

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890201

研究課題名（和文） 脂肪幹細胞の癒痕声帯に及ぼす影響にかかわる基礎的研究

研究課題名（英文） Modulation of vocal fold scar fibroblast by adipose derived stem cell

研究代表者

熊井 良彦 (KUMAI YOSHIHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00555774

研究成果の概要（和文）：癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞に HGF を添加した場合と、脂肪幹細胞と共培養した場合との抗線維化作用を、細胞外マトリックスの産生量を ELISA 法により、また筋線維芽細胞の特定のマーカーの発現量を免疫染色法および FACS を用いてそれぞれ比較解析した。さらに筋線維芽細胞と脂肪幹細胞を共培養し、培養液に抗 HGF 抗体を添加し、脂肪幹細胞から分泌されると予測される HGF の作用を中和することで上記の抗線維化作用が抑制されるか検討解析した。結果として、脂肪幹細胞から分泌される分子のうち少なくとも HGF は、癒痕声帯から分離培養した筋線維芽細胞に対して抗線維化作用を有することが示された。

研究成果の概要（英文）：Scar fibroblasts (SFs) were isolated from ferret vocal folds electrocauterized two weeks previously (N=2). Adipose-derived stem cells (ASCs) were isolated from ferret lipoaspirated subcutaneous abdominal fat (N=2). For co-culture experiments, the two cell types were combined in Transwell plates for 6 days, followed by 1 or 3 days of monoculture after removing the upper chamber. Assays were then performed on cells and media from the bottom chamber. We measured (1) the production of hyaluronic acid (HA), collagen and hepatocyte growth factor (HGF) via enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) (2) the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), (3) cell proliferation and (4) apoptosis of SFs (2, 3 & 4 via flow cytometry). Other experiments examined the effects of HGF on SFs and the effects of HGF neutralization in the co-culture system. We demonstrated that co-culture led to significant decreases in SF collagen production ($p < .05$), proliferation ($p < .05$), and α -SMA expression ($p < .05$), while HA production increased ($p < .05$). Co-culture also increased HGF secretion from ASCs ($p < .05$). Neutralization of HGF abolished the inhibitory effects of ASCs on SF collagen synthesis ($p < .05$). We concluded that ASCs influence SFs to adopt a less fibrotic profile. It appears that HGF is at least one of the soluble factors responsible for this effect. Implanted ASCs could potentially ameliorate vocal fold scar by acting as a long-term, intrinsic source of HGF

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,960,000	588,000	2,548,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：癒痕声帯、脂肪幹細胞、

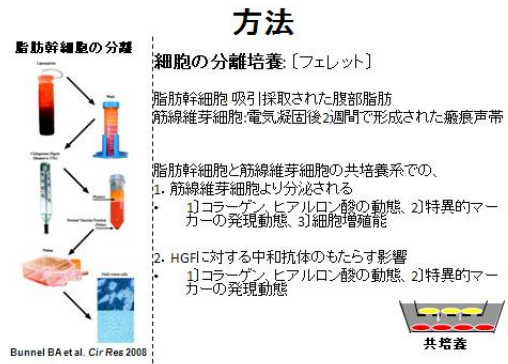
1. 研究開始当初の背景

声帯の最表層に位置する粘膜固有層に含まれるコラーゲン、エラスチン、ヒアルロン酸等の細胞外マトリックスの量のバランスが、声帯の粘弾性に大きく影響を及ぼすことは周知の事実である。癒痕声帯の場合これらのバランスが著しく崩れ、発声障害をもたらすことがすでに報告されている。现阶段では、癒痕組織に対する抗炎症作用を期待したステロイドの局所注入、生体内に注入可能な粘弾性に富む物質の癒痕声帯への注入、癒痕組織の増生を抑制することを期待した特定の成長因子の注入などが試みられているが、その有効性には賛否両論があり一般的に確立された治療法には至っていない。一方で様々な幹細胞を癒痕声帯に移植することで正常声帯の再生を目指した治療法の開発が国内外で近年行われはじめ、動物実験によりその有効性を報告する論文が散見される。しかしその有効性の根拠となる幹細胞の癒痕声帯に対する影響についての分子レベルでの考察はまだまだ不十分の感が否めない。

2. 研究の目的:

脂肪幹細胞から分泌される様々なサイトカインの癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞に対する影響を特定のサイトカインの中和実験等により解析し、サイトカインの特定化を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

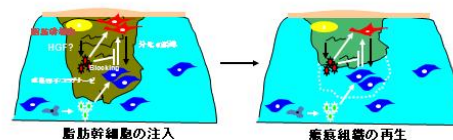


(1) フェレットの癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞に HGF を添加した場合と、脂肪幹細胞と共培養した場合との抗線維化作用を、細胞外マトリックスの産生量を ELISA 法により、また筋線維芽細胞の特定のマーカーの発現量を免疫染色法および FACS を用いてそれぞれ比較解析した。

(2) 筋線維芽細胞と脂肪幹細胞を共培養し、さらに培養液に抗 HGF 抗体を添加し、脂肪幹細胞から分泌されると予測される HGF の作用を中和することで上記の抗線維化作用が抑制されるか検討解析した。

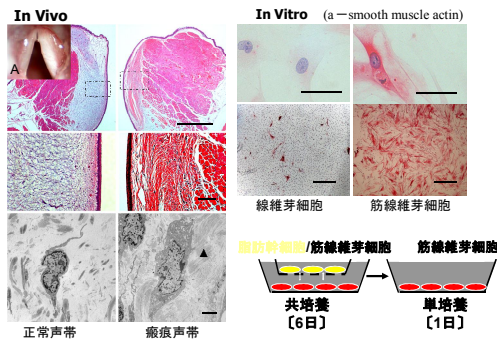
4. 研究成果

仮説: 脂肪幹細胞から分泌される HGF が癒痕声帯に対して抗線維化作用を示す。



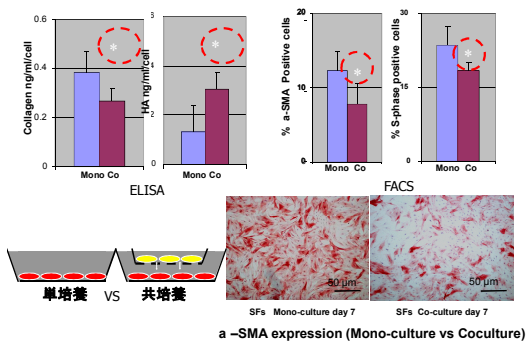
以上に示した仮説を証明するために下記の実験を行った。

癒痕声帯のIn Vitro Modelの確立



まず、以上に示したように、フェレットの癒痕声帯を電気凝固処理により作成し、そこから分離培養した筋線維芽細胞を、電子顕微鏡および免疫染色法を用いて、その特性が In Vitro でも維持されることを確認した。これは癒痕声帯の In Vitro Model を確立したことを意味する。

脂肪幹細胞と筋線維芽細胞の共培養系での、筋線維芽細胞より分泌されるコラーゲン、ヒアルロン酸の動態、特異的マーカーの発現動態、細胞増殖能



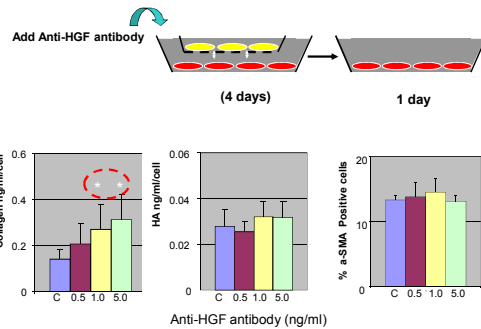
次に上記に示すように脂肪幹細胞と筋線維芽細胞の共培養系での、筋線維芽細胞より分泌されるコラーゲン、ヒアルロン酸の動態、特異的マーカーの発現動態、細胞増殖能を計測し

- 1) 脂肪幹細胞との共培養により筋線維芽細胞よりのコラーゲンの分泌が抑制されヒアルロン酸の産生量が有意に増加することを示した。
- 2) 次に FACS により α -SMA の発現量が抑

制され、細胞増殖能も抑制されることが明らかになった。

- 3) さらに 2) の結果が免疫染色にても裏付けられた。

HGFに対する中和抗体のもたらす影響
1)コラーゲン、ヒアルロン酸の動態、2)特異的マーカーの発現動態



次に上記に示すように HGF に対する中和抗体のもたらす影響 1) コラーゲン、ヒアルロン酸の動態、2) 特異的マーカーの発現動態を検証した。この検証より少なくとも脂肪幹細胞より分泌される HGF により、癒痕声帯より分離培養した筋線維芽細胞よりのコラーゲンの産生量は抑制されることが示唆された。

以上の結果をまとめると

- (1) 脂肪幹細胞は以下の 3 つの抗線維化作用を有することが示された。

筋線維芽細胞の

- ① 細胞増殖率
- ② コラーゲンの分泌
- ③ α -SMA の発現率 各々が抑制された。

- (2) 共培養系における HGF 中和抗体により、脂肪幹細胞の抗線維化作用は抑制された。

本研究により、脂肪幹細胞から分泌される分子のうち少なくとも HGF は、癒痕声帯から分離培養した筋線維芽細胞に対して抗線維化作用を有することが示された。これにより脂肪幹細胞の癒痕声帯に対する抗線維化作用を担う分子が明らかになり、さらにその分泌量を維持増加させるための特定の分子を今後明らかにすることで、脂肪幹細胞の癒痕声帯に対する臨床応用に向けた研究の第一歩となりうる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

熊井良彦、脂肪幹細胞から分泌される肝細胞増殖因子が癒痕声帯に及ぼす影響、第 61 回日本気管食道科学会ならびに学術講演会、平成 22 年 11 月 5 日 横浜ベイシェラトン ホテル&タワーズ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊井 良彦 (KUMAI YOSHIHIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・助教

研究者番号：00555774