

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19609

研究課題名(和文) バイオ3Dプリンターを用いた声帯組織の再生

研究課題名(英文) vocal fold regeneration using stacked cell sheets

研究代表者

大森 孝一 (Omori, Koichi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：10233272

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの声帯やイヌの声帯、口腔粘膜から上皮細胞、粘膜下の線維芽細胞を分離し、培養する技術を確立した。それらを3Dプリンティングし、積層化することは困難であったが、培養細胞をシート状に剥離し、ゼラチンハイドロゲル粒子を間に挟み込むことにより、積層化することに成功した。作製された細胞シートは約300 μ mの厚さで、免疫細胞化学により層構造を確認することができた。更に、イヌの声帯切除部位に積層化細胞シートを移植することが可能であることを、予備検討で確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後はこの積層化細胞シートをイヌの声帯に自家移植し、声帯粘膜の再生効果を組織学的に検討するとともに、吹鳴実験を行いその物性および機能性を評価する予定である。この技術を確立され、細胞シート移植の粘膜再生効果が確認されれば、声帯癒痕や萎縮などの組織学的な変化を伴う難治性声帯疾患に対する、声帯再生医療の実現に大きく貢献すると考えられる。更に、その技術は他臓器の再生医療にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells and fibroblasts were successfully isolated and cultured from rat vocal folds, canine vocal folds and canine oral mucosa. Further, cultured cell sheets were stacked using gelatin hydrogel microspheres. Stacked cell sheets were about 300 μ m in thickness, and layered structure in cell sheets were confirmed by immunostaining. Further, preliminary experiments revealed that the cell sheets can be implanted into the canine vocal fold.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：声帯 上皮細胞 線維芽細胞 積層化技術

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

声帯は特徴的な層構造を有し、それぞれの層が異なる粘弾性および剛性を示すことで、発声（声帯振動）に重要な役割を担っている（図1）。しかしながら、炎症や外傷などではその層構造が破綻し、物性変化が生じ、重篤かつ難治性の音声障害の原因となる。これまで、様々な方法で、声帯の再生医療研究が行われてきた。細胞外マトリックス産生を調節する因子の投与や細胞移植などにより、物性および形態をある程度回復できるようになったものの、声帯に特有の層構造の再生には未だ至っていない。

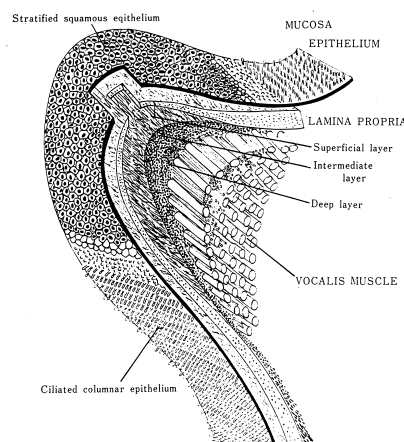


図1 声帯の層構造（平野、1975）

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規技術を用いて複数種の細胞を三次元的に配置することで声帯の層構造を再現し、音声障害治療に資する機能的な声帯粘膜組織を作製することである。

3. 研究の方法

- ① 声帯上皮細胞、線維芽細胞の初代培養の確立：9週齢のラットの喉頭を提出し、酵素処理することで上皮と粘膜固有層を分離し、声帯の上皮細胞、線維芽細胞の初代培養を確立した。上皮細胞はセルカルチャーインサートに継代した。バリア機能を担うとされるタイトジャンクションを構成するタンパク質である occludin や ZO1 の発現を確認するとともに、イオンの透過性を評価するために Transepithelial electrical resistance (TEER) を測定した。更に、同様の手技でイヌ声帯および口腔粘膜からも初代培養を確立した。
- ② ゼラチンハイドロゲル粒子の作製：当初、3D バイオプリンティングによる積層化を予定したが、学会等で灌流培養の間に層の区別がつかなくなる可能性などが報告されたため、ゼラチンハイドロゲル粒子を用いた積層化を行うこととした（1）。高濃度のゼラチン溶液をオイル内で攪拌し、オイルエマルジョン状態とし、それを冷却してゼラチンをゲル化させた後にアセトンで洗浄し、熱脱水架橋を行い、ゼラチンハイドロゲル粒子を作製した。
- ③ Bioengineered 声帯組織の作製：Dish plate 上で培養した線維芽細胞をシート状に剥離し、それらの間にゼラチンハイドロゲル粒子を挟み込むことにより層構造を作製した。また Cell culture insert で培養した上皮細胞は dispase に浸すことでシート状に剥離した。線維芽細胞、筋芽細胞の多層構造の上に上皮細胞のシートを積層することで、声帯の多層構造を再現した。

4. 研究成果

- ① 上皮細胞の TEER は、継代後 3 日目には $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度に達した。またタイトジャンクションの構成蛋白である ZO1 や Occludin を用いた免疫組織化学でタイトジャンクションの発現や重層化構造を観察できた。(図 2)

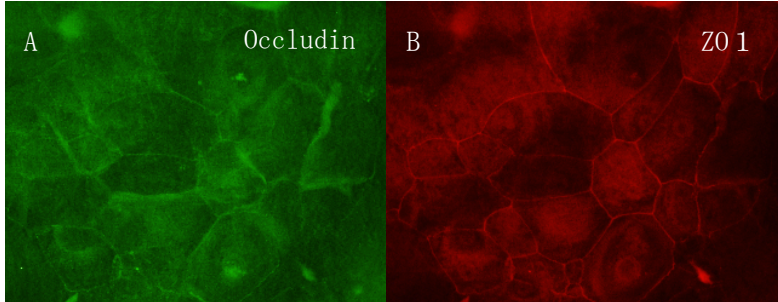


図 2 上皮細胞の免疫組織化学 A : Occludin、
B : ZO1

- ② 既報に従い、ゼラチンハイドロゲル粒子を作製できた。(図 3)

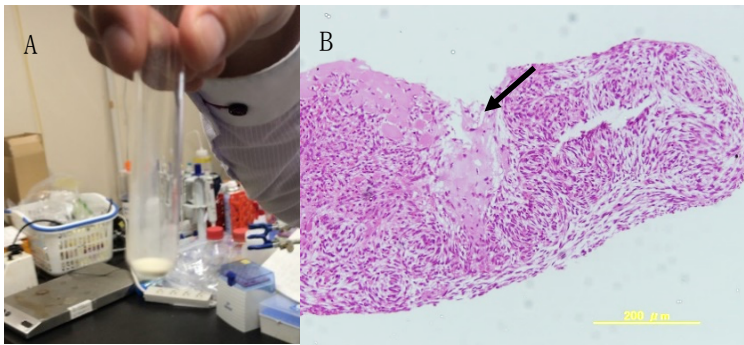


図 3 A : 作製したゼラチンハイドロゲル、B : 線維芽細胞のシート内に認めるゼラチンハイドロゲル (矢印)

- ③ イヌの口腔粘膜から分離した上皮細胞および線維芽細胞をシート状に剥離し、それを積層することに成功した。Pan Cytokeratin, Vimentin を用いて上皮細胞と線維芽細胞の染色を行い、積層化構造を確認した。完成した積層化細胞シートは約 $300 \mu\text{m}$ の厚さであった。更に、作製した積層化細胞シートは、把持可能であり、イヌの声帯粘膜切除部位に自家移植できることを確認した。(図 4)

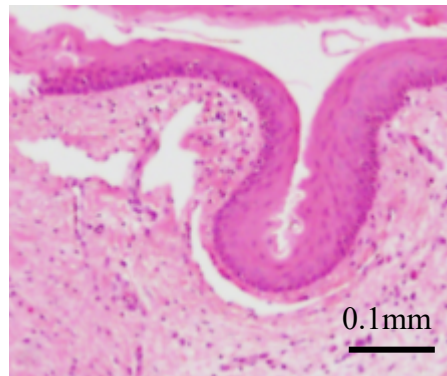


図 4 積層シートによる声帯再建部位 (HE 染色)

今後はこの積層化細胞シートの自家移植をすすめ、声帯粘膜再生効果を検証する予定である。

(引用文献)

1. Takehiko Matsuo, Hidetoshi Masumoto, Shuhei Tajima, Takeshi Ikuno, Shiori Katayama, Kenji Minakata, Tadashi Ikeda, Kohei Yamamizu, Yasuhiko Tabata, Ryuzo Sakata, Jun K. Yamashita. Efficient long-term survival of cell grafts after myocardial infarction with thick viable cardiac tissue entirely from pluripotent stem cells. Scientific reports. 5 (1): 16842-16842. 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kaba Shinji, Nakamura Ryosuke, Yamashita Masaru, Katsuno Tatsuya, Suzuki Ryo, Tateya Ichiro, Kishimoto Yo, Omori Koichi	4. 巻 129
2. 論文標題 Alterations in macrophage polarization in injured murine vocal folds	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E135-E142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.27523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Yoshitaka, Kishimoto Yo, Sogami Tohru, Suzuki Ryo, Tsuji Takuya, Hiwatashi Nao, Tateya Ichiro, Kanemaru Shin-Ichi, Nakamura Tatsuo, Omori Koichi, Hirano Shigeru	4. 巻 129
2. 論文標題 Characterization of aged rat vocal fold fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Laryngoscope	6. 最初と最後の頁 E94 ~ E101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/lary.27464	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 児嶋圭介、吉松誠芳、樋渡直、岸本曜、末廣篤、楯谷一郎、大森孝一
2. 発表標題 ラット声帯上皮のin vitroモデルの作成
3. 学会等名 第31回日本喉頭科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Kojima, Tatsuya Katsuno, Masanobu Mizuta, Ryosuke Nakamura, Yo Kishimoto, Masayoshi Yoshimatsu, Hiroe Ohnishi, Atsushi Suehiro, Tomoko Tateya, Ichiro Tateya, Koichi Omori
2. 発表標題 Development of an in vitro model of rat vocal fold epithelium
3. 学会等名 140th Annual Meeting of American Laryngological Association (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山下 勝 (Yamashita Masaru) (10635519)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	楯谷 一郎 (Tateya Ichiro) (20526363)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	中村 亮介 (Nakamura Ryosuke) (40736708)	京都大学・医学研究科・研究員 (14301)	削除：2019年11月13日
研究分担者	岸本 曜 (Kishimoto Yo) (80700517)	京都大学・医学研究科・特定病院助教 (14301)	
研究分担者	青山 朋樹 (Aoyama Tomoki) (90378886)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------