

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11381

研究課題名(和文) 喉頭気管領域での組織線維化過程におけるマクロファージの役割の解明

研究課題名(英文) Role of macrophages during fibrogenesis in upper airway organs

研究代表者

岸本 曜 (Kishimoto, Yo)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：80700517

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)：マウス声帯の物理的損傷後のマクロファージの発現を検討した。正常声帯では粘膜固有層浅層に組織常在マクロファージを認めたが、損傷後は徐々に増加し3日目に最多となり、粘膜固有層全層に分布した。損傷後初期にはiNOS陽性マクロファージ(M1-like)が、正常声帯および損傷後後期ではCD206陽性マクロファージ(M2-like)がそれぞれ優位であることが確認された。さらに、線維化に関わるTGF- β 1とArginase1の発現は損傷後3日目に増加していた。声帯損傷後にマクロファージの分化誘導効果を有するPPAR α アゴニストを経口投与し線維化抑制を試みたが、線維化軽減効果は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症や外傷後に生じる声帯の線維化病変は難治性の音声障害をきたすため、患者にとって精神的にも社会的にも大きなハンディキャップとなるが、確立された治療法はなかった。本研究により、声帯の線維化過程においてマクロファージは比較的早期に関与している可能性が示唆された。これまでは線維芽細胞が治療法開発のターゲットとされてきたが、今後、マクロファージをターゲットとした治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The distributions, phenotypes of macrophages during the wound healing process of the murine vocal fold were investigated. In the naive vocal fold, the majority of F4/80 positive macrophages reside at the superficial layer of the lamina propria and they were positive for CD206. In the injured vocal fold, F4/80-positive iNOS-positive cells increased at post-operative day 3, and then gradually decreased. As for F4/80-positive CD206-positive cells, they didn't exhibit any significant changes during the process. Further, unregulated expression of TGF- β 1 and Arginase1 was observed at post-operative day 3. In order to alter the phenotypes of macrophages during the wound healing of the vocal fold, PPAR α agonist was administered trans orally after the vocal fold injury. However, no significant reduction of fibrotic changes were confirmed.

研究分野：喉頭科学

キーワード：声帯 線維化 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発声の際には呼吸を駆動力として声帯粘膜が振動し喉頭原音が生じるが、悪性腫瘍の治療に伴う切除、外傷、炎症性疾患などでは声帯粘膜の線維化からその物性が変化し、振動障害をきたす。結果、音声は弱く嚙れたものとなり、コミュニケーションツールとしても働きは大きく損なわれ、患者のQOL (Quality of Life) を著しく低下させる。

これまで、この喉頭の線維化病変に対して様々な外科治療が試みられてきたが、組織変化の是正は得られず、根本的な治療とは成り得なかった。また、組織工学に基づいたアプローチでの組織再生も試みられており、そのターゲットとなっているのが、細胞外基質産生の元となっている線維芽細胞である。喉頭領域では過去約20年、線維芽細胞の動態を明らかにし、コントロールすることが試みられてきたが、炎症制御、癒着化のメカニズムに関しては未だ不明のことが多く、喉頭の線維化病変の予防法もしくは治療法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的はマクロファージをターゲットとした組織修復コントロール方法の開発を目指し、喉頭の組織修復におけるマクロファージの働きを明らかにすることである。

3. 研究の方法

8-12週齢のC57BL/6マウスを用い、正常声帯および損傷声帯(損傷後1、3、5、7、14日目)におけるF4/80、CD206、iNOS発現細胞の分布を経時的に評価した。声帯損傷モデルは喉頭鏡挿入下に特製の手術器具を用いて声帯粘膜を損傷することにより作製した。また、損傷前、損傷後3、7、14日目に採取した声帯粘膜から抽出したtotal RNAを用いEmr1(マクロファージマーカー)、CD86(M1マクロファージマーカー)、Mrc1(M2マクロファージマーカー)、TNF、NOS2(炎症性サイトカイン)、IL10(抗炎症性サイトカイン)、TGF-1、Arginase1(線維化因子)の遺伝子発現の経時的な変化を評価した。

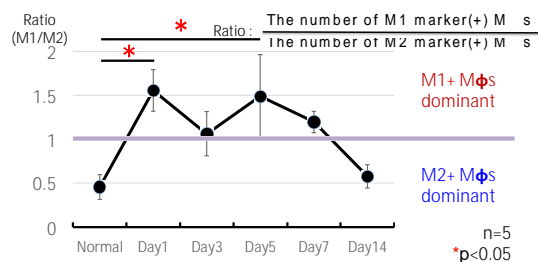
8-10週齢のオスC57BL/6マウスを用い、声帯損傷後にM1-likeマクロファージからM2-likeマクロファージへの分化誘導効果を有すると報告されているPPAR-αアゴニスト(ピオグリタゾン)を投与し、声帯線維化に与える効果を検証した。

4. 研究成果

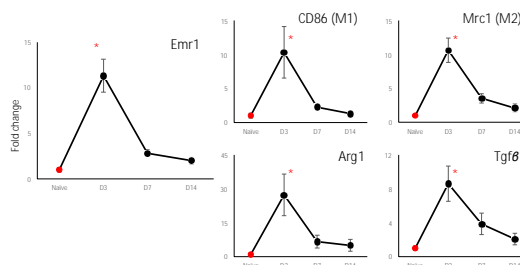
正常声帯ではF4/80陽性細胞(組織常在マクロファージ)は声帯粘膜固有層浅層に存在し、その多くはCD206陽性であった。声帯物理的損傷モデルでは、iNOS陽性F4/80陽性細胞は、損傷後1、3日目に増加しそこから徐々に減少した。これに対してCD206陽性F4/80陽性細胞は、傷害後3日目にわずかに増加したのみであった。また、F4/80陽性細胞の内、iNOS陽性細胞の割合は傷害後1日目から増加し、この傾向は7日目まで続いた。その後、損傷後14日目にはCD206陽性細胞が大半を占めるようになった。正常声帯、損傷声帯のいずれにおいても、F4/80陽性細胞の内、iNOS陽性細胞とCD206陽性細胞は明確に区別できるものではなく、その両者を発現する細胞が多数存在した。以上より、マウス声帯におけるマクロファージの表現型が損傷後経時的に変化することが確認され、損傷後初期にはiNOS陽性マクロファージ(M1-like)が、正常声帯および傷害後後期ではCD206陽性マクロファージ(M2-like)がそれぞれ優位であることが明らかとなった。

一方Emr1、CD86、Mrc1およびTGF-1、Arginase1は損傷後3日目に発現が亢進したが、TNF、NOS2、IL10の発現に関しては有意な変動を認めなかった。

Changes in polarization



Gene expression in injured VF



マクロファージは損傷後早期に創傷治癒に影響することが予想された。
声帯損傷後 PPAR α アゴニストの経口投与を行い、3 および 14 日目に声帯粘膜を採取した。
声帯粘膜から抽出した total RNA を用い、線維化マーカー、筋線維芽細胞マーカー、M2 マ
クロファージマーカーの遺伝子発現を評価したところ、いずれの遺伝子においても有意な
差を認めず、損傷後 3 日目、14 日目の声帯において PPAR α アゴニスト経口投与による線
維化軽減効果はないことが確認された。PPAR α アゴニストの経口投与では声帯における
PPAR α 活性は期待できないと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kishimoto Yo, Yamashita Masaru, Wei Alice, Toya Yutaka, Ye Shuyun, Kendziorski Christina, Welham Nathan V.	4. 巻 16
2. 論文標題 Reversal of Vocal Fold Mucosal Fibrosis Using siRNA against the Collagen-Specific Chaperone Serpinh1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 616 ~ 625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kaba Shinji, Nakamura Ryosuke, Yamashita Masaru, Katsuno Tatsuya, Suzuki Ryo, Tateya Ichiro, Kishimoto Yo, Omori Koichi	4. 巻 4
2. 論文標題 Alterations in macrophage polarization in injured murine vocal folds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E135-E142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.27523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawai Yoshitaka, Kishimoto Yo, Sogami Tohru, Suzuki Ryo, Tsuji Takuya, Hiwatashi Nao, Tateya Ichiro, Kanemaru Shin-Ichi, Nakamura Tatsuo, Omori Koichi, Hirano Shigeru	4. 巻 129
2. 論文標題 Characterization of aged rat vocal fold fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E94 ~ E101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.27464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsuji Takuya, Nakamura Ryosuke, Katsuno Tatsuya, Kishimoto Yo, Suehiro Atsushi, Yamashita Masaru, Uozumi Ryuji, Nakamura Tatsuo, Tateya Ichiro, Omori Koichi	4. 巻 19
2. 論文標題 Long-term preservation of planar cell polarity in reversed tracheal epithelium	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Research	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-018-0726-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Mami, Tsuji Takuya, Kishimoto Yo, Sugiyama Yoichiro, Nakamura Tatsuo, Hirano Shigeru	4. 巻 32
2. 論文標題 Regenerative Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on Restoration of Thyroarytenoid Muscle Atrophy Caused by Recurrent Laryngeal Nerve Transection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Voice	6. 最初と最後の頁 645 ~ 651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvoice.2017.09.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaneko Mami, Hitomi Takefumi, Takekawa Takashi, Tsuji Takuya, Kishimoto Yo, Hirano Shigeru	4. 巻 32
2. 論文標題 Effects of Voice Therapy on Laryngeal Motor Units During Phonation in Chronic Superior Laryngeal Nerve Paresis Dysphonia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Voice	6. 最初と最後の頁 729 ~ 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvoice.2017.08.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Ryo, Katsuno Tatsuya, Kishimoto Yo, Nakamura Ryosuke, Mizuta Masanobu, Suehiro Atsushi, Yamashita Masaru, Nakamura Tatsuo, Tateya Ichiro, Omori Koichi	4. 巻 128
2. 論文標題 Process of tight junction recovery in the injured vocal fold epithelium: Morphological and paracellular permeability analysis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E150 ~ E156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hirano Shigeru, Kawamoto Atsuhiko, Tateya Ichiro, Mizuta Masanobu, Kishimoto Yo, Hiwatashi Nao, Kawai Yoshitaka, Tsuji Takuya, Suzuki Ryo, Kaneko Mami, Naito Yasushi, Kagimura Tatsuo, Nakamura Tatsuo, Kanemaru Shin-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 A phase I/II exploratory clinical trial for intracordal injection of recombinant hepatocyte growth factor for vocal fold scar and sulcus	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 1031 ~ 1038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morisaki Tsuyoshi, Kishimoto Yo, Tateya Ichiro, Kawai Yoshitaka, Suzuki Ryo, Tsuji Takuya, Hiwatashi Nao, Nakamura Tatsuo, Omori Koichi, Kitano Hiroya, Takeuchi Hiromi, Hirano Shigeru	4. 巻 128
2. 論文標題 Adipose-derived mesenchymal stromal cells prevented rat vocal fold scarring	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E33 ~ E40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26855	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki Ryo, Kawai Yoshitaka, Tsuji Takuya, Hiwatashi Nao, Kishimoto Yo, Tateya Ichiro, Nakamura Tatsuo, Hirano Shigeru	4. 巻 127
2. 論文標題 Prevention of vocal fold scarring by local application of basic fibroblast growth factor in a rat vocal fold injury model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E67 ~ E74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Toshiki, Mizuta Masanobu, Hiwatashi Nao, Kishimoto Yo, Nakamura Tatsuo, Kanemaru Shin-ichi, Hirano Shigeru	4. 巻 44
2. 論文標題 Drug delivery system of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel for restoration of acute vocal fold scar	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 86 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.anl.2016.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Yo Kishimoto, Shinji Kaba, Nathan V Welham
2. 発表標題 The role of macrophages during vocal fold wound healing in mice
3. 学会等名 15th biennial phonosurgery symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Kaba, Ryosuke Nakamura, Yo Kishimoto, Ryo Suzuki, Tatsuya Katsuno, Masaru Yamashita, Ichiro Tateya, Koichi Omori
2. 発表標題 Alteration of macrophage polarization in the injured murine vocal fold
3. 学会等名 98th Annual Meeting of American Broncho-Esophagological Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Kaba
2. 発表標題 Alteration of macrophage polarization in the injured murine vocal fold
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 YO KISHIMOTO, SHINJI KABA, NATHAN V. WELHAM
2. 発表標題 MACROPHAGES IN THE VOCAL FOLD
3. 学会等名 The 13th International Conference on Advances in Quantitative Laryngology, Voice and Speech Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	大森 孝一	京都大学・医学研究科・教授	
	(Omori Koichi)		
	(10233272)	(14301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	楯谷 一郎 (Tateya Ichiro) (20526363)	藤田医科大学・医学研究科・教授 (33916)	
研究分担者	北村 守正 (Kitamura Morimasa) (60543262)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	山下 勝 (Yamashita Masaru) (10635519)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	岡野 高之 (Okano Takayuki) (60642931)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	末廣 篤 (Suehiro Atsushi) (00738247)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	水田 匡信 (Mizuta Masanobu) (20777875)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	