

令和 元年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20255

研究課題名(和文)加齢による声帯粘膜固有層の線維化に対する新たな治療法の開発

研究課題名(英文)Potential treatment for vocal fold fibrosis due to aging with pirfenidone.

研究代表者

宮丸 悟(Miyamaru, Satoru)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：10535636

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):加齢によって生じる声帯粘膜固有層の線維化を、抗線維化作用を有する薬剤(ピルフェニドン)を使用することで回復させることができないか検討した。生後18ヶ月齢のラットの声帯から筋線維芽細胞を培養し、コラーゲンゲル収縮アッセイを行い、ピルフェニドンの添加によって線維化が抑制されている可能性が示唆された。免疫染色では、コラーゲンタイプ1、SMAともにピルフェニドン添加による変化は見られなかった。加齢による声帯粘膜固有層の線維化はピルフェニドンの投与で改善させることができる可能性はあるが、より詳細な検討が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢による声帯粘膜固有層の線維化に対して、その効果が確認されて広く臨床に応用されている薬剤はない。本研究では、抗線維化作用を有する薬剤として、肺線維症に対してすでに薬事承認されているピルフェニドンをを用いた。声帯の加齢による線維化に対しても有効である可能性が示唆され、その学術的な意義は大きいと考えられる。今後さらに検討を加えて有効性を確認できれば、十分に臨床応用が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文):We examined the antifibrotic effects of pirfenidone (PFD) on myofibroblasts (MFs) isolated from vocal folds (VFs) in aged rats.

MFs were incubated in the presence of transforming growth factor 1, with or without PFD. After the 48-hour incubation, immunohistochemistry with anti-smooth muscle actin (SMA) and anti-collagen type 1 antibodies was performed. MFs were cultured in collagen gel with or without PFD for 48hours, and extent of gel contraction was examined.

PFD suppressed gel contraction in some models. However, in other models, gel contraction did not arise even without PFD. As to immunohistochemistry, there were no differences on the expression of SMA and collagen type 1 between with or without PFD. Fibrosis of MFs caused by aging might be not enough to examine the antifibrotic effects of PFD with our methods. Further studies including other experimental manners are necessary.

研究分野：喉頭基礎

キーワード：声帯 加齢 線維化 抗線維化作用 コラーゲン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢によって生じる嚙声は、声帯筋の萎縮と声帯粘膜固有層の細胞外基質の変化が主因と考えられている。これに対する治療としては、声帯筋の萎縮をターゲットにした、声帯への物質の注入治療や喉頭の粹組み手術 (Slavit DH. Ear Nose Throat J 1999, Tucker HM. Ann Otol Rhinol Laryngol 1988) が主に行われてきた。声帯の質量を増加させることで、萎縮によって生じる発声時の声帯の間隙を狭め、嚙声を改善させる方法である。しかし、これらの治療法だけでは声帯粘膜固有層の変化を回復させることはできず、嚙声に対する効果は限定的である。

声帯粘膜固有層の細胞外基質は声帯振動に重要な役割を果たしており、その組成によって張力や粘弾性が最適な条件に保たれることで声帯粘膜は規則的に振動し、良好な音声となる。加齢による細胞外基質の組織学的な変化としてはコラーゲンが蓄積し (Sato K. Ann Otol Rhinol Laryngol 2002) 弾性線維や細網線維、ヒアルロン酸が減少する (Butler JE. Laryngoscope 2001) ことが分かっている。これらの変化によって粘膜固有層には萎縮と線維化が生じ、粘弾性が低下する。そのため声帯の規則的な粘膜振動は妨げられ、嚙声を生じることとなる。

加齢声帯の粘膜固有層をターゲットにした治療として、成長因子を用いた治療が試みられている。塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) を加齢ラットの声帯に注入することでヒアルロン酸が増加することが報告されている (Hirano S. Ann Otol Rhinol Laryngol 2005)。また、肝細胞成長因子の注入実験ではヒアルロン酸の増加に加えてコラーゲンの減少も確認されている (Ohno T. Laryngoscope 2009)。臨床においても、bFGF を声帯内に注入すると声帯の粘膜波動が改善し、空気力学的検査や音響分析といった発声機能検査で音声改善したことが報告されている

(Hirano S. Laryngoscope 2012)。このように成長因子を声帯に直接注入する方法は有用な治療法と考えられるが、施行できる施設が限られ、一人ひとりの処置に時間を要するといった点で、現時点では広く臨床応用するのは困難と考えられる。そこで、抗線維化作用を有する薬剤をより簡便に投与することで粘膜固有層の変化を回復させることはできないかと着想した。

声帯においては、手術操作や放射線治療、声の酷使といった様々な侵襲の後に声帯粘膜固有層でコラーゲンの増生、ヒアルロン酸の減少といった線維化が生じ、癒痕を形成することが知られている (Titze IR. J Voice 1997, Rousseau B. Laryngoscope 2003)。このような癒痕声帯の治療として、当教室では、特発性肺線維症に対して有効であることが実証され、すでに臨床で使用されているピルフェニドンに着目し研究を行っている。動物実験では、作製した癒痕声帯に対してピルフェニドンを添加することで線維化が改善することを確認している (Kodama H. Laryngoscope 2017, Kumai Y. Laryngoscope in press)。ピルフェニドンは組織の線維化過程に関連した様々な成長因子やサイトカインの動態に影響して抗線維化作用を発揮し、各臓器の線維化病変の軽減と機能改善をもたらすことが明らかとなっている (Schaefer CJ. Eur Respir Rev 2011)。加齢声帯の粘膜固有層でも同様の線維化が起こっていることから、ピルフェニドンの抗線維化作用によって細胞外基質の変化を回復させることができるのではないかと考えた。効果が実証されれば、薬剤の内服や吸入といった方法で広く臨床に応用できる可能性があり、その有用性は非常に高いと考えられる。

2. 研究の目的

加齢による嚙声の原因の一つである、声帯粘膜固有層の細胞外器質の変化に対して、抗線維化作用を有し、すでに臨床で使用されているピルフェニドンが有効であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

SD ラットの 8 週齢を若年モデル、18 ヶ月齢を高年齢モデルとして使用した。それぞれ安楽死後に喉頭を摘出して声帯から組織を採取し、筋線維芽細胞の培養を行った。2 回もしくは 3 回継代した細胞を用いた。

癒痕収縮、つまり線維化の抑制効果を検討する方法として、コラーゲンゲル収縮アッセイを用いた。4×10⁶個/mlの細胞をコラーゲンゲル溶液に混ぜて1時間培養したのち、10ng/mlのTGF-βと1.0mg/mlのピルフェニドンもしくはTGF-βのみを加えて48時間培養した。TGF-βは線維化促進作用を有することから添加した。それぞれの濃度は当教室の過去の報告を参考にした(Kodama H. Laryngoscope 2017)。若年、高年齢それぞれのモデルでピルフェニドン添加の有無によるコラーゲンゲルの収縮の程度を評価した。

また、筋線維芽細胞の免疫染色も行った。7.5×10³個の細胞に10ng/mlのTGF-βと1.0mg/mlのピルフェニドンもしくはTGF-βのみを添加して48時間培養したのちに行った。一次抗体としてαSMAとコラーゲン type1を用いた。若年、高年齢それぞれのモデルでピルフェニドン添加の有無による変化を評価した。

4. 研究成果

コラーゲンゲル収縮アッセイでは、ピルフェニドンを添加していない高年齢モデルに比べてピルフェニドンを添加した高年齢モデルではゲルの収縮が軽度であった(図1)。若年モデルではピルフェニドン添加による影響は全く見られなかった。これらの結果からは、加齢によって起こるコラーゲンの増生がピルフェニドンを添加することで抑えられ、ゲルの収縮が軽度にとどまった可能性が示唆された。しかし、ピルフェニドン非添加群の中にも収縮がほとんど見られないものもあった。当教室での以前の検討では、声帯を電気メスで処置して癒痕を作製しているが、この場合はピルフェニドン添加によって統計学的に有意にゲルの収縮が抑制されていた。加齢による線維化は癒痕による線維化に比べて軽度であり、ゲルの収縮がそれほど顕著ではなかったものと考えられた。そのためこの方法のみで加齢によるコラーゲンの増生へのピルフェニドンの抑制効果を判断するのは困難であると思われた。

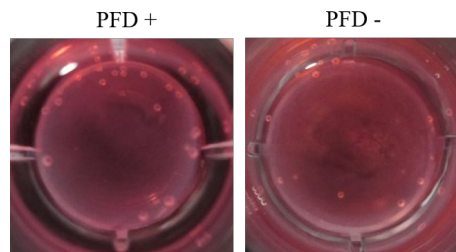


図1 コラーゲンゲル収縮アッセイ

免疫染色では、コラーゲン type1 とαSMAの発現のピルフェニドン添加の有無による差を検討した。いずれもピルフェニドン添加群と非添加群による差はほとんど目立たなかった(図2)。当教室での以前の検討の結果を踏まえると、やはり加齢による線維化では癒痕に比べるとαSMA、コラーゲン type1ともに発現が弱く、ピルフェニドンの効果を評価するには至らない結果であった。

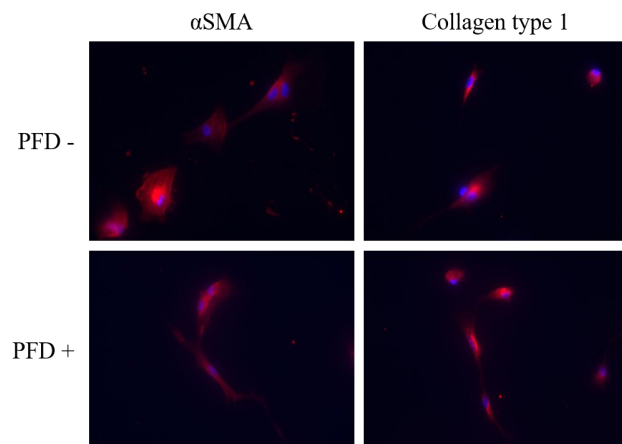


図2 αSMAとコラーゲンtype1の免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

以上の結果からは、今回の結果だけでは加齢によって声帯粘膜固有層に生じる線維化がピルフェニドン投与によって改善するかどうかを判断するのは困難であると思われた。ピルフェニドンによる効果が示唆された実験結果もあり、今後は、PCR や ELISA といった方法や、in vivo での摘出喉頭を用いた声帯の粘弾性の検討などを用いてさらに検討する必要があると思われた。

5. 主な発表論文等

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：宮丸 悟

ローマ字氏名：Satoru Miyamaru

所属研究機関名：熊本大学

部局名：大学院生命科学研究部(医)

職名：助教

研究者番号(8桁): 10535636

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。