

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03870

研究課題名(和文) 足場材の硬さの違いを利用した上皮角化・非角化様式解明と培養口腔粘膜作成法への応用

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism of ortho- and non-keratinization pattern using different stiffness of scaffold and its application for fabrication of tissue-engineered oral mucosa

研究代表者

泉 健次 (Izumi, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80242436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：角化様式の異なる口腔粘膜が隣在する謎を、メカノバイオロジーの観点から理解・解決する目的で、硬い培養皿とコラーゲン製の柔らかい基質でヒト初代口腔粘膜角化細胞を培養し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析、培養口腔粘膜による組織学的検討に加え、AFMによる細胞のヤング率の測定を行った。口腔粘膜角化細胞でも基材の硬さに依存して多数の遺伝子発現変動が生じていることがわかった。一方で、培養口腔粘膜の組織像や細胞のヤング率の変化については、実験に使用した足場材の硬さに関して著明な違いはなかった。硬さに応答する遺伝子の探索にはさらなるサンプル数と基材の硬さのパリエーションが必要と思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、口腔粘膜上皮角化細胞の分化・増殖という特徴的な事象は、足場材の硬さの違いによっても大いに制御されていることを示すと考えられた。特に口腔と言う器官は非常に複雑な解剖学的構造を呈していることから、今後口腔粘膜の再生医療を推進していく上で、メカノトランスダクション機構による細胞応答反応の検討は不可欠であることが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Although histology of oral mucosa often demonstrates dramatic change of keratinization pattern, for instance, at muco-gingival fold. However, the mechanism is not well-elucidated. This study aimed to investigate how the histological differences are regulated in terms of mechanobiology. Using human primary oral keratinocytes culturing on two types of collagen matrices with different stiffness and regular culture dishes, we examined micro-array analyses, histological observation of tissue-engineered oral mucosa and measurement of Young's modulus. The gene expression analysis revealed that there are many genes that are up- and down-regulated depending on the stiffness. However, there are few genes specific to biological functions of oral keratinocytes. Furthermore, there were scarce differences of histological appearances and Young's modulus among cells grown on matrices with different stiffness. It may be required to increase the number of samples and matrix stiffness to be examined.

研究分野：再生歯学

キーワード：メカノバイオロジー 口腔粘膜 口腔粘膜角化細胞 正角化 非角化 培養口腔粘膜

## 1. 研究開始当初の背景

わが国では、インプラント症例と歯周病患者の増加に伴い、正角化様式を示すいわゆる咀嚼粘膜で構成された付着歯肉形成術の需要が高まっている。近年の再生医学、ティッシュエンジニアリング技術の発展は目覚ましいものがあるが、現在までに角化と非角化を示す培養口腔粘膜の作り分けができたという報告、プロトコルは存在しない。元来、口腔には正角化を示す歯肉、硬口蓋粘膜と非角化を示す頬粘膜、口腔底、軟口蓋、口唇粘膜が存在する。同じ口腔組織を被覆する粘膜でありながら、この角化様式の変化は、歯肉頬移行部や口蓋で、突然に出現する(歯肉歯槽粘膜境)。口腔内において角化歯肉は咀嚼という機能圧を受け止めるのに対し、非角化粘膜は柔軟で咀嚼圧を受け流す。この2種類の口腔粘膜の機能は異なるため、角化様式の異なる培養口腔粘膜を作製できることの臨床的意義は非常に高い。

近年、培養環境の力学場とそれに対する細胞力覚応答を研究するメカノバイオロジーが注目されている。一般的な細胞培養では、硬い(2-3GPa)プラスチック培養皿が用いられてきたが、間葉系幹細胞(MSC)培養で基材の硬さを1, 11, 34kPaにすると、それぞれ神経細胞、筋芽細胞、骨芽細胞に分化傾向が変わることが明らかになり、MSCの分化の方向性が培養基材硬度に依存するという事実が発見された。その後、3次元組織再生に用いるバイオマテリアルの物性が細胞機能制御に非常に重要なことが再生医療分野でも注目され、硬さに対する細胞力覚応答が、iPS細胞やES細胞の未分化能維持機構や癌細胞浸潤メカニズムにも展開している。

一方、上皮系細胞の硬さへの細胞応答の報告は、単層上皮の角膜や乳腺上皮で散見されるが、ヒト表皮、口腔粘膜角化細胞などは、再生医療で使用されるメジャーな細胞ソースであるにもかかわらず、細胞培養基材の硬度が正常重層扁平上皮角化細胞に与える影響は全く分かっていない。以上の背景から、口腔角化細胞の分化や角化パターンは、細胞培養基材の硬度の調整で制御することが可能で、生体で隣接して存在するような角化と非角化の培養口腔粘膜の作り分けが可能ではないか、という仮説に至った。

## 2. 研究の目的

口腔粘膜角化細胞の基材/足場材の硬さに対する細胞応答についての知見は全く得られていない上、特定の上皮系細胞で報告されているデータが、必ずしも口腔粘膜をはじめとする他の上皮細胞に当てはまるわけではない。本研究では、学術的「問い」を明らかにするために、基盤となるデータの解析・収集をしながら、培養口腔粘膜作成プロトコルへの反映と臨床応用を見据えて以下の3点を明らかにする。

- ① 足場材の硬さを変え、2次元培養した口腔粘膜角化細胞の $\mu$ アレイ解析を実施して、角化・非角化に関連する、あるいは細胞接着や細胞増殖などに関連する、変動遺伝子を抽出する。あわせて、非侵襲的に細胞運動能測定も実施して、細胞運動能が高い細胞(増殖能 )と低い細胞(増殖能 )に分けて、遺伝子発現解析も実施する。
- ② ①の結果を踏まえて、足場材としてのコラーゲンゲルの硬さを、コラーゲン濃度を変えることで調整し、その足場材を用いて細胞を3次元培養で重層化させ、再生した培養口腔粘膜の角化様式を組織学的に観察する。
- ③ 基盤の硬さが異なる培養基材上で培養した口腔粘膜角化細胞に対して、細胞の形態によって分化度の違いを想定しながら、AFMにより直接細胞の硬さを測定して、相関性を検索する。

## 3. 研究の方法

口腔粘膜角化細胞は、インフォームドコンセントを得た口腔外科を受診して、埋伏歯抜歯を受ける患者様から提供された組織から、酵素を用いて単離した初代口腔粘膜角化細胞を用いる。培地はカルシウム濃度0.06mMのエピライフを使用した。継代数として1代目から4代目の細胞を実験に使用した。研究分担者の鈴木と加来が行った。

### (1) マイクロアレイ解析

口腔粘膜角化細胞を培養する足場材の硬さは、通常のプラスチック細胞培養基材(35mm Dish:ヤング率2-3GPa)、商品名セルキャンパスという膜状の足場材(ヤング率約1.78MPa)、市販のI型コラーゲンゲル基材(ヤング率約5kPa)とし、細胞分化の比較コントロールとして、カルシウム濃度を1.2mMに上げ意図的に分化を亢進させた細胞を用いた。コンフルエントになる直前にmRNAを試薬で抽出し、質、量ともに十分であることを確認した後、外注によって約22000を超える遺伝子プローブを用いてマイクロアレイ解析を実施した。(N=7)アレイデータの統計解析は研究分担者の凌が行った。解析は、遺伝子発現レベルに対して、硬さの異なる基材に対して対応のあるt検定を用いて有意に発現レベルの異なる遺伝子を抽出した。本成果では通常のプラスチック細胞

培養基材 (35 mm Dish) と I 型コラーゲンゲル基材で培養した細胞において有意に遺伝子発現変動が認められた遺伝子を報告する。

さらに、検体 7 例中、タイムラプス撮影により、細胞増殖能と相関する細胞運動能解析を実施して、増殖能が高い細胞群と低い細胞群それぞれ 3 例に分けてからも、発現レベルの解析を行った。

(2) 異なるコラーゲン濃度により作製したコラーゲン足場材を用いて 3 次元培養で作製した培養口腔粘膜の組織学的解析

魚うるこコラーゲン粉末から 0.9% から 0.1% おきに 1.2% までの 4 種類の濃度のコラーゲンゲルを作製する。かつ、ゲルが培養中に溶けださないように、カルボジイミド(EDC) 架橋を実施した。作製したコラーゲンゲルの硬さをレオメーターでの測定を、研究分担者の佐藤が行った。その後、その表面が平坦なゲル状に口腔粘膜角化細胞を播種して、通常の作製プロトコルを用いて培養口腔粘膜を作製し、固定後、組織学的に観察した。

(3) AFM による細胞のヤング率測定

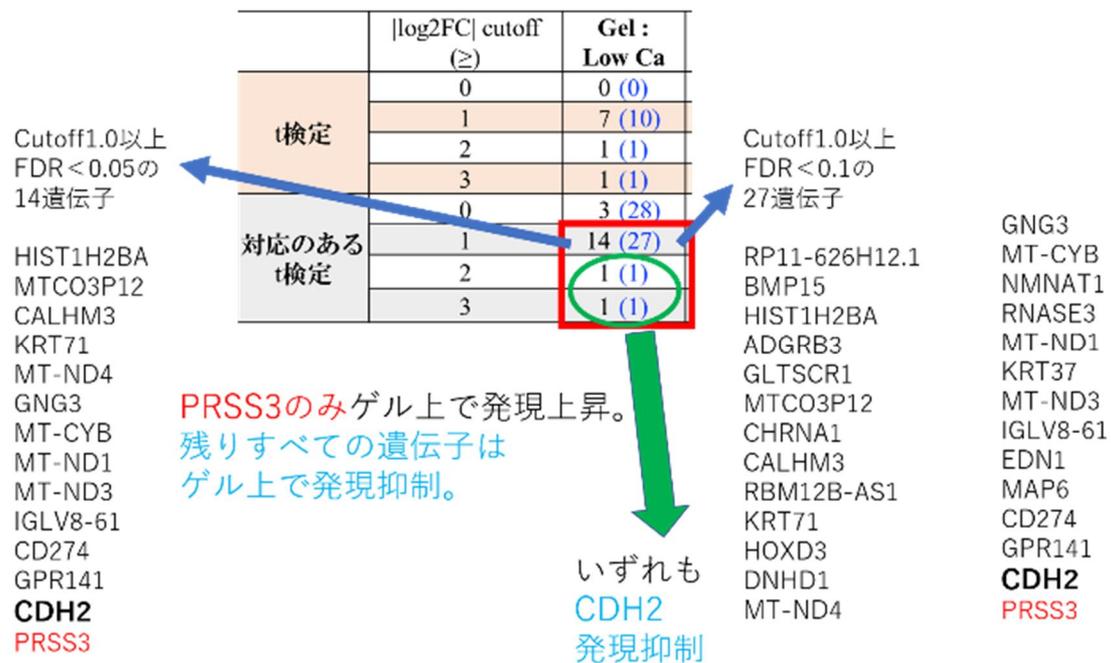
I 型コラーゲンゲル基材 (ヤング率約 5 kPa) 上と、I 型コラーゲンでコーティングした通常のプラスチック細胞培養基材 (35 mm Dish: ヤング率 2-3GPa) 上で培養した口腔粘膜角化細胞を、カルシウム濃度 0.06mM のエプライフで 3 日間培養した後、AFM で細胞のヤング率を測定した。細胞は分化度の指標となる細胞のサイズで小型 (低分化) と大型 (高分化) の細胞に分けて、研究分担者の芳賀と石原が測定した。

・カンチレバー: MLCT-C (~0.01 N/m) ・測定条件: Set Point 1 nN, Pix Time 250 ms, Z-length 4000 nm, 1x1 mm<sup>2</sup> 測定 4x4 pix

#### 4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析

通常のプラスチック細胞培養基材 (35 mm Dish) と I 型コラーゲンゲル基材で培養した細胞に対する網羅的遺伝子解析にて、遺伝子発現レベルに有意な差 (有意差レベルは FDR < 1 は、< 0.05 より緩い) が認められた遺伝子を列挙した。遺伝子発現がハイドロゲル上で培養した細胞で発現が抑制された遺伝子が多かったが、いずれの遺伝子も口腔粘膜角化細胞の機能と関連したものは認められなかった。KRT71、KRT37 の発現抑制が認められたが、いずれも毛に関連する遺伝子で、口腔粘膜とは関連が薄いと考えられた。一方、PRSS3 はハイドロゲル上での遺伝子発現亢進が認められた。PRSS3 は表皮細胞の角化過程における脱核メカニズムに参与している報告があり、口腔粘膜角化細胞の角化、非角化のメカニズムに参与している可能性が示唆された。一方、ハイドロゲル上の細胞で発現抑制されている遺伝子に CDH2 (= N-cadherin) があつた。しかし、口腔粘膜角化細胞における遺伝子発現レベルが極めて少ない遺伝子であり、WB によるタンパク発現は認められずに、タンパクレベルの同定までは至らなかった。



カルシウム濃度 0.06mM のエプライフ培地で通常のプラスチック細胞培養基材 (35 mm Dish: ヤング率 2-3GPa) 上で培養した細胞をコントロールとして、その細胞群とセルキャンパス (ヤング率約 1.78MPa) I 型コラーゲンゲルハイドロゲル (ヤング率約 5 kPa) カルシウム濃度 1.2mM のエプライフ培地で通常のプラスチック細胞培養基材の各群に

## log2FCでフィルタリングし、FDRを計算

- log<sub>2</sub>FCはNAか±lnの遺伝子を除外する
- T検定のP値はNAの遺伝子を除外する
- Cutoff値：log<sub>2</sub>FCの絶対値 >= 1.2, 3

**P < 0.05 (FDR < 0.05)**

	Fast group			Slow group		
	Gel : Low Ca	Cell Campus : Low Ca	High Ca : Low Ca	Gel : Low Ca	Cell Campus : Low Ca	High Ca : Low Ca
検定	538 (0)	1294 (0)	919 (0)	409 (0)	956 (0)	337 (0)
対応のあるt検定	1462 (0)	1939 (0)	1248 (0)	1375 (0)	1922 (0)	875 (0)
共通遺伝子数	318 (0)	921 (0)	208 (0)	253 (0)	622 (0)	75 (0)

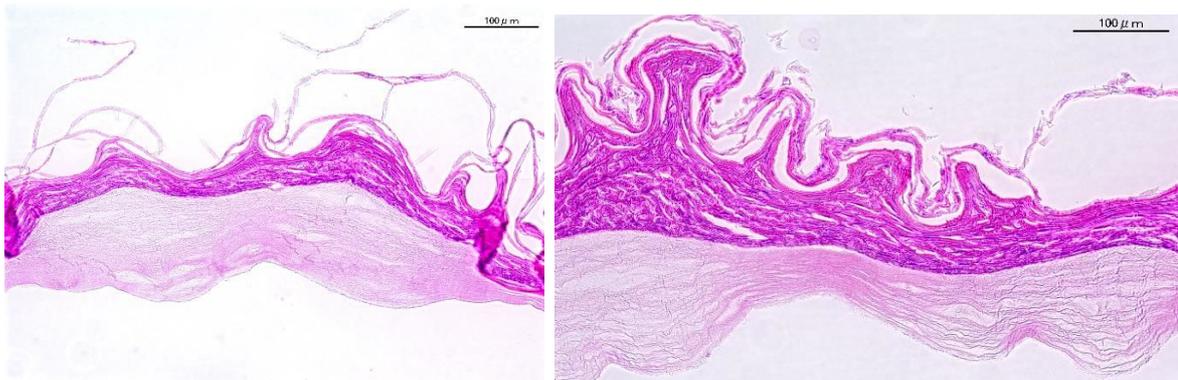
	log <sub>2</sub> FC  cutoff (≥)	Fast group			Slow group		
		Gel : Low Ca	Cell Campus : Low Ca	High Ca : Low Ca	Gel : Low Ca	Cell Campus : Low Ca	High Ca : Low Ca
検定	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	1	1 (1)	134 (351)	16 (23)	0 (3)	11 (63)	0 (0)
	2	1 (1)	59 (135)	6 (17)	0 (0)	6 (17)	0 (4)
	3	0 (0)	9 (61)	2 (4)	0 (0)	2 (10)	1 (1)
対応のあるt検定	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (0)
	1	0 (0)	1 (342)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	2	0 (0)	57 (168)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	3	0 (0)	8 (88)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (1)

おける遺伝子発現を比較した。

3 サンプルずつの運動能が速い群と遅い群に分けて検定したところ、コントロールに対しセルキャンパス上で培養した細胞比較でのDEGが最も多く、コラーゲンハイドロゲルで培養した細胞比較でのDEGが最も少なかった。また、運動能が遅い群より速い群のDEGが多かった。いずれも細胞分化、角化、増殖をコントロールする遺伝子の同定には至らなかった。

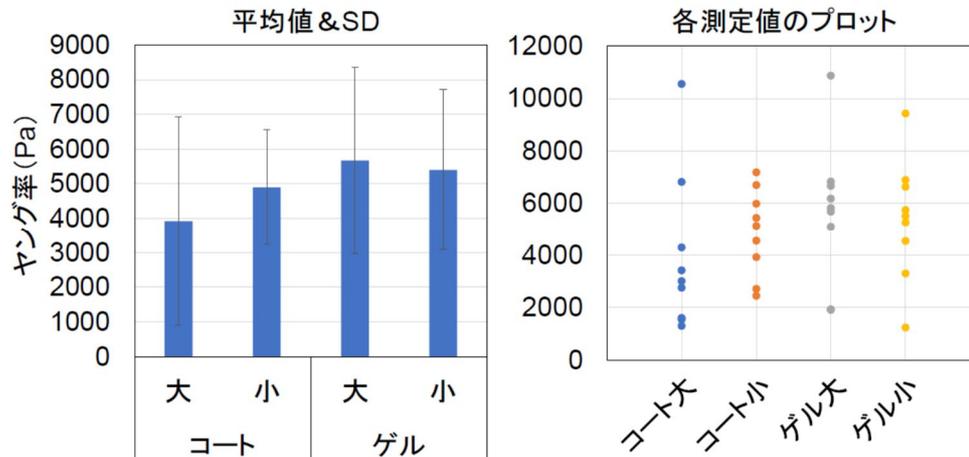
### (2) 培養口腔粘膜の組織学的解析

コラーゲン濃度 0.9, 1.0, 1.1, 1.2% で表面平坦なコラーゲンゲル足場材を作製した。右図に示すレオメーターでヤング率を測定したところ、およそ 5, 8, 8, 12kPa であった。この足場材上に口腔粘膜角化細胞を播種して培養口腔粘膜を通常のプロトコールで作製して組織学的に観察した。0.9% (左) と 1.2% (右) を使用した場合の HE 染色像を示す。いずれも分化した重層扁平上皮が形成されていた。角化層は正角化ではなく非角化を示し、十分形成されているものの、明らかな組織学的な違いは認められなかった。著明に肥厚している原因は、足場材の収縮に伴う現象であり、足場材の硬さによる可能性は低い。



### (3) 細胞ヤング率測定

細胞のヤング率に有意な差は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryota Kobayashi, Emi Hoshikawa, Taisuke Saito, Orakarn Suebsamarn, Eriko Naito, Ayako Suzuki, Seiichiro Ishihara, Hisashi Haga, Kei Tomihara, Kenji Izum	4. 巻 -
2. 論文標題 The EGF/EGFR axis and its downstream signaling pathways regulate the motility and proliferation of cultured oral keratinocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS openbio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	芳賀 永 (Haga Hisashi) (00292045)	北海道大学・先端生命科学研究院・教授  (10101)	
研究分担者	石原 誠一郎 (Ishihara Seiichiro) (10719933)	北海道大学・先端生命科学研究院・助教  (10101)	
研究分担者	加来 賢 (Kaku Masaru) (30547542)	新潟大学・医歯学系・准教授  (13101)	
研究分担者	佐藤 大祐 (Sato Taisuke) (70778703)	新潟大学・研究推進機構・助教  (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	凌 一葦  (Ling Yiwei)  (70804540)	新潟大学・医歯学系・助教    (13101)	
研究分担者	鈴木 絢子  (Suzuki Ayako)  (70869916)	新潟大学・医歯学系・特任助教    (13101)	

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