

# 学位論文要約

## Adipose-derived mesenchymal stromal cells prevented rat vocal fold scarring

(脂肪由来間葉系間質細胞はラットの声帯癒痕化を予防した)

手術、外傷、炎症、放射線照射により生じる声帯癒痕は不可逆的な嗄声を引き起こす。声帯癒痕では組織学的に声帯粘膜固有層における過剰なコラーゲン沈着とヒアルロン酸の喪失を認める。この細胞外基質の分布は音声治療や外科治療では是正することができないため治療効果は限られる。成長因子、間葉系間質細胞などを用いた再生治療が試みられ細胞外基質の是正が多少認められたが、未だに最適な治療選択肢は確立されていない。その中であって細胞治療は、それ自身が細胞外基質を産生すること、成長因子を産生することが知られており有望な治療選択肢である。脂肪由来間葉系間質細胞 (Adipose-derived mesenchymal stromal cells: ASCs) は骨髄由来間葉系間質細胞に比べて増殖能が強く採取し易い特徴がある。本研究ではラット声帯損傷の直後にASCsを声帯に移植し組織変化の様子とmRNAレベルでの治療効果を検討した。

## 方法

実験には13週齢のSDラットと、GFP遺伝子組換えSDラットを用いた。ラットを麻酔し経口的に内視鏡明視下に右側の声帯粘膜を切除した。その直後に、予めGFP-SDラットの鼠径部皮下脂肪から分離培養しておいたGFP標識ASCsを懸濁した生理食塩水を声帯筋層に注入した (ASC群)。sham群には同量の生理食塩水のみを注入した。組織学的な検討として、術後3日、14日、56日時点でラットの喉頭を摘出し、薄切切片を蛍光顕微鏡で観察してGFP標識ASCsの生存の有無を検討した。また、特殊染色と画像解析ソフトでヒアルロン酸とコラーゲンの密度を算出し、統計学的に群間の差を検討した。

mRNAの発現量の検討については、術後3日、14日時点でラットの喉頭を摘出し、右側の声帯粘膜のみから全mRNAを抽出して定量的RT-PCRの手法で各細胞外基質、各成長因子に関連するmRNA量を算出した。声帯損傷を加えないnormal群を設けて比較対象の一つとし、群間の差を検討した。

## 結果

GFP標識ASCsは3日では多数組織中に確認できたが、14日、56日では確認できなかった。

14日、56日時点ではヒアルロン酸の密度がASC群で有意に高くなり、コラーゲン濃度はASC群で有意に低くなった。mRNA発現量は、3日でASC群のみがnormal群に比べて有意に*Has1*、*Has2*が多く、sham群とASC群の有意差はなかった。*Col1a1*、*Col3a1*は3日でASC群、sham群ともnormal群と比べ有意に多かった。14日ではsham群のみがnormal群と比べて有意に多くASC群はnormal群に近かった。*Mmp1*の発現量は3日でsham群がnormal群に比べて多かった。*Mmp8*の発現量はsham群がASC群とnormal群と比べて多かった。*Fgf2*、*Hgf*の発現量はASC群とsham群に3日で有意差はなかった。一方でASC群のみが14日でnormal群より多かった。

## 考 察

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、肝細胞増殖因子 (HGF) はコラーゲン産生抑制作用や強い抗線維化作用を有することで無瘢痕創傷治癒において重要な役割を持つ。mRNA発現量の解析では14日において*Fgf2*、*Hgf*がASC群のみでnormal群に比べて多かった。移植したASCsが14日以前に消失していたことを考えるとASCs自身がbFGF、HGFを産生したとは考えにくい。間葉系間質細胞は傍分泌作用により内在する細胞を活性化することが他領域で知られている。声帯に内在する細胞がASCsからの傍分泌作用を受けてbFGF、HGFを産生したと考えられる。声帯創傷治癒に関与する細胞には、マクロファージ、線維細胞、声帯線維芽細胞、筋線維芽細胞があるが、マクロファージ、線維細胞は創傷治癒の早期にのみ動員されるため、声帯線維芽細胞と筋線維芽細胞がASCsに活性化されbFGF、HGFを産生した可能性がある。

細胞外基質に関しては14日目においてASC群で*Col1a1*、*Col3a1*発現量が少なく、よりnormal群に近かった。コラゲナーゼの量を反映する*Mmp1*、*Mmp8*の発現量はASC群で少なかった。ASC群ではコラーゲン産生が少なかったためにコラゲナーゼの量も少なかったと考えられる。この結果は組織学的検討でのコラーゲン沈着の抑制を裏付けるものである。声帯粘膜固有層内のコラーゲン増加は組織を硬化させ粘膜振動を阻害することから、ASCsは細胞外基質の分布を改善し声帯の粘弾性を改善することができると考えられる。

## 結 論

移植したASCsは創傷治癒中の声帯でbFGF、HGFのmRNA発現量を増加させた。ASCsは声帯創傷治癒の過程で過剰なコラーゲン沈着を抑制した。これらの結果よりASCsは声帯瘢痕を予防する効果があると考えられた。