

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791749

研究課題名(和文)喫煙モデル動物の作製と喉頭における神経原性炎症ネットワークの解明

研究課題名(英文) Establishment of smoking animal model and understanding of the effect of smoking on the larynx

研究代表者

上羽 瑠美 (UEHA, RUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10597131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：喫煙が誘因となる喉頭病変の病態生理解明に向けて、タバコ煙溶液を用いた喫煙モデル動物(ラット)の作製法を確立し、組織や炎症性サイトカインの変化を中心に検証した。喫煙により、粘膜上皮が肥厚し、炎症細胞浸潤の増加・声門部粘膜下組織膠原線維の増生・Ki67陽性細胞や分泌腺の増加を認めた。これらの組織変化は長期禁煙により改善した。また、禁煙後に喉頭腺分泌が一過性に亢進するものの、長期禁煙により改善することが判明した。炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、CD3e)、Fibronectin1、Mucin 5、NGFのRT-PCR法による解析では、組織変化を支持する結果であった。

研究成果の概要(英文)：To figure out the mechanism of smoking effect on larynx pathophysiologically, we established how to make a smoking animal model (rats), using cigarette smoke solution, and then we examined mainly tissue alterations and changes in inflammatory cytokines. By smoking, mucosal epithelium became thickened, and increase of inflammatory cell infiltration, submucosal collagen fibers at the glottis, Ki67+ cells in the glottic mucosa, and hyperplasia of laryngeal glands were shown. These alterations improved by long-term smoking cessation. Additionally, though laryngeal gland secretion increased transiently, that was improved by long-term smoking cessation. The results of RT-PCR analyses of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CD3e), Fibronectin1, and Osteopontin supported the organization changes in larynx.

研究分野：喉頭・嗅覚

キーワード：喫煙 禁煙 タバコ 喉頭 炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

喫煙はヒトが日常生活で曝露される最も重大な酸化ストレス源であり、悪性疾患や慢性炎症の発症と強く関与している。喉頭領域では、喉頭癌が喫煙男性に多く、一方喫煙女性では声帯粘膜固有層が浮腫状に腫脹するポリープ様声帯を発症することが知られている。また、咽喉頭異常感のある患者では喫煙者の割合が高く、喫煙による知覚神経への何らかの影響が示唆される。しかしながら、喉頭領域において、In vitro ではタバコ煙濃縮液により声帯の線維芽細胞が活性化、cyclooxygenase 2 や prostaglandin E2 の誘導が解明されている一方、in vivo においては未解明点が多く、喫煙がもたらす病変における病態生理は分子生物学的にあまり解析されていない。

禁煙は喫煙がもたらす病態を改善させる最も効果的な対策と考えられ、喫煙の蓄積効果のリスクが禁煙により非喫煙者のレベルまで減少するには約10年必要であることが示唆されている。しかしながら、喉頭領域の組織障害への喫煙効果が禁煙によりどのように変化するかに関しては研究されていない。

喉頭領域での喫煙及び禁煙の研究が進んでいない一因として、喉頭の解析が可能な喫煙モデル動物の作製法が確立していないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究では以下のことを目的として検証を行った。

喉頭における喫煙による影響を検証するための喫煙モデル動物の確立を目指すこと。モデル動物は喉頭の構造や大きさなどを検討し選定し、薬剤の投与回数や投与量など、作製条件の最適化を検討すること。

モデル動物を用いて、喫煙による喉頭の組織変化(炎症細胞浸潤、細胞増殖、分泌腺の変化、粘膜上皮肥厚など)を評価し、その後の禁煙期間による組織変化の推移を検討することで、喫煙による組織障害と禁煙による組織障害からの変化を解明すること。

喫煙による組織障害と炎症性サイトカインの関連、及び線維化や神経増殖、分泌腺などの各種マーカーの変化を分子生物学的に検証し、臨床における治療戦略となりうる機構を検証すること。

3. 研究の方法

(1) 喫煙モデル動物作製

使用動物として、喉頭の大きさや声帯構造などを考慮して、SDラットを用いた。喉頭と肺における組織学的検証をもとに暴露条件を調整した。タバコ煙溶液(Cigarette smoke solution: CSS)を用いて喫煙モデルを作製後、喫煙期間とほぼ同じ期間(30日間)未処置としたものを禁煙モデル、3ヶ月未処置としたものを長期禁煙モデルとした(図1)。

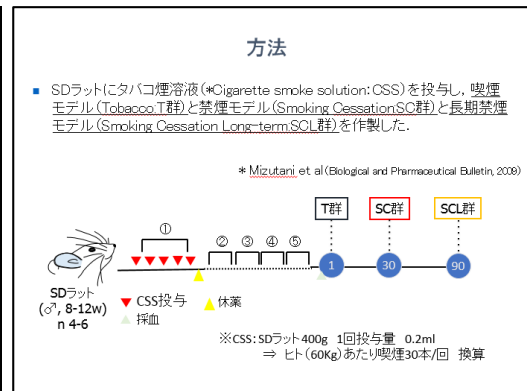


図1. 動物作製方法

(2) 評価項目

血中コチニン濃度測定と肺の組織変化による喫煙モデルの検証

血中ニコチン濃度測定により CSS による喫煙効果を確認し、肺組織の喫煙性障害である肺気腫の確認を行った。

組織学的検討 各種モデルに対し以下の項目を検証した。

1. Elastic van Gieson 染色(上皮・膠原線維・弾性線維)

2. Alcian blue 染色(分泌腺)

3. 免疫染色: CD3(炎症細胞浸潤)、Ki67(細胞増殖)、PGP9.5(神経線維)

分子生物学的検討 RT-PCR 法

1. 炎症性サイトカイン: TNF- α 、IL-6 など

2. 線維化や神経増殖マーカー、分泌腺マーカー: FN1、NGF、MUC5AC

4. 研究成果

血中コチニン濃度測定と肺の組織変化による喫煙モデルの検証

コチニン能動は喫煙直後は上昇しているが禁煙モデルでは検出されなかった(図2)。喫煙モデルの肺組織は、コントロールと比較して肺胞の気腫上変化が強く炎症細胞浸潤を伴っていた。禁煙モデルの肺組織では、炎症細胞浸潤は減少しているものの、肺胞の気腫状変化は継続していた(図3)。

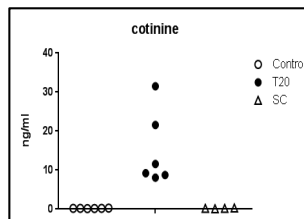


図2. 血中コチニン濃度

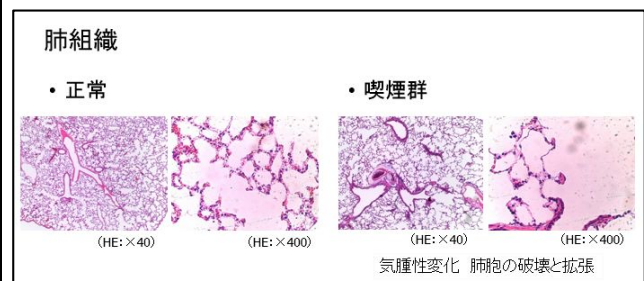


図3. 肺胞の構造変化

組織学的検証

喉頭モデル動物 (Tobacco 群:T 群) では、粘膜上皮の肥厚、炎症細胞浸潤の増加、Ki67 陽性細胞の増加、PGP 陽性神経線維の増加そして声帯粘膜下組織中の膠原線維の増加を認めた。禁煙モデル喉頭 (smoking cessation 群:SC 群) において組織学的には、炎症細胞浸潤の減少や声門部粘膜下組織の膠原線維の減少を認めたが、Ki67 陽性細胞増加と粘膜上皮肥厚は持続していた。分泌腺においては禁煙後により分泌腺が増加した。長期禁煙モデル喉頭 (smoking long-term cessation:SLC 群) では、組織学的には、炎症細胞浸潤はほとんど認めず、上皮の肥厚や神経線維の増生はコントロールと同程度に改善した。禁煙群で有意に増加していた分泌腺は、長期禁煙群ではコントロールと同程度まで減少した。一方、声門部粘膜下組織の弾性線維の増生を認めた (図4・図5)。

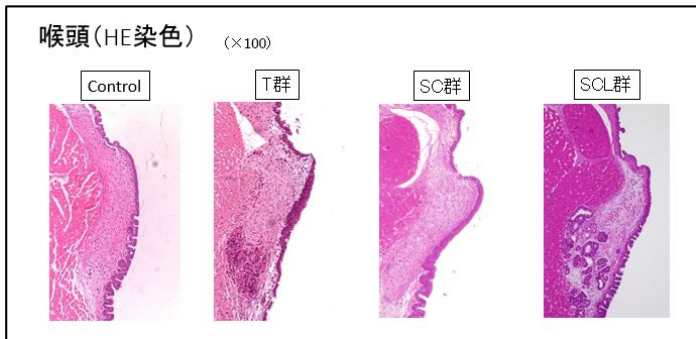


図4. 各群の喉頭 (声門部) 組織

	Control	T群	SC群	SLC群
上皮肥厚	-	++	+	-
粘膜固有層 膠原線維	+	+++	+	弾性線維↑?
炎症細胞浸潤 CD3	±	+	+	±
細胞増殖 Ki67	+	+++	++	+
神経線維 PGP9.5	+	++	+	+
分泌腺 PAS染色	+	++	+++	+

図5. 各群の組織変化

分子生物学的検証

線維化関連マーカー (FN1)、神経増殖マーカー (NGF) は喫煙により増加し、禁煙により減少する傾向を認めた。分泌腺関連マーカーの MUC5AC は、喫煙により分泌が有意に増加し、禁煙後はさらに有意に増加したが、長期禁煙により低下した。

炎症性サイトカインの TNF、IL6 はコントロールと比較して喫煙 (T 群) で有意に上昇した。その後1ヶ月禁煙 (SC 群) と長期禁煙 (SLC 群) では経時的に減少する傾向を認めた。

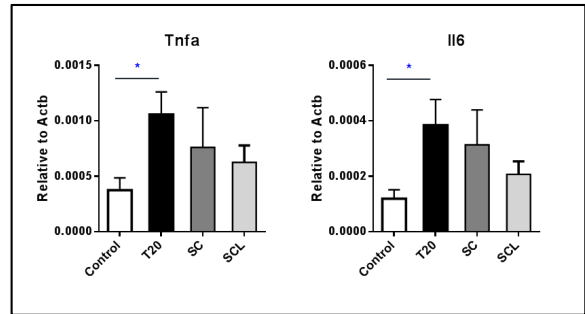


図6. 炎症性サイトカインの推移

総括

本研究により、喉頭の喫煙モデル動物の作製方法が確立され、禁煙モデルとしても研究使用が可能であった。喫煙により上皮の肥厚や細胞増殖能が亢進したが、これらは禁煙後もすぐには改善せず、喫煙後もある程度持続し、長期禁煙により改善することが明らかになった。TNF や IL6 など炎症性サイトカインの変化は組織変化を支持する結果となった。一方、分泌腺においては禁煙後も分泌が一過性に亢進するものの、長期禁煙により改善した。また、炎症により神経が増加し炎症改善とともに減少する傾向を認めたことから、喫煙中及び禁煙後の分泌物の増加や炎症にともなう神経増生が喉頭違和感や咳と関連している可能性及び、長期禁煙により改善する可能性が示唆され、更なる検証が必要と考えられた。

臨床的には、喫煙が一因と考えられている喉頭白板症などの上皮角化傾向の患者に対しては、禁煙後も早期に組織障害が改善しないことを踏まえたうえで、注意深い経過観察が必要である。喫煙に対する組織障害に対しては禁煙により効果があることが示されたが、必要期間が長いことから、喫煙による炎症性サイトカイン上昇を抑制する薬剤投与や上昇した炎症性サイトカインを早期に減少させるような薬剤の開発が今後期待される。

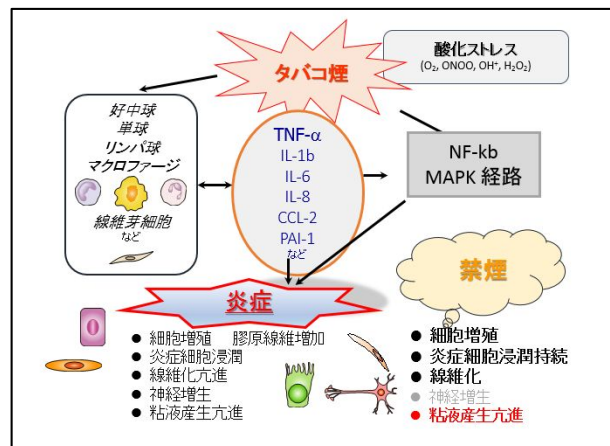


図7. タバコ煙と組織障害機構

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 4件)

上羽瑠美(代表) 喉頭気管における喫煙による影響の解析 - 喫煙モデル動物の作製 -、第 65 回日本気管食道科学会総会、2013 年 10 月 31 日、東京

上羽瑠美(代表) 喉頭における喫煙と禁煙による変化、第 26 回日本喉頭科学会総会、2014 年 3 月 6 日、沖縄

上羽瑠美(代表) 喉頭気管における喫煙モデル動物の禁煙後変化、第 66 回日本気管食道科学会総会、2014 年 11 月 13 日、高知

上羽瑠美(代表) 喉頭における喫煙モデル動物の長期禁煙変化、第 27 回日本喉頭科学会総会、2015 年 4 月 9 日、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

上羽 瑠美 (UEHA, Rumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10597131

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし