

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09349

研究課題名(和文) フェレット癒痕声帯線維芽細胞に対するプロスタグランジンE2の効果に関する研究

研究課題名(英文) Effect of PGE2 on fibroblast isolated from the ferret vocal fold

研究代表者

高村 晴香 (Takamura, Haruka)

熊本大学・病院・医員

研究者番号：70623974

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)：本研究でマウスの頸部放射線照射により前頸筋(嚥下に不可欠な頸部筋組織)線維化動物モデルの作製が可能であることが示唆された。マウス頸部に24Gy、72Gyを単回照射し、10日と1か月、3か月経過後に前頸筋を採取しPCRを行うと、各種線維化マーカー(SMA、TGF β 、Collagen I)の発現推移から、72Gy単回照射後1か月のマウスで、最も強く線維化した前頸筋の検体が得られることが判明した。またMasson Trichrome染色による検討で72Gy照射後は未照射と比較して線維化部分が增大することから前頸筋への放射線照射で線維化が誘発されることが組織学的にも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
今後頸部放射線照射に伴う線維化(癒痕組織)に対する新規治療法開発を検討するうえでの、的確で有用な放射線誘発頸部線維化マウスモデルの作製ができた。

研究成果の概要(英文)：The neck of the mouse was irradiated with 24 Gy or 72 Gy. Once, and after 10 days, 1 month, and 3 months, whole tissue of the strap muscle (which is the key for healthy swallow) was collected and PCR was performed. With the measurement of mRNA level of various fibrosis markers such as SMA, TGF β , Collagen I and with Masson Trichrome staining, it was found that the obvious mouse fibrotic changes in strap muscle can be detected with a single irradiation of 72 Gy. This observation validated that strap muscle irradiated with single shot of 72Gy as a model of radiation induced fibrosis in neck muscle related to swallowing function.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：筋線維芽細胞 頸部癒痕 SMA 骨格筋線維化 PGE2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癒痕声帯により QOL を著しく障害された患者が多くいる中、癒痕声帯に対する根本的治療法開発は特に急性炎症期の癒痕に対して多くの労力が注がれてきたが、慢性癒痕声帯に対しては未だ解決されていない。癒痕声帯の主体は外傷や炎症などの刺激因子により線維芽細胞から分化した筋線維芽細胞とそれより産生される細胞外マトリックスであるコラーゲン線維の増加とヒアルロン酸の減少である。

現在の研究では、この分化の過程および細胞外マトリックス産生を調節することに注意が注がれているが、これでは一旦形成された癒痕組織(慢性癒痕)を修復できない。筋線維芽細胞を正常の線維芽細胞へ脱分化させることが慢性癒痕声帯の根本的治療につながるが、現時点では不可能とされている。

2013年に特発性肺線維症に関する In vitro 系の基礎研究において、正常のヒト肺組織から分離培養した線維芽細胞に TGF- β 1 を添加して 24 時間培養し筋線維芽細胞に分化させ、さらに PGE2 を添加して 24~48 時間培養すると筋線維芽細胞のマーカーである smooth-muscle actin (SMA) が focal adhesion kinase (FAK) の失活を通じて減少し、正常の線維芽細胞に脱分化することが報告された。またこれは apoptosis によるものではないことが示された (Garison G; 2013)。PGE2 により癒痕声帯由来の筋線維芽細胞の正常線維芽細胞への脱分化が可能か否かを検証する必要があると考えた。

2. 研究の目的

我々がすでに確立した癒痕声帯の動物モデルを用いて PGE2 が筋線維芽細胞による癒痕形成過程をどのように修飾して効果を発揮するのか検討すること。さらに臨床応用を念頭に、in vivo において手軽な吸入という投与方法での PGE2 の癒痕抑制効果を組織学的に検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) In vitro 実験

- フェレット (n=4) の声帯を顕微鏡下に電気凝固して 2 週間待機して作成したフェレット癒痕声帯モデル (図 1) を用いて癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞について以下のことを検討する。
- フェレットの癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞に対して各種濃度の PGE2 を添加し、以下の産生量、発現量を ELISA, Western blotting, real time PCR および免疫染色にて評価する。
 - ・線維化促進作用を有する TGF- β 1
 - ・細胞外マトリックスとしてのコラーゲンおよびヒアルロン酸
 - ・筋線維芽細胞 (SF) の細胞マーカーである smooth-muscle actin (SMA)
 - ・線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK)
 - ・cleaved poly-ADP ribose polymerase (PARP)コラーゲンゲル収縮アッセイも行う。

2) In vivo 実験

- 上記 1) の癒痕声帯モデルを作成後 2 週間後より、動物用に作製された吸入器を用いて 4 週間、12 週間に渡って週 5 日、1 日 2 回 PGE2 を吸入させる。
- その後摘出喉頭声門下より湿潤させた空気を注入し、声帯を振動させて声帯粘膜波動を記録する。音声に同期させたストロボ光を用いて、粘膜波動を詳細に記録する。
- その後安楽死させ摘出した喉頭の冠状断切片を作製し、無処置側と比較したときの癒痕声帯における以下の発現量を免疫組織学的に検証する。
 - ・ TGF- β 1
 - ・コラーゲンおよびヒアルロン酸
 - ・筋線維芽細胞細胞マーカーである smooth-muscle actin (SMA)
 - ・線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を促進する phosphorylated focal adhesion kinase (p-FAK)

4. 研究成果

1) フェレット癒痕声帯より分離培養した細胞の、過失による完全損失

これまでの実験でフェレットの筋線維芽細胞および正常線維芽細胞を分離培養し、研究を進

めていたが、保存していた細胞を過失で破損してしまいすべて失われてしまった。管理不行き届きが原因と深く反省している。さらにフェレットが極めて高額のため(フェレット癒痕声帯動物モデルを再度作成し、研究を再開することを重々検討したが、フェレットが極めて高価なこと(3匹で輸送費も併せて25万円程度)、再度購入のうえモデル作製が資金的に困難と判断した。以上から当初の研究計画は実行することが不可能となり、研究計画の根本的練り直しを迫られる事態となった。

一方これは当初より懸念していた点であるが、フェレットの遺伝情報が少ないことなどの理由から動物種をマウスに変更して研究をやり直す判断とした。まずマウスの癒痕声帯モデルの作製を試みた。こちらは技術的には可能だが、マウスの声帯はフェレットよりかなり小さく、実際手技的に毎回一定の程度の癒痕を作製することが極めて困難であることが判明し、また筋線維芽細胞および正常線維芽細胞を分離培養して、SMAの発現の差異を確認したが、採取できる試料が少なすぎてそのデータの正確性に確信が持てなかった。正確な結果を獲得するためには十分な採取試料が必要と考えて、声帯以外の組織採取による頸部癒痕組織の作製を目指すことにした。

上記の各結果を吟味するために前半の1年半を費やす結果となり、最終的に行き詰まったため、モデル作製のみならず根本的研究計画の見直しを迫られた。これに加えて研究代表者の業務による遅延と、研究代表者の産育児休業のため研究を安定して行うことが難しい期間があったことも研究遅延の一因である。

2) 当初の学術的背景、当初の目的に即した頭頸部癌治療に伴う頸部癒痕組織に対する新規治療法開発を目指した研究計画再度の立案に至るまで 声帯から頸部筋組織への変更

音声手術や音声の酷使、頭頸部領域への放射線照射など声帯や頸部に対する様々な侵襲および声帯及び頸部筋組織における炎症が原因で癒痕を形成することがしばしば経験される。患者の発声機能や嚥下機能は著しく損なわれQOLに大きく影響するが現在有効な治療法は皆無である。声帯や頸部筋組織の癒痕の主体は、筋線維芽細胞と細胞外マトリックスであるコラーゲン線維産生能の増加と粘弾性に不可欠なヒアルロン酸産生能の減少であり、筋線維芽細胞を正常の線維芽細胞へ脱分化させることが癒痕修復の根本的治療につながるが現時点では不可能とされる。この問題を解決するため、前述のように、マウスの声帯の検体はごく少量のため線維化の程度の評価の信ぴょう性に確信が持てなかった。そこで検体をより多く採取するために、マウスの頸部筋肉全体に線維化を誘発するために放射線を照射し、十分な筋肉の線維化が得られるかを評価する方が、今後の実験系として確証性が高いと考えた。過去には共同研究者の熊井が、放射線照射と同様の効果をもたらす食道癌手術操作での頸胸部手術操作により、術後誤嚥性肺炎が誘発されることを後方視的に検討し、前胸部の筋組織線維化が喉頭挙上障害を誘発する可能性が高いことを報告している。これを踏まえて以下の仮説を立てた。

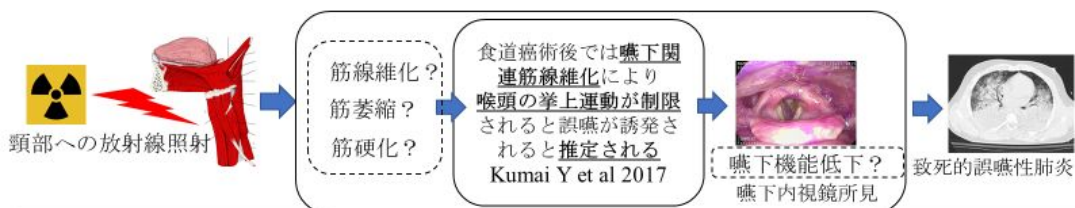
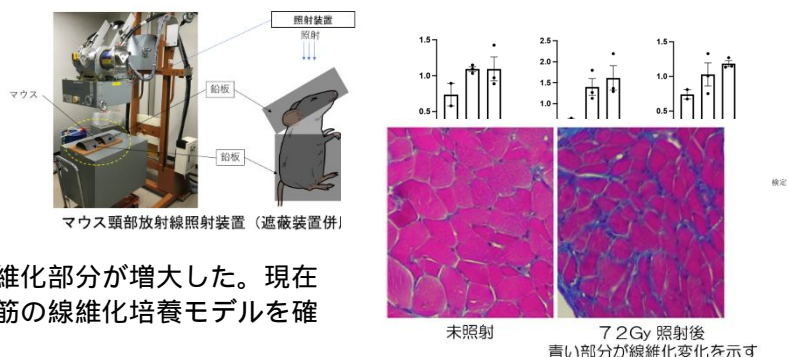


図1 仮説①：頭頸部癌放射線照射による誤嚥性肺炎は、食道癌術後の場合と同様に、放射線照射に誘発された嚥下関連筋線維化・萎縮・硬化による喉頭運動の制限が主たる原因である。

3) 計画変更後の実際の研究成果

そこで、マウスの頸部に、24Gyと72Gyを単回照射し、その後10日と1か月、3か月経過後に前頸筋を採取し、PCRを行うと、各種線維化マーカー(αSMA、TGFβ、Collagen I)の発現推移から、72Gy単回照射後、1か月経過後にマウス前頸筋の検体を採取すると最も強い線維化のマウスの前頸筋の検体が得られることが判明した。またMasson Trichrome染色による検討で72Gy照射後は未照射に比較して線維化部分が増大した。現在この条件下でのマウス骨格筋の線維化培養モデルを確



立しつつある。今後、当初の治療戦略の一つである PGE2 を各種濃度に分けて添加し培養研究を進め、免疫染色、PCR、Western blotting、ELISA など、線維化の評価を検討していく予定である。条件調整もある程度進めているが今一歩安定したのを確認して、実際の PGE2 の適正濃度による添加実験の本実験を行う予定である。

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 副島駿太郎
2. 発表標題 マウス動物モデルを用いた頸部放射線照射による嚥下関連筋への影響の検討
3. 学会等名 第34回日本喉頭科学会総会学術講演会
4. 発表年 2022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	熊井 良彦 (Kumai Yoshihiko) (00555774)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授 (17301)	

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
---------	---------