

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462680

研究課題名(和文) 声帯癬痕に対する細胞移植による再生医療に関する研究

研究課題名(英文) Regenerative medicine for vocal fold scar with cell therapy

研究代表者

平野 滋 (Hirano, Shigeru)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10303827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植を用いた声帯の再生医療を確立することを目的とした。細胞ソースとして、MSC(骨髄由来間葉系幹細胞)とASC(脂肪由来間葉系幹細胞)が有効で、ラットおよびイヌ声帯癬痕モデルを用いた検証では、ASC、MSCともに組織学的、機能的に良好な再生効果を示したが、遺伝子発現においてはASCがHAS、HGF発現において有効であった。また、再生土台の開発として増殖因子を徐放可能なコラーゲン・ゼラチン複合土台を開発し、声帯線維芽細胞との組織親和性が良好で、イヌ声帯癬痕への移植により良好な再生効果を確認した。今後ハイブリッド移植による声帯再生の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aims to develop regenerative medicine for the vocal fold with cell transplant. Mesenchymal stem cells derived from the bone marrow or fat improved histological and functional aspects of canine scarred vocal folds. ASC showed higher gene expression of HAS and HGF from vocal fold cells, which appeared beneficial for vocal fold regeneration. Collagen/gelatin scaffold was developed that control-release growth factors. The scaffold proved a good biocompatibility to vocal fold fibroblasts, and indicated regenerative effects on canine vocal fold scar.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：声帯 再生医療 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

音声の発生源である声帯粘膜は粘弾性を備えた極めて特殊な粘膜で、癒痕や萎縮による粘膜の機能喪失は不可逆的で重度の音声障害をきたし、現在の喉頭科学の分野で最重要かつ最難関の課題である。

声帯癒痕の治療のために種々の方法が考案されてきた。癒痕切除、レーザー手術、筋膜移植、ステロイド注射、脂肪注入などであるがいずれも癒痕の改善効果は乏しく、確立された治療ほうはないのが現状である。

再生医療は従来困難な難治性疾患の打開にむけた革新的医療であり、声帯癒痕にも応用あ望まれている。これまで細胞移植や増殖因子を用いた方法、再生土台移植を用いた方法など研究が行われてきたが、いまだ確立されるには至っていない。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの我々の研究成果をもとに、細胞移植を用いた声帯の再生医療を確立していくことを目的とした。そのために細胞ソースの確立、効果の検証、再生土台や増殖因子との併用効果を検討することとした。

3. 研究の方法

● 細胞ソースの開発

適切な細胞ソースを *in vitro*, *in vivo* で検証する。

➤ 細胞ソース

- ✓ iPS 細胞
- ✓ 末梢血単核球 (MNC)
- ✓ 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC)

✓ 脂肪由来間葉系幹細胞(ASC)

● 細胞移植による声帯癒痕治療の効果の検証

➤ 動物実験により安全性と効果を確認する

● 再生土台、増殖因子との併用効果の検証

➤ 細胞治療の効果増幅のため、動物実験により安全性と効果を確認する

4. 研究成果

● 細胞ソースの樹立：細胞ソースとしては、iPS, MSC(骨髄由来間葉系幹細胞), ASC(脂肪由来間葉系幹細胞), MNC(単核球)を候補としたが、iPSは移植後の腫瘍原性が問題となり、またMNCは幹細胞性に劣るため自家幹細胞であるMSC, ASCに絞り、まずは両者の細胞樹立系を確立した。そのうち、MSC, ASCをラットおよびイヌの声帯癒痕モデルを用いて再生効果の検証を行った。

● 再生効果の検証実験：ラット声帯の慢性癒痕を作成し、GFPラットから採取培養したMSCおよびASCを声帯へ直接注入した。1か月後の組織所見では移植細胞は生着していたが、3か月目には消失していた。3か月後の組織所見で細胞移植を行った声帯においてはヒアルロン酸の回復とコラーゲンの適度な融解が認められ、良好な再生効果が確認され、両細胞群で差はなかった。一方、投与後1か月の声帯内における遺伝子発現を検討したところ、ASC群でHGF、ヒアルロン酸合成酵素(HAS)の遺伝子発現より強いことを確認した。

● イヌ声帯癒痕モデルを用いて、MSC,

ASC の移植実験を行った。イヌ声帯癒痕に移植した後、6 か月後に喉頭を摘出し声帯の振動機能、組織学的検討を行った結果、両細胞群は Sham 群より有意に振動機能の改善が確認されたが ASC のほうが、より声門閉鎖が良好であった。また、組織学的には ASC のほうが声帯粘膜内のヒアルロン酸の回復とコラーゲンの消化において、MSC より効果的であった。以上の実験結果より、声帯再生には ASC が最も有効である可能性が示された。

- 再生土台、増殖因子を用いたハイブリッド効果の検証：再生土台にはコラーゲン、ジェラチン、ヒアルロン酸などが用いられてきたが、増殖因子を徐放する強力な再生誘導をもつ土台としてコラーゲン・ジェラチン複合土台（CGS）が開発された。これを用いた細胞移植を検討するために、まず声帯から抽出した線維芽細胞を CGS 上で3次元培養し、細胞親和性、増殖性、機能を検討した。CGS 上には線維芽細胞増殖因子（bFGF）を濃度を変えて封入した。結果、線維芽細胞は CGS 上でよく生着し、bFGF 存在下において有意に細胞増殖が促進された。また bFGF 存在下において細胞からの内因性 bFGF, HGF の遺伝子発現が亢進された。コラーゲン I, III の遺伝子発現は抑制され、HAS-1, 2 の発現は有意に上昇した。
- ハイブリッド素材の移植実験
CGS + bFGF のイヌ声帯癒痕への移植実験を行った。移植後半年の組織所見および振動機能検査で、ハイブリッド移植は CGS のみの移植より声帯振動の改善、組織学的なヒアルロン酸の回復などにおいて有意に良好な再生効果

をもたらした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Hirano S, Mizuta M, Kaneko M, Tateya I, Kanemaru SI, Ito J. Regenerative phonosurgical treatments for vocal fold scar and sulcus with basic fibroblast growth factor. *Laryngoscope*. 2013;123(11):2749-2755.

2013;123(11):2749-2755.

Kanemaru SI, Kitani Y, Ohno S, Shigemoto T, Kojima T, Ishikawa S, Mizuta M, Hirano S, Nakamura T, Dezawa M. Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells. *Laryngoscope*. 2013;123:2728-2734.

2013;123:2728-2734.

Mizuta M, Hirano S, Ohno S, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Restoration of Scarred Vocal Folds Using 5 Amino Acid-Deleted Type Hepatocyte Growth Factor. *Laryngoscope* 2014;124:E81-6.

Laryngoscope 2014;124:E81-6.

Graupp M, Kiesler K, Friedrich G, Ainödhofer H, Gruber HJ, Kieslinger P, Saxena A, Hirano S, Gugatschka M. Vocal Fold Fibroblast Response to Growth Factor Treatment is Age Dependent: Results From an In Vitro Study. *J Voice*. 2014;28:420-423.

2014;28:420-423.

Mizuta M, Hirano S, Kishimoto Y, Hiwatashi N, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, Ito J. Pharmacokinetics and safety of human recombinant hepatocyte growth factor administered to vocal folds.

Laryngoscope. 2014;124:2131-2135.

Gugatschka M, Ainodhofer H, Gruber H, Graupp M, Kieslinger P, Kiester K, Saxena A, Hirano S, Friedrich G. Age effects on extracellular matrix production of vocal fold scar fibroblasts in rats. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2014;271:1107-1112.

Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Tateya I, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J. Adipose-derived stem cells versus bone marrow-derived stem cells for vocal fold regeneration. *Laryngoscope*. 2014 ;124(12):E461-469.

Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Tateya I, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J, Kawai K, Suzuki S. Biocompatibility and Efficacy of Collagen/Gelatin Sponge Scaffold With Sustained Release of Basic Fibroblast Growth Factor on Vocal Fold Fibroblasts in 3-Dimensional Culture. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2015;124(2):116-125.

Hiwatashi N, Hirano S, Mizuta M, Kobayashi T, Kawai Y, Kanemaru SI, Nakamura T, Ito J, Kawai K, Suzuki S. The efficacy of a novel collagen-gelatin scaffold with basic fibroblast growth factor for the treatment of vocal fold scar. *J Tissue Eng Regen Med*. 2015 Jun 29. doi: 10.1002/term.2060. [Epub ahead of print]

Hiwatashi N, Hirano S, Suzuki R, Kawai Y, Mizuta M, Kishimoto Y, Tateya I, Kanemaru S, Nakamura T, Dezawa M, Ito J. Comparison of ASCs and BMSCs combined with atelocollagen for vocal fold scar regeneration. *Laryngoscope* 2015 Sep 25. doi: 10.1002/lary.25667. [Epub ahead of print] PMID:26403510

[学会発表](計 11 件)

Kobayashi T, Hirano S, Mizuta M, Hiwatashi N, Kishimoto Y, Ito J. Acute vocal fold scar restoration with injectable basic fibroblast growth factor hydrogel. 94th American Bronchoesophagological Association, Las Vegas, May 14-15,2014.

Kawai Y, Hirano S, Kishimoto Y, Ito J. Identification of slow cycling cells in the macula flava of rat vocal fold. 94th American Bronchoesophagological Association, Las Vegas, May 14-15,2014.

Kishimoto Y, Wei A, Toya Y, Ling C, Hirano S, Welham N. Targeted depletion of monocyte-lineage cells attenuates vocal fold scar formation in mice. 94th American Bronchoesophagological Association, Las Vegas, May 14-15,2014.

Mizuta M, Kobayashi T, Kanemaru S, Ito J, Hirano S. Effect of Astaxanthin on the age-associated change of vocal folds in a rat model. 135th American Laryngological Association, Las Vegas, May 14-15,2014.

Hiwatashi N, Mizuta M, Tateya I, Kobayashi T, Kanemaru S, Ito J, Hirano S. The comparison of mesenchymal stem cells for regeneration of rat chronic vocal fold scar. 135th American Laryngological Association, Las Vegas, May 14-15,2014.

Hirano S. Tissue engineering approach to regeneration of the larynx with growth factors. 13th Biennial Phonosurgery Symposium -Strategic Directions in Laryngeal Tissue Regeneration. Madison,

July 10-12, 2014

Hiwatashi N, Kawai Y, Kishimoto Y, Tsuji T, Suzuki R, Hirano S. Comparison of the efficacy of mesenchymal stromal cells for canine vocal fold regeneration:

Adipose-derived stromal cells versus bone marrow-derived stromal cells. 136th annula meeting of American

Laryngological Association, Boston, Apr 22-23, 2015.

Kishimoto Y, Wei A, Xiong M, Toya Y, Ling C, Hirano S, Welham NV.

Identification of bone marrow derived migratory cells in the naïve and injured vocal fold. 95th annual meeting of

American Bronchoesophagological Association, Boston, Apr 22-23, 2015.

Kishimoto Y, Wei A, Xiong M, Toya Y, Ling C, Hirano S, Welham NV.

Identification of bone marrow derived migratory cells in the naïve and injured vocal fold. 95th annual meeting of

American Bronchoesophagological Association, Boston, Apr 22-23, 2015.

Suzuki R, Hirano S, Tateya I, Kishimoto Y, Kawai Y, Hiwatashi N. Prevention of vocal fold scarring with local application of basic fibroblast growth factor in rat model.

95th annual meeting of American Bronchoesophagological Association, Boston, Apr 22-23, 2015.

Hirano S, Kishimoto Y, Hiwatashi N, Kaneko M. Current status of intracordal injectino of basic fibroblast growth factor for vocal fold scar and atrophy. 44th Voice

Foundation Symposium, Philadelphia, May 26-31, 2015

〔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 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

URL:<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 (HIRANO, Shigeru)

京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：10303827

(2)研究分担者

金丸眞一 (KANEMARU, Shin-ichi)

田附興風会北野病院・部長

研究者番号：00271510

中村達雄 (NAKAMURA, Tatsuo)

京都大学再生医科学研究所・准教授

研究者番号：70227908

楯谷一郎 (TATEYA, Ichiro)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20526363

北村守正 (KITAMURA, Morimasa)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60543262