

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：23592982

研究課題名(和文) 安定した高い粘膜再生能を有する培養粘膜の開発 - 口腔粘膜上皮前駆 / 幹細胞の応用 -

研究課題名(英文) Development of tissue engineered oral mucosa maintaining higher regenerative potential -application of oral mucosa progenitor/stem cells-

研究代表者

芳澤 享子 (Yoshizawa, Michiko)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：60303137

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)：私たちは培養口腔粘膜(EVPOME)の開発とその臨床応用とそのすぐれた粘膜再生能について検討してきた。しかし、現在の方法では上皮細胞は増殖能、分化能が不均一な細胞集団のため、患者によっては細胞増殖能の不良なEVPOMEが作製される恐れがある。本研究では口腔粘膜上皮前駆 / 幹細胞が多いとされる小型細胞集団よりEVPOMEを作製しその粘膜再生能を評価し、マウス背部皮下に移植して継時的に形態学的に検討した。その結果、小型細胞集団よりなるEVPOMEの方が細胞増殖能に優れ、移植後の上皮層の伸長と重層化が促進された。このことより安定した高い粘膜再生能を有するEVPOMEの作製が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the application of ex vivo-produced oral mucosa equivalent (EVPOME) and its ability of oral mucosa regeneration. However, cultivated epithelial cells using the present methods has heterogeneity, consequently, there is a risk that EVPOME possess poor cell growth activity and capability of oral mucosa regeneration. The objective of the present study was to investigate the capability of EVPOME fabricated with small-sized cell population in which oral mucosal progenitor/stem-cell-enriched subpopulation present and the change after EVPOME grafting subcutaneously in mice histologically. More Ki-67 positive cells were observed in the epithelial cells of EVPOME fabricated by small-sized cell population. Epithelial elongation of EVPOME fabricated by small-sized cell population occurs faster than that of EVPOME using present methods. These findings suggest that EVPOME with small-sized cell population has high activity and capability of oral mucosal regeneration.

研究分野：医歯薬系

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 口腔顎顔面再建外科学 口腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 培養粘膜に関する研究

1990年代に組織工学による培養上皮シート研究が多く行われたが、強度的に脆弱で取り扱いにくいこと、スローウィルス感染を引き起こしうるウシ胎仔血清や、細胞の増殖を促すためにマウスの細胞 (feeder layer) と患者の細胞が一時的に共培養されることが問題点に挙げられる。

(2) 培養複合口腔粘膜(EVPOME)の開発と臨床応用

そのため私たちはウシ由来物質やマウスの細胞との共培養を除外した培養方法を採用し、米国 FDA の認可を受け、世界的に広く臨床応用されているヒト無細胞性真皮 (AlloDerm®、米国 LifeCell 社) と患者自身の口腔粘膜上皮細胞とを用いて培養複合口腔粘膜 (以下 EVPOME) の作製に成功した。EVPOME は、より安全性の高い培養システムを用いていることと、ヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) に口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化しているために口腔粘膜と組織学的に類似している上に操作性に優れていることが大きな特徴である。2000年に新潟大学歯学部倫理委員会で承認を得て、臨床応用を開始し、2002年度から2004度には文部科学省高度先進医療開発経費 (B) が採択され、神戸大学、富山大学と EVPOME 移植の適応拡大を目的とした共同研究をすすめ、3施設で合計約 100 例の臨床応用を経験し、全例生着し、癒痕も少ない良好な結果を得ている。

(3) EVPOME の粘膜再生過程に関する基礎的研究

一方、基礎的研究として、動物移植モデルや臨床応用例での EVPOME による再生過程について検討し、ヌードマウス皮下移植モデル、口腔内移植モデルより、以下のことが解明されている。

①EVPOME 上皮は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を放出、血管新生を誘導

②EVPOME 上皮は移植後速やかに再生上皮を誘導

③EVPOME 基底膜はリモデリングにより上皮再生を誘導

これらの研究より EVPOME の培養細胞が粘膜再生に大きく関与していることが明らかである。

しかしながら現在の方法で培養した上皮細胞はその増殖能、分化能が不均一な細胞集団であり、患者によっては細胞増殖能の不良な EVPOME が作製されるリスクが危惧される。現在本学医歯学総合病院では 2007 年に GMP グレードに準拠した細胞プロセッシングルーム (CPR) が設置され、EVPOME 移植も「再生医療プロジェクト」の一つとして CPR での厳重な品質管理のもと製造、出荷判定がなされるようになったが、それ以前に作製した多くの症例の中には、培養細胞の増殖が遅いために組織採取を複数回行った症例や最終的に EVPOME 移植を断念した症例も私たちは経験している。

2. 研究の目的

今後より多くの症例に対して臨床応用を進めるには、安定した高い粘膜再生能を有する EVPOME の作製が必要であることから、本研究では増殖能が高い均一な細胞集団である口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団が多く含まれているといわれている小型細胞集団を選別して EVPOME を作製し、その高い増殖能を有する EVPOME についてフラスコ内で作製した状態と生体内移植後の変化、つまり *in vitro*、*in vivo* の両面からその粘膜再生能および再生機構を評価する

3. 研究の方法

(1) EVPOME の作製と組織学的、免疫組織学的検索

①ヒト口腔粘膜上皮細胞を EpiLife 培地で培養し、1, 2 回目の継代時にフィルターシステム (Falcon, 70 μm) を用いて、小型

の細胞群を選別して EVPOME を作製（実験群）。対照群として従来の方法で EVPOME を作製。

ホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

②上皮細胞マーカーであるサイトケラチン 17(CK17)、細胞増殖マーカーである Ki-67 に対する抗体を用いて EVPOME の上皮細胞の増殖能や分化能を免疫組織化学的に検索した。

(2) EVPOME をヌードマウス背部皮下に移植、組織学的、免疫組織学的観察

①5 週齢のヌードマウス(BALB/c)の背部皮膚を約 10mm 切開し、両群の EVPOME をそれぞれ底面が皮膚側になるように移植し、移植後 5, 7, 14, 21 日目に EVPOME 移植部を周囲組織も含めて切除し、摘出。

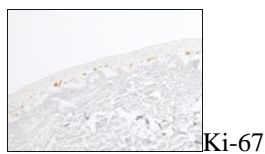
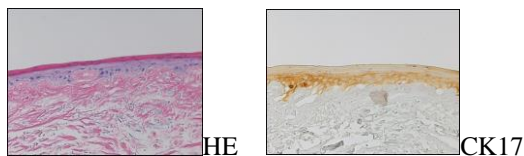
②摘出物をホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

③CK17、Ki-67 に対して免疫組織化学的に検索した。

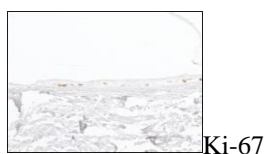
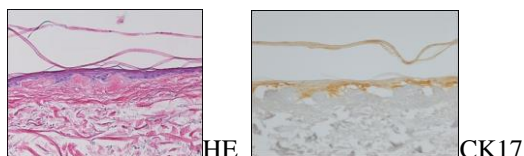
4. 研究成果

(1) EVPOME

<実験群>



<対照群>



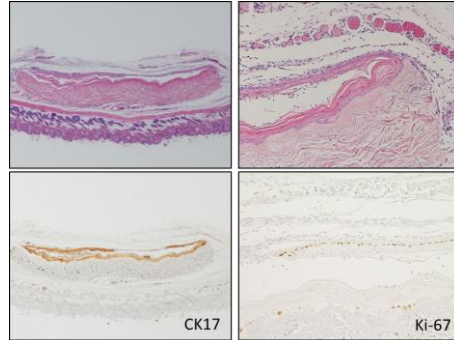
実験群の EVPOME は対照群と比較し上皮層全体や基底層が厚く、角化層の剥離もみられない。培養上皮は両群ともに CK17 陽性反応を示し、Ki-67 陽性を示す上皮細胞は実験群

の上皮の方に多い傾向にある。

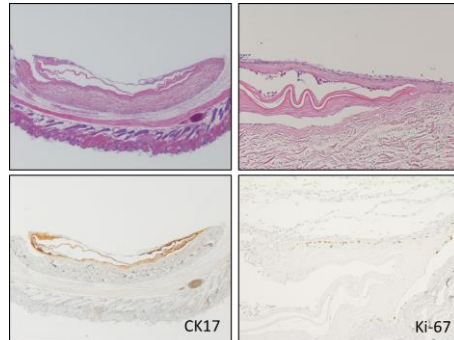
(2) 背部皮下移植モデル

①移植後 5 日目

<実験群>



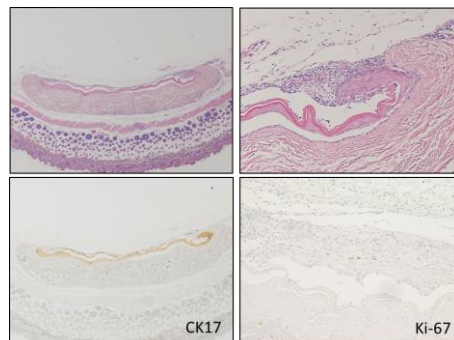
<対照群>



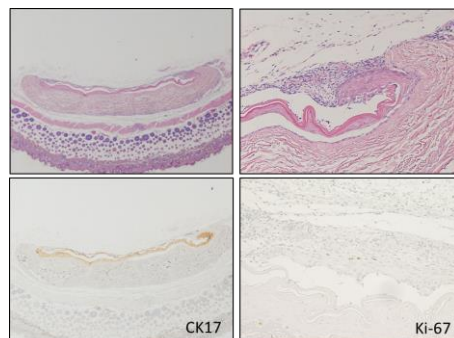
両群ともに、CK17 陽性の EVPOME 上皮の上全体に肉芽組織が被覆しており、EVPOME 両端より上皮がそれに沿って伸長している。両端より伸長している上皮は両群とも Ki-67 陽性の細胞が多く認めるが、実験群の方がより多い傾向にある。

② 移植後 7 日目

<実験群>

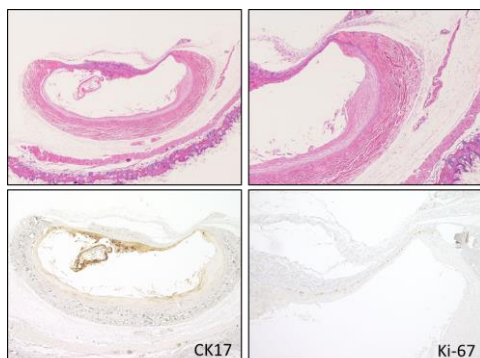


<対照群>

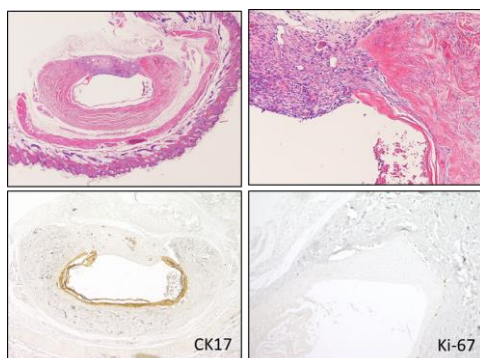


両群とも、両端の EVPOME 上皮の上にやや厚みを増した肉芽組織が被覆し、その肉芽組織に沿って、EVPOME 上皮が両端から厚みを増しながら内側に向かい伸長している。両群の上皮層とも Ki-67 陽性細胞数が 5 日目よりも減少している。

③移植後 14 日目
 <実験群>

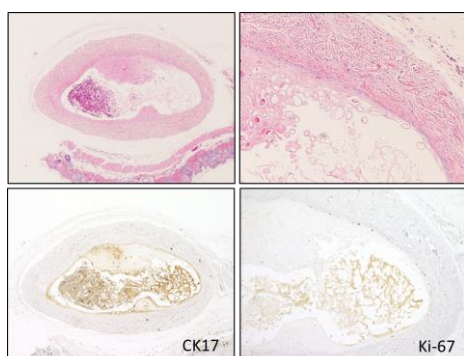


<対照群>

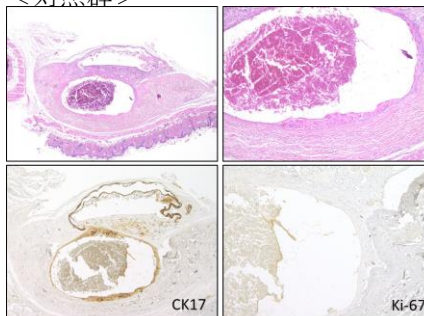


両群とも、EVPOME 上皮から連続して毛細血管を多数含んだ肉芽組織が増生している。内腔には剥離した角化上皮が含まれている。その肉芽組織に沿うように EVPOME 上皮が伸長しているが、実験群の方がその速度が速く、両端の上皮が連続し腔状を呈している。Ki-67 陽性細胞は実験群の方が多く認められる。

④移植後 21 日目
 <実験群>



<対照群>



実験群では、EVPOME 全体が両端で連続して腔状を呈するようになり、上皮層は部分的にかなり厚く重層化している。それに対し、対照群は全体的には腔状を呈し、EVPOME 両端間の上皮は連続しているものの、上皮下の AlloDerm®部分は連続せず、血管の豊富な厚い肉芽組織が介在している。Ki-67 陽性細胞は実験群の上皮に多い。

⑤まとめと考察

I. 実験群の EVPOME 上皮は基底層が厚く、Ki-67 陽性細胞も多いことから、高い増殖能を有すると考えられた。両群とも上皮は CK17 陽性を示した。

II. EVPOME 移植後 5 日目では、両群とも肉芽組織が上皮に被覆し、EVPOME 両端より上皮がそれに沿うように内側へ伸長していた。

III. 移植後 7 日目では EVPOME 上皮は両端よりやや厚みを増した肉芽組織に沿って内側に伸長していた。

IV. 移植後 14 日では両群とも EVPOME 上皮が伸長し、実験群ではその速度が速く、両端の上皮が連続し腔状を呈した。

V. 移植後 21 日目では実験群は EVPOME 全体が両端で連続して腔状を呈するようになり、上皮層は部分的にかなり厚く重層化していた。一方、対照群は全体的には腔状を呈しているが、両端が連続しているのは上皮だけであった。

VI. 移植後の EVPOME 上皮において、実験群の方が Ki-67 陽性細胞が多く認められていたことから、実験群 EVPOME の方が増殖能が高いと考えられた。

以上の結果より、小型の上皮細胞を多く含む細胞集団より作製した EVPOME の方が上皮細胞の増殖能が高く、上皮の伸長も早かったことから、安定した良好な粘膜再生能を有することが示唆された。

⑥今後の展望

小型の上皮細胞を多く含む細胞集団に含有される口腔粘膜前駆/幹細胞の同定および動態、さらに移植後の上皮増殖能の速さに影響を及ぼす機構や伸長していく上皮に沿って存在する毛細血管を多数含む肉芽組織の役割などについて検討を進める予定である。

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 2 件)

1. Kojima T, Hasegawa T, DE Freitas PH, Yamamoto T, Sasaki M, Horiuchi K, Hongo H, Yamada T, Sakagami N, Saito N, Yoshizawa M, Kobayashi T, Maeda T, Saito C, Amizuka N: Histochemical aspects of the vascular invasion at the erosion zone of the epiphyseal cartilage in MMP-9-deficient mice. Biomed Res. 2013; 34(3): 119-28. 査読あり.

2. Yoshizawa M, Koyama T, Funayama A, Mikami T, Saito C. Regeneration Process after Intraoral Grafting of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa in Athymic Mice. Oral Craniofacial Engineering. 1(4): 376, 2011. 査読あり.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 芳澤享子、小山貴寛、船山昭典、三上俊彦、小野由起子、小林正治: 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞を応用した培養複合口腔粘膜の皮下移植後の動態. 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 東京, 2014 年 5 月 7-9 日.

2. Yoshizawa M, Koyama T, Funayama A, Mikami T, Kojima T, Niimi K, Kobayashi T, Saito C; Remodeling of the basement membrane during the healing process after intraoral grafting of tissue-engineered human oral mucosa in athymic mice. 21th International Conference on oral and maxillofacial surgery, Oct 21-24, 2013, Barcelona, Spain.

3. 芳澤享子, 小山貴寛, 船山昭典, 三上俊彦, 小野由起子, 齊藤 力: 培養複合口腔粘膜の皮下移植モデルにおける培養上皮の動態. 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 広島, 2013 年 5 月 23, 24 日.

4. 芳澤享子、小山貴寛、船山昭典、三上俊彦、小野由起子、齊藤 力: 培養複合口腔粘

膜移植後の口腔粘膜再生過程における基底膜の動態. 第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 宇都宮, 2012 年 5 月 17, 18 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 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 0 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

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/surgery1/classroom02.html>

<http://bmrctr.jp/saisei/project/project3>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA MICHIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 60303137

(2) 研究分担者

泉 健次 (KENJI IZUMI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 80242436

(3) 連携研究者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学部・教授

研究者番号: 80217421