

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10829

研究課題名(和文) ヒト声帯粘膜の幹細胞システムの解明

研究課題名(英文) Investigations of the stem cell system of the human vocal fold mucosa

研究代表者

佐藤 公則 (SATO, Kiminori)

久留米大学・医学部・客員教授

研究者番号：70196228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト声帯黄斑内の細胞は組織幹細胞の可能性が高まってきている。また細胞が密に分布するヒト声帯黄斑は、組織幹細胞を維持している微小環境(幹細胞ニッチ)である可能性が高まってきている。ヒト声帯粘膜の幹細胞システムを検討した。

ヒト声帯黄斑内の細胞は骨髄由来の間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質細胞であることが示唆された。成人と新生児の声帯黄斑内の細胞は、分化度が低く、3杯葉への分化が可能であり、多分化能を持ち、杯葉を越えて分化する可能性がある細胞であることが示唆された。声帯黄斑内の細胞が幹細胞性を維持するためには、幹細胞ニッチとしてのヒト声帯黄斑の微小環境が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： The stem cell system in the maculae flavae of the human vocal fold mucosa was investigated.

Cells in the human maculae flavae expressed the major makers for bone marrow derived circulating fibrocytes. The cultured cells in the human maculae flavae were undifferentiated and express proteins of all three germ layers. Using mesenchymal stem cell growth medium, the subcultured cells formed a colony-forming unit and cell division was an asymmetric self-renewal, indicating these cells are mesenchymal stem cells or stromal stem cells in the bone marrow. A proper microenvironment in the maculae flavae of the human vocal fold mucosa is necessary to be effective as a stem cell niche maintaining the stemness of the contained putative stem cells. The results of this study are consistent with the hypothesis that the cells in the human maculae flavae are putative stem cells of the human vocal fold mucosa.

研究分野：医学

キーワード：組織幹細胞 幹細胞システム 幹細胞ニッチ ヒト声帯粘膜 再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

ヒト声帯前・後黄斑内のヒト声帯星細胞をはじめとした細胞は、声帯組織の恒常性を維持し、声帯が損傷した場合には失われた細胞を産生して再生させる、すなわちヒト声帯黄斑内の細胞は組織幹細胞の機能を持っているのかを解明する研究を継続している。またヒト声帯星細胞をはじめとした細胞が密に分布するヒト声帯黄斑は、組織幹細胞を維持している微小環境(幹細胞ニッチ)なのか、組織幹細胞の増殖や分化は、その細胞周辺環境(幹細胞ニッチ)によって制御されているのかを解明する研究を継続している。

## 2. 研究の目的

ヒト声帯膜様部粘膜の前端と後端には黄斑が存在する。黄斑内に通常の線維芽細胞とは異なった細胞(ヒト声帯星細胞)が存在することを我々は2001年に発見し、その形態と機能を研究してきた。

我々の研究から、ヒト声帯黄斑内の細胞は声帯組織の恒常性を維持し、声帯が損傷した場合には失われた細胞を産生して再生させる組織幹細胞(Tissue Stem Cell)の可能性が高まってきている。また細胞が密に分布するヒト声帯黄斑は組織幹細胞を維持している微小環境(幹細胞ニッチ)である可能性が高まってきている。

本研究の最終的な目的は、ヒト声帯黄斑内の細胞は声帯組織の恒常性を維持し、声帯が損傷した場合には失われた細胞を産生して再生させる、すなわち組織幹細胞としての機能を持っていることを解明することにある。またヒト声帯黄斑は組織幹細胞を維持している微小環境(幹細胞ニッチ)であり、組織幹細胞の増殖や分化は、その細胞周辺環境(幹細胞ニッチ)によって制御されていることを解明することにある。

ヒト声帯組織の細胞外マトリックスの恒常性を維持し、声帯が損傷した場合には失われた細胞を産生して再生させていると推察

される声帯黄斑と黄斑内細胞の機能を解明することで、ヒト声帯の細胞外マトリックスの代謝のメカニズム、さらにヒト固有の特徴的な声帯構造あるいは物性(粘弾性)が声帯に発生する病気にどのように関与しているのかを解明するための基礎的研究になる。

近年組織工学と再生医療が急速に発展しているが、本研究はヒト声帯の組織工学あるいは再生医療の基礎的研究と臨床応用に貢献できる研究になる。間葉系幹細胞を含めた組織幹細胞さらにニッチを操作する声帯・喉頭の再生医療研究、組織幹細胞を生体内で制御し組織再生させるケミカルバイオロジーにおいても基礎的研究になると考えられる。

### (1) 声帯黄斑内の細胞の起源を解明する

声帯黄斑内の細胞は、骨髄由来間葉系幹細胞あるいは骨髄由来間質細胞であるかどうかを検討する。

### (2) ヒト声帯黄斑内の細胞の組織幹細胞性(幹細胞システム)を解明する

ヒト声帯黄斑内の細胞を組織培養し、その増殖形態、分裂形態、すなわち幹細胞の階層性(hierarchy)、細胞分化の系列決定あるいは拘束(lineage commitment)を検討する。

### (3) ヒト声帯黄斑における幹細胞性の維持(幹細胞システム)を解明する。

ヒト声帯黄斑の細胞周辺環境が、幹細胞の細胞周辺環境すなわち細胞微小環境(幹細胞ニッチ)であるヒアルロン酸リッチマトリクスであることを明らかにしたが、さらに組織幹細胞の幹細胞性(stemness)の維持はどのように行われているのかを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 声帯黄斑内の細胞の起源を解明する

声帯黄斑内の細胞は、骨髄由来の間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質細胞であるかどうかを検討する。

ヒト成人と新生児の黄斑内の細胞が、造血幹細胞あるいは骨髄由来の circulating fibrocyte のマーカーである CD34、CD45、

Collagen type I の発現を、ホルマリン固定した成人と新生児の黄斑の標本を用いて免疫組織化学で検討した。

(2) ヒト声帯黄斑内の細胞の組織幹細胞性 (幹細胞システム) を解明する

ヒト声帯の前黄斑を顕微鏡下に摘出し、通常の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地あるいは間葉系幹細胞培地で黄斑内の細胞を継代培養し、幹細胞性 (自己複製と分化の2つの性質を有する細胞を生じるか、複数の細胞種へ分化する多分化能を有するか)、その増殖形態 (Colony-forming unit を形成するのか)、分裂形態 (非対称性分裂か対称性分裂か) などを観察した。

ホルマリン固定した成人と新生児の黄斑の標本を用いて、細胞骨格である細胞質の中間径フィラメントの構成蛋白質組成 (サイトケラチン、ビメンチン、デスミン、GFAP (Glial fibrillary acidic protein))、内杯葉由来細胞のマーカである SOX17 を免疫組織化学的に検討し、ヒト声帯黄斑内の細胞の分化度を明らかにした。

ヒト成人声帯黄斑内の細胞を組織培養し、細胞骨格である細胞質の中間径フィラメントの構成蛋白質組成 (サイトケラチン、ビメンチン、デスミン、GFAP など)、内杯葉由来細胞のマーカである SOX17 を免疫組織化学的に検討し、ヒト声帯黄斑内の細胞の分化度を明らかにした。

ホルマリン固定した成人と新生児の黄斑の標本を用いて、ヒト胚性幹細胞 (Embryonic stem cell) に発現する SSEA-3 (Stage specific embryonic antigen 3) を免疫組織化学的に検討した。

(3) ヒト声帯黄斑 (幹細胞ニッチ) における幹細胞性の維持 (幹細胞システム) を解明する

ヒト声帯黄斑の細胞周辺環境、すなわち組

織幹細胞の細胞微小環境 (幹細胞ニッチ) が、組織幹細胞の幹細胞性 (stemness) の維持にどのように関わっているのかを解明する。

ヒト声帯黄斑の細胞周辺環境、すなわち組織幹細胞の細胞微小環境 (幹細胞ニッチ) がヒアルロン酸リッチマトリクスであることは、我々の研究で既に分かっている。

ヒト声帯の前黄斑を顕微鏡下に摘出し、通常の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 培地あるいは間葉系幹細胞培地などで培養液の条件を変えて黄斑内の細胞を継代培養し、どのような条件でヒト声帯黄斑内の細胞が幹細胞性を維持できるのかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 声帯黄斑内の細胞の起源を解明する

ヒト成人と新生児の声帯黄斑内の細胞が、造血幹細胞あるいは骨髄由来の circulating fibrocyte のマーカである CD34、CD45、Collagen type I を発現した。したがって声帯黄斑内の細胞は、声帯固有の間質細胞ではなく、その起源は骨髄由来の間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質細胞であることが示唆された。

このことからヒト成人の声帯黄斑内の細胞は末梢循環経路で骨髄から供給されていることが示唆された。新生児の黄斑内の細胞は、胎生期に末梢循環経路で骨髄から声帯黄斑内に既に供給されており、出生直後からヒト固有の声帯粘膜の成長・発達に関与すると考えられた。

(2) ヒト声帯黄斑内の細胞の組織幹細胞性 (幹細胞システム) を解明する

通常の DMEM 培地を用いると、声帯黄斑からは脂肪滴を細胞質にもつ大型の細胞、すなわち声帯星細胞に類似した細胞が対称性に分裂した。間葉系幹細胞増殖培地の MF-start 培地で培養を行うと、初代培養で2種類の形態の異なる細胞、すなわち線維芽細

胞様の細胞と敷石状の扁平細胞が黄斑から増殖した。これらの2種類の細胞を分離、単離し、間葉系幹細胞増殖培地の MF-medium 培地で培養を行うと、線維芽細胞様の細胞からは脂肪滴を細胞質にもつ大型の細胞、すなわち声帯星細胞に類似した細胞が増殖した。敷石状の扁平細胞は colony-forming unit、いわゆるコロニーを形成し、間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質幹細胞などである可能性が示唆された。

このように声帯黄斑内の細胞は、細胞周囲の微小環境を整えれば、幹細胞システム特有の非対称性分裂を行うが、細胞周囲の微小環境を整えなければ、対称性分裂を行った。声帯黄斑内の細胞が幹細胞性 (stemness) を維持するためには、幹細胞ニッチとしてのヒト声帯黄斑の微小環境が重要であることが今回の検討から示唆された。

ヒト声帯の黄斑内では、幹細胞性の維持、幹細胞の階層性、細胞分化における系列決定あるいは拘束がどのように行われているのか、今後更なる研究が必要であると考えられた。

新生児の声帯黄斑内の細胞は、上皮細胞の中間径フィラメントの構成タンパク質であるサイトケラチン、間葉系細胞の中間径フィラメントの構成タンパク質であるビメンチン、筋細胞の中間径フィラメントの構成タンパク質であるデスミン、神経細胞の中間径フィラメントの構成タンパク質である GFAP を発現していた。また内杯葉由来細胞のマーカーである SOX17 を発現していた。したがって成人と新生児の黄斑内の細胞は、外杯葉、中杯葉、内杯葉の3杯葉由来の細胞であることが示唆され、分化度が低く、多分化能を持った細胞であることが示唆された。

また組織培養したヒト成人声帯黄斑内の細胞も、サイトケラチン、ビメンチン、デスミン、GFAP、SOX17 を発現していた。したがって組織培養したヒト成人声帯黄斑内の

細胞は、外杯葉、中杯葉、内杯葉の3杯葉由来の細胞であることが示唆され、分化度が低く、多分化能を持った細胞であることが示唆された。

成人と新生児の声帯黄斑内の細胞は、ヒト胚性幹細胞 (Embryonic stem cell) に発現する SSEA-3 を発現していた。

このように成人と新生児の声帯黄斑内の細胞は、分化度が低く、3杯葉への分化が可能であり、多分化能を持ち、杯葉を越えて分化する可能性がある細胞であることが示唆された。

(3)ヒト声帯黄斑 (幹細胞ニッチ) における幹細胞性の維持 (幹細胞システム) を解明する

間葉系幹細胞増殖培地の MF-start 培地で培養を行うと、初代培養で2種類の形態の異なる細胞、すなわち線維芽細胞様の細胞と敷石状の扁平細胞が黄斑から増殖した。これらの2種類の細胞を分離、単離し、間葉系幹細胞増殖培地の MF-medium 培地で培養を行うと、線維芽細胞様の細胞からは脂肪滴を細胞質にもつ大型の細胞、すなわち声帯星細胞に類似した細胞が増殖した。敷石状の扁平細胞は colony-forming unit、いわゆるコロニーを形成し、間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質幹細胞などである可能性が示唆された。

このように声帯黄斑内の細胞は、細胞周囲の微小環境を整えれば、幹細胞システム特有の非対称性分裂を行う。声帯黄斑内の細胞が幹細胞性 (stemness) を維持するためには、幹細胞ニッチとしてのヒト声帯黄斑の微小環境が重要であることが今回の検討から示唆された。

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8件)

佐藤公則：加齢に伴うヒト声帯の機能形態学的変化. ディソースリア臨床研究、査読

有、7巻、2017、47-55.

佐藤公則、栗田 卓、佐藤公宣、千年俊二、梅野博仁：ヒト声帯黄斑の機能 -ヒトはなぜ一生発声できるのか- 日本音声言語医学、査読有、58巻、2017、301-309.

佐藤公則：ヒト声帯黄斑の形態と機能. デイサースリア臨床研究、査読有、6巻、2016、53-60.

Kiminori Sato, Shun-ichi Chitose, Takashi Kurita, Hirohito Umeno: Microenvironment of macula flava in the human vocal fold as a stem cell niche. J Laryngol Otol、査読有、130、2016、656-661.

Kiminori Sato, Shun-ichi Chitose, Takashi Kurita, Hirohito Umeno: Cell origin in the macula flava of the human newborn vocal fold. J Laryngol Otol、査読有、130、2016、650-655.

Takashi Kurita, Kiminori Sato, Shun-ichi Chitose, Mioko Fukahori, Shintaro Sueyoshi, Hirohito Umeno: Origin of Vocal Fold Stellate Cells in the Human Macula Flava. Ann Otol Rhinol Laryngol、査読有、124、2015、698-705.

Kiminori Sato, Shun-ichi Chitose, Hirohito Umeno: Dimensions and Morphological Characteristics of Human Newborn Glottis. Laryngoscope、査読有、125、2015、E186-E189.

Kiminori Sato, Takashi Kurita, Shun-ichi Chitose, Hirohito Umeno, Tadashi Nakashima: Mechanical Regulation of Human Vocal Fold Stellate Cells. Ann Otol Rhinol Laryngol、査読有、124、2015、49-54.

〔学会発表〕(計 15 件)

Fumihiko Sato, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato, Takashi Kurita, Kiminobu Sato, Hirohito Umeno, Hiroisa Yano: Multipotency of the Cells in the Macula Flava of the Human Vocal Fold. The 139<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association (April 18-20, 2018, National Harbor, Maryland)

佐藤公則：教育セミナー 音声外科に必

要な喉頭の臨床組織解剖. 第 30 回日本喉頭科学会 (2018 年 3 月 1-2 日、高知)

佐藤文彦、千年俊一、佐藤公則、栗田 卓、佐藤公宣、梅野博仁、矢野博久：ヒト声帯の組織幹細胞 -ヒト声帯黄斑細胞の多分化能- 第 69 回日本気管食道科学会 (2017 年 11 月 8-9 日、大阪)

佐藤文彦、千年俊一、佐藤公則、栗田 卓、佐藤公宣、梅野博仁、矢野博久：ヒト声帯の組織幹細胞-ヒト声帯黄斑細胞の分化誘導による分化能評価- 第 18 回日本耳鼻咽喉科学会 (2017 年 5 月 17-20 日、広島)

Kiminobu Sato, Takashi Kurita, Shun-ichi Chitose, Kiminori Sato, Hirohito Umeno, Hirohisa Yano: Tissue stem cells and stem cell niche of the vocal fold mucosa: Identification using label-retaining cell assay. The 138<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association (April 26-28, 2017, San Diego, California)

佐藤公宣、栗田 卓、千年俊一、佐藤公則、梅野博仁、矢野博久：喉頭の組織幹細胞の局在と分布 -ラベル保持細胞法による声帯粘膜の組織幹細胞の同定- 第 29 回日本喉頭科学会 (2017 年 4 月 6-7 日、盛岡)

佐藤公宣、栗田 卓、千年俊一、佐藤公則、梅野博仁、矢野博久：喉頭の組織幹細胞の局在と分布 -声帯粘膜の幹細胞ニッチ- 第 68 回日本気管食道科学会 (2016 年 11 月 17-18 日、東京)

佐藤公則、栗田 卓、佐藤公宣、千年俊二、梅野博仁：ミニレクチャー ヒト声帯黄斑の機能 -ヒトはなぜ一生発声できるのか- 第 61 回日本音声言語医学会 (2016 年 11 月 3-4 日、横浜)

佐藤公宣、栗田 卓、千年俊一、佐藤公則、梅野博仁、矢野博久：喉頭の組織幹細胞の局在と分布 -ラット声帯黄斑内の細胞の中間系フィラメント- 第 117 回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会 (2016 年 5 月 18-21 日、

名古屋)

Kiminori Sato, Shun-ichi Chitose, Takashi Kurita, Hirohito Umeno: Vocal Fold Stellate Cells. A new category of cells in the human vocal fold. The 96<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association (May 18-19, 2016, Chicago, Illinois)

佐藤公宣、栗田 卓、千年俊一、佐藤公則、梅野博仁、矢野博久：喉頭の組織幹細胞の局在と分布 -声帯膜様部粘膜の組織幹細胞- 第 28 回日本喉頭科学会( 2016 年 3 月 3-4 日、大阪)

Kiminori SATO, Shun-ichi CHITOSE, Takashi KURITA, Hirohito UMENO: Cell Origin In The Macula Flava Of The Human Newborn Vocal Fold. The 95<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association (April 22-23, 2015, Boston, Massachusetts)

Kiminori SATO, Takashi KURITA, Shun-ichi CHITOSE, Hirohito UMENO: Microenvironment of Macula Flava in the Human Vocal Fold as a Stem Cell Niche. The 136<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association (April 22-23, 2015, Boston, Massachusetts)

佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：ヒト声帯黄斑内の声帯星細胞の幹細胞性。第 27 回日本喉頭科学会( 2015 年 4 月 9-10 日、東京)

佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：ヒト声帯粘膜の組織幹細胞と幹細胞ニツチ。第 14 回日本再生医療学会( 2015 年 3 月 19-21 日、横浜)

〔図書〕(計 2 件)

Kiminori SATO: Functional Histoanatomy of the Human Larynx. Springer Singapore, Singapore, 2018.

Kiminori SATO: The Macula Flava of the Human Vocal Fold as a Stem Cell Microenvironment. In: Alexander Birbrair, editors.

Stem Cell Microenvironments and Beyond. pp 171-186, Springer International Publishing, Switzerland, 2017.

〔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：

## 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・客員教授  
研究者番号：70196228

### (2)研究分担者

千年 俊一 (CHITOSE, Shun-ichi)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：20299514  
梅野 博仁 (UMENO, Hirohito)  
久留米大学・医学部・教授  
研究者番号：40203583