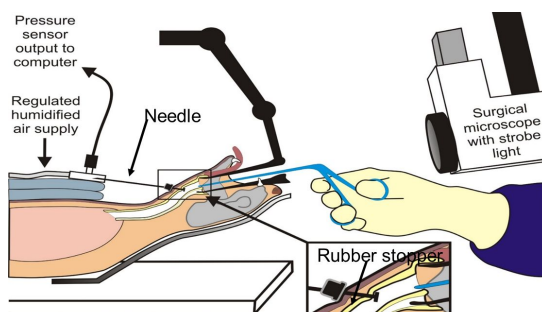
## In vitro



以上はコラーゲン収縮アッセイの結果であるが、ピルフェニドンの濃度依存性にコラーゲンの収縮抑制が認められ、In vitro において本薬剤が癒痕声帯形成抑制に働く可能性が示唆された

また免疫染色結果によりピルフェニドンは TGF-β の下流域に存在する転写因子である p-SMAD2/3 の核内移行を阻害することで癒痕形成抑制に働いている可能性も示唆される結果となった。

また In vivo の動物モデル、注入手技の検証は以下のようにサマライズされる設定にて結果が得られ、本薬剤を In vivo で検証するうえで妥当なモデルであることを確認できた。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kodama H, **Kumai Y**,\* Nishimoto K, Toya Y, Miyamaru S, Furushima S, Yumoto E. Potential treatment for vocal fold scar with pirfenidone. Laryngoscope. 128(5):E171-E177.(2018) 査読有り

Kodama H, **Kumai Y**,\* Nishimoto K, Toya Y, Miyamaru S, Furushima S, Yumoto E. The Ferret as a Surgical Model for Vocal Fold Scar Creation and Treatment. Ann Otol Rhinol Laryngol. 127(3):146-154(2018). 査読有り

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊井良彦 (Kumai Yoshihiko)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授  
研究者番号：00555774

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者 ( )