

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462697

研究課題名(和文) マウス声帯の病態生理解明に関する研究

研究課題名(英文) Research for Elucidating Pathophysiological Mechanism in the Vocal Folds in Mice

研究代表者

山下 勝 (Masaru, Yamashita)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：10635519

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)：声帯は筋の上にプリンのような組織がのったような構造をしている。このプリン(カバー)の部分の粘り気や弾力を調整する細胞や組織の組成については未知の部分が多い。そのため、遺伝子改変動物への研究応用が期待される、マウスの新実験モデルを作成した。体内の組織は絶えず古い細胞と新しい細胞とが交換されるため、新しい細胞の供給源があるはずである。その候補としての骨髄からの細胞を追跡するため、蛍光細胞(GFP)をもつマウスの骨髄をもたないマウスの骨髄に移植した。また、そのマウスの声帯を頸部を切ることなく内視鏡下で傷つけることに成功した。同モデルの応用で声帯傷害から回復までの過程の研究が促進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The vocal folds have unique structure, which contains a "Pudding" layer on an intralaryngeal muscle layer. Many researchers had tried to elucidate pathophysiological mechanism in the vocal folds, but wound healing process and anatomical understanding are still unclear. We, therefore, established two new mouse surgery models. The first model is intra-bone bone marrow transplantation model in mice. To track bone marrow derived cells in the vocal folds, bone marrow tissue from transgenic mice with expressing green fluorescent protein was transplanted into femoral bones of wild-type mice. The other is an endoscopic injury model to vocal folds in mice. Since their vocal structures are very tiny, this procedure was very challenging without open cervical surgeries. We established new surgical tools to create vocal fold injuries without any lethal damage. The application of these models and commercially available gene-manipulated mice would enhance the researches in the vocal folds.

研究分野：喉頭科学

キーワード：マウス声帯 内視鏡下手術 骨髄内骨髄移植

1. 研究開始当初の背景

声帯の粘膜は粘弾性もち、この程度により良好な発声機能が維持されている。粘膜の物性や質量の変化を生じると、たとえ筋肉を中心とする神経・運動系が正常に機能していても大きな機能障害を生じる。よって、この声帯粘膜の物性を調節する因子の解明がさまざまな声帯疾患治療や再生治療の鍵となる。

声帯ポリープや声帯結節など嘔声をきたす疾患は、発声による過度の声帯刺激や炎症に続いて非可逆的な変化を生じて起こるとされる。一方でほとんどの症例はこのような音声酷使や炎症後に何の変化も生じないで正常にまで回復する。この2つの群の間には創傷治癒機転において何らかの差異が存在するはずであり、この差異を検出することが病態の解明・治療や発症予防に寄与するものと考えられる。また、声帯手術後や特発性に癒痕を生じる癒痕声帯という難治の病態があり、いったんこの病態を生じると終生ひどい嘔声に悩まされ、現在のところ有効な治療方法は存在しない。疾患の本体は声帯粘膜の不可逆的な線維化であるが、この癒痕が生じるメカニズムの解明も望まれているところである。さらに喉頭癌などによって切除された粘膜は小さいものは切除したまま上皮化を待ち、大きなものは再建材料などを遊離・有茎弁によって作成することとなるが、当然のことながらしなやかな粘膜が再生されるわけではなく、粘弾性をもつ声帯粘膜を再生させる技術はいまだ確立されていない。

病態の解明や組織の修復を考える前に、そもそも正常声帯粘膜の細胞代謝回転がどのようにおこなわれているのかについても未知の点が多く、Side Population 細胞や Vitamin A を含有する Stellate 細胞など幹細胞の候補もいくつか挙げられているが確定されていないのが現状である。声帯粘膜に限らず、体内のあらゆる組織において、それを構成する細胞は定期的に古いものから新しいものへと更新されていく。もし新しい細胞の源となる幹細胞や前駆細胞が存在するとするならば、絶えず古い細胞に取って代わっているものと考えられる。声帯粘膜の細胞供給について考えると、他の実質臓器と異なり、声帯粘膜の内腔側は空気に触れているため、現実的には内腔面側からの細胞供給はおこりえない。よって局所に生来存在する組織幹細胞あるいは骨髄から全身を循環する細胞中の幹細胞がこの役割を担っていると考えられる。一方、声帯は様々な細胞群で構成されているため、組織幹細胞を直接探索するには困難を極めると予想される。ゆえに骨髄由来の細胞が声帯組織構築に寄与しているのかどうかを判明させることが重要であると考えた。声帯粘膜における細胞代謝回転の機構を明らかにすること、また実

際に声帯傷害を作成した時の創傷治癒機転における骨髄細胞の寄与の程度を明らかにする目的で本研究を計画した。

従来、声帯粘膜の研究は主にラット以上の大きさをもつ哺乳類において行われてきたが、遺伝子改変動物における将来の研究展開を考えると、マウスの実験系の確立が重要である。動物自体の大きさはラットの10分の1と技術的障壁は高いが、下記2つの実験モデル作成をマウスにおいて計画した。

2. 研究の目的

(1) マウス骨髄内骨髄移植モデルの作成。声帯粘膜の細胞の細胞代謝回転を観察する目的で、大腿骨骨髄内への骨髄移植のモデルマウスを作成する。従来研究では標識のついた骨髄細胞を尾静脈から投与されていたが、この方法では骨髄細胞がいきなり全身を循環することとなり、生理的状況とは大きく異なる。大腿骨は頸部からも遠くはなれており、手術による直接侵襲が声帯粘膜に与える影響は限りなく少ないと考えた。

(2) 内視鏡下声帯傷害モデルの作成。マウスにおいて頸部外切開を用いて声帯傷害を行うと、窒息などの致死の合併症を生じやすいため、従来最小の動物としてもラットにおいて行われてきた、内視鏡下声帯傷害モデルをマウスにおいて行うモデルの確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) C57/BL6 バックグランドの雄 GFP トランスジェニックマウスを安楽死させ、四肢から骨髄を針にて回収し、野生型の雌 C57/BL6 マウスに骨髄移植を行う。1匹から得られた骨髄を2等分し2匹のレシピエントに供する。全身麻酔下のレシピエントの片側大腿骨を露出し、手術用ドリルにてより太さのある近位側に2mmの小孔をあけて自己の骨髄を可能な限り1mlシリンジに付けた22ゲージ針にて吸引除去する。その直後にドナーの骨髄をゆっくりと同部から注入し、周囲の結合織にて骨にあけた小孔を閉鎖、筋と皮膚を4-0パイクリル糸で縫合する。2種の動物の遺伝子は相同なので、理論上拒絶反応は生じない。なお、循環している血管内の骨髄由来細胞を可能な限り除去する目的で、喉頭組織採取前に50ml以上の十分量のリン酸緩衝生理食塩水によって全身灌流を行い、血管内の血液細胞を可能な限り除去する。

(2) マウス内視鏡下手術用の直達喉頭鏡、手術機器を作成する。さらにC57/BL6マウスに腹腔内注射により全身麻酔を行い、さらに口腔・咽頭・喉頭の表面麻酔を行う。オリンパス社製の30度耳科手術用針状鏡を使用して、声帯の観察下に右声帯の傷害モデルを作成する。

4. 研究成果

(1) ラットで事前に行った骨髄内骨髄移植実験結果より、ドナー大腿骨からレシピエント大腿骨への移植がマウスでも容易に行えると考えていたが、物理的な骨の脆弱性、動物のサイズが小さいことより手技の確立に難渋した。初期に実験したマウスでは大腿骨の骨折を生じたが、骨髄腔内でドリルを回転させずに、鋭匙などで穿破することにより、骨折させることなく骨髄内骨髄移植を行うことが可能となった。(図1)
少数の結果ではあるが、低侵襲であり、覚醒後すぐに歩行が可能であった。術中・術後死は一例も認めなかった。

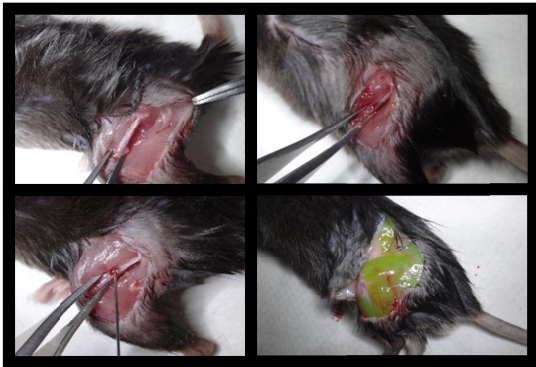


図1. マウス骨髄内骨髄移植モデル
左上: 左大腿骨の露出
右上: 骨開窓
左下: 骨髄内容の吸引除去
右下: ドナーの GFP マウスの大腿部

経心全身灌流にて血液を洗い流し喉頭組織を採取することが可能となった。(図2)

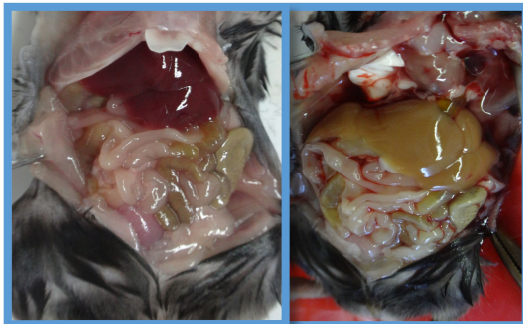


図2. マウス経心全身灌流
左: 全身灌流前
右: 全身灌流後 (肝臓の色調が白色に変化)

(2) 声帯傷害の作成するため、マウス用の喉頭直達鏡(図3)および三種類の微小手術機器(図4)を製作した。

麻酔に関しては内視鏡下での経口手術のため、吸入麻酔を使用することができない。よって腹腔内注射による全身麻酔下において、オリンパス社製30度鼓膜斜視鏡によって

マウス声帯を確認することとした。

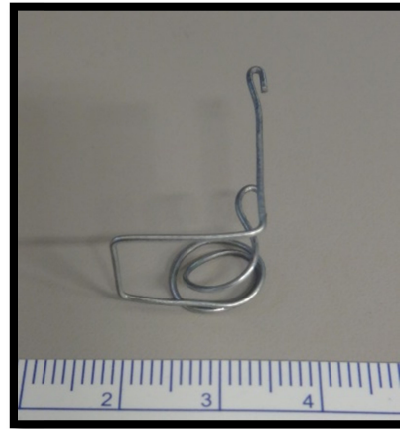


図3. マウス喉頭直達鏡(仰臥位で使用)

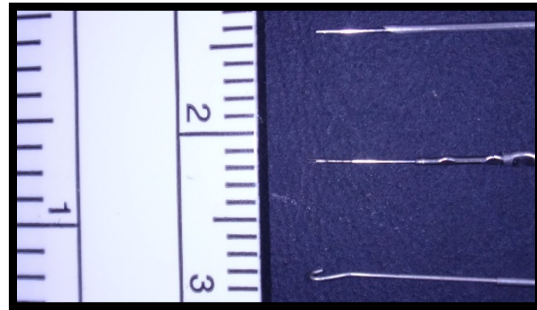


図4. 作成した微小手術器具
上から、針、フォーク、フック。

作成した微小手術機器によって右側声帯の傷害が可能となり(図5)、同手術によって手術関連操作によって死亡した個体は認めなかった。

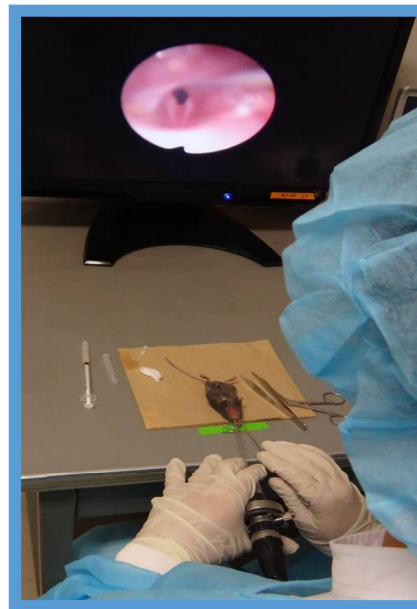


図5. マウス内視鏡下声帯傷害の様子

覚醒後の運動制限や窒息の所見を認めず、実用的な手法と考えられた。骨髄内骨髄移植後2ヶ月および3ヶ月経過した動物に対して、片側の声帯傷害を作成し術後一週間で標本採取とした。標本の作成およびGFPの検出に困難を生じたため、キメラ率の算出や声帯粘膜への骨髄移行状況までは確認できていない。

この内視鏡下声帯粘膜傷害モデルは声帯傷害からの組織修復の過程を確認するツールとして極めて有望であると考えられた。

(3) 将来の展望

今後はこれら2つのモデルを応用してデータを蓄積するとともに、手術後の経過時間や傷害程度のバリエーションを増やし、市販の多種ノックアウトマウスへの応用・展開を検討する。炎症・外傷時の創傷治癒機転の鍵となるターゲットが判明すれば、その蛋白発現を増強・減弱させることにより、予期される自然経過を改変させることができる。声帯の病変が生じる前の予防法発見とともに新規の治療方法の開発にも大きく近づく可能性を秘めている。

また、これらの成果をもととして、マウスでは現実的には困難かもしれないが、声帯の傷害手術後に、創傷治癒の促進または傷害の抑制因子の局所投与などを行い、新規治療薬の創薬・有効性・安全性評価について検討していくことも可能となると考える。

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)

山下 勝、岸本 曜、Nathan V. Welham、平野 滋、声帯粘膜における組織幹細胞同定の試み、日本気管食道科学会会報、査読無、67(2)、2016、pp. 99-100.

〔学会発表〕(計 1 件)

山下 勝、岸本 曜、Nathan V. Welham、平野 滋、声帯粘膜における組織幹細胞同定の試み、第67回日本気管食道科学会、H27年11月19日-20日、福島市、シンポジウム。

〔図書〕(計 1 件)

Yamashita M, Kitani Y, Kanemaru S-I, Springer Japan, Regenerative Medicine in Otolaryngology, Chapter 10; Laryngeal Framework Regeneration, 2015, 147-160.

Kanemaru S-I, Omori K, Yamashita M, Nakamura T, Springer Japan, Regenerative

Medicine in Otolaryngology, Chapter 15; Regeneration of the Trachea, 2015, 225-234.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
なし

取得状況(計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 勝 (YAMASHITA, Masaru)
京都大学・大学院医学研究科・耳鼻咽喉科・頭頸部外科・助教
研究者番号：10635519

(2) 研究分担者

金丸 眞一 (KANEMARU, Shin-ichi)
公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院・第5研究部・研究主幹
研究者番号：00271510

中村 達雄 (NAKAMURA, Tatsuo)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・臓器・器官形成応用分野・准教授
研究者番号：70227908

(3) 連携研究者

前谷 俊樹 (MAETANI, Toshiki)
公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院・第5研究部・研究員
研究者番号：90346669

金井 理絵 (KANAI, Rie)
公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院・第5研究部・研究員
研究者番号：30574008

辻 拓也 (TSUJI, Takuya)
公益財団法人田附興風会医学研究所北野病院・第5研究部・研究員
研究者番号：00543266