

令和元年8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11230

研究課題名(和文) 声帯組織の維持・修復における上皮間葉転換の役割

研究課題名(英文) Role of epithelial-mesenchymal transition in maintenance and repair of vocal cord

研究代表者

北村 守正 (Kitamura, Morimasa)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：60543262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：K5Cre系統とCAG-td Tomato系統をかけた遺伝子組み換えマウスの実験において、上皮間葉移行細胞の存在を示すものとして、1) 粘膜固有層に存在、2) Tomato陽性の細胞、3) E-cadherin陰性、4) Vimentin陽性、をすべて満たすものとした。

遺伝子組み換えマウスの声帯損傷を行い、1、3、5、14日後に喉頭を採取し、粘膜固有層の細胞を免疫染色にて評価した。その結果、無傷の声帯及び損傷後1、3、5日後の声帯では上皮間葉移行細胞を認めなかったが、損傷14日後には5-6切片に1細胞の割合で上皮間葉移行細胞を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮間葉転換後も上皮由来の細胞が追跡できるトランスジェニックマウスを用いた声帯の研究は世界においても他に類を見ない研究であり、本実験で上皮由来細胞が声帯粘膜固有層に移行し間葉細胞へ分化していることが確認された。これは上皮由来幹細胞が多分化能を示す証拠となる。声帯創傷治療において重視されるべき治療ターゲットが明らかになり、声帯癒痕に対する治療戦略の確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Experiments were performed using transgenic mice in which the K5 Cre strain and the CAG-td Tomato strain were crossed. As a result, the presence of epithelial-mesenchymal transition cells was satisfied in all of 1) existence in the lamina propria of vocal cord, 2) positive Tomato, 3) negative E-cadherin, and 4) positive Vimentin.

The vocal cord injury of the transgenic mice was performed, and the larynx was extracted after 1, 3, 5 and 14 days. The cells of the lamina propria lamina were evaluated by immunostaining. As a result, there were no epithelial-mesenchymal transition cells in the intact vocal cords and vocal cords 1, 3 and 5 days after injury, but epithelial mesenchymal transition cells were recognized at a ratio of 1 cell in 5-6 sections after 14 days of injury.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：上皮間葉移行 声帯 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

声帯癬痕の治療と再生工学によるアプローチ

音声は非常に重要なコミュニケーションツールの一つであり、社会生活で担う役割は大きい。声帯癬痕は創傷治癒の過程で層構造が破綻することにより声帯振動の不全が生じ音声が悪化する病態で、多くの患者が苦しんでいる。しかし、癬痕化のメカニズムや病態に不明な点も多く、予防法・治療法は未だ確立されていない。声帯癬痕は音声障害における残された大きな課題の一つといえる(Hirano, 2005)。

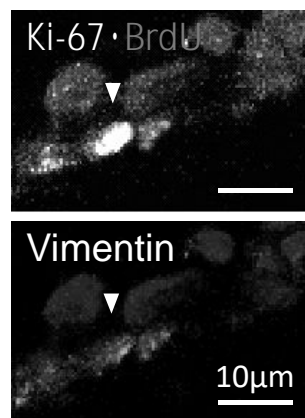
声帯癬痕に対しては、細胞、成長因子、足場を組み合わせたいわゆる組織工学的アプローチによる種々の再生治療が試みられており、一定の効果をあげているが、いまだ十分とは言えない。組織を再生するには、まずその組織の発生や維持のメカニズムを細胞レベル、あるいは分子レベルから理解することが重要であるが、声帯組織の発生・維持機構に関してはほとんどわかっていないのが現状である。

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transision: EMT)

上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) は、上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、初期胚発生における原腸陥入・神経提細胞の運動や器官形成過程における重要性が明らかとなっている。上皮間葉転換を起こした細胞では運動能、浸潤能の亢進が見られ、成人の組織では創傷治癒や細胞のがん化の他、肝硬変や気管支喘息での組織の線維化に与与することが知られている (Lamouille, et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2014)。声帯組織における上皮間葉転換の存在は未だ不明であるが、我々が行った先行研究では、声帯粘膜の基底層に分布するスローサイクリング細胞 (図1 矢頭) の一部が間葉系マーカーを発現することがわかっており、声帯組織においても上皮間葉転換が起こっている可能性を支持するものであった。(Kawai, et al. in preparation) 本研究の目的は声帯組織の維持や創傷治癒過程における上皮間葉転換の関与を明らかにすることにある。上皮間葉転換の直接的な証明には上皮細胞が間葉系細胞に分化していることを示す必要があるが、そのために Cre-LopP システムを用いてトランスジェニックマウス実験系を確立し、上皮由来の細胞を恒久的にラベルしてその運命・細胞系譜を追跡していく。

図 1

Ki67(+) BrdU(+)
= スローサイクリング細胞
Vimentin(+) = 間葉系



同一切片

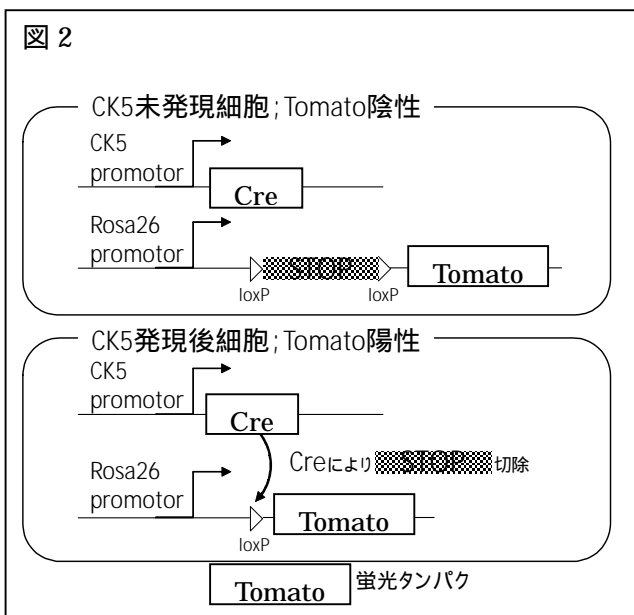
CK5-Cre トランスジェニックマウス

声帯粘膜を含む上皮基底層には CK5 遺伝子が発現している。

CK5-Cre トランスジェニックマウスでは、CK5 が発現した細胞で蛍光タンパクを産生するよう DNA の組み換えが起きる。この DNA 組み換えは非可逆的であり、一度蛍光タンパクを産生し始めると、その細胞が細胞分裂を起こした後の娘細胞でも常に蛍光タンパクが産生される (図 2)。

即ち、上皮基底層由来の細胞は蛍光タンパクを産生し、上皮間葉転換を起こした後も蛍光タンパクを産生しつづけるため、上皮基底層の上皮由来細胞を恒久的に追跡することが出来る。

図 2



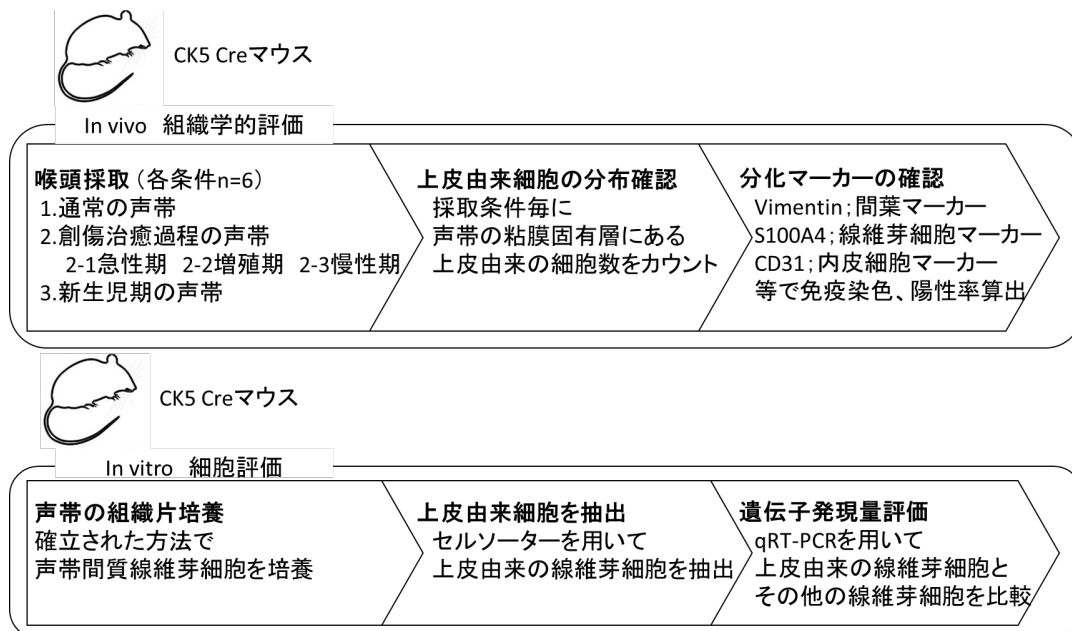
2. 研究の目的

声帯癒痕は現在においても有効な予防法・治療法が解明されていない臨床上の大きな課題である。近年、組織再生工学を用いた研究が行われているが、声帯組織の維持・修復機構について細胞・分子レベルでの研究は非常に限られている。上皮間葉転換は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象であり、創傷治癒や肝硬変等での線維化への関与が知られているが、声帯組織での関与については不明である。本研究の目的は、上皮由来の細胞を恒久的にラベル出来るトランスジェニックマウスを用い、声帯組織の維持・修復における上皮間葉転換の役割を明らかにすることにある。

3. 研究の方法

CK5-Cre トランスジェニックマウスの声帯を、コントロール状態、傷害後創傷治癒過程、胎生期に採取し、組織学的に上皮由来細胞の声帯内における分布を解析する。さらに間葉系細胞マーカー、内皮細胞マーカーの免疫染色で分化状態を確認する。

次にマウス声帯の組織片培養で得られた細胞に対しセルソーターを用いて、上皮由来の線維芽細胞を選択的に抽出する。上皮由来の線維芽細胞とそれ以外の線維芽細胞の遺伝子レベルでの違いを qRT-PCR にて解析し比較する。



- 1) 声帯創傷治癒モデルは Yamashita らが報告した方法で作成し、創傷治癒の急性期、増殖期、慢性期に喉頭を採取する。他に傷害しない喉頭と新生児期の喉頭も採取する。採取された喉頭の上皮由来細胞は蛍光タンパク (tdTomato) で標識されており、必要に応じて蛍光抗体を用いて tdTomato を強調しながら粘膜固有層に分布する上皮由来細胞をカウントする。上皮由来細胞の分布は通常声帯、創傷声帯、新生児期の声帯の条件間で比較検討する。さらに上皮由来の細胞が粘膜固有層で上皮以外の細胞に分化しているかの確認のため Vimentin, S100A4, CD31 といった間葉細胞、線維芽細胞のマーカーで染色を行う。
- 2) Thibeault らの方法に準じて声帯組織片の培養を行なう。同培養方法により粘膜固有層の線維芽細胞が選択的に培養できることが知られているが、このようにして得られた線維芽細胞の中から上皮由来の細胞を選択抽出するため、細胞数が十分に達したところでセルソーターにて蛍光タンパク陽性細胞を分離し抽出する。このようにして得られた上皮由来細胞を再度培養し、上皮由来の線維芽細胞群、それ以外の線維芽細胞群にわけて再度培養を行なう。
- 3) 上皮由来の線維芽細胞群、それ以外の線維芽細胞群から得られた mRNA を qRT-PCR にかけることで、細胞外基質産生能や成長因子産生能といった声帯の恒常性維持に重要な物質の産

生量を遺伝子レベルで解析する。

4. 研究成果

K5Cre系統とCAG-td Tomato系統をかけ合わせた遺伝子組み換えマウスにおいて、無傷害の声帯でのTomato陽性細胞の分布確認を行ったところ、Tomato陽性細胞は声帯粘膜上皮全層と喉頭腺に一致して確認されたが、声帯粘膜固有層には認めなかった。従って粘膜上皮細胞は全てその基底層細胞由来であることが確認できた。さらに上皮マーカーであるE-cadherin染色では声帯粘膜上皮全層と喉頭腺が染色され、間葉マーカーであるVimentin染色ではこれらの部位は染色されず粘膜固有層に陽性細胞を認めた。そこで、上皮間葉移行細胞の存在を示すものとして、1) 粘膜固有層に存在、2) Tomato陽性の細胞、3) E-cadherin陰性、4) Vimentin陽性、をすべて満たすものとした。

遺伝子組み換えマウスに対し内視鏡下に片側の声帯損傷を行ったところ、無傷の声帯及び損傷後1、3、5日目の声帯では上皮間葉移行細胞を認めなかったが、損傷後14日目には5-6切片に1細胞の割合で上皮間葉移行細胞を確認できた。

上皮間葉移行が生じる条件の一つに、粘膜上皮細胞同士の結合力が低下していることが必要であると仮定し、上皮バリアを形成する細胞間物質であるタイトジャンクションの機能検証を行った。実験方法として、ラット声帯を内視鏡下片側声帯損傷後、免疫化学染色並びにピオチントレーサーを用いた上皮バリア機能の評価を行った。創傷後3日目の時点では上皮が被覆しておらず、創傷後5日目にはタイトジャンクション関連タンパクであるオクルディンが上皮内に部分的に出現するものの、ピオチントレーサーは上皮を透過し粘膜固有層にまで浸透することが確認できた。一方、創傷後14日目にはオクルディンは無傷害の声帯に近い状態まで回復し、ピオチントレーサーも上皮を透過できず上皮バリア機能も修復されることが示唆された。

予定では声帯の慢性炎症モデルを作成することによって上皮間葉移行細胞の数を増加させ評価を行う方針であったが、炎症惹起物質の全身投与は目的外の臓器に対する有害事象が強く、通常の遅延した創傷治癒とは異なる経過をたどる可能性が高いこと、炎症を目的とした物質の局所投与はマウスにおいて手技が確立しておらず、安定した結果を得ることが困難であったことから中止した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suzuki R, Katsuno T, Kishimoto Y, Nakamura R, Mizuta M, Suehiro A, Yamashita M, Nakamura T, Tateya I, Omori K.: Process of tight junction recovery in the injured vocal fold epithelium: Morphological and paracellular permeability analysis. Laryngoscope. 2018 Apr;128(4): E150-E156. DOI:10.1002/lary.26959.

〔学会発表〕(計 1 件)

Suzuki R, Katsuno T, Kishimoto Y, Mizuta M, Suehiro A, Yamashita M, Tateya I, Omori K.: Localization of tight junction protein claudin subtypes in the vocal fold epithelium. The 139th American Laryngological Association. 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：大森 孝一

ローマ字氏名：Koichi Omori

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10233272

研究分担者氏名：平野 滋

ローマ字氏名：Shigeru Hirano

所属研究機関名：京都府立医科大学大学院医学研究科

部局名：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10303827

研究分担者氏名：楯谷 一郎

ローマ字氏名：Ichiro Tateya

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20526363

研究分担者氏名：岸本 曜

ローマ字氏名：Yo Kishimoto

所属研究機関名：京都大学大学院医学研究科

部局名：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

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：椛島 健治

ローマ字氏名：Kenji Kabashima

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。