

令和元年6月21日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11239

研究課題名(和文)より均一な口腔粘膜上皮前駆/幹細胞による凍結培養粘膜の開発

研究課題名(英文)Development of the freeze culture mucosa due to more uniform oral mucosa epithelium preceding / stem cells

研究代表者

小山 貴寛 (Koyama, Takahiro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30444178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：より均一な口腔粘膜上皮前駆/幹細胞による凍結培養粘膜の開発のため、フィルタリングとmagnetic cell sorting(MACS)を行った細胞を凍結保存したのちに、培養粘膜の作成を行い評価を行う予定であった。しかしながら口腔粘膜上皮細胞の培養が困難となり、成長因子の変更が必要とされた。成長因子をhuman keratinocyte growth supplement-V2をHKGSへ変更し、同様の培養粘膜の作製が可能となるかの検討が必要となった。その結果、成長因子変更後も同様の培養口腔粘膜の作製が可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成長因子変更後もフィルタリング後の均一な培養上皮細胞による凍結培養粘膜の作製が可能であった。作製方法の変更によっても、同様の培養口腔粘膜の作製が可能であることが確認された。このことから同方法で、さらなる均一な細胞の選択法の検討が可能になるものと考えられる。動物への移植を行うための培養口腔粘膜の作成が可能となったことから、より臨床に向けた研究が可能となったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：After having cryopreserved the cells which we performed filtering and magnetic cell sorting(MACS) in for the development of the freeze culture mucosa due to more uniform oral mucosa epithelium outrider / stem cells, we made the culture mucosa and were going to evaluate it. However, the culture of oral mucosa epithelial cells became difficult, and the change of growth factors was required. We changed human keratinocyte growth supplement-V2 by growth factors to HKGS, and the examination that the manufacture of similar culture mucosa was enabled was required. As a result, it was confirmed after growth factors change that manufacture of similar culture oral mucosa was possible.

研究分野：外科系歯学

キーワード：組織工学 凍結培養粘膜 口腔粘膜前駆/幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私たちは米国ミシガン大学口腔外科、形成外科との共同研究で、培養上皮シート (Luca M, et al. Transplant 1990, Ueda M, et al. OS OM OP 1998, Lauer G, J Craniomaxillofac Surg 1994) の問題点を解決した培養複合口腔粘膜 (以下 EVPOME) を開発した (Izumi K, J Oral Maxillofac Surg 1999)。その特徴として、

- (1) 組織学的に上皮層と真皮層を有し、口腔粘膜組織に類似している
- (2) 動物由来血清やマウス細胞の feeder layer を使用しないため、未知の生物等による感染のリスクが少なく、安全性が高い
- (3) 真皮層として AlloDerm® を使用することで、強度的に優れ、操作性が良い

が挙げられ、その有用性についてもこれまで私たちは報告してきた (Yoshizawa M, J Oral Maxillofac Surg 2004, Yoshizawa M, Koyama T, J Oral Maxillofac Surg, 2011)。

新潟大学では、2000年に新潟大学歯学部倫理委員会で承認を得て、口腔がんおよび前がん病変に対し臨床応用を開始し (Izumi K, Yoshizawa M, Int J Oral Maxillofac Surg 2003)、2002年度から2004年には文部科学省高度先進医療開発経費の援助を受け、神戸大学、富山大学と EVPOME 移植の適応拡大を目的とした共同研究をすすめ、現在までに100例以上の EVPOME 移植を行い、臨床的にも良好な結果を得ている。

しかしながら、従来の方法では移植材作製のための組織片採取から手術までの期間が3~4週間に限定されることになり、また複数回の手術にも対応できなかった。この問題点を解決するため、代表者は、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製に関する研究を行い、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製が可能であることが示された。一方で生体内に移植した時の治癒機転は通常の培養口腔粘膜も概ね同様であったが、凍結 EVPOME に比べて EVPOME では血管新生が顕著であり、凍結 EVPOME の粘膜再生能が EVPOME よりも劣る可能性が示唆された。

(小山貴寛. 口科誌 54: 253-263, 2005, 科学研究費補助金 H19 - 21)。

また、顎顔面口腔外科領域では、口唇口蓋裂などの奇形、腫瘍などの疾患に対しては、複数回にわたる手術が必要となり、なおかつ治療期間が長期にわたることが多い。例えば、口唇口蓋裂患者の場合、初回手術の際に採取した粘膜組織から得た粘膜細胞を用いて、5年後に予定される口蓋閉鎖術時の粘膜再建材料を作製するためには、単離した細胞を5年間という長期間凍結保存を行う必要性が生じる。これまでの研究から1年間の凍結保存後の細胞においては活性の低下はほとんど認めてはいないが、より長期間の凍結保存によって細胞活性が低下することは否めない。そのため、今後臨床応用を行っていくためには、高い粘膜再生能を有する凍結 EVPOME の作製が必要であることから、増殖能が高い均一な細胞集団、つまり口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団を選別し、その細胞を凍結保存した後に凍結 EVPOME を作製することが必要と考えた。そのために私たちは、細胞の大きさが20µm以下の口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団をナイロンメッシュ法 (Fujimori Y, JDS, 2009・Izumi K, JDR, 2007) を用いて選別し、その細胞を1~2か月間凍結保存し解凍後に EVPOME を作製し、in vitro、in vivo の両面からその粘膜再生能および再生機構を評価するための研究を行ってきた。しかしながら現在までのところ、従来の方法のものと比較して治癒機転に大きな差が認められないことが示唆されている。この結果から、ナイロンメッシュ法では細胞の大きさのみに頼った選別となっており、どのような性質を持った細胞が得られているかは不明であることから、より厳密な細胞の選別が必要と考えられる。(科学研究費補助金若手研究(B)22791964 小山貴寛 H22-23・基盤研究(C)24593051 H24-26)

これまでの研究から、本研究では細胞の大きさのみに頼ったナイロンメッシュ法では不均一な口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団しか選別できなかったと考えられたため、増殖能が高いより均一な口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団を、細胞マーカーを用いる magnetic cell sorting (MACS) (Formanek M, EAO, 1998) を用いて CD34+・CD71+・CD90+ の上皮細胞を選別し、また、その細胞を凍結保存した後に凍結 EVPOME を作製し、高い増殖能を有すると考えられる凍結 EVPOME についてフラスコ内で作製した状態と生体内移植後の変化、つまり in vitro、in vivo の両面からその粘膜再生能および再生機構を評価する。

### 2. 研究の目的

ヒト口腔粘膜より上皮細胞を培養し、その不均一な細胞集団より magnetic cell sorting (MACS) (Formanek M, EAO, 1998) とわれわれが開発した手法 (Fujimori Y, JDS, 2009・Izumi K, JDR, 2007) を用いて口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団を選別し、その細胞を1、3、6、12、24か月間凍結保存し EVPOME を作製する。そして従来の方法で培養した細胞集団より作製した凍結 EVPOME とその増殖能と分化能を組織学的、免疫組織学的に比較検討する。さらに両者の生体内移植後の変化を評価するために、これまで用いてきた皮下移植モデルと口腔内移植モデルより、移植後の変化を組織学的、免疫組織学的に検索し、その粘膜再生能を比較、検討することで、口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団を用いて作製した凍結 EVPOME の粘膜再生能とその治癒機転を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 材料

実験には新潟大学医歯学総合病院口腔外科において、同意が得られた患者の口腔外科小手術時に余剰となったヒト正常口腔粘膜を使用した

### 上皮細胞の培養方法

上皮細胞の培養は、Izumi ら (IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999) の方法に準じて行った。細胞培養用の培地は、カルシウム濃度が 0.06mM の EpiLife に human keratinocyte growth supplement-V2 と HKGS、penicillin/streptomycin/amphotericin solution、(Cascade Biologics, Portland, OR, USA) を使用した。T-25 フラスコ (Corning, NY, USA) に上皮細胞を播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。培地の交換は 2 日毎に行い、80%コンフルエントになった時点で継代を行った。フィルタリングを行う細胞はセルストレイナー® (20 μm) (BD Falcon) を用いて、継代の際に行った。

### 凍結保存および解凍方法

1 回目の継代の際に、凍結保存を行う細胞と非凍結細胞で EVPOME を作製する細胞の 2 群に分けた。凍結保存液には、凍害防止剤として 10%ジメチルスルホキシド(以下 DMSO)含有で、無血清タイプのバンバンカー® (日本ジェネティクス、東京) を用いた。-80℃ で 6 か月間凍結保存を行った。凍結保存後、培養細胞を 37℃ 恒温槽中の温水中で急速解凍し、凍結保存液を除くため、低 Ca 培地を加えて希釈し、解凍後の培養細胞 (以下凍結培養細胞) を遠心洗浄した。その後、凍結培養細胞を 5ml の低 Ca 培地に懸濁し T-25 フラスコに播種して再度培養を開始した。80%コンフルエントになった時点で培養粘膜を作製した。

### EVPOME の作製

Izumi ら (IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999) の方法に準じて、凍結培養細胞を用いて培養複合口腔粘膜を作製した。対照として培養細胞を用いた培養粘膜を作製した。Type コラーゲン (BD biosciences) でコーティング後の AlloDerm® 上に、 $1.25 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> の細胞を播種した。この際、カルシウム濃度を 1.2mM に増加させた EpiLife を用いた。凍結培養細胞を用いた培養粘膜と培養粘膜を、細胞播種後 4 日間は培地に浸漬した状態で、その後 2 週間は air-liquid interface の状況下で培養を行った。

### 培養細胞の形態評価・作製した EVPOME の評価

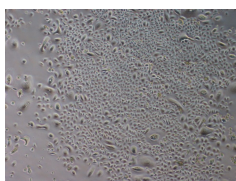
培養した細胞の形態につき肉眼的に評価する。作製した EVPOME を組織学的 (ヘマトキシリン - エオジン染色)、免疫組織学的 (PCNA) に評価する。

## 4. 研究成果

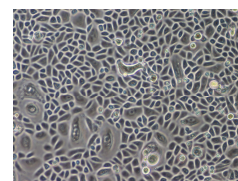
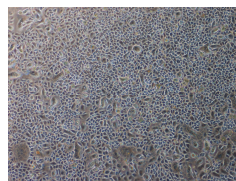
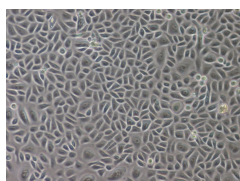
培地中の成長因子として human keratinocyte growth supplement-V2 を用いた場合に、培養が行えない状況となったため HKGS を用いて同等の結果が得られるかを追加検討した。

### 細胞の形態

human keratinocyte growth supplement-V2



HKGS

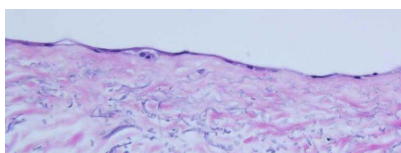


成長因子を human keratinocyte growth supplement-V2 から HKGS に変更した場合でも同様の細胞の成長が確認された。

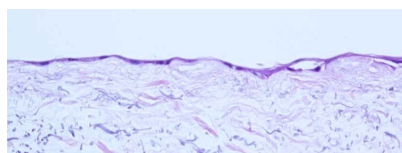
### H-E 染色

human keratinocyte growth supplement-V2

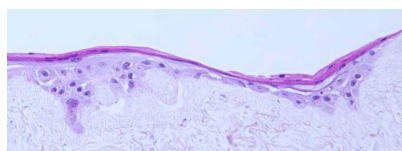
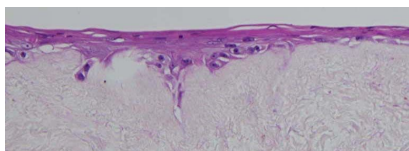
Day4



HKGS

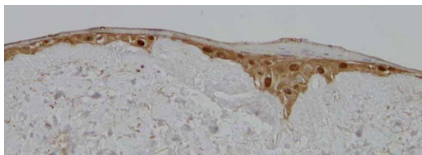


Day11



成長因子を human keratinocyte growth supplement-V2 から HKGS に変更した場合でも同様の培養粘膜の作製が可能であることが確認された。

PCNA による免疫組織化学  
human keratinocyte growth supplement-V2  
Day11



HKGS



成長因子を human keratinocyte growth supplement-V2 から HKGS に変更した場合でも同様の細胞活性を持つ培養粘膜の作製が可能であることが確認された。

以上のことから、成長因子を human keratinocyte growth supplement-V2 から HKGS に変更した場合でも、同様に凍結保存後の細胞を用いた培養複合口腔粘膜の作製が可能であることが確認された。

今後はより臨床の状態に近いマウス口腔内移植モデルでの検討を行うことで、臨床応用への応用が可能となると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等 なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：芳澤 享子

ローマ字氏名：Yoshizawa Michiko

所属研究機関名：松本歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 60303137

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。