

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06758

研究課題名(和文) 熱性喉頭粘膜障害の組織学的・分子生物学的解明と G-CSF による治療効果の検証

研究課題名(英文) Histological and molecular biology of thermal laryngeal mucosal disorder and verification of therapeutic effect by G-CSF

研究代表者

佐藤 拓 (Sato, Taku)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50779808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：熱傷や放射線治療、外科的手術での焼灼などによる喉頭癒痕や気道狭窄など、熱性喉頭粘膜障害は臨床において非常に治療に難渋する病態である。本研究は、熱性喉頭組織障害のメカニズムの解明を行うこと、臨床応用可能な治療として、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)の投与による障害抑制効果を検証することを目的とする。

組織学的・分子生物学的において熱性喉頭粘膜障害モデル作成に成功した。しかし、障害抑制効果のあるターゲットとなる物質の発見に対しては未解明であり、今後の研究の課題である。

研究成果の概要(英文)：Thermal laryngeal mucosal disorders such as laryngeal scarring and narrowing of the airway caused by burns, radiotherapy, cauterization with surgical operation, etc. are clinically extremely difficult to treat. The purpose of this study is to elucidate the mechanism of thermal laryngeal tissue disorder and to investigate the effect of suppressing disorder by administration of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) as clinically applicable therapy. We were succeeded in making the model of thermal laryngeal mucosal disorder in histological and molecular biology. However, the substance with mucosal disorder inhibitory effect have not been found and it is a subject of future research.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：熱性喉頭粘膜障害 顆粒球コロニー刺激因子 G-CSF サイトカイン 熱傷 気道狭窄

## 1. 研究開始当初の背景

熱傷や放射線治療、外科的手術での焼灼などによる喉頭癒痕や気道狭窄など、熱性喉頭粘膜障害は臨床において非常に治療に難渋する病態である。本研究は、熱性喉頭組織障害の経時的な組織学的変化・分子生物学的なメカニズムの解明を行うことを目的に、動物モデルを作製し、コラーゲンや弾性線維、ヒアルロン酸、分泌線などの組織学的解析と炎症性サイトカインなどの分子機構の分子生物学的解析を行う。また、臨床応用可能な治療として、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の投与による障害抑制効果を検証することを目的とする。

## 2. 研究の目的

### ①熱性喉頭組織障害に関する背景

熱傷や放射線治療、外科的手術での焼灼などによる喉頭癒痕や気道狭窄など、熱性喉頭組織障害は、臨床において非常に治療に難渋する病態である。特に気道熱傷の場合、受傷後短時間で急性炎症による気道浮腫を生じることから慎重な気道管理を必要とすることが多い。また、頭頸部悪性腫瘍に対する放射線治療による咽頭頭粘膜障害、早期喉頭癌に対するレーザー治療による熱性喉頭粘膜障害後遺症は QOL(生活の質)に関わる障害である。

喉頭領域の熱性喉頭組織傷害としては、声帯癒痕や喉頭変形、喉頭狭窄が挙げられる。声帯癒痕や喉頭癒痕の治療は難渋することが多く、外科的手術による癒痕切除やトリウムシノロンアセトニド局所投与が行われてきたが、癒痕や硬縮が再発しやすいとされてきた。声帯癒痕では、声帯の粘膜硬化のため有効な声帯振動が阻害され、音声障害が生じる。近年、声帯癒痕に対して、線維化予防因子である、線維芽細胞増殖因子(bFGF:basic fibroblast growth factor)、肝細胞増殖因子(HGF:hepatocyte growth factor)の声帯内投与により、コラーゲン沈着・組織拘縮を抑制し、ヒアルロン酸、エラスチンが維持されるなどの効果が報告されている (Hirano et al. 2007)。しかしながら、声帯以外の喉頭粘膜への影響や熱性障害による効果に関しては不明である。

熱傷の傷害過程は、急性期 (48 時間以内)・亜急性期 (48 時間~2 週間)・慢性期 (2 週間以降) に分けられる。急性期には、組織から TNF- $\alpha$  や IL-1、IL-6、INF- $\gamma$ 、TGF- $\beta$  など各種サイトカイン、様々なケミカルメディエータが放出されて血管透過性が亢進し浮腫が著明となる。亜急性期には単球の誘導から線維芽細胞が増加し、慢性期には TGF- $\beta$ 、IL-10 など抗炎症性サイトカインが増加し、傷害治癒過程に至る (松田ら、2010)。喉頭においては、急性期の炎症性組織障害による浮腫から呼吸障害が生じ、慢性期には線維化進行による組織障害により音声障害や喉頭変形、進行する気道狭窄、嚥下障害など

の諸問題を生じうる。喉頭狭窄に関しては声門上部・声門部・声門下いずれも生じうる。声門下の熱性障害のメカニズムに関しては組織学的にも分子生物学的にもほとんど解明されていないのみならず、声門部においても十分な分子生物学的メカニズム解明には至っておらず、解明が待たれている病態であり意義が大きい。

### ②顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) と組織傷害改善効果に関して

G-CSF は、IL-6 サイトカインファミリーのひとつで、血球系へ作用、心筋細胞増殖効果、毛細血管の再生効果や、抗線維化作用が医療現場で実証されており、熱傷患者や消化管炎症への創傷治癒促進効果も報告されている (Orlic D, et al 2001, Claudia P, et al 2008, Shimoji K, et al 2010)。

我々の研究チームでは、既に、頭頸部領域における G-CSF の効果を動物モデルで検証 (顔面神経切断後における G-CSF による神経再生促進効果と喉頭筋損傷後の G-CSF による筋再生促進効果: 現在論文投稿中) しており、G-CSF の皮下注射による効果を証明している。喉頭粘膜損傷への G-CSF 喉頭領域での臨床使用はされておらず、動物モデルを使用した報告も現在のところ皆無である。本研究においても、熱性喉頭傷害の分子生物学的機序の解明を踏まえて、熱性喉頭傷害後の再生過程に対して、炎症性サイトカインや線維化を治療ターゲットとし、臨床応用されている薬剤である G-CSF 投与の効果が期待され、また臨床に直結する重要な知見が得られることが期待される。さらに、過去の神経・筋への皮下注射での効果を考慮すると、声帯内投与といった侵襲的な治療より、より低侵襲(皮下注射)な方法で、治療することができるのではないかと期待している。

## 3. 研究の方法

### ①熱性喉頭粘膜障害モデルの作成と適正評価

本研究では Sprague Dawley ラット (以下ラット: 8 週齢・オス) を使用する。キシラジン・ケタミン腹腔投与後に喉頭内視鏡で喉頭を確認し、27G 針を用いて右側の声帯から声門下まで電気焼灼し動物モデルとする (図 1)。さまざまな焼灼条件 (出力、時間) での喉頭組織障害の程度を顕微鏡下および、組織切片の HE 染色にて評価し、適正条件を決定する。



(図 1)

## ②傷害後の経時的变化に関する組織学的・免疫組織学的解析

処置後、Day1、7、14、28 に組織採取を行い、ホルマリン固定・EDTAによる脱灰後に冠状断の組織切片を作成する。組織染色を行い、①喉頭粘膜構造 (HE 染色)、②膠原線維 (エラスティック・ワンギーン染色)、③弾性線維 (エラスティック・ワンギーン染色)、④ヒアルロン酸 (アルシアンブルー染色)、⑤分泌腺 (アルシアンブルー・染色 PAS 染色) を、各タイムポイント別に Image J で計測しコントロール組織と比較する。

また、免疫組織学的解析として、炎症細胞浸潤と線維芽細胞の免疫染色を行う。好中球 (抗好中球抗体)、リンパ球 (抗 CD3 抗体)、単球 (抗 f 4/80 抗体) の数をタイムポイント別にカウントし、正常組織の比較や経時的な比較検討を行う。

## ③傷害後の経時的变化に関する分子生物学的解析

深麻酔下に喉頭組織を摘出後、喉頭粘膜・粘膜下組織を丁寧に剥離し採取する。RNA から cDNA を合成し RT-PCR 法にて喉頭粘膜・粘膜下組織の各種サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ ) 及び G-CSF-R 発現量を解析する。それぞれの経時变化を比較検証する。

## ④G-CSF 投与による傷害回復へ与える影響の解析

熱性喉頭組織障害モデル作成後、G-CSF を様々なタイムポイントで投与濃度を調整して投与する。それぞれのモデルにおいて、組織学的変化や炎症細胞浸潤の違い、各種サイトカインの変化を定量比較し、G-CSF の効果を検証し、よりよい治療効果が得られる投与量や投与タイミング、投与回数を解明する。

### a. G-CSF 投与方法

G-CSF 製剤として、レノグラスチム (ノイトロジン注 250  $\mu$ g、中外製薬) を使用する。G-CSF 製剤は一般的に半減期が非常に短いという問題があるが、この問題の解決方法として、ドラッグデリバリーシステムであるゼラチンハイドロゲル (MedGel<sup>®</sup>) を用いる。

### b. 投与量の違いによる効果の評価

G-CSF を 10  $\mu$  l/kg、50  $\mu$  l/kg、200  $\mu$  l/kg で皮下投与し、各グループ別に Day28 に喉頭摘出を行い、以下を比較検討する。

#### i. 組織学的検証

膠原線維、弾性線維、ヒアルロン酸、分泌腺を Image J により各組織染色陽性部分の面積を計測し、比較検討を行う。

#### ii. 免疫組織学的検証

好中球、リンパ球、単球、マクロファージ、線維芽細胞の細胞数を計測し、経時的な比較検討を行う。

#### iii. 分子生物学的検証

炎症性サイトカイン (TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、

IFN- $\gamma$  など) や抗炎症性サイトカイン (TGF- $\beta$ 、IL-10 など) の変動を qRT-PCR 法で定量評価し、比較解析する。

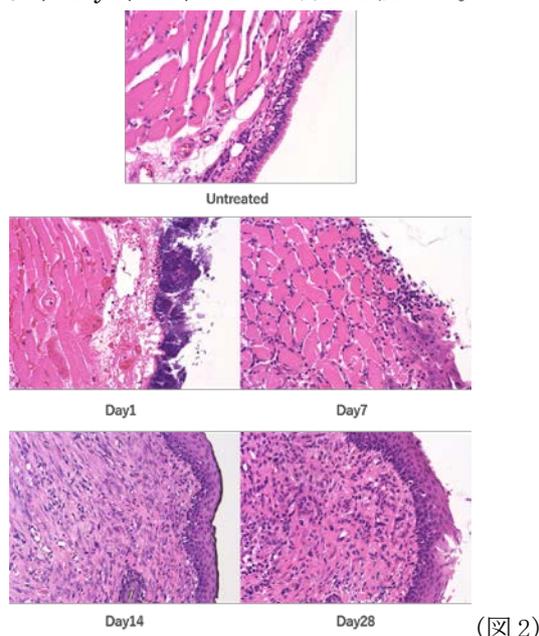
### c. 投与回数や投与時期の違いによる効果の評価

G-CSF を①Day1 のみ、②Day7 のみ、③Day14 のみ、④Day1、7、14 の4グループに分けて投与し、各グループ別に Day28 に喉頭組織摘出し、組織学的・分子生物学的に比較検討する。

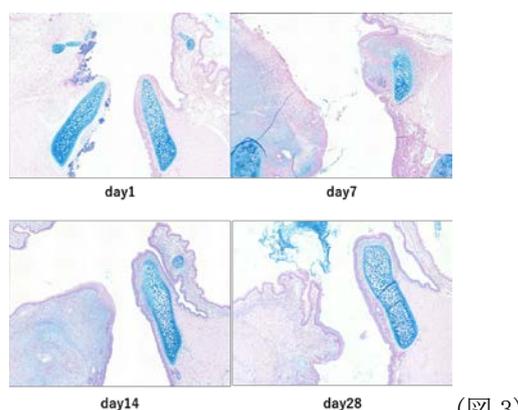
## 4. 研究成果

組織学的解析 (HE 染色 : 図 2、アルシアンブルー染色 : 図 3、エラスティックワンギーン染色 : 図 4) については、ラット熱性喉頭組織障害を作成し、組織の経時变化を正常組織と比較し、day1、7、14、28 にて以下が判明した。

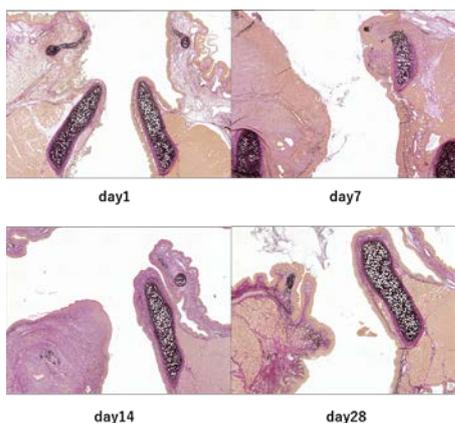
上皮において、day1 での脱落・剥離、day7 以降での不完全な再生を認めた。筋肉において、day1、7 での萎縮・減少、day14 以降での再生を認めた。基底層において、day1 での破壊、day7、14 での消失、day28 での再生を認めた。分泌腺において、day1 での減少、day7、14、28 での再生を認めた。



(図 2)



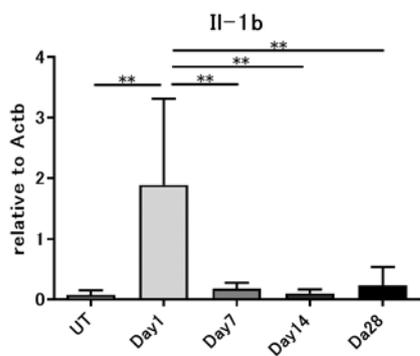
(図 3)



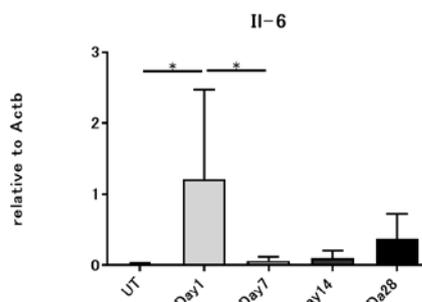
(図 4)

免疫組織学的解析としては、急性期での好中球、マクロファージの増加および慢性期での減少が確認できた。しかし、急性期および慢性期における G-CSF 受容体抗体の健側と患側の有意差は認められず、G-CSF 投与における障害抑制効果を証明するものではないと考えられた。そのため、G-CSF 投与による傷害回復へ与える影響の検討については今後の課題とした。

分子生物学的解析では、当モデルでの急性期での炎症性サイトカインの増加(IL-1 $\beta$ 、IL-6)および慢性期における減少が確認できた(表 1、2)。抗炎症サイトカインと言われている IL-10 に関しては、Untreated と比較して、day1 にて増加し、day7、14 にて減少し、day28 にて再度増加したものの、有意差は認めなかった。



(表 1)



(表 2)

本研究において、組織学的・分子生物学的において熱性喉頭粘膜障害モデル作成に成功し、この点においては解明に寄与したものと考えられた。しかしながら、障害抑制効果のあるターゲットとなる物質の発見に対しては未解明であり、今後の研究の課題と考えられる。

#### 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 0 件)

[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 拓 (Sato Taku)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：50779808

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者 ( )