

## 科学的研究費補助金研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592192

研究課題名(和文) 声帯の粘膜再生：組織幹細胞の同定と再生への応用

研究課題名(英文) Identification of tissue specific stem cell of the vocal fold

研究代表者

平野 滋 (Shigeru Hirano)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10303827

研究成果の概要(和文)：声帯の幹細胞同定とその再生への応用を目的として各種実験を施行した。幹細胞同定に SP 細胞を利用しようとしたが、SP 細胞の同定は可能なものの分離、培養は技術的な困難に直面し、細胞マーカーによる特徴抽出にはいたらなかった。そこで、損傷治癒過程での SP 細胞の発現をラットの声帯損傷モデルを用いて検討した。その結果、損傷後 1 週間以内の早期に SP 細胞の発現上昇を認めた。現在これらの表面マーカーを用いた特徴抽出を行っているところである。SP 細胞を用いた再生実験は分離培養が困難なため、骨髄由来間葉系幹細胞を用いた声帯再生実験に変更した。イヌを用いた実験で、瘢痕声帯に幹細胞移植を行うことで、組織学的、機能的に良好な再生効果を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：The current research aimed to identify tissue specific stem cell of the vocal fold using SP cells. However, although SP cell could be separated, collection and culture of the cells turned out to be technically difficult. Then it was attempted to pick up SP cells during wound healing of the vocal folds using rat models and ABCG antibody. The results showed increased expression of SP cells during early wound healing period. Characterization of the cells using surface markers is under way. The third project aimed to examine regenerative effects of stem cells for the vocal fold. Bone marrow derived mesenchymal stem cells were used for regeneration of scarred vocal folds in a canine model. The results were encouraging with positive effects on histology and function of the regenerated vocal folds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：喉頭、声帯、再生、幹細胞、創傷治癒、FACS、SP細胞、表面マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 喉頭は音声・呼吸・嚥下を司る複合機関であり、軟骨、筋肉、粘膜より構成されている。声帯粘膜が音声の主要部位であり、これが障害されると音声障害や失声をきたす。声帯粘膜の障害は外傷や炎症、加齢、さらには咽頭や喉頭癌の治療後におこり、QOLを著しく損なうものである。これを解決する方法には、他の臓器を用いた喉頭再建が試みられてきているが、効果はきわめて限定されているのが現状である。

本研究は、声帯粘膜の再生を目指して立案した。

### (2) これまでの研究状況

我々は、喉頭の再生のための実験を繰り返してきた。組織再生のために必要なことは適切な再生の足場を提供し、さらに再生をうながす細胞や増殖因子を動員することである。

#### (1) 増殖因子を用いた再生実験

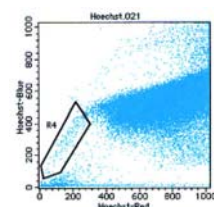
声帯粘膜の再生のために増殖因子を用いた実験を行ってきた。その結果、増殖因子治療においてはこれまでのVivoやVivoの結果から線維芽細胞増殖因子(FGF)や肝細胞増殖因子(HGF)が有用なことがわかってきた。

#### (2) 細胞治療

損傷声帯の再生に、骨髄由来間葉系幹細胞が有用なことも動物実験で示してきた。骨髄由来間葉系幹細胞は骨髄細胞以外の多くの細胞に分化する能力をもつことがわかっており、イヌを用いた実験においてはこれらの培養細胞移植により声帯粘膜の再生が促されることが確認できた。

#### (3) 声帯粘膜の組織幹細胞へのアプローチ

上記のようにいくつかの声帯粘膜再生への可能性が見出されてきたが、いずれの方法においてもその再生効果は一定ではなく、個や環境による影響が大きいようである。組織再生における細胞ソースとして最適なものは組織幹細胞である。われわれは、声帯粘膜に幹細胞が存在する可能性をSP細胞(Side population cell)を同定して示した。その割合は全構成細胞の0.2%程度であった



## 2. 研究の目的

本研究においては、SP細胞を手がかりに、声帯粘膜の組織幹細胞を同定し、さらにこれを声帯再生に応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) SP細胞の分離・同定

#### ①SP細胞の分離

イヌ/ラット声帯粘膜を採取し、コラゲナーゼ処理により細胞成分を抽出する。これを細胞ソーター(FACS:Aria)にヘキスト色素を標識としてかけ、SP細胞群を分離する。SP細胞はヘキスト陰性細胞として区別される。

#### ②表面マーカーによるSP細胞の特徴抽出

分離収集したSP細胞を培養し、培養細胞に各種表面マーカーを用いた免疫染色を行う。

#### ③SP細胞の再分離

SP細胞をさらに分離していき、組織幹細胞の候補になる細胞群の抽出を行う。

#### ④再分離細胞の幹細胞としての検討

自己複製能・分化能を *vitro* および *vivo* の実験系で確認する。

#### (2) SP 細胞 (もしくは組織幹細胞) の声帯組織修復過程における役割の解明

声帯損傷後の再生機構を調べるため、ラット声帯の損傷後の SP 細胞の発現を ABCG 抗体を用いた免疫組織化学法で検討する。

#### (3) SP 細胞 (もしくは組織幹細胞) を用いた声帯の再生実験

課題 1, 2 より導き出される細胞群を用いた声帯再生実験をおこなう。すなわち、SP 細胞、およびこれからさらに分離される細胞を用いる。これらの細胞移植が声帯粘膜再生、音声の再生に有用かどうかを検討する。

\* 予定通りいかなかった場合：

SP 細胞からどれほどまで幹細胞に近づけるかが問題であり、必ずしも容易ではない。その際は、SP 細胞そのものを使って実験をおこなっていくこととする

### 4. 研究成果

#### (1) SP 細胞の分離・同定

SP 細胞の FACS による分離は従来通り施行したが、細胞密度が 1% 以下と少なく、回収に大きな問題を生じた。また、回収した細胞のほとんどが FACS のカラムによると思われる損傷を受けており、その後の細胞培養においても増殖をえることができなかった。

結局、細胞の分離・活用は厳しい状況に直面し、表面マーカーによる特徴抽出は断念せざるとえなかった。

そこで、次の損傷治癒時に集まる SP 細胞群を詳細に検討することとした。

#### (2) SP 細胞 (もしくは組織幹細胞) の声帯組織修復過程における役割の解明

[方法]ラットの声帯粘膜を内視鏡下に損傷し、組織修復過程を損傷後 1, 3, 5, 7, 14, 21, 28, 35 日の各タイムポイントにおいて観察した。各タイムポイントにおける個体数は 4-5 匹使用した。ABCG 抗体を用いて SP 細胞の発現を検出した。

[結果]SP 細胞は損傷側、非損傷側のいずれにおいても、声帯粘膜黄斑部には観察されたが、損傷の有無による差はなく、すべてのタイムポイントにおいて一定であった。黄斑部に SP 細胞が密に分布していることがわかったが、損傷修復における役割は今後の検討課題である。一方、声帯粘膜ラインケ腔では、健常側の定常時においては SP 細胞の発現は認めなかったが、損傷後 1-7 日目において発現が認められ、7 日目で最大であった。このことは損傷声帯粘膜の再生に早期に SP 細胞群が関与していることを示した。現在、これらの細胞群がどこから由来しているのかを突き詰めるために、各種マーカーによる検索を行っているところである。

#### (3) SP 細胞 (もしくは組織幹細胞) を用いた声帯の再生実験

本課題においては、SP 細胞の分離が順調にすまなかったため、代替細胞による声帯再生実験を遂行中である。代替細胞として骨髄由来間葉系幹細胞 (BSC)、脂肪由来間葉系幹細胞などが挙げられるが、今回 BSC を用いた再生実験を施行した。

[方法] イヌの声帯に癒痕を作成したのち、癒痕剥離手術のみ、癒痕剥離+コラーゲンスポンジ留置、癒痕剥離+コラーゲンスポンジ留置+BSC 移植を施行し、これら 3 群間における粘膜再生効果を検討した。

[結果]癒痕剥離のみの群では、術後再癒痕形成による機能損失が多大であった。コラーゲンスポンジ群では粘膜機能の再生効果が認

められたが、BSC を追加することにより、より強力な再生効果が確認された。すなわち、BSC 投与群では粘膜振動の改善、声門閉鎖の回復が認められ、さらに組織学的にヒアルロン酸の回復とコラーゲン蓄積の解消、粘膜拘縮の改善が認められた。

#### 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 5 件)

すべて査読あり

1. Kitani Y, Kanemaru S, Umeda H, Suehiro A, Kishimoto Y, Hirano S, Nakamura T, Ito J. Laryngeal regeneration using tissue engineering techniques in a canine model. Ann Otol Rhinol Laryngol 2011;120:49-56.PMID:21370680
2. Ohno S, Hirano S, Kanemaru S, Kitani Y, Kojima T, Tateya I, Nakamura T, Ito J. Implantation of an atelocollagen sponge with autologous bone marrow derived mesenchymal stromal cells for treatment of vocal fold scarring in a canine model Ann Otol Rhinol Laryngol 2011;120:401-408.PMID:21774449
3. Gugatschka M, Kojima T, Ohno S, Kanemaru S, Hirano S. Recruitment patterns of side population cells during wound healing in rat vocal folds. Laryngoscope. 2011;121:1662-1667.PMID:21792952
4. Kishimoto Y, Hirano S, Tateya I, Kanemaru S, Ito J. Temporal changes in vocal functions of human scarred vocal folds after cordectomy. Laryngoscope. 2010;120:1597-601.PMID:20641077
5. Kishimoto Y, Welham NV, Hirano S. Implantation of atelocollagen sheet for vocal fold scar. Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg. 2010;18(6):507-511.PMID:20856118

[学会発表] (計 10 件)

1. Hirano S. Advances for the treatment of scar of the vocal folds. 17th Int'l workshop on laser voice surgery, Paris, Mar 30-31, 2012.
2. Ohno S, Hirano S, Kanemaru S, Kitani Y, Kojima T, Tateya I, Nakamura T, Ito J. Implantation of an atelocollagen sponge with

bone marrow derived stromal cells for the treatment of vocal fold scarring. 91th American Bronchoesophagological Association Meeting, Chicago, Apr 28-29, 2011.

3. Kitamura M, Hirano S, Kitani Y, Ohno S, Kojima T, Kanemaru S, Ito J, Rosen C, Gilbert T. Laryngeal reconstruction with tissue engineering technique using acellular extracellular matrix scaffold. 91th American Bronchoesophagological Association Meeting, Chicago, Apr 28-29, 2011.
4. Hirano S. Symposium 3: Laryngology; Vocal fold wound healing and regeneration. 11th Japan Taiwan Conference on Otolaryngology, Kobe, Dec 8-9, 2011.
5. Kitani Y, Kanemaru S, Hirano S, Ohno S, Kojima T, Ito J. Two staged laryngeal regeneration using tissue engineering techniques in a canine model. 113th Triological Society, Las Vegas, Apr 30-May 1, 2010
6. Kojima T, Hirano S, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Expression of side population cells during wound healing of rat vocal folds. ICVPB, Madison, Jul 6-9, 2010
7. Hirano S. Cutting edge of healing process of vocal cord in 2010. 15th Int'l workshop on laser voice surgery, Paris, Apr 9-10, 2010.
8. Hirano S. Regeneration of vocal fold: translational research from bench to bed. Grand round at Cornell University, New York, Jul 1, 2010
9. Hirano S. Current management of vocal fold scar. New surgical treatment option. 4th World Voice Congress, Seoul, Sep 6-9, 2010
10. Hirano S. Regeneration of vocal fold mucosa with tissue engineering strategy. 7th East Asian Conference on Phonosurgery, Tokyo, Nov 27, 2010.

[その他]

ホームページ

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~ent/new/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

平野 滋 (ひらの しげる)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：10303827

##### (2) 研究分担者

金丸真一

田附興風会北野病院・耳鼻咽喉科・部長

研究者番号：00271570

楯谷一郎

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20526363