

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592326

研究課題名(和文)

口腔粘膜由来線維芽細胞の特性と創傷治癒に与える影響について

研究課題名(英文)

The research for gingival fibroblasts character and its effect on the wound healing

研究代表者

蛭沢 克己 (EBISAWA KATSUMI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：20397459

研究成果の概要(和文)：

口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞で特異的に発現した遺伝子において、各組織を特徴付ける遺伝子は、約5%に過ぎず、年齢・性別等ではなく組織由来でクラスターが分かれることより、各組織は特徴的なことが判明した。また口腔粘膜由来線維芽細胞は角化細胞の遊走能や増殖能を促進させる因子を分泌することにより、創治癒を促進していることを示した。細胞源の選択により、より効率的に細胞治療による効果を得る可能性があることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：

From comparison of expression profiles of genes in dermal and gingival fibroblasts, only 5% showed a significant difference in the levels of expression. Hierarchical clustering of total genes showed that the difference between gingival and dermal fibroblasts was larger than the difference between ages or gender of patients. Wound closure was significantly accelerated in the wells treated with conditioned medium from gingival fibroblasts than in wells treated with dermal fibroblast conditioned medium, suggesting the presence of functional factor(s) in the conditioned medium that accelerate cell motility/growth of keratinocytes. These results should provide the possibility of effective treatment, which could be genetically designed to provide a higher therapeutic effect by selecting the origin of fibroblasts since gingival and dermal fibroblasts show some unique characteristics in their gene expression profiles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：創傷治癒、口腔粘膜由来線維芽細胞、再生医療

1. 研究開始当初の背景

口唇裂などの先天奇形術後や顔面外傷の傷跡は患者にとって精神的に大きな負担となる。特に、思春期の若年者にとってはわず

かな傷でもいじめの対象になるなど深刻な問題であるが、臨床ではこれら軽度の症例に対処することは不可能である。現在のところ、術後に起こる瘢痕などの問題を事前に予測

することは不可能である。予防的にトラニラストを内服するなどの対処や、口唇裂患者では早期手術などが試みられているが、多くは癒痕などが形成された時に外科的に切除する以外にない。実際には、創傷治癒はさまざまな増殖因子やサイトカインが関与する複雑な過程である。創を目立たず治癒させるためには、これら単一の因子で制御することは困難と考えられ、現在までに有効な方法は報告されていない。

近年、培養した患者本人の細胞を移植することで、さまざまな疾患を治療する細胞療法の可能性が報告されている。虚血性疾患に対する血管再生や関節軟骨欠損の治療など、細胞の持つさまざまな蛋白質産生や分泌の機能が、従来では治療困難であった疾患治療に有用と考えられている。何よりも、本人の細胞を採取して、培養という方法で増やすことができるため、患者への侵襲も少なく、安全な治療といえる。

われわれは、顎顔面領域の創傷治癒の改善を目的として、自家の培養細胞を利用する可能性について検討している。たとえば、骨髄から容易に採取可能な間葉系幹細胞 (MSC)、脂肪由来幹細胞、線維芽細胞などは、血管内皮増殖因子 (VEGF) や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などを分泌することが知られており、創の治癒に影響を与えるものと予測される。中でも、予備実験の結果から、口腔粘膜由来線維芽細胞が持つユニークな特性が明らかになってきた。元来口腔粘膜は治癒力にすぐれ、癒痕形成も少ないことは周知の事実であるが、そのメカニズムはよくわかっていない。われわれは、口腔粘膜の創傷治癒が優れている一因として、この粘膜由来の線維芽細胞の放出する増殖因子などの影響があるのではないかと推測している。しかしながら、これら口腔粘膜由来が分泌する蛋白質や、皮膚由来の線維芽細胞との違いについては限られた報告があるのみである。われわれはこれまでの研究で肝細胞増殖因子 (HGF) 以外にも VEGF、KGF などが口腔粘膜由来線維芽細胞において多く分泌されていることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔粘膜由来線維芽細胞の持つ特徴を詳細に検討し、皮膚由来線維芽細胞との違いを明らかにすることである。また、粘膜由来の線維芽細胞が皮膚創傷の治癒および癒痕形成に与える影響を検討することである。これまでも口腔粘膜と皮膚との違いについてはさまざまな研究がされてきた。しかしながら、上皮が中心であり、間葉系である線維芽細胞の特性についてはあまり注目されてこなかった。また、細胞治療という新たな領域に必要な情報は、ほとんど蓄

積されていないといえる。本研究課題での提案は、これら細胞の持つ特性についての基礎的検討を行い、臨床応用を踏まえて細胞治療のためのデータを得ることである。

初年度は、口腔粘膜由来線維芽細胞に特異的な遺伝子群について、DNA マイクロアレイを行い、その結果を検討する。これらの理論的根拠に基づいて、次年度以降には *in vivo* での評価を行なう。創傷治癒過程の評価は、マウスなどの動物の皮膚では癒痕の形成がほとんど見られないため、動物での評価は困難である。したがって、ヌードマウスへヒト皮膚を移植することによりヒト皮膚移植モデルを作製し、より生体に近い創傷治癒・癒痕形成環境での口腔粘膜由来線維芽細胞の影響を検討する。本研究については倫理委員会での承認も受けている。以上より、顔面の創傷治癒を改善するための具体的な治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 網羅的遺伝子解析

網羅的な解析を目的として、名古屋大学医学部附属病院倫理委員会の承諾したプロトコルに従い、承諾の得られた健康なボランティアより口腔内および耳介後面皮膚を採取し、それぞれの組織より線維芽細胞を単離する。それらの細胞より得られた mRNA をサンプルとして HUMAN FOCUS ARRAY による約 8500 遺伝子の網羅的遺伝子発現解析を行った。

(2) RT-PCR による遺伝子発現確認

マイクロアレイのデータを確認するため、口腔粘膜由来線維芽細胞で最も発現強度の高い因子に着目し、同一個人より採取した耳介後面皮膚および口腔粘膜由来の線維芽細胞が発現する遺伝子を RT-PCR によって確認する。

(3) 角化細胞に与える影響の解析

生体に近似した環境下で、創治癒を評価するため、スクラッチアッセイを行った。ヒト角化細胞を培養し、コンフルエントの状態ではプレート上をスクラッチする。培地は口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞培養上清とする。スクラッチ当日および 3 日後にデジタルカメラにてプレート上のスクラッチした間隙を撮影し、細胞遊走能と増殖能を検討する。

(4) ヒト皮膚移植モデルへの細胞移植

ヒト皮膚をヌードマウスに移植し、ヒトの皮膚モデルを作成する。移植皮膚にメスにて切創を作成し、直後に同一患者より採取した口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞を蛍光色素 PKH26 にて標識して創部に注入する。注入後経時的に創部規格化写真を撮影し、解

析する。さらに注入部組織を摘出し、標本を作製する。HE 染色では、創部のコラーゲン線維のアライメントの変化を、また蛍光免疫染色では移植された細胞の局在や表皮角質化細胞への影響について検討を行う。

4. 研究成果

(1) 網羅的遺伝子解析の結果

口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞で特異的に発現した 5284 遺伝子において、GO 解析より、各組織を特徴付ける遺伝子は、全 5284 遺伝子の約 5% に過ぎず、全 5284 遺伝子でのクラスタリングでは、年齢・性別等ではなく組織由来でクラスターが分かれることより、各組織は特徴的なことが判明した (図 1)。

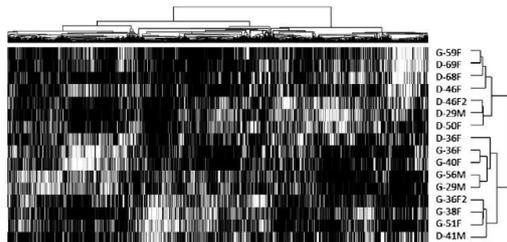


図 1 口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞に発現する遺伝子の階層化クラスタリング。

発現に有意差のあった 278 遺伝子による遺伝子発現の比較からは、口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞は異なるプロファイルを示しており、由来によってほぼ同じクラスターに分類されることがわかった。

口腔粘膜由来線維芽細胞で強発現している遺伝子として IGF-2 (21.9 倍)、hydroxysteroid dehydrogenase 2 (15.7 倍)、glypican 3 (13.3 倍) などがあり、真皮由来線維芽細胞で強発現している遺伝子として MMP12 (25.5 倍) などがピックアップされた。

(2) RT-PCR による遺伝子発現確認

さらにマイクロアレイのデータを確認するため、口腔粘膜由来線維芽細胞で最も発現強度の高い IGF-2 に着目し、同一個人より採取した耳介後面皮膚および口腔粘膜由来線維芽細胞が発現する IGF-2 を RT-PCR によって半定量を行った (図 2)。

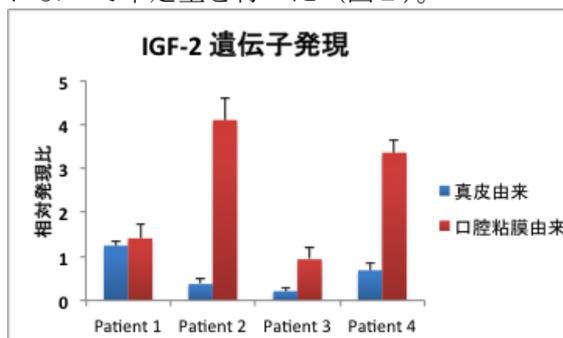


図 2 IGF-2 遺伝子発現。被験者 4 名中 3 名について口腔粘膜由来線維芽細胞で IGF-2 が優位に発現していた。

(3) 角化細胞に与える影響の解析

スクラッチアッセイの培養 3 日後の結果では、口腔粘膜由来線維芽細胞培養上清の方が、優位に間隙を早く埋めており、口腔粘膜由来線維芽細胞培養上清に含まれる因子が角化細胞の移動および細胞増殖を促進することを明らかにした (図 3)。

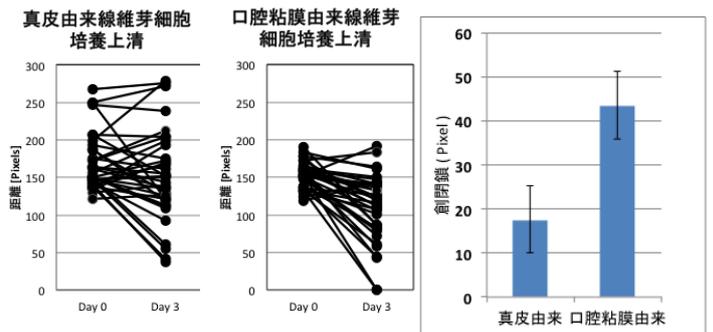


図 3 スクラッチ後の間隙 (左・中央) と創閉鎖面積 (右)。3 日後、口腔粘膜由来線維芽細胞の方が作成した間隙を優位に埋めている。

(4) ヒト皮膚移植モデル作成

予備実験にて PKH26 にて標識化した線維芽細胞を免疫不全マウスに注入したが、3 ヶ月目までは移植細胞を追跡することが可能であった。

免疫不全マウスにヒト皮膚移植を行ったが、移植皮膚が生着せず、文献の結果を再現できなかった。このため、in vivo における評価は行わなかった。

以上の結果を Journal of Bioscience and Bioengineering 誌に投稿し、受領された。

本研究の結果、口腔粘膜および真皮由来線維芽細胞はそれぞれユニークな遺伝子発現プロファイルを持つことを明らかにし、細胞源の選択により、より効率的に細胞治療による効果を得る可能性があることを示した。

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 6 件)

① Ebisawa K, Kato R, Okada M, Sugimura

T, Latif MA, Hori Y, Narita Y, Ueda M, Honda H, Kagami H. Gingival and dermal fibroblasts: Their similarities and differences revealed from gene expression. *J Biosci Bioeng*. 111(3): 255-8, 2011. 査読有り

- ② Nishino Y, Yamada Y, Ebisawa K, Nakamura S, Okabe K, Umemura E, Hara K, Ueda M. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy. *Cytotherapy*. 2011 Feb 22. 査読有り
- ③ Nishino Y, Ebisawa K, Yamada Y, Okabe K, Kamei Y, Ueda M. Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells (hDPC) with Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) Enhance Wound Healing of Skin Defect. *J Craniofacial Surg*. in press. 査読有り
- ④ 蛭沢克己、加藤竜司、亀井譲. 自家培養線維芽細胞によるしわ、瘢痕の治療. *PEPARS*. 50, 22-31, 2011. 査読無し
- ⑤ 蛭沢克己、上田実. 老年医学領域における再生医療. *Geriatric Medicine* 48, 83-83, 2010. 査読無し
- ⑥ 蛭沢克己、加藤竜司、上田実. 実用化は美容医療から. *Bio Industry* 7 月号, 40-46, 2009. 査読無し

[学会発表] (計 4 件)

- ① Ebisawa K, Nishino Y, Yamada Y, Okabe K, Ueda M, Kamei Y. Human Deciduous Teeth Dental Pulp Cells (hDPC) with Basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) Enhance Wound Healing of Skin Defect. 第 20 回日中形成外科学会 2010. 8. 27. 上海
- ② 蛭沢克己、加藤竜司、岡田真衣、上田実、亀井譲. 瘢痕に対する培養線維芽細胞注入. 第 2 回創傷外科学会 2010. 7. 30. 神戸
- ③ Ebisawa K Clinical Experience of Cosmetic Regenerative Medicine for Facial Anti-Aging. 2nd TERMIS World 2009. 9. 1. Seoul
- ④ Ebisawa K, Kato R, Okada M, Kamei Y, Latif MA, Narita Y, Kagami H, Ueda M. Cell therapy for facial anti-aging using cultured autologous gingival fibroblasts. TERMIS-AP 2008. 11. 7. 台北

[図書] (計 1 件)

- ① 蛭沢克己、上田実. 新興出版社 抗加齢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭沢 克己 (EBISAWA KATSUMI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号: 20397459

(2) 研究分担者

成田 裕司 (NARITA YUJI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号: 60378221

各務 秀明 (KAGAMI HIDEAKI)
東京大学・医科学研究所・客員准教授
研究者番号: 80232866

(3) 連携研究者

()

研究者番号: