

令和 4 年 4 月 16 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10167

研究課題名(和文) 口腔粘膜切除後の癒痕拘縮を予防する高密度コラーゲン医療デバイスの開発

研究課題名(英文) A high-density collagen devise for oral surgery

研究代表者

青木 茂久 (AOKI, Shigehisa)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：10448441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔悪性腫瘍は外科的切除が第一選択と考えられているが、舌や頬組織は、発語・摂食による粘膜面の伸展・収縮は避けることが出来ず、構音障害が必発する。舌癌は再発にて複数回の治療を要することも多く、高い疼痛緩和作用を示しながら、粘膜の再生を促進し、癒痕拘縮を抑制する治療法の早期確立が喫緊の課題となっている。本研究では、コラーゲン新素材であるコラーゲンヒトリゲルを用いて、新しい口腔粘膜再生デバイスを開発した。この新デバイスは、再生粘膜部の線維化を抑制し、筋線維芽細胞の出現を抑制した。今後も、製品化を目指しデバイス形状の改良と作用効果の解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、国内外で口腔領域に使用されている主な粘膜被覆剤は、コラーゲンスポンジとPGAシートである。近年、海外では屍体皮膚より得られるヒト無細胞化真皮基質が使用され、高い治療効果が示されているが、この製品は同種に由来する製品である。

我々が目指す口腔粘膜再生デバイスは、安定した品質でかつ安価に得られるブタ皮膚を原料とする。さらにテロペプチドを除去した医療用アテロコラーゲンを原料とするため、高い安全性も担保出来る。本研究において高性能化を目指すコラーゲンデバイスは、舌のみならず頬粘膜および歯周粘膜への応用も可能であり、革新的な口腔領域治療デバイスと成り得る。

研究成果の概要(英文)：Surgical resection is considered to be the first choice for treatment of oral malignancies. As a result, pathological fibrosis of the surgical wound is unavoidable due to the anatomical structure, and articulation disorder is inevitable. Tongue cancer often requires multiple treatments for recurrence, and it is an urgent task to establish a treatment method that promotes mucosal regeneration and suppresses scar contracture while exhibiting a high pain-relieving effect. We have developed a new mucosal regeneration device by combining a new high-density collagen material and a plastic-based material. This new device suppressed the fibrosis of the regenerated mucosa and suppressed the appearance of myofibroblasts. We will continue to improve the device shape and elucidate the effects of the device, aiming for commercialization.

研究分野：実験病理学

キーワード：口腔粘膜再生 線維化 上皮化

## 1. 研究開始当初の背景

口腔悪性腫瘍は、放射線治療や化学療法に対し抵抗性を示す症例が多く、外科的切除が第一選択と考えられている。例えば早期癌切除後の浅い開放創において、舌や頬組織は、発語・摂食による粘膜面の伸展・収縮は避けることが出来ず、構音障害が必発する。また知覚神経も多数存在するため、重篤な術後疼痛が生じる。術後緩和・疼痛管理を目的に、コラーゲンスポンジとシリコンフィルムから成る人工真皮やポリグリコール酸 (PGA: Polyglycolic Acid) シートが、創部の被覆材として主に用いられている。人工真皮はシリコン膜と粘膜との間で縫合が可能で、疼痛緩和効果と創傷治癒効果を有するとされているが、操作性および創部との密着・固定性に関して多くの解決すべき課題があり、さらに瘢痕拘縮の可能性も有ることが知られている。特にシリコンフィルムは、一定期間後、除去する必要があり、フィルム除去後、疼痛や出血は避けられない。また PGA シートは、粘膜部分の運動により容易に脱落してしまうため、被覆後は経管栄養による栄養管理を実施しながら、口腔運動制限が必須である。創部との接着にフィブリン糊 (血液製剤) を使用するため、感染のリスクを完全に除外することが出来ない。さらに創部との接着面では PGA の分解に伴う炎症を惹起するため、異常分解による高度炎症の報告もある。舌癌は再発にて複数回の治療を要することも多く、高い疼痛緩和作用を示しながら、粘膜の再生を促進し、瘢痕拘縮を抑制する治療法の早期確立が喫緊の課題となっている。

切除後の舌および頬粘膜の創部における再生過程では、周辺組織からの線維芽細胞、筋線維芽細胞、毛細血管の増生による母床 (炎症性肉芽組織) の形成、周辺粘膜からの重層扁平上皮細胞の増殖による再被覆、間質内の細胞外マトリックスのリモデリングが生じる。このからまでの過程で障害が生じた場合、治癒の遅延や病的線維化、瘢痕拘縮を来す。一方、人工真皮および PGA シート共に、それぞれの再生組織に及ぼす正確な分子機序は未だ解明されておらず、生物学的効果を応用することで治療効果を増強した高機能化デバイスは、現在のところ実現していない。

研究者分担者の竹澤が発明した『コラーゲンビトリゲル』はゲル状のコラーゲンをガラス化処理したもので、その密度・強度は生体内のコラーゲンに匹敵する新素材である (Takezawa et al. Cell Transplant. 2004)。我々は従来の研究で、膜状のコラーゲンビトリゲルを用いて、絆創膏型人工皮膚と広範囲食道粘膜剥離術後の狭窄抑制パッチを完成させ、その治療効果と有効性を病理組織学的に確認した。

これらの知見を踏まえ、食道と口腔における湿潤環境と組織学的な共通性に着目した。我々が開発したコラーゲンビトリゲル膜は皮膚および食道粘膜の上皮化を促進しつつ、かつ病的な線維化も抑制する。特に蠕動運動と唾液や粘液にてデバイスの固定が困難と考え得る食道においても、コラーゲンビトリゲルパッチは創部への接着性が極めて良好であり、2ヶ所のみクリップ固定で十分であった。さらに我々はシリコンオイル処理にて高度の耐水性を有するコラーゲンビトリゲル膜を新たに共同開発した。以上の研究成果から、術後の口腔疼痛を抑制し、口腔粘膜の創傷・再生促進するのみならず、瘢痕拘縮を抑制する革新的医療デバイスとしてのビトリゲルパッチの着想に至った。

本申請研究ではコラーゲンビトリゲルが再生組織の母床に及ぼす生物学的作用の分子メカニズムを解明することで、口腔粘膜再生デバイスとしての実現を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔組織の再生を最適化するデバイス実現に向けた作用機序の解明と治療効果の高性能化である。現在、国内外における口腔領域の開放創への標準的治療法は、前述の人工真皮および PGA シートの貼付であるが、組織再生機序の理解に基づく高性能化を目指した製品とは言い難い。一方、我々が完成を目指す『口腔粘膜再生ビトリゲルデバイス』は、表面のバリア機能による疼痛抑制、創部との優れた接着性による汚染防止に加え、粘膜の上皮化促進と瘢痕拘縮の予防を同時に満足する画期的粘膜再生デバイスである。

コラーゲン素材は再水和後の力学的強度は急激に低下する。特にコラーゲンスポンジではその傾向が顕著であり、血液や滲出液による再水和後では、素材強度が低下し、縫合は困難である。人工真皮ではこの欠点を補うためにシリコン膜で補強されているが、シリコン膜自体が異物であるため、一定期間の後、除去する必要がある。本研究では、再水和に伴うデバイスの力学的強度低下を克服するデバイス構造を新たに開発する。

## 3. 研究の方法

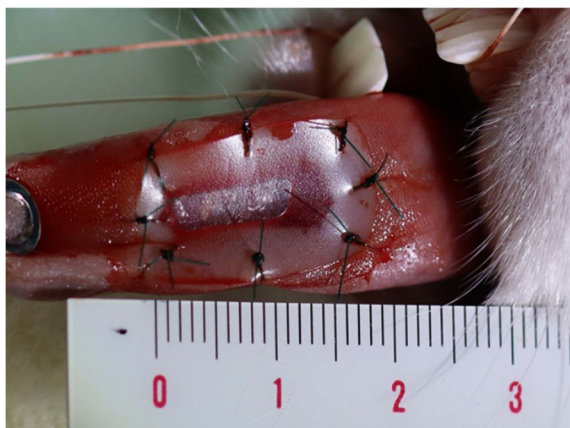
### 1) 口腔粘膜再生ビトリゲルデバイス作製

貼付型の口腔粘膜再生デバイスとしての最適な治療効果を発揮する、製品の品質 (コラーゲン量、複合素材) を決定し、至適デバイス強度 (コラーゲン線維間の架橋追加) につい

て様々な条件を設定し評価を行った。

## 2) ウサギ粘膜欠損モデルを用いたデバイス治療効果の評価

ウサギの舌もヒトと同様、粘膜を切除した場合、術後に癒痕拘縮が生じることが知られている (Yonazawa et al. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 2012)。本研究では上記 1) 実験モデルに準じて、ウサギ (日本白色種、牡、体重 3.0-3.5 kg) の舌粘膜に、10 x 10 x 2 mm の粘膜欠損を作製後、粘膜切除部にデバイスを貼付した。貼付したデバイスは吸収性縫合糸を用いて周囲粘膜に固定した (図 1)。この際、デバイス形状の違いによる操作性、固定方法の違いによる貼付性を評価した。デバイス治療後、2 週目に当該動物の安楽死を実施し、舌組織を摘出し、粘膜切除部の組織学的状態、貼付デバイスの変化、線維化の有無等、その詳細について病理学的に評価した。



(図 1) 創部へのデバイス貼付と固定

## 3) デバイスの生物学的作用解析

上記 2)にて採取された組織サンプルに対し、病理組織学的解析を行うと共に、粘膜再生と線維化に関連する蛋白発現を免疫染色にて解析した。

## 4. 研究成果

### 1) 口腔粘膜再生ビトリゲルデバイス作製

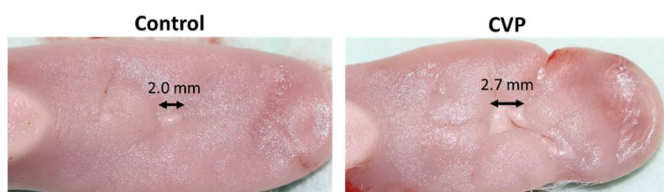
2019 年度では、コラーゲンビトリゲル単独での口腔粘膜再生デバイスを作製した。ビトリゲルに形状加工を行うことで、粘膜下層露出部へのデバイスの密着性の向上を目指し、複数のプロトタイプを作成し動物実験を行った。その結果、いずれのデバイスも、動物の舌運動の回復に従い、術後早期 (数時間以内) に脱落した。その後の実験においても、長期に脱落を防止することが困難であった。そのため、縫合方法を改良することで脱落を予防することが可能となった。しかし、素材が比較的脆弱なため、3 日後の創部では貼付デバイスは消失した。

2020 年度は前年度までの経験を踏まえ、前年度と比較し約 5 倍の厚みのあるコラーゲンビトリゲル膜を作製に成功し、改良型デバイスとして口腔粘膜に貼付した。このデバイスでは早期の脱落は認めなかったが、粘膜下層との密着性にやや乏しく、デバイスと粘膜面の間に食物残渣がしばしば入り込み、異物反応を認めることがあった。

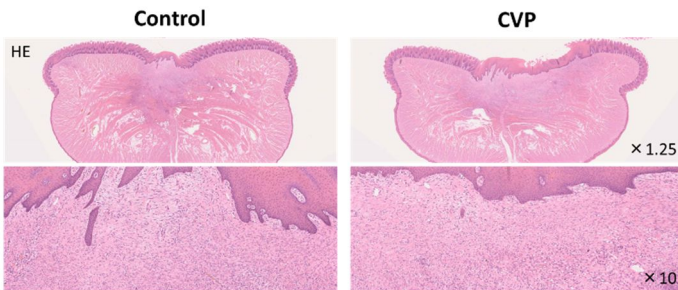
2021 年度では、素材の耐久性と密着性を向上させるべく、プラスチック系素材による表層部と組み合わせた新デバイスを設計し、最終型デバイスを作製した。改良型デバイスでは、手術時の操作性、創部への密着性に優れ、評価終了時まで表層部は残存した。コラーゲン部はいずれの条件においても 2 週間後には消失していた。

### 2) 口腔粘膜再生ビトリゲルデバイスの効果

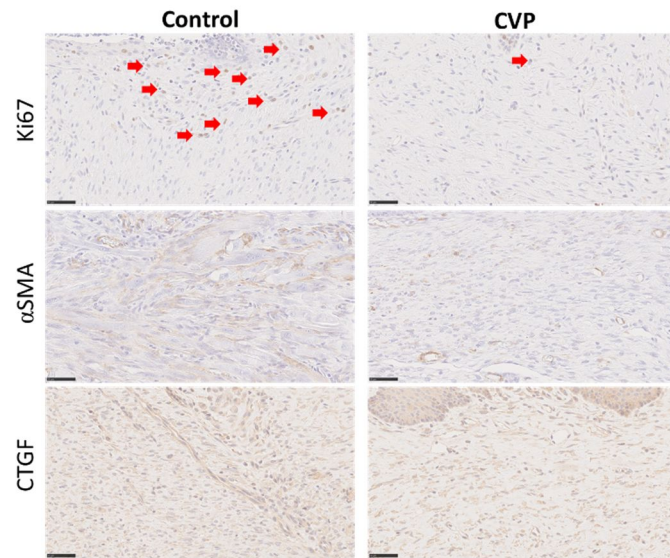
2021 年度に作製した複合素材型口腔粘膜再生デバイス(CVP)を用いて、その治療効果および作用機序を解析した。対照群として、表層のプラスチック素材部を被覆処理した群を準備し比較検討を行った。被覆後 2 週間の時点で、対照群と比較し CVP 群では再生粘膜面積は広い傾向を示した。対照群の再生粘膜は隆起しており、触診上も同部位に硬結を認めた。一方、CVP 群の再生粘膜は平坦で、触診上も硬結は認めず柔らかい性状を示した (図 2)。



(図2) 対照群(Control)と複合素材型口腔粘膜再生デバイス(CVP)の肉眼像  
 病理組織学的に、対照群では再生組織において上皮下の粘膜固有層内に炎症細胞浸潤、線維化、毛細血管の増生からなる炎症性肉芽組織の形成が見られた。特に肉芽組織内では毛細血管の増生が目立つ傾向を示した。CVP 群では、前額断において再生部における肉芽組織の面積はやや広い傾向を示したが、線維芽細胞および毛細血管数は対照群と比較して疎であり、炎症細胞数も低値であった(図3)。



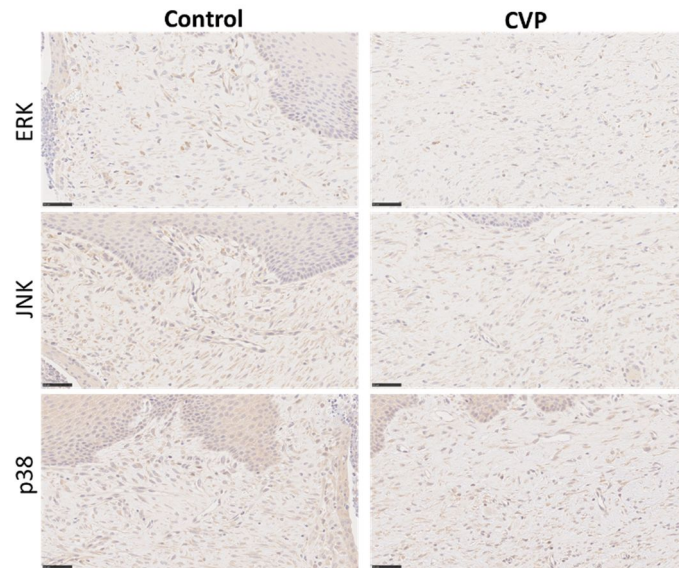
(図3) 対照群(Control)と複合素材型口腔粘膜再生デバイス(CVP)の病理組織像  
 再生組織における構成細胞と機能的変化を免疫染色により解析した。細胞増殖のマーカである Ki67 の免疫染色では、対照群において、肉芽組織内の間葉系細胞に多数の Ki67 陽性像が見られた(矢印)。一方、CVP 群では Ki67 陽性像を示す間葉系細胞はごく少数であった。筋線維芽細胞マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) の免疫染色では、対照群において、多数の  $\alpha$ SMA に陽性を示す筋線維芽細胞が出現していた。一方、CVP 群では対照群と比較し筋線維芽細胞の出現数は低値であった。線維化の示標となる Connective tissue growth factor (CTGF) に関しては、対照群では多数の CTGF 陽性の線維芽細胞および血管内皮細胞が出現していた。CVP 群では線維芽細胞における CTGF 陽性率は対照群と比較しやや低値を示した



(図4)

(図4) 対照群(Control)と複合素材型口腔粘膜再生デバイス(CVP)における Ki67、 $\alpha$ SMA、CTGF の免疫染色態度

対照群と CVP 治療群における筋線維芽細胞動態と線維化に関し、MAPK および SAPK/JNK signaling に着目し、免疫染色にて解析を行った。対照群では、肉芽組織内の間葉系細胞に多数の ERK および JNK への陽性像が見られた。一方、CVP 群では対照群と比較し、陽性像を示す間葉系細胞は相対的に少数であった。p38 に関しては、対照群及び CVP 群の間には、陽性細胞率の差は認められなかった(図5)。



(図5) 対照群(Control)と複合素材型口腔粘膜再生デバイス(CVP)における ERK、JNK、p38 の免疫染色態度

### 3) 考察

本研究において、我々は口腔粘膜切除後の粘膜再生を促進し、病的線維化を抑制する粘膜再生デバイスの開発を試みた。解剖生理学上、舌は絶えず動き、さらに頻繁に硬い異物が通過する組織であることから、医療機器として耐えうる製品としての品質を達成するのに難渋した。様々な試行錯誤の結果、複合素材型の口腔粘膜再生デバイスを開発し、その治療効果を解析可能となった。この開発デバイスは、肉眼的にも病的な線維化と収縮を抑制し、再生組織における筋線維芽細胞数と CTGF 陽性細胞数を抑制することから、創部の病的線維を予防可能と考えられる。また、その線維化には MAPK や SAPK/JNK signal の関与が示唆された。

現在、製品の表面加工および創部との密着性を高める改良継続中であり、将来的に医療機器としての製品化を目指す。

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

〔出願〕 計1件

|                               |                  |               |
|-------------------------------|------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>複合系及びその使用         | 発明者<br>竹澤俊明 青木茂久 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、2020-175248 | 出願年<br>2020年     | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 竹澤 俊明<br><br>(TAKEZAWA Toshiaki)<br><br>(50301297) | 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・グループ長<br><br><br><br>(82111) |    |
| 研究分担者 | 合島 怜央奈<br><br>(AIJIMA Reona)<br><br>(30756143)     | 佐賀大学・医学部・講師<br><br><br><br>(17201)                              |    |
| 研究分担者 | 山下 佳雄<br><br>(YAMASHITA Yoshio)<br><br>(50322300)  | 佐賀大学・医学部・教授<br><br><br><br>(17201)                              |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

|         |         |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|