

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462696

研究課題名(和文) 培養口腔粘膜を用いた組織工学的手法による声帯再生

研究課題名(英文) Regeneration of Vocal Fold Mucosa Using Tissue-Engineered Structures with Oral Mucosal Cells

研究代表者

千年 俊一 (Chitose, Shun-ichi)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：20299514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：目的) 口腔粘膜から積層培養組織を作製し、自家移植による声帯層構造と物性の再生を試みる。方法) イヌ口腔粘膜をわずかに採取し粘膜上皮細胞と線維芽細胞をそれぞれ分離・培養した。下層に配向性コラーゲンシート、線維芽細胞の上層に粘膜上皮細胞を播種して共培養を行なった。喉頭截開を行い声帯膜様部全長を切除し、培養組織を移植した。結果) 8週間後の作製した培養組織は正常声帯粘膜に類似した形態であった。再生声帯粘膜に規則的な粘膜波動を認めた。再生声帯粘膜は粘膜上皮と線維芽細胞を含む粘膜固有層で構成された組織であった。再生声帯粘膜上皮は連続した薄い重層扁平上皮であり、再生粘膜固有層では弾性線維密度が減少していた。

研究成果の概要(英文)：Objective: The purpose of this study is to regenerate vocal fold mucosa using cultured oral mucosal cells. Methods: A small specimen of oral mucosa was surgically excised from six canines, and epithelial cells were isolated and cultured. The epithelial cells were co-cultured on collagen gels containing separately cultured fibroblasts. The fabricated tissues were autotransplanted to the mucosa-deficient vocal fold. Seven weeks after the transplantation, the vocal fold vibration and morphological characteristics were observed. Results: Laryngeal stroboscopy revealed that the mucosal waves at the transplanted site were regular. Histological findings showed there were fewer elastic fibers in the lamina propria covered with stratified squamous epithelium. The morphology and function after transplantation were more similar to those of a normal vocal fold. Conclusion: The transplantation of the stratified epithelial cell sheet alone has greater ability to regenerate proper vocal fold mucosa.

研究分野：喉頭

キーワード：再生 喉頭 声帯 口腔粘膜 声帯上皮 声帯粘膜固有層 声帯癒痕 声帯溝症

### 1. 研究開始当初の背景

喉頭癌などの切除後に生じる傷害声帯や加齢変化で生じる声帯溝症では、声帯層構造に不可逆性の異常を来している。声帯粘膜の粘弾性は低下し発声時の粘膜波動が不規則あるいは消失するため、硬起性や氣息性の嗶声になり日常生活でコミュニケーション障害を生ずる。

### 2. 研究の目的

難治性疾患である傷害声帯や声帯溝症に対する再生治療の前段階として、培養口腔粘膜を用いて正常声帯粘膜と同様の層構造および同等の機能をもった声帯粘膜を *in vitro* で再生する。

### 3. 研究の方法

積層培養組織（声帯粘膜モデル）の作製と組織学的・形態学的検証を行なう。動物実験用ビーグル犬から採取した口腔粘膜組織 3×3mm を用いる。口腔粘膜組織を上皮細胞と線維芽細胞に分離培養した上で、粘膜重層上皮と粘膜固有層から成る声帯粘膜モデルを作製する。粘膜固有層にあたるコラーゲンゲル内に含まれる線維芽細胞の足場として、配向性を有するメッシュコラーゲンシート（アトリー社）を用いる。次に、作製した声帯粘膜モデルに対して、HE（Hematoxylin-Eosin）染色、各種免疫組織化学染色、走査型電子顕微鏡を行なう。正常声帯粘膜（図 1）と作製した声帯粘膜モデル（図 2）の構造上の類似性を比較検討する。

<声帯粘膜モデルの自家移植> まず喉頭截開を行い声帯膜様部全長を切除した。切除部に声帯粘膜モデルをフィブリン糊で固定し吸収糸で縫合した。8 週間後に喉頭を摘出して吹鳴実験および組織学的検討を行った。

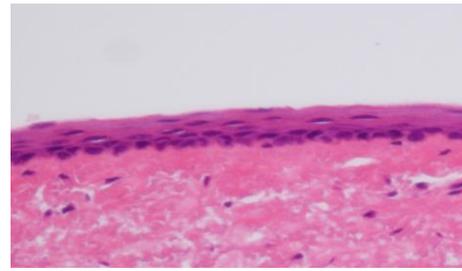


図 1) 正常声帯粘膜（ビーグル）

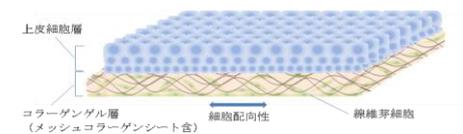


図 2) 声帯粘膜モデルの作製

### 4. 研究成果

1) 口腔粘膜由来の 2 層構造の声帯粘膜モデルを作製できた。2) HE 染色で、上層細胞の重層化（図 3）と下層コラーゲンに含まれる細胞の増生（図 4）を確認した。3) 重層化した上層細胞は抗 Cytokeratin 抗体で全層が陽性であった（図 5）。4) 上層細胞の細胞間は抗 E-Cadherin 抗体で全層が陽性であった（図 6）。5) 走査型電子顕微鏡にて、上層細胞の表面は広い細胞間隙を認めた。また、一部の上層細胞の表面に微絨毛が確認できた（図 7）。5) 下層の間質細胞は抗 Vimentin 抗体が陽性であり、正常声帯上皮の粘膜固有層に類似していた（図 8）。6) 重層化した上層細胞の基底部分では抗 IV 型コラーゲン抗体が陰性であった。

移植後の摘出喉頭の吹鳴実験（図 9）では、再生声帯粘膜に規則的な粘膜波動を認めた（図 10）。摘出喉頭の免疫組織化学的検討で、再生声帯粘膜は粘膜上皮と線維芽細胞を含む粘膜固有層で構成された組織であった（図 11）。また、再生声帯粘膜上皮は切除端との境界のない連続した薄い重層扁平上皮であり、再生粘膜固有層では弾性線維密度が減少していた（図 12）。

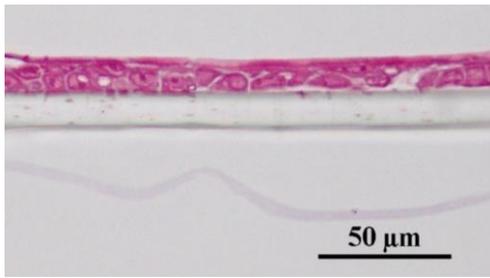


図 3) 上層細胞の重層化

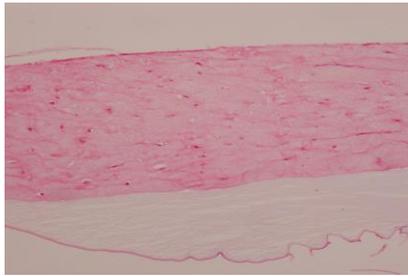


図 4) 下層細胞の増生



図 5) 抗 Cytokeratin 抗体による上層細胞の陽性所見



図 6) 抗 E-Cadherin 抗体による上層細胞間の陽性所見

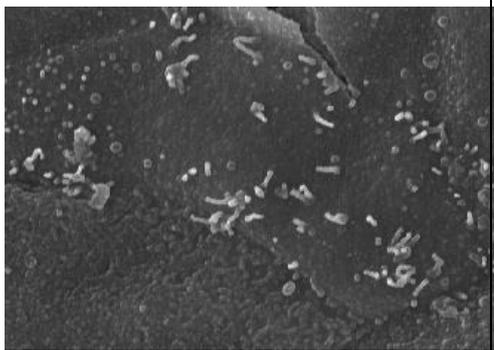


図 7) 表面細胞に微絨毛の確認

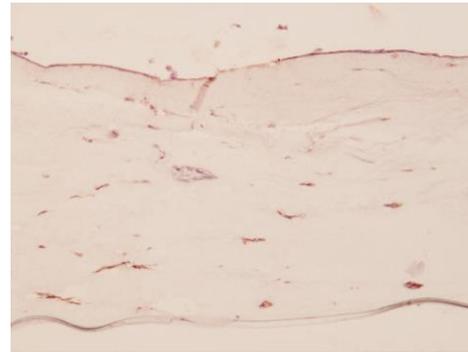


図 8) 抗 Vimentin 抗体による下層の間質細胞の陽性所見

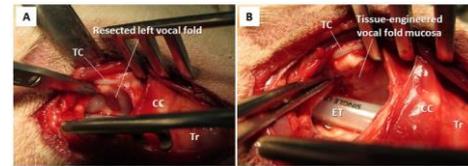


図 9) 声帯モデルの移植



図 10) 喉頭ストロボ所見 上段) 右声帯移植側 下段) 右声帯癒痕モデル

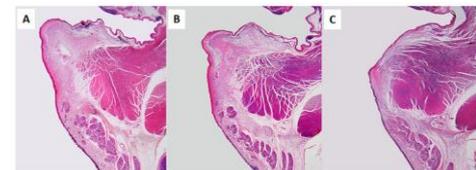


図 11) 左: 正常声帯 中: 移植声帯 右: 切除のみの癒痕声帯

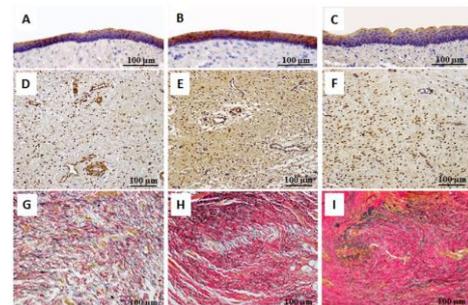


図 12) 左：正常声帯 中：移植声帯 右：切除のみの癒痕声帯

細胞培養手技を用いて、口腔粘膜から重層上皮細胞と線維芽細胞から成る声帯粘膜モデルを作製することができた。作成した声帯粘膜モデルは正常声帯粘膜の構造と類似する部分が多かったが、上皮基底膜の存在は確認できなかった。過去の報告によると、三次元的な組織構築により上皮細胞と線維芽細胞間の相互作用が働くことにより、積層培養組織の形態維持が可能になるとされる。また、積層培養組織は、移植後の粘膜再生を促進し粘膜肥厚や粘膜固有層の線維化を抑制する働きがあるとされる。このことから本研究で作製した声帯粘膜モデルは、自家移植後の粘膜上皮および粘膜固有層の組織親和性と形態維持ができるものと期待される。声帯粘膜モデルの自家移植に関しては培養段階での他家由来の血清や増殖因子を使用する問題が残るが、本研究で作製した声帯粘膜モデル他家由来の細胞や増殖因子を用いない培養条件下で組織作製が可能である。今後は、声帯粘膜モデルの粘膜固有層にコラーゲン以外の細胞外マトリックスを添加あるいは誘導することで、声帯振動に有利な細胞外マトリックスの配列と強度を持った組織構造の再生が必要と考えられる。

まとめ) 口腔粘膜の小片から作製した声帯粘膜モデルは、良好な組織親和性によって声帯層構造を再生できる。また、移植後の再生声帯粘膜には規則的な声帯振動を得るための物性がある。しかし、より良好な発声機能に必要な声帯粘弾性を考慮した場合、再生粘膜固有層の線維密度やヒアルロン酸量などの細胞外マトリックスの調整に課題が残されている。

研究成果とそのインパクト)

本研究は、従来の音声障害に対する治療法

とは全く異なり、*in vitro* での自家組織の再構成培養を経て組織工学的手法を利用し移植することにより、本来の声帯機能の回復を目指している。作製した培養重層組織を実際に声帯粘膜欠損部へ移植し、移植後の安定性を獲得できるかが今後の重要なポイントになる。これまでにヒト皮膚（表皮と真皮）を用いた 3 次元再構成培養法はすでに確立されており、熱傷後治療などにおいて移植部位に応じて各層の構造や厚さを自在に変えることができる。今回の実験結果から、粘膜においても粘膜上皮と粘膜固有層の 3 次元再構成培養は十分可能であり、移植後の声帯層構造の再生は可能と考えられる。また、声帯粘膜固有層の再生に配向性材料を用いたことで細胞外マトリックスの配列を任意にすることができ、声帯粘膜特有の線維方向をもった組織を作製することが可能であり、声帯の伸縮に対応できると考えられる。近年、培養口腔粘膜上皮を用いて、食道、心筋や角膜 7) において臨床応用した報告がみられる。但し、声帯は振動体であり他の臓器とは異なる粘膜の層構造が必要であり、さらには移植後の安定的生着が問題になる。しかし、組織片を直接自家移植することと異なり自家培養組織の移植は周囲組織との親和性が高く生着しやすいという利点がある。また、培養層構造の下層に強度を備えた配向性メッシュコラーゲンシートを用いることで移植後の安定性・機能が保たれると考えられる。培養口腔粘膜を用いた組織工学的手法による声帯への自家移植は、粘膜再生が期待できない声帯病変に対して、低侵襲な手技として利用できる可能性があり音声外科の観点からも今後の傷害声帯や声帯溝症の治療に大きく貢献するものと思われる。

##### 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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Mioko Fukahori, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato, Shintaro Sueyoshi, Takashi Kurita, Hirohito Umeno, Yu Monden, Ryoji Yamakawa: Regeneration of vocal fold mucosa using tissue-engineered structures with oral mucosal cells. Plos ONE 11(1), 2016: e0146151

[学会発表] (計 5 件)

Shun-ichi Chitose, Mioko Fukahori, Kiminori Sato, et al: Vocal fold cover layer with a tissue-engineered structure containing epithelium and fibroblast of oral mucosa. AAO-HNSF 2013 Annual Meeting & OTO EXPO (Vancouver 2013.9)

Mioko Fukahori, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato, et al: Regeneration of vocal fold mucosa using a tissue-engineered structure with oral mucosal cells. 18th WCBIP/WCBE (Kyoto, 2014.4)

Mioko Fukahori, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato, et al: Regeneration of vocal fold mucosa using cultured oral mucosal cells. Combined Otolaryngology Spring Meeting (Boston. 2015.5)

深堀 光緒子、千年 俊一、佐藤 公則、ほか: 培養口腔粘膜を用いた声帯粘膜再生の試み. 第 66 回日本気管食道科学会 パネルディスカッション (高知. 2014.11)

深堀 光緒子、千年 俊一、佐藤 公則、ほか: 培養声帯粘膜の移植による声帯粘膜層構造の再生—重層上皮と積層組織の比較検討—. 第 27 回日本喉頭科学会 (東京. 2015.4)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

千年 俊一 (Shun-ichi Chitose) 久留米大学・耳鼻咽喉科頭頸部外科・准教授 研究者番号: 20299514

### (2)研究分担者

深堀 光緒子 (Mioko Fukahori) 久留米大学・耳鼻咽喉科頭頸部外科・助教 研究者番号: 50529310

佐藤 公則 (Kiminori Sato) 久留米大学・耳鼻咽喉科頭頸部外科・客員教授 研究者番号: 70196228

梅野 博仁 (Hirohito Umeno) 久留米大学・耳鼻咽喉科頭頸部外科・教授 研究者番号: 40203583