

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17957

研究課題名(和文) 声帯におけるビタミンAの分布と動態

研究課題名(英文) Distribution and Dynamics of Vitamin A in Vocal Fold

研究代表者

西本 康兵(Nishimoto, Kohei)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：60535590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラットを用いて経口的にビタミンAを投与し、その体内動態および声帯を含む各臓器への分布を調べた。ビタミンAとして、アルコール型ビタミンAの輸送タンパクであるRBP(retinol binding protein)と結合しない性質をもつ レチノールを投与した。経口的に投与された ビタミンAは3時間で血中に出現し、エステル型ビタミンAとして声帯を含む種々の臓器に分布され、声帯で貯蔵されたビタミンAはその他の臓器と比較して素早く代謝されていることが判明した。また、ビタミンAの貯蔵細胞である声帯星型細胞において輸送タンパクを含む各種のビタミンA関連タンパクは全て発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

喉頭領域のビタミンAの動態や レチノールの投与効果に関する報告は過去にない点、すでに製品化されたビタミンA製剤を用いることで即臨床応用が可能となる点から、本研究は独創的である。本研究によりビタミンAの声帯への輸送機序が一部解明された。声帯癒痕については現在治療法はないが、ビタミンA過剰状態にすることで、声帯星型細胞のビタミンA貯蔵量の増加とともに活性化・線維素産生の抑制・遅延が起こり、癒痕形成の予防効果が認められると予想される。

研究成果の概要(英文)：Orally dosed vitamin A (VA) peaked at 3 h in circulating serum and was distributed to multiple organs including the vocal fold mucosa. chylomicron-mediated VA transport can be measured via detection of α -retinol, a VA isomer that cannot bind to RBP and therefore cannot be released from hepatic storage. Compared with the other organs assayed, vocal fold mucosa appears to be a rapid metabolizer of VA. Combined, our tracing and immunohistochemistry data suggest that vocal fold stellate cells can uptake chylomicron-trafficked α -retinyl ester, then convert it to α -retinol followed by α -retinoic acid.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：声帯星型細胞 ビタミンA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

声帯粘膜はコラーゲンやグリコサミノグリカンなどの細胞外基質に富み、その粘弾性が正常発声に不可欠である。声の酷使や頸頭部への放射線治療、外傷により声帯に炎症をきたすと、細胞外基質の不可逆的な線維化を起し癒痕を形成する。声帯癒痕による発声障害・嗄声は、米国において約 2800 万人の QOL と収入の低下をきたしていると報告されているが、声帯における癒痕形成の機序は十分に解明されておらず、予防法や治療法は確立していない。そのため、喉頭領域で現在世界的に最も活発な研究テーマとなっている。

臓器の線維化において、最も重要な役割を果たすのがビタミン A(レチノール)を貯蔵する星型細胞である。全身の 50-80%のビタミン A を貯蔵する肝臓において、外傷や炎症により星型細胞は活性化し、細胞質内のビタミン A を喪失し、筋線維芽細胞様に変化することで線維素などの細胞外基質を産生し臓器の癒痕をきたすと報告されている。声帯粘膜の前後端にある黄斑にも星型細胞は存在しており、他臓器と同様に癒痕形成に寄与していると考えられている。

ビタミン A は星型細胞の活性化や組織修復の調整因子と考えられており、肝臓においてはビタミン A の抗線維化効果がすでに確認されている。声帯においても、全身麻酔下にウサギの声帯を損傷すると同時にレチノイン酸(ビタミン A の代謝物質)含有ゲルを留置することで、コラーゲン蓄積の軽減など癒痕形成が抑制されたことが報告されている。ビタミン A の投与は声帯癒痕に対する臨床応用可能な治療法として期待されるが、全身麻酔による治療が必要であり、また、すでに癒痕化した声帯への効果は不明である。臨床応用には内服などの全身投与が望ましいが、ビタミン A が声帯星型細胞にどの程度取り込まれるか、また、その輸送機序についても不明である。

ビタミン A の声帯星型細胞への輸送機序や動態を解明するため、今回ビタミン A の一種である α レチノールに着目した。 α レチノールは通常のビタミン A と同様、脂質と共に腸から吸収され、声帯や肝臓の星型細胞に運ばれ貯蔵・代謝される。しかし、通常のビタミン A と異なり血中のビタミン A 輸送蛋白に結合できないため、肝臓に一旦蓄えられた α レチノールは声帯など肝臓外の組織に移動しない。

2. 研究の目的

経口投与したビタミン A がどの割合で各臓器(声帯、肝臓、腎臓など)に分布するか、小動物を用いて検討する。 α レチノールをラットに経口投与し、声帯内に検出される α レチノール濃度を測定することで、経口投与したビタミン A がどの程度声帯星型細胞に取り込まれるかを解明する。

3. 研究の方法

α レチノール(エステル型) 2mg を綿実油に溶かし、ラット 130 匹に投与する。投与前～投与後 72 時間の間の 9 つのタイムポイントで、全身麻酔下(イソフルレン吸入)に 10 匹ずつ伏在静脈から採血する。また、投与後 7 および 72 時間後にそれぞれ 65 匹を安楽死処置する。各臓器(喉頭、肝臓、腎臓、肺、脾臓)を摘出し、喉頭は実体顕微鏡下に解剖し黄斑を含む声帯粘膜を採取する。ラットの声帯は小さく、前実験では 1 回の分析にラット 10 匹分の声帯を必要とした。65 匹のうち 60 匹分の声帯を 6 つのチューブに分け、ビタミン A 定量のため冷凍保存する。5 匹は組織学的評価のため喉頭のまま OCT コンパウンド中に冷凍保存する。残りの臓器についても同様に保存する。

対照群では綿実油のみを 30 匹に投与し、7 および 72 時間後に 10 匹ずつ血液および臓器をビタミン A 定量用に、5 匹ずつ組織学的評価用に処理する。

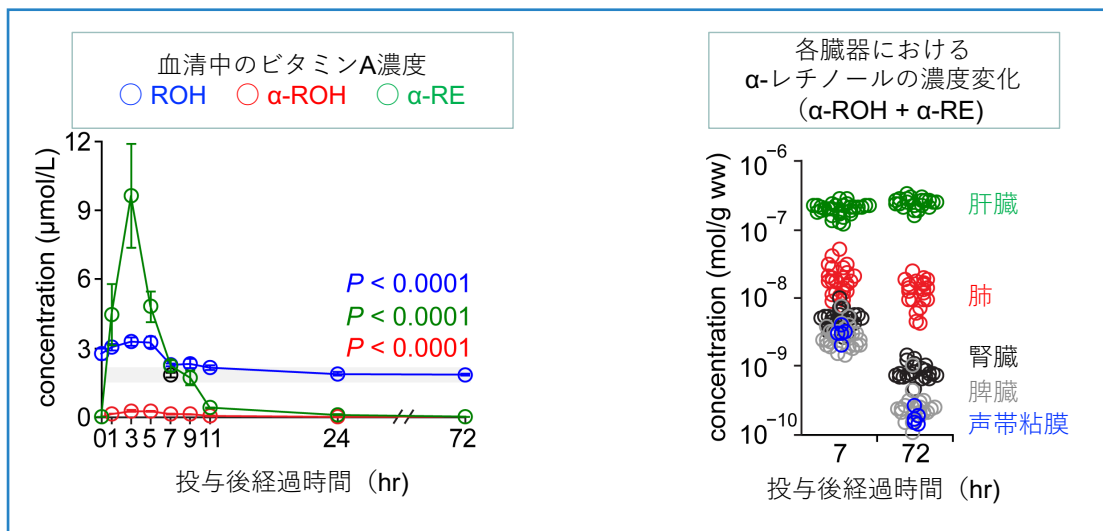
血清および各臓器からウイスコンシン大学にて以前から行っている方法でビタミン A を抽出し、高速液体クロマトグラフィーで分画および量を定量する。組織は破砕した後に、血清はエタノールで希釈後にヘキサンを加えビタミン A を抽出する。乾燥後、メタノール-ジクロロエタンに溶解し、クロマトグラフィーで解析する。あらかじめサンプルには標準試料として β -apo-carotenol を添加しておく。325nm の UV 光で励起された波形を標準試料から得られた検量線に照らし合わせ、各種ビタミン A (α -ROH: アルコール型 α レチノール、 α -RE: エステル型 α レチノールエステル) の濃度を計算する。

ビタミン A に関連する細胞、受容体や酵素として、以下のものに着目した。免疫染色でこれらの蛋白が声帯や肝臓においてどのような局在か、星型細胞との関係について評価する。

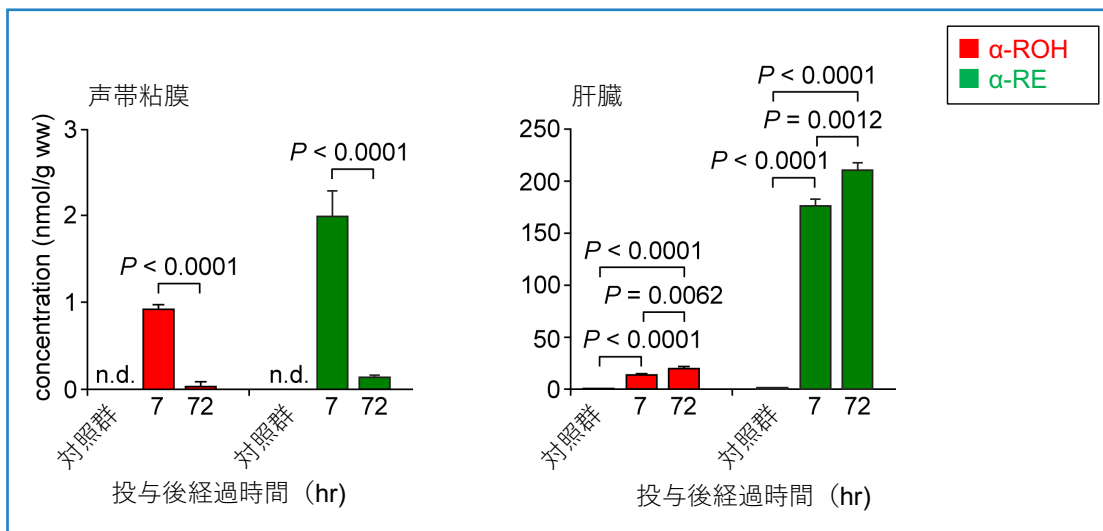
- ・ GFAP : 星型細胞のマーカー
- ・ Stimulated by retinoic acid 6 (STRA6) :
肝臓に貯蔵後、血中に放出されたビタミン A とビタミン A 輸送蛋白の複合物に対する受容体。
- ・ Cellular Retinol Binding Protein 1 (CRBP1) : 細胞内でのビタミン A 輸送蛋白
- ・ リポ蛋白リパーゼ :

食餌中の脂質やリポ蛋白質が各臓器に取り込まれるように修飾する。脂質に含まれるビタミン A に特異的な受容体は確認されていないため、本研究ではリポ蛋白リパーゼを評価する。

4. 研究成果



α -レチノールの経口投与後3時間で血中濃度はピークとなり、11時間にかけて平衡相となり、24時間で血中から消失した。肝臓では投与後7、72時間で高濃度を維持していた。次いで肺、腎臓、脾臓、声帯粘膜の順に濃度は高かったが、いずれも7から72時間にかけて低下した。



声帯粘膜では投与後7時間で濃度は最大値であったが、その時点で α -RE から α -ROH への変換により α -ROH が検出された。72時間の時点でいずれもほぼ完全に代謝され消失した。肝臓では通常のビタミンAと同様、貯蔵型の α -RE となり、7~72時間かけて貯蔵する

免疫染色では声帯星型細胞が

リポ蛋白リパーゼ (経口摂取された脂質-カイロミクロンを吸収するため修飾)、
レチノール結合タンパクの受容体 (肝臓から輸送された ROH を取り込む)、
レチノイン酸受容体 (生物活性をもつ RA を核に取り込む)
を持つことを確認した。

以上の結果から、声帯星型細胞では

腸管から吸収したエステル型、肝臓から輸送されたアルコール型のビタミンA双方を取り込み、7時間以内にエステル型からアルコール型に変換したのちに、他臓器と比較し素早く代謝する (レチノイン酸を核内に取り込む) こと、投与したビタミンAは3時間で血中濃度が最大値になることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西本康兵
2. 発表標題 ラットにおける経口投与したビタミンAの体内動態と声帯への分布
3. 学会等名 第70回日本気管食道科学会・学術講演会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----