

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592369

研究課題名 (和文) 培養粘膜による口腔粘膜再生機構を解明する

研究課題名 (英文) Investigation of regeneration process of oral mucosa using tissue engineered oral mucosa

研究代表者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA MICHIKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60303137

研究成果の概要 (和文) : マウス口腔内移植モデルを用いて、培養粘膜移植後の変化について形態学的に観察し、培養粘膜による口腔粘膜の再生機構を検索した。その結果、培養粘膜の上皮および基底膜は、口腔内移植後 5 日目までは保たれているが、7 日目には上皮細胞の剥離、基底膜の消失が生じ、その後同部は速やかに周囲粘膜上皮によって被覆されることが示唆された。以上より培養粘膜は口腔粘膜の上皮化を促進していると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : The objective of the present study was to investigate the role of grafted human oral keratinocytes in a transplanted ex vivo-produced oral mucosa equivalent (EVPOME) in the regeneration and/or healing process of the oral mucosa at the recipient site of mice. The grafted EVPOME maintained a stratified epithelial layer and basement membrane for up to 5 days post-grafting. By day 7 post-grafting, a portion of the EVPOME epithelial layer peeled away from the AlloDerm® and a thin, CK17-immunonegative epithelial layer extended from the adjacent thick epithelia layer of the mouse and contacted the CK17 immunopositive EVPOME epithelium. These findings suggest that grafting of EVPOME with viable oral keratinocytes onto an intraoral mucosal wound plays an active role in promotion of re-epithelialization of the oral wound during the subsequent healing process.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯学系

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔顎顔面再建外科学、再生医療

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) 培養粘膜に関する研究

1990年代にティッシュエンジニアリングを応用した培養上皮シートが開発されたが、これらは強度的に脆弱で取り扱いにくく、さらにこの培養システム上の重大な問題点として、スローウイルス感染を引き起こしうるウシ胎仔血清を用いていることや、細胞の増殖を促すためにマウスの細胞 (feeder layer) と患者の細胞が一時的に共培養されていることが挙げられていた。

(2) 培養複合口腔粘膜(EVPOME)の開発と臨床応用

私たちはこれらの問題点を解決するため、ウシ由来物質やマウスの細胞との共培養を除外した培養方法を採用し、米国 FDA の認可を受け、世界的に広く臨床応用されているヒト無細胞性真皮 (AlloDerm®、米国 LifeCell 社) と患者自身の口腔粘膜上皮細胞とを用いて培養複合口腔粘膜 (以下 EVPOME) の作製に成功した。EVPOME は、より安全性の高い培養システムを用いていることと、ヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) に口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化しているために口腔粘膜と組織学的に類似している上に操作性に優れていることが大きな特徴である。2000年に新潟大学歯学部倫理委員会にて承認を得て、口腔癌や前癌病変などの症例に対し臨床応用を開始した。そして2002年度から2004年度には文部科学省高度先進医療開発経費 (B) が採択され、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、3施設で合計約100例の臨床応用を経験し、全例生着し、瘢痕も少ない良好な結果を得ている。

(3) EVPOMEに関する基礎的研究

一方、基礎的研究としてはいくつかの動物移

植モデルや臨床応用例での EVPOME による再生過程について検討し、その中でも私たちはヌードマウス口腔内移植モデルを開発し、移植後の口腔粘膜再生過程に関して基礎的に検討を進めてきた。これらの研究より、EVPOME の移植後の治癒機転に関しては、臨床的には EVPOME は移植後生体内に良好に生着し、瘢痕形成も少なく、周囲組織と同程度の軟らかさの口腔粘膜になるという結果は得られているものの、基礎的研究ではフラスコ内で作製した EVPOME が移植後必ずしも生体内でそのままの状態で生着するわけではなく、術後14日以内での一部の上皮細胞の脱落や術後28日以内でのヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) の吸収といった現象が観察された。また、術後7日目以降に多数の毛細血管新生が認められ、EVPOME 作製中の培養上清中にも血管新生因子の発現が有意に高く認められていた。

2. 研究の目的

これまでの研究より、EVPOME が口腔粘膜再生に寄与していることが示唆されるものの、どのように口腔粘膜の再生に関与しているのかは未だ不明な点が多く、特に、術後21日目以降で認められる EVPOME 移植部の重層上皮は、果たして EVPOME の上皮細胞によるものか、それとも周囲組織からの再生上皮によるものかという問題を解明することが EVPOME による口腔粘膜の再生機構を解明する上での最も大きなポイントとなる。そのため、本研究の目的は、マウス口腔内移植モデルを用いて、EVPOME 移植後の変化について形態学的手法を用いて観察し、EVPOME による口腔粘膜の再生機構を解明することであった。

3. 研究の方法

(1) EVPOME 作製、組織学的、免疫組織化学的観察、培養上清のグルコース量測定

①ヒト口腔粘膜上皮細胞を培養ヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) 上に播種、重層化させ、EVPOME を作製し、ホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

②上皮細胞マーカーであるサイトケラチン 17、細胞増殖マーカーである Ki-67 に対する抗体を用いて EVPOME の上皮細胞の増殖能や分化能を免疫組織化学的に観察するとともに、上皮細胞のグルコース代謝能を示す GLUT-1 を免疫組織化学的に検索した。

③EVPOME の培養上清よりグルコース消費量を測定した。

(2) EVPOME をヌードマウス頬粘膜欠損創に移植、組織学的、免疫組織学的観察

①ヒト口腔粘膜上皮細胞を培養ヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) 上に播種、重層化させ、EVPOME を作製し、ヌードマウス頬粘膜欠損創に移植し、経時的に屠殺し、標本作製した。

②EVPOME および移植片はホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

③さらに上皮細胞マーカーであるヒトサイトケラチン 17、基底膜マーカーであるヒトタイプIVコラーゲンを免疫組織化学的に検索した。

4. 研究成果

(1) EVPOME 作製、組織学的、免疫組織化学的観察、培養上清のグルコース量

①EVPOME の上皮細胞はサイトケラチン 17 陽性、Ki-67 陽性細胞は基底層に多い傾向にあり、GLUT-1 は上皮全層で陽性であった。

②グルコース消費に関しては、消費率が高い

時期には組織学的に増殖細胞が多く、グルコース消費率が減少する場合には増殖細胞が減少する傾向にあった。

以上より、EVPOME の上皮細胞は増殖能にすぐれ、その増殖活性はグルコース消費量で評価できることが示唆された。

(2) EVPOME をヌードマウス頬粘膜欠損創に移植、組織学的、免疫組織学的観察

EVPOME 移植後 5 日目のシリコン膜除去時では AlloDerm 上に培養上皮細胞が観察され、AlloDerm の構成成分である基底膜は上皮層の下面に観察された(図 1)。移植後 7 日目では、CK17 陽性上皮細胞は剥離し、上皮が存在したと思われる部分の AlloDerm 上面には IV型コラーゲン陽性反応を示した。しかし、それから少し離れたところには 2-3 層の CK17 陰性の上皮細胞層が認められ、同部では IV型コラーゲン陰性反応であった(図 2)。

このため EVPOME の上皮細胞は剥離し、同部では AlloDerm の基底膜も消失し、その部位にマウス上皮細胞が伸びだしてきていると考えられた。術後 14 日目では移植した EVPOME は周囲と癒合しており、被覆上皮は周囲上皮と移行的な CK17 陰性の重層扁平上皮で、IV型コラーゲン陽性反応は周囲粘膜上皮と移行的に基底細胞下に観察された(図 3)。

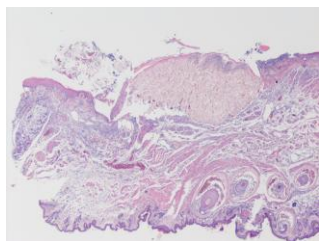
また、対照群である AlloDerm 単独移植では上皮細胞層の被覆は EVPOME 移植群よりも遅延していた。

以上より EVPOME の上皮および基底膜は、口腔内移植後、固定と保護の目的で一緒に移植したシリコン膜を除去するまでは AlloDerm 上に保たれているが、その後上皮細胞の剥離、基底膜の消失が生じ、同部には速やかに周囲粘膜上皮が被覆することが示唆された。このように上皮細胞の存在が早期の粘膜再生に寄与していると考えられたが、

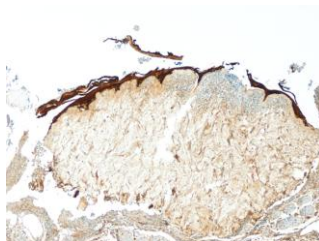
AlloDerm の基底膜は培養上皮細胞の接着には有効であるが、移植後は AlloDerm と同様にリモデリングされると考えられた。

培養粘膜の上皮細胞の増殖活性を培地内グルコース消費量で評価する手法は、簡便で評価しやすいことから有用な方法であるが、このように増殖活性にすぐれた上皮細胞を有する培養粘膜の口腔内移植後の治癒機転を観察したことは本研究の大きな特色である。しかしながら、本実験モデルは異種移植であり、移植後の上皮細胞の運命を検索する上では免疫機序の影響が否定できないため、今後は同種移植モデルによる検索を行う予定である。

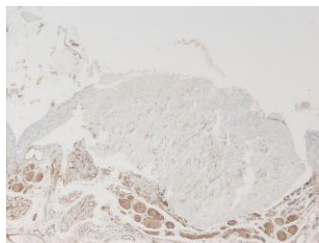
<図 1 : EVPOME 移植後 5 日目>



HE 染色

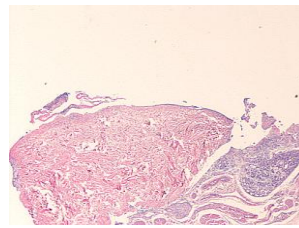


CK17



IV型コラーゲン

<図 2 : EVPOME 移植後 7 日目>



HE 染色

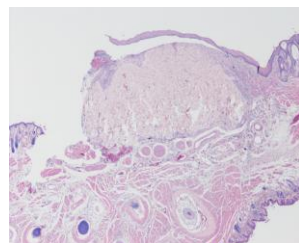


CK17

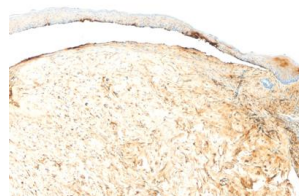


IV型コラーゲン

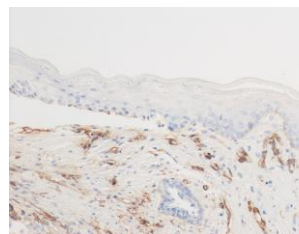
<図 3 : EVPOME 移植後 14 日目>



HE 染色



CK17



IV型コラーゲン

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 Yoshizawa M, Koyama T, Kojima T, Kato H, Ono Y, Saito C.: Keratinocytes of tissue engineered human oral mucosa promote re-epithelialization after intraoral grafting in athymic mice. J Oral Maxillofac Surg, 査読有、2011 (in press).

② 飯田明彦、芳澤享子、小山貴寛、齋藤太郎、高木律男、齋藤 力、齋藤 功、小野和宏、泉 健次: 培養複合口腔粘膜移植を応用した口唇口蓋裂の 2 例. 日口蓋誌 査読有、35(3): 235-240, 2010.

③ 芳澤享子, 泉健次, 飯田明彦, 小山貴寛, 中西義崇, 鈴木一郎, 齋藤力, 高木律男: 口腔粘膜の再建における培養複合口腔粘膜 (EVPOME) の応用. 新潟県医師会 査読有、702: 8-10, 2008.

〔学会発表〕 (計 9 件)

① Yoshizawa M: Special lecture: Clinical application of tissue- engineered oral mucosa. The 49th congress of Korean association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons (KAMPRS), November 4-6, 2010, Buan, Korea.

② 芳澤享子: シンポジウム再生医療を応用したがん治療, 口腔がん治療における培養複合口腔粘膜の応用. 第 48 回日本癌治療学会学術集会, 京都. 2010 年 10 月 30 日.

③ Yoshizawa M, Koyama T, Kojima T, Kato H, Niimi K, Saito C: Regeneration of oral mucosa by tissue engineered oral mucosa grafts on athymic mice, 3rd Hiroshima Conference on

Education and Science in Dentistry, Hiroshima, Japan, November 7-8, 2009.

④ Yoshizawa M, Koyama T, Kojima T, Nakanishi Y, Niimi K, Suzuki I, Saito C: Tissue Engineered Oral Mucosa Grafts Promote Regeneration of Oral Mucosa on Athymic Mice. The 8th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery, November 3- 7, 2008 Bangkok, Thailand.

⑤ 芳澤享子、小山貴寛、小島 拓、中西義崇、小野由起子、鈴木一郎、齋藤 力: 培養複合口腔粘膜移植による創傷治癒過程に関する組織学的検討. 第 53 回 (社) 日本口腔外科学会総会, 2008 年 10 月 20-21 日, 徳島.

⑥ 芳澤享子、小山貴寛、小神晴美、川嶋香代子、梶 昌美、中西義崇、新美奏恵、小野由起子、鈴木一郎、齋藤 力、布施一郎、中田 光: グルコース消費量の測定による培養複合口腔粘膜の細胞増殖活性の評価. 第 18 回日本口腔粘膜学会総会, 2008 年 9 月 19-20 日, 東京.

⑦ 芳澤享子: 培養粘膜による口腔粘膜の再生. 口腔から QOL 向上を目指す連携研究再生工学研究集会, 2008 年 9 月 10 日広島.

⑧ 飯田明彦, 小山貴寛, 高木律男, 芳澤享子, 小野和宏: 口唇口蓋裂手術に対する培養複合口腔粘膜の応用. 日本形成外科学会関東支部第 78 回新潟地方会, 2008 年 7 月 7 日, 新潟.

⑨ 飯田明彦、小山貴寛、高木律男、芳澤享子、齋藤 力、齋藤 功、小野和宏: 口唇口蓋裂手術における培養複合口腔粘膜の応用.

第 32 回日本口蓋裂学会総会, 2008 年 5 月
28-29 日広島.

〔図書〕 (計 1 件)

① 芳澤享子、泉 健次、飯田明彦、齊藤 力、
高木律男.: 口腔前庭拡張術、歯槽堤形成術へ
の培養複合口腔粘膜の応用. 口腔外科ハンド
マニュアル' 09, 110-117、2009、東京、クイ
ンテッセンス

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/surgery1/research.html>

<http://www.bmrctr.jp/saisei/public02.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA MICHIKO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号 : 60303137

(2)研究分担者

小野 由起子 (ONO YUKIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号 : 80345511

(3)連携研究者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号 : 80217421