

令和 6 年 8 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16559

研究課題名（和文）他家線維芽細胞シート移植に向けた治療効果の高い細胞バンク構築の為の細胞特性解析

研究課題名（英文）Analysis of fibroblast isolated from gingiva

研究代表者

溝口 高弘（MIZOGUCHI, Takahiro）

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：90844796

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ドナーから得られた歯肉組織由来の線維芽細胞は、CD44、CD73、CD90を発現していた。この線維芽細胞は、IFN- γ がない培養環境において、HLA class Iの陽性率は99%であったが、IFN- γ 存在下での培養環境において、HLA class Iの陽性は更に右側にシフトした。ドナーから得られた歯肉組織由来の線維芽細胞の50%以上、CD274陽性を示す細胞であったが、IFN- γ 存在下で、その陽性率は、90%以上となった。この結果は、ドナーから得られた歯肉組織由来の線維芽細胞は、炎症環境下において、強力な免疫拒絶を受けにくい可能性があることを示唆していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、将来の他家細胞移植の細胞として、歯肉組織由来の線維芽細胞に着目し、その細胞の特徴を解析した。

他家細胞の原料組織としては、その入手方法の容易さが重要であると考えられている。我々は、親知らず抜歯時に破棄する歯肉組織であれば、永続的に容易に入手できる原料組織になると考えた。

本研究では、ドナー5名から得た歯肉組織由来の線維芽細胞の特徴を解析したところ、歯肉組織から線維芽細胞を得ることは可能であり、その細胞の特性も共通していると思われた。これらの結果から、歯肉組織由来の線維芽細胞は、他家細胞移植の細胞として利用可能であると示唆された。

研究成果の概要（英文）：CD44, CD73 and CD90 were expressed in fibroblasts isolated from gingiva provided by donors. HLA class I was expressed in fibroblasts in culture without IFN- γ . The population of HLA class I-positive fibroblasts was shifted further to the right side in culture with IFN- γ . CD274 was expressed in more than 50% of fibroblasts in culture without IFN- γ . CD274 was expressed in more than 90% of fibroblasts in culture with IFN- γ . These results suggest that fibroblasts isolated from gingiva might be less susceptible to strong immune rejection.

研究分野：血管外科

キーワード：他家細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞移植による再生医療の普及のポイントは、低コスト、且つ、治療効果の高い細胞が簡単に使用できることである。

移植細胞は、患者由来の自家細胞と、患者以外のヒトに由来する他家細胞がある。自家細胞は患者由来の為、細胞増殖能が十分でないことや、移植細胞としての品質が低い為に、期待された治療効果が得られないことがある。また、自家細胞移植は、オーダーメイド医療の為、細胞培養に日数を要し、細胞毎に感染の有無などの安全性確認検査を実施する必要がある為、高コストになってしまう。そのため、日本で上市されている自家細胞由来の再生医療等製品は、1000万円以上と高額になっている。

それらを解決する方法が、他家細胞移植である。品質の高い細胞を選定し、十分な量まで培養し、保存しておくことで、検査や培養にかかる費用を低く抑えることができる。また、移植が必要な時に、自家細胞では培養日数が必要であるが、細胞の準備が来ている他家細胞では、高い治療効果が期待できる細胞移植治療を直ちに開始出来る。

我々は、2018年3月から、難治性皮膚潰瘍に対して、患者の口腔内組織由来の線維芽細胞と末梢血単核球を混合培養して作製した自家細胞混合シートを移植する臨床研究を実施した(jRCTb060190034 <https://jrct.niph.go.jp/latest-detail/jRCTb060190034>)。その中で、患者由来の自家線維芽細胞が十分増殖しない、あるいは、品質が低くて使用出来ないという経験し、自家細胞を用いた再生医療の実用化は困難であると判断した。

我々は、他家線維芽細胞シート移植の開発に、必要な理想的な細胞として、若年者由来の細胞であれば、治療効果が高いのではないかと考えた。また、細胞源となる組織を提供するドナーに対する侵襲が少なく、若年者由来の組織を入手する方法として、我々は、歯科口腔外科で、親知らず抜歯時に破棄される余剰歯肉組織から線維芽細胞を単離してバンク化することを考えた。歯科矯正時には親知らず抜歯をすることから、ドナーの年齢を12~25歳と設定し、樹立する線維芽細胞10株を目標に、我々は、親知らず抜歯時の歯肉組織から線維芽細胞を単離してバンク化する研究である、「再生医療を想定した他家細胞バンク構築に関する臨床研究 (#2020-123)」(https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr_view.cgi?recptno=R000048289)を開始するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、他家線維芽細胞シート移植の高い治療効果を実現するために、細胞移植に最適な他家線維芽細胞の特徴を見出すことである。

3. 研究の方法

(1) 歯肉組織由来線維芽細胞

本実験では、5名のドナーから得た歯肉組織由来の線維芽細胞5株を使用した。

(2) 細胞の倍加時間の評価

線維芽細胞4株のP3~P5までの倍加時間を評価した。

(3) 細胞表面抗原解析

線維芽細胞5株のCD44、CD73、CD90、CD105、CD166の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。

線維芽細胞5株をIFN- γ の有無で培養し、HLA class I、HLA class II、CD274の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞の倍加時間の評価

ドナーから得た歯肉組織由来の線維芽細胞のP3~P5の倍加時間は約20~25時間であった(表1)。

表1 細胞の倍加時間[h]

	P3	P4	P5
No2	23.46	24.63	25.49
No3	23.05	24.49	23.77
No4	23.08	25.00	24.09
No5	19.62	23.53	21.45

(2) 細胞表面抗原解析

線維芽細胞 5 株の CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した (表 2)。

CD44、CD73、CD90 は、ドナーから得た歯肉組織由来の線維芽細胞において、ほとんどの細胞が発現していた。ドナーから得た歯肉組織由来の線維芽細胞における CD105 の陽性率は、16~66%とドナー毎にバラツキが観察された。また、ドナーから得た歯肉組織由来の線維芽細胞における CD166 の陽性率は、62~69%とドナー毎にバラツキが観察された。

表 2 CD44、CD73、CD90、CD105、CD166 の発現レベル

	No1	No2	No3	No4	No5
CD44	99.6	99.6	99.7	99.8	99.9
CD73	98.6	99.3	97.3	99.3	99.7
CD90	99.8	99.8	99.8	99.9	99.7
CD105	16.4	65.7	55.2	66.7	61.3
CD166	62.8	87.3	91.1	94.4	76.8

(3) 細胞表面抗原解析

線維芽細胞 5 株を IFN- γ の有無で培養し、HLA class I、HLA class II、CD274 の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した。

図 1 は、IFN- γ の有無で 48 時間培養し、HLA class I、HLA class II、CD274 の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した代表的な図を示した。

HLA class I は、IFN- γ 無しで培養しても、陽性率は 99%であったが、IFN- γ 有りで培養すると、陽性の細胞集団が更に右側にシフトした。

線維芽細胞を IFN- γ 無しで培養した場合、HLA class II は発現していないが、IFN- γ 有りで培養した場合、HLA class II が陽性である細胞集団を観察した。

図 1 IFN- γ の有無で培養した HLA class I、HLA class II の発現レベルの変化

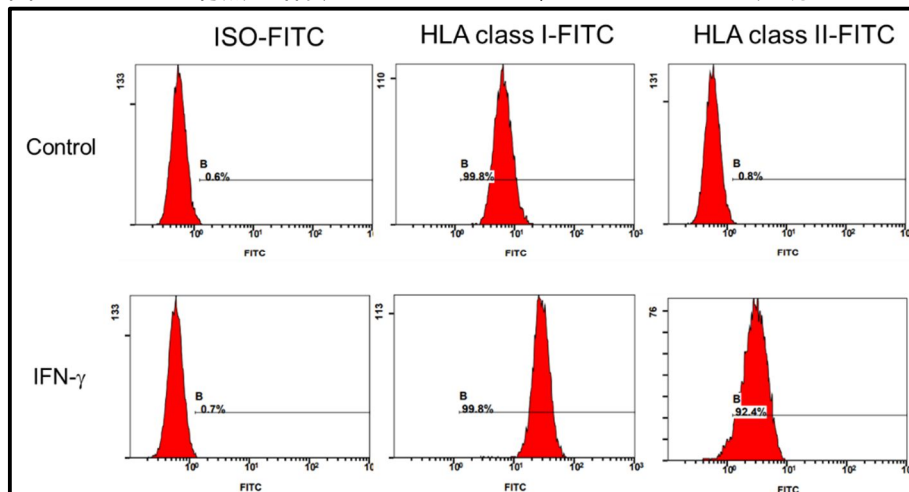


表 3 は、IFN- γ の有無で培養した線維芽細胞における HLA class I、HLA class II、CD274 の発現レベルをフローサイトメトリーで解析した結果を示した。

線維芽細胞 5 株に共通して、IFN- γ 無しで培養しても、HLA class I の陽性率は 99%であったが、IFN- γ 有りで培養すると、陽性の細胞集団が更に右側にシフトした。また、線維芽細胞を IFN- γ 無しで培養した場合、HLA class II は発現していないが、IFN- γ 有りで培養した場合、HLA class II の陽性を示す細胞集団が 56~91%と観察された。

CD274 は、IFN- γ 無しで培養しても、57%以上の細胞が陽性であったが、IFN- γ 有りで培養した場合、線維芽細胞 5 株に共通して、その陽性率は 90%以上となった。

表 3 IFN- γ の有無で培養した HLA class I、HLA class II、CD274 の発現レベル

	No1		No2		No3		No4		No5	
	control	IFN- γ	control	IFN- γ	control	IFN- γ	control	IFN- γ	control	IFN- γ
HLA class I	99.2	99.1	99.1	99.1	99.7	99.6	99.7	99.4	99.6	99.7
HLA class II	0.2	91.7	0.2	56.9	0.2	87.8	0.6	74.3	0.6	72.2
CD274	65.1	95.9	70.1	94.4	62.9	95.8	57.8	96.1	68.7	91.4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsunaga Kazumasa, Tsubone Sarii, Lv Bochao, Kobayashi Sei, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Samura Makoto, Suehiro Kotaro, Harada Takasuke, Morikage Noriyasu, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Is a Major Source of Nitric Oxide in Saphenous Vein Grafts Harvested via the No Touch Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e020637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.120.020637	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 -

1. 著者名 Soichi Ike, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Takahiro Mizoguchi, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Tomoko Kondo, Tomoaki Murata, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 14
2. 論文標題 Cryopreserved allogenic fibroblast sheets: development of a promising treatment for refractory skin ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3879-3892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------