

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26861373
研究課題名(和文)声帯におけるスローサイクリング細胞の機能の解明

研究課題名(英文)slow cycling cells in the vocal fold

研究代表者

岸本 曜 (Kishimoto, Yo)

京都大学・医学研究科・特定病院助教

研究者番号：80700517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：自己増殖能と長い細胞周期という特徴を有するスローサイクリング細胞の中に、多分化能を有する幹細胞が含まれることが複数の臓器で示されている。本研究ではラット声帯における組織幹細胞の検索の一助とすべく、スローサイクリング細胞の同定および特徴の検討を行った。ラット声帯におけるスローサイクリング細胞はそのほとんどが粘膜上皮基底層に存在し、また、種々のマーカーで染色することにより周囲とは異なる特徴を有する細胞が含まれることが明らかとなった。さらに、声帯傷害時には減少し、創傷治癒に動員されたと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Part of the slow-cycling cells exhibit pluripotency, and they are thought to be tissue specific stem cells in some organs. In this study, we investigated the distributions and characteristics of slow cycling cells in rat vocal folds. We applied double labeling technique to detect the distribution of slow cycling cells, and most slow cycling cells were detected in the basal layer of the epithelium. Further, histological investigation revealed various phenotypes in a relatively undifferentiated condition of slow cycling cells. A time-dependent reduction of slow-cycling cells was observed in injured vocal folds, and they are suspected to contribute to the tissue repair of the injured VFs.

研究分野：喉頭科学

キーワード：声帯 スローサイクリング細胞

1. 研究開始当初の背景

音声は呼気流が声帯を通過する際の周期的な粘膜振動で生じるが、良好な声帯振動には声帯粘膜が適度な粘弾性を有していることが必要不可欠とされる。外傷、炎症、手術後などに生じる声帯癒痕では粘弾性の低下から重篤かつ難治性の音声障害をきたすが、未だ有効な治療法の確立には至っていない。

声帯癒痕治療に対する治療法開発において幹細胞を用いた治療は非常に有望なアプローチの一つと考えられており、実際、脂肪や骨髄といった他臓器由来の幹細胞を声帯へ移植する方法は既に有効性が示されている。もう一つの治療戦略は声帯固有の内因性組織幹細胞を賦活化させての再生効果を期待する方法である。しかし声帯固有の組織幹細胞は、相異なる解剖学的位置にその存在を示唆する諸報告はあってもいずれも確定的でない

一般に幹細胞は多分化能以外にも、自己増殖能、細胞周期が長いという特徴が知られている。自己増殖能と長い細胞周期という特徴を有した細胞をスローサイクリング細胞として同定すると、スローサイクリング細胞の中に多分化能を示す幹細胞が含まれることが複数の他臓器において既に示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は内因性組織幹細胞の候補と考えられるスローサイクリング細胞を声帯で同定評価し、組織幹細胞検索における礎とすることである。

3. 研究の方法

細胞増殖時に DNA 類似物質として細胞に取

り込まれる BrdU を投与後に一定期間を空けると、分裂周期の緩徐な細胞に BrdU が残存する。さらに、Ki-67 染色で陽性の細胞は細胞増殖能を有すると判断できる。したがって、BrdU と Ki-67 が共陽性となる細胞がスローサイクリング細胞として検出できる。

上記の方法を用いて、正常声帯粘膜、および障害声帯におけるスローサイクリング細胞の分布および表現型につき組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

BrdU 投与終了後の適正な待機期間を検討するためラット腹腔内に BrdU を 50 mg/kg/day で 7 日間連続投与し、投与 1、5、10、15 日後に評価した。結果、BrdU 投与終了 10 日後時点がスローサイクリング細胞の同定時期として適していると考えられた。

10 日後時点での声帯スローサイクリング細胞の分布評価を行ったところ、声帯全層に存在が認められるもののその殆どが粘膜上皮基底層に局在していた。さらにスローサイクリング細胞の表面マーカーを評価したところ、声帯粘膜上皮基底層に分布するスローサイクリング細胞の一部で E-cadherin や CK5 といった上皮マーカー陰性の細胞が存在し、間葉系マーカーの Vimentin や内皮細胞マーカーの CD31 陽性細胞が相対的に多く認められるなど周辺の粘膜上皮細胞とは異なる性状を示した。また、粘膜固有層内に僅かに分布するスローサイクリング細胞は周囲の細胞と比較し線維芽細胞マーカーである S100A4 陽性率が低かった。

BrdU 投与後待機期間中に声帯損傷を行ったところ、損傷後の時間に応じて経時的なスローサイクリング細胞の減少が認められ、創傷治癒に動員された可能性が示唆された。

以上の研究により、声帯組織幹細胞の候補となる細胞が主に粘膜上皮基底層に分布す

る可能性が示され、声帯組織幹細胞研究における新たな知見となった。

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15件)

1. Kishimoto AO, Kishimoto Y, Young D, Zhang J, Rowland I, Welham NV. High and ultrahigh-field magnetic resonance imaging of naive, injured, and scarred vocal fold mucosae in rats. *Dis Model Mech*. 2016 Nov 1;9(11):1397-1403. 査読あり
2. Kaneko M, Shiromoto O, Fujii-Kurachi M, Kishimoto Y, Tateya I, Hirano S. Optimal Duration for Voice Rest After Vocal Fold Surgery: Randomized Controlled Clinical Study. *J Voice*. 2016 Aug 1. pii: S0892-1997(16)00043-6. doi: 10.1016/j.jvoice.2016.02.009. 査読あり
3. Kaneko M, Kishimoto Y, Suzuki R, Kawai Y, Tateya I, Hirano S. Protective Effect of Astaxanthin on Vocal Fold Injury and Inflammation Due to Vocal Loading: A Clinical Trial. *J Voice*. 2016 Jul 29. pii: S0892-1997(16)30180-1. doi:10.1016/j.jvoice.2016.06.017. 査読あり
4. Suzuki R, Kawai Y, Tsuji T, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Tateya I, Nakamura T, Hirano S. Prevention of vocal fold scarring by local application of basic fibroblast growth factor in a rat vocal fold injury model. *Laryngoscope*. 2016 Jul 14. doi: 10.1002/lary.26138. 査読あり
5. Kobayashi T, Mizuta M, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Nakamura T, Kanemaru SI, Hirano S. Drug delivery system of basic fibroblast growth factor using gelatin hydrogel for restoration of acute vocal fold scar. *Auris Nasus Larynx*. 44(1):86-92. 査読あり
6. Kishimoto Y, Kishimoto AO, Ye S, Kendziorski C, Welham NV. Modeling fibrosis using fibroblasts isolated from scarred rat vocal folds. *Lab Invest*. 2016 Jul;96(7):807-16. 査読あり
7. Kishimoto Y, Suzuki R, Kawai Y, Hiwatashi N, Kitamura M, Tateya I, Hirano S. Photocoagulation therapy for laryngeal dysplasia using angiolytic lasers. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 May;273(5):1221-5. doi: 10.1007/s00405-015-3887-z. Epub 2016 Jan 7. 査読あり
8. Ling C, Li Q, Brown ME, Kishimoto Y, Toya Y, Devine EE, Choi KO, Nishimoto K, Norman IG, Tsegayal T, Jiang JJ, Burlingham WJ, Gunasekaran S, Smith LM, Frey BL, Welham NV. Bioengineered vocal fold mucosa for voice restoration. *Sci Transl Med*. 2015 Nov 18;7(314):314ra187. doi: 10.1126/scitranslmed.aab4014. 査読あり
9. Kawai Y, Kishimoto Y, Suzuki R, Tsuji T, Hiwatashi N, Tateya I, Yamamoto N, Nakamura T, Kanemaru S, Hirano S. Distribution and characteristics of slow-cycling cells in rat vocal folds. *Laryngoscope*. 2016 Apr;126(4):E164-70. doi: 10.1002/lary.25558. Epub 2016 Feb 4. 査読あり
10. Hiwatashi N, Hirano S, Suzuki R, Kawai Y, Mizuta M, Kishimoto Y, Tateya I, Kanemaru SI, Nakamura T, Dezawa M, Ito J. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. *Laryngoscope*. 2015 Sep 25. doi: 10.1002/lary.25667. 査読あり

11. Kaneko M, Hirano S, Tateya I, **Kishimoto Y**, Hiwatashi N, Fujiu-Kurachi M, Ito J. Multidimensional Analysis on the Effect of Vocal Function Exercises on Aged Vocal Fold Atrophy. *J Voice*. 2015 May 2. pii: S0892-1997(14)00251-3. 査読あり
12. Toya Y, Riabroy N, Davis CR, **Kishimoto Y**, Tanumihardjo SA, Bless DM, Welham NV. Interspecies comparison of stellate cell-containing macula flavae and vitamin A storage in vocal fold mucosa. *J Anat*. 2014 Sep;225(3):298-305. 査読あり
13. Mizuta M, Hirano S, **Kishimoto Y**, Hiwatashi N, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Pharmacokinetics and safety of human recombinant hepatocyte growth factor administered to vocal folds. *Laryngoscope*. 2014 Sep;124(9):2131-5. 査読あり
14. 平野 滋, 岸本 曜 . 音声機能回復技術とその成績 再生医療 声帯粘膜の再生と臨床応用 . 音声言語医学(0030-2813)57 巻 3 号 Page255-260(2016.07). 査読あり
15. 平野 滋, 岸本 曜 . 喉頭・気管領域における次世代医薬品・医療機器の実用化への挑戦 喉頭の再生医療の開発 . 日本気管食道学会会報 (0029-0645)67 巻 2 号 Page82-84(2016.04). 査読あり

[学会発表](計26件)

1. **Kishimoto Y**. Bring Your Own Case. 14th biennial phonosurgery symposium. July 7-9, 2016. Madison.
2. **Kishimoto Y**, Kawai Y, Hirano S, Welham NV. In vitro experimental models for the study of vocal fold scar and presbyphonia. 14th biennial phonosurgery symposium. July 7-9, 2016. Madison.
3. **Kishimoto Y**, Tateya I, Sogami T,

- Kitamura M, Hirano S, Omori K. Complications after endoscopic laryngo-pharyngeal surgery. The 96th Annual Meeting of American Broncho-Esophagological Association. May 18-19, 2016. Chicago.
4. **Kishimoto Y**, Hirano S. Intracordal injection of basic fibroblast growth factor for vocal fold scar and atrophy. The 10th East Asian Conference on Phonosurgery. March 4-5, 2016. Kumamoto.
5. **Kishimoto Y**, Hirano S. Photocoagulation therapy for laryngeal dysplasia using angiolytic lasers. The 13th Japan-Taiwan Conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery. Dec 3-4, 2015. Tokyo.
6. **Kishimoto Y**. Current treatment options for vocal fold scarring. World congress on larynx cancer 2015. July 26-30, 2015. Cairns.
7. **Kishimoto Y**, Wei A, Xiong M, Toya Y, Ling C, Hirano S, Welham NV. Identification of bone marrow-derived migratory cells in the naïve and injured vocal fold. The 95th Annual Meeting of American Broncho-Esophagological Association. April 22-23, 2015. Boston.
8. **Kishimoto Y**, Wei A, Toya Y, Welham NV. Gene silencing therapy for vocal fold scarring. July 10-12, 2014. 13th biennial phonosurgery symposium. Madison.
9. **Kishimoto Y**, Wei A, Toya Y, Ling C, Hirano S, Welham NV. Targeted depletion of monocyte-lineage cells attenuates vocal fold scar formation in mice. The 94th Annual Meeting of American Broncho-Esophagological Association. May 14-15, 2014. Las Vegas.
10. **岸本曜, 大森孝一**. 喉頭・気管の上皮再

生・第16回日本再生医療学会・平成29年3月7~9日・仙台。

11. **岸本暉**, 末廣篤, 楯谷一郎, 大森孝一. **声帯における骨髄由来細胞の分布**. 第61回日本音声言語医学会. 平成28年11月3~4日. 横浜.

12. **岸本暉**, 河合良隆, 平野滋. **加齢に伴う声帯線維芽細胞の変化**. 第16回日本抗加齢学会. 平成28年6月10~12日. 横浜.

13. **岸本暉**, 平野滋. **塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた声帯萎縮・声帯癒痕治療**. 第28回日本喉頭科学会. 平成28年3月3~4日. 大阪.

14. **岸本暉**, 平野滋. **加齢声帯に対するアスタキサンチンの効果**. 第15回日本抗加齢医学会. 平成27年5月29~31日. 福岡.

15. **岸本暉**, 平野滋, 伊藤壽一. **声帯癒痕化過程におけるマクロファージの働き**. 第18回日本耳鼻咽喉科学会. 平成27年5月20~23日. 東京.

16. **岸本暉**, 平野滋, 楯谷一郎, 樋渡直, 辻拓也, 河合良隆, 金子真美. **肝細胞増殖因子を用いた声帯癒痕の再生に関する医師主導治験**. 第30回西日本音声外科研究会. 平成27年1月10日. 神戸.

17. **岸本暉**, 平野滋. **塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた声帯萎縮・癒痕の治療**. 第66回日本気管食道科学会. 平成26年11月13~14日. 高知.

18. **岸本暉**, 平野滋, 伊藤壽一. **声帯癒痕における声帯線維芽細胞のキャラクター変化**. 第26回日本喉頭科学会. 平成26年3月6~7日. 那覇.

19. Suzuki R, Kawai Y, Tsuji T, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Tateya I, Nakamura T, Hirano S. Prevention of vocal fold scarring by local application of basic fibroblast growth factor in a rat vocal fold injury model. Combined Otolaryngology Spring Meeting. May 18-19

2016. Chicago.

20. 鈴木良, 河合良隆, 辻拓也, 岸本暉, 楯谷一郎, 大森孝一, 平野滋. bFGF投与による声帯癒痕予防効果における急性期メカニズム. 第28回日本喉頭科学会・学術講演会; 平成28年3月3日~4日. 大阪.

21. 鈴木良, 河合良隆, 辻拓也, 樋渡直, 岸本暉, 楯谷一郎, 大森孝一, 平野滋. bFGFのラット声帯癒痕予防効果 第37回日本炎症・再生医学会; 平成28年6月16日~17日. 京都.

22. 河合良隆, 岸本暉, 金子真美, 楯谷一郎, 平野滋. ラット声帯における slow cycling cell の同定とその性状. 第60回日本音声言語医学会. 平成27年10月15~16日. 名古屋.

23. Suzuki R, Hirano S, Tateya I, Kishimoto Y, Hiwatashi N, Kawai Y, Ito J. Prevention of vocal fold scarring with local application of basic fibroblast growth factor in rat model. Combined Otolaryngology Spring Meeting. April 22-23, 2015. Boston.

24. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Kawai Y, Suzuki R, Kishimoto Y, Kanemaru S, Ito J. The Regenerative Effect of Mesenchymal Stromal Cells for Canine Vocal Fold Scar. Combined Otolaryngology Spring Meeting. Apr 22-26 2015. Boston.

25. Kawai Y, Kishimoto Y, Suzuki R, Tsuji T, Hiwatashi N, Tateya I, Yamamoto N, Hirano S. Distribution and characteristics of slow-cycling cells in rat vocal folds 95th Annual Meeting of American Broncho-Esophagological Association. April 22-23, 2015. Boston.

26. Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Kobayashi T, Kawai Y, Kishimoto Y, Tateya I, Kanemaru S, Ito J. The Comparison of Mesenchymal Stem Cells for Regeneration of

Rat Chronic Vocal Fold Scar. Combined
Otolaryngology Spring Meeting . May 14-18
2014. Las Vegas.

〔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

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸本 曜 (KISHIMOTO, Yo)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭
頸部外科 特定病院助教

研究者番号: 80700517

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

平野 滋 (HIRANO, Shigeru)

京都府立医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
教授

楯谷一郎 (TATEYA Ichiro)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭
頸部外科 講師

北村守正 (KITAMURA Morimasa)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭
頸部外科 助教

水田匡信 (MIZUTA Masanobu)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭
頸部外科 医員

樋渡直 (HIWATASHI Nao)

京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭
頸部外科 医員

河合良隆 (KAWAI Yoshitaka)

ウィスコンシン大学マディソン校 耳鼻咽
喉科 Visiting researcher

Nathan V. Welham

ウィスコンシン大学マディソン校 耳鼻咽
喉科 Associate Professor