

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592612

研究課題名(和文) ヒト声帯幹細胞と細胞周辺環境(細胞ニッチ)の解明

研究課題名(英文) Investigation of tissue stem cells and stem cell niche in the human vocal fold mucosa

研究代表者

佐藤 公則 (SATO, KIMINORI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：70196228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト声帯粘膜固有層の前・後黄斑に密に分布するヒト声帯星細胞は、声帯固有の間質細胞ではなく、造血細胞あるいは骨髄由来の間葉系細胞である可能性が示唆された。ヒト声帯の前・後黄斑に分布する声帯星細胞は、声帯組織の恒常性を維持し、声帯組織が損傷した際には細胞を産生して組織を再生させる間葉系幹細胞(組織幹細胞)である可能性が示唆された。

ヒト声帯粘膜の前・後黄斑は幹細胞ニッチであり、組織幹細胞を維持し、組織幹細胞の増殖・分化を制御している微小環境である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cells including vocal fold stellate cells in the human anterior and posterior maculae flavae, which are located at both ends of the human vocal fold mucosa, are inferred to be undifferentiated cells which arise from the differentiation of bone marrow cells. The results of this study are consistent with the hypothesis that the cells in the human maculae flavae are tissue stem cells or progenitor cells of the human vocal fold. The maculae flavae are a candidate for a stem cell niche, which is a microenvironment nurturing a pool of tissue stem cells.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：組織幹細胞 幹細胞ニッチ 声帯黄斑 声帯星細胞 ヒト声帯

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) ヒト声帯黄斑の形態と機能

我々の研究から、ヒト声帯黄斑は、ヒト声帯粘膜の粘弾性を維持するために必須の細胞外マトリックスの代謝に重要な役割を担っていることが示唆された。またヒト声帯黄斑の機能的変化がヒト声帯粘膜の成長・発達・老化に深く関与していることが示唆された。

### (2) ヒト声帯星細胞 (Vocal Fold Stellate Cell) の形態と機能

ヒト声帯の黄斑内には通常の線維芽細胞とは形態学的に異なり、細胞質内に脂肪滴を持った特殊な細胞が密に存在することを我々は 2001 年に世界で初めて発見し、以後この細胞 (ヒト声帯星細胞) の形態と機能を研究してきた。

またヒト声帯星細胞の機能は、ヒト声帯粘膜の粘弾性を維持するために必須の細胞外マトリックスの代謝に重要な役割を担っていることが示唆された。またヒト声帯星細胞の機能的変化がヒト声帯粘膜の成長・発達・老化に深く関与していることが示唆された。

## 2. 研究の目的

ヒト声帯膜様部粘膜の前端と後端には組織解剖学的に特徴的な黄斑が存在する。黄斑内に通常の線維芽細胞とは異なった細胞 (ヒト声帯星細胞) が存在することを我々は 2001 年に発見し、その形態と機能を研究してきた。

我々の研究から、ヒト声帯星細胞は声帯組織の恒常性を維持し、声帯が損傷した場合には失われた細胞を産生して再生させる組織幹細胞 (Somatic Stem Cell) の可能性が高まってきた。またヒト声帯星細胞が密に分布するヒト声帯黄斑は組織幹細胞を維持している微小環境 (幹細胞ニッチ) である可能性が高まってきた。ヒト声帯星細胞は組織幹細胞なのか、黄斑は組織幹細胞を維持する幹細胞ニッチなのかを解明することが本研究の目

的である。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星細胞の細胞骨格

ヒト声帯星細胞の細胞骨格、その中でも中間径フィラメントを研究した。動物の細胞内には中間径フィラメントが発達した線維構造が存在し、この中間径フィラメントの構成蛋白質の種類は、組織や発生段階によって異なるからである。

まずヒト声帯星細胞の細胞骨格を、電子顕微鏡を用いて形態学的に検討する。ヒト声帯星細胞の細胞質にはどのような細胞骨格、その中でも中間径フィラメントが存在するのかを明らかにした。

次に光学顕微鏡下と電子顕微鏡下に免疫組織染色法を用いて、ヒト声帯星細胞の細胞骨格、その中でも中間径フィラメントの構成蛋白質の種類を明らかにした。具体的には内胚葉系細胞が持つ中間径フィラメントの構成蛋白質 (デスミンなど)、中胚葉系細胞が持つ中間径フィラメントの構成蛋白質 (ビメンチンなど)、外胚葉系細胞が持つ中間径フィラメントの構成蛋白質 (グリア線維酸性蛋白質など) の存在を検討した。ヒト声帯星細胞の細胞骨格の一つであるマイクロフィラメント (中間径フィラメント) を検討することにより、ヒト声帯星細胞の起源、細胞種、分化の過程が明らかになった。

### (2) ヒト声帯星細胞の組織幹細胞性

光学顕微鏡下に免疫組織染色法を用いて、ヒト声帯星細胞の細胞表面マーカー、細胞増殖と細胞周期マーカーを検討することにより、ヒト声帯星細胞は組織幹細胞と同じ細胞表面マーカーを持っているのか、組織幹細胞と同じ細胞増殖と細胞周期を示すのかを検討した。ヒト声帯星細胞の細胞表面マーカー、細胞増殖と細胞周期マーカーを検討することにより、ヒト声帯星細胞が組織幹細胞であ

るかどうかが明らかにした。

今回はヒト声帯星細胞の幹細胞性を研究するために、ヒト声帯星細胞と声帯粘膜固有層の通常の線維芽細胞を継代培養し、*in vitro* で研究を行った。

方法は手術時に摘出された喉頭の声帯を用いて、光学顕微鏡下に声帯粘膜固有層の声帯黄斑とラインケ腔を摘出した。声帯黄斑とラインケ腔を抗生物質入りのリン酸緩衝液に浸した後に、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地で単層静置培養を行い、ヒト声帯星細胞と線維芽細胞の継代培養を行った。また間葉系幹細胞増殖培地で単層静置培養を行い、ヒト声帯星細胞と線維芽細胞の継代培養を行い、ヒト声帯星細胞の幹細胞性について検討した。

(3)ヒト声帯星細胞が密に分布する声帯黄斑と幹細胞ニッチ

光学顕微鏡下に免疫組織染色法を用いて、ヒト声帯星細胞が密に分布する声帯黄斑の細胞周辺環境を検討した。具体的にはヒト声帯黄斑はヒアルロン酸リッチマトリクス (Hyaluronan-rich matrix) であるかどうかの検討である。ヒト声帯黄斑はヒアルロン酸に富むのか、ヒアルロン酸結合性蛋白質が存在するのか、黄斑内に密に分布するヒト声帯星細胞の細胞表面にはヒアルロン酸受容体が存在するのかなどである。

ヒト声帯星細胞が密に分布するヒト声帯黄斑の細胞周辺環境が、幹細胞の細胞周辺環境すなわち細胞微小環境 (幹細胞ニッチ) であるヒアルロン酸リッチマトリクス (Hyaluronan-rich matrix) であるかどうかを検討することにより、ヒト声帯黄斑が幹細胞の細胞微小環境 (幹細胞ニッチ) であるかどうか明らかになった。

#### 4. 研究成果

(1)ヒト声帯黄斑内のヒト声帯星細胞の細胞骨格

ヒト声帯内のヒト声帯星細胞の細胞質には、細胞骨格の一つである中間径フィラメントが発達していることが電子顕微鏡で観察された。

免疫組織染色法を用いて、ヒト声帯星細胞の細胞骨格、その中でも中間径フィラメントの構成タンパク質の種類を明らかにした。

ヒト声帯星細胞は、上皮細胞、神経細胞、筋細胞、間葉系細胞すべての中間径フィラメントを保持しており、内胚葉系細胞、中胚葉系細胞、外胚葉系細胞全ての中間径フィラメントの構成タンパク質を保持していた。*in vitro* で培養されたヒト声帯黄斑内のヒト声帯星細胞も同様に内・中・外胚葉細胞全ての中間径フィラメントの構成タンパク質を保持していた。

このことからヒト声帯黄斑内のヒト声帯星細胞は分化が低く、多分化能を持ち、胚葉を越えて分化する可能性がある細胞であることが示唆された。

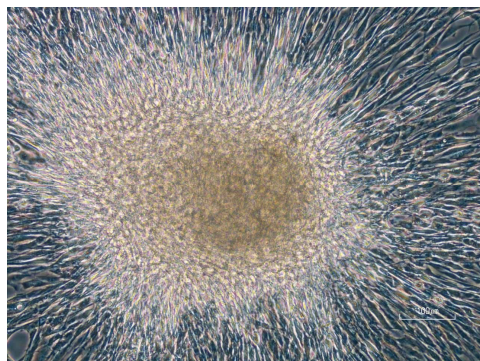
(2)ヒト声帯星細胞の組織幹細胞性

ヒト声帯星細胞は、間葉系幹細胞マーカーが陽性であり、細胞周期は Go 期であった。造血幹細胞マーカー、胚性幹細胞マーカーは陰性であった。ヒト声帯星細胞には telomerase reverse transcriptase が発現しており、telomerase を保持していた。このことからヒト声帯星細胞は間葉系幹細胞である可能性が示唆された。

ヒト声帯星細胞には、造血細胞あるいは骨髄由来の circulating fibrocytes のマーカーである CD34、CD45、Collagen type I が発現していた。ヒト声帯星細胞は、声帯固有の間質細胞ではなく、造血細胞あるいは骨髄由来の間葉系細胞である可能性が示唆された。

ヒト声帯星細胞を間葉系幹細胞増殖培地で単層静置培養すると、コロニーを形成する細胞群 (colony-forming unit) と声帯星細胞類似の細胞群が増殖し、未分化の幹細胞とそれより分化した細胞を生み出す非対称性分

裂が認められた。



図：コロニーを形成する細胞群(colony-forming unit

このことからヒト声帯星細胞を含めたヒト声帯黄斑内の細胞は、間葉系幹細胞あるいは骨髄の間質幹細胞の可能性が示唆された。

典型的な形態を示すヒト声帯星細胞は幹細胞から特殊化された体細胞へ分化する途中の段階にある細胞、すなわち前駆細胞あるいはTA細胞(Transit-amplifying Cell)の可能性が示唆された。

(3)ヒト声帯星細胞が密に分布する声帯黄斑と幹細胞ニッチ

ヒト声帯黄斑はヒアルロン酸に富み、黄斑内の細胞表面にはヒアルロン酸受容体を認め、ヒアルロン酸リッチマトリクスであった。

幹細胞ニッチは体内で幹細胞を維持し、幹細胞の増殖や分化を制御している微小環境である。ヒアルロン酸リッチマトリクスは、幹細胞の微小環境(ニッチ)として生体内に広く分布している。ヒト声帯星細胞が密に分布する前・後黄斑はヒアルロン酸リッチマトリクスであり、幹細胞ニッチである可能性が示唆された。

ヒト声帯黄斑内の細胞を DMEM 培地で培養すると、声帯星細胞類似の細胞が継代され、対称性分裂が認められた。間葉系幹細胞増殖培地で培養すると、コロニーを形成する細胞群(colony-forming unit)と声帯星細胞類似の細胞群が増殖し、未分化の幹細胞とそれより分化した細胞を生み出す非対称性分裂が認められた。

声帯星細胞を含めたヒト黄斑内の細胞が、

その幹細胞性を維持するためには、幹細胞ニッチとしてのヒト声帯黄斑の微小環境が重要であり、その解明が今後の課題といえた。

(4)まとめ

ヒト声帯星細胞は、声帯組織の恒常性を維持し、声帯組織が損傷した際には細胞を産生して組織を再生させる間葉系幹細胞(組織幹細胞)である可能性が示唆された。

ヒト声帯粘膜の前・後黄斑は幹細胞ニッチであり、同部に密に分布する細胞は、ヒト固有の声帯組織の恒常性を保つ組織幹細胞である可能性が示唆された。

## 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 8 件)

- 1) KURITA Takashi, SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, FUKAHORI Mioko, SUEYOSHI Shintaro, UMENO Hirohito: Origin of Vocal Fold Stellate Cells in the Human Macula Flava. Ann Otol Rhinol Laryngol 124: in press, 2015. 査読有
- 2) SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito: Dimensions and Morphological Characteristics of Human Newborn Glottis. Laryngoscope 125: E186-E189, 2015. 査読有
- 3) SATO Kiminori, KURITA Takashi, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi Mechanical Regulation of Human Vocal Fold Stellate Cells. Ann Otol Rhinol Laryngol 124: 49-54, 2015. 査読有
- 4) 佐藤公則：病態からみた音声障害の診断と治療-声帯所見に乏しい音声障害をどう取り扱うか- 喉頭 25 : 104~112, 2014. 査読有
- 5) 佐藤公則：高齢者の音声機能 -機能形態学からみた音声の加齢- 日気食会報 65 : 379-387, 2014. 査読有
- 6) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Vocal Fold Stem Cells

and their Niche in the Human Vocal Fold. Ann Otol Rhinol Laryngol 121: 798-803, 2012. 査読有

7) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Vocal Fold Stellate Cells in the Human Macula Flava and the Diffuse Stellate Cell System. Ann Otol Rhinol Laryngol 121: 51-56, 2012. 査読有

8) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi, NONAKA Satoshi, HARABUCHI Yasuaki: Histopathologic Investigation of the Unphonated Human Child Vocal Fold Muocsa. J Voice 26: 37-43, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

1) SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, KURITA Takashi, UMENO Hirohito: Cell Origin In The Macula Flava Of The Human Newborn Vocal Fold. The 95<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, April 22-23, 2015, Boston (USA)

2) SATO Kiminori, KURITA Takashi, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito: Microenvironment of Macula Flava in the Human Vocal Fold as a Stem Cell Niche. The 136<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association, April 22-23, 2015, Boston (USA)

3) 佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：ヒト声帯黄斑内の声帯星細胞の幹細胞性。第27回日本喉頭科学会、2015年4月9-10日、ホテルグランドヒル市ヶ谷(東京)

4) 佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：ヒト声帯粘膜の組織幹細胞と幹細胞ニッチ。第14回日本再生医療学会、2015年3月19-21日、パシフィコ横浜(横浜)

5) 佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：新生児声帯黄斑内の声帯星細胞の起源-骨髄由来細胞との関連性- 第66回日本気管食道科学会、2014年11月13-14日、高知県

立県民文化ホール(高知)

6) 佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁：幹細胞ニッチとしてのヒト声帯黄斑の微小環境。第59回日本音声言語医学会(2014年10月9-10日、アクロス福岡(福岡))

7) SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, KURITA Takashi, UMENO Hirohito: Keynote Lecture: Tissue Stem Cells in the Human Vocal Fold Mucosa. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society-Asia Pacific Meeting 2014 (September 24-27, 2014, Daegu (Korea))

8) SATO Kiminori, KURITA Takashi, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Cytoskeleton of Newborn Vocal Fold Stellate Cells. The 135<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association (May 14-15, 2014, Las Vegas (USA))

9) SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, KURITA Takashi, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Origin of Vocal Fold Stellate Cells in the Human Macula Flava. Are They Bone Marrow Derived Cells? The 94<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association (May 14-15, 2014, Las Vegas (USA))

10) SATO Kiminori, CHITOSE Shun-ichi, KURITA Takashi, UMENO Hirohito: Symposium: Somatic Stem Cells in the Human Vocal Fold. The 15<sup>th</sup> Korea Japan Joint Meeting in Otolaryngology-Head and Neck Surgery April 3-5, 2014, Seoul (Korea)

11) 佐藤公則、千年俊一、栗田 卓、梅野博仁、中島 格：ヒト声帯黄斑内の声帯星細胞の起源 -骨髄由来細胞との関連性- 第26回日本喉頭科学会、2014年3月6-7日、ロワジールホテル那覇(那覇)

12) 佐藤公則、栗田 卓、千年俊一、梅野博仁、中島 格：新生児声帯黄斑内声帯星細胞

のメカニカルレギュレーション. 第 65 回日本気管食道科学会、2013 年 10 月 31 日～11 月 1 日、品川プリンスホテル (東京)

13) SATO Kiminori: Panel Discussion: Functional Fine Structure of the Aged Vocal Fold Mucosa. The 20<sup>th</sup> World Congress of the International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies, June 1-5, 2013, Seoul (Korea)

14) SATO Kiminori, KURITA Takashi, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Mechanical Regulation of Human Vocal Fold Stellate Cells. The 93<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association, April 10-11, 2013, Orlando (USA)

15) SATO Kiminori, KURITA Takashi, ONO Takeharu, CHITOSE Shun-ichi, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Cytoskeleton of Vocal Fold Stellate Cells Unphonated for a Long Period. The 134<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Laryngological Association, April 10-11, 2013, Orlando (USA)

16) 佐藤公則、栗田 卓、千年俊一、小野剛治、梅野博仁、中島 格: 長期間発声していないヒト声帯星細胞の細胞骨格. 第 25 回日本喉頭科学会、2013 年 3 月 7-8 日、メルパルク横浜 (横浜)

17) 佐藤公則、栗田 卓、千年俊一、梅野博仁、中島 格: ヒト声帯黄斑の声帯星細胞のメカニカルレギュレーション. 第 64 回日本気管食道科学会、2012 年 11 月 8~9 日、ホテル日航東京 (東京)

18) SATO Kiminori: SYMPOSIUM: Functional Microscopic Structure of the Macula Flava in the Human Vocal Fold. The 5<sup>th</sup> International Congress of World Voice Consortium, October 27-31, 2012, Luxor (Egypt)

19) SATO Kiminori: KEYNOTE LECTURE Translational Medicine of the Human Vocal Fold Mucosa. On the Move from Bench to Bedside. The 5<sup>th</sup> International Congress of World Voice Consortium, October 27-31, 2012, Luxor (Egypt)

20) SATO Kiminori, UMENO Hirohito, NAKASHIMA Tadashi: Vocal Fold Stem Cells and their Niche in the Human Vocal Fold. The 91<sup>st</sup> Annual Meeting of the American Broncho-Esophagological Association (April 18-19, 2012, San Diego (USA)

21) 佐藤公則、梅野博仁、中島 格: ヒト声帯幹細胞と幹細胞ニッチ. 第 24 回日本喉頭科学会、2012 年 3 月 8-9 日、金沢文化ホール (金沢)

〔図書〕(計 1 件)

1) SATO Kiminori: Functional Fine Structures of the Human Vocal Fold Mucosa. In: John S Rubin, Robert T Sataloff, Gwen S Korovin, editors. Diagnosis and Treatment of Voice Disorders. 4<sup>th</sup> edition. pp 49-59, Plural Publishing Inc., San Diego, 2014.

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤公則 (SATO KIMINORI)

久留米大学医学部教授

研究者番号: 70196228

(2) 研究分担者

梅野博仁 (UMENO HIROHITO)

久留米大学医学部准教授

研究者番号: 40203583

中島 格 (NAKASHIMA TADASHI)

久留米大学医学部教授

研究者番号: 70117183