

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10828

研究課題名(和文) 脂肪幹細胞を用いた声帯再生の基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental research of the vocal cord regeneration using canine Adipose Derived Regenerative Cells (ADRCs)

研究代表者

梅野 博仁 (Umeno, Hirohito)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40203583

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)：声帯内自家脂肪注入術後の脂肪吸収を防止するため、成犬の脂肪由来再生細胞(ADRCs)を混ぜた脂肪組織を声帯に注入すると、手術後1年で脂肪単独注入より多くの脂肪組織が残存し、脂肪組織内の血管内皮細胞数が多い傾向がみられた。ADRCsの肝細胞増殖因子産生能がqPCRで確認できたが、分化誘導で多分化能は確認できなかった。

ADRCsを用いて声帯粘膜上皮再生と、声帯粘膜・筋層再生を試みた。ADRCs注射群では1年後の声帯振動は良好であった。病理学的には声帯上皮と筋層の再生効果は明らかではなかったが、粘膜にヒアルロン酸増生が確認でき、再生した粘膜は肥厚し疎な膠原線維と弾性線維の増生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

片側声帯麻痺や萎縮による嚙声や嚙下障害に対する声帯内自家脂肪注入術は、安全で有効な機能改善手術であるが、唯一の欠点は術後の自然な脂肪吸収による手術効果の減少である。本研究により、採取した脂肪由来再生細胞(ADRCs)を脂肪組織と混ぜて声帯に注入すると、手術効果を維持できる可能性が示唆された。

さらに、喉頭癌の声帯切除や外傷による声帯損傷に対する声帯の再生医療にADRCsを用いることで、声帯粘膜の再生が促される可能性が声帯吹鳴実験と病理組織学的評価によって示された。

研究成果の概要(英文)：Canine Adipose Derived Regenerative Cells (ADRCs) combined with the autologous fat was injected into the canine vocal folds to prevent the post-operative fat absorption. At the side of ADRCs injection, larger fat graft area and more vascular endothelial cells were observed compared to the control side. ADRCs produced more hepatocyte growth factor (HGF) than normal fat tissue. HGF-producing ability of ADRCs was able to confirm by qPCR, but the multi-differentiation ability was not able to confirm by the induced differentiation. Good vocal fold vibration had seen with ADRCs injection group according to the blowing examination. The pathological reproduction effect of the epithelium and muscular layer was not clear. However, hyaluronic acid production could confirm in lamina propria. The regenerate lamina propria thickened and detected that the sparse collagen fiber and hyperplasia of elastic fiber.

研究分野：喉頭科学

キーワード：声帯再生 脂肪由来再生細胞 声帯上皮 声帯粘膜 声帯筋層 肝細胞増殖因子 吹鳴実験 病理組織学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 一側声帯麻痺や声帯癒痕・溝症に対する嚥声や嚥下障害に対する声帯内自家脂肪注入術は有効な手術である。しかし、術後に注入された脂肪の自然吸収が唯一の課題であり、脂肪吸収を抑制させることが手術効果の継続に繋がるため、研究が行われている。

(2) 音声機能は人が人らしく生きるための重要なコミュニケーション機能の一つであるが、喉頭癌の声帯切除手術後や喉頭外傷などによって生じる声帯癒痕、加齢変化で生じる声帯溝症、声帯麻痺は患者の音声機能を著明に低下させる。しかしながら、損傷した声帯に対する有効な再生医療は実際の臨床では行われていないのが実情である。

## 2. 研究の目的

(1) 声帯内自家脂肪注入術において、脂肪由来再生細胞 (Adipose Derived Regenerative Cells: ADRCs) を用いて脂肪吸収を抑制させることが研究の目的である。

(2) 声帯損傷に対し、培養の必要がなく安全性が高い ADRCs を用いて声帯を再生させ、声帯の機能を改善させることが研究の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) ビーグル犬 2 匹を用いて米国 Cytori therapeutics 社製 Celution™system を用いて ADRCs を採取し、脂肪細胞のみ注入した声帯と ADRCs を脂肪に混ぜて注入した声帯との残存した脂肪組織の量と脂肪細胞周囲の血管増生の比較検討を実験から 1 年後の摘出喉頭で行った。また、ADRCs 中に脂肪幹細胞が含まれる可能性を CD34 と CD90 染色で確認した。さらに ADRCs における血管増殖因子である HGF の発現を qPCR で確認した。ADRCs の分化誘導能力についても検討した。

(2) 脂肪幹細胞が声帯再生に及ぼす影響を調べる目的のため、ビーグル犬 4 匹を用いて 1. 声帯粘膜上皮の損傷、2. 声帯筋までの損傷の 2 つのモデルを作成した。ADRCs の声帯内注入により、この 2 つのモデルの声帯層構造の再生がどこまで可能かについて、ADRCs を注入しなかった対側声帯と比較し、病理組織学的検討を行った。また、喉頭全摘後の声帯振動を観察するため、吹鳴実験も行った。

## 4. 研究成果

(1) 成犬の脂肪細胞から採取した ADRCs は CD34 と CD90 染色で陽性の結果が得られ、脂肪幹細胞の存在が示唆された。ADRCs の total RNA を QIAGEN 社の RNeasy mini kit で精製後、Invitrogen 社の Superscript II (Oligo-dT) にて逆転写を行い、合成した cDNA を 1ul 用いて qPCR を行なった。その結果、ADRCs の方が脂肪組織より多くの HGF の発現が認められた (図 1)。しかし、ADRCs の分化誘導では多分化能は確認できなかった。

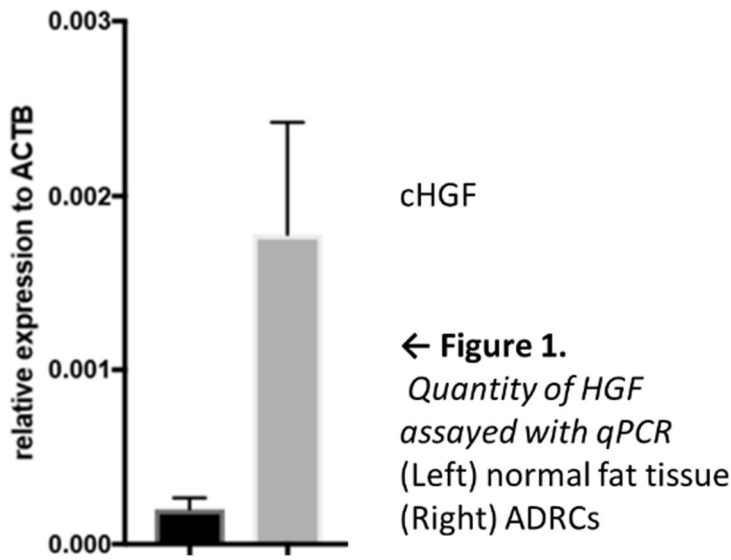


図 1

( 2 ) 実験から 1 年後の摘出喉頭の連続段階組織標本による脂肪組織の面積計測により、ADRCs を添加した脂肪組織を声帯に注入した群が脂肪組織のみを声帯に注入した群よりもより多くの脂肪組織が残存する傾向を認めた ( 表 1 , 図 2 ) 。

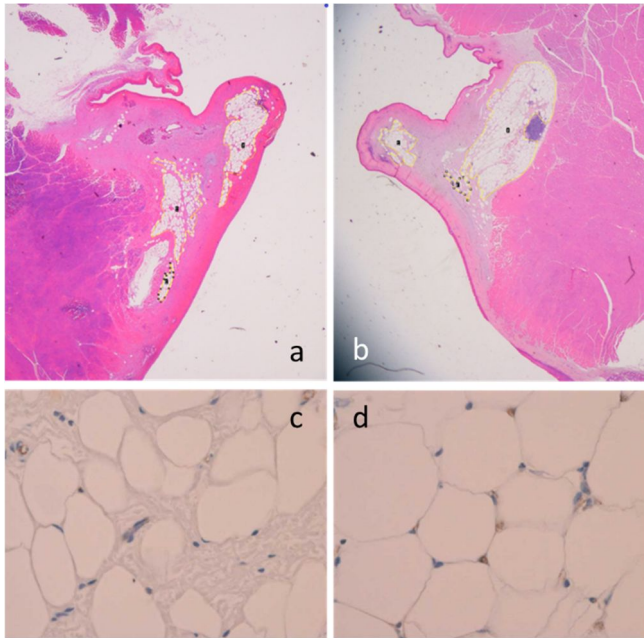
	canine	Left : control	Right : ADRCs +
Fat graft area (injected volume)	#1 canine	$1.56 \times 10^5$ (1ml)	$1.36 \times 10^5$ (1ml)
	#2 canine	$1.79 \times 10^5$ (1ml)	$2.96 \times 10^5$ (0.7ml)
Number of vascular endothelial cells around adipocyte	#1 canine	169	203
	#2 canine	192	227

表 1 . Histological findings

(Top) Total area of injected fat graft and injected fat volume, scale:  $\text{nm}^2$

(Bottom) Number of vascular endothelial cells around adipocyte in randomly-selected 40 fields of 400X microscope

また、脂肪組織内の血管内皮細胞数は ADRCs を添加した脂肪組織を声帯に注入した群が脂肪組織のみを声帯に注入した群よりも多い傾向がみられ、ADRCs が注入された脂肪細胞の方が良好な血流で栄養されていた可能性が示され、HGF などの血管増殖因子産生が脂肪生着に有利に働いた可能性が示唆された ( 図 2 ) 。



( 図 2 )

**図 2 . Microscope findings**

(Top) vocal fold coronal section HE stain

(Bottom) vascular endothelial cells factor VIII stain

**ac/bd** : control side/ADRCs + side

( 3 ) 実験から 1 年後に喉頭を摘出し吹鳴実験の様子をビデオ録画し、声帯振動状態を観察した。その結果、声帯上皮欠損モデルと声帯筋層欠損モデルの双方において、ADRCs + 脂肪細胞を注射した声帯の振幅と粘膜波動は大きかった。乳酸リンゲル液のみを注射した声帯の振幅と粘膜波動は小さかった。

病理学的検討では、上皮欠損モデルでは ADRCs + 脂肪細胞注射群と乳酸リンゲル液注射群との間に再生した上皮に差は認めなかった。筋層欠損モデルでは ADRCs + 脂肪細胞を注射した群の声帯にヒアルロン酸の産生を認めた ( 図 3 a, b : アルシアンブルー染色 )。

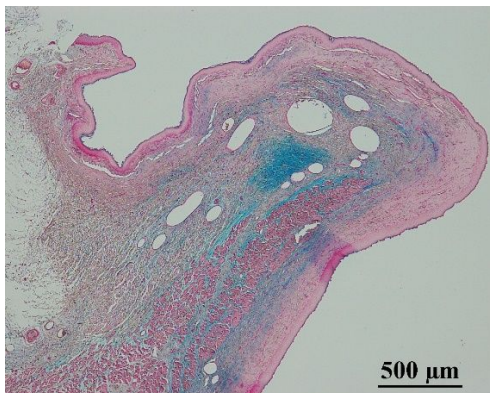


図 3a : 乳酸リンゲル液を注射した声帯

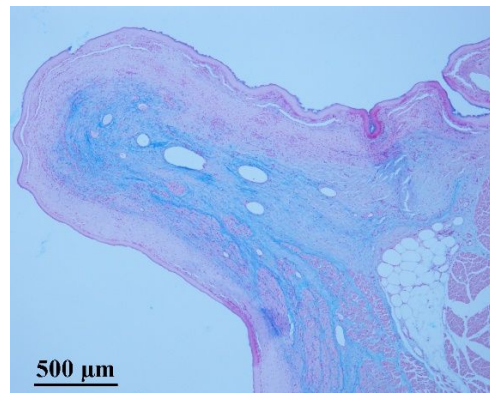


図 3b : ADRCs + 脂肪細胞を注射した声帯

筋層欠損モデルでは ADRC s + 脂肪細胞を注射した群の声帯では再生粘膜はより厚くなり、  
膠原線維も多く産生されていた ( 図 4 a, b : EVG 染色 )。

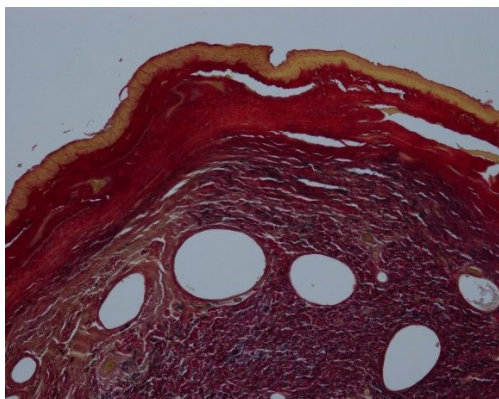


図 4 a : 乳酸リンゲル液を注射した声帯

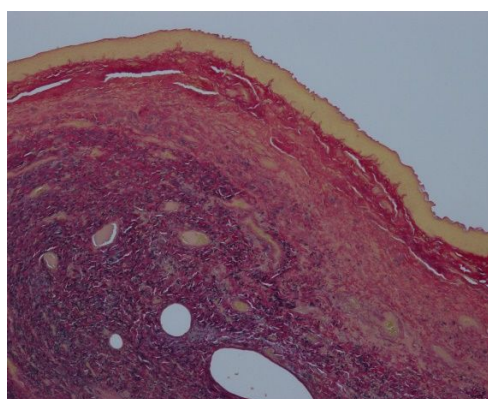


図 4 b : ADRC s + 脂肪細胞を注射した声帯

筋層欠損モデルでは、膠原線維の局在は乳酸リンゲル液を注射した声帯では菲薄化した粘  
膜全層に密に沈着していたのに対し、ADRC s + 脂肪細胞を注射した声帯では膠原線維は粘  
膜深層で疎となり、同部に弾性線維の増生を認めた ( 図 5 a, b : マッソントリクローム染色 )。

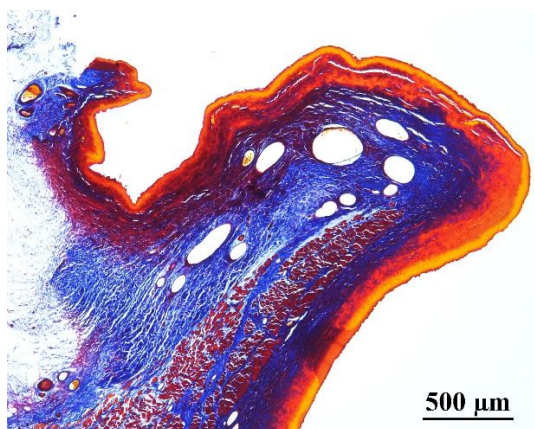


図 5 a : 乳酸リンゲル液を注射した声帯

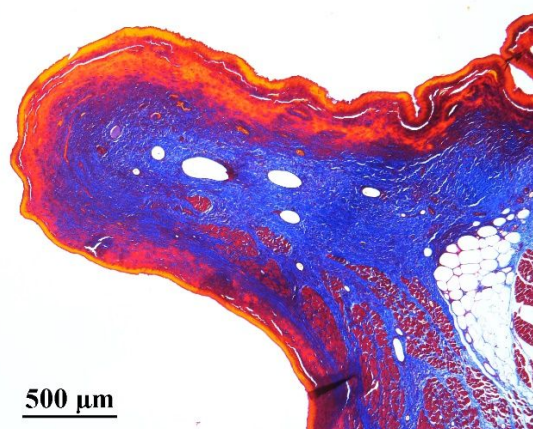


図 5 b : ADRC s + 脂肪細胞を注射した声帯

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 梅野博仁	4. 巻 108
2. 論文標題 一側声帯麻痺に対する声帯内注入術	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科臨床	6. 最初と最後の頁 81-91
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中久一郎、梅野博仁
2. 発表標題 脂肪由来再生細胞(ADRCs)の声帯内脂肪注入術への効果
3. 学会等名 第63回日本音声言語医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisaichiro Tanaka, Hirohito Umeno, Ryota Mihashi, Fumihiko Sato, Shintaro Sueyoshi, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato
2. 発表標題 Efficacy of ADRCs for autologous fat injection laryngoplasty
3. 学会等名 The 99th Annual Meeting of the American Broncho-Esophageal Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中久一郎、梅野博仁、三橋亮太、佐藤文彦、岩畔英樹
2. 発表標題 脂肪由来再生細胞（ADRCs）の声帯粘膜再生効果
3. 学会等名 第32回日本喉頭科学会
4. 発表年 2020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
研究協力者	田中 久一郎  (Tanaka Hisaichiro)		
研究協力者	三橋 亮太  (Mihashi Ryota)		
研究協力者	佐藤 文彦  (Sato Fumihiko)		
研究協力者	岩畔 英樹  (Iwaguro Hideki)		
研究協力者	岡田 李之  (Okada Toshiyuki)		
研究協力者	川原 明彦  (Kawahara Akihiko)		
研究協力者	末吉 慎太郎  (Sueyoshi Shintaro)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	千年 俊一  (Chitose Syun-ichi)		
研究協力者	佐藤 公宣  (Sato Kiminobu)		
研究協力者	深堀 光緒子  (Fukahori Mioko)		
研究協力者	佐藤 公則  (Sato Kiminori)		
研究協力者	溝口 充志  (Mizoguchi Atsusi)		
研究協力者	麻生 丈一郎  (Asou Takeichiro)		