

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03805

研究課題名（和文）声帯硬化性病変に対する再生医療の重症度に応じた体系化のための基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research for development of regenerative medicine for stiffened vocal folds according to severity

研究代表者

平野 滋（Hirano, Shigeru）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：10303827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：声帯癒痕に対する再生医療を駆使した先端的治療法開発のために、重症度別声帯癒痕動物モデルの確立、病態に応じた声帯再生医療の指針の作成、軽度・重度声帯癒痕に対する治療戦略の構築、プラズマリッチ血小板（PRP）の声帯再生効果の検証、声帯粘膜の羊膜による全置換再生についての基礎実験を行った。その結果、軽度声帯癒痕に対しては細胞増殖因子単体、もしくは幹細胞移植で十分な効果が得られること、重症声帯癒痕にはPRPや羊膜移植が有効な可能性を示した。細胞増殖因子のコンビネーションや、細胞増殖因子と脂肪由来間葉系幹細胞のハイブリッドについては有意な乗せ効果は今のところ確認できておらず、今後の検討を要する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

声帯癒痕は永続的で重度の音声障害をきたし、治療法が確立されていないがために、患者は長期に渡り病悩に苦しめられている。この解決のためには再生医療しか道はなく、世界的に多くの基礎研究が行われているものの、未だ決め手がないのが現状である。声帯癒痕の重症度別の治療戦略が重要であり、今回の研究成果から軽度～中等度の癒痕はほぼ解決でき、臨床応用の段階である。重度癒痕について、本研究成果より効果的な治療法が見いだせる可能性がでてきた点、画期的な展開と考えている。さらなる研究により臨床応用に至れば苦しんでいる患者の福音となり、社会的意義は極めて大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Vocal fold scar causes severe dysphonia and remains difficult to treat. In order to overcome this, in vitro and in vivo animal experiments have been completed to develop novel regenerative treatments for vocal fold scar and sulcus. Growth factor (basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor) or adipose derived mesenchymal stem cell have revealed to be effective for the regeneration in mild to moderate scar, while the effects were insufficient in severe scar. Plasma rich platelet or amniotic membrane turn out to be effective to regenerate such severe scar. The combination of growth factors or hybrid of growth factor and stem cell did not show significant additional regenerative effects. The research provided with possible ideal strategies for the treatment of vocal fold scar according to the severity of the disease.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：声帯再生 声帯癒痕 再生医療 幹細胞 細胞増殖因子 PRP 羊膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

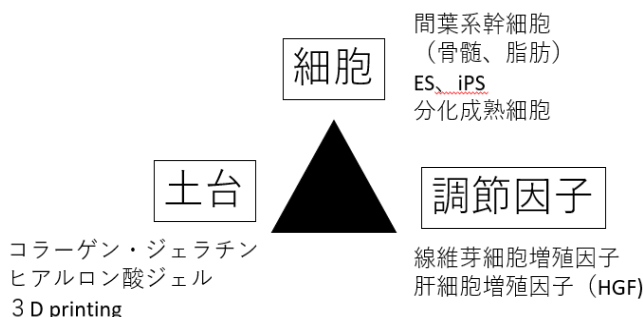
1. 研究開始当初の背景

声帯は長さ 15~20mm 程度の一対の粘膜であり、これが 1 秒間に 100 回から数百回の振動をおこすことで喉頭原音すなわち音声を生産する。この振動能力は層構造と呼ばれる声帯特有の構造により支えられている

声帯癒痕、溝症は声帯粘膜の硬化性病変であり、炎症や外傷後、放射線治療後や熱傷などでおこる。前述の緻密な組織構造は破綻し、不整なコラーゲン線維束が無秩序に沈着し、ヒアルロン酸は消失する。その結果、声帯振動は著しく障害を受け、重度で永久的に音声障害をきたす。いったん硬くなった声帯が自然に回復することはなく、これを改善させる治療法も確立されていない。

硬くなった声帯粘膜を柔らかくするために、種々の手術治療が試みられてきたが効果は不定であった。研究代表者はこの課題に対し一早く再生医療を導入し世界を牽引してきた。既存の治療ではもはや為す術がなく、再生医療こそが唯一の打開策と考えている。

再生医療には細胞、土台、調節因子の3つの柱があり、世界的にはヒアルロン酸ゲルなどの再生土台移植、間葉系幹細胞を用いた細胞治療、増殖因子治療など種々のアプローチが模索されているが、それぞれが個別に行われ、何がどういう病態に最も適しているのかという感覚に欠けているのが、この医療がすすまない最大の要因である。声帯の再生医療を進めるには病態に応じた治療戦略を構築する必要があると考えている。



2. 研究の目的

声帯の再生医療の研究をより効率的にすすめ、確立した治療法開発のために、病態に応じた再生戦略を構築し、声帯の再生医療の体系化を目的とした。

課題1: 重症度別声帯癒痕動物モデルの確立:

課題2: 重度声帯癒痕に対する治療戦略の構築

課題3: プラズマリッチ血小板 (PRP) の声帯再生効果の検証:

課題4: 声帯粘膜の羊膜による全置換再生:

課題5: 病態に応じた声帯再生医療の指針の作成

3. 研究の方法

課題1: 重症声帯癒痕の動物モデルの作成

これまで動物モデルでは画一的なものしかなく、重症度別の検討が行えない状況であった。声帯癒痕の国際的な重症度分類はなく、声帯振動の主観的7段階評価法 (Wisconsin score) などが用いられている。動物モデルにおいては細かな分類は不可能であるため、声帯振動が残っている軽度~中等度癒痕とほとんど喪失した重度癒痕モデルを作成す

る。

課題 2：重症声帯癬痕に対するコンビネーション・ハイブリッド治療戦略の検証

上記の重症声帯癬痕モデルを用いて新たな治療戦略を検討する。従来、MSC や細胞増殖因子(bFGF, HGF)が単体で用いられてきたが、重症癬痕への効果は不十分であった。そこで、MSC や細胞増殖因子を組み合わせることで、上積み効果がえられるかどうかを検討した。

(1) in vitro study

ラットより声帯線維芽細胞を抽出・培養し、bFGF(100ng)、HGF(10ng)、bFGF + HGF をそれぞれ培地に転嫁した。24 時間培養ののち細胞を抽出し、qPCR でヒアルロン酸合成酵素(HAS)、コラーゲン(Col3a)、HGF、bFGF の遺伝子発現を検討した。

(2) 動物実験

ラット一側声帯を重度癬痕化したのち、生食(Sham)、bFGF(100ng)、HGF(100ng)、bFGF + HGF をそれぞれ声帯注射し、3 か月後に喉頭を摘出、組織学的再生効果の検討を行った。

課題 3：重症声帯癬痕に対する PRP の効果

PRP は血小板から精製できる多種増殖因子とサイトカインのカクテルであり、他の領域で優れた再生効果が認められており、整形外科領域では特に関節の再生にすでに臨床応用されている。重症癬痕への治療効果が期待されるが、声帯への再生効果は確認されておらず、最大の問題はこれに含まれるどの分子がどのように働くのかわからない点にある。重度声帯癬痕モデルで PRP 移植を行い、その再生効果を検討した。

(1) in vitro study：ラットより PRP を抽出・精製し、その中に含まれる細胞増殖因子として PDGF, FGF, HGF, TGF b を ELISA を用いて定量化した。

(2) 動物実験：ラット重症声帯癬痕に対し、PRP を局所投与し、その再生効果を組織学的に検討した。

課題 4：重症声帯癬痕に対する羊膜移植の効果

声帯が完全に振動性を失った場合、その組織を用いての再生医療は困難である。新たな戦略として声帯の全置換再生を試みる。羊膜は生体で最も厚い基底膜を有し、間葉系幹細胞を含む組織である。癬痕抑制、組織修復促進の作用を有し、眼科領域では組織充填、組織置換、上皮伸展の基質として用いられ、現在は保険診療として羊膜移植が行われている。さらに羊膜は優れた再生土台となり、申請者の所属施設では羊膜を用いた培養上皮シート移植が医師主導治験として実施されている。

(1) in vitro study

ラットの声帯線維芽細胞を培養し、羊膜上に播種して羊膜の線維芽細胞に対する親和性を組織学的に検討した。

(2) 動物実験：ウサギを用いて喉頭截開を行い、片側声帯を上皮、粘膜固有層を含めて切除し、羊膜移植をおこない、2 か月後に再生効果を形態学的、組織学的に検討した。

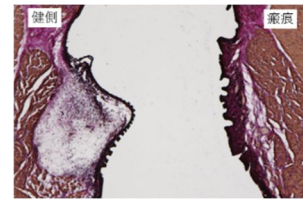
課題 5：重症度別治療指針の作成

今回の結果を踏まえ、重症度別の声帯癬痕治療指針を作成する。

4. 研究の成果

課題1：重症声帯癬痕の動物モデルの作成

ラットの重症声帯癬痕モデルを作成した。鎮静後、特注の喉頭鏡を作成しラットを固定、経口的に内視鏡下に一側声帯を鉗子で切除することで、声帯粘膜全層を切除した。



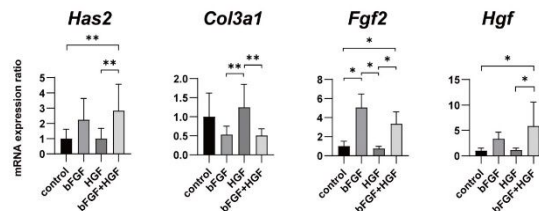
2 か月後に喉頭を摘出し HE 染色、EVG 染色を施行した。健側に

比べ癬痕側では声帯の粘膜固有層がほぼ消失し、コラーゲン線維に占められ、重度の癬痕が形成できた。

課題2：重症声帯癬痕に対するコンビネーション・ハイブリッド治療戦略の検証

(1) in vitro study

ラット声帯線維芽細胞培地に各種増殖因子を添加したとき、bFGF と HGF のコンビネーションにより HAS の遺伝子発現は Control より有意に上昇した。

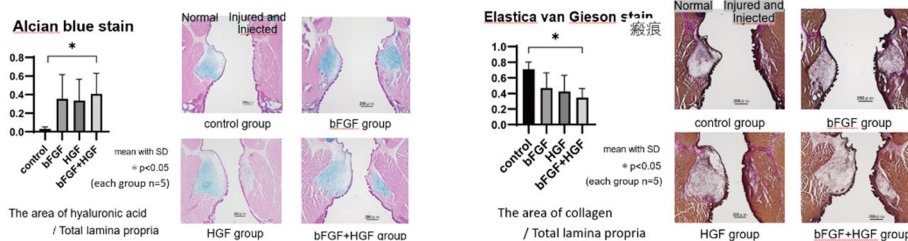


Col3a1についてはControl と差はなく、

HGF, FGF2 の発現はコントロールより有意に上昇した。

(2) 動物実験

ラット重症声帯癬痕に各種増殖因子を毎週計4回局所投与し、3か月後に組織学的検討を行った。ヒアルロン酸はSham に比べると FGF + HGF 群で有意に増加したが、FGF 単独、HGF 単独と比べ有意差はなかった。コラーゲンはSham に比べると FGF + HGF 群で有意に減少したが、FGF 単独、HGF 単独と比べ有意差はなかった。

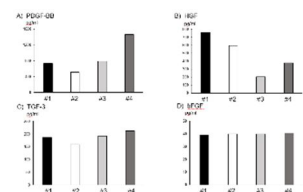


課題3：重症声帯癬痕に対する PRP の効果

ラットを用いて PRP を作成し、重症声帯癬痕モデルに PRP の声帯内注射を施行した。

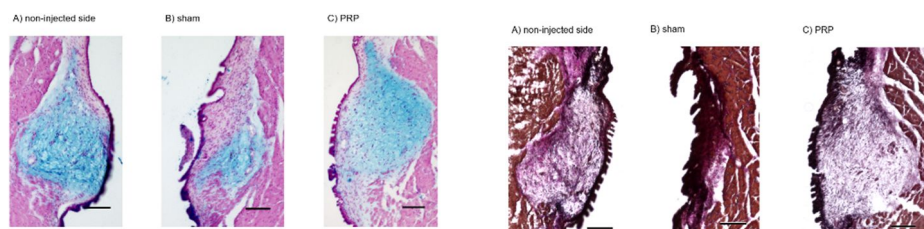
(1) PRP のロット差

4つのPRPを作成し、内包する細胞増殖因子(PDGF, HGF, TGF b、bFGF)を調べたところ、ロットにより大きな差があることがわかった。



(2) PRP の声帯再生効果

ロット#1のPRP投与群では癬痕群に比較しヒアルロン酸の有意な改善とコラーゲン沈着の解消が確認された。

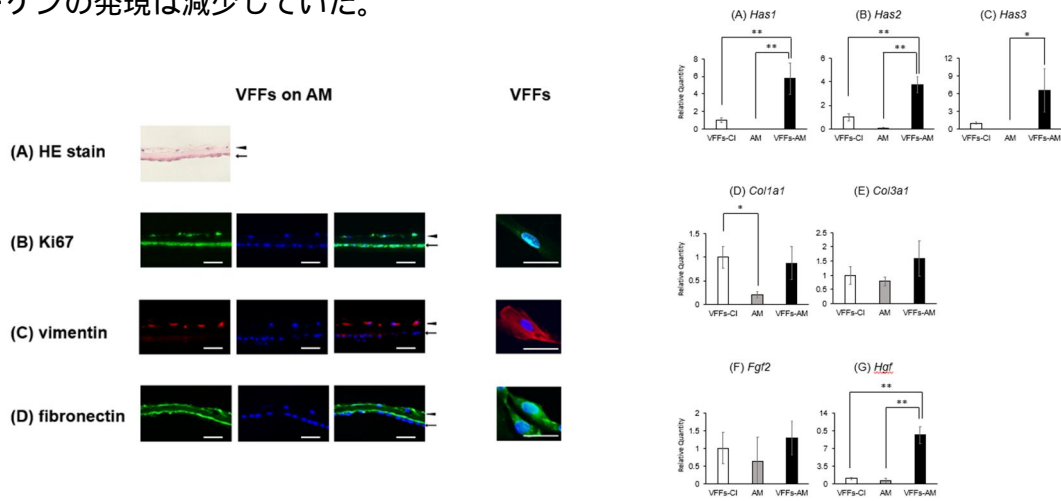


以上の結果から、重症声帯癬痕に対しPRPが有用な可能性が示されたが、PRPのロット差による効果の違いが考えられ、至適ロットの選定が重要と考えられる。

課題 4：重症声帯癭痕に対する羊膜移植の効果

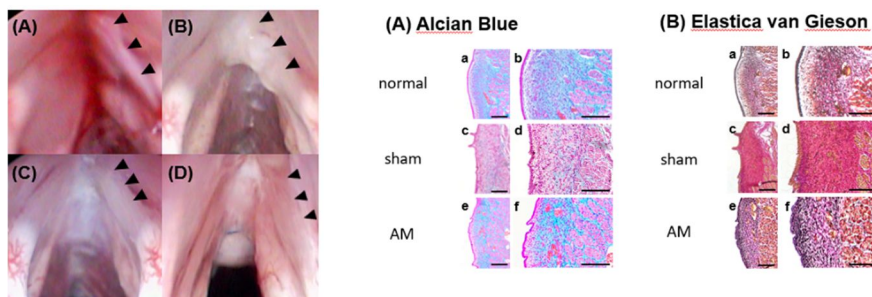
(1) in vitro study

ラット声帯線維芽細胞を羊膜上に播種し培養した結果、細胞増殖は良好で、Ki67, Vimentin, Fibronectin の良好な発現をみた。羊膜の声帯への親和性が確認された。羊膜上の培養細胞からは HAS や HGF の遺伝子発現の有意な上昇がみられ、一方でコラーゲンの発現は減少していた。



(2) 羊膜移植の動物実験

ラビットの喉頭を截開し、一側声帯粘膜を全切除したのち、羊膜を移植した。羊膜は1か月後には生着し、形態的には正常の声帯を呈した。移植後3カ月目の組織所見では、羊膜移植声帯は正常と比較しヒアルロン酸、コラーゲン、エラスチン分布においてほぼ正常であった。以上の結果より、羊膜は声帯全置換再生の有力な移植材料と考えられた。



課題 5：重症度別治療指針の作成

軽症～中等症	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞増殖因子 (HGF, bFGF) ● 間葉系幹細胞 (MSC, ASC) 再生土台移植 (コラーゲン、ヒアルロン酸土台)
重症、溝症	<ul style="list-style-type: none"> ? 増殖因子のコンビネーション ? 増殖因子と間葉系幹細胞のハイブリッド治療 ● PRP ● 羊膜移植

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hashimoto K, Kaneko M, Kinoshita S, Ozawa S, Mukudai S, Sugiyama Y, Hirano S. Effects of Repeated Intracordal Glucocorticoid Injection on the Histology and Gene Expression of Rat Vocal Folds. J Voice. 2021 Jul 17:S0892-1997(21)00199-5. doi: 10.1016/j.jvoice.2021.06.013. Online ahead of print.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of Repeated Intracordal Glucocorticoid Injection on the Histology and Gene Expression of Rat Vocal Folds.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Voice.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j	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 Ozawa S, Mukudai S, Kaneko M, Kinoshita S, Hashimoto K, Sugiyama Y, Hashimoto S, Akaki J, Hirano S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of Japanese Herbal Medicine Kyoseihatekigan on Vocal Fold Wound Healing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Voice	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j	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 M, Sugiyama Y, Fuse S, Mukudai S, Hirano S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Physiological Effects of Voice Therapy for Aged Vocal Fold Atrophy Revealed by EMG Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Voice.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j	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、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 Ozawa S, Mukudai S, Sugiyama Y, Branski RC, Hirano S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Mechanisms Underlying the Antifibrotic Potential of Estradiol for Vocal Fold Fibrosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laryngoscope.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lary.29355	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 S, Sugiyama Y, Kaneko M, Mukudai S, Fuse S, Hashimoto K	4. 巻 -
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 -
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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Hirano S
2. 発表標題 Surgical treatment of vocal fold scar with or without growth factor.
3. 学会等名 International Congress of ORL-HNS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirano S
2. 発表標題 Surgical treatment of vocal fold scar.
3. 学会等名 51st Brazilian Congress of Otorhinolaryngology and Facial Cervical Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mukudai S, Ozawa S, Kaneko M, Sugiyama Y, Hirano S.
2. 発表標題 Anti-inflammatory and Anti-oxidant Effects of Japanese Herbal Medicine Kyoseihatekigan On Vocal Fold Wound Healing
3. 学会等名 American Bronchoesophagological Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirano S, Sugiyama Y.
2. 発表標題 Videoendoscopic surgery of aerodigestive tract using 4K3D exoscopy.
3. 学会等名 ORLIAC (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ozawa S, Mukudai S, Sugiyama Y, Branski R, Hirano S.
2. 発表標題 Estradiol Ameliorates Vocal Fold Fibrosis by Modulation of Estrogen Receptor-Mediated TGF β 1 Signaling.
3. 学会等名 ALA meeting, 2020, May16-Jun 15, ePoster (Atlanta)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hirano S, Sugiyama Y, Kaneko M.
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, 2020, May16-Jun 15, ePoster (Atlanta)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 棕代茂之、木下翔太、小澤聡美、布施慎也、橋本慶子、金子真美、杉山庸一郎、平野 滋。
2. 発表標題 SMAD3抑制による声帯癒痕治療におけるリピトイドの比較検討。
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平野 滋
2. 発表標題 シンポジウム：喉頭における組織・機能再生の新展開．声帯癒痕に対する肝細胞増殖因子を用いた再生医療：第I/II相医師主導治験．
3. 学会等名 第31回日本喉頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 棕代茂之
2. 発表標題 声帯線維芽細胞におけるグルコルチコイド受容体のリン酸化とTGFb/SMAD signalingへの関与．
3. 学会等名 第31回日本喉頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirano S.
2. 発表標題 Histological findings in vocal folds.
3. 学会等名 21st International Workshop on Laser Voice Surgery, Paris, (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平野 滋.
2. 発表標題 声帯癒痕に対する肝細胞増殖因子を用いた声帯再生医療：第I/II相医師主導治験.
3. 学会等名 第40回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirano S.
2. 発表標題 Panel: Regenerative medicine for vocal fold scar: phase I/II clinical trial of hepatocyte growth factor,
3. 学会等名 World Phonosurgery Congress, Buenos Aires (招待講演) (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	椋代 茂之 (Mukudai Shigeyuki) (00821860)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (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)	
研究 分担者	斉藤 敦志 (Saito Atsushi) (80573633)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (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
---------	---------