

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22691

研究課題名（和文）声帯溝症に対する羊膜移植を用いた声帯再生医療開発のための基礎研究

研究課題名（英文）Regeneration for vocal fold sulcus with amniotic membrane

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：声帯癒痕は重度の音声障害を呈し、我々はこれまで再生量を駆使した治療法の開発を行ってきた。しかし、特に重症の声帯癒痕に対しては治療は未だ確立されていない。本研究では新たな革新的手法として、硬化・変性した声帯粘膜の全置換を目指し、羊膜移植の安全性、有効性について検討した。まずラットの声帯線維芽細胞を採取し、羊膜上に播種し、良好な生着と増殖を確認した。次にラビット喉頭を用い、声帯粘膜を全除去後に羊膜の移植を施行したところ、1か月目には声帯粘膜の再生が確認され、組織学的にもヒアルロン酸の豊富な蓄積を認めた。羊膜が声帯の親和性に優れ、声帯粘膜の全置換再生に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
重度の声帯癒痕や声帯溝症に対する革新的な治療法の開発に向け、羊膜が科学的に有用であることを証明した。これらの疾患に苦しむ患者さんへの臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Vocal fold scar remains problematic. Particularly severe scar is still difficult to treat even with regenerative methods. We examined the effects of the amniotic membrane for regeneration of the whole vocal fold mucosa using rat and rabbits. Rat vocal fold fibroblasts were seeded on amniotic membrane in culture medium, and appropriate survival and proliferation were observed. Then the amniotic membrane was transplanted to the rabbit vocal folds. Regeneration of the vocal folds were observed at 1 month after the implant. The histology showed good deposition of hyaluronic acid in the lamina propria of the vocal folds. The results indicate the feasibility of the amniotic membrane 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 羊膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

声帯は高速振動する粘膜であり、その機能ゆえ発声が可能であるが、その組織構造が破綻し硬く変性し、振動能力を失うと永続的で難治性の重度の音声障害をきたし、QOLを大きく貶めることになる。

このような状態を声帯癒痕と呼ぶが、これを治療する方法は従来なく、我々は塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)や肝細胞増殖因子(HGF)あるいは間葉系幹細胞(MSC)を用いた再生医療を試みてきた。その結果、軽度から中等度の声帯癒痕であれば十分再生効果が期待できるものの、重度の声帯癒痕には効果は限定的であり、より革新的な手法が必要であった。

羊膜は優れて再生土台であるとともに、各種の細胞増殖因子や幹細胞を含有しているとされ、重度声帯癒痕に対する置換材料として適している可能性が考えられた。重度声帯癒痕においては粘膜の全置換が必要と考えられ、再生誘導力の強い羊膜が期待された。

2. 研究の目的

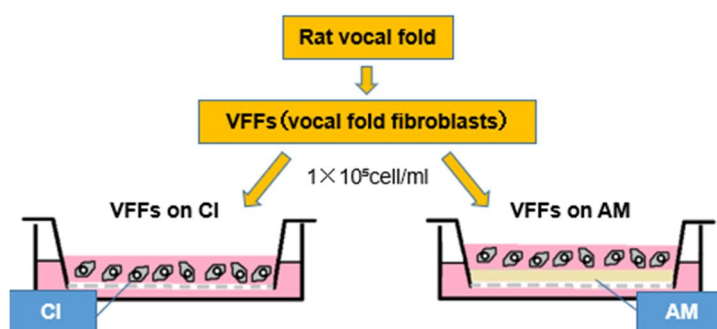
羊膜による声帯粘膜全置換により再生効果と安全性を検証する。

3. 研究の方法

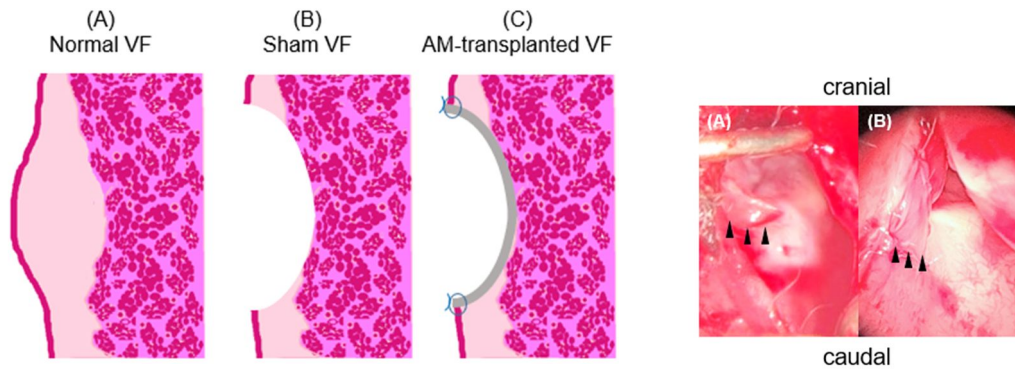
(1) In vitro study : 羊膜における声帯線維芽細胞の親和性をみるために、羊膜上にラット声帯線維芽細胞を播種し、生着・増殖を検討した。

CI グループ : ラット声帯線維芽細胞を Culture insert (CI) 上に播種

AM グループ : ラット声帯線維芽細胞を CI 底面に AM を敷いて、その上に播種



(2) 動物実験 : ラビットを用い、全身麻酔下に喉頭截開を行い、一側声帯は切除、他側は切除後に羊膜の委嘱を行った。3 か月後に喉頭を摘出し、組織学的検討を行った。

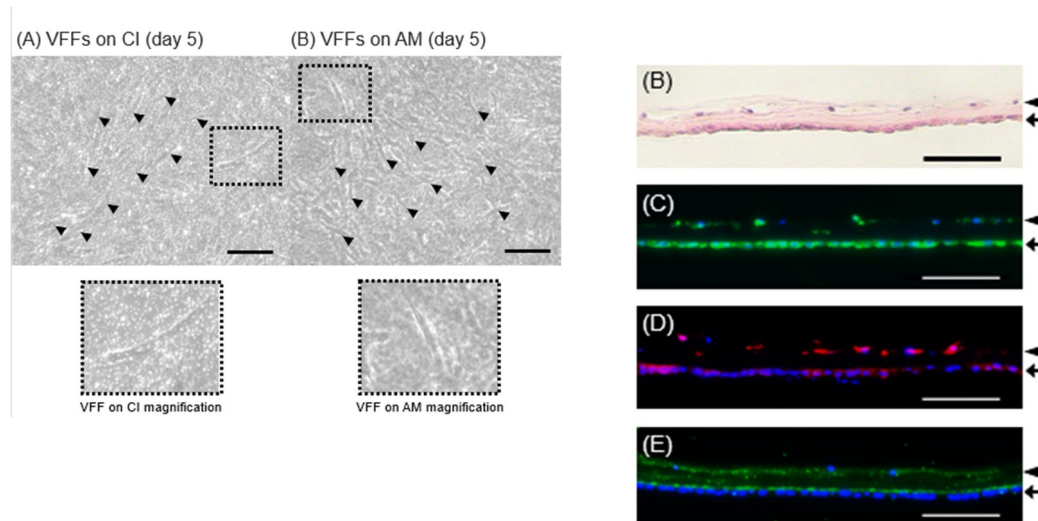


喉頭截開下に、両側声帯を切除し、片方に羊膜を逢着（矢頭）。

4 . 研究成果

(1) In vitro study

声帯線維芽細胞は AM 上で良好な生着と増殖を示した。



羊膜上の線維芽細胞は Ki67, vimentin, fibronectin の発現を示し、良好な生着と Cell viability を示した。

矢印：羊膜、矢頭：線維芽細胞

B: HE 染色、C: Ki67、D: Vimentin、E: Fibronectin

PCR の結果：

AM 上の線維芽細胞は HAS と HGF の有意な遺伝子発現を示した。

HAS はヒアルロン酸合成の亢進、HGF は抗線維化作用、血管新生作用を介した組織再生に重要な因子である。

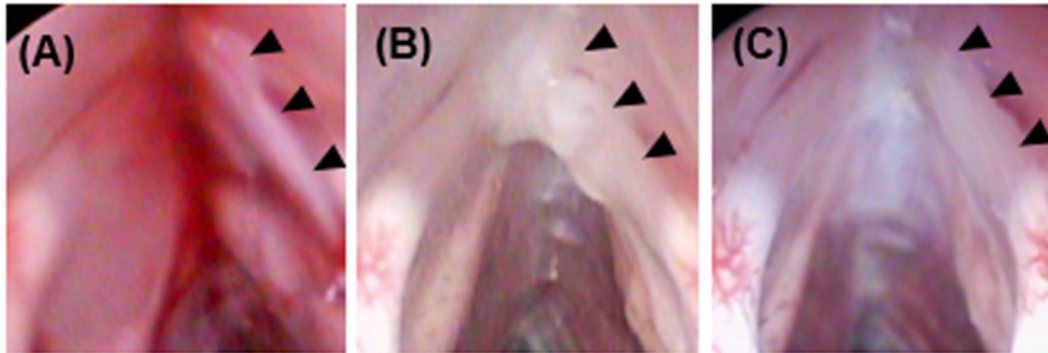
(2) 動物実験の結果

移植した AM は生着し、30 日目には良好な声帯粘膜の再生が確認された。

移植直後

7 日目

30 日目

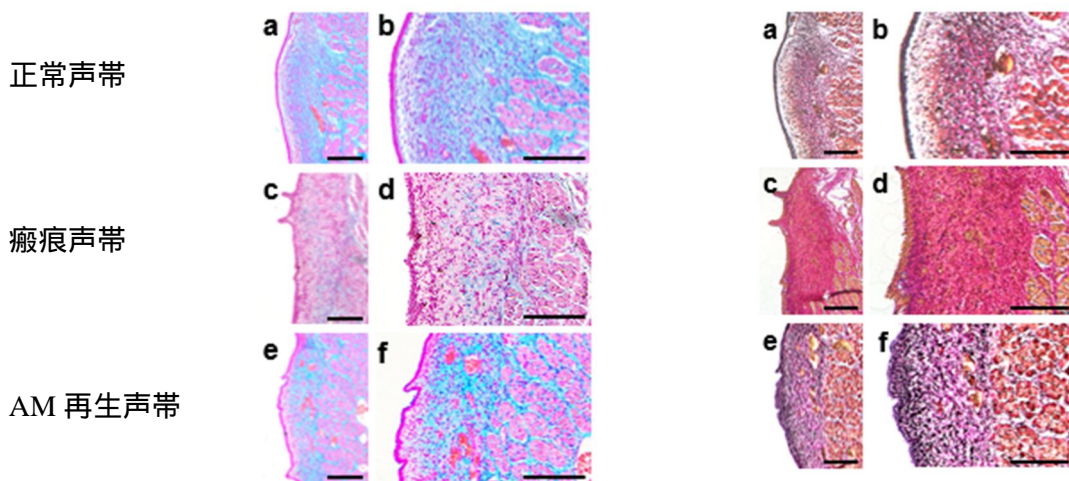


組織学的所見

AM 移植声帯はヒアルロン酸の良好な沈着と、コラーゲン沈着の解消を示した。

Alcian blue 染色。青：ヒアルロン酸

EVG 染色：赤：コラーゲン



結論

ラットの声帯線維細胞は羊膜上で良好に生着、増殖した。

ラビットの声帯を切除後に羊膜を貼付したところ、1 か月で良好な声帯粘膜の再生がえられた。組織学的にヒアルロン酸の再生とコラーゲンによる瘢痕化の予防が示された。羊膜移植が声帯粘膜再生に有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 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 -

1. 著者名 Ogawa M, Mukudai S, Sugiyama Y, Matsushita H, Kinoshita S, Ozawa S, Hashimoto K, Fuse S, Kaneko M, Nakanishi Y, Yoshizaki T, Sotozono C, Hirano S	4. 巻 -
2. 論文標題 The Effects of Amniotic Membrane Transplantation on Vocal Fold Regeneration.	5. 発行年 2021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.29997.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ogawa M, Mukudai S, Matsushita H, Kinoshita S, Ozawa S, Hashimoto K, Kaneko M, Nakanishi Y, Sugiyama Y, Yoshikazu T, Hirano S.
2. 発表標題 The effects of human amniotic membrane transplantation for vocal fold regeneration
3. 学会等名 European Laryngogloacial Association, (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小川真智子、椋代茂之、杉山庸一郎、松下大樹、木下翔太、小澤聡美、橋本慶子、布施慎也、金子真美、平野 滋。
2. 発表標題 声帯粘膜再生における羊膜移植の効果
3. 学会等名 第34回日本喉頭科学会
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	棕代 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)	

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