

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06818

研究課題名（和文）声帯癭痕における核内レセプターの病態関与の解明

研究課題名（英文）Regulation of nuclear receptor for vocal fold fibrosis

研究代表者

樋渡 直（HIWATASHI, Nao）

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：10808778

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）：声帯癭痕は難治性であり、その治療としてはTGF- β 1の制御が重要であるが、副反応を避けるためより選択的な治療法の開発が必要であった。我々は、核内レセプターNR4A1の選択的アゴニストであるCytosporone B（Csn-B）による線維化抑制効果に着目し、線維化関連遺伝子の発現をリアルタイムPCRで、また組織拘縮の指標としてゲルアッセイを行った。結果はCsn-Bを添加した群においてコラーゲン関連遺伝子を抑制し、ゲル拘縮も有意に抑制していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、Csn-Bの投与がTGF- β 経路を選択的に制御し、より副反応の少ない治療選択を提示しうることを証明した。声帯癭痕への薬剤投与経路としては局所注射が可能のため、従来のCsn-Bの全身投与による線維化抑制と異なり、より臨床応用できる可能性が高いと考える。本研究成果として、海外学会1回、国内学会1回、英文誌掲載として評価を受けた。

研究成果の概要（英文）：Vocal fold fibrosis is intractable, and the regulation of TGF- β 1 is essential, whereas selective targeting therapy is also needed to avoid some side effects. We focused on a selective agonist of NR4A1, Cytosporone B (Csn-B). To investigate the efficacy of Csn-B, realtime-PCR and gel contraction assay were employed. The results were as follows. Cells cultured with Csn-B showed significant suppression of fibrosis-related gene expressions, and gel contraction.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：声帯癭痕 核内レセプター NR4A1 TGF-

1. 研究開始当初の背景

(1) 声帯癒痕と TGF- β 1 について

声帯は長さ 15-20mm 程度の一対の粘膜で、この粘膜が周期的に振動することにより声が生成される。声帯癒痕は加齢、外傷や炎症、声帯の手術後などにより起こり、声帯の物性が線維化により硬く変化し、深刻な音声障害をきたす。職業的音声使用者にも多くみられ、いったん声帯が硬く変質するとこれを元に戻すことは不可能であり、現時点で確立された治療法は存在しない。

以前より、声帯では内在する線維芽細胞が損傷後の組織修復に関与すると言われている。しかしラットを用いた声帯癒痕モデルでは TGF- β 1 が損傷後早期の 8 時間目より分泌されることにより線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化誘導が始まり、癒痕が成熟する慢性期に至るまで長期に残存することにより組織の線維化に関与していることが報告されている。そのため声帯癒痕の予防、治療には創傷治癒における TGF- β 経路の制御が必要であるが、TGF- β 1 それ自体の抑制は細胞活動に多大な副反応を起こすため、より選択的なターゲットを発見することが必須で、これにより治療効果を高め、且つ副作用の少ない治療選択を提示することができると考えられる。

(2) NR4A1 の先行基礎研究

近年、核内レセプター NR4A1 が TGF- β 経路の重要な調節因子であることが証明された。同報告によると、遺伝子改変 NR4A1 欠損マウスでは肺や皮膚の線維化病変形成が促進され、反対に NR4A1 の選択的アゴニストである Cytosporone B (Csn-B) の全身投与にて線維化の抑制が確認されている。

我々は先行研究にて、核内レセプター NR4A1 が声帯癒痕においても TGF- β 経路の重要な調節因子であることを次の点において証明した。

TGF- β 経路、特にコラーゲン遺伝子の調節

声帯癒痕では組織変化として特に I 型コラーゲンの過剰蓄積が認められるが、NR4A1 を siRNA を用いてノックダウンすることで、COL1A1、SERPINE1 遺伝子の発現が増強された (図 1)

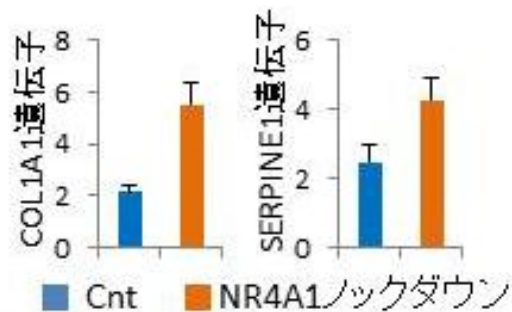
筋線維芽細胞への分化促進

同様に NR4A1 をノックダウンすることで、TGF- β 1 誘導による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が促進された (図 2)。

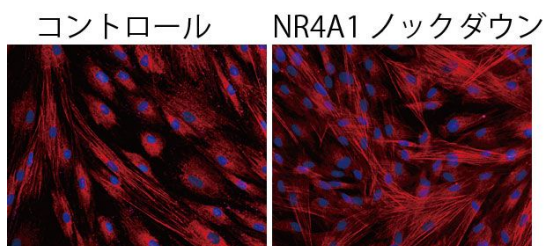
コラーゲンゲルの拘縮

同様に NR4A1 をノックダウンすることで、TGF- β 1 誘導によるコラーゲンゲルの拘縮が増強された (図 3)。

(図 1)



(図 2)



(図 3)



以上より NR4A1 の選択的アゴニストである Cytosporone B (Csn-B) の投与にて線維化の抑制が声帯においても寄与するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

声帯癒痕における核内レセプターの病態関与の解明

- (1) 音声障害の新規予防法、治療法の確立を目指し、声帯創傷治癒における核内レセプターの機能と関与を解明する。我々の先行研究により、核内レセプター**NR4A1**を刺激することで**TGF- 1**誘導による声帯線維芽細胞の線維化が抑制される可能性が明らかとなっている。本研究の目的は、**NR4A1**を選択的に刺激する**Cytosporone B**の声帯癒痕に対する有効性を検証し、新たな治療選択肢として提示することにある。
- (2) 具体的には声帯線維芽細胞に対し**TGF- 1**にて線維化を誘導し、その後**Csn-B**を投与して、線維化抑制効果を確認することである。

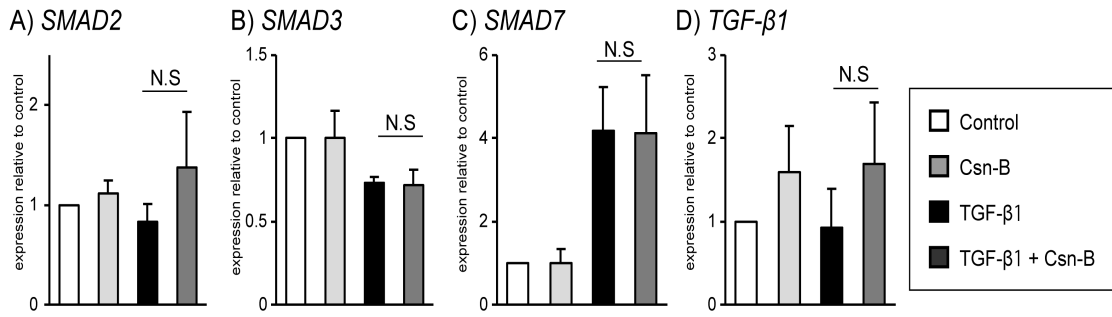
3. 研究の方法

- (1) 声帯線維芽細胞に対するCsn-Bの効果を確認 (In vitro 実験)
ラット正常声帯あるいはヒト正常声帯由来の線維芽細胞を培養し、TGF- 1 刺激にて線維化を誘導する。この細胞に対しCsn-Bを培養液中に添加する。濃度は先行研究での1 μM に加え、適宜最適濃度を検討する。評価は以下の各項目を検討することで行う。
 - ・線維化関連遺伝子の発現 - リアルタイム PCR
 - ・筋線維芽細胞への分化 - 免疫組織科学
 - ・組織拘縮の指標 - ゲルアッセイ
 - ・NR4A1の細胞ホメオスタシス解析 - PCR アレイ
- (2) ラット声帯癒痕モデルで至適量・濃度の探索
我々のグループにて確立された内視鏡下でのSprague-Dawleyラットの声帯傷害モデルを用いる。損傷後の治療介入のタイミングを、急性期と慢性期に大別して行う。
 - i) 急性期介入モデル
声帯損傷後1週間以内にCsn-Bを内視鏡下に声帯粘膜固有層に注入投与する。急性期に介入する役割は、声帯癒痕の予防にあり、実臨床では急性炎症時への応用を想定している。注入後、ラットの声帯癒痕が成熟する2ヶ月目まで各タイムポイントで声帯を採取し、遺伝子、組織評価を行う。
 - ii) 慢性期介入モデル
声帯損傷後2ヶ月にて同様にCsn-Bを注入投与する。こちらは実臨床で多数を占める、音声酷使患者ですでに完成された癒痕への投与を想定している。評価は急性期と同様である。

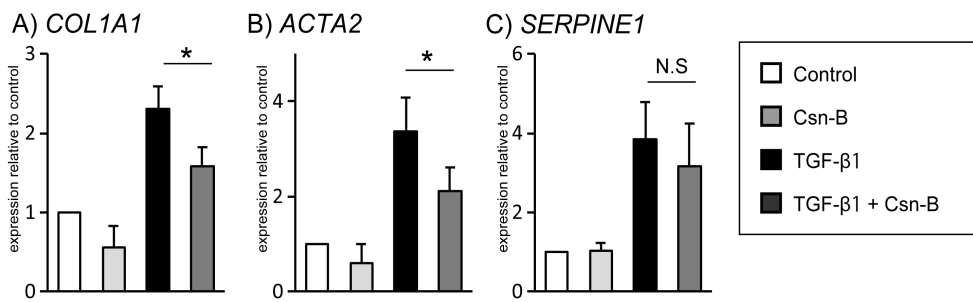
4. 研究成果

- (1) ヒト正常声帯由来の線維芽細胞に対し、ヒトリコンビナントTGF- 1製剤にて線維化を誘導し、Csn-B添加で遺伝子がどのように変化するかを検証した。培養液中にCsn-B 1 μM を添加した培養液内で6時間培養した群では、NR4A1の上流遺伝子であるSMAD2、SMAD3、SMAD7、また内因性TGF- 1には影響を与えなかった(図1)。24時間培養した群ではコラーゲンタンパク前駆因子であるCOL1A1、また声帯において線維化誘導細胞である筋線維芽細胞の発現関連するACTA2において有意にCsn-B添加群で遺伝子発現が抑制されていた(図2)。このSMAD経路への影響を与えず、下流のコラーゲン産生関連遺伝子あるいは筋線維芽細胞関連遺伝子の発現を抑制するというのは過去の報告と同様であり、声帯線維芽細胞においてもNR4A1が線維化を調整しており、またNR4A1に対する刺激が線維化を抑制することが示唆された。
また、ゲル拘縮においては、12時間培養した群において、Csn-B添加群が有意に拘縮を抑制していた(図3)。ゲル拘縮は創傷治癒過程における組織の線維化・拘縮を反映するため、NR4A1に対する刺激が遺伝子発現と同様に組織での線維化抑制に寄与することが示唆された。

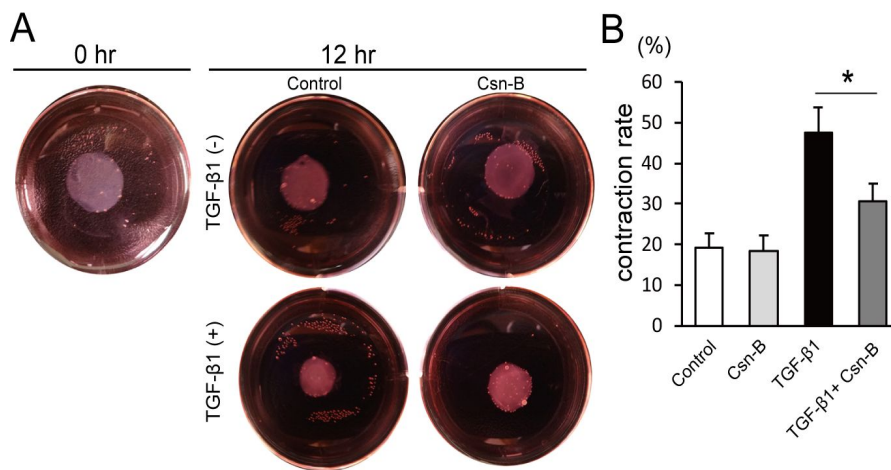
(1)



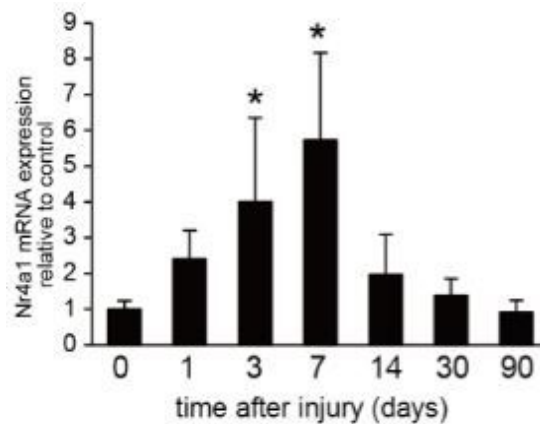
(2)



(3)



- (2) ラット声帯癭痕モデルを作成し、声帯内における NR4A1 の遺伝子発現を解析した。結果は損傷後 day7 においてもっとも遺伝子発現が促進されており、day1-7 の間での Csn-B 投与による賦活化が有効であることが示唆された。



ラット損傷声帯への Csn-B 至適投与量に関する検討は現在遂行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiwatashi N, Mukudai S, Bing R, Branski RC. Cytosporone-B, a novel anti-fibrotic agent, on vocal fold fibroblasts. *The Laryngoscope*. 2018 Dec;128(12):E425-E428. doi: 10.1002/lary.27361.

〔学会発表〕(計 2 件)

— Hiwatashi N, Mukudai S, Renjie B, Branski RC. Preliminary study of the effects of Cytosporone-B, a novel anti-fibrotic agent, on vocal fold fibroblasts, COSM 2018 (Combined Otolaryngology Spring Meeting), National Harbor, Apr 18-22, 2018.

— 樋渡 直、鈴木 良、岸本 曜、末廣 篤、楯谷一郎、大森孝一. 核内レセプターNR4A1 の声帯線維化への関与. 第 30 回日本喉頭科学会総会・学術講演会, 2018 年 3 月 1-2 日, 高知

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: 無し

6. 研究組織

(1) 研究分担者 無し

(2) 研究協力者 無し

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。