

平成21年 6月12日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592192

研究課題名（和文） 羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用

研究課題名（英文） Clinical use of cultured oral epithelial cells sheet on amniotic membrane

研究代表者

金村 成智 (KANAMURA NARISATO)

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：70204542

研究成果の概要：われわれは羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートを用いた新たな再生医療的手術療法の確立を目指し、同シートの臨床応用を行った。口腔外科手術予定患者より口腔粘膜上皮細胞を採取し、羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートを作成し、手術後の粘膜上皮欠損部へ自家移植した。結果、同シートは拒絶反応や感染など異常所見なく生着し、経過は良好である。羊膜上培養口腔粘膜上皮シートは、粘膜上皮再建に有用なものとなりうることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,100,000	0	1,100,000
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	690,000	4,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科一般（含病態検査学）

1. 研究開始当初の背景

歯科口腔外科領域では、口腔前庭拡張術や腫瘍切除後の口腔再建術などに自家粘膜移植が行われている。その際の自家口腔粘膜は、移植片として採取できる粘膜の量に限りがあるため、やむなく皮膚移植が行われることがある。しかしながら、移植片が皮膚であるために皮膚特有症状の現象がみられ、これに伴う感染、異臭発生等の随伴症状が長年に渡り後遺することになる。それらは患者に対して不快かつ不可避なものであり、口腔再建における重要な課題となっている。

近年、患者の口腔粘膜上皮細胞を採取し、生体外で増殖・分化させ培養口腔粘膜上皮を作製し自己移植する報告が散見される。そこで、われわれは、羊膜を基質とした口腔粘膜上皮細胞の培養を行い、培養口腔粘膜上皮シートの作成が可能であることを確認した。この羊膜とは、胎盤の最表層を覆う薄膜で、免疫学的に胎児を母体から隔離する特異な機序が存在する。分娩後に胎盤よりほぼ無菌的に採取され、胎盤は分娩後に通常廃棄される組織であるため倫理的、技術的に入手が容易である。羊膜組織中には多機能幹細胞が含ま

れている可能性があり、さらには血管成分を含まないため、移植後の免疫反応を軽減することが可能であるという大きな利点がある。これまでに各種細胞の培養基質として適し、抗炎症作用、感染抑制作用、癒着抑制作用などを有することより、生物学的材料として皮膚移植、膺形成術、腹部手術の際の癒着・癒着防止、皮膚熱傷後などの創部の被覆による上皮修復促進、さらには眼表面の再建などの手術療法に用いられ、高い有用性および有効性が報告されてきた。

今回、われわれは各種の口腔粘膜上皮欠損を有した患者に対して、羊膜を基質とした培養自己口腔粘膜上皮シートを用いた手術療法を試み、かつ自家粘膜移植や皮膚移植に代替される新たな自己移植材料としての臨床応用を行った。

2. 研究の目的

組織再生において細胞増殖を誘導するためには、基質が重要なファクターである。そこでわれわれは、生体材料である羊膜に注目し、培養基質に用いた。本来、羊膜には様々な免疫学的特徴により抗炎症作用、感染抑制作用等を有し、各種細胞の培養基底膜として適し、他の組織にはない特徴を備えている。この羊膜の有用性に注目し、移植に耐えうる十分な強度と活性を備えた培養シートを作成し、口腔粘膜の再生に用いることで新たな再生医療的手術療法の確立を目指すことを目的とする。

なお、羊膜上培養口腔粘膜上皮シートの臨床応用については、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の承認（平成17年7月1日付）を受けている。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者

歯科口腔外科手術後における口腔粘膜欠損、外科的補綴前処置、各種難治性口腔粘膜疾患を有した患者（7名）とした。年齢については成人以上に限り、口腔内悪性腫瘍疾患罹患患者は対象外とした。

なお、研究対象者には羊膜および自己の口腔粘膜を用いた治療法の有用性、安全性および考えられる結果について十分な説明を行った上で、本術式を選択して頂き、文書により同意を得た。

(2) 方法

①羊膜の採取・保存

帝王切開予定の妊婦から羊膜を採取した。羊膜提供者は、全身的に合併症のない帝王切

開予定の妊婦で、3ヶ月以内の血清検査で感染症（B型・C型肝炎、梅毒、ヒト免疫不全ウイルス、クロイツフェルト・ヤコブ病、ウエストナイル熱など）が陰性であるものとした。帝王切開時に取り出された胎盤から無菌的に羊膜を採取し、洗浄後、保存液中にて冷凍保存し研究に供した。

なお、対象となる妊婦に対してわれわれの研究内容、羊膜採取にあたっての安全性について十分な文書を用いた説明を行った上で、文書による同意を得た。羊膜の臨床使用に際しては、平成17年7月1日付けにて京都府立医科大学医学倫理審査委員会にて許可を受けている。

②口腔粘膜の採取

研究対象者より、局所麻酔下に3×3mmの口腔粘膜を採取し研究に供した。

③口腔粘膜上皮細胞の羊膜上培養

採取した粘膜片は、抗菌薬添加PBS(-)中にて洗浄後、ディスペーゼ処理を行い、上皮組織を真皮および粘膜固有組織より剥離した。次に剥離した上皮片はトリプシン-EDTAにて処理、遠心分離（1000rpm、5分間）を行い、上皮細胞を分離した。そして細胞密度が 1×10^5 cells/cm²になるように調整後、あらかじめセルカルチャーインサート上に静置した羊膜上に播種した。そしてMMC処理にて増殖活性を抑制した3T3細胞と約2週間の共培養を行った。培地には、自己血清、インシュリン、EGF、抗菌薬を含む標準的な口腔粘膜上皮培養液を用いた。

④組織学的観察

作成した羊膜上培養口腔粘膜上皮細胞は凍結切片とし、ヘマトキシリン-エオジン（H-E）染色し、鏡検を行った。

⑤免疫組織化学的観察

分化、重層化を示した羊膜上培養口腔粘膜上皮細胞は、keratin 4/13、integrin alpha 6、laminin (alpha5-chain)の局在について蛍光抗体染色法を用いて検索を行った。

⑥羊膜上培養上皮シートの臨床応用

研究対象者の手術後の口腔粘膜上皮欠損部位に羊膜上培養自己口腔粘膜上皮シートを羊膜ごと7-0ナイロン糸で縫合固定を行い、自家移植した。術後1週間の時点で抜糸した。

4. 研究成果

臨床応用に先立って、実験動物（白色家兎）を用いて培養上皮シートの自家移植後の組織動態について検討したところ、移植後2週

間にて口腔粘膜上皮欠損部に生着しており、免疫組織化学的に、keratin 4/13、integrin alpha 6、laminin(alpha5-chain) および type III collagen の発現を認めたことで、羊膜上培養口腔粘膜上皮シートは、移植後において粘膜としての性質を持ち、基底膜成分を再生することがわかった。

同結果をもとに、同培養上皮シートの臨床応用を開始した。口腔粘膜上皮細胞は羊膜上にて 5~7 層に重層化しており、免疫染色性では、粘膜分化型 keratin 4/13 および、基底膜構成成分である integrin alpha 6、laminin (alpha5-chain) の発現も認めた。

自家移植においては、自家移植全例において、術中における培養上皮シートの強度や操作性に問題なく、術後において移植部位における拒絶反応や感染など異常所見なく生着し、新しい粘膜上皮が獲得された。また、術後 1 年以上経過した症例 (3 症例) においても病変の再発や組織拘縮を認めず経過は極めて良好である。

羊膜の有用性に注目し、移植に耐えうる十分な強度と活性を備えた培養シートを作成、口腔組織の再生に用いることは今までに見られなかった試みである。また自己細胞を用いることで免疫拒絶を起こさず、また培養上皮移植は広範囲な粘膜上皮欠損などにおいても十分に対応できる可能性があり、臨床的意義が極めて高い。

従って、各種上皮層創傷を取り扱うことが多い歯科口腔外科領域において、本方法は応用範囲が広い有効な方法と考えられた。今後さらに症例重ね、研究成果の蓄積により、臨床応用の幅をさらに広げるだけでなく、これまでにない新たな治療手段となりうるものと期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Takeshi Amemiya, Autologous transplantation of cultivated oral epithelial cell sheets on human amniotic membrane, *China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 6, 44, 平成 20 年 (2008), 査読有.
- ② Toshiro Yamamoto, Takeshi Amemiya, Akira Nakanishi, Takahiro Nakamura, Shigeru Kinoshita, Narisato Kanamura, Usefulness for a cultured human oral epithelial cell sheet on human amniotic membrane following removal of minor salivary gland tumor surgery, *J Oral*

Tissue Engin, 5, 54-58, 平成 19 年 (2007), 査読有.

- ③ 山本俊郎, 雨宮傑, 林誠司, 中村隆宏, 木下茂, 金村成智, 白板症切除術後にヒト羊膜上自己培養口腔粘膜上皮シートを応用した 1 例, *近畿北陸歯科医学会雑誌*, 59, 31-33, 平成 19 年 (2007), 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Takeshi Amemiya, Oral mucosal reconstruction using autologous cultured oral epithelial sheets, 86th General Session and Exhibition of the International Associations for Dental Research (IADR), 平成 20 年 7 月 3 日, Toronto, Canada.
- ② Takeshi Amemiya, Autologous transplantation of cultivated oral epithelial cell sheets on human amniotic membrane, 12th International Congress on Oral Cancer in conjunction with 24th Congress of the International College for Maxillo-Facial-Surgery (ICMFS) (former IAMFS), 平成 20 年 5 月 25 日, Shanghai, China.
- ③ 足立圭司, 羊膜を用いた培養口腔粘膜上皮シートによる口腔粘膜の再生, 第 62 回日本口腔科学会学術集会, 平成 20 年 4 月 17 日, 福岡.
- ④ Takeshi Amemiya, Oral epithelial cell sheets using amniotic membrane for oral mucosal reconstruction, *Tissue Engineering International & Regenerative Medicine Society Asia-Pacific Chapter Meeting 2007 (TERMIS-AP 2007)*, 平成 19 年 12 月 3 日, 東京.
- ⑤ Takeshi Amemiya, Transplant of cultivated oral mucosal epithelial cell sheets using amniotic membrane, American Associate of Oral Maxillofacial Surgeons 89th Annual Meeting, Scientific Sessions and Exhibition in conjunction with the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons and the Korean Associate of Oral and Maxillofacial Surgeons, 平成 19 年 10 月 11 日, Honolulu, USA.
- ⑥ 雨宮傑, 羊膜上口腔粘膜上皮細胞の培養および自家移植に関する研究, 第 52 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 平成 19 年 9 月 29 日, 愛知.
- ⑦ 足立圭司, 多形性腺腫に対して培養口腔粘膜上皮シートを応用した 1 例, 第 38 回日

本口腔外科学会近畿地方会、平成 19 年 6 月 16 日、大阪。

⑧ Takeshi Amemiya, Transplantation of cultivated autologous oral epithelial cells using amniotic membrane, 85th General Session and Exhibition of the International Associations for Dental Research (IADR), 平成 19 年 3 月 22 日, New Orleans, USA.

⑨ Takeshi Amemiya, Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells using amniotic membrane: a rabbit experiment, The 7th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, 平成 18 年 11 月 6 日, Hong Kong, China.

⑩ 雨宮 傑、羊膜上での家兎口腔粘膜上皮細胞の培養および自家移植に関する研究、第 4 回日本再生歯科医学会学術大会、平成 18 年 9 月 10 日、大阪。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 成智 (KANAMURA NARISATO)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口腔科学・准教授
研究者番号：70204542

(2) 研究分担者

山本 俊郎 (YAMAMOTO TOSHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口腔科学・助教
研究者番号：40347472

雨宮 傑 (AMEMIYA TAKESHI)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口腔科学・助教
研究者番号：90398389

足立 圭司 (ADACHI KEIJI)
京都府立医科大学・医学研究科・歯科口腔科学・助教
研究者番号：70457951

口唇腫瘍の発生は、口腔上皮細胞の増殖と分化の異常によるものである。口腔上皮細胞の増殖と分化は、上皮幹細胞の存在と分化能の維持に依存している。口腔上皮幹細胞は、口腔粘膜の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。本研究では、自家培養された口腔上皮幹細胞を用いて、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。

本研究では、自家培養された口腔上皮幹細胞を用いて、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、自家培養された口腔上皮幹細胞の増殖と分化を、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムと関連づけて解析する。

自家培養された口腔上皮幹細胞は、口腔粘膜の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。本研究では、自家培養された口腔上皮幹細胞を用いて、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、自家培養された口腔上皮幹細胞の増殖と分化を、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムと関連づけて解析する。

自家培養された口腔上皮幹細胞は、口腔粘膜の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。本研究では、自家培養された口腔上皮幹細胞を用いて、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、自家培養された口腔上皮幹細胞の増殖と分化を、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムと関連づけて解析する。

自家培養された口腔上皮幹細胞は、口腔粘膜の恒常性を維持するために重要な役割を果たしている。本研究では、自家培養された口腔上皮幹細胞を用いて、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムを明らかにすることを目的とする。具体的には、自家培養された口腔上皮幹細胞の増殖と分化を、口腔上皮腫瘍の発生メカニズムと関連づけて解析する。

8. 主たる論文著者
研究代表者、研究分担者及び共同著者
(順不同)

① Takeshi Amemiya, Transplantation of cultivated oral epithelial cell sheets on human amniotic membrane, *China Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 6, 44, 平成 20 年 (2008), 査読有り

② Toshiro Yamamoto, Takeshi Amemiya, Akira Nakanishi, Takahiro Nakamura, Shigoru Kinoshita, Narisato Kanamura, Usefulness for a cultured human oral epithelial cell sheet on human amniotic membrane following removal of minor salivary gland tumor surgery. *J Oral*