

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16909

研究課題名(和文) 声帯組織の維持における声帯上皮防御機構の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of vocal fold epithelial barrier function

研究代表者

水田 匡信 (Mizuta, Masanobu)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20777875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：声帯上皮の防御機構を解明することは声帯病変発生予防のために重要であり、その解明の足掛かりとするため声帯上皮培養モデルの確立を行った。

本研究でラットから培養された声帯上皮は多層構造を有しており、上皮の防御機構において重要なタイトジャンクションの構成分子が培養上皮の細胞間に発現していることが確認された。さらに防御機能のひとつの指標となる電気抵抗値を培養上皮で測定したところ、電気抵抗値は高値であった。また培養上皮をペプシンに暴露させたところ、一時的に培養上皮の電気抵抗値は低下し、その後速やかに回復することが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

音声障害の原因となる声帯疾患の発生には、声帯上皮の防御機構の破綻が関与すると考えられる。このため音声障害の予防のためには声帯上皮の防御機構を維持することが重要であるが、今まで有用な声帯上皮の培養システムが確立されていなかったため声帯防御機構の研究は進んでいなかった。本研究において上皮としての防御機能を有する声帯上皮をラットから培養するシステムおよび実験系が確立されたことにより、今後声帯上皮の防御機構の解明が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The characteristics and function of vocal fold epithelial cells remains unclear because of the lack of in vitro experiments. In this study, we established the culture methods of the epithelial cells of rat vocal folds to establish an in vitro experimental model. The toluidine blue staining showed multi-layered epithelial structure of the cultured epithelial cell layer and immunohistochemistry revealed the expression of occludin and ZO-1 in the cultured cells. Transepithelial electrical resistance (TER) was measured for the evaluation of epithelial barrier function. Results revealed more than 1000 ohms x cm<sup>2</sup> of TER on day 4, passage 1. After exposing the cultured cell layer to acidic-pepsin, TER values promptly decreased and recovered to the baseline within 24 hours.

研究分野：喉頭

キーワード：声帯 上皮細胞 培養 バリア機能

## 1. 研究開始当初の背景

最も使用頻度の高いコミュニケーション手段である音声の障害は、精神的ストレスはもとより、職業や社会的地位の喪失につながり、QOLを低下させる。音声障害の多くは声帯粘膜の振動障害が原因であり、その声帯振動においては上皮下の粘膜固有層が重要な役割を担うため、これまでの喉頭研究は粘膜固有層の研究を中心に行われてきた。

しかしながら、疾病予防という観点では最初に物理的刺激を受ける声帯上皮がもっとも重要と考えられる。声帯の粘膜に生じる病変としては、声帯ポリープ、声帯結節、ラインケ浮腫などの頻度が高く、これらの危険因子として声の乱用、喫煙、胃酸逆流などがあげられ、粘膜内の病変もまずは上皮層への傷害が先行すると考えられる。発声時には左右の声帯上皮は毎秒100回以上もの衝突を繰り返しており、長時間発声後に声帯上皮の傷害が生じることを我々は動物実験にて確認した(Kojimaら、2014)。また胃酸による声帯上皮のバリア機能の低下も報告されており(Ericksonら、2010)声帯上皮での物理的・化学的傷害が声帯病変の発生に関与することが徐々に明らかとなってきた。

上皮の細胞群は互いに細胞間結合でつなぎ合わされており、特にタイトジャンクションは上皮バリア機構において中心的な役割を担う。タイトジャンクションにより外界からの病原微生物や化学物質の上皮下への侵入が防がれ、上皮下組織の恒常性が維持される。声帯上皮に関する今までの研究では、外部からの刺激により上皮が傷害されることが証明されているのみであり、上皮のバリア機構自体の傷害・修復のメカニズムや、上皮障害が粘膜振動に及ぼす影響などは未だ明らかにされていない。

声帯上皮の研究が不十分な要因のひとつが、声帯上皮培養モデル、*in vitro* 実験系が確立されていなかったことである。重曹扁平上皮である声帯上皮の培養の報告は少なく、既報の培養声帯上皮モデルにおいても上皮として重要なバリア機能の確認は行われていなかった。その状況下で、我々は先行研究にてウサギ声帯上皮細胞の抽出・培養に成功した。その培養上皮は、2-3層の構造を有し上皮細胞間にタイトジャンクションの構成蛋白であるoccludinやZO-1が発現していた(図1)。さらに培養上皮の電気抵抗値を測定すると、経時的な上昇を認め、上皮としてのバリア機能が確認された(図2)。しかしながら、抗体などの汎用性や使用可能な動物個体数において有利なラットやマウスでの声帯上皮培養モデルおよび*in vitro* 実験系の確立が、今後の研究の推進のためには不可欠と考えられた。

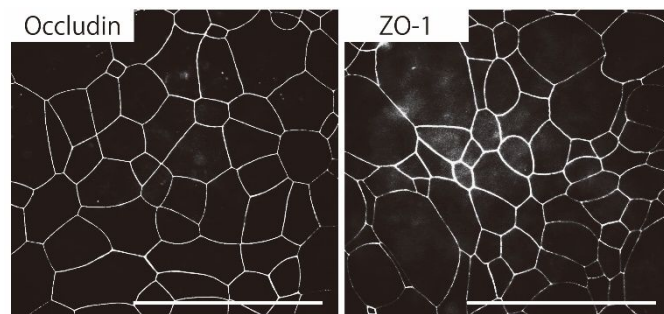


図1：培養声帯上皮の細胞間結合(ウサギ)

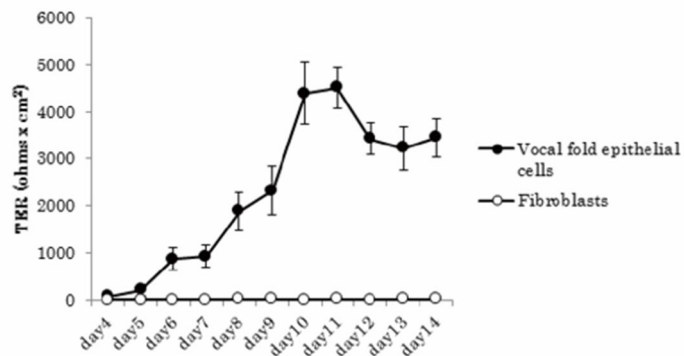


図2：培養声帯上皮(ウサギ)の電気抵抗値(TER)の経時的変化

## 2. 研究の目的

声帯上皮のバリア機構を解析するため、ラットを用いた声帯上皮培養モデルおよび*in vitro* 実験系を確立することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

Sprague-Dawley ラットの喉頭を摘出し、粘膜固有層の接着分子を除去するため1時間酵素に浸透させた。その後顕微鏡下に声帯の上皮層を摘出し、トリプシン EDTA 溶液で処理することで分離した声帯上皮細胞を採取した。これをコラーゲンコートしたプレート上でフィーダー細胞と共培養させた。7~9日間培養した後に継代をおこない、継代後は声帯上皮細胞をコラーゲンコートしたカルチャーインサート上で培養した(図3)。継代後7~12日間培養した時点でトルイジンブルー染色や電子顕微鏡による組織検査および上皮間結合に関する分子の免疫組織化学

染色をおこなった。また培養された声帯上皮のバリア機能を評価するため、epithelial volt-ohmmeter (EVOM2、World Precision Instruments、Sarasota、FL)を用いて、培養上皮の電気抵抗値 (Transepithelial electrical resistance: TER)を測定した (図4)。さらに、バリア機能の修復過程を観察するため、ペプシンを培養声帯上皮に5分間投与することでバリア機能を傷害させ、TERを経時的に測定することでバリア機能の回復過程の観察を試みた。またペプシン暴露後の上皮細胞の生存率 (cell viability) および細胞密度を解析した。

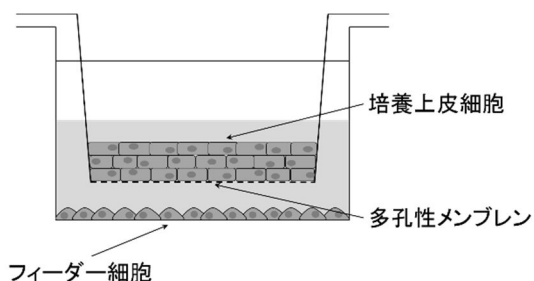


図3：多孔性メンブレン上での上皮細胞培養

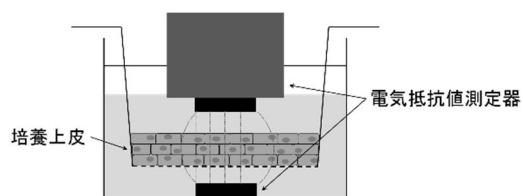


図4：培養上皮の電気抵抗値測定

#### 4. 研究成果

初代培養開始から7~9日後に上皮細胞は80-90%コンフルエントに達した。さらに第1継代後9日間培養の上皮は多層構造を成していることが確認された (図5)。またタイトジャンクションの構成蛋白であるZO-1やoccludinを用いた免疫染色でタイトジャンクションの発現や重層化構造を観察することができた (図6)。

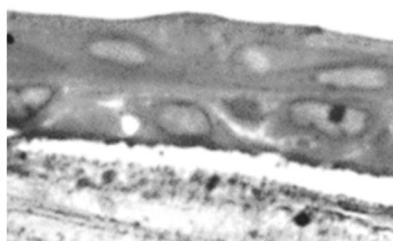


図5：培養ラット声帯上皮の多層構造

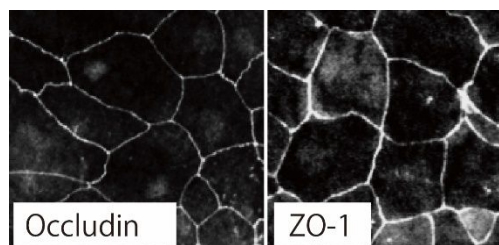


図6：培養声帯上皮の細胞間結合 (ラット)

さらに培養声帯上皮のバリア機能を評価するためTERを測定したところ、第1継代後4日目にはTERは $500 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度にまで上昇し、5日目には $1000 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}^2$ 以上に達した (図7)。これらの結果から防御機構の中心的な役割を担うとされるタイトジャンクションの成熟により透過性が低下し、TERが上昇したと考えられた。またこの培養システムで培養された声帯上皮は上皮としてのバリア機能を有し、in vitro実験系として利用できると考えられた。

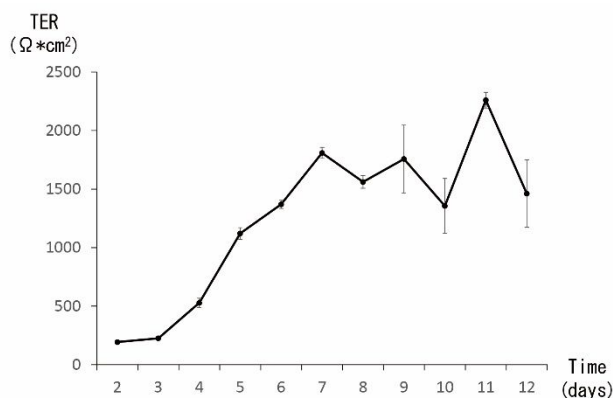


図7：培養声帯上皮 (ラット) の電気抵抗値 (TER) の経時的変化

そこで次の実験として、ペプシンによる声帯上皮バリア機能の損傷とその後の修復の過程の評価を試みた。pH4、2 mg/ml のペプシンにより培養声帯上皮の表面を5分間傷害した後の上皮のバリア機能の修復を観察した。ペプシンへの暴露により培養声帯上皮のTERは低下し、その後、時間経過とともにTERは改善し1日以内で元の数値まで改善した。一方で、傷害後に死細胞の有意な増加はなく、細胞密度も低下がみられなかった。このことから、ペプシンへの暴露により、細胞死に至るほどの大きな傷害はなかったものの、タイトジャンクションが緩み透過性が亢進した可能性が考えられた。そのタイトジャンクションは即座に修復され、バリア機能は回復することが観察された。これらの結果は、今回確立した声帯上皮培養システムが *in vitro* 実験系として有用であることを示唆するものであった。

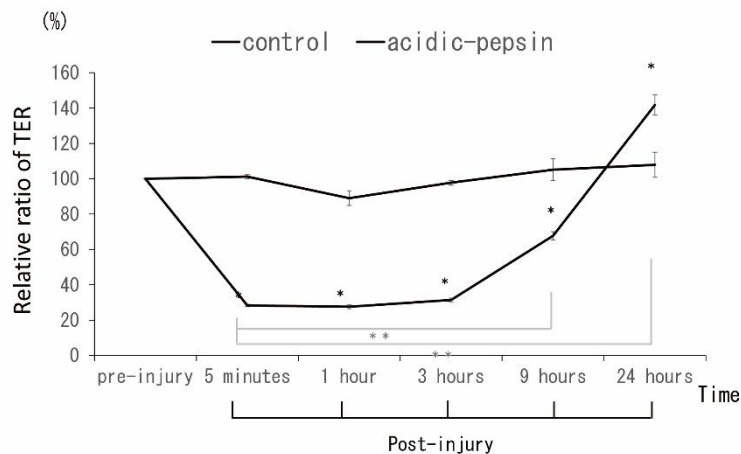


図8：ペプシン暴露後の培養声帯上皮の電気抵抗値（TER）の経時的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 1件）

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 2018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 該当する
1. 著者名 Mizuta M, Kurita T, Dillon NP, Kimball EE, Garrett CG, Sivasankar MP, Webster RJ 3rd, Rousseau B	4. 巻 127
2. 論文標題 In vivo measurement of vocal fold surface resistance	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E364-E370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26715	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 該当する
1. 著者名 Mizuta M, Kurita T, Kimball EE, Rousseau B	4. 巻 49
2. 論文標題 Structurally and functionally characterized in vitro model of rabbit vocal fold epithelium	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Tissue Cell	6. 最初と最後の頁 427-434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tice.2017.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Pitman MJ, Kurita T, Powell ME, Kimball EE, Mizuta M, Chang S, Garrett CG, Rousseau B	4. 巻 128
2. 論文標題 Vibratory function and healing outcomes after small intestinal submucosa biomaterial implantation for chronic vocal fold scar	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 901-908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.26883	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 該当する

1. 著者名 Rousseau B, Kojima T, Novaleski CK, Kimball EE, Valenzuela CV, Mizuta M, Daniero JJ, Garrett CG, Sivasankar MP	4. 巻 204
2. 論文標題 Recovery of Vocal Fold Epithelium after Acute Phonotrauma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cells Tissues Organs	6. 最初と最後の頁 93-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000472251	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 該当する

1. 著者名 Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Kobayashi T, Kawai Y, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J, Kawai K, Suzuki S	4. 巻 11
2. 論文標題 The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Tissue Eng Regen Med	6. 最初と最後の頁 1598-1609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/term.2060	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Yo Kishimoto, Shinji Kaba, Masanobu Mizuta, Atsushi Suehiro, Masaru Yamashita, Ichiro Tateya, Koichi Omori
2. 発表標題 Distribution of the tight junction proteins occluding, ZO-1, and claudins in the laryngeal glands.
3. 学会等名 第119回日本耳鼻咽喉科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木良、岸本曜、樋渡直、水田匡信、末廣篤、楯谷一郎、大森孝一
2. 発表標題 塩酸ペプシン塗布によるラット声帯上皮バリアへの影響
3. 学会等名 第31回日本喉頭科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水田匡信, 土師知行, 佐藤進一, 玉木久信
2. 発表標題 声帯上皮バリア機能評価の試み
3. 学会等名 第43回日本耳鼻咽喉科学会中国地方部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 水田匡信, 楯谷一郎, 大森孝一
2. 発表標題 in vivo環境での声帯上皮バリア機能評価の試み
3. 学会等名 第29回日本喉頭科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ryo Suzuki, Yo Kishimoto, Tatsuya Katsuno, Ryosuke Nakamura, Yoshitaka Kawai, Masanobu Mizuta, Ichiro Tateya, Koichi Omori
2. 発表標題 Recovery process of TJ-based functional barriers in injured vocal fold epithelium
3. 学会等名 The 138th Annual Meeting of the American Laryngological Association (国際学会)
4. 発表年 2017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
研究協力者	楯谷 一郎  (Tateya Ichiro)		

## 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
研究協力者	北村 守正 (Kitamura Morimasa)		
研究協力者	岸本 曜 (Kishimoto Yo)		
研究協力者	末廣 篤 (Suehiro Atsushi)		
研究協力者	児嶋 圭介 (Kojima Keisuke)		
研究協力者	勝野 達也 (Katsuno Tatsuya)		
研究協力者	鈴木 良 (Suzuki Ryo)		