

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593049

研究課題名(和文) TGF- β / Smad3シグナル伝達経路をターゲットとした新創傷治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of mucosal wound healing in the role of TGF/Smad signal

研究代表者

横尾 聡 (Yokoo, Satoshi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00322206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは、患者自身の口腔粘膜組織から、異種動物タンパク接触と xenotransplantation を完全に排除した新しい人工口腔粘膜(EVPOME)の作製に成功し、その有用性を報告してきた。本研究では、keratinocyteを持つ人工口腔粘膜(EVPOME)の移植創部を(1)臨床的に評価し、創傷治癒において重要な(2)神経系の再生および(3)神経系が関与する上皮の防御機構についてkeratinocyte derived cytokine systemの観点から観察することによって、EVPOMEの人工真皮に比較した創傷治癒優位性について検討した。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in fabricating an ex vivo produced oral mucosa equivalent (EVPOME) consisted of patients' oral keratinocytes and an acellular dermal matrix, entirely without heterogenic animal proteins or xenotransplantation, and have reported its usefulness. To clarify the superiority of EVPOME with keratinocytes over the artificial dermis without keratinocytes (Terdermis $\text{\textcircled{R}}$:Terumo, Tokyo) in wound healing, we evaluated the following items in this study: 1) clinical factors; 2) regeneration of the neuromucosal system; 3) epithelial defense system associated with the nervous system with keratinocyte-derived cytokines.

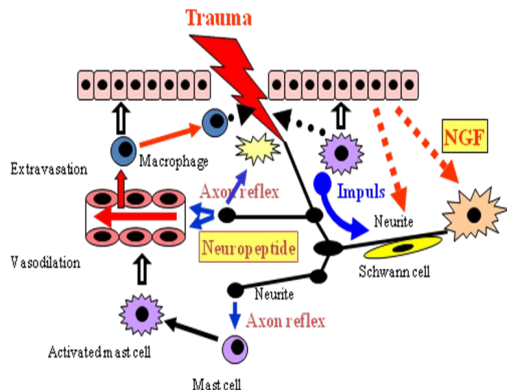
研究分野：口腔外科

キーワード：keratinocyte (上皮細胞) 創傷治癒 人工口腔粘膜 Smad TGF- β 神経系再生

1. 研究開始当初の背景

(1) 創傷治癒過程における keratinocyte の再生と神経系再生との関係

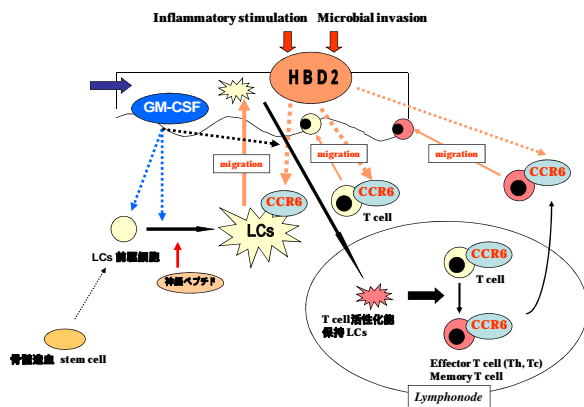
外傷によって刺激を受けた知覚神経からは axon reflex を通して神経ペプチドが遊離され、この神経ペプチドが血管系や免疫系細胞に機能的影響を与える。これらは keratinocyte の増殖をも刺激し、同時に keratinocyte から derive される NGF が神経系の再生・成長を促すという一連のシステムが構築されている。つまり、創傷治癒は上皮の再生と神経系の再生が極めて重要であるといえる。



(図 1)

(2) Keratinocyte derived chemoattractive cytokine としての HBD2 発現と CCR6 expressing cell 上皮内誘導との関連 (正常皮膚, 粘膜の防御機構)

ヒト表皮、口腔粘膜に分布する抗菌ペプチドである HBD2 は、炎症刺激などで発現量を大幅に増加する。最近、in vitro で HBD2 はケモカインレセプター-6 をターゲットとしたケモカインであり、この CCR6 を持つランゲルハンス細胞や T cell を走化性によって誘導させることが明らかとなった。つまり、HBD2 の発現は keratinocyte derived cytokine system の中の 1 つのシステムであると考えられる。



(図 2)

2. 研究の目的

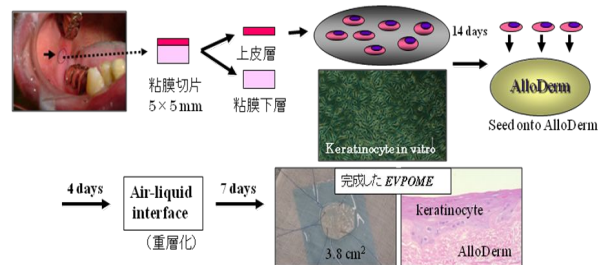
われわれは、患者自身の口腔粘膜組織から、異種動物タンパク接触と xenotransplantation を完全に排除した新しい人工口腔粘膜 (Ex Vivo Produced of human Oral Mucosa Equivalent; 以下 EVPOME) の作製に成功し、その有用性を報告してきた。本研究では、keratinocyte を持つ EVPOME の移植創部を(1) 臨床的に評価し、創傷治癒において重要な (2) 神経系の再生および (3) 神経系が関与する上皮の防御機構について keratinocyte derived cytokine system の観点から観察することによって、EVPOME の人工真皮に比較した創傷治癒優位性について検討した。

3. 研究の方法

(1) EVPOME の作成方法と手術法

作成方法 (実験室)

患者口腔内から局所麻酔下に約 5×5mm 大の粘膜組織採取。単離・回収した上皮細胞を無血清培地 (Epilife® 0.06mM Ca 含有) 中で培養後、無細胞真皮マトリックス (AlloDerm®) 上に播種、生着させ、Ca 濃度を 1.2mM に上昇の後に 7 日間 air-liquid interface 培養を行い完成する。



(図 3)

手術方法 (手術室)

EVPOME は 4-0 ナイロン糸にて手術創部へ縫合し、抗生剤含有滅菌綿花を tie-over 固定

(2) 研究対象および研究方法

臨床応用 (対象患者)

神戸大学倫理委員会の承認を得て、男性 8 例、女性 7 例の計 15 例に実施した。平均年齢 64 歳。術前診断は白板症 11 例、顎堤形成不全 4 例で、移植平均面積は 6.5cm² であった。

研究内容および方法

1) 臨床的評価

手術創が完全に上皮組織で被覆されるまでの期間を創傷治癒とした。

2) 病理組織学的および免疫組織化学的観察

i) EVPOME 移植および人工真皮移植後の創傷治癒過程

移植後、早期の創傷治癒過程における fibroblast の遊走を fibroblast surface antigen (clone 1B10: Sigma) および glycoprotein of macrophage (CD68, M0814: DAKO) にて、さ

らに神経系の再生は S-100 protein を使用して免疫組織化学的に染色細胞発現数にて検討した。

ii) EVPOME 移植後の上皮化過程における防御機構獲得

Keratinocyte における human β defensin-2 (HBD2) タンパクの発現は β defensin-2 antiserum (14338-v, PEPTIDE) を使用し、さらに CCR6 発現細胞 (Langerhans 細胞) の上皮内発現は CD1a (M3571, DAKO) を使用して検討した。HBD2 染色の評価は強陽性染色細胞：3 点、弱染色細胞：1 点、染色陰性細胞：0 点を与え、200 倍視野での total cell score を算出し、HBD2 の一定領域内の強さとして表示した (HBD index)。標本間の比較は、上皮細胞核のコントラストを一定とし、NIH image を用いた半定量解析を行った。CCR6 発現細胞 (Langerhans 細胞) の上皮内発現は染色細胞数にて検討した。

3) 分子生物学的検討

培養口腔粘膜 keratinocyte での HBD2 mRNA 発現について RT-PCR 法で検討した。逆転写反応：random primer 法 Primer design：5' CCC AAG CTT CAG CCA TCA GCC ATG AGG GT 3', 5' GGA ATT AGG AGC CCT TTC TGA ATC CGC 3'

4. 研究成果

(1) EVPOME 移植創部の臨床的評価

EVPOME は、移植後約 10 日で上皮化が始まり、平均 28.2 日で完全上皮化が得られ、これは人工真皮移植とほぼ同時期であったが、瘢痕拘縮が極めて軽度であった。

移植 12 日において、EVPOME では重層化した上皮が確認されたが、人工真皮では上皮を認めなかった。さらに、EVPOME では上皮下に fibroblast がほとんど存在しないのに対し、人工真皮では旺盛な fibroblast の増生を認めた。

(2) EVPOME 移植後治癒過程における神経系の再生

ラット舌急性創傷の二次治癒モデル (Wister rat 8 週齢 n=5)

上皮再生が終了し keratinocyte の安定化が図られると、急速に神経系の再生が起こることが 5 例全例で確認された。

EVPOME 移植、人工真皮移植における神経系再生の相違 (S-100 による免疫染色)

移植 12 日

EVPOME：活発な神経系再生を認める。

人工真皮：神経系再生を全く認めない。

移植 28 日

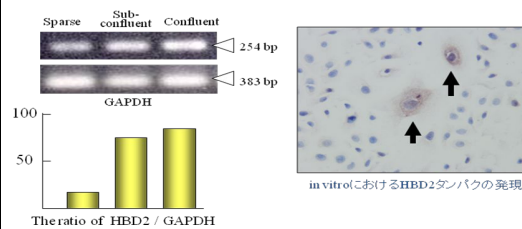
EVPOME：上皮の安定と共に、神経系も安定する (正常歯肉と同程度)。

人工真皮：上皮の被覆が完成し、神経系の再生が始まる。

(3) EVPOME 移植後治癒過程における上皮防御機構

培養口腔粘膜 keratinocyte での HBD2 mRNA とタンパク発現

HBD2 は mRNA レベルでもタンパクレベルでも proliferation から differentiation, apoptosis, senescence などの細胞転換を経て、その発現が増加していた。



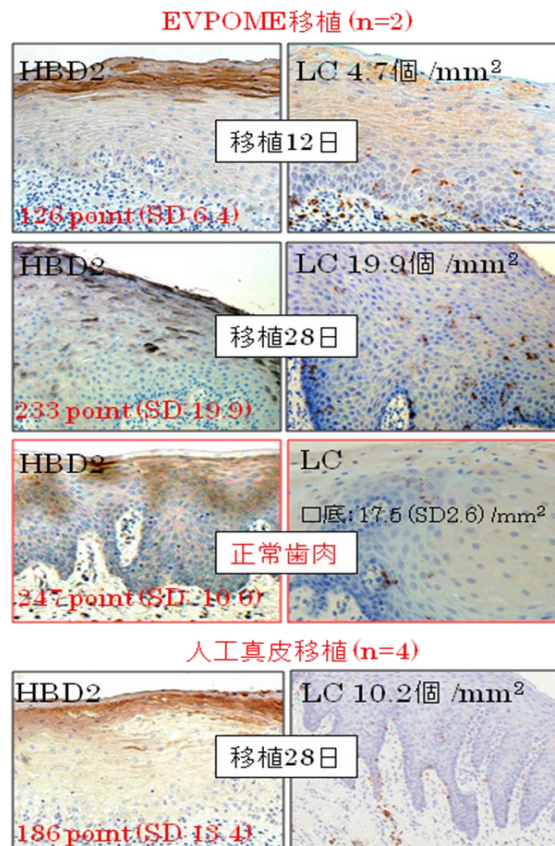
(図 4)

Keratinocyte derived chemoattractive cytokine としての HBD2 発現と CCR6 expressing cell 上皮内誘導との関係

移植 12 日では HBD2 陽性細胞は角化層のみでの分布であったが、28 日では、正常歯肉と同程度の上皮内発現を示した。

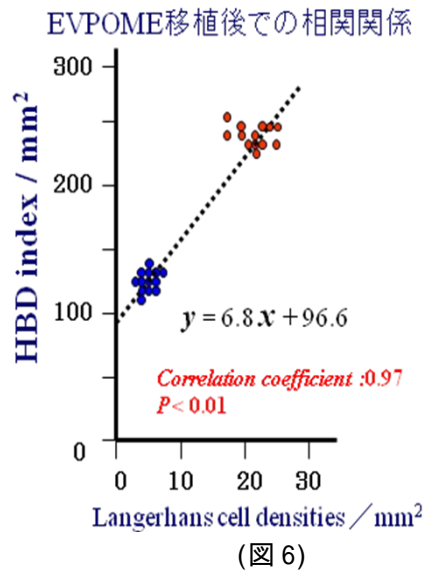
移植 12 日には、ランゲルハンス細胞の上皮内分布が極めて少なかったのに対し、28 日では正常歯肉と同程度存在していた。

人工真皮移植は EVPOME 移植と比較し、移植 28 日においても、HBD2 index、ランゲルハンス細胞数ともに少なかった。



(図 5)

HBD2 の発現と神経ペプチドによって成熟したランゲルハンス細胞の上皮内浸潤には強い相関が確認された。



(4) 考察

- EVPOOME 移植の治癒過程初期の創部治癒は人工真皮移植に比較し, fibroblast の増生が少ないため keratinocyte derived system が中心となり, 瘢痕形成が軽度に抑えられたと考えられた.
- Keratinocyte 誘導型 neurosystem が EVPOOME 移植後の治癒促進へ関与し, 人工真皮に比較し早期にその再生がなされていた.
- 人工真皮は完全上皮化時期は EVPOOME と変わらないものの, 上皮では防御機構の観点から, 上皮下では神経再生の観点から再生途上の未成熟組織であることが明らかとなった.
- EVPOOME 上の培養 keratinocyte は移植後 28 日で, 正常細胞と同様の防御機能の一部 (HBD2 誘導型 CCR6 発現細胞による免疫応答能) を獲得していることが明らかとなり, 神経ペプチドも この機構獲得に重要な働きをしていると考えられた.
- EVPOOME 移植後の創傷治癒の促進効果は keratinocyte derived system が重要な役割を担っており, その意味から, EVPOOME は移植材料ではなく, 生物学的被覆剤 (biological dressing) と捉えるべきであると考えられた.

(5) 結語

EVPOOME は keratinocyte の存在により, さまざまな biological event が起こり, それらがリンクし, 人工真皮に比較して早期の創傷治癒が起こると考えられた.

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 5 件)

Takayama Y, Yokoo S, Makiguchi T, Komori T. Motor nerve preservation and muscle atrophy after major

musculocutaneous flap surgery for oromandibular reconstruction. (査読有) Journal of Craniomaxillofacial Surgery, 2016, in press

Makiguchi T, Yokoo S, Ogawa M. Factors influencing internal jugular vein patency after neck dissection in oral cancer. Int J Oral Maxillofac Surg 26: 673-6, 2015. (査読有)

Makiguchi T, Yokoo S, Takayama Y, Terashi H. Double free flap reconstruction for extensive oromandibular defect: prevention of sinking or drooping of the flap with an anterior rectus sheath. (査読有) J Craniofac Surg 26: e622-4, 2015.

Sakakibara A, Hashikawa K, Yokoo S, Sakakibara S, Komori T, Tahara S. Risk factor and surgical refinements of postoperative mandibular reconstruction: a retrospective study. (査読有) Plastic Surgery International 2014;2014:893746. doi: 10.1155/2014/893746. Epub 2014 Aug 6

Makiguchi T, Yokoo S, Takayama Y, Ogawa M, Hashikawa K, Terashi H. Supercharged pectoralis major musculocutaneous flap. (査読有) J Craniofacial Surg 24: e179-82, 2013.

[学会発表](計 20 件)

- 牧口貴哉, 小川将, 高山優, 横尾聡, 他. 口腔癌頸部郭清後の内頸静脈血栓と再建方法についての検討 第 31 回日本口腔腫瘍学会, 2013 年 1 月 24, 25 日, 東京.
- 牧口貴哉, 小川将, 高山優, 横尾聡, 他. Double free flap with rectus sheath of RAM. 第 31 回日本口腔腫瘍学会, 2013 年 1 月 24, 25 日, 東京.
- 牧口貴哉, 小川将, 高山優, 横尾聡, 他. 口腔癌頸部郭清後の内頸静脈血栓と再建方法についての検討 第 56 回日本形成外科学会, 2013 年 4 月 3-5 日, 東京.
- 牧口貴哉, 小川将, 高山優, 横尾聡, 他. Double free flap with rectus sheath of RAM. 第 67 回日本口腔科学会, 2013 年 4 月 11-14 日, 宇都宮.
- 武者 篤, 横尾聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における急性期口腔粘膜炎症と粘膜線量との関連, 第 67 回日本口腔科学会, 2013 年 4 月 11-14 日, 宇都宮.
- 牧口貴哉, 小川将, 高山優, 横尾聡, 他. Double free flap with rectus sheath of RAM. 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2013 年 6 月 13-14 日, 東京.

武者 篤, 横尾 聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における急性期口腔粘膜炎と粘膜線量との関連. 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2013 年 6 月 13-14 日, 東京.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 熱傷後瘢痕拘縮による小口症に対する鼻唇溝皮弁を用いた治療 - 口輪筋交連部の外側牽引 - 第 58 回日本口腔外科学会, 2013 年 10 月 11-13 日, 福岡.

武者 篤, 横尾 聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における急性期口腔粘膜炎と粘膜線量との関連. 第 58 回日本口腔外科学会, 2013 年 10 月 11-13 日, 福岡.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 熱傷後瘢痕拘縮による小口症に対する鼻唇溝皮弁を用いた治療 - 口輪筋交連部の外側牽引 - 第 31 回日本頭蓋顎顔面外科学会, 2013 年 10 月 24 日-25 日, 名古屋.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. Nasolabial flap を用いた口唇周囲再建. 第 31 回日本口腔腫瘍学会, 2013 年 1 月 23,24 日, 札幌.

武者 篤, 横尾 聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における口腔粘膜炎発症線量の解析. 第 31 回日本口腔腫瘍学会, 2013 年 1 月 23,24 日, 札幌.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 口腔癌頸部郭清後の内頸静脈血栓と再建方法についての検討 - 吻合静脈選択の一助として - 第 57 回日本形成外科学会, 2013 年 4 月 9-11 日, 長崎.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 血管柄付き遊離腓骨移植の吸収危険因子の検討 - 術中因子を含めて - . 第 68 回日本口腔科学会, 2014 年 5 月 8,9 日, 東京.

武者 篤, 横尾 聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における口腔粘膜炎発症時期に関する検討. 第 68 回日本口腔科学会, 2014 年 5 月 8,9 日, 東京.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 血管柄付き遊離腓骨移植の吸収危険因子の検討 - 術中因子を含めて - . 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2014 年 6 月 12,13 日, 東京.

武者 篤, 横尾 聡, 他. 頭頸部重粒子線治療における口腔粘膜炎発症時期に関する検討. 第 37 回日本頭頸部癌学会, 2014 年 6 月 12,13 日, 東京.

高山 優, 牧口貴哉, 小川 将, 横尾 聡. 大胸筋皮弁移植後の筋体部経時的変化における運動神経の存在意義. 第 59 回日本口腔外科学会, 2014 年 10 月 17-19 日, 千葉.

高山 優, 牧口貴哉, 小川 将, 横尾 聡. 大胸筋皮弁移植後の筋体部経時的変化における運動神経の存在意義 形態学的, 免疫組織学的検討 - 第 33 回日本口腔腫瘍学会, 2014 年 1 月 29,30 日, 奈良.

牧口貴哉, 小川 将, 高山 優, 横尾 聡, 他. 口角を含む頬部広範全層欠損に対する再建戦略. 第 68 回日本口腔科学会, 2014 年 5 月 14-15 日, 大阪.

〔図書〕(計 1 件)

Yokoo S, Kirita T. Oral and maxillofacial reconstruction, in Oral Cancer-Diagnosis and Therapt-:231-272, Springer Japan, 2015.

〔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: 現在作成中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横尾 聡 (YOKOO Satoshi)

研究者番号: 00322206

群馬大学・医学系研究科・教授

(2) 研究分担者

高山 優 (Takayama Yu)

研究者番号: 60507490

群馬大学・医学部附属病院・助教

(3) 連携研究者

小川 将 (OGAWA Masaru)

研究者番号: 70622041

群馬大学・医学部附属病院・助教