

平成 25 年 7 月 31 日

日本音声言語医学会理事長 殿

所属施設・部局 久留米大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

申請者(代表者) 千年 俊一 (署名・捺印)

所属部局責任者 中島 格 (署名・捺印)

## 研究報告書

プロジェクトの名称 : 培養口腔粘膜を用いた組織工学的的手法による声帯粘膜再生

1. 実施結果の概要（800字程度：なお，その中に本経費で購入した機器・消耗品等が，どのように研究に活用されたのかを簡潔に記入する。）

背景：喉頭癌などの切除後に生じる傷害声帯や加齢変化で生じる声帯溝症では、声帯層構造に不可逆性の異常を来している。声帯粘膜の粘弾性は低下し発声時の粘膜波動が不規則あるいは消失するため、硬起性や氣息性の嗄声になり日常生活でコミュニケーション障害を生ずる。

目的：難治性疾患である傷害声帯や声帯溝症に対する再生治療の前段階として、培養口腔粘膜を用いて正常声帯粘膜と同様の層構造および同等の機能をもった声帯粘膜をin vitroで再生する。

対象と方法：積層培養組織（声帯粘膜モデル）の作製と組織学的・形態学的検証を行なう。動物実験用ビーグル犬から採取した口腔粘膜組織 3×3mm を用いる。口腔粘膜組織を上皮細胞と線維芽細胞に分離培養した上で、粘膜重層上皮と粘膜固有層から成る声帯粘膜モデルを作製する。粘膜固有層にあたるコラーゲンゲル内に含まれる線維芽細胞の足場として、配向性を有するメッシュコラーゲンシート（アトリー社）を用いる。次に、作製した声帯粘膜モデルに対して、HE (Hematoxylin-Eosin) 染色、各種免疫組織化学染色、走査型電子顕微鏡を行なう。正常声帯粘膜（図1）と作製した声帯粘膜モデル（図2）の構造上の類似性を比較検討する。

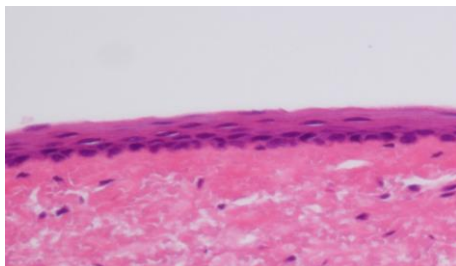


図1) 正常声帯粘膜（ビーグル）

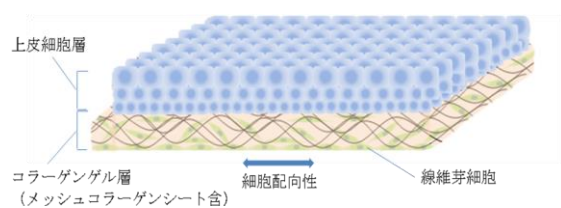


図2) 声帯粘膜モデルの作製

結果：1) 口腔粘膜由来の2層構造の声帯粘膜モデルを作製できた。2) HE染色で、上層細胞の重層化（図3）と下層コラーゲンに含まれる細胞の増生（図4）を確認した。3) 重層化した上層細胞は抗Cytokeratin抗体で全層が陽性であった（図5）。4) 上層細胞の細胞間は抗E-Cadherin抗体で全層が陽性であった（図6）。5) 走査型電子顕微鏡にて、上層細胞の表面は広い細胞間隙を認めた（図7）。また、一部の上層細胞の表面に微絨毛が確認できた（図8）。5) 下層の間質細胞は抗Vimentin抗体が陽性であり、正常声帯上皮の粘膜固有層に類似していた（図9）。6) 重層化した上層細胞の基底部では抗IV型コラーゲン抗体が陰性であった。

考察：細胞培養手技を用いて、口腔粘膜から重層上皮細胞と線維芽細胞から成る声帯粘膜モデルを作製することができた。作成した声帯粘膜モデルは正常声帯粘膜の構造と類似する部分が多かったが、上皮基底膜の存在は確認できなかった。過去の報告によると、三次元的な組織構築により上皮細胞と線維芽細胞間の相互作用が働くことにより、積層培養組織の形態維持が可能になるとされる。また、積層培養組織は、移植後の粘膜再生を促進し粘膜肥厚や粘膜固有層の線維化を抑制する働きがあるとされる。このことから本研究で作製した声帯粘膜モデルは、自家移植後の粘膜上皮および粘膜固有層の組織親和性と形態維持ができるものと期待される。声帯粘膜モデルの自家移植に関しては培養段階での他家由来の血清や増殖因子を使用する問題が残るが、本研究で作製した声帯粘膜モデル他家由来の細胞や増殖因子を用いない培養条件下で組織作製が可能である。今後は、声帯粘膜モデルの粘膜固有層にコラーゲン以外の細胞外マトリックスを添加あるいは誘導することで、声帯振動に有利な細胞外マトリックスの配列と強度を持った組織構造の再生が必要と考えられる。

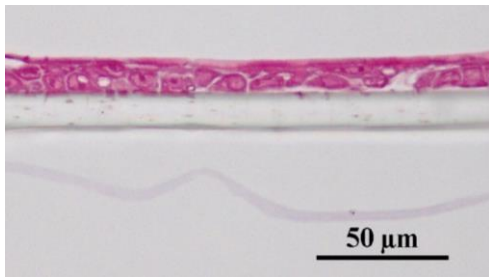


図3) 上層細胞の重層化

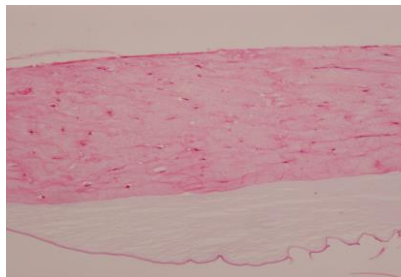


図4) 下層細胞の増生

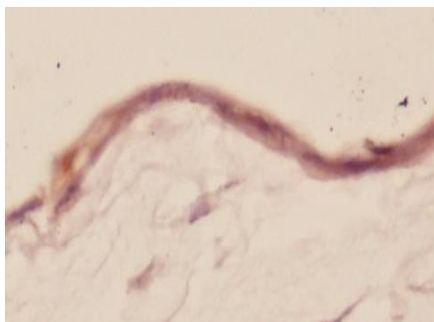


図5) 抗Cytokeratin抗体による上層細胞の陽性所見

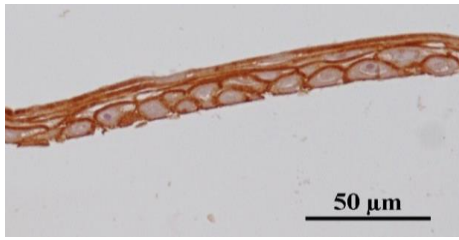


図6) 抗E-Cadherin抗体による上層細胞間の陽性所見

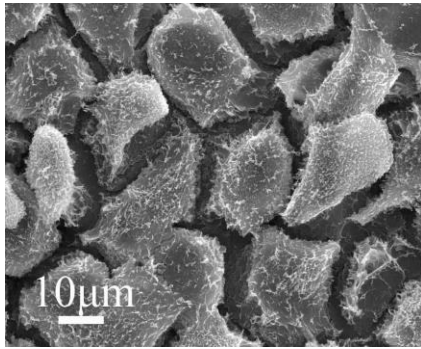


図7) 表面細胞は広い細胞間隙

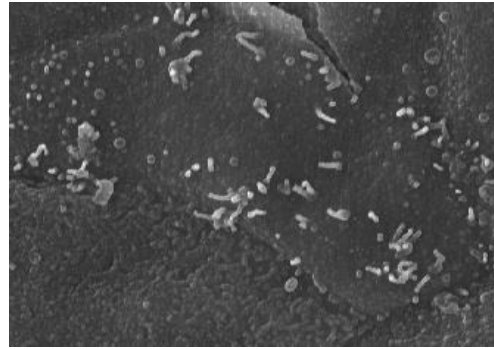


図8) 表面細胞に微絨毛の確認

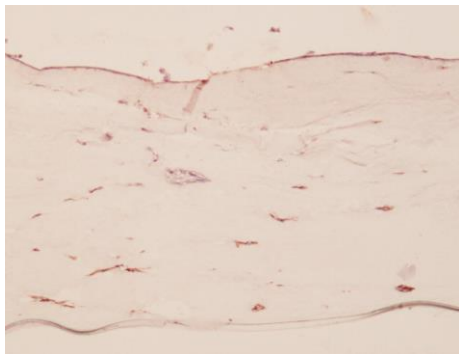


図9) 抗Vimentin抗体による下層の間質細胞の陽性所見

本研究における助成金45万円は、細胞培養液、コラーゲン溶液、酵素溶液、仔牛血清、上皮細胞増殖因子、各種抗体、および培養用プラスチック製品の購入に使用した。

## 2. 本研究に関わる将来展望

### (1) 研究成果とそのインパクト (A4用紙に2～3枚程度)

本研究は、従来の音声障害に対する治療法とは全く異なり、*in vitro*での自家組織の再構成培養を経て組織工学的手法を利用し移植することにより、本来の声帯機能の回復を目指している。作製した培養重層組織を実際に声帯粘膜欠損部へ移植し、移植後の安定性を獲得できるかが今後の重要なポイントになる。これまでにヒト皮膚(表皮と真皮)を用いた3次元再構成培養法はすでに確立されており、熱傷後治療などにおいて移植部位に応じて各層の構造や厚さを自在に変えることができる。今回の実験結果から、粘膜

においても粘膜上皮と粘膜固有層の3次元再構成培養は十分可能であり、移植後の声帯層構造の再生は可能と考えられる。また、声帯粘膜固有層の再生に配向性材料を用いたことで細胞外マトリックスの配列を任意にすることができ、声帯粘膜特有の線維方向をもった組織を作製することが可能であり、声帯の伸縮に対応できると考えられる。近年、培養口腔粘膜上皮を用いて、食道、心筋や角膜<sup>7)</sup>において臨床応用した報告がみられる。但し、声帯は振動体であり他の臓器とは異なる粘膜の層構造が必要であり、さらには移植後の安定的生着が問題になる。しかし、組織片を直接自家移植することと異なり自家培養組織の移植は周囲組織との親和性が高く生着しやすいという利点がある。また、培養層構造の下層に強度を備えた配向性メッシュコラーゲンシートを用いることで移植後の安定性・機能性が保たれると考えられる。培養口腔粘膜を用いた組織工学的手法による声帯への自家移植は、粘膜再生が期待できない声帯病変に対して、低侵襲な手技として利用できる可能性があり音声外科の観点からも今後の傷害声帯や声帯溝症の治療に大きく貢献するものと思われる。

#### 謝辞

本研究は、平成24年度（第6回）日本音声言語医学会の研究助成を受けて実施しました。本学会の湯本英二理事長、役員の方、並びに会員の先生方に深謝申し上げます。

3. 実績発表（発表予定を含む）

代表者・分担者氏名	発表論文名・著者名等（音声言語医学誌の投稿規定に沿った書式でお願いします）（著者名：論文名．雑誌名，巻：頁，年次．）
代表者：千年俊一 分担者：深堀光緒子 分担者：佐藤公則	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第24回日本喉頭科学会．2012年3月8,9日金沢(金沢大学)．犬培養口腔粘膜上皮を用いた傷害声帯治療に関する基礎的研究．</li> <li>2. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第64回日本気管食道科学会．2012年11月8,9日東京（慶応大学）．培養口腔粘膜を用いたtissue engineeringによる声帯粘膜再生．</li> <li>3. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第25回日本喉頭科学会．2013年3月7,8日横浜(北里大学)．口腔粘膜培養による声帯粘膜の再生-層構造を持つ声帯粘膜の再生を目指して-．</li> <li>4. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第114回日本耳鼻咽喉科学会．2013年5月15-18日 札幌（北海道大学）．培養口腔粘膜を用いた組織工学的手法による声帯層構造の再生．</li> <li>5. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第28回日耳鼻九州連合地方部会．2013年6月22-23日 長崎（長崎大学）．</li> <li>6. Shun-ichi Chitose, Mioko Fukahori, Kiminori Sato, et al. AAO-HNSF Annual Meeting. Sep 29-31, Oct 1-2, 2013 in Vancouver, Canada. Vocal fold cover layer with a tissue-engineered structure containing epithelium and fibroblast of oral mucosa.（発表予定）</li> <li>7. 深堀光緒子，千年俊一，佐藤公則，他：第65回日本気管食道科学会．2013年10月31日,11月1日東京（日本大学）．培養口腔粘膜を用いた組織工学的手法による声帯層構造の再生．一摘出喉頭における水鳴実験および組織学的検討-．（発表予定）</li> </ol>