(第 59 回日本音声言語医学会シンポジウム：再生医療から見た音声言語医学の未来)

ヒト iPS 細胞を用いた声帯の組織再生

今泉 光雅 大森 孝一

要 約：外傷や炎症、術後に形成される声帯癒痕は治療困難な疾患である。その治療は、動物実験や臨床応用を含めて、ステロイド薬や成長因子の注入、種々の細胞や物質の移植などにより試みられているが、現在まで決定的な治療法がないのが実情である。2006 年、山中らによってマウス人工多能性幹細胞（iPS 細胞）が報告された。2007 年、山中らとウイスコンシン大学の Dr. James Thomson らは同時にヒト iPS 細胞を報告した。iPS 細胞は多分化能を有し、かつ自己由来の細胞を利用できるため声帯組織再生の細胞ソースの一つになりうると考えられる。本稿では、幹細胞を用いた声帯の組織再生について述べるとともに、ヒト iPS 細胞を、in vitro において声帯の上皮細胞に分化誘導し、声帯上皮組織再生を行った研究を紹介する。

索引用語：ヒト iPS 細胞、再生、声帯、喉頭

Vocal Fold Regeneration with Stem Cells

Mitsuyoshi Imaizumi and Koichi Omori

Abstract: Vocal fold scarring is the foremost cause of voice disorders after vocal fold injury secondary to trauma, surgical treatment, and inflammation postinfection; however, present treatment approaches are limited.

Induced pluripotent stem (iPS) cells are generated from fibroblasts through the introduction of 4 transcription factors – Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf4; and because they are obtained from patient-derived somatic cells, they can prevent transplant rejection. Therefore, iPS cells are capable of unlimited symmetrical self-renewal, thus providing a limitless cell source for tissue-engineering applications.

Vocal fold regeneration with stem cells is reviewed in this paper. We also show the feasibility of differentiating human iPS (hiPS) into stratified squamous epithelial cells for vocal fold regeneration.

Key words: human iPS cell, regeneration, vocal fold, larynx

はじめに

外傷や炎症、術後に形成される声帯癬痕は治療困難な疾患である。ステロイドや線維芽細胞増殖因子 (FGF: fibroblast growth factors) 等の成長因子の注入、さまざまな種類の体細胞や幹細胞の移植など、再生医学的アプローチを用いた治療が動物実験や臨床応用を含めて試みられている。しかしながら、現在まで決定的な治療法がないのが実情である。幹細胞は、分裂して自分と同じ細胞を作る自己複製能と、別の種類の細胞に分化する能力をもち、臨床応用が期待されている。間葉系幹細胞は、分化能や増殖能に限りがあり、胚性幹細胞は胚から作成させるため、倫理的問題と拒絶の問題がある。2006年、Yamanaka らによってマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が報告され¹⁾、2007年、山中らと同時にウイコンシン大学の Dr. James Thomson らはヒト iPS 細胞を報告した²⁾。iPS 細胞は多分化能を有し、かつ自己由来の細胞を利用できるため声帯組織再生の細胞ソースの一つになりうると思われる。本稿では幹細胞を用いた声帯の組織再生について述べる。

声帯の解剖学的特徴

喉頭粘膜の大部分は多列線毛上皮に覆われているが、声帯遊離縁および喉頭蓋喉頭面は重層扁平上皮に覆われている。声帯は組織学的には、筋と粘膜より構成されている。粘膜はさらに、粘膜上皮と粘膜固有層に分けられる。機能的には声帯は、カバー (粘膜上皮およびヒアルロン酸が豊富な粘膜固有層浅層)、声帯靱帯 (エラスチンやコラーゲンが豊富な粘膜固有層中間層および深層)、ボデイ (声帯筋) の3層に分かれている³⁾。

声帯の再生医学研究

声帯の再生医学の主な研究対象となってきたのは、声帯の術後や、外傷、炎症後に比較的容易に形成される、声帯癬痕に伴う音声障害である⁴⁾。その大きな理由が声帯癬痕に対する確立された治療法がないことが挙げられる⁵⁾。そこでは、粘膜固有層が病変の主体となるため、同部位が主な研究対象となってきたが、それとは対称的に、ここで述べるような声帯上皮に関する研究は一部であった。癬痕形成に伴い粘膜波動は阻害され、声帯上皮の欠損に伴い感染が起きたり、ハイドレーションが阻害される⁶⁾。

幹細胞を用いた声帯組織の再生医学研究

1. 間葉系幹細胞

2003年 Kanemaru らは、ラットの声帯癬痕において、間葉系幹細胞の投与が有効であることを報告し⁷⁾、2010年 Thibeault らは、ヒアルロン酸ベースのハイドロゲルに間葉系幹細胞を加え投与することにより、声帯の癬痕組織に対して有効であることを報告している⁸⁾。

2010年 Long らは、air liquid interface の培養環境に epidermal growth factor (EGF) を投与し、上皮細胞へ分化誘導する方法を報告している⁹⁾。上記方法は細胞が培養液により浸潤した状態を保ちつつ、表層の細胞が空気に触れる環境を作成することが可能であり、気道上皮が空気に触れている状態を in vitro の培養環境で再現した分化誘導方法である。

2. ES 細胞

2007年、Cedervall らは、ヒト ES 細胞を in vivo においてラビットの声帯に移植し、声帯組織への再生への可能性を言及した¹⁰⁾。

3. iPS 細胞

2006年、京都大学の Yamanaka らによってマウス iPS 細胞が誕生した¹⁾。2007年、山中らとウイコンシン大学の Dr. James Thomson らは同時にヒト iPS 細胞を報告した²⁾。iPS 細胞は多分化能を有するため、移植医療への利用が期待されている。ES 細胞と異なり、患者由来の細胞を遺伝子操作して人工的に作るため、免疫拒絶の問題が回避可能であり、かつ胚やクローン技術を使用しないため倫理的問題が発生しないとされている。

2013年、Imaizumi らはヒト iPS 細胞から声帯上皮細胞の分化誘導技術に関して報告している¹¹⁾。ヒアルロン酸ベースのハイドロゲル内にヒト iPS 細胞を包埋し、3次元的な培養環境を整えたうえで、EGF およびヒト声帯由来線維芽細胞との共培養により上皮への分化誘導を試みている。共培養モデルにおいてより効率良く上皮へ分化することが示唆されている (図1, 2)。

しかしながら上記はすべて、前臨床段階の研究報告であり、今後の臨床応用に向けてさらなる研究が必要と考えられる。

今後の展望

2014年9月、高橋政代医師をプロジェクトリーダーとする理化学研究所チームらが、患者由来の iPS 細胞

図1 組織学的評価 (文献 11 より改訂)

分化誘導をしていない iPS 細胞および培養液に EGF を加えた iPS 細胞は形態的に上皮への分化を認めなかった (A, B, C, D, E, F). 声帯由来線維芽細胞と共培養した iPS 細胞は、培養 1, 2 週間後の時点では上皮への分化は認められなかったが (G, H), 培養 4 週間後において上皮細胞の特徴といえる細胞間同士が接着する所見および核の極性が認められ、上皮細胞への分化が認められた (I). (A, B, C, D, E, F, G, H and I were stained with H E) Bars - 100 μ m

図2 免疫組織化学の手法を用いた評価 (文献 11 より改訂)

声帯上皮関連蛋白である CK13 蛋白の発現は、分化誘導をしていない iPS 細胞においては認めなかった (A, B, C). 培養液に EGF を加えた iPS 細胞および声帯由来線維芽細胞と共培養した iPS 細胞は、培養 1, 2 週間後の時点では CK13 の発現は認められなかったが (D, E, G, H), 培養 4 週間後において CK13 の発現が認められた (F, I). Bars - 100 μ m

から作製した網膜の細胞を「加齢黄斑変性」の患者に移植したことが報道された。これは、iPS細胞を用いた臨床研究を世界で初めて実施したものであり、臨床応用に対する足枷となっていた腫瘍形成という問題点が解決されつつあることを示唆する。腫瘍形成を防ぐ方法として、1) 分化誘導を完全に行う、2) フローサイトメーターを用いて、未分化な細胞の割合を評価するだけではなく、ソーティングを行い分化した細胞のみを移植する、3) ウイルスベクターを用いて作成されたものではないiPS細胞を利用する、4) 腫瘍を形成しづらいとされる細胞株を利用する、等が挙げられる。腫瘍形成を防ぐことは、将来の臨床応用に向けた今後の課題であり、さらなる研究を行っていく予定である。

結 語

iPS細胞は喉頭の再生医療における将来的な細胞ソースになりうることを報告した。

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金若手研究(B)(課題番号26861404)の助成を受けた。
利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Takahashi K and Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006.
- 2) Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al: Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318: 1917-1920, 2007.
- 3) Hirano M: Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)*, 26: 89-94, 1974.
- 4) Hansen JK and Thibeault SL: Current understanding and review of the literature: vocal fold scarring. *J Voice*, 20: 110-120, 2006.
- 5) Chhetri DK, Head C, Revazova E, et al: Lamina propria replacement therapy with cultured autologous fibroblasts for vocal fold scars. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 131: 864-870, 2004.
- 6) Leydon C, Bartlett RS, Roenneburg DA, et al: Localization of label-retaining cells in murine vocal fold epithelium. *J Speech Lang Hear Res*, 54: 1060-1066, 2011.
- 7) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, et al: Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 112: 915-920, 2003.
- 8) Johnson BQ, Fox R, Chen X, et al: Tissue regeneration of the vocal fold using bone marrow mesenchymal stem cells and synthetic extracellular matrix injections in rats. *Laryngoscope*, 120: 537-545, 2010.
- 9) Long JL, Neubauer J, Zhang Z, et al: Functional testing of a tissue-engineered vocal fold cover replacement. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 142: 438-440, 2010.
- 10) Cedervall J, Ahrlund-Richter L, Svensson B, et al: Injection of embryonic stem cells into scarred rabbit vocal folds enhances healing and improves viscoelasticity: short-term results. *Laryngoscope*, 117: 2075-2081, 2007.
- 11) Imaizumi M, Sato Y, Yang DT, et al: In vitro epithelial differentiation of human induced pluripotent stem cells for vocal fold tissue engineering. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 122: 737-747, 2013.

別刷請求先：〒960-1295 福島県福島市光が丘1
福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学講座
今泉光雅