

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18311

研究課題名（和文）培養声帯粘膜におけるバリア機能の傷害と修復の評価

研究課題名（英文）Damage and Repair of Barrier Function in Cultured Vocal Fold Mucosa

研究代表者

河合 良隆（Kawai, Yoshitaka）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：50862223

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：声帯に酸暴露しての上皮バリア機能障害をin vitro環境で再現し、傷害の様式と回復過程を観察した。声帯粘膜上皮由来培養細胞に酸性培地を一定時間曝露する酸傷害を行い、上皮バリア機能を反映する経上皮電気抵抗（TEER）を測定し、一過性の抵抗値減少とその回復を確認した。胃液に含まれる酵素であるペプシンを酸性培地に付加すると抵抗値のさらなる減少が認められた。一方で声帯粘膜上皮細胞表面の微絨毛を走査型電子顕微鏡で確認したところ、酸傷害とペプシン付加酸傷害による微絨毛の減少程度は同等であった。実験結果から上皮バリア機能に傷害が加わる場合、傷害の種類により機能不全に陥る部位に違いが有ることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

粘膜上皮は深層組織を外部刺激から守る物理的障壁（上皮バリア）としての機能を持った重要な構造であり、声帯粘膜においては乾燥、タバコ、胃酸、手術、音声酷使などがバリア機能の傷害因子として指摘されている一方で機能の修復について着目した報告は未だ存在しない。様々な要素が複合して粘膜のバリア機能は構築されているが、本研究では逆流性食道炎による胃酸暴露環境にともなう傷害を培養環境で再現した。本研究の結果、傷害の種類により機能不全に陥る部位に違いが有ることがわかった。バリア機能の十分な評価には様々な傷害手技と多面的な評価手法が必要であることが重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We mimicked acid-induced epithelial barrier dysfunction in vocal folds in an in vitro environment to observe damage patterns and the recovery process. Cultured vocal fold mucosal epithelial cells were exposed to an acidic medium for a set period, and transepithelial electrical resistance (TEER) was measured to confirm a transient decrease and subsequent recovery in resistance. Adding pepsin, an enzyme present in the stomach, to the acidic medium further decreased resistance. Scanning electron microscopy revealed that the reduction in microvilli on the cell surface was similar between acid injury alone and acid injury with pepsin. The results indicate that epithelial barrier dysfunction varies by the type of injury.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：声帯 バリア機能 酸傷害

1. 研究開始当初の背景

(1) 声帯は発声の音源となる重要な器官であり、声帯の最も表層に位置するのが扁平上皮細胞で構成される粘膜上皮である。この粘膜上皮は深層組織を外部刺激から守る物理的障壁(上皮バリア)としての機能を持った重要な構造である(Gill 2015)。上皮バリア機能障害が関与するとされる疾患は皮膚領域においてはアトピー性皮膚炎や乾癬などが知られる(Segre 2006)。声帯ではバリア機能破綻が主原因であると証明された疾患は未だ報告されていないが、乾燥、タバコ、胃酸、手術、音声酷使などがバリア機能の傷害因子として指摘されている(EE Levendoski 2014)。申請者の所属する実験室からも動物実験において長時間発声後に声帯上皮が物理的傷害を受けることを報告しているほか、他施設からも動物実験で胃酸やヒスタミンに曝露されることで喉頭の上皮バリア機能が低下するという(E Erickson 2010, Zhang and Fisher 2012)報告がある。その一方で、声帯粘膜上皮バリア機能の修復について着目した報告は未だ存在しない。

(2) 喉頭肉芽腫症は声帯粘膜上皮に覆われる声帯突起の近傍に肉芽腫が生じる疾患で、胃酸の暴露が主原因であるとされ、制酸薬の内服投与が治療の第一選択となっている。また酸によって声帯粘膜上皮のバリア機能が傷害されることは Ex Vivo の実験で E Erickson 2010 が報告している。現時点声帯粘膜バリア機能の破綻が肉芽腫の直接的な原因であるという証明はなされていないが、それらの間に強い相関が存在する蓋然性は高いと考えられる。

胃食道逆流症に随伴する喉頭臨床症状は週に3回以上 pH4.0 未満の胃酸逆流にさらされることで出現するとされる他、胃で分泌されるタンパク分解酵素であるペプシンが上皮傷害を相乗的に悪化させる。

また、上皮バリア機能が意味する物理的障壁は、上皮の細胞間接着装置であるタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクションなどを意味するものとして扱う文献が多いが、実際は上皮よりも更に管腔側に存在し上皮を被覆する粘液層もバリア機能として寄与することが知られている。粘液層を扁平上皮である声帯粘膜上皮の表面に保持する機構は未だ充分には解明されていないが、声帯粘膜上皮の表面にはマイクロプロジェクションと呼ばれる微絨毛が密集して存在することが知られており(T Kojima 2014)、毛細管現象による粘液の保持に寄与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) 上皮におけるバリア機能低下は軽度なものであれば修復されるが、慢性的な刺激や過度の刺激によってその修復が遅延されることが他臓器の上皮において知られている。粘膜上皮にかかる刺激と粘膜の自己修復能力のバランスが不均衡になった際に臨床問題となる様々な疾患が発症すると考えられる。上述の通り、傷害からの回復過程に着目した評価は声帯において過去に行われておらず、本研究における目的は「声帯粘膜上皮培養モデルを用いた、酸傷害暴露後における上皮バリア機能の自己修復過程を評価すること」である。

(2) 単純な酸の暴露以外にも、異なる種類の刺激を与えることで上皮バリア機能の破綻の様式にも相違が生じる可能性がある。上記の自己修復過程の評価に加えて「傷害の種類による上皮バリア機能の損傷様式と自己修復過程の相違が生じないか検証する」ことも本研究における目的である。

3. 研究の方法

(1) 培養声帯粘膜上皮の品質確認

ラット由来の声帯粘膜上皮を培養するため、以下の方法で培養を行った。Sprague-Dawley ラットの喉頭を摘出、50 U/mL Dispase II で処理した後に実体顕微鏡下に声帯粘膜上皮を摘出、採取した上皮を 0.05% trypsin-EDTA solution で処理して細胞を分離し、195G で5分間遠心分離してカルチャープレートに播種した。

カルチャープレートにはあらかじめフィーダー細胞である 3T3-Swiss 細胞を培養しており、培地には DMEM/HAM 混合培地と F12 培地を 1:1 で混合したものをベースにウシ胎児血清などの添加したものを使用した。

1 週間の培養の後、フィーダー細胞や声帯粘膜上皮に付着していた線維芽細胞を除去するため 0.05% trypsin-EDTA 処理を行い、上皮細胞より先にプレートから遊離するフィーダー細胞と線維芽細胞を除去した。

純度が高くなった上皮細胞を回収し、コラーゲンコートしたカルチャープレートに継代した。培養された細胞がバリア機能を有するかを多角的に評価するため、培養細胞の HE 染色のほかタイトジャンクションマーカーである ZO-1 と Occludin での免疫染色を行った。

(2) 自己修復可能な程度の酸傷害を作り出す条件検討

軽度酸性である pH6.8 培地以外に pH3.0, 4.0 の酸性培地を培養粘膜上皮に曝露させ一定時間経過後に培地を交換して中和し、その後の回復を経時的に評価することとした。経時的な評価として電気抵抗値測定 (TEER; Trans-epithelial electrical resistance) を行い、短期的な評価として 180 分まで確認するほか、最長で 1 日後の TEER を測定した。

評価内容は細胞死の評価を Live-dead stain で行う他、走査型電子顕微鏡による細胞表面の観察を行った。得られた画像をマイクロプロジェクションの部分とそれ以外の部分として 2 値化してそれぞれの面積を測定しその比率を算出することでマイクロプロジェクションの傷害程度を評価した。

(3) ペプシン付加の有無による傷害様式の相違の検討

上記で得られた至適条件での経時変化の観察に加えて、別の傷害条件としてペプシンを付加した酸性培地に培養声帯粘膜上皮を暴露させた。上記と同様に TEER や走査型電子顕微鏡による細胞表面の観察を行い、酸単独の傷害との比較を行った

4. 研究成果

(1) 培養声帯粘膜上皮の品質確認

上記の工程で賠償された培養声帯粘膜上皮は、2-3 層の重層扁平上皮上にタイトジャンクションのマーカである ZO-1 と Occludin が発現していることを確認した (図 1)。生理的なラットの声帯粘膜も 2-3 層の扁平上皮細胞から構成されており、本培養声帯粘膜上皮は十分に生体を再現していることが示唆された。

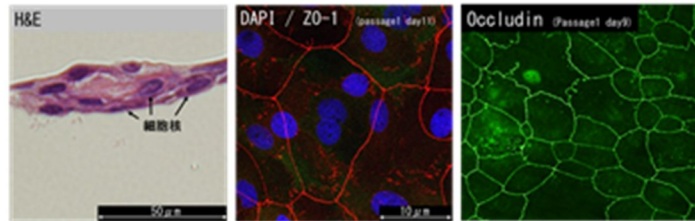


図 1 培養声帯粘膜上皮とタイトジャンクションマーカ

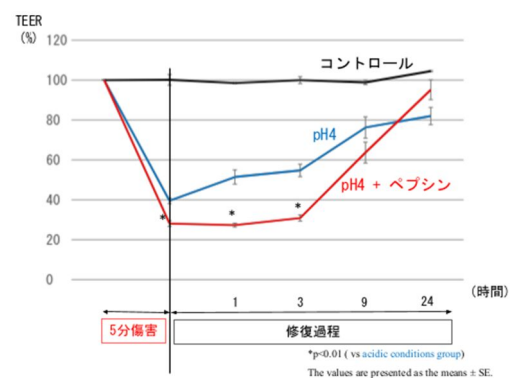
ことが示唆された。走査型電子顕微鏡による観察でもマイクロプロジェクションが確認できた。細胞死の程度を観察するために Hoechst 33342, Ethidium Homodimer-1 を用いて染色を行ったがシートの中央部でも死細胞の数はごく少数であった。その他、タイトジャンクション関連蛋白とされる Claudin 3,4,5,7 の発現も確認できた。

(2) 自己修復可能な程度の酸傷害を作り出す条件検討

ラットにおける胃酸の濃度は pH 3.2-3.9 であり、条件検討を行った結果 最終的に pH4.0 で 5 分間の酸傷害を与える方針となった。同刺激後もとくに死細胞の数が増加しないことを確認した。

(3) ペプシン付加の有無による傷害様式の相違の検討

酸性培地により TEER の減少が認められ、本実験の条件では 24 時間の経過でほぼ酸暴露前の状態に改善が認められた。また胃液に含まれる酵素であるペプシンを酸性培地に付加すると抵抗値のさらなる減少が認められたがこちらも 24 時間の経過でほぼ暴露前の状態まで回復が認められた。



また声帯粘膜上皮細胞表面のマイクロプロジェクションを走査型電子顕微鏡で確認した。

酸傷害とペプシン付加酸傷害による微絨毛の減少程度は同等であり、こちら傷害終了後 24 時間でほぼ暴露前の状態まで回復が認められた。

実験結果から上皮バリア機能に傷害が加わる場合、傷害の種類により機能不全に陥る部位に違いが有ることがわかった。

本研究の結果、傷害の種類により機能不全に陥る部位に違いが有ることがわかった。バリア機能の十分な評価には様々な傷害手技と多面的な評価手法が必要であることが重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児嶋圭介
2. 発表標題 In vitro 実験系でのラット声帯上皮に対する酸性環境とペプシンによる影響
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科 頭頸部外科学会
4. 発表年 2021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
---------	---------