

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007~2009  
 課題番号： 19791499  
 研究課題名 (和文) 凍結培養細胞を用いた培養複合口腔粘膜の治癒機転を解明する  
 研究課題名 (英文) An elucidated study of the healing process by used *ex vivo* produced oral mucosa equivalent by cryopreserved oral keratinocytes.  
 研究代表者  
 小山 貴寛 (KOYAMA TAKAHIRO)  
 新潟大学・医歯学総合病院・医員  
 研究者番号： 30444178

## 研究成果の概要 (和文)：

凍結培養細胞を用いた培養複合口腔粘膜 (凍結 EVPOME) の治癒機転を解明するため、ヌードマウス背部皮下に、凍結 EVPOME と通常の EVPOME 移植を行い、移植後 1、7、14、21、28 日目に検体を採取し、組織学的に評価を行った。移植後 14 日目で移植された EVPOME の状態・血管数で 2 群間に差を認めたものの、28 日目には 2 群間の差は認められず、同様の治癒機転が起こっていることが示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

The aim of this study was to elucidate the process of healing after transplanted human *ex vivo*-produced oral mucosa equivalents by cryopreserved oral keratinocytes (frozen EVPOMEs). Normal EVPOMEs, by not cryopreserved oral keratinocytes, was used as a control. Two groups of EVPOMEs were transplanted into the back of nude mice. Mice were killed on days 1, 7, 14, 21, and 28 posttransplantation. The healing process of the transplanted EVPOMEs was evaluated with histologically. There were differences of the vessel density and of the epithelial stratification between two groups on 14 days posttransplantation. However, There were no difference between two groups on 28 days posttransplantation. The results of this study were indicated that two groups of EVPOMEs was same process of healing posttransplantation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

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： (1) 組織工学 (2) 口腔粘膜上皮細胞 (3) 凍結保存  
 (4) 治癒機転

## 1. 研究開始当初の背景

従来の皮膚移植・人工真皮に変わる材料として、顎顔面口腔領域でも再生医療の基礎研

究や臨床研究が盛んに行なわれてきている。皮膚の分野では、1975年にGreenらによってBell型培養人工皮膚が開発されて以来、ティッシュエンジニアリングによる培養皮膚が広範の火傷治療に使用されるなど、比較的早期に臨床応用されてきた。この培養皮膚の手法を基礎として、現在まで口腔粘膜の再生も同様に開発、研究がなされてきている。応募者の共同研究者が米国ミシガン大学口腔外科、形成外科との共同研究で開発した培養複合口腔粘膜(ex-vivo produced oral mucosa equivalent;以下 EVPOMEと略す)は、ヒト培養口腔粘膜上皮細胞とヒト新鮮屍体真皮であるAlloDerm®で構成される口腔粘膜代替生体材料である。

特徴として

(1) 組織学的に上皮層、真皮層が明確に観察され、口腔粘膜組織に非常に類似している

(2) 動物由来の血清、マウスの細胞等を用いたfeeder layerを使用しないため、未知の生物による感染等のリスクがない

(3) 真皮層としてAlloDerm®使用することで、培養上皮シートなどシート状の生体材料と比較して強度が強く、移植手術材料として扱いやすい

などが挙げられ、その有用性についても多数の報告がされている。(IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999., IZUMI K; Jpn J Oral Maxillofac Surg 47(5):289-292 2001., YOSHIZAWA M; J Oral Maxillofac Surg 62:980-988 2004.)

新潟大学では新潟大学歯学部倫理委員会の承認を得て2001年よりEVPOMEの臨床応用を開始し、2002年度から2004年度には文部科学省より高度先進医療開発経費の援助を受け、EVPOME移植の適応症の検討を目的に神戸大学、富山大学と共同研究を開始、さらには米国ミシガン大学においても臨床応用が行なわれるようになり、現在までに100例以上の症例に対し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、凍結粘膜細胞による培養複合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複合口腔粘膜の作製が可能であることを代表者が報告した(小山貴寛. 口科誌 54: 253-263, 2005)。

今回、凍結保存を行った細胞を用いたEVPOMEが実際にどのような治癒機転をたどるのかを評価し

(1) 現在臨床応用を行っているものと違いがあるのか。

(2) より長期間の培養細胞の凍結保存は可能なのか

を明らかにすることを考えた。

## 2. 研究の目的

今回の研究から凍結培養細胞を用いたEVPOMEの治癒機転を明らかにし、その有用性を示すことができることにより、

(1) 口唇口蓋裂の初回手術時に切除される小組織片より細胞を採取、保存しその後の手術の粘膜欠損創へ応用する

(2) 他の口腔外科、歯周外科手術の複数回の手術が必要となる場合に応用する

などが可能になることから、歯科口腔外科における組織再建手術に大きな役割を果たすとともに口腔機能の回復に多大な貢献を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

当施設で行われている培養システムを用いて口腔粘膜上皮細胞を培養し、凍結保存を行った細胞と通常の培養を行った2種類の上皮細胞を用いて培養粘膜を作製し、それらを形態学的に比較検討する。さら当施設で開発した動物移植モデルを用いて、それら2種類の培養粘膜による移植後の治癒過程について固有組織学的に評価を行い、比較検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 緒言

研究代表者らは、凍結培養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を報告した。本研究では凍結保存を行った細胞を用いたEVPOMEが実際にどのような治癒機転をたどるのかを評価し、現在臨床応用を行っているものと違いがあるのか、また、より長期間の培養細胞の凍結保存は可能なのかを明らかにすることを目的とし、EVPOMEをヌードマウス背部に移植するモデルを用いて検討を行った。

### (2) 材料及び方法

#### ①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。

#### ②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、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°C、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。

#### ③凍結保存および解凍方法

2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<sup>®</sup>(日本ジェネティクス、東京)を用いた。-80°Cで1ヶ月間凍結保存を行った。凍結保存後、培養細胞を37°C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。

#### ④EVPOME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。TypeIVコラーゲン (BD biosciences) でコーティング後のAlloDerm<sup>®</sup>上に、1.25×10<sup>5</sup>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。

#### ⑤ヌードマウス背部皮下への移植

作成後11日目の凍結培養細胞と非凍結培養細胞を用いた2群のEVPOMEをヌードマウス背部皮下へ移植を行った。皮下組織とEVPOME上皮側の間にはシリコン膜を留置した状態で閉創を行った。移植部の組織を移植後1日目、7日目、14日目、21日目、28日目に移植部の組織採取を行った。

#### ⑥組織学的検討

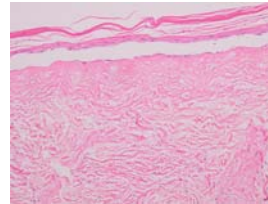
採取した検体を10%中性ホルマリン液で固定後、通法に従いパラフィン包埋、4μmの連続切片を作製した。作製した切片は、ヘマトキシリンエオジン染色とMasson trichrome染色を行い、採取した各時期での移植したEVPOMEと血管の状態について検討を行った。

#### (3) 結果

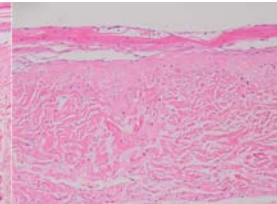
#### ①ヘマトキシリン-エオジン染色

移植後1日目から7日目までは重層化した上皮を伴う EVPOME を凍結 EVPOME、非凍結 EVPOME 共に認められ、2群間に差はなかった。移植後14日目では、凍結 EVPOME で上皮層の剥離が認められる所見が得られた。28日目には上皮が2群ともに吸収されている状態が確認された。

移植後7日目  
凍結 EVPOME

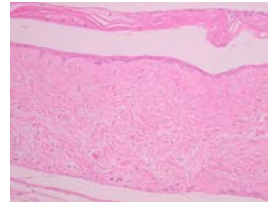


非凍結 EVPOME

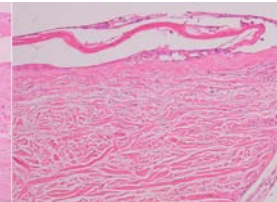


移植後14日目

凍結 EVPOME

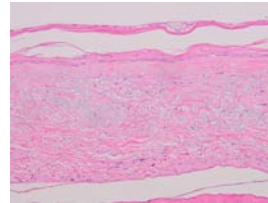


非凍結 EVPOME

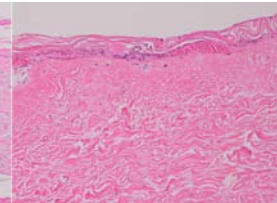


移植後21日目

凍結 EVPOME

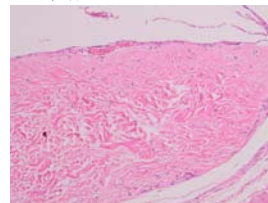


非凍結 EVPOME

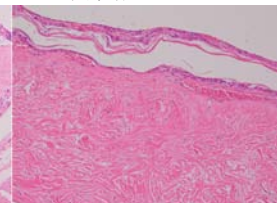


移植後28日目

凍結 EVPOME



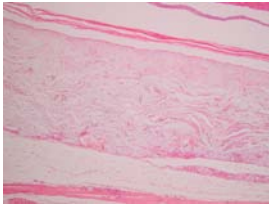
非凍結 EVPOME



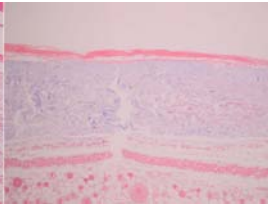
#### ②Masson trichrome 染色

移植後7日目より継時的に培養粘膜中の血管の増生が認められ、28日目には2群間に差は認められなかった。

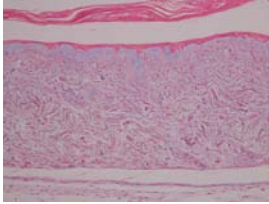
移植後 7 日目  
凍結 EVPOME



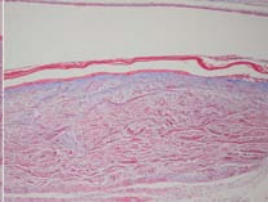
非凍結 EVPOME



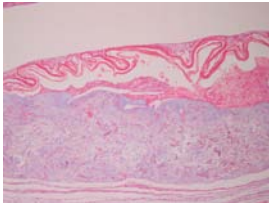
移植後 14 日目  
凍結 EVPOME



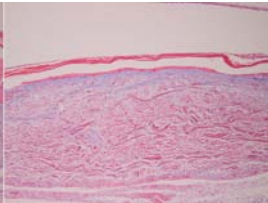
非凍結 EVPOME



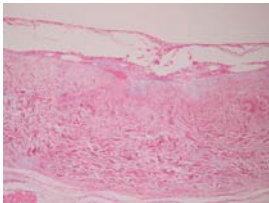
移植後 21 日目  
凍結 EVPOME



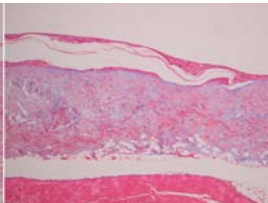
非凍結 EVPOME



移植後 28 日目  
凍結 EVPOME



非凍結 EVPOME



#### (4) 考察

上記の結果より、凍結 EVPOME と非凍結 EVPOME において、最終的な治癒機転として差はないものと考えられた。

治癒機転としては、EVPOME の上皮と AlloDerm 内に血管の増生が継時的に認められ、上皮層と AlloDerm も継時的に周囲より吸収される傾向が認められた。

通常我々が使用する口腔内と環境が違うものの EVPOME の治癒機転の解明を行う手がかりとなった。

#### 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 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)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 貴寛 (KOYAMA TAKAHIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：30444178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし