

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09888

研究課題名(和文) 傷害声帯の修復過程における上皮間葉移行の役割

研究課題名(英文) Role of epithelial-mesenchymal transition in the repair process of injured vocal cords

研究代表者

北村 守正 (KITAMURA, Morimasa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：60543262

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)：K5Cre系統とCAG-td Tomato系統を交配した遺伝子組み換えマウスの声帯の物理的損傷モデルを確立し、粘膜固有層を免疫染色にて評価した。上皮間葉移行細胞を、粘膜固有層に存在、Tomato陽性、E-cadherin陰性、Vimentin陽性の4条件を満たすものと定義した。損傷14日後の組織で5-6切片に1細胞の割合でしか条件を満たす細胞を確認できず、また共焦点顕微鏡を用いた観察でも評価可能な細胞はごく少数で分離培養できなかった。マウス声帯に強い炎症を加えると生存に関わるため付与する炎症の程度に限界があり、他臓器における組織修復時の上皮間葉移行に比べ誘導が少ないことが原因の一つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

声帯癒傷は有効な予防法・治療法が解明されていない臨床上の大きな課題の一つである。上皮間葉転換は上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象で、創傷治癒や肝硬変等において線維化への関与が知られているが、声帯組織での関与については不明である。そのため、上皮由来の細胞を恒久的にラベルできる遺伝子改変マウスを用い、傷害声帯の修復過程における上皮間葉移行の役割を明らかにすることで、声帯癒傷の治療法の確立に寄与できると考えていたが、今回の研究では十分な細胞を確認できず分離培養できなかった。

研究成果の概要(英文)：We established a model of physical damage to the vocal folds of transgenic mice, which were crossed between K5Cre and CAG-td Tomato lines, and evaluated by immunostaining of the mucosal intrinsic layer (epithelial marker: E-cadherin staining/mesenchymal marker: Vimentin staining). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) cells were defined as cells that fulfilled the following criteria: 1) present in the mucosal lamina propria, 2) Tomato-positive, 3) E-cadherin-negative, and 4) Vimentin-positive. However, only one cell per 5-6 sections of tissue 14 days after injury could be identified that met the criteria, and only a few evaluable cells could be isolated and cultured for observation using a confocal microscope. One of the reasons for this is that the degree of inflammation in the vocal cords is limited because strong inflammation may affect the survival of the mice, and that it is less induced than the EMT during tissue repair in other organs.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：声帯 上皮間葉移行 線維芽細胞 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

音声障害は正常な声帯振動が生成できなくなるため生じる。その原因は多岐に渡るが、声の酷使、たばこ、飲酒、胃食道逆流や手術操作などの外的要因により声帯粘膜が傷害され、その修復過程で正常声帯の構造が破綻する事で声帯振動の不全が生じ、嚙声が出現すると考えられている。特に声帯癒痕は音声障害における残された大きな課題の一つとされ、有効な治療法は未だ確立されていない。傷害された組織を再生するには、まずその組織の発生や維持のメカニズムを細胞・分子レベルから理解することが重要であるが、声帯組織が傷害された場合、どのように修復されていくのか、その機序に関しては十分にわかっていない。

上皮間葉移行とは上皮細胞がその性質を失い間葉系細胞としての性質を新たに得る変化であり、組織再生時に生じる上皮間葉移行細胞はコラーゲンを産生し癒痕治療に影響することが他臓器で報告されている。声帯における上皮間葉移行の関与については不明であったが、申請者らは上皮由来の細胞を恒久的にラベルするトランスジェニックマウスを用いて予備実験を行い、傷害声帯において上皮間葉移行が起こっていることを世界で初めて示した。

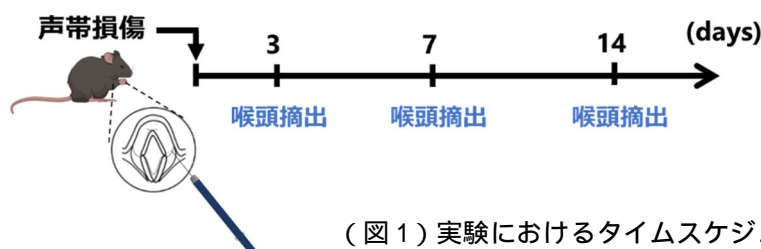
2. 研究の目的

上皮由来の細胞が追跡できるトランスジェニックマウスを用いて傷害声帯の創傷治療過程における上皮間葉移行のタイミングや上皮間葉移行を来した細胞の性質を解析し、声帯における上皮間葉移行のメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、予備実験で確立した K5Cre 系統と CAG-td Tomato 系統を交配した遺伝子組み換えマウスを用いて行うこととした。本トランスジェニックマウスは上皮基底層に局限して発現する K5 と同じプロモータを有する Cre が発現すると、td-Tomato 蛍光タンパクが産生開始するように遺伝子改変が生じるようになっている。一度遺伝子改変が生じた細胞は細胞分裂後も td-Tomato を発現し続けるため、上皮間葉移行を起こした後も蛍光タンパクを産生しつづけるため、上皮間葉移行後の上皮由来細胞の追跡が可能マウスである。

声帯創傷治療過程の急性期及び慢性期における上皮間葉移行を調べるためマウス声帯に内視鏡下に声帯を自作の針状機器を用いて損傷することにより、物理的損傷モデルを作製した。創傷治療過程の急性期 (3, 7, 14 日) における上皮間葉移行を解析する。Vimentin, S100A4, CD31 といった間葉細胞、線維芽細胞のマーカーで染色を行い、上皮由来細胞の系譜を調べた。(図 1)



(図 1) 実験におけるタイムスケジュール

4. 研究成果

上記の研究方法で作成した声帯の物理的損傷モデルを観察し、粘膜上皮ならびに粘膜固有層の細胞を免疫染色 (上皮マーカーである E-cadherin = ECCD 染色と間葉マーカーである Vimentin 染色を施行) を行い評価した。上皮間葉移行細胞を、1) 粘膜固有層に存在すること、2) Tomato 陽性の細胞であること、3) E-cadherin 陰性であること、4) Vimentin 陽性であること、の 4 つの条件を全て満たすものと定義して評価を行うこととした。

傷害を加えていないマウスでは上皮間葉移行細胞は全く存在しなかった。損傷後 3 日目・7 日目の声帯は、炎症に伴う浮腫性変化が強いものの上皮間葉移行を示す細胞は確認できなかった。損傷 14 日後の組織で 5-6 切片に 1 細胞の割合で上記 4 つの条件を満たす細胞を確認できた。図 2 に示すように損傷後 14 日目の状態では声帯粘膜の上皮は完全に創部を被覆しており、破断した上皮が間質内に偶然入り込んだという可能性は低いのではないかと考えられた。目的細胞の出力向上を目標として共焦点顕微鏡を用いた観察も行ったが、評価可能な細胞はごく少数であった。

もともと、上皮間葉移行を生じる細胞を抽出してその性状評価を行う予定ではあったが、上皮間葉移行細胞の絶対数が非常に少ないため、細胞抽出の手法は断念せざるを得なかった。さらに K5Cre 系統の系統維持の方法で誤りが生じて、Cre が粘膜基底層以外の細胞でも発現するいわゆる leakage が生じてしまったため一度維持していたマウス系統をもう一度交配しなければならず、多くの時間を消耗してしまった。そのため、慢性期において上皮間葉移行した細胞がどのような動態を示すのか評価するといった実験項目や、由来のより効率よく傷害声帯のなかから上皮間葉移行細胞を探す方法を検討することは断念せざるを得なかった。

本研究によって、声帯においても創傷治癒の上皮化が完了した時点で上皮間葉移行が生じるという事実が確認できたことは非常に重要な意義をもつと考えられる。皮膚領域の創傷治癒においても上皮間葉移行が生じることは確認されているが、上皮化が完了していない瘡蓋の裏側 = 間質にケラチノサイトが侵入していくことで上皮化が完了するという形式であり (Dev Dyn. 2018) 本研究で示されたような上皮化が完了したあとになるまで上皮間葉移行細胞が確認されない (損傷後 3 日目 7 日目には上皮間葉移行細胞が確認できなかった) という様式は類を見ないものであった。皮膚の創傷時に見られる上皮間葉移行は基本的に上皮化を迅速に進めるための反応であるのに対して、声帯傷害時における上皮間葉移行細胞は上皮化が完了した後で確認され、粘膜上皮層の下層にある粘膜固有層でまばらに上皮間葉移行細胞が確認されるという発現様式は、上皮間葉移行細胞が粘膜固有層の創傷治癒過程の急性期以降の恒常性維持に寄与する可能性が示唆された。なお、声帯癒痕に代表される粘膜の硬化は粘膜固有層に生じるコラーゲン蓄積が原因であるとされるため、粘膜固有層の恒常性は創傷後の音声維持に必須の役割を果たすとされる。

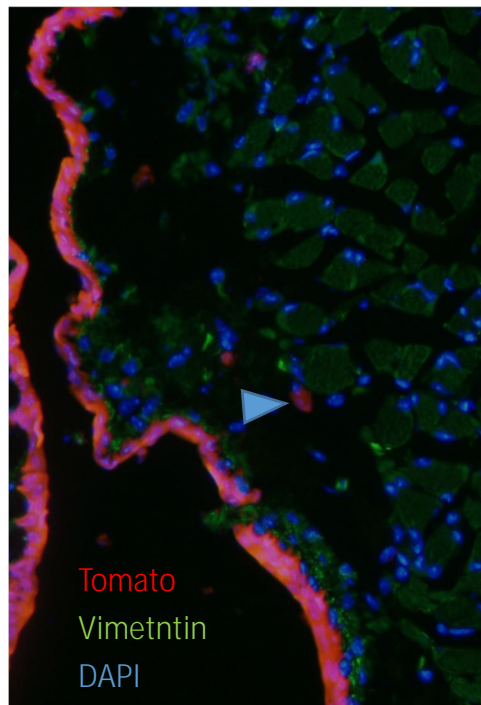
上皮間葉移行を生じるためには TGF-beta1 などの遺伝子発現がトリガーになるとされているが、声帯の傷害後の TGF-beta1 の産生は損傷後 3 - 5 日目前後がピークになるとされており (C Leydon 2014) 今回の結果は TGF-beta1 の産生がピークを過ぎた後から上皮間葉移行が生じたということになり、そういった意味からも大変に興味深い。別の解釈としては損傷後 3 - 5 日目前後に実際は上皮間葉移行が生じていたがその時点では我々が発見できないほどのごく少量の細胞数で、その後定着・増殖した上皮間葉移行細胞を損傷後 14 日目に発見できたとも考えられるが、その場合は先の段落で述べたように上皮間葉移行細胞が再生する声帯粘膜固有層の恒常性維持に重要であるとする仮説をより強く補強するものとなりそうである。

また、今回の実験で上皮間葉移行は確認できたものの、上皮間葉細胞の絶対数は非常に少ないものであった。上皮に強い炎症を加えると上皮間葉移行する細胞数はもう少し増加する可能性はあるが、自作の針状機器で与えられる傷害以上となると出血によりマウスが窒息するなど、その生存に関わる傷害強度となるため付与する炎症の程度に限界がある。与えられる傷害強度に限界があることが、他臓器における報告と比較して組織修復時の上皮間葉移行誘導が少ない原因の一つと考えられた。また、創傷治癒過程において TGF-beta1 の産生主体になると思われるマクロファージを始めとした組織球の分布が臓器によって異なるために上皮間葉移行の応答に違いが生じてしまったという可能性も十分に考えられる。しかし、環境の異なる臓器間での比較は変動因子があまりに多く難しいのではないかと考えられる。現実的なプランとして、炎症細胞の分布に変化を与えるような薬剤投与をした環境下での創傷実験を行い上皮間葉移行細胞の量がどのように変化するかを追跡する方法が妥当と考えられた。

今回の研究において確認された上皮間葉移行細胞は、その後消失してしまうのか定着して再生声帯の恒常性維持に関わるのか、あるいは定着はするが癒痕化に関わるコラーゲン蓄積を悪化させるのかなどを調べていくことで、創傷治癒の慢性期において上皮間葉移行細胞が果たす役割がさらに解明できることが期待できる。

本研究の成果をまとめると以下の通りである。本研究により、

- ・声帯に創傷を作成するとその治癒過程で上皮間葉移行が生じることが確認できた。
- ・皮膚の創傷治癒過程で認められる上皮間葉移行とことなり、創部の上皮化が完了したあとで上皮間葉移行細胞が確認できた。
- ・声帯における上皮間葉移行細胞はその数は少ないものの、創傷治癒の亜急性期移行の時期において声帯粘膜固有層に確認できることから、その創傷治癒や恒常性維持に寄与していることが示唆された。



(図2) 上皮間葉移行細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	末廣 篤 (SUEHIRO Atsushi) (00738247)	京都大学・医学研究科・特定講師 (14301)	
研究分担者	楯谷 智子 (TATEYA Tomoko) (10512311)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	樋渡 直 (HIWATASHI Nao) (10808778)	京都大学・医学研究科・客員研究員 (14301)	
研究分担者	楯谷 一郎 (TATEYA Ichiro) (20526363)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	岸本 曜 (KISHIMOTO Yo) (80700517)	京都大学・医学研究科・助教 (14301)	
研究分担者	菊地 正弘 (KIKUCHI Masahiro) (90443564)	京都大学・医学研究科・講師 (14301)	

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
---------	---------