

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791462

研究課題名(和文) 羊膜と口腔上皮細胞による培養上皮シートの開発に関する実験的研究

研究課題名(英文) An Experimental Study on Development of Cultured Epithelial Grafting Sheets with Amnion and Oral Epithelial Cells

研究代表者

小池 剛史 (KOIKE TAKESHI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60359734

研究成果の概要(和文)：

口腔上皮細胞をヒト乾燥羊膜上で培養を行う、新たな培養重層上皮シート作製の可能性について研究を行った。その結果、口腔上皮細胞-ヒト乾燥羊膜複合体は、正常口腔粘膜上皮組織と同様の重層上皮化が認められた。免疫組織学的検討では、本複合培養重層上皮シートは正常口腔粘膜上皮と比較し、より高い増殖活性を示していた。本複合培養重層上皮シートは、ヒューマンセルによる培養上皮シート開発における有望な供給源となり得る事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The aim of this study was to assess the possibility of human oral mucosal epithelial cells on hyper-dry-amnion can be used as new source for culturing stratified epithelium sheets. The oral keratinocyte and hyper-dry-amnion composites had a well-stratified epithelial layer similar to native oral keratinized mucosa. Immunohistochemistry, the oral keratinocyte and hyper-dry-amnion composites appeared to be in a more proliferative state than native keratinized mucosa. These results suggested that the oral keratinocyte and hyper-dry-amnion composites may be a promising cell source for the development of stratified epithelium allograft sheets using a human cell strain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2009 年度	700,000 円	210,000 円	910,000 円
2010 年度	600,000 円	180,000 円	780,000 円
年度			
総 計	2,500,000	750,000 円	3,250,000 円

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：移植・再生医療、再生医学、歯学

1. 研究開始当初の背景

親不知を抜歯した際に付着している歯肉

や、出生時に胎盤とともに体外へ出される羊膜は、従来より医療廃棄物として捨てられて

きた。しかし、それら破棄されていた組織は、近年の組織工学の進歩に伴い、再生医療の分野で優れた生物学的特性を有していることが徐々に解明されてきた。

羊膜は生殖や胎盤免疫に深く関与しており、胎児を母体の免疫系から保護している神秘的な組織である。これまで羊膜は、火傷や皮膚潰瘍をはじめ古くからさまざまな医学分野で臨床応用が試みられてきたが、広く臨床に応用されるには至っていなかった。羊膜移植における羊膜の作用機序には未だ不明な点が多いとされているが、眼科領域などの再生医療分野で最も脚光を浴びている組織のひとつである。眼表面の再構築に、羊膜と口腔粘膜上皮の複合培養上皮が応用された報告も散見され、瘢痕形成が少なく正常に近い上皮組織が速やかに伸展したなど良好な結果が得られている。このような羊膜の優れた「創傷治癒機構」（各種増殖因子の放出・抗菌/抗炎症作用）や「免疫学的特性」（拒絶を惹起しにくい組織）は、臓器移植や遺伝子治療への応用にも期待され、最近では骨髄・臍帯血に続く第3の組織バンクとして再生医療支援機構が「羊膜バンク」を設立した。また、親不知を抜歯した際に付着している歯肉上皮細胞は、皮膚上皮細胞と比較し、増殖能が著しく高いなどの優れた細胞特性があるといわれ、培養歯肉上皮の口腔領域への応用や皮膚の熱傷治療などで既に臨床応用された報告もみられる。

近年の組織工学、培養技術の進歩は新たな選択肢を与えているにも関わらず、現在まで口腔領域への羊膜の応用は試みられていない。そこで本研究は、羊膜と口腔粘膜の優れた細胞生物学的特性に着眼し、これら細胞の特性をうまく組み合わせる事により、優れた人工再建造物の創出が可能となれば、今後の歯科医療や熱傷治療などの分野で計りし

れない進歩をもたらすものと考えた。

2. 研究の目的

米国では、死体から採取した皮膚を凍結保存する皮膚バンクと呼ばれるシステムやヒト新鮮屍体真皮を scaffold（足場）とする上皮培養研究が盛んに行われている。しかしわが国では、死体から皮膚を採取したヒト新鮮屍体真皮を scaffold とする培養法は倫理的に問題がある。また、培養上皮研究の多くのは、作成時にマウス細胞やウシ血清が使用されている。羊膜と口腔上皮を用いた過去の実験報告も例外でなく、上皮の重層化を目的にそれらが使用されているのが現状である。しかし FDA（アメリカ食品医薬品）のガイドラインでは、上皮細胞の培養にマウス feeder 細胞やウシ血清を用いる方法は、プリオンや未知のウイルスの混入の可能性があるため推奨されていない。

本研究はこれら問題を解決すべく、従来医療廃棄物として捨てられてきた組織の優れた細胞特性に着眼した。本研究は、羊膜と口腔上皮細胞それぞれが有する細胞特性を組み合わせる事により、培地に含まれる動物性蛋白や未知因子を完全に排除したクリーンで、かつ増殖活性にも優れた培養上皮シートの作製を主な目的としている。

羊膜と口腔上皮の複合培養上皮シートが臨床に応用できるようになれば、歯周病により破壊された歯肉の再生や唇顎口蓋裂治療、悪性腫瘍切除後の口腔再建、ひいては熱傷治療など様々な医療分野で新たな再生医療の確立が期待される。

3. 研究の方法

口腔上皮細胞の培養は、Boyce & Ham の方法に準じ、各種添加物含有 MCDB 153 培地を選択した。実験の手順は、1、抜去歯から口腔上皮細胞を単離。2、口腔上皮細胞を継代

培養し細胞を増殖。3, ヒト乾燥羊膜上に培養口腔上皮細胞を播種し、数日間液相下環境にて培養。4, 無血清培地のカルシウム濃度を上げ、約3週間気相下環境に変更し培養。

平成20年度は *in vitro* を中心に形態学的な検討を行い、平成21年度以降は本研究の臨床応用に向けた動物実験、さらには生体への応用など *in vivo* を中心とした検討を行う。

平成20年度

研究計画・方法

ヒト乾燥羊膜と口腔上皮細胞により作製された上皮シートの組織学的・免疫組織学的な検討を行う。さらに蛋白の発現状況などについても検討する。

平成21年度

研究計画・方法

羊膜・口腔上皮複合培養上皮シートを実験動物へ移植実験し、創傷治癒に関連の深い上皮の分化、増殖過程と創収縮機構などについて細胞生物学的解析を試みる。羊膜・口腔上皮複合培養上皮シート移植部や対象部の切除切片を作製し、免疫学的・形態学的な検討を行う。

平成22年度

①研究計画・方法

羊膜・自家口腔上皮複合培養上皮シートを生体へ移植実験する。その際には倫理面で十分な配慮を行うとともに、信州大学医倫理委員会においても再度、承認を得る予定である。羊膜・自家口腔上皮複合培養上皮シートの生体移植を行う対象は、インフォームドコンセントが得られた待機的手術患者とする。事前に健常部より採取した少量の自家組織片から羊膜・自家口腔上皮複合培養上皮シートを作製する。それを口腔内の粘膜実質欠損部へ移植し、経時的な創傷治癒経過や拒絶反応の有無、生着率などについて検討を行う。

実験より得られた結果を整理し、国内・外

の学会、学術誌へ研究成果を発表する。

4. 研究成果

本研究は、平成17/18年度科学研究費補助金(若手B)の支援のもと、当研究室で開発したヒト乾燥羊膜を口腔上皮細胞の scaffold とし、特殊な条件下で培養する事により、ウシ血清などの未知因子を使うことなく、培養重層上皮シートを作成することに世界で初めて成功した。平成19年2月(1)培養重層上皮シートの作成方法(特願2007-40378)、平成20年4月(2)培養重層上皮シートの改良作製方法(特願2008-106448)について特許を申請した。

口腔上皮細胞は、ヒト乾燥羊膜上で気相下培養を行っても増殖を続け、培養上皮シートのH-E染色標本による形態学的検討では、口腔上皮細胞がヒト乾燥羊膜上で、ほぼ均一な約10層以上からなる重層化を認めた。また重層化に伴う核の消失はみられなかった。免疫組織学的検討では、cytokeratin 10/13、laminin-5、ZO-1 および occludin において、正常な口腔上皮組織とほぼ同様の発現パターンを示した。特に上皮のタイトジャンクション、即ちバリア機能を示すマーカーである ZO-1 および occludin において、正常な口腔上皮組織とほぼ同様の発現パターンを示した。したがって、本培養シートを生体に移植した際には、上皮としてのバリア機能を十分に発現できるものと推察された。さらに、上皮 stem-cell や上皮の活発な増殖能を示すマーカーである keratin-19 や PCNA では、正常な口腔上皮と比べ、培養上皮の全層で陽性細胞の発現が認められた。また、悪性腫瘍と関連のある P53 タンパクの発現は認められなかった。

本実験結果より、ヒト乾燥羊膜と口腔上皮細胞による複合培養重層上皮シートは、正常口腔粘膜上皮組織と類似した機能を有しつ

つ、高い細胞活性と増殖能を示していたことがわかった。ヒト乾燥羊膜は、今後の培養上皮開発における細胞外マトリックスとして、有用かつ妥当な組織であると思われた。また従来医療廃棄物とされてきた羊膜を scaffold として使用する事により、倫理的な問題が生じにくい事も利点といえる。

本複合培養重層上皮シートは、ヒューマンセルによる培養上皮シート開発における有望な供給源となり得る事が示唆され、新たな移植法の確立が期待される結果であった。

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1件)

- ① Koike T, Yasuo M, Shimane T, Kobayashi H, Nikaido T, Kurita H. (Cultured epithelial grafting using human amniotic membrane: The potential for using human amniotic epithelial cells as a cultured oral epithelium sheet.) Arch Oral Biol. 2011 May 6. In press. 査読有
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T4J-52T6857-1&_user=4307883&_coverDate=05%2F07%2F2011&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_acct=C000050561&_version=1&_urlVersion=0&_userid=4307883&md5=a0ef11e4776bc7fa6363c1967b3d7084&searchtype=a

〔学会発表〕(計4件)

- ① Takeshi Koike, Hiroichi Kobayashi, Tetsu Shimane, Hiroshi Kurita (An Experimental Study of Cultured Epithelial Grafting Using Human Amnion)、88th General session and Exhibition of the International Association for Dental Research、

2010. 7. 14-17、Barcelona

- ② 小池剛史、鎌田孝広、飯島 響、小林啓一、栗田 浩、倉科憲治 (ヒト乾燥羊膜と口腔上皮細胞による培養上皮シートの開発に関する実験的研究)、第54回日本口腔外科学会総会、2009. 10. 9-11、札幌市
③ 小池剛史、酒井宣紀、成川純之助、鎌田孝広、栗田 浩、倉科憲治 (ヒト乾燥羊膜と口腔上皮細胞による培養上皮シートの開発に関する実験的研究)、第53回日本口腔外科学会総会、2008. 10. 20-21、徳島市
④ 小池剛史、酒井宣紀、酒井洋徳、小林啓一、栗田 浩、倉科憲治 (ヒト乾燥羊膜と口腔上皮細胞による培養上皮シートの開発に関する実験的研究)、第62回日本口腔科学会総会、2008. 4. 17-18、福岡市

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: ①培養重層上皮シートの改良作製方法

発明者: 二階堂敏雄、岡部素典、齋藤滋、倉科憲治、小池剛史

権利者: 国立大学法人富山大学、国立大学法人信州大学

種類: 特許

番号: ①特願 2008-106448

出願年月日: ①2008年4月16日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 剛史 (KOIKE TAKESHI)

信州大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60359734

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: