

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592209

研究課題名（和文） ヒト声帯黄斑と声帯星型細胞の機能、  
細胞外マトリックス産生の調節機能の解明研究課題名（英文） Function of the human macula flava and vocal fold stellate cells  
in the human vocal fold

研究代表者

佐藤 公則 (SATO KIMINORI)

久留米大学医学部教授

研究者番号：70196228

研究成果の概要（和文）：

本研究により発声（声帯振動）による張力は、ヒト声帯の前・後黄斑内のヒト声帯星型細胞を刺激して細胞外マトリックスを産生・維持し、ヒト固有の声帯の層構造を維持するための調節因子の一つであると考えられた。機械的刺激を受けたヒト声帯星型細胞のメカノレセプターが刺激され、細胞内にそのシグナルが伝達されることにより細胞活動に影響を与えられた。ヒト声帯星型細胞は肝臓外星細胞であり、Diffuse Stellate Cell System の一員であり、ヒト声帯の新しい範疇の細胞と考えられた。またヒト声帯の黄斑は声帯星型細胞のニッチである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The result of the present study support our hypothesis that the tension caused by phonation (vocal fold vibration) after birth stimulate the vocal fold stellate cells in the anterior and posterior maculae flavae to accelerate production of extracellular matrices and form the vocal ligament, Reinke's space, and characteristic layered structure of the human vocal fold mucosa. This suggests that the vocal fold vibration (phonation) after birth and mechanotransduction of the vocal fold stellate cells in the maculae flavae are important factors in the growth and development of the human vocal fold mucosa.

The vocal fold stellate cells in the human maculae flavae are desmin-positive cells with perinuclear vitamin A droplets and show the morphological features of the cells included in the proposed diffuse stellate cell system. The vocal fold stellate cells are considered to be a new category of cells in the human vocal fold. The maculae flavae are believed to be special microenvironments or niches, that nurture a pool of vocal fold stellate cells

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：ヒト声帯、黄斑、声帯星型細胞、細胞外マトリックス

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 声帯膜様部粘膜の細胞外マトリックスの構造

声帯振動に最も関与する声帯膜様部粘膜を構成する細胞外マトリックスの三次元微細構造およびその成長・発達・加齢的变化を我々は研究してきた。

これらの我々の研究からヒト声帯膜様部粘膜を構成する細胞外マトリックスの特異的三次元構造が声帯振動に必要な物性（粘弾性）を維持していること、ヒト声帯膜様部粘膜を構成する細胞外マトリックスの特異的三次元構造が成長・発達・老化により変化することを明らかにしてきた。

### (2) 声帯黄斑部の構造

ヒト声帯膜様部粘膜の前端と後端に存在し、細胞と細胞外マトリックスが密に分布するヒト声帯黄斑の構造と機能を我々は研究してきた。

これらの我々の研究から、ヒト声帯黄斑は、ヒト声帯粘膜の粘弾性を維持するために必須の細胞外マトリックスの代謝に重要な役割を担っていることが示唆された。またヒト声帯黄斑の機能的変化がヒト声帯粘膜の成長・発達・老化に深く関与していることが示唆された。

### (3) 声帯黄斑部の声帯星型細胞の構造

人声帯の黄斑内には通常の線維芽細胞とは形態学的に異なり、細胞質内に脂肪滴を持った特殊な細胞が密に存在することを 2001 年に世界で初めて発見し、ヒト声帯星型細胞の構造と機能を研究してきた。

我々が発見したヒト声帯星型細胞に関する上述した我々の研究から、ヒト声帯黄斑内

に密に存在するビタミンAを貯蔵した声帯星型細胞は、声帯に分布する通常の線維芽細胞とは異なった種類の細胞であることが示唆された。またヒト声帯星型細胞は、ヒト声帯粘膜の粘弾性を維持するために必須の細胞外マトリックスの代謝に重要な役割を担っていることが示唆された。またヒト声帯星型細胞の機能的変化がヒト声帯粘膜の成長・発達・老化に深く関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

ヒト声帯黄斑と声帯星型細胞の機能、特に細胞外マトリックス産生の調節機能の解明を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞の培養細胞、あるいはパラフィン包埋組織を光学顕微鏡（免疫組織染色など）、電子顕微鏡で形態学的に研究した。

## 4. 研究成果

### (1) ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞の継代培養

ヒト声帯黄斑の機能と黄斑内に密に分布するヒト声帯星型細胞の機能を研究するために、ヒト声帯星型細胞の継代培養を行った。継代培養されたヒト声帯星型細胞を用いて *in vitro* で機能形態学的に研究した。継代培養されたヒト声帯星型細胞は通常の線維芽細胞と形態学的に異なり、ヒト声帯星型細胞は、通常の線維芽細胞とは異なった範疇の細胞であることが示唆された。

### (2) ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞が細胞外マトリックスを産生するための調節因子の解明

ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞が細胞外マトリックスを産生するための調節因子の解明の一環として、Mechanotransductionの観点から、ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞はどのような環境下で細胞外マトリックスを産生するのか、線維芽細胞との機能の差も含めて研究した。

#### ①生来発声していない成人声帯の構造

生来発声していない、すなわち発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に張力が加わっていない成人声帯の粘膜固有層、黄斑、声帯星型細胞、線維芽細胞などの微細構造を研究した。また生来発声していない声帯内のヒト声帯星型細胞と線維芽細胞の膜レセプターの発現と細胞外マトリックスの産生との関連を、ヒアルロン酸に関して研究した。その結果、生来発声していない成人声帯内の間質細胞、特にヒト声帯星型細胞では膜レセプターの発現と細胞外マトリックスの産生が低下しており、ヒト固有の声帯の構造をとっていないかった。発声（声帯振動）は、ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞が細胞外マトリックスを産生するための調節因子の一つであると考えられた。機械的刺激を受けたヒト声帯星型細胞のメカノレセプターが刺激され、細胞内にそのシグナルが伝達されることにより細胞活動に影響を与えると考えられた。

ヒト声帯では生後の発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に張力が加わり、ヒト声帯星型細胞を活性化し、ヒト固有の声帯粘膜の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達に関与しているという我々の仮説が再度支持された。

#### ②生来発声していない小児声帯の構造

生来発声していない小児の声帯、すなわち発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に張力が加わっていない小児の声帯の微細構造を研究した。その結果、生来発声していない小児の声帯内の間質細胞、特にヒト声帯星型細胞では細胞外マトリックスの産生が低下しており、声帯粘膜固有層はヒト固有の声帯の層構造をとっていないかった。ヒト声帯では生後の発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に張力が加わり、ヒト声帯星型細胞を活性化し、ヒト固有の声帯粘膜の層構造を構築し、ヒト声帯粘膜の成長・発達に関与していると考えられた。

#### ③長期間発声していない成人声帯の構造

声帯の層構造が完成した後に長期間発声していない成人声帯、すなわち発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に長期間張力が加わっていない成人の声帯の微細構造を研究した。その結果、声帯の層構造が完成した後に長期間発声していない成人の声帯内の間質細胞、特にヒト声帯星型細胞では細胞外マトリックスの産生が低下しており、声帯粘膜はヒト固有の声帯の層構造をとっていないかった。ヒト成人の声帯では、発声（声帯振動）により声帯黄斑と黄斑内のヒト声帯星型細胞に張力が加わり、ヒト声帯星型細胞を活性化し、ヒト固有の声帯粘膜の層構造の維持に関与していると考えられた。

発声（声帯振動）は、ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞が細胞外マトリックスを産生するための調節因子の一つであると考えられた。機械的刺激を受けたヒト声帯星型細胞のメカノレセプターが刺激され、細胞内に

そのシグナルが伝達されることにより細胞活動に影響を与えると考えられた。

### (3) ヒト声帯星型細胞と Diffuse Stellate Cell System

肝臓に存在する肝臓星細胞 (Hepatic Stellate Cell) は細胞突起を持った星型の細胞であり、細胞質にはビタミン A を貯蔵した脂肪滴を認め、肝臓の線維化 (細胞外マトリックスの産生) に関与している。近年、肝臓星細胞と形態的に類似した細胞が膵臓、腎臓、大腸などの臓器にも存在し、肝臓外星細胞 (Extrahepatic Stellate Cell) とよばれる細胞系 (Diffuse Stellate Cell System、ビタミン A 貯蔵星細胞系) の存在が示唆されており、組織幹細胞 (Somatic Stem Cell) との関連性も指摘されている。ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星型細胞が細胞外マトリックスを産生するための調節因子の解明の一環として、ヒト声帯星型細胞が肝臓外星細胞 (Extrahepatic Stellate Cell) とよばれる細胞系 (Diffuse Stellate Cell System、ビタミン A 貯蔵星細胞系) の細胞なのかを研究した。

その結果、ヒト声帯星型細胞の細胞質の中間径フィラメントには、神経細胞、筋細胞に伴う蛋白質が同定でき、肝臓星細胞と同じ染色態度であった。またヒト声帯星型細胞は分化が低い細胞である事が明らかになった。ヒト声帯星型細胞は、肝臓外星細胞であり、Diffuse Stellate Cell System の一員であると考えられ、組織幹細胞 (Somatic Stem Cell) との関連性が示唆された。またヒト声帯の黄斑は声帯星型細胞のニッチである可能性が示唆された。

### 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 7 件)

- 1) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Histopathologic Investigation of the Unphonated Human Child Vocal Fold Mucosa. J Voice 26: 37-43, 2012. 査読有
- 2) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Vocal Fold Stellate Cells in the Human Macula Flava and the Diffuse Stellate Cell System Ann Otol Rhinol Laryngol 121: 51-56, 2012. 査読有
- 3) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, ONO Takeharu, NAKASHIMA Tadashi: Histopathologic Study of Human Vocal Fold Mucosa Unphonated over a decade Acta Oto-Laryngol 131: 1319-1325, 2011. 査読有
- 4) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Functional Histology of the Macula Flava in the Human Vocal Fold Its Roles in the Adult Vocal Fold. Folia Phoniatr Logop 62: 178-184, 2010. 査読有
- 5) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Functional Histology of the Macula Flava in the Human Vocal Fold Its Roles in the Growth and Development of the Vocal Fold. Folia Phoniatr Logop 62: 263-270, 2010. 査読有
- 6) SATO Kiminori, NAKASHIMA Tadashi: Stellate Cells in the Human Child Vocal Fold Macula Flava. Laryngoscope 119: 203-210, 2009. 査読有
- 7) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Expression and Distribution of Hyaluronic Acid and CD44 in Unphonated Human Vocal Fold Mucosa Ann Otol Rhinol Laryngol 118: 773-780, 2009. 査読有

〔学会発表〕（計 11 件）

- 1) 佐藤公則、梅野博仁、中島 格、野中 聡、  
原渕保明：発声経験がないヒト声帯粘膜の組織構造-ヒアルロン酸の分布と CD44 の発現-  
第 21 回日本喉頭科学会（2009 年 3 月 26～27 日、前橋）
- 2) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Expression and Distribution of Hyaluronic Acid and CD44 in Unphonated Human Vocal Fold Mucosa  
The 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association (May 28~29, 2009, Phoenix, Arizona)
- 3) 佐藤公則：教育講演：ヒト声帯粘膜の微細構造-ヒト固有の振動体の細胞と細胞外マトリックス- 第 24 回日耳鼻九州連合地方部会（2009 年 7 月 11～12 日、福岡）
- 4) 佐藤公則、梅野博仁、中島 格、野中 聡、原渕保明：発声経験がないヒト小児声帯粘膜の組織構造 第 61 回日本気管食道科学会（2009 年 11 月 5～6 日、横浜）
- 5) SATO Kiminori: Plenary Lecture  
Translational Medicine of the Human Vocal Fold Mucosa: On the Move from Bench to Bedside. The 53<sup>rd</sup> Annual Convention of the Philippine Society of Otolaryngology - Head and Neck Surgery (November 28~December 1, 2009, Manila, The Philippines)
- 6) 佐藤公則、梅野博仁、小野剛治、中島 格、：長期間発声していない成人声帯粘膜の微細組織構造. 第 22 回日本喉頭科学会(2010 年 3 月 4～5 日、下関)
- 7) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Histopathologic Investigations of the Unphonated Human

Child Vocal Fold Mucosa

The 90<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association  
(April 28-29, 2010, Las Vegas, Nevada)

8) SATO Kiminori: Panel Discussion “Vocal Fold Anatomy & Histopathology”

Microscopic structure of the human vocal fold mucosa

The 4<sup>th</sup> World Voice Congress

(September 6-9, 2010, Seoul, Korea)

9) 佐藤公則、梅野博仁、中島 格：声帯星細胞と Diffuse Stellate Cell System  
第 23 回日本喉頭科学会（2011 年 4 月 21～22 日、旭川）

10) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, ONO Takeharu, NAKASHIMA Tadashi:

Histopathologic investigations of the unphonated human vocal fold mucosa for a decade. The 132<sup>nd</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association  
(April 27-28, 2011, Chicago, Illinois)

11) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Vocal fold stellate cells in the human macula flava as a diffuse stellate cell system: The 91<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association  
(April 27-28, 2011, Chicago, Illinois)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤公則 (SATO KIMINORI)  
久留米大学医学部教授  
研究者番号：70196228

### (2) 研究分担者

梅野博仁 (UMENO HIROHITO)  
久留米大学医学部准教授  
研究者番号：40203583  
千年俊一 (CHITOSE SHUN-ICHI)  
久留米大学医学部講師  
研究者番号：20299514  
中島 格 (NAKASHIMA TADASHI)  
久留米大学医学部教授  
研究者番号：70117183

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：