声帯組織の維持機構

楯 谷 一 郎・平 野 滋・伊 藤 壽 一

The Maintenance Mechanism of the Vocal Fold Tissue

Ichiro Tateya, Shigeru Hirano and Juichi Ito

Key words : 声帯黄斑, ビタミンA, 細胞的マトリックス

は じ め に

声帯粘膜固有層は3層に分かれており、ヒアルロン酸が豊富な浅層がカバー、エラスチンあるいはコラーゲンが豊富な声帯靱帯と筋層がボディを形成することで振動に適したユニークな構造を有し、その前後端には黄斑が存在していることが知られている¹⁻³⁾。近年再生医療が注目を浴び様々な組織において再生が試みられ、声帯組織においても声帯溝症、声帯癒痕、加齢声帯を中心とした疾患を対象に再生医療の応用がされている^{4,5)}。しかし、再生させる対象である声帯組織がどのような機序で形作られるのか、あるいはどのように維持されているかについてはほとんど知られていないのが現状である。

声帯においては膜様部粘膜固有層にある線維芽細胞の他、黄斑にビタミンA貯留星型細胞の存在が報告されている⁶⁻⁸⁾。佐藤ら^{6,7)}の報告によりビタミンA貯留星型細胞が膜様部の細胞外マトリックスの生成に関わっている可能性が指摘されているが、電子顕微鏡以外でそれらの細胞の役割について調べた研究はほぼ皆無であった。本研究では細胞外マトリックス生成に関わるmRNA発現とビタミンAを中心に解析し、声帯組織の維持における黄斑部と膜様部の役割について調べた。

1) 黄斑と膜様部粘膜固有層における細胞外マトリックス生成能

佐藤ら⁶⁾による電子顕微鏡を使った形態学的観察から、ヒト黄斑に存在するビタミンA貯留星型細胞の細胞質には膜様部粘膜固有層に存在する線維芽細胞に比べreticular fiberなどのcollagenous fibersが豊富に含まれていることが知られており、このような知見などから声帯膜様部の粘膜固有層に存在する細胞外マトリックスは黄斑部で作られているのではないかと推察されている。しかし黄斑部と膜様部の細胞外マトリックス生成の違いを機能的に調べた報告は我々の渉猟しえた限りではなかった。そこで我々は

ラット声帯を用いて黄斑部と膜様部から組織を抽出し、それぞれの組織における代表的な細胞外マトリックスあるいはその生成酵素のmRNA発現を定量的PCR法により調べた。

生後4ヶ月の雄のSprague-Dawleyラット6匹を対象に実験を行った。ラットを安楽死させた後に喉頭を摘出し30 μ m厚の凍結切片を作成した。顕微鏡下に27G針を用いて膜様部組織と後黄斑組織を切片上から別々に採取した(図1)。これらの組織についてI型プロコラーゲン α 1鎖、III型プロコラーゲン α 1鎖、ヒアルロン酸合成酵素I、ヒアルロン酸合成酵素II、エラスチンのmRNA発現を過去に報告した方法⁹⁾で定量的RT-PCR法により解析した。宿主遺伝子としては β 2ミクログロブリン(β 2MG)を用い、発現量の比較には β 2MGとの比を用いた。

その結果、I型プロコラーゲン α 1鎖、III型プロコラーゲン α 1鎖、エラスチンのmRNA発現は黄斑部と膜様部で有意な差を認めなかったのに対し、ヒアルロン酸合成酵素I、ヒアルロン酸合成酵素IIのmRNA発現は膜様部で有

図1 ラット喉頭の水平断
後黄斑組織(MF), 声帯膜様部粘膜固有層(LP)の採取部位を示す。

図2 膜様部粘膜固有層(LP), 黄斑組織(MF)におけるI型プロコラーゲン $\alpha 1$ 鎖, III型プロコラーゲン $\alpha 1$ 鎖, エラスチン, ヒアルロン酸合成酵素1(HAS1), ヒアルロン酸合成酵素2(HAS2)のmRNA発現の比較. n.s.:有意差なし.

意に高かった(図2).

以上の結果により, 膜様部におけるヒアルロン酸合成酵素のmRNA発現が黄斑部に比べ有意に多いことが明らかとなった. 膜様部粘膜固有層の構成細胞のほとんどは線維芽細胞であることが知られている¹⁰⁾が, これらの線維芽細胞はヒアルロン酸の合成に関与して膜様部粘膜固有層の粘弾性維持に寄与している可能性が示された.

2) 黄斑におけるレチノイン酸受容体発現

次に我々はビタミンA貯留星型細胞に着目した. ビタミンA貯留星型細胞は肝臓, 肺, 腎臓, 小腸などにおいてその存在が報告されており, 組織の炎症, 再生に関わることが知られている. 前述の通り声帯においてもビタミンA貯留星型細胞が黄斑部に存在することを佐藤ら⁶⁾が世界に先駆けて報告している. その特徴としては広い細胞質と多数の細胞突起を有することに加え, ビタミンAを貯留する脂肪滴が細胞質に豊富に存在していることが挙げられ, 同様の細胞がラットの声帯黄斑にも存在することを我々は確認している¹¹⁾.

ビタミンAは様々な臓器の発生, 成長, 維持に重要な役割を果たしている¹²⁾ことが広く知られている. 声帯星型細胞においてもビタミンAが何らかの役割を果たしていることが推察されるが, 実際どのように関わっているのかは不明であった. ビタミンAが細胞内で働く際にはまず様々な酵素で代謝されてレチノイン酸になり, さらに細胞質や核に存在するレチノイン酸受容体(retinoic acid receptor: RAR)とレチノイドX受容体(RXR)に結合してRAR/RXRヘテロ二量体を作る. ヘテロ二量体は核内に移行してDNAに結合し, 遺伝子発現を調節する. 従ってビ

タミンAが組織内で働くにはその代謝産物であるレチノイン酸に対する受容体が存在することが必要である.

RARには α , β , γ の3つのサブタイプがあるが, 我々がラット声帯組織におけるレチノイン酸受容体の発現を免疫染色法により解析したところ, RAR α が声帯黄斑の星型細胞に発現していた⁸⁾(図3). ビタミンAが声帯星型細胞において何らかの働きをしていることが示唆された.

3) ビタミンA欠乏の声帯に与える影響

さらにビタミンAの声帯における働きを調べるため, ビタミンA欠乏ラットをDickmanら¹³⁾の方法に準じて作製

図3 ラット声帯黄斑の星型細胞におけるレチノイン酸受容体 α の発現(文献8より改変)

し、ビタミンA欠乏の声帯に対する影響を解析した。ラット誕生前の妊娠18日目から母ラットにビタミンA欠乏食を与え、誕生後もビタミンA欠乏食を母乳を介して与えた。乳離れ後は仔に直接ビタミンA欠乏食を与え続けた。ビタミンA欠乏により発育が止まる生後6週以降は生命の維持に必要な最小限のレチノイン酸を与えた。生後12週の時点でレチノイン酸投与を中止し、その1週後に屠殺した。血中のレチノール濃度はコントロールラットで1.91 $\mu\text{mol/L}$ 、ビタミンA欠乏ラットで0.05 $\mu\text{mol/L}$ であり、ビタミンA欠乏ラットで有意に少なかった。

これらのラットの喉頭組織を用いて、声帯の組織学的変化ならびに細胞外マトリックスのmRNA発現を解析した。結果、ビタミンA欠乏ラットにおける声帯星型細胞の細胞質はコントロールラットに比べて狭く(図4)、核/細胞質比は有意($p < 0.05$)に高かった。またビタミンA貯留脂肪滴も著明に減少していた。声帯膜様部粘膜固有層におけるヒアルロン酸、エラスチン、コラーゲンの発現をそれぞれアルシアンブルー染色、EVG染色で調べたところビタミンA欠乏ラットとコントロールラットで明らかな差は認めず、また黄斑部(図5)においても同様の結果であった。一方、黄斑部におけるビタミンA欠乏ラットとコントロールラットのmRNA発現の比較では、ビタミンA欠乏ラットでI型プロコラーゲンmRNAの発現が有意に低値であった(図6)。黄斑は振動体である声帯をその両端で固定する役割も果たしており、コラーゲンの発現が豊富で比較的硬い組織であることが知られている。黄斑の星型細胞はビタミンAを介してI型コラーゲンの

図4 正常ラット(左)とビタミンA欠乏ラット(右)の声帯黄斑における星型細胞の免疫染色像(ビメンチン)(文献8より改変)

図5 正常ラット(左)とビタミンA欠乏ラット(右)の声帯黄斑におけるI型プロコラーゲン発現(文献8より改変)
抗I型プロコラーゲン抗体により免疫染色を行い、画像を再構築したもの。コントロールラットとビタミンA欠乏ラットで、I型プロコラーゲンの発現に明らかな差を認めない。

図6 正常ラット(vitamin A sufficient rat : VAS)とビタミンA欠乏ラット(vitamin A deficient rat : VAD)の黄斑におけるmRNA発現(文献8より改変)

生成に関与し、黄斑組織の維持に寄与している可能性が示唆された。

ま と め

正常ラットでの解析では膜様部におけるヒアルロン酸合成酵素mRNAの発現が有意に高く、膜様部の線維芽細胞はヒアルロン酸の合成に関与し膜様部の粘弾性の維持に寄与している可能性が示唆された。一方、ビタミンA欠乏ラットを用いた解析では声帯粘膜固有層の細胞外マトリックスに変化はなかったものの、ビタミンA欠乏ラットにおいて声帯星型細胞の核/細胞質比が上昇し黄斑でのI型コラーゲンのmRNA発現が低下していた。粘膜固有層の線維芽細胞はヒアルロン酸合成に、黄斑の星型細胞はビタミンAを介してI型コラーゲンの生成に関わることで、それぞれヒアルロン酸が豊富で粘弾性の高い膜様部組織、相対的に硬い組織である黄斑部組織を維持している可能性が示唆された。

参 考 文 献

- 1) Hirano M : Morphological structure of the vocal cord as a vibrator and its variations. *Folia Phoniatr (Basel)* 26 (2) : 89-94, 1974.
- 2) Gray SD, Hirano M, Sato K : Molecular and cellular structure of vocal fold tissue. *Vocal fold physiology : frontiers of basic science*, In Titze IR, ed. 1-34. Singular Publishing Group, San Diego, 1993.
- 3) Tateya T, Tateya I, Bless DM : Immuno-scanning electron microscopy of collagen types I and III in human vocal fold lamina propria. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116 (2) : 156-159, 2007.
- 4) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K et al : Regeneration of the vocal fold using autologous mesenchymal stem cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112 (11) : 915-920, 2003.
- 5) Hirano S, Kishimoto Y, Suehiro A et al : Regeneration of aged vocal fold: first human case treated with fibroblast growth factor. *Laryngoscope* 118 (12) : 2254-2259, 2008.
- 6) Sato K, Hirano M, Nakashima T : Stellate cells in the human vocal fold. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110 (4) : 319-325, 2001.
- 7) Sato K, Hirano M, Nakashima T : Vitamin A-storing stellate cells in the human vocal fold. *Acta Otolaryngol* 123 (1) : 106-110, 2003.
- 8) Tateya T, Tateya I, Surles RL et al : Roles of vitamin A and macula flava in maintaining vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 117 (1) : 65-73, 2008.
- 9) Tateya I, Tateya T, Surles RL et al : Prenatal vitamin A deficiency causes laryngeal malformation in rats. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 116 (10) : 785-792, 2007.
- 10) Catten M, Gray SD, Hammond TH et al : Analysis of cellular location and concentration in vocal fold lamina propria. *Otolaryngol Head Neck Surg* 118 (5) : 663-667, 1998.
- 11) Tateya T, Tateya I, Munoz-del-Rio A et al : Postnatal development of rat vocal folds. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 115 (3) : 215-224, 2006.
- 12) Duester G : Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267 (14) : 4315-4324, 2000.
- 13) Dickman ED, Thaller C, Smith SM : Temporally-regulated retinoic acid depletion produces specific neural crest, ocular and nervous system defects. *Development* 124 (16) : 3111-3121, 1997.

別刷請求先 〒606-8507 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学医学部附属病院耳鼻咽喉科

楯谷一郎