

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：85308

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09755

研究課題名（和文）ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた細胞積層化による声帯層構造の再現技術開発

研究課題名（英文）Reconstruction of vocal cord layer structure by cell stacking using gelatin hydrogel particles

研究代表者

山田 光一郎（Yamada, Koichiro）

公益財団法人大原記念倉敷中央医療機構（臨床医学研究所 臨床医学研究開発部）・クリニカルサイエンスリサーチグループ・研究員

研究者番号：60815257

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）：本研究では、イヌ声帯より分離した細胞を用いて細胞シートを作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子を用いて積層することにより積層細胞シートを作製した。作製した積層細胞シートを損傷声帯に移植したところ、組織学的な変化は明らかではないものの、萎縮は軽減し、振動は保たれることが確認された。ゼラチンハイドロゲル粒子を用いて作製した積層細胞シートによる、声帯粘膜再生の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では声帯粘膜より採取した細胞とゼラチンハイドロゲル粒子を用いることで積層細胞シートを作製した。この積層細胞シートを移植することによる声帯粘膜再生効果が示されれば、難治性の声帯の線維性疾患の新たな治療法開発につながる可能性がある。また、その技術は他臓器における線維化疾患に対しても応用できる可能性がある。

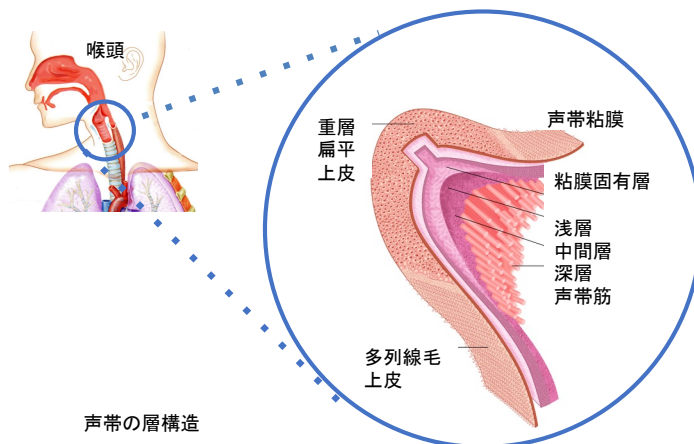
研究成果の概要（英文）：In this study, cell sheets were prepared using cells isolated from canine vocal folds, and layered cell sheets were prepared by stacking them using gelatin hydrogel particles. Layered cell sheet was successfully transplanted to the injured vocal fold. Although histological change was not identified with cell sheet transplantation, it resulted in reduced atrophic change and preserved mucosal vibration. It was suggested that layered cell sheets made from gelatin hydrogel particles may be effective for regeneration of the vocal fold mucosa.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：声帯 ゼラチンハイドロゲル 細胞シート 線維化

### 1. 研究開始当初の背景

声帯は声帯粘膜上皮、粘膜固有層、筋層からなる特徴的な層構造を有するユニークな臓器であり、その層構造が発声に重要な役割を担っている。しかしながら、炎症、外傷などでその層構造が破綻すると、声帯の粘弾性は損なわれ、難治性の嗄声をきたし、患者のQOLは著しく低下する。これまで薬剤や細胞移植などの様々な方法を用い、声帯組織再生が図られてきたが、その効果は限定的であり細胞外基質産生のコントロールにとどまっている。機能的な声帯組織再生にはその層構造の再現が不可欠であるが、治療法確立には至っていない。



近年、京都大学ウイルス・再生医科学研究所、再生組織構築研究部門では、ゼラチンハイドロゲル粒子を挟み込むことにより、細胞シートの積層化に成功した。この新技術を用いると、声帯組織の3次元層構造を再現できる可能性があるが、声帯のような小さい臓器にこれらの技術が応用できるかどうか検証されていない。

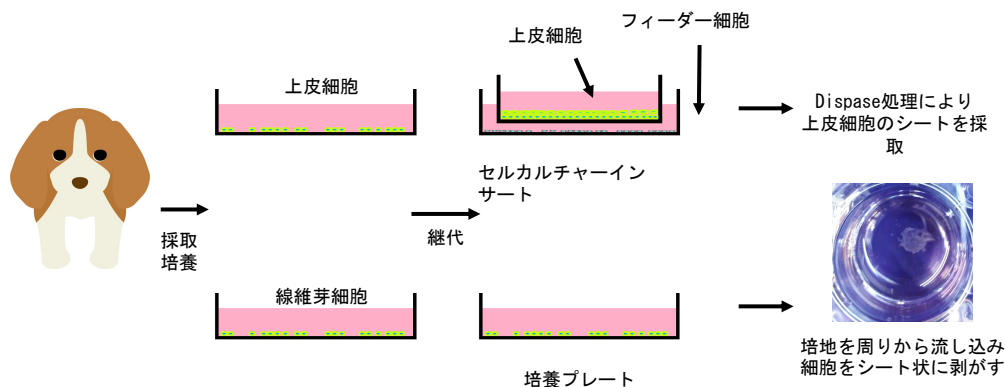
### 2. 研究の目的

本研究の目的は、声帯より分離した各種細胞を用いて細胞シートを作製し、ゼラチンハイドロゲル粒子を用いて積層することにより、声帯特有の層構造を有する声帯組織を再現する基盤技術を開発するとともに、再現した組織を実験動物の喉頭に移植することによる声帯組織再生効果を検証することである。

### 3. 研究の方法

#### ①細胞培養

Dispase を用いて酵素処理を行い、上皮と粘膜固有層を分離する。それぞれから上皮細胞と線維芽細胞を採取し、それぞれ個別に培養を行う。細胞増殖を促進させ、十分な細胞数を得る。上皮細胞は cell culture insert に継代を行い培養する。



#### ②ゼラチンハイドロゲル粒子の作製

高濃度のゼラチン溶液をオイル内で攪拌し、オイルエマルジョン状態とする。それを冷却してゼラチンをゲル化させた後にアセトンで洗浄し、熱脱水架橋を行い、GHM を作製する。実験には 20 μm 程度の微小なもののみを使用するため、篩にかけて微小な GHM のみを回収する。

#### ③細胞シートの作製

Dish plate 上で培養した線維芽細胞をシート状に剥離する。線維芽細胞のシートの上に小粒子の GHM を撒き、その上にさらに線維芽細胞のシートをのせることで線維芽細胞の多層構造を作

成する。Cell culture insert で培養した上皮細胞は dispase に浸すことでシート状に剥離することができる。線維芽細胞の多層構造の上に GHM を撒き、上皮細胞のシートをのせることで上層、下層で物性の異なる多層構造を作成することができる。

#### ④細胞シートの移植

イヌ損傷声帯に細胞シートを移植し、吹鳴実験及び組織学的検査を行うことで声帯粘膜再生効果を評価する。

#### 4. 研究成果

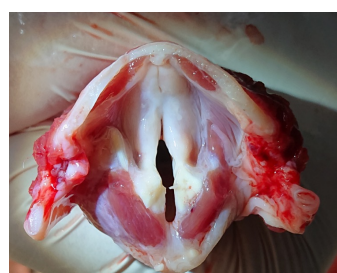
①上皮細胞と線維芽細胞を分離し、培養することに成功した。培養した上皮細胞では重層化やバリア機能の成熟が確認できた。

②高濃度のゼラチン溶液から、ゼラチンハイドロゲル粒子を作製することに成功した。

③培養した上皮細胞と線維芽細胞をシート状に剥離し、ゼラチンハイドロゲル粒子を挟み込み、積層化することで、積層細胞シートを作製することができた。積層細胞シートを構成する上皮細胞と線維芽細胞の状態を確認した。Hoechst 33342, ethidium homodimer-1 を用いて染色を行ったところ、シートの中央部でも死細胞の数はごく少数であった。また作製した積層シートが十分な機能や構造を保持しているか HE 染色や免疫染色で観察した。Pan Cytokeratin, Vimentin の染色を行い、積層化構造を確認した。完成した細胞ブロックは約 300  $\mu\text{m}$  の厚さであり、自家移植実験に十分な大きさのものであった。

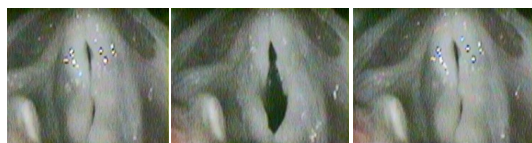


④移植した声帯粘膜は対側声帯と癒着しており、声帯振動は障害されていた。癒着部位を切離した上で吹鳴実験を行い、ハイスピードカメラで声帯振動を観察したところ、比較的良好な声帯振動が確認された。発声時の声門下圧は 10cmH<sub>2</sub>O 程度であり、声帯粘膜の萎縮は軽度であり、声門閉鎖は良好であった。HE 染色では非再建側と比較すると細胞がやや密になっていることが確認されたが、アルシアンブルー、マッソントリクローム染色では非再建声帯と比較して、明確な差は認めなかった。

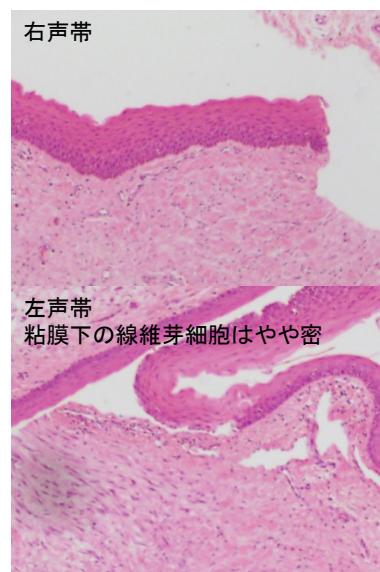


左声帯は損傷後細胞シート移植  
右声帯は損傷のみ

0 ms      8.5 ms      17.5 ms



amplitude 1.5mm  
f=125Hz 声門下圧1.0kPa前後



これらの結果から、ゼラチンハイドロゲル粒子を用いて作製した積層細胞シートによる、声帯粘

膜再生の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	岸本 曜  (Kishimoto Yo)  (80700517)	京都大学・医学研究科・准教授    (14301)	

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