

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659913

研究課題名(和文)エイジレスな培養口腔粘膜上皮の開発・作成

研究課題名(英文)Development of age-less tissue-engineered oral mucosa substitute

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) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素環境における口腔粘膜上皮細胞のWST-8活性とGLUT-1発現は好気性から嫌気性による解糖系にシフトしていると示唆された。また細胞周期は低酸素環境でG0/G1期で停止している所見を示した。加えてp21の発現を同時にみたところ、p21発現は低酸素環境で発現が低下しており、どちらかという低酸素では細胞はG1期で回っていることがわかり、これはコロニー形成能が高かったことと一致する所見であった。最後に3次元培養口腔粘膜で上皮の恒常性を通常期間、および長期間培養して組織学的に観察したところ、低酸素環境培養においてよりよく恒常性が保たれていた。

研究成果の概要(英文)：Decreasing of WST-8 activity and increasing of GLUT-1 expression suggested that keratinocytes metabolism were shift oxidative metabolism to anaerobic glycolysis in hypoxic culture. Cell cycle profile shows G0/G1 arrest in hypoxic culture. In addition, we assessed p21 expression concomitant with cell cycle analysis because "cycling cells" in G1 phase do not express p21. p21 expression were lower in hypoxic culture suggested that greater number of G1 cells existed in hypoxic culture. Thus, significant higher colony forming efficiency (CFE) shown in cells under hypoxic conditions was due to a higher proportion of cycling cells. Finally, using a tissue-engineered oral mucosa (TEOM) equivalent, we investigated the effect of hypoxia on the epithelial structure for regular and long-term cultivation. The histological examinations showed that the epithelial homeostasis of the TEOM was better sustained in hypoxic condition.

研究分野：歯科医用工学・再生歯学

科研費の分科・細目：再生歯学

キーワード：口腔粘膜 上皮細胞 再生医療 老化 Akt/mTOR 低酸素

1. 研究開始当初の背景

本研究グループはヒト複合培養口腔粘膜を開発し、臨床応用を行ってきている(Izumi, 2003, 2004)。培養粘膜が再生されることは、通常の培養細胞中に口腔粘膜上皮前駆/幹細胞が存在していることを意味している。ヒト再生医療分野で培養口腔粘膜細胞のさらなる応用のためには、可能な限り安全かつ簡便な方法による培養方法の開発が急務であり、このためにはマウスモデルを含めて遺伝子(RNA)には手を加えず、薬学的操作による改良が不可欠である。

申請者は脂肪細胞の分化誘導因子として発見された核内受容体、ペルオキシソーム増殖因子活性型受容体(PPAR)が、口腔粘膜上皮の分化マーカーであることを報告し(Izumi, 2007)、このアンタゴニストによる細胞分化抑制を誘導することで培養細胞増殖能が亢進するという仮説を立てて予備実験を行った。しかしながら、アンタゴニストは無処置群よりは増殖効果を示したが、PPAR アゴニスト(シグリタゾン)投与群でより増殖効果が高く、また幹細胞の性格を示す細胞コロニー形成能も高く、予想した結果とは相反する結果となった。

一方、腫瘍抑制因子 PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10) は PPAR により活性化されることが判明し、PPAR アゴニストによる癌治療が脚光をあびている(Lee, 2007; Teresi, 2008)。シグリタゾンによる神経前駆細胞の PTEN タンパク発現(Paintlia, 2010)や PPAR の毛包上皮幹細胞の維持効果(Karnik, 2009)から、予期せぬ予備実験結果は、PPAR -PTEN の連携作用で説明できると考え、この連携作用を追求することで、培養細胞増殖能が亢進可能となるのではないかと想像し、本研究計画を立案した。

高品質な培養口腔粘膜上皮細胞の維持実現に貢献するという本研究課題を担う鍵は PPAR と PTEN とその連携である(右図)。このシグナル経路活性化に抗糖尿病効果(インスリン抵抗性改善)をもつ、チアゾリジン誘導剤(TZD)を応用する点が、申請者独自の研究・データに基づいた発想で、これまでこのような視点からアプローチされた研究は皆無である。

腫瘍抑制因子 PTEN が欠失している癌細胞が多い癌組織では PI3 キナーゼ/Akt シグナルが活性化され、悪性度が高いことから、PPAR アゴニストを介する PPAR -PTEN 連携による抗腫瘍効果の研究が行われている。一方、正常組織幹細胞の分裂はまれで、常に PTEN が細胞分裂を抑制している。本計画のように、正常口腔粘膜における PPAR -PTEN 連携を PPAR アゴニストを通じて論じた報告はまったくなく、ここに本研究のチャレンジ性がある。ヒト正常口蓋粘膜では、基底細胞層とその上の 2-3 層の核に PTEN

の発現が認められ、PPAR アゴニストによる PTEN タンパクレベル上昇と機能発現が容易に想像される。

基本的にすべての細胞で発現している PPAR は、上皮でも脂肪や糖の代謝調節に中心的な役割を果たしていることが想像できる。従って、PPAR アゴニスト(TZD)は上皮細胞の代謝に影響を及ぼしていることは確実で、PPAR を介した PTEN 誘導という本研究の主目的と同時に、培地中で消費された脂肪酸やグルコース量を測定することで粘膜上皮細胞の脂肪や糖代謝といった副次的な研究への発展が期待される。

2. 研究の目的

再生医療に用いる移植用組織・細胞を体外で増殖させる際には、前駆/幹細胞集団の未分化性の維持が重要である。しかし、invitro では通常の細胞同様、幹細胞でもエイジングがおこり、最後は枯渇してしまう。本研究の最終目標は薬学的操作によるエイジレス(age-less)な培養口腔粘膜上皮の開発・作成である。最終目標達成のため、ペルオキシソーム増殖因子活性型受容体(PPAR)アゴニストであるチアゾリジン誘導剤(TZD)の口腔粘膜培養細胞へのアンチエイジング効果の追求(長期生存能や再生能を含めた細胞学的検索)、PPAR と、PI3 キナーゼ/Akt シグナル経路を抑制する PTEN との連携作用を解明する。これらのことにより、TZD による PPAR -PTEN を介した細胞の長期生存・再生能維持を証明し、将来的に in vivo 組織幹細胞に対するアンチエイジング効果への応用に展開させる。

具体的な目的として、本研究では成人ヒト培養口腔粘膜上皮細胞を材料に、PPAR のアゴニストであるチアゾリジン誘導剤(TZD)を培養液に加え、(1)連続培養法による細胞長期生存能への効果、(2)その細胞生物学的、機能学的特徴および PPAR、PTEN タンパク発現レベル、(3) TZD 処理細胞の三次元培養を行い、口腔粘膜上皮再生能を解明する。

3. 研究の方法

予定では上記の3つの研究目標(口腔粘膜上皮細胞の長期生存、増殖能の確認、(I)各種薬剤による細胞の生物学的分析と機能評価、および(II)シグナルタンパクの発現確認、培養上皮細胞の上皮再生能評価)をかけた、それぞれの目標に対しての方法を計画していた。具体的には、に対して、薬剤添加培地で口腔粘膜細胞を継代し150日をエンドポイントに連続培養する。使用薬剤は PPAR アゴニスト2種(シグリタゾンとロジグリタゾン)と PPAR アンタゴニスト(GW9662 など)および無処置の合計4群とし、期間中定量的、半定量的に比較検討する。アゴニストでは PTEN 阻害剤で拮抗効果確

認も行う。 の(1)に対して50、100日目において細胞を分取し細胞発現型、細胞周期、創閉鎖アッセイ、コロニー形成能を検索することにしていた。

しかしながら、サンプル数を増やして本実験を可能な限り継続して行ったものの、PPARアゴニストに対する細胞反応のばらつきが非常に大きく、1年以上時間を費やしたにもかかわらず、一定の傾向すら把握できない状況が続き、初代培養細胞の難しさを痛感した。しかしながら、最終的には臨床応用プロトコルに研究成果を反映させることを念頭においているので、株化された細胞を用いることは根本的な実験の主旨に反することは自明である。

そこで最終年度においては、3次元培養による組織学的観察に実験手法を変えて実験を遂行した。また、方法そのものも薬学的な環境因子の改変から、物理的な環境因子の改変、すなわち酸素濃度を変えての培養系で最終年度は実験を遂行した。当初の申請書に記載した内容から逸脱した方法になるが、最終的なエイジレスな培養口腔粘膜作成という到達目標は同一であり、許容範囲と考えた。

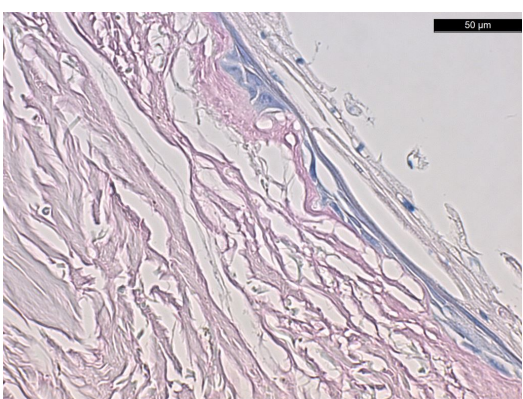
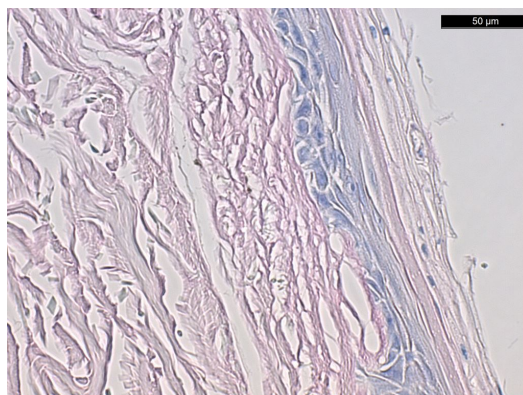
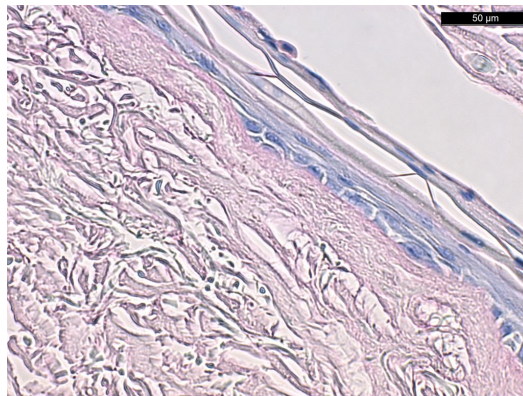
そこで、低酸素濃度として2%と0.5%を設定し、コントロールとして通常の大気中の酸素濃度、20%とし、細胞を培養した。細胞の代謝活性をMTTアッセイで測定、細胞増殖については生細胞数カウントを行った。加えてコロニー形成能を6日間培養後にクリスタルバイオレット染色して直径1mm以上のコロニー数をカウントした。さらに、FACSで細胞周期分析を行い、同時にp21の染色を行い、陽性細胞数を測定した。また老化マーカーとしてGAL染色を行い、陽性細胞をカウントした。実験のメインである3次元の培養口腔粘膜を作成して組織学的な観察は、通常の人臨床応用プロトコルに準じて口腔粘膜を作成し、ホルマリンで固定後パラフィン包埋し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。培養期間内に低酸素に晒したのは、培養5-6日目の48時間のみとし、通常の日間の培養に加え、32日間の長期間培養によっても観察を行い、エイジレス状態を確認した。

4. 研究成果

2%の低酸素環境で培養した細胞は20%の酸素濃度で培養した細胞に比べ、MTTアッセイによる代謝は48時間でおちるが、96時間で回復傾向を示した。セルカウントによる増殖能力では6日間に及ぶ培養で細胞数は増加していた。この現象は細胞周期の解析から、細胞周期がゆっくりではあるが20%酸素濃度下の培養細胞より低酸素培養環境下で回転しているためと考えられた。さらに、コロニー形成能も低酸素環境で培養した細胞で

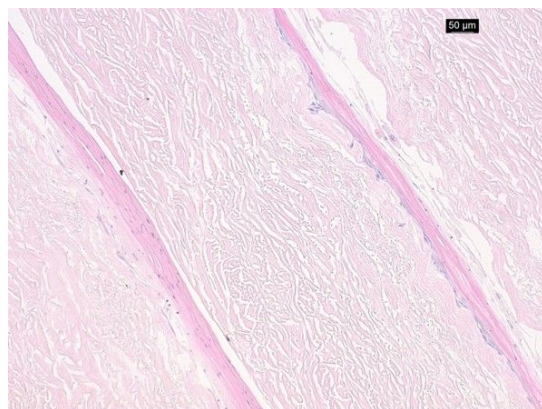
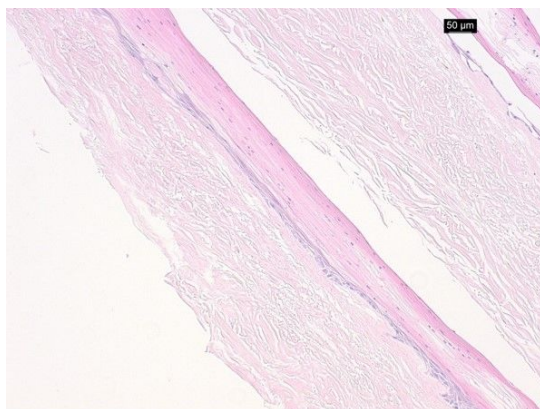
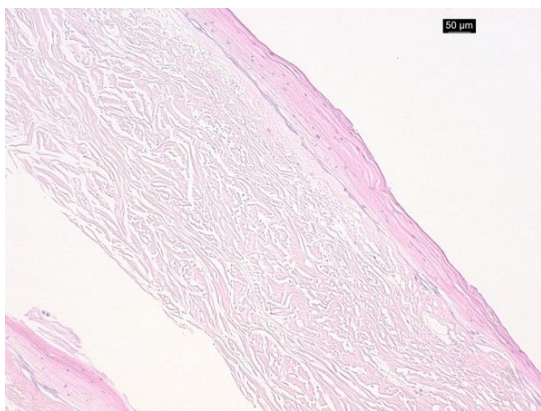
は、20%酸素濃度培養より亢進していた。また、老化マーカーであるGALの陽性細胞数が低酸素培養では低下していた。

組織学的には通常の人臨床応用で用いている培養口腔粘膜作成プロトコルでは、11日間培養のうち、4日目から6日目の2日間2%低酸素で培養した粘膜上皮の厚さが20%酸素濃度で培養したものに比べて増加していた。逆に0.5%の低酸素では薄かった。写真：上から20%、2%、0.5%



さらに、引き続き5週間培養した場合の上皮については、2%と0.5%の低酸素で培養した上皮は生細胞層が多く残存しており、とくにこれは2%低酸素培養でより多く存在し、上皮の細胞活性が2%低酸素培養によって高まり、長期生存能に結びついている可能性が示唆された。

写真：上から 20%、2%、0.5%



以上から、平面培養の GAL の陽性細胞数の低酸素環境での減少を含めて、酸素濃度を改変することが、培養口腔粘膜の長期生存に寄与する可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Hiroko Kato, Kenji Izumi, Stephen E. Feinberg: **Effects of Hypoxia on Human Oral Keratinocytes**. Research Day @University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI, USA. 2014.2.19.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 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

(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