

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K09326
研究課題名(和文) 幹細胞からの声帯線維芽細胞への分化誘導と再生医療への応用

研究課題名(英文) Differentiation of vocal fold fibroblast from stem cell

研究代表者
斉藤 敦志 (Saito, Atsushi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：80573633
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪由来間葉系細胞ASCからの声帯線維芽細胞への分化を目指し、ASCに各種増殖因子を投与することで分化誘導能を検討した。その結果、結合組織増殖因子CTGFを添加することにより声帯線維芽細胞への分化を誘導することができた。さらにこの誘導細胞を用いてラット声帯癒痕の再生効果を動物実験で検証したところ、誘導細胞による再生効果は乏しいことがわかり、ASCをそのまま使用するほうが再生効果は高かった。Ex vivoにおける誘導細胞よりも、In situにおける分化誘導が重要なことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
硬化した声帯の再生のための再生医療的アプローチについては世界中で研究中である。これまでASCやMSCを用いた再生医療の試みがなされ、動物実験では良好な結果が報告されたものの、臨床試験においてははまだ十分な効果が得られておらず、ASCの声帯線維芽細胞への分化誘導が重要と考えられる。本研究はこの視点からASCの分化誘導を試みた世界発の研究である。誘導細胞に効果が認められれば声帯再生医療の進歩に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop the strategy of differentiation of adipose derived mesenchymal stem cell (ASC) into the vocal fold fibroblasts (VFFB), and then to confirm the regenerative effects of induced VFFB (iVFFB) for regeneration of the vocal fold. In vitro study revealed that connective tissue growth factor (CTGF) is effective for differentiation of ASC into VFFB. The subsequent animal study showed that the intracordal injection of iVFFB into rat scarred vocal folds caused few effects in terms of the regeneration of the vocal fold as a vibratory property. Intracordal injection of ASC indicated better regenerative effects on the scarred vocal folds than iVFFB. It is suggested that ex vivo differentiated cells may not be appropriate for the regeneration of the vocal fold in terms of regenerative potentials, and in situ differentiation of ASC to VFFB should be more important and effects for vocal fold regeneration.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：声帯再生 再生医療 声帯癒痕 間葉系幹細胞 線維芽細胞 分化誘導 CTGF

1. 研究開始当初の背景

声帯は1秒間に数100回の振動をおこなう稀有な粘膜であり、これは粘膜の規則的な細胞外マトリックスタンパクの配列と、ヒアルロン酸の豊富な分布によるとされている。これらの構成タンパクを分泌し制御するのは線維芽細胞である。この組織骨格が破綻し、過剰コラーゲン線維の蓄積とヒアルロン酸の枯渇をきたすのが声帯癬痕であり、不可逆性の重度な音声障害をおこす。有効な治療法はなく、再生医療を用いたアプローチが研究されてきている。これまで、声帯再生を促すために骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)、脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)、ES細胞を移植する動物実験が報告されている。これらの報告では声帯の再生効果が示唆されているが、移植した細胞の多くは分化せずに傍分泌作用による再生効果が主体と考えられている。またその効果は安定せず、ASCを用いた早期臨床試験が海外で報告されたが、一定の効果にはいたっていない。声帯の再生を促進するためには声帯線維芽細胞の生着と機能維持が必要であり、幹細胞から声帯線維芽細胞を誘導する必要がある。本研究では幹細胞からの声帯線維芽細胞への分化を試みた。

2. 研究の目的

幹細胞からの声帯線維芽細胞への分化誘導、および誘導細胞を用いた声帯再生効果を検証すること

3. 研究の方法

(1) 細胞ソースの選定と分化誘導

細胞ソースの選定：幹細胞ソースとして、脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)を用いる。幹細胞ソースとしてはiPS, MSC, ASCが挙げられるが、iPS細胞は優れた多分化能を有するものの、細胞移植として用いるに当たっては腫瘍原性の問題がある。我々の先行研究で、MSCとASCの声帯への移植による声帯再生実験では同等の効果が認められたが、ASCは潜在的細胞増殖因子の遺伝子発現などの面でMSCより優位であった(Hiwatashi N, et al. Laryngoscope. 2016;126(5):1143-50.)。以上の根拠よりASCを用いる事とした。

(2) ASCからの声帯線維芽細胞への分化誘導実験(in vitro):

ヒト由来ASC cell lineを用いる。

細胞培養条件1：ASCのみの培養系で、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mLの濃度で添加。

細胞培養条件2：声帯線維芽細胞とASCの共培養

細胞培養条件3：声帯線維芽細胞とASCの共培養において、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を1ng/mL, 10ng/mL, 100ng/mLの濃度で添加。

分化誘導の評価：1, 2, 4週後に細胞を抽出し、未分化マーカーであるOct3/4, MSC

マーカーであるCD29, 44, 73, 90, 105、造血系マーカーであるCD14, 31, 34, 45の発現を免疫染色乃至はFACSで検出する。

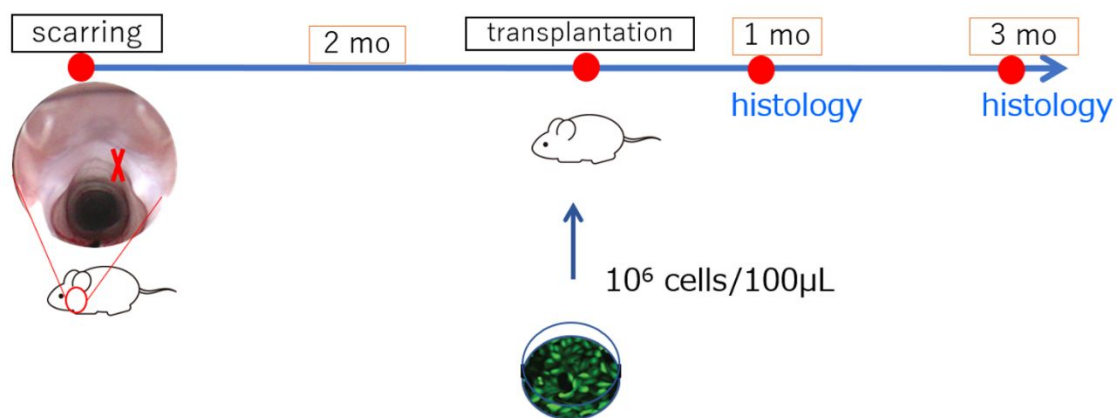
(3) ラット声帯癒痕モデルを用いた細胞移植実験

ラットの声帯損傷モデルの作成：ラットの一側声帯を経口的内視鏡下に切開して損傷をおこし、声帯癒痕を誘導する。我々の先行実験において2カ月で癒痕化が完了することを確認している。

細胞移植：上記誘導細胞を一声帯当たり 1×10^6 個、経口的に注射針を介して移植する。対象として無治療Sham群、ASCの声帯移植群を設けた。

評価：

声帯再生効果：細胞移植後3か月後に喉頭を摘出。組織学的な癒痕の改善状態としてヒアルロン酸、コラーゲン、エラスチン染色を行い評価する。



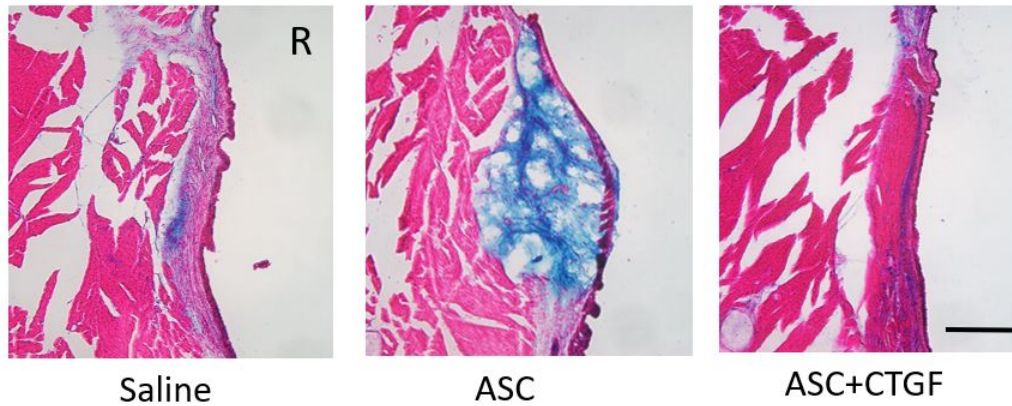
4. 研究成果

(1) ASC から声帯線維芽細胞への分化誘導

ASC への bFGF 添加はどのような条件においても安定した成果がえられず、CTGF を用いることで分化誘導を確認した (PLoS ONE 9(3): e92676.)。CTGF 添加により Vimentin 陽性、Acta2 陰性の細胞分化を確認したため、これを次の In vivo 実験に使用した。

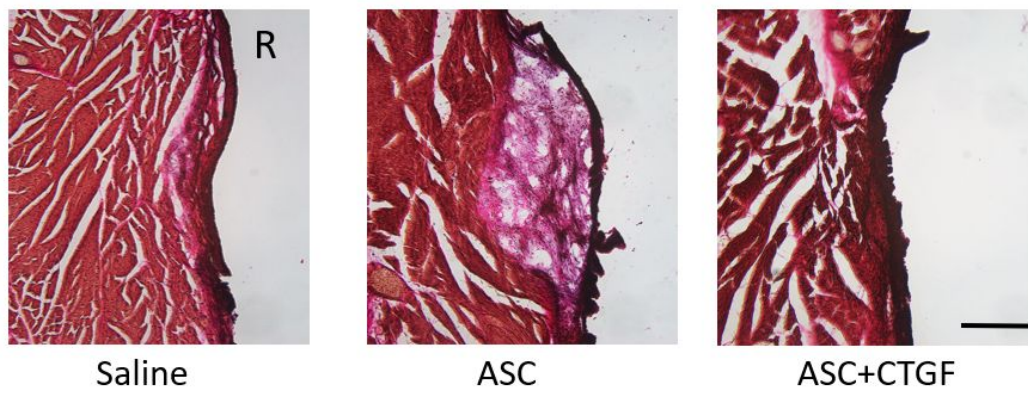
(2) 誘導細胞による声帯再生効果

Sham 群においては声帯粘膜固有層は著明に収縮し、ヒアルロン酸はほぼ消失した。ASC 投与群ではヒアルロン酸の蓄積は良好であったが、誘導細胞移植群では不良であった。



Saline ASC ASC+CTGF

Sham 群では声帯粘膜固有層に過剰のコラーゲンの蓄積を認め、重度な瘢痕を形成していた。ASC 投与群ではコラーゲンの過剰蓄積は減弱していたが、誘導細胞移植群ではコラーゲンの過剰蓄積が残存した。



Saline ASC ASC+CTGF

考察：

誘導細胞の移植による声帯再生効果は限定的で、ASC のほうがむしろ良好であった。ASC 移植による効果は外分泌作用によるため、細胞分化効果を与えることはできない。しかし、本研究の結果から、Ex vivo で分化誘導した細胞では再生効果は少なく、再生効果を期待するためには In situ での細胞分化誘導が必要なことがわかった。すなわち ASC 移植と同時に CTGF などの分化誘導因子を導入する必要がある、今後の課題と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirano S, Sugiyama Y, Kaneko M, Mukudai S, Fuse S, Hashimoto K.	4. 巻 E-pub
2. 論文標題 Intracordal Injection of Basic Fibroblast Growth Factor in 100 Cases of Vocal Fold Atrophy and Scar	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laryngoscope.	6. 最初と最後の頁 E-pub
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.29200.	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 Kawai Y, Kishimoto Y, Sogami T, Suzuki R, Tsuji T, Hiwatashi N, Tateya I, Kanemaru SI, Nakamura T, Omori K, Hirano S.	4. 巻 E-pub
2. 論文標題 Characterization of aged rat vocal fold fibroblasts.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Laryngoscope.	6. 最初と最後の頁 E-pub
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 該当する
1. 著者名 Kaneko M, Hitomi T, Takekawa T, Tsuji T, Kishimoto Y, Hirano S.	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 J 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） なし	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 平野 滋、杉山庸一郎、椋代茂之、橋本慶子、布施慎也、木下翔太、金子真美 .	4. 巻 71
2. 論文標題 細胞増殖因子による声帯の再生医療up to date.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日気食	6. 最初と最後の頁 167-168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 平野 滋	4. 巻 124
2. 論文標題 健康長寿のための音声の維持.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日耳鼻	6. 最初と最後の頁 11-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hirano S
2. 発表標題 Intracordal Injection of Basic Fibroblast Growth Factor into the Vocal Fold in 100 Cases of Atrophy, Scar or Sulcus.
3. 学会等名 ALA meeting (国際学会)
4. 発表年 2020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	平野 滋 (Hirano Shigeru) (10303827)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (24303)	
研究分担者	杉山 庸一郎 (Sugiyama Yoichiro) (50629566)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (24303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------