

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 31日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791964

研究課題名（和文） より活性の高い凍結培養粘膜の開発 - 口腔粘膜上皮前駆・幹細胞の確立と解明 -

研究課題名（英文） A study of the development high activity *ex vivo* produced oral mucosa equivalent by cryopreserved oral keratinocytes.

研究代表者

小山 貴寛 (KOYAMA TAKAHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30444178

研究成果の概要（和文）：

より活性の高い凍結培養細胞粘膜の開発のため、フィルタリングを行った群と行わなかった群の培養上皮細胞を用いてその細胞の活性につき検討を行い、また、同細胞を用いた培養複合口腔粘膜（凍結 EVPOME）を作製し、細胞播種後 4、11 日目の各群の培養粘膜において組織学的、免疫組織学的に評価を行った。細胞数はフィルタリング(+)群がフィルタリング(-)群に比べ、各時期において上回り、細胞播種後 4 日目と 11 日目で凍結 EVPOME の基底細胞数、PCNA 陽性細胞数がフィルタリング(+)群で多く認められた。以上の結果から、フィルタリング(+)群の凍結 EVPOME は、フィルタリング(-)群のものに比べ活性が高いことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to development of high activity freeze culture cell mucosa. The cell activity of filtered keratinocytes compared these of not filtered keratinocytes. We made culture composition oral mucosa (freeze EVPOME) which we used the cell for and it was histological and immunohistological evaluated it in 4, culture mucosa of each group of the eleventh day after cell dissemination. A filtering (+) group compared cell count with a filtering (-) group and exceeded it in each time, and there was many it, and base cell count of freeze EVPOME, PCNA counts were found in a filtering (+) group after cell dissemination by the fourth day and the eleventh day. The results of this study were indicated that the freeze EVPOME of a filtering (+) group were higher activity than a thing of a filtering (-) group.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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： (1) 組織工学 (2) 口腔粘膜上皮前駆・幹細胞 (3) 凍結保存
(4) 凍結培養粘膜

1. 研究開始当初の背景

従来 of 皮膚移植・人工真皮に変わる材料と

して、皮膚の分野では、1975年にGreenらによってBell型培養人工皮膚が開発されて以来、ティッシュエンジニアリングによる培養皮膚が広範の火傷治療に使用されるなど、比較的早期に臨床応用されてきた。この培養皮膚の手法を基礎として、現在まで口腔粘膜の再生も同様に開発、研究がなされてきている。代表者の共同研究者が米国ミシガン大学口腔外科、形成外科との共同研究で開発した培養複合口腔粘膜(ex-vivo oral mucosa equivalent; 以下 EVPOMEと略す)は、ヒト培養口腔粘膜上皮細胞とヒト新鮮屍体真皮であるAlloDerm®で構成される口腔粘膜代替生体材料である。特徴として

1. 組織学的に上皮層、真皮層が明確に観察され、口腔粘膜組織に非常に類似している
2. 動物由来の血清、マウスの細胞等を用いたfeeder layerを使用しないため、未知の生物による感染等のリスクがない
3. 真皮層としてAlloDerm®使用することで、培養上皮シートなどシート状の生体材料と比較して強度が強く、移植手術材料として扱いやすい

などが挙げられ、その有用性についても多数の報告がされている。(IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999., IZUMI K; Jpn J Oral Maxillofac Surg 47(5):289-292 2001., YOSHIZAWA M; J Oral Maxillofac Surg 62:980-988 2004.)

新潟大学では新潟大学歯学部倫理委員会の承認を得て2001年よりEVPOMEの臨床応用を開始し、2002年度から2004年度には文部科学省より高度先進医療開発経費の援助を受け、EVPOME移植の適応症の検討を目的に神戸大学、富山大学と共同研究を開始、さらには米国ミシガン大学においても臨床応用が行なわれるようになり、現在までに100例以上の症例に対しEVPOME移植を行い、臨床的にも良好な結果を得ている。

2. 研究の目的

今回の研究から口腔粘膜上皮前駆・幹細胞の単離方法を確認し、その前駆・幹細胞を凍結保存した後の細胞において、通常の培養方法を用いた細胞と比較してより高い細胞活性を示すことができれば、活性の高い凍結培養細胞を用いた培養口腔粘膜の作製が可能になることとなり、唇顎口蓋裂患者への応用だけでなく、他の口腔外科、歯周外科手術の複数回の手術が必要となる場合に適用できることとなり、歯科口腔外科における組織再建手術に大きな役割を果たすとともに口腔機能の回復に多大な貢献をすることを目的とする。

3. 研究の方法

当施設で行われている培養システムを用いて口腔粘膜上皮細胞の培養を行う。Igarashiら(Oral Disease 14: 413-418 2008)の方法を応用し、口腔粘膜上皮前駆・幹細胞を同定し、口腔粘膜上皮前駆・幹細胞と同細胞を凍結保存し解凍したものの活性について、通常の培養を行ったものと比較を行う。以上のことより、今回、口腔粘膜上皮前駆・幹細胞の単離方法を確認し、その細胞集団の増殖活性と凍結保存後における同細胞集団の細胞活性を明らかにする。

また、活性の高い凍結培養細胞を用いた培養口腔粘膜の作製を行う。

4. 研究成果

(1) 緒言

研究代表者らは、凍結培養細胞を用いた培養複合口腔粘膜の作製が可能であることを報告した。口腔粘膜上皮前駆・幹細胞の単離方法を確認し、その前駆・幹細胞を凍結保存した後の細胞において、通常の培養方法を用いた細胞と比較してより高い細胞活性を示すことができれば、活性の高い凍結培養細胞を用いた培養口腔粘膜の作製が可能になると考え、今回の研究を行うに至った。

(2) 材料及び方法

① 材料

実験には新潟大学医歯学総合病院口腔外科において、同意が得られた患者の口腔外科小手術時に余剰となったヒト正常口腔粘膜を使用した。

② 上皮細胞の培養方法

上皮細胞の培養は、Izumiら(IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999)の方法に準じて行った。細胞培養用の培地は、カルシウム濃度が0.06mMのEpiLifeに human keratinocyte growth supplement-V2、penicillin/streptomycin/amphotericin solution、(Cascade Biologics, Portland, OR, USA)を使用した。T-25 フラスコ(Corning, NY, USA)に上皮細胞を播種し、37°C、5%CO₂インキュベーター中で培養した。培地の交換は2日毎に行い、80%コンフルエントになった時点で継代を行った。

③ 凍結保存および解凍方法

1回目の継代の際に、凍結保存を行う細胞と非凍結細胞でEVPOMEを作製する細胞の2群に分けた。凍結保存液には、凍害防止剤として10%ジメチルスルホキシド(以下DMSO)含有で、無血清タイプのバンバンカー®(日本ジェネティクス、東京)を用いた。-80°Cで6か月間凍結保存を行った。凍結保存後、

培養細胞を 37℃恒温槽中の温水中で急速解凍し、凍結保存液を除くため、低 Ca 培地を加えて希釈し、解凍後の培養細胞（以下凍結培養細胞）を遠心洗浄した。その後、凍結培養細胞を 5ml の低 Ca 培地に懸濁し T-25 フラスコに播種して再度培養を開始した。80%コンフルエントになった時点で培養粘膜を作製した。

③細胞増殖能の測定

フィルタリングを行った群とフィルタリングを行っていない群において解凍後の上皮細胞を継代時の細胞数のカウントを行い、細胞の増殖能力に関して検討を行った。

④EVPOMEの作製

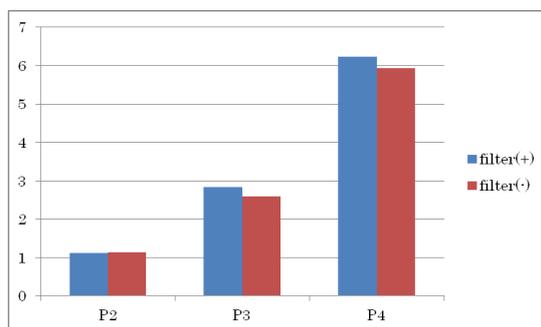
Izumiら (IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999)の方法に準じて、凍結培養細胞を用いて培養複合口腔粘膜を作製した。対照として培養細胞を用いた培養粘膜を作製した。TypeIVコラーゲン (BD biosciences) でコーティング後のAlloDerm®上に、 1.25×10^5 個/cm²の細胞を播種した。この際、カルシウム濃度を1.2mMに増加させたEpiLifeを用いた。凍結培養細胞を用いた培養粘膜と培養粘膜を、細胞播種後4日間は培地に浸漬した状態で、その後2週間はair-liquid interfaceの状況下で培養を行った。

⑤組織学的検討

採取した検体を10%中性ホルマリン液で固定後、通常に従いパラフィン包埋、4μmの連続切片を作製した。作製した切片は、ヘマトキシリンエオジン染色とPCNA抗体による免疫染色を行い、作製した培養粘膜の評価を行った。

(3) 結果

1) 細胞数の推移 (n=4)



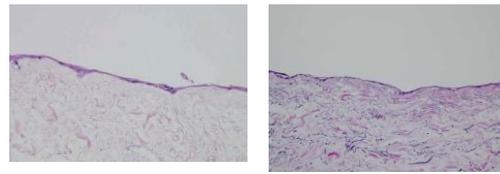
統計学的な有意差は認めないものの、フィルター (+) 群のほうが、(-) 群に比し細胞数の増加が認められた。

2) 組織像

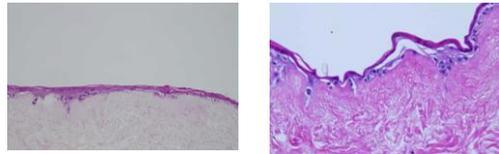
①HE 染色像

フィルタリング(+) フィルタリング(-)

Day4



Day11



フィルタリング(+)の培養粘膜が、(-)の培養粘膜に比し基底層の細胞配列が整っており、細胞数も多くみられた。

抗 PCNA 抗体像

フィルタリング(+) フィルタリング(-)

Day4



Day11



PCNA 陽性反応の細胞数においてフィルタリング(+)の培養粘膜の方が、(-) に比べて多く認められた。

(4) 考察

以上の結果より、口腔粘膜上皮前駆・幹細胞の同定には至らなかったが、フィルタリングを行った口腔粘膜上細胞を用いた場合、フィルタリングを行わなかった口腔粘膜上皮細胞を用いた場合に比べ、より活性が高いことが示唆された。

今後は、フィルタリングを行った細胞の性質解明と、培養粘膜の治癒機転を比較し臨床応用に結びつけていきたい。

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 0 件)

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 貴寛 (KOYAMA TAKAHIRO)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30444178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし