

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18813

研究課題名(和文) 声帯癬痕に対する新規エストロゲン治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel estrogen treatment for vocal fold scar

研究代表者

椋代 茂之(Mukudai, Shigeyuki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00821860

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)：声帯癬痕は難治性線維化疾患である。エストロゲンは、抗線維化作用を有するとされる。我々は、声帯線維芽細胞(VFFs)においてエストラジオール(E2)がTGF- β 1 signalingに与える影響を解明した。10週齢雄のSDラットの声帯からVFFsを培養した。VFFsはエストロゲン受容体を発現した。TGF- β 1刺激したVFFsにE2を投与し、線維化関連遺伝子の発現をqPCR法により調べた。TGF- β 1+E2群は、TGF- β 1単独群と比較して有意にSmad7が増加し、Col1a1が減少した。以上からVFFsにおいてE2はTGF- β 1 signalingに作用して抗線維化作用を示すことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

声帯癬痕は難治性線維化疾患であり、音声障害による生活上のダメージは大きい。従来からグルココルチコイドの局所注入が行われてきたが、その効果は不確実である。近年、性ステロイドに属するエストロゲンが創傷治癒に対して保護作用を有することが報告されているが、声帯創傷治癒に対する効果は不明であった。本研究ではエストロゲンが声帯の創傷治癒過程に与える影響を、声帯線維芽細胞を用いて分子生物学的に解明した。本研究の成果はエストロゲンをを用いた声帯癬痕治療への臨床応用につながり、声帯癬痕がもたらす音声障害を克服する切り札を提供すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vocal fold fibrosis remains a significant clinical challenge. Estrogens, steroid hormones predominantly responsible for secondary sexual characteristics in women, have been shown to alter wound healing. We sought to elucidate the effects of estrogens on TGF- β 1 signaling in vocal fold fibroblasts (VFFs). VFFs were isolated from 10-week-old, male SD rats, and ER α and GPR30 were examined via immunostaining and qPCR. VFFs were treated with estradiol (E2, 10⁻⁷, 10⁻⁸ or 10⁻⁹ M) \pm TGF- β 1 (10 ng/mL). qPCR was employed to determine estrogen receptor-mediated effects of E2 on genes related to fibrosis. ER α and GPR30 were expressed in VFFs. The combination of E2 (10⁻⁸ M) and TGF- β 1 significantly increased Smad7 and decreased Col1a1 compared to TGF- β 1 alone. E2 regulated TGF- β 1/Smad signaling via estrogen receptors in VFFs. These findings provide insight into potential mechanisms of estrogens on vocal fold injury with the goal of enhanced therapeutics for vocal fold fibrosis.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：声帯癬痕 エストロゲン TGF- β /Smad signaling

1. 研究開始当初の背景

声帯癭痕は反復する外傷や炎症が誘因となって声帯が硬化する難治性線維化疾患であり、それに起因する音声障害はコミュニケーション上大きなダメージをもたらす。ステロイドホルモンのなかでもグルココルチコイドは抗炎症作用や抗線維化作用を有するとされ、これまで様々な線維化疾患の治療や予防に用いられてきた。しかしながら、声帯癭痕へのグルココルチコイド投与の効果は不確実である。我々はこれまでに声帯線維芽細胞(VFFs)においてデキサメサゾン(DM)がグルココルチコイド受容体のリン酸化や創傷治癒において中心的役割を果たす TGF- β /Smad signaling に与える影響について検証し、DM は VFFs に対して抗線維化作用と線維化作用の両面を有することを明らかにした。この結果は声帯創傷治癒に対するグルココルチコイド療法の効果が不確実であることの理論的基盤となる。

一方、近年になって性ステロイドに属するエストロゲンが創傷治癒に対して保護作用を有することが報告されている。我々は過去に VFFs がエストロゲン受容体(ER)を発現し、エストロゲンがその受容体を介して VFFs の ECM 関連遺伝子の発現を変化させることを明らかにした。エストロゲンの声帯の創傷治癒や癭痕形成に対する効果が期待されており、その作用機序の解明が待たれていた。

2. 研究の目的

本研究は、エストロゲンが声帯の創傷治癒過程、特に VFFs の TGF- β /Smad signaling に与える影響を基礎的に解明することを目的とした。

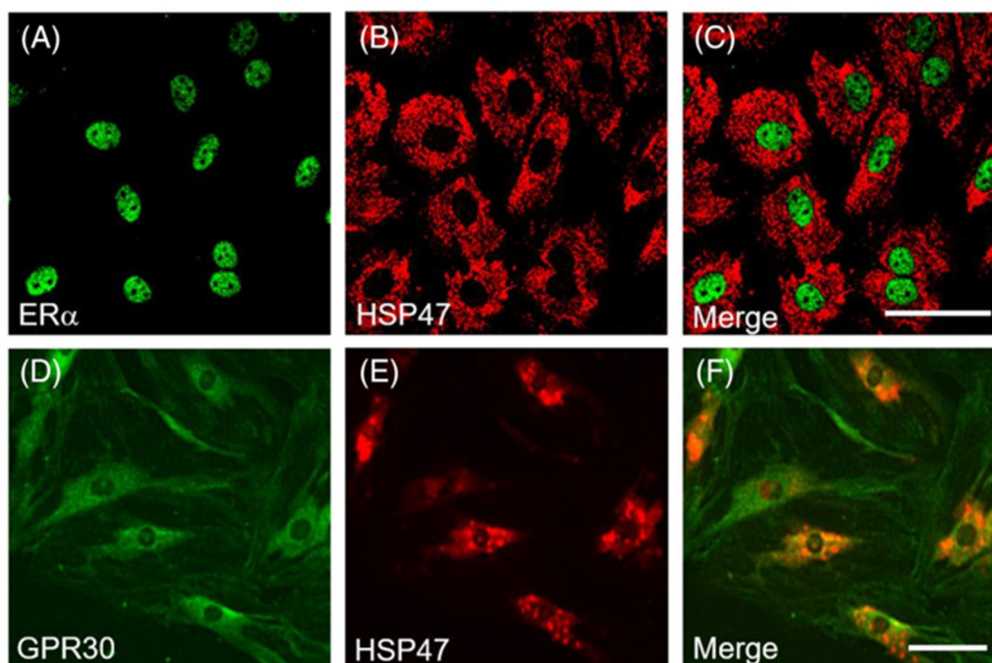
3. 研究の方法

10 週齢雄の SD ラットの声帯から VFFs を培養し、免疫染色と qPCR 法を用いてエストロゲン受容体(ER)と膜型エストロゲン受容体(GPR30)の発現を調べた。また TGF- β 1 刺激した VFFs にエストラジオール(E2)や ER アンタゴニスト(IC1182,780 と G36)を投与して 4 時間後、24 時間後の線維化関連遺伝子の発現変化を qPCR 法により調べた。

4. 研究成果

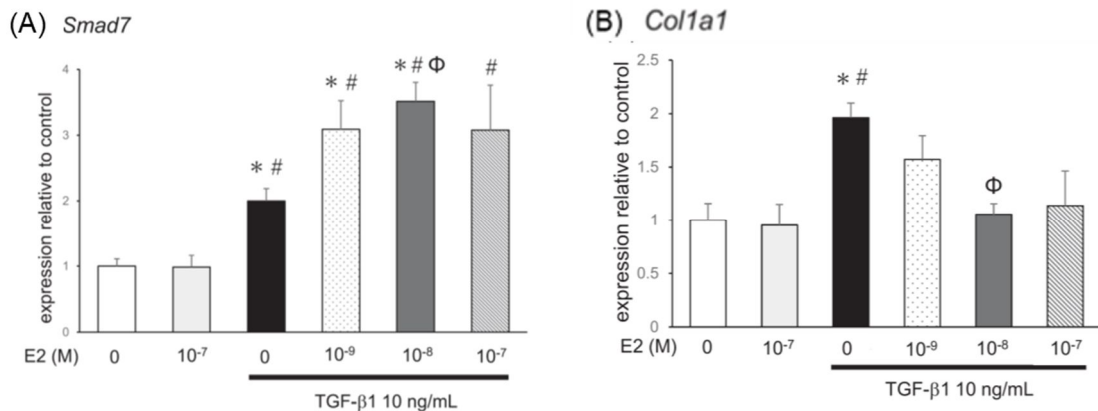
VFFs は ER と GPR30 を蛋白・mRNA レベルで発現した(図 1A-F)。TGF- β 1 + E2 群は、TGF- β 1 単独群と比較して 4 時間後に Smad7 が増加し、24 時間後に Col1a1 が減少した(図 2AB)。これらの変化は ER アンタゴニストの投与により抑制された(図 3AB)。以上から VFFs は ER と GPR30 を発現し、E2 はこれらの受容体を介して TGF- β 1/Smad signaling に作用して抗線維化作用を示す可能性が示された(図 4)。本研究の成果はエストロゲンを用いた声帯癭痕治療への臨床応用につながり、声帯癭痕がもたらす音声障害を克服する切り札を提供すると考えられる。

図 1 声帯線維芽細胞(VFFs)における ER と GPR30 の発現



Scale bar: 50 μ m

図2 TGF- 刺激後の声帯線維芽細胞 (VFFs) に E2 (10⁻⁸ M) を投与すると TGF- 単独群と比較して Smad7 mRNA は有意に増加、Col1a1 mRNA は有意に減少した



n = 6 for all; **P* < .05 relative to control; #*P* < .05 relative to E2 (10⁻⁷ M); Φ*P* < .05 relative to TGF-β1

図3 ER アンタゴニストの投与により上記の変化は抑制された

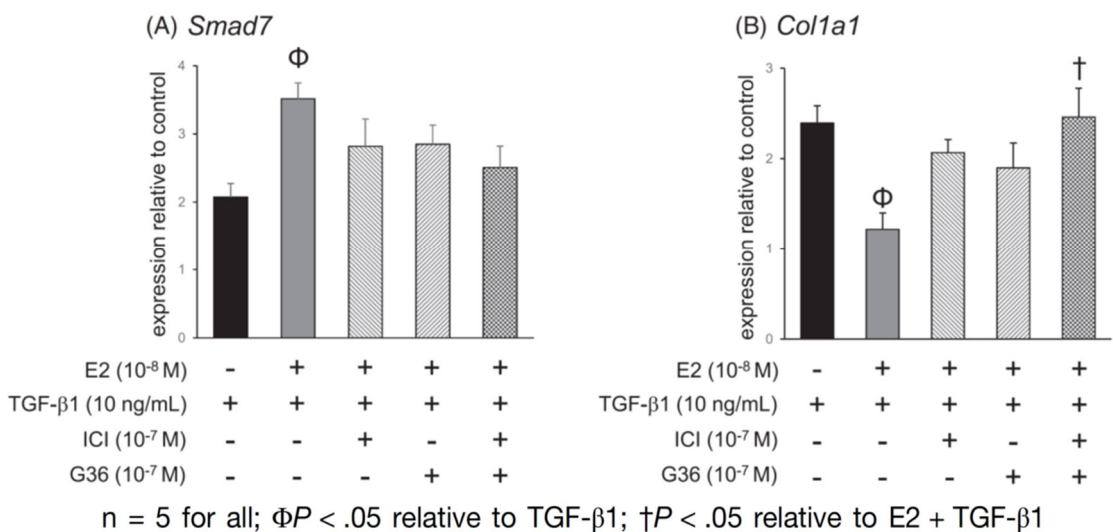
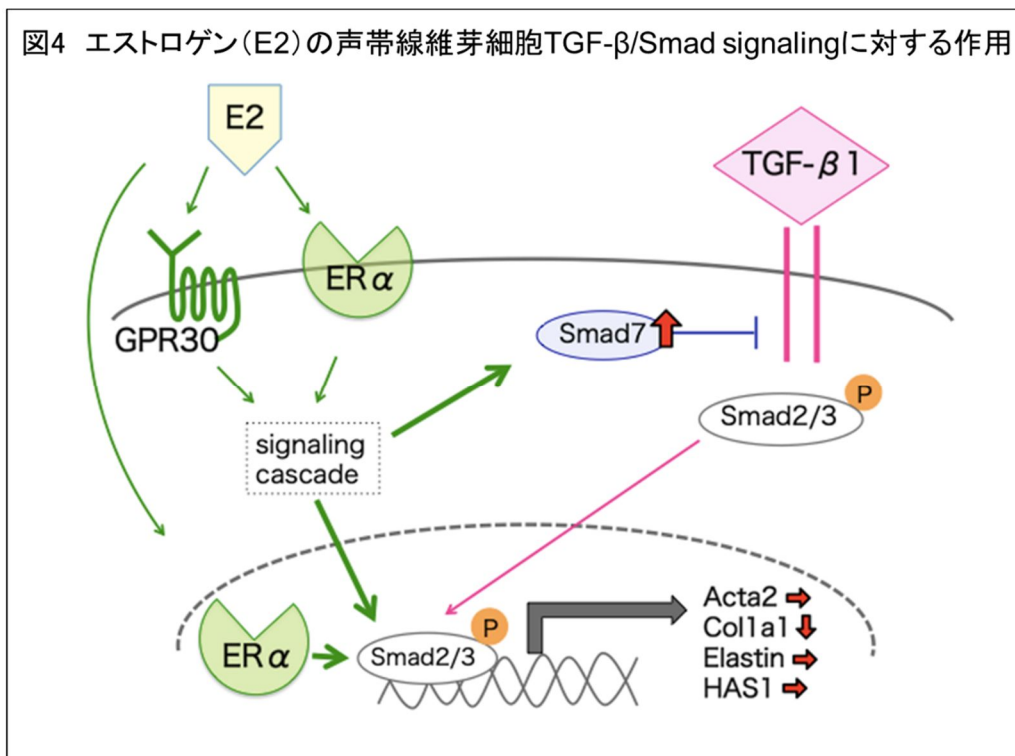


図4 エストロゲン(E2)の声帯線維芽細胞TGF-β/Smad signalingに対する作用



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ozawa Satomi, Mukudai Shigeyuki, Sugiyama Yoichiro, Branski Ryan C., Hirano Shigeru	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 The 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 Nakamura Ryosuke, Mukudai Shigeyuki, Bing Renjie, Garabedian Michael J., Branski Ryan C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Complex fibroblast response to glucocorticoids may underlie variability of clinical efficacy in the vocal folds	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-020-77445-9	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 -
1. 著者名 Dion Gregory R., Guda Teja, Mukudai Shigeyuki, Bing Renjie, Lavoie Jean Francois, Branski Ryan C.	4. 巻 130
2. 論文標題 Quantifying vocal fold wound healing biomechanical property changes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 454 ~ 459
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.27999	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 Mukudai Shigeyuki, Kraja Iv, Bing Renjie, Nalband Danielle M., Tatikola Mallika, Hiwatashi Nao, Kirshenbaum Kent, Branski Ryan C.	4. 巻 4
2. 論文標題 Implementing Efficient Peptoid Mediated Delivery of RNA Based Therapeutics to the Vocal Folds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 640 ~ 644
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lio2.310	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小澤聡美, 椋代茂之, 木下翔太, 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 ラット培養声帯線維芽細胞に対するエストラジオールの抗線維化作用
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Satomi Ozawa, MD; Shigeyuki Mukudai, MD, PhD; Yoichiro Sugiyama, MD, PhD; Ryan C. Branski, PhD; Shigeru Hirano, MD, PhD
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 ombined Otolaryngology Spring Meetings 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 椋代茂之, 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抑制による声帯瘢痕治療におけるリピトイドの比較検討
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小澤聡美, 椋代茂之, 木下翔太, 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 ラット声帯創傷治療に対するエストロゲン作用
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会総会・学術講演会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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