

平成 31 年 4 月 30 日

日本音声言語医学会
理事長 大森孝一様

会員番号 5663
申請者氏名 佐藤文彦 印

助成研究実績報告書

平成 29 年 5 月 15 日付で助成金交付決定を受けた研究が完了したので、次のとおりその実績を報告します。

記

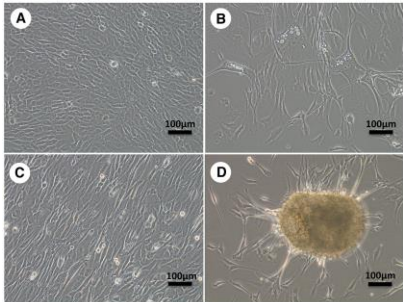
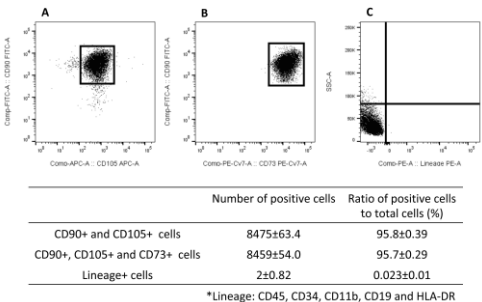
1 研究課題名 ヒト声帯黄斑細胞の幹細胞性と階層性の解明

2 交付決定助成金額 300,000 円

3 添付書類

- (1) 助成研究実績報告書(付表1)
- (2) 助成研究収支計算書(付表2)
- (3) その他参考資料

助成研究実績報告

申請者	佐藤 文彦												
研究実施期間	平成 29 年 4 月～平成 31 年 3 月												
研究課題名	ヒト声帯黄斑細胞の幹細胞性と階層性の解明												
目的	我々のこれまでの研究から、声帯黄斑には声帯粘膜の細胞外マトリックスの代謝や成長・発達・老化に関与する声帯星細胞や、声帯の組織構造を再生・維持する組織幹細胞が存在し、また声帯黄斑は、幹細胞ニッチである可能性が示唆されている ¹⁻⁴ 。本研究では、ヒト声帯黄斑内の細胞の幹細胞性を評価し、また声帯黄斑内の細胞の階層性について検討した。												
方法	<p>1. 細胞分離と培養 外科的切除により摘出した病変のない喉頭から声帯黄斑組織を採取し、細胞培養する。放射線照射例及び、癌の喉頭浸潤例は除外する。間葉系細胞増殖培地 (MF-start 培地: TOYOBO, Osaka, Japan) を用い、37°C、5%CO₂ の条件下で培養を行い、コンフルエントになった時点で、間葉系幹細胞増殖培地 (MF-medium 培地: Mesenchymal Stem Cell Growth Medium; TOYOBO) で継代培養する。</p> <p>2. 細胞表面マーカーの解析 (Flow cytometry (FCM)) FCM を用いて、ヒト声帯黄斑内の細胞の細胞表面マーカー (CD105, CD73, CD90, CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD19, HLA-DR) の発現様式を検討する。</p> <p>3. 分化能の検討 ヒト声帯黄斑内の細胞を Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification kit (R&D systems) を用いて脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ、また Human Pluripotent Stem Cell Functional Identification Kit (R&D Systems) を用いて 3 胚葉に分化誘導する。</p> <p>4. 免疫組織化学的検討 多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 の発現を検討する。</p>												
結果	<p>ヒト声帯黄斑から幹細胞の特徴の一つであるコロニー形成を示し、また 3 種類の形態の異なる細胞 (紡錘形細胞、敷石状細胞、声帯星細胞様の脂肪滴を有する細胞) を認めた (Figure 1)。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Fig. 1</p> </div> <div style="text-align: center;">  <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Number of positive cells</th> <th>Ratio of positive cells to total cells (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CD90+ and CD105+ cells</td> <td>8475±63.4</td> <td>95.8±0.39</td> </tr> <tr> <td>CD90+, CD105+ and CD73+ cells</td> <td>8459±54.0</td> <td>95.7±0.29</td> </tr> <tr> <td>Lineage+ cells</td> <td>2±0.82</td> <td>0.023±0.01</td> </tr> </tbody> </table> <p>*Lineage: CD45, CD34, CD11b, CD19 and HLA-DR</p> <p>Fig. 2</p> </div> </div> <p>継代をすすめ第二継代目の細胞を用いた FCM ではヒト声帯黄斑から増殖した細胞は、CD105, CD73, CD90, の発現を認め、CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79a or CD19, HLA-DR の発現は認めなかった</p>		Number of positive cells	Ratio of positive cells to total cells (%)	CD90+ and CD105+ cells	8475±63.4	95.8±0.39	CD90+, CD105+ and CD73+ cells	8459±54.0	95.7±0.29	Lineage+ cells	2±0.82	0.023±0.01
	Number of positive cells	Ratio of positive cells to total cells (%)											
CD90+ and CD105+ cells	8475±63.4	95.8±0.39											
CD90+, CD105+ and CD73+ cells	8459±54.0	95.7±0.29											
Lineage+ cells	2±0.82	0.023±0.01											

(Figure 2)。

これらの細胞は、脂肪・骨・軟骨細胞へ分化し(Figure 3)、また 3 胚葉の各マーカーを発現する細胞へ分化した(Figure 4)。

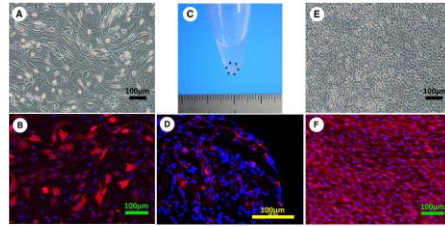


Fig. 3

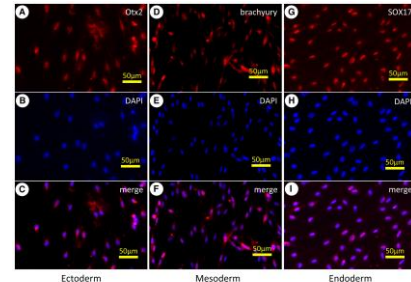


Fig. 4

ヒト多能性幹細胞マーカーの一つである SSEA-3 の発現を認めた(Figure 5)。

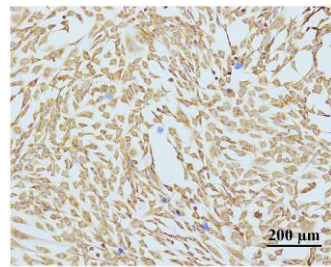


Fig. 5

倫理的配慮

久留米大学倫理委員会承認の元、実験を行った。

考 察

今回検討したヒト声帯黄斑の細胞は、間葉系幹細胞の minimal criteria: ①プラスチックに接着性を有する ②脂肪・骨・軟骨細胞への分化能を有する ③CD105, CD73, CD90 を発現し、CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD19, HLA-DR は発現しない を満たす細胞であることが確認された。また、3 胚葉の各マーカーを発現する細胞へ分化した。

声帯黄斑における幹細胞関連の報告はいくつかあり、山下らはヒト声帯黄斑には side population cell が存在すると報告している⁵。さらに、ラットにおいてこの side population cell はラインケ腔の創傷治癒に関与しているとの報告もある⁶。これらの報告は、我々のヒト及びラットの声帯黄斑には、組織幹細胞が存在し、声帯黄斑は幹細胞ニッチであるという報告¹⁻⁴を支持するものである。

間葉系幹細胞は 3 胚葉由来のすべての細胞に分化するとされている。本検討では、ヒト声帯黄斑細胞は、三胚葉の各胚葉マーカーを発現する細胞へ分化し、ヒト多能性幹細胞マーカーを発現することが確認された。栗田らは、声帯黄斑には 3 胚葉全てに由来する中間径フィラメントが発現する細胞が存在すると報告している³。声帯黄斑には声帯組織を構成する細胞へと分化が可能な声帯の組織幹細胞が存在する可能性が、今回の研究から示唆された。またヒト声帯黄斑を培養すると 3 種類の形態の異なる細胞(紡錘形細胞、敷石状細胞、声帯星細胞様の脂肪滴を有する細胞)が増殖したことから、ヒト声帯黄斑内の細胞には階層性があることが今回の研究から示唆された。

1 Sato K, Umeno H, Nakashima T., 2012. Vocal fold stem cells and their niche in the human vocal fold. Ann Otol Rhinol Laryngol. 121: 798-803.

2 Sato K, Chitose S, Kurita T, Umeno H., 2016. Microenvironment of macula flava in the human vocal fold as a stem cell niche. J Laryngol Otol. 130: 656-661.

3 Kurita T, Sato K, Chitose S, Fukahori M, Sueyoshi S, Umeno H., 2015. Origin of vocal

	<p>fold stellate cells in the human macula flava. <i>Ann Otol Rhinol Laryngol.</i> 124: 698–705.</p> <p>4 Sato K, Kurita T, Chitose S, Sato K, Umeno H, Yano H., 2018. Distribution of label-retaining cells and their properties in the vocal fold mucosa. <i>Laryngoscope Investig Otolaryngol</i>, 2018; 4(1): 76–82.</p> <p>5 Yamashita M, Hirano S, Kanemaru S, Tsuji S, Suehiro A, Ito J., 2007. Side population cells in the human vocal fold. <i>Ann Otol Rhinol Laryngol.</i> 116: 847–852.</p> <p>6 Gugatschka M, Kojima T, Ohno S, Kanemaru S, Hirano S., 2011. Recruitment patterns of side population cells during wound healing in rat vocal folds. <i>Laryngoscope.</i> 121: 1662–1667.</p>
添 付 資 料	なし