

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592882

研究課題名(和文) 培養口腔粘膜上皮細胞とハイドロゲルのミックス材を用いた皮膚創傷治癒効果の検証

研究課題名(英文) The verification of the effects on the epidermal wound healing by the topical application of the mixture of cultured oral keratinocytes and hydrogel.

研究代表者

安島 久雄 (ajima, hisao)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80377150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の長期目標は本学の口腔粘膜細胞培養テクノロジーを発展させ、口腔粘膜細胞による口腔外上皮欠損の再生治療の実現である。本研究ではハイドロゲル材に培養口腔粘膜上皮細胞を混和したミックスゲルを創製し、熱傷や虚血性皮膚難治性潰瘍などの皮膚創傷治療への応用を図るため、各種サイトカインのELISA分析を行った。VEGFに関しては量的にはクリアしているものの個体差によるばらつきが非常に大きく、さらにサイトカインの測定においても、細胞によっては測定限界以下である場合もあり、細胞間のばらつきが大きいことが分かった。この現象は、動物実験に移行した際、データに影響することが予想された。

研究成果の概要(英文)：Our long-term goal is to develop the current technology of oral mucosa keratinocyte culture system, and treat wounds by using cultured oral keratinocytes to regenerate epithelial defects. This study aimed to produce the mixture of cultured oral keratinocytes and hydrogel and assess the feasibility and effects on epidermal wound care such as burns and ischemic vicious ulcers. We measured the levels of various cytokines secreted from the mixture by ELISA assay. Based on measurement of the cytokine production, we found VEGF was sufficiently secreted into the culture supernatant although there were remarkable variations among samples. Furthermore, other cytokines also showed more remarkable variations in which some of them were undetectable. Thus, we concluded that these variations should have a negative impact on the in vivo animal study and it would be difficult to obtain the consistent outcomes. As a result, we may need to find a different strategy for cells to produce cytokines.

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯科医用工学

キーワード：口腔培養粘膜 ハイドロミックスゲル 創傷治療

## 1. 研究開始当初の背景

培養表皮/真皮/皮膚は最も早くに臨床応用された組織であり、皮膚欠損を再建する臨床現場(先天性疾患・外科的切除)で積極的に患者治療に利用されてきた。当初培養細胞から3次元組織、あるいはシート状組織を作成し完全な“皮膚組織”として移植する方法が主流であり、拒絶反応がない患者自身の自家細胞で“代替皮膚”は作成される。植皮同様に扱える利点がある反面、欠点は自家組織を採取してから細胞を増やす必要があり、時間とコストを要した。

近年では、3次元組織を作成する方法に加え、健全な宿主細胞の再生能力の刺激・誘導を目的に培養上皮細胞を創部にスプレーで塗布する方法が開発され、急性(火傷など)・慢性(糖尿病性潰瘍など)皮膚創傷治療にも適応範囲を拡大された。すなわち自家細胞以外に、創部“生着”を目的としないため他家細胞で、かつ何回もアプライ可能であり、細胞の在庫ストックと長期保存が可能になるので安価で大規模な細胞供給を実現することができる。そのメカニズムは、単一の成長因子を含むフィブリン糊の塗布だけで肉芽形成はしないが、糊中の“生きている”細胞から放出される様々な血管新生因子や成長因子が患者自身の細胞を刺激し、創面を閉鎖させるものである。フィブリン製剤はスプレー化できるので、使い勝手が非常によい。しかし不幸にもわが国ではフィブリン製剤による薬害訴訟が起きており、フィブリンそのものが使いづらい。その点、完全合成ゲル製材はスプレーと材料形態こそ違うものの、軟膏状の性状であり臨床医も非常に使いやすいことは間違いない。

皮膚に比べると口腔粘膜が細胞培養、あるいは不潔な創に適応することにおいて有利な点が多い。(1)口腔内環境はもともと細菌が多く存在し、そこで生存する口腔粘膜は生来微生物に対して抵抗性がある。(2)口腔か

らの組織採取は歯科医であれば誰でも可能で、かつ非常に容易であり、採取部位となる新たな創は目立ちにくい。つまりドナー組織へのアクセスが良い。(3)口腔粘膜のターンオーバーは皮膚の約半分だが、これはそのまま培養細胞にもあてはまり、培養環境でも口腔粘膜上皮細胞は皮膚より増殖が速い。(4)手足や体幹に傷を負ったり、潰瘍を患っている患者であっても、口腔内に外傷や潰瘍が存在していることは少なく、口腔粘膜は健全な組織のままのことが多い。以上から再生医療に培養口腔粘膜を用い、独自の皮膚創傷治療アプローチ法を本研究で探求することは、我が国の歯科界から発信できる大きな再生医療のソースである。

## 2. 研究の目的

本研究の長期目標は本学の口腔粘膜細胞培養テクノロジーを発展させ、口腔粘膜細胞による口腔外上皮欠損の再生治療の実現である。本研究ではハイドロゲル材に培養口腔粘膜上皮細胞を混和したミックスゲルを創製し、皮膚創傷治療(熱傷など急性創傷治療および糖尿病、虚血性皮膚難治性潰瘍など慢性創傷治療)への応用を図るため、(1)in vitro のデータ蓄積と(2)in vivo のデータ収集を目的とする。後者では糖尿病マウスを用いミックスゲルの単独投与による創傷治癒効果とアプライ方法(塗布間隔)の検証を行う。細胞が産生する成長因子で宿主細胞を活性化させる研究戦略は、細胞の移植床への生着の必要がなく他家細胞で対応でき、実用化に有利である。

## 3. 研究の方法

本研究では計3つの目標を設定した。平成23年度(1)in vitro データの蓄積によって、ミックスゲルの最も効果的な細胞密度とゲル濃度を決定する。MTT アッセイにより細胞のゲル内における細胞活性とVEGF, FGF, KGF, TGF、ベータディフェンシンなど、細胞が

産生する成長因子をELISA法で測定し検討を行う。24-25年度は(2)培養口腔粘膜上皮細胞による糖尿病マウスのin vivo創傷治癒効果の肉眼的、組織学的検証に入る。まず細胞を混和したミックスゲルを糖尿病マウスの全層皮膚欠損に1回だけ塗布して経時的に創傷治癒を観察し、投与量を決定する。また口腔粘膜と皮膚の上皮細胞で比較する。更に(3)複数回塗布による場合のアプライ方法(塗布間隔)と、どのプロトコールが最も治癒に効果的で、コストベネフィットが高いか検討する。最後に安全性確認のため、マーキングした培養口腔粘膜上皮細胞の創部残存度も組織学的に観察する。

#### 4. 研究成果

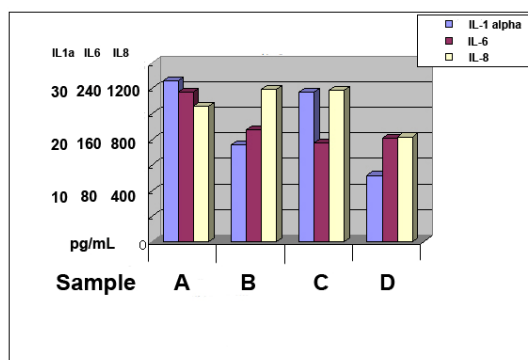
平成23年度(1)in vitroデータの蓄積によって、ミックスゲルの最も効果的な細胞密度とゲル濃度を決定する。MTTアッセイにより細胞のゲル内における細胞活性とVEGF, FGF, KGF, TGF、ベータディフェンシンなど、細胞が産生する成長因子をELISA法で測定し検討を行った。

平成24~25年度は(2)培養口腔粘膜上皮細胞による糖尿病マウスのin vivo創傷治癒効果の肉眼的、組織学的検証に入る。まず細胞を混和したミックスゲルを糖尿病マウスの全層皮膚欠損に1回だけ塗布して経時的に創傷治癒を観察し、投与量を決定する。また口腔粘膜と皮膚の上皮細胞で比較した。

更に(3)複数回塗布による場合のアプライ方法(塗布間隔)と、どのプロトコールが最も治癒に効果的で、コストベネフィットが高いか検討し、最後に安全性確認のため、マーキングした培養口腔粘膜上皮細胞の創部残存度も組織学的に観察を行うことを予定した。

創傷治癒に関連すると言われている各種サイトカインのELISA分析を行なった結果、VEGFに関しては量的にはクリアしているものの個体差によるばらつきが非常に大きくなった。さらに、サイトカインの測定においても、細

胞によっては測定限界以下である場合もあり、細胞間のばらつきが大きかった。この予想以上のデータのばらつきを突き止めたことは、ある程度の成果ではあったが、動物実験に移行する前に、こうした細胞によるサイトカイン産生能の違い、ばらつきがあった場合に、動物実験に移行して有意差を導くことができる可能性は低いことが予想され、平成25年度は細胞におけるサイトカイン産生能の違いからばらつきを求めた。



#### 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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

安島 久雄 (AJIMA, Hisao)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80377150

(2)研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

泉 健次 (IZUMI, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80242436

(3)連携研究者

( )

研究者番号：