

平成21年8月 日

日本音声言語医学会理事長 殿

所属施設・部局 京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科

申請者(代表者) 平野 滋 (署名・捺印)

所属部局責任者 伊藤壽一 (署名・捺印)

## 研究報告書

プロジェクトの名称：声帯粘膜再生のための声帯SP細胞の分離と組織幹細胞の同定

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。）

声帯粘膜の再生機構と組織幹細胞のはたす役割について研究を行っている。本研究は（１）SP細胞の分離、表面マーカーの同定と（２）SP細胞の損傷声帯再生過程における役割の解明とからなる。（１）についてはSP細胞のFACSによる分離同定をすすめているところで、まだデータをえるにはいたっていない。本年度は主に（２）の組織幹細胞を豊富に含むとされるSP細胞が、損傷声帯の修復期間にどのような発現をするかを検討した。まず、ラットの声帯粘膜を一側性に内視鏡下に損傷した。その後2週から5週までの各タイムポイントで喉頭を採取し、組織学的に検討を行った。SP細胞のマーカーであるABC抗体を用い、声帯黄斑部、ラインケ腔のスライスにおいて免疫染色を施行した。その結果、SP細胞の発現は黄斑部に多く発現していたが、14-28日において損傷側において強い発現が認められた。一方、ラインケ腔における発現は健常側、損傷側ともに乏しかったが、損傷部位においては第5週において若干の発現増加が認められた。今回、黄斑部、ラインケ腔ともに、損傷側でのABC陽性細胞発現は健常側に比較して統計学的な有意差は示さなかったものの、声帯粘膜再生におけるSP細胞の関与が示唆された。

本年度は主にSP細胞のマーカー抗体、免疫染色消耗品、ラット購入、手術機器および消耗品に研究費が使われた。

## 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)

[研究成果]

研究課題：ラット損傷声帯の修復過程におけるSP細胞の発現

研究方法と結果：

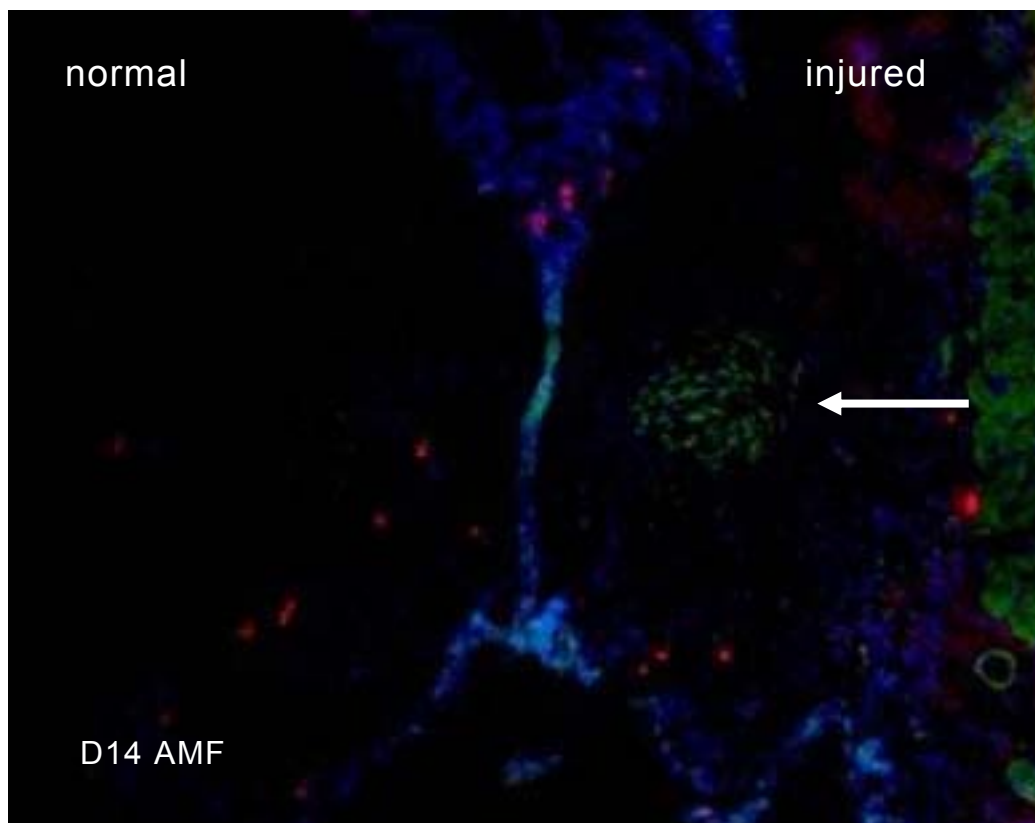
### 1. ラット声帯粘膜の損傷

ネンプタール、サイラジンの腹腔内投与による麻酔の後、小児用内視鏡を用いて眼科硝子体手術用の剪刀を用いて、一側声帯粘膜の膜様部中央を切開し、損傷を作成した(図1)。反対側は健常側コントロールとした。

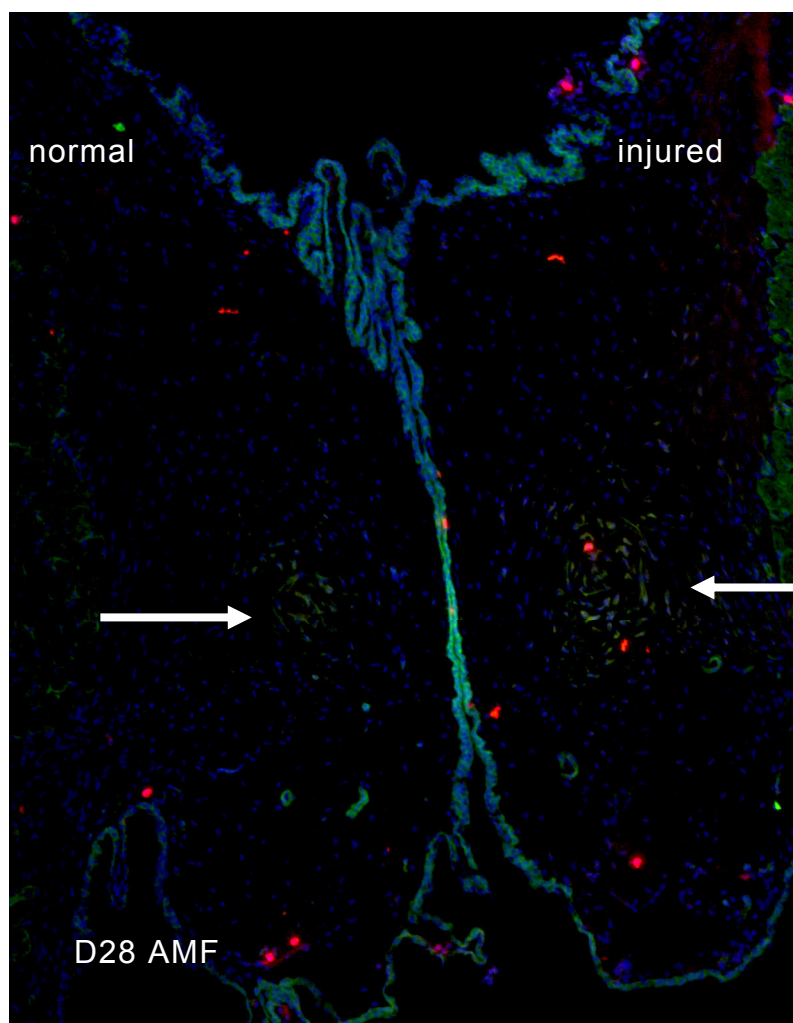
損傷後2-5週でラットを安楽死したのち、喉頭を摘出し、組織学的検索をおこなった。

### 2. ABCG抗体を用いた免疫染色によるSP細胞発現

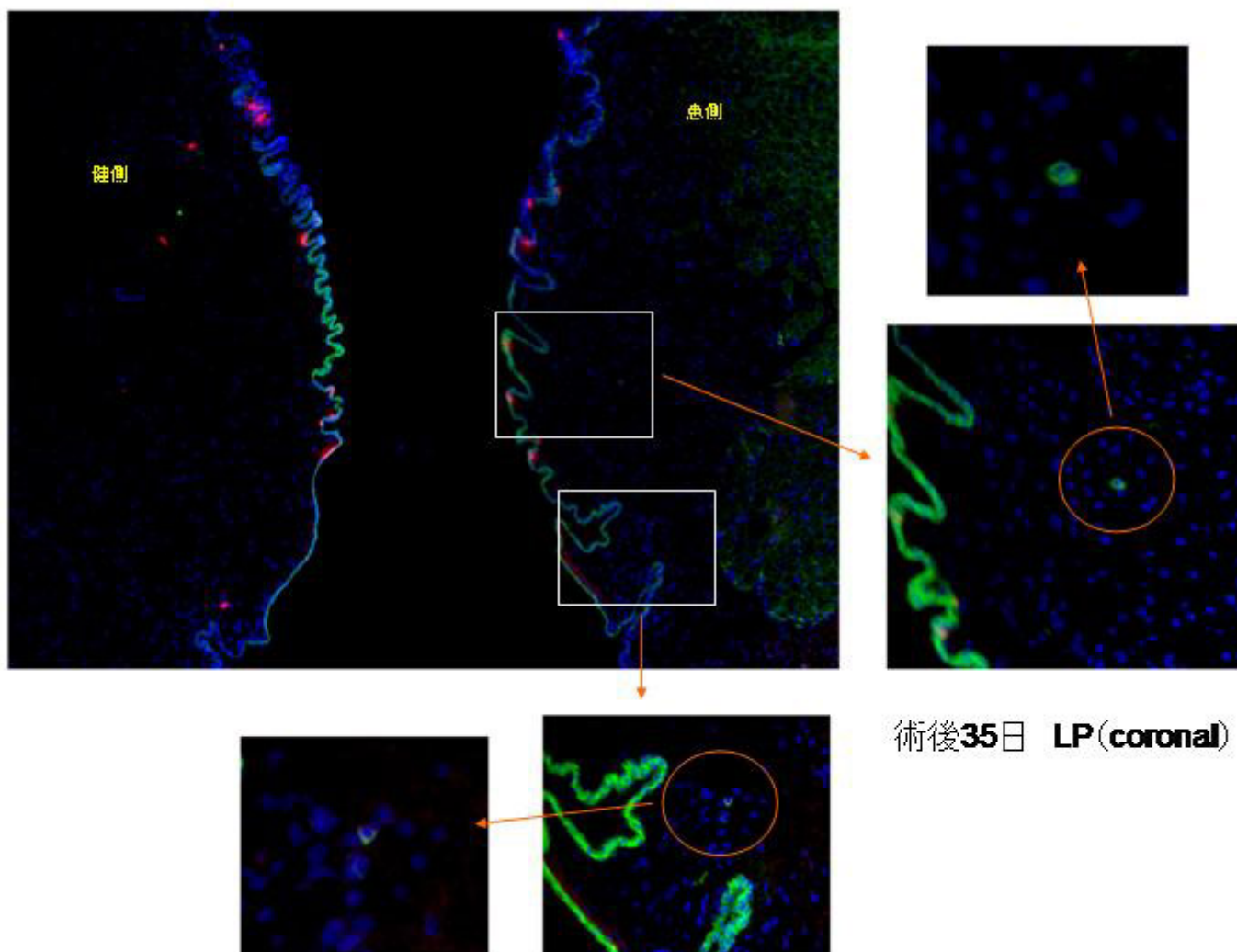
ABCG陽性細胞の多くは健常側、損傷側ともに黄斑部に多く認められた。14日目の染色では損傷側により強い発現が認められた(下図)。矢印；ABCG陽性細胞群



この傾向は28日まで認められたが、健常側との統計学的有意差にはいたらなかった。下図：28日目のABCG陽性細胞。



ラインケ腔におけるABCG発現は全体的に乏しかったが、35日目に損傷側で若干の発現上昇を認めた。



以上より、ABCG陽性細胞が損傷声帯において何らかの役割を果たしている可能性が示された。今後、タイムポイントの設定や他のマーカーとの関係など調べる必要があると考えられる。少なくとも、これまで声帯粘膜の損傷治癒においては線維芽細胞のみが注目をえていたが、粘膜の再生に幹細胞を含む幼弱細胞の関与がはじめて示されたと考えている。

- (2) その他に特記すべきことがありましたら記入ください。  
特になし

4. 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 (著者名、論文名、学会等名、巻(号)、発表年(西暦))
平野 滋	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Hirano S, Minamiguchi S, Yamashita M, Ohno T, Kanemaru S, Kitamura M. Histologic characterization of human scarred vocal folds. <i>J Voice</i> 2009;23(4):399-407.</li> <li>2. Ohno T, Hirano S, Rousseau B. Extracellular matrix gene expression during wound healing of the injured rat vocal fold. <i>Otolaryngol Head Neck Surg</i> 2009;140:757-761.</li> <li>3. Ohno T, Hirano S, Rousseau B. Gene expression of transforming growth factor-b1 and hepatocyte growth factor during wound healing of injured rat vocal fold. <i>Laryngoscope</i> 2009;119:806-810.</li> <li>4. Ohno T, Hirano S, Rousseau B. Gene expression of transforming growth factor-b1 and hepatocyte growth factor during wound healing of injured rat vocal fold. <i>Laryngoscope</i> in press.</li> <li>5. Ohno T, Yoo MJ, Swanson E, Hirano S, Ossoff R. Regeneration of Aged Rat Vocal Folds using Hepatocyte Growth Factor Therapy. <i>Laryngoscope</i> 2009 in press</li> </ol>
岸本 曜	<ol style="list-style-type: none"> <li>6. Kishimoto Y, Hirano S, Kojima T, Kanemaru S, Ito J. Implant of atelocollagen sheet for the treatment of vocal fold scarring and sulcus vocalis. <i>Ann Otol Rhinol Larngol</i> in press</li> </ol>
末廣 篤	<ol style="list-style-type: none"> <li>7. Suehiro A, Hirano S, Kishimoto Y, Tanaka S, Ford CN. Comparative Study of Vocal Outcomes with Silastic vs Gore-Tex Thyroplasty. <i>Ann Otol Rhinol Larngol</i> 2009;118:405-408.</li> </ol>