

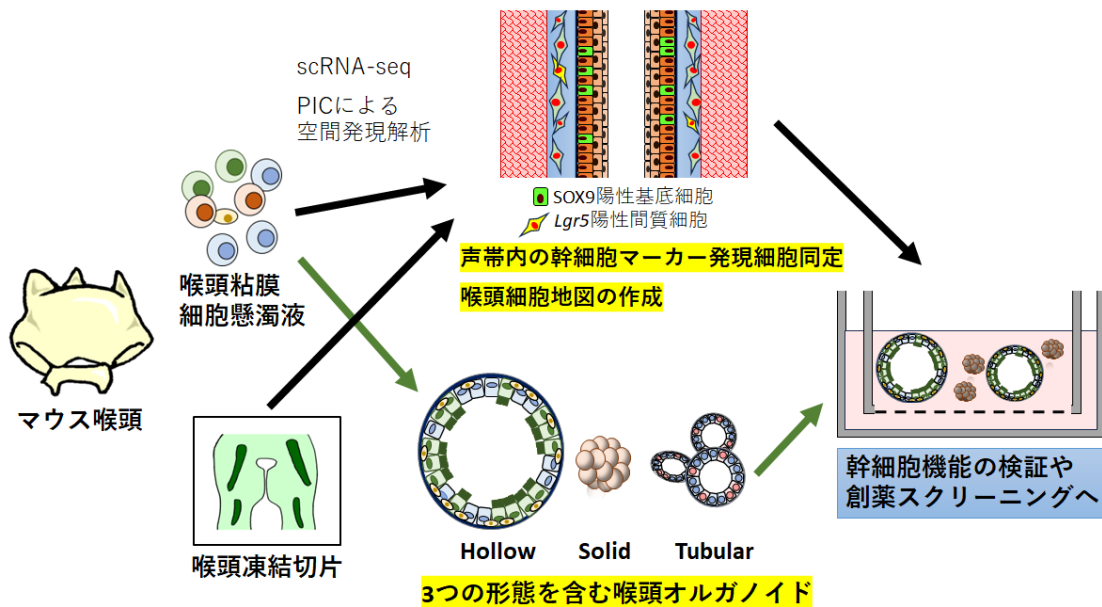
# 喉頭構成細胞の多様性とオルガノイド作製

## —声帯再生の新たな指標の発見とモデル作製—

### 概要

喉頭は呼吸、嚥下、発声という重要な機能を担っていますが、機能障害に対する根本的治療法は確立されていません。治療法開発には、指標となる正常組織の細胞組成、幹細胞を含めた恒常性維持機構の解明が必要ですが、喉頭での知見は少なく、これらの情報の集積は急務です。今回、京都大学大学院医学研究科 頭頸部腫瘍先進治療学講座 大森孝一特任教授、大西弘恵同特定講師、耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座 田村啓一博士課程学生らの研究グループは、トランスクリプトーム解析と組織学的解析を用いて喉頭各部位の上皮、上皮下間葉層を構成する細胞の多様性を明らかにし、幹細胞マーカーとして知られる SOX9-, *Lgr5*-陽性細胞が声帯に存在することを見出しました。さらに、気管(Hollow, Tubular)や食道(Solid)のオルガノイドと類似の3種類の形態を示す喉頭オルガノイドの作製にも成功しました。本研究は、正常喉頭組織に関する新たな知見と、治療法の検討に必要な培養モデルの確立により喉頭組織の治療・再生への貢献が期待されます。

本研究成果は、2026年4月7日に国際学術誌「*Nature Communications*」にオンライン掲載されました。



研究の概要図：喉頭の遺伝子発現解析から幹細胞候補を見出し、喉頭オルガノイドを作製した。

## 1. 背景

喉頭機能障害に対する根本的治療法は確立されていません。喉頭は複雑な三次元構造を持ち、内腔面を覆う上皮も重層扁平上皮(注 1)と気道上皮(注 2)が入り混じっていることから、治療法開発に必要な正常組織での細胞分布と各細胞の遺伝子発現の差異などの情報が不足しています。他施設からも scRNA-seq(注 3)の報告はあるものの、組織学的裏付けは十分ではなく、特に声帯特異的幹細胞から組織を構成する細胞を適宜作り出し、組織を維持しているメカニズムに関する知見も必要でした。また、得られた知見を検証し制御メカニズムを解明するための適切な培養モデルも確立されていませんでした。

## 2. 研究手法・成果

まず、喉頭組織にどのような細胞がどの部分に存在するかの地図作りを目指しました。マウスの喉頭粘膜の細胞をばらばらにし、scRNA-seqにより、どのような遺伝子発現を持つ細胞がどのような割合で存在するか検討しました。分泌細胞(注 4)および間質細胞(注 5)は遺伝子発現の異なる複数のグループに分かれることがわかりました。組織学的解析により、これらの各グループの細胞は喉頭組織内での存在場所も異なることが示されました。この解析データを用いた既知の幹細胞マーカーの発現解析により、声帯重層扁平上皮の基底細胞層(注 6)に SOX9(注 7)陽性基底細胞が存在することも確認されました。SOX9 陽性基底細胞は声帯基底細胞内のごく一部に限局しており、基底細胞内で特異的な機能を担う可能性が推測されました。

次に、マウス喉頭の凍結切片を photo-isolation chemistry (PIC: 注 8)により解析し、喉頭粘膜上皮層の各部位における遺伝子発現を評価し、組織学的検証を行いました。その結果、声帯粘膜下間葉層に *Lgr5*(注 9)陽性細胞が点在していることが明らかとなりました。*Lgr5* 陽性細胞は様々な臓器で幹細胞として働いているので、喉頭間葉層でも幹細胞として働いている可能性が考えられます。肺では組織が障害された際に、幹細胞を働かせるためのニッチ(注 10)として機能するという報告があるので、喉頭でも同様に幹細胞ニッチとして機能する可能性も考えられました。

さらにマウス喉頭粘膜を単一細胞化し、ゲルの中に埋め込んだ状態で、培地に浸して培養することにより、喉頭オルガノイドを作製しました。作製されたオルガノイドには、気管オルガノイドで見られる Hollow タイプ(大きな袋状の中空型)、Tubular タイプ(ブドウの房のように分岐した管状型)と食道オルガノイドで見られる Solid タイプ(小さな細胞塊の充実型)、の 3 タイプが含まれていました。さらに、喉頭に存在する気道上皮、重層扁平上皮、粘膜下腺上皮に相当するオルガノイドが存在することも、複数のマーカー発現パターンにより確認されました。これで、SOX9 陽性基底細胞や *Lgr5* 陽性細胞の機能を調べるためのツールも開発されたこととなります。

## 3. 波及効果、今後の予定

喉頭全体には複数のタイプの分泌細胞や間質細胞が存在して、それぞれ違う場所で働いていることが明らかになりました。これらの細胞の機能を知ることで喉頭各部位の機能がどのように維持されているか理解できる可能性があります。また、今まで報告が無かった声帯内の SOX9 陽性基底細胞や *Lgr5* 陽性細胞の存在が明らかになり、声帯の幹細胞や組織を維持するためのメカニズムを探る足がかりが得られました。そして、これらの機能を解明するために必要な培養モデルである喉頭オルガノイドの作製に成功しました。

今後、喉頭オルガノイドの性質をより詳しく調べ、より使いやすく改善することで、創薬スクリーニングにも利用できる可能性があります。

#### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、京都大学医学研究科、頭頸部腫瘍先進治療学講座/耳鼻咽喉科・頭頸部外科、頭頸部腫瘍プロジェクトおよび、京都大学学内ファンド[いしずえ 2023]の支援を受けて実施されました。

研究機関：京都大学大学院医学研究科 頭頸部腫瘍先進治療学講座、同耳鼻咽喉科・頭頸部外科、京都大学大学院医学研究科附属 総合解剖センター 電子顕微鏡室、熊本大学 生命資源研究支援センター、九州大学、生体防御医学研究所、京都大学医学部附属病院 先端医療研究開発機構

#### <用語解説>

##### 注1：重層扁平上皮

平べったく、何層も重なった上皮。バリア機能が強く摩擦やこすれ等のダメージを受けやすい場所に分布。

##### 注2：気道上皮

線毛(長い毛)の生えた細胞や粘液を分泌する細胞があって、外から来た異物を粘液で絡め取り、線毛運動で外へ掃き出す。気道に存在して異物を外に排出する機能を持っている。

##### 注3：scRNA-seq

Single cell RNA sequencing の略。組織を作っている細胞をばらばらにし、一つ一つの細胞の遺伝子発現を検出する技術。

##### 注4：分泌細胞

気道上皮に含まれる、粘液や抗菌物質を分泌する細胞。

##### 注5：間質細胞

固有組織の間を埋める細胞。上皮などに存在し、線維芽細胞など細胞外マトリクスを産生するなどして支持組織を構成する細胞群。幹細胞様の性質をもつものなど多様性があることが知られてきている。

##### 注6：基底細胞層

多層の上皮の一番基底膜寄りにある細胞群で、組織幹細胞としての役割を持つ。以前は一様と考えられていたが、遺伝子発現とそれに基づく機能に多様性があることが知られてきている。

##### 注7：SOX9

臓器および骨格の発達に関与する転写制御因子であり、軟骨形成や精巣分化に関する機能が着目されている。肺や食道などで基底細胞での発現が報告されている。

##### 注8：photo-isolation chemistry (PIC)

共著者の大川、沖らが開発した技術で、顕微鏡下で光照射した微小部の遺伝子発現のみを検出できる技術。

##### 注9：Lgr5

小腸で幹細胞マーカーとして同定されたタンパク質で、大腸などでも幹細胞に発現している。最近ではがん幹細胞にも発現の報告があり、肺胞では Lgr5 陽性の間質細胞がニッチとして機能するという報告がある

#### **注 10：ニッチ**

幹細胞が自己複製能や分化能を維持するために必要な環境。支持細胞やシグナル分子、細胞外マトリクスなどで形成される。

#### **<研究者のコメント>**

喉頭の声帯粘膜は発声時の振動に重要で、外傷や頭頸部腫瘍切除後に再生しにくく、生活の質に大きな影響を与えます。私たちは 2000 年から喉頭・気管の再生医療に取り組んできましたが、今回、声帯粘膜の幹細胞候補を見出しました。この発見を足がかりに、失われた「声」の回復につながる新たな治療法の実現を目指していきたいと思います。(大森 孝一)

#### **<論文タイトルと著者>**

タイトル：Identification of stem cell marker-positive subpopulations in the vocal fold of the larynx through transcriptomic analyses (トランスクリプトーム解析による喉頭声帯内の幹細胞マーカー陽性細胞亜集団の同定)

著者：田村 啓一、大西 弘恵、長谷部 孝毅、藤村 真太郎、勝野 達也、鄒 兆南、沖 真弥、大川 恭行、森田 智視、大森孝一

掲載誌：Nature Communications (2024 Impact Factor 15.7)

DOI：10.1038/s41467-026-71514-9