

令和元年5月13日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11229

研究課題名(和文) 脱細胞喉頭土台を用いた喉頭全摘後の喉頭再生に関する研究

研究課題名(英文) Basic research for developing laryngeal regeneration method using decellularized larynx

研究代表者

平野 滋 (Hirano, Shigeru)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10303827

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)：喉頭全摘後の喉頭再生を目的とし、脱細胞技術を用いた脱細胞喉頭土台の作成を試みた。まずラット喉頭を用いた脱細胞法としてSDSへの浸潤7日間で最も簡便かつ十分な脱細胞がえられた。声帯粘膜内の細胞は完全に消失、軟骨細胞は一部残存したものの、MHC class Iの発現は検出されず、細胞外マトリックスはよく維持され、喉頭移植に適した土台が得られた。次に脱細胞した喉頭土台を他のラットの腹部皮下、大網にそれぞれ移植し、生着度、拒絶反応の有無を確認したところ、脱細胞喉頭土台移植では炎症細胞は軽度で、異物反応はほぼ問題なかった。本研究において至適脱細胞喉頭土台が得られたが、この移植においてはまだ課題が残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喉頭全摘出は喉頭癌の治療の大きな柱であるが、術後に音声の喪失をきたし大きなハンディキャップをきたす。従来電気喉頭などの代用音声しかなく、また喉頭移植では免疫抑制剤の使用が問題となった。脱細胞した喉頭土台を用いた喉頭移植は、免疫抑制剤のいらぬ喉頭移植を可能とし、喉摘者にとっては音声再獲得のための大きな福音となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop the methodology to create decellularized larynx as transplantable material for laryngeal regeneration. It was confirmed that immersion of rat larynx in SDS for 7 days provided the most successful decellularization with preservation of extracellular matrix and elimination of cells. Although cells in the cartilages remained, MHC class I was not expressed, and remnant DNA were few. When the decellularized larynx was transplanted into the subcutaneous portion of the back and inside the omentum, the decellularized larynx survived well in the body with minimum rejection or inflammation. The current study achieved ideal methodology of decellularization of the larynx.

研究分野：喉頭の再生医療

キーワード：喉頭再生 脱細胞 喉頭移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

喉頭全摘術は進行喉頭癌、下咽頭癌、甲状腺癌などに対して行われ、音声喪失、永久気管孔の造設により QOL が低下、社会から隔絶される深刻な状況である。米国では 1960 年代から Ogura らが喉頭移植の動物実験を莫大な研究費をあげて行ったが、最初の臨床応用は 2001 年の Strome らまだ待たされ、さらにその後は潰れている。その理由の一つに免疫抑制剤の使用があり、本来生命維持装置でない喉頭の回復のためにリスクを冒す危険性が常に壁となってきた。2000 年代に入り、大型臓器の脱細胞技術が急速に発展し、細胞外マトリックスの鋳型を残したまま完全に脱細胞することが可能となった。喉頭領域においても脱細胞の試みが始められているが、まだ確立された技術にはいたっていない。本研究は、喉頭の脱細胞技術を確立し、将来的には免疫抑制剤の不要な喉頭移植を可能化しようとするものである。

#### 2. 研究の目的

本研究では、脱細胞した喉頭土台を作成し、免疫抑制剤の不要な喉頭移植を実現化することを目的とし、そのための基礎的研究を進める。

#### 3. 研究の方法

(1) 喉頭脱細胞の至適条件の検討：ラット喉頭を用いて化学的・酵素的脱細胞の至適条件と求める。SDS, RNAase, DNAase, Triton などによる脱細胞を試み、最も適した溶媒を同定する。還流が必要か、浸潤だけでいいのかを検討する。また、細胞外マトリックスが維持され、かつ細胞が完全に脱細胞されるのに要する薬液使用期間を明らかにする。

(2) 脱細胞した喉頭土台が生体に生着するかどうかを、拒絶反応が起きないかどうかを含め確認する。ラット脱細胞喉頭土台を背部、腹部皮下、大網にそれぞれ移植し、生着度、拒絶反応の有無を確認する。

(3) 脱細胞喉頭の移植実験：喉頭摘出後レシピエントに脱細胞喉頭土台を移植し、生着について検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 脱細胞法として SDS, RNAase, DNAase, Triton などによるラット喉頭の脱細胞を試みた。各溶液に 1, 3, 7 日間の浸潤、あるいは灌流法を用いて試みたところ、SDS への浸潤 7 日間で最も簡便かつ十分な脱細胞がえられた。灌流ではむしろ組織損傷が強く、浸潤によって声帯粘膜内の細胞は完全に消失、軟骨細胞は一部残存したものの、MHC class I の発現は検出されず、細胞外マトリックスはよく維持され、喉頭移植に適した土台が得られた。

(2) 脱細胞した喉頭土台を他のラットの腹部皮下、大網にそれぞれ移植し、生着度、拒絶反応の有無を確認した。非脱細胞喉頭の移植では炎症反応や膿瘍形成が多くで認められ、拒絶反応と考えられた。脱細胞喉頭土台移植では炎症細胞は最小限であり、異物反応はほぼ問題なかった。膿瘍形成も認められず、良好な生着をえた。

(3) 脱細胞喉頭移植をラットを用いて試みたが、脱細胞喉頭土台においては粘膜部分の強度が縫合、逢着に耐えられるほど十分でないことが判明した。脱細胞法を修正し試みるも、解決するには至らず、本研究において至適脱細胞喉頭土台が得られたが、この移植においてはまだ課題が残った。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Morisaki T, Kishimoto Y, Tateya I, Kawai Y, Suzuki R, Tsuji T, Hiwatashi N, Nakamura T, Omori K, Kitano H, Takeuchi H, Hirano S. Adipose-derived mesenchymal stromal cells prevented rat vocal fold scarring. Laryngoscope 2018;128: E33-E40

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Hirano S. Key note: Overview of tissue engineering and regenerative medicine of the vocal fold. 5th TERMIS World Congress, Kyoto, Sep 4-7, 2018.  
(2) Hirano S. Symposium: Cutting edge topics in phonosurgery. Regenerative medicine of the vocal fold. American Academy of Otolaryngology Head and Neck Surgery annual meeting, Atlanta, Oct 7-10, 2018 .

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：金丸 眞一

ローマ字氏名：Kanemaru, Shin-ichi

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：非常勤講師

研究者番号 (8 桁)：00271510

研究分担者氏名：中村 達雄

ローマ字氏名：Nakamura, Tatsuo

所属研究機関名：京都大学

部局名：ウイルス・再生医科学研究所

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：70227908

研究分担者氏名：岸本 曜  
ローマ字氏名：Kishimoto, Yo  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：医学研究科  
職名：特定病院助教  
研究者番号（8桁）：80700517

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。