

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593051

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞を用いた凍結培養粘膜の移植後動態の解明

研究課題名(英文) The elucidate of dynamics after the transplant of the freeze culture mucosa using oral mucosa epithelium progenitor / stem cells

研究代表者

小山 貴寛 (KOYAMA, Takahiro)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30444178

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：より活性の高い凍結培養細胞粘膜の移植後動態の解明のため、フィルタリング群と行わなかった群の培養上皮細胞を用いて培養複合口腔粘膜を作製し、細胞播種後11日目にヌードマウス皮下に移植、移植後1、10、28日目に移植部組織を採取し、組織学的、免疫組織学的に評価を行った。細胞の形態はフィルタリング(+)群がフィルタリング(-)群に比べ、均一な細胞が確認された。また、経時的にフィルタリング(+)群でフィルタリング(-)群よりもAlloDerm内の血管新生および上皮周囲の毛細血管を豊富に含んだ肉芽組織の増生が顕著であった。以上より、フィルタリング(+)群の凍結EVPOMEは、より活性が高いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate of dynamics after the transplant of more active high freeze cultured cell mucosa, we manufactured culture composition oral mucosa using the culture epithelial cells of filtering group and the group which did not perform it for the and obtained a transplant part tissue of each group after transplant, transplant in nude mouse subcutis on 1, 10, 28 day on day 11 after cellular dissemination and were histologic and evaluated it immunohistologically. The cells that filtering (+) group was more uniform as for the form of cells than a filtering (-) group were confirmed. Also, hyperplasy of the capillary around the neovascularisation in AlloDerm and the epithelium-rich the granulation tissue was more remarkable over time than a filtering (-) group in filtering (+) group.  
Freeze EVPOME of the filtering (+) group was thought to have higher activity than the thing of the filtering (-) group than the above.

研究分野：生物系 医歯薬学 外科系歯学

キーワード：組織工学 凍結培養粘膜 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

従来の皮膚移植・人工真皮に替わる材料として、皮膚の分野では 1975 年に Green らによって Bell 型培養人工皮膚が開発されて以来、ティッシュエンジニアリングによる培養皮膚が比較的早期に臨床応用されてきた。この培養皮膚の手法を基礎として、1990 年代に培養上皮シートが開発されたが (Luca M, et al. Transplant 1990, Ueda M, et al. OS OM OP 1998, Lauer G, J Craniomaxillofac Surg 1994) これらは脆弱で取り扱いにくく、さらにこの培養システム上の重大な問題点として、スローウィルス感染を引き起こしうるウシ胎仔血清を用いていることや、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ていることが挙げられる。私たちは米国シガン大学口腔外科、形成外科との共同研究で、これらの問題点を解決した培養複合口腔粘膜 (以下 EVPOME) を開発した (Izumi K, J Oral Maxillofac Surg 1999)。これはヒト培養口腔粘膜上皮細胞とヒト無細胞真皮 (AlloDerm®、米国 LifeCell 社) とで構成される口腔粘膜代替生体材料である。その特徴として、

(1) 組織学的に上皮層と真皮層を有し、口腔粘膜組織に類似している

(2) 動物由来血清やマウス細胞の feeder layer を使用しないため、未知の生物等による感染のリスクが少なく、安全性が高い

(3) 真皮層として AlloDerm® を使用することで、強度的に優れ、操作性が良いが挙げられ、その有用性についてもこれまで私たちは報告してきた (Yoshizawa M, J Oral Maxillofac Surg 2004, Yoshizawa M, Koyama T, J Oral Maxillofac Surg, 2011)。

新潟大学では、2000 年に新潟大学歯学部倫理委員会で承認を得て、口腔がんおよび前がん病変に対し臨床応用を開始し (Izumi K, Yoshizawa M, Int J Oral Maxillofac Surg 2003)、2002 年度から 2004 年には文部科学省高度先進医療開発経費の援助を受け、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、現在までに 100 例以上の EVPOME 移植を行い、臨床的にも良好な結果を得ている。

しかしながら、従来の方法では移植材作製のための組織片採取から手術までの期間が 3~4 週間に限定されることになり、また複数回の手術にも対応できなかった。この問題点を解決するため、代表者は、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製に関する研究を行い、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製が可能であること、生体内に移植した時の治癒機転も通常の培養口腔粘膜も概ね同様であったことを示した。(小山貴寛, 口科誌 54: 253-263, 2005, 科学研究費補助金 H19 - 21)。

## 2. 研究の目的

顎顔面口腔外科領域では、口唇口蓋裂などの奇形、腫瘍などの疾患に対しては、複数回

にわたる手術が必要となり、なおかつ治療期間が長期にわたることが多い。例えば、口唇口蓋裂患者の場合、初回手術の際に採取した粘膜組織から得た粘膜細胞を用いて、5 年後に予定される口蓋閉鎖術時の粘膜再建材料を作製するためには、単離した細胞を 5 年間という長期間凍結保存を行う必要性が生じる。これまでの研究で 1 年間の凍結保存後の細胞においては活性の低下はほとんど認めてはいないが、より長期間の凍結保存によって細胞活性が低下することは否めない。今後臨床応用を行うためには、高い粘膜再生能を有する凍結 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、つまり口腔粘膜上皮前駆 / 幹細胞集団を選別して、その細胞を凍結保存した後に凍結 EVPOME を作製し、その高い増殖能を有する凍結 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

ヒトの口腔粘膜より口腔粘膜上皮細胞集団を培養し、それらから私たちがこれまでに確立した手法を用いて口腔粘膜上皮前駆 / 幹細胞を選別し凍結保存する。解凍後それらの細胞の増殖能、分化能を評価した後凍結 EVPOME を作製する。2 群の細胞集団から作製した EVPOME をこれまで確立したマウス動物モデルを用いて、皮下移植移植を行う。それぞれ術後 1、10、28 日に移植部を摘出、固定し、組織学的、免疫組織化学的に検索する。2 群の細胞集団から作製した凍結 EVPOME を用いて皮下移植モデルにおいては細胞増殖能、分化能、血管誘導能を評価し、EVPOME の培養上皮細胞と基底膜による粘膜再生過程も検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 緒言

研究代表者らは、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製に関する研究を行い、凍結粘膜細胞による培養口腔粘膜の作製が可能であること、生体内に移植した時の治癒機転も通常の培養口腔粘膜も概ね同様であったことを示した。(小山貴寛, 口科誌 54: 253-263, 2005, 科学研究費補助金 H19 - 21)。

ヒト口腔粘膜より上皮細胞を培養し、その不均一な細胞集団よりわれわれが開発した手法 (Izumi K, JDR, 2007) を用いて口腔粘膜上皮前駆 / 幹細胞集団を選別し、その細胞を凍結保存し EVPOME を作製し、そして従来の方法で培養した細胞集団より作製した凍結 EVPOME とその増殖能と分化能を組織学的、免疫組織学的に比較検討する。さらに両者の生体内移植後の変化を評価するために、これまで用いてきた皮下移植モデルより、移植後の変化を組織学的、免疫組織学的に検索し、その粘膜再生能を比較、検討することで、口腔粘膜上皮

前駆 / 幹細胞集団を用いて作製した凍結 EVPOME の粘膜再生能とその治癒機転を明らかにする。

## (2) 材料及び方法

### 材料

実験には新潟大学医歯学総合病院口腔外科において、同意が得られた患者の口腔外科小手術時に余剰となったヒト正常口腔粘膜を使用した

### 上皮細胞の培養方法

上皮細胞の培養は、Izumiら (IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999)の方法に準じて行った。細胞培養用の培地は、カルシウム濃度が0.06mMのEpiLifeに human keratinocyte growth supplement-V2、penicillin/streptomycin/amphotericin solution、(Cascade Biologics, Portland, OR, USA)を使用した。T-25 フラスコ (Corning, NY, USA) に上皮細胞を播種し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。培地の交換は2日毎に行い、80%コンフルエントになった時点で継代を行った。フィルタリングを行う細胞はセルストレイナー® (35 μm) (BD Falcon)を用いて、継代の際に行った。

### 凍結保存および解凍方法

1 回目の継代の際に、凍結保存を行う細胞と非凍結細胞で EVPOME を作製する細胞の2群に分けた。凍結保存液には、凍害防止剤として10%ジメチルスルホキシド (以下DMSO) 含有で、無血清タイプのバンバンカー® (日本ジェネティクス、東京)を用いた。-80 °Cで6か月間凍結保存を行った。凍結保存後、培養細胞を37 °C恒温槽中の温水中で急速解凍し、凍結保存液を除くため、低Ca培地を加えて希釈し、解凍後の培養細胞 (以下凍結培養細胞) を遠心洗浄した。その後、凍結培養細胞を5mlの低Ca培地に懸濁しT-25 フラスコに播種して再度培養を開始した。80%コンフルエントになった時点で培養粘膜を作製した。

### EVPOMEの作製

Izumiら (IZUMI K; J Oral Maxillofac Surg 57:571-577 1999)の方法に準じて、凍結培養細胞を用いて培養複合口腔粘膜を作製した。対照として培養細胞を用いた培養粘膜を作製した。Type コラーゲン (BD biosciences) でコーティング後のAlloDerm®上に、 $1.25 \times 10^5$ 個/cm<sup>2</sup>の細胞を播種した。この際、カルシウム濃度を1.2mMに増加させたEpiLifeを用いた。凍結培養細胞を用いた培養粘膜と培養粘膜を、細胞播種後4日間は培地に浸漬した状態で、その後2週間はair-liquid interfaceの状況下で培養を行った。

### マウス皮下移植

5 週齢 SCID マウス (日本クレア) に十分除痛を行った後、背部皮下に作成した EVPOME を移植し、術後1・10・28日で移植

部を採取した。

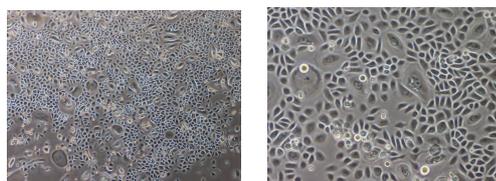
### 組織学的検索

採取した検体を10%中性ホルマリン液で固定後、通法に従いパラフィン包埋、4 μmの連続切片を作製した。作製した切片は、ヘマトキシリンエオジン染色と Mouse monoclonal 抗 Cytokeratin 17 抗体 (CK17)、Rabbit polyclonal 抗 Collagen IV 抗体 (Co IV) による免疫染色を行い、作製した培養粘膜の評価を行った。

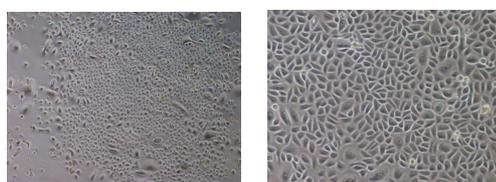
## (3) 結果

### 細胞の形態

#### フィルターなし



#### 35 μm フィルタリング

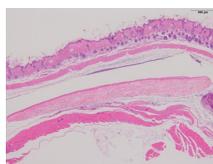


フィルタリングを行った細胞の方が、フィルタリングなしの細胞に比べ均一な細胞が得られている。

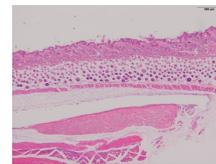
### 移植後組織像

#### 移植後1日目

##### フィルター(-) HE 像



##### フィルター(+)



##### CK17

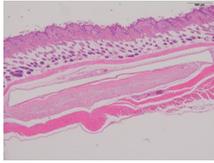


##### Co

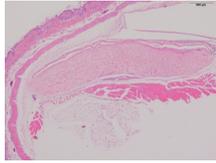


移植後 10 日目

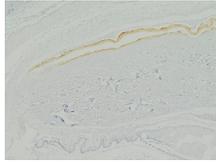
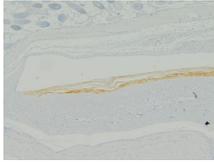
フィルター(-)  
HE 像



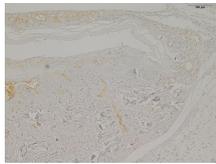
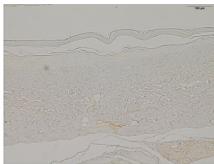
フィルター(+)



CK17

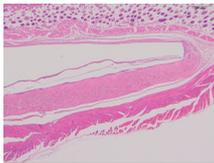


Co

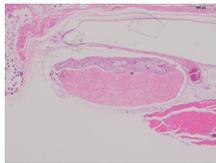


移植後 28 日目

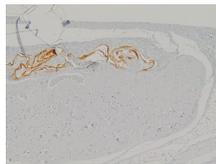
フィルター(-)  
HE 像



フィルター(+)



CK17



Co



EVPOME の背部皮下移植後 1 日目では、フィルター(-)とフィルター(+))ともに重層扁平上皮は連続しており、肉芽組織の形成は認めなかった。また、フィルター(-)とフィルター(+))ともに AlloDerm® 内に Collagen IV 陽性を示す管腔構造を認めたが、これは AlloDerm® 内の血管構造と考えられた。

移植後 10 日目ではフィルター(-)とフィルター(+))の上皮はともに 1 日目よりやや厚みを増した。フィルター(-)とフィルター(+))ともに AlloDerm® 内に Collagen IV 陽性の管腔構造

を認めたが、フィルター(+))のほうが多い傾向にあったことから、これらは新生血管と考えられた。さらにフィルター(+))の上皮周囲には Collagen IV 陽性を示す新生血管と思われる管腔構造を豊富に含んだ肉芽組織が認められたが、フィルター(-))の上皮周囲には肉芽組織はほとんど認められなかった。

28 日目では、フィルター(+))の方がフィルター(-))よりも AlloDerm® 内の Collagen IV 陽性を示す新生血管の増加が著明であり、フィルター(+))上皮周囲の肉芽組織も厚さを増していたが、フィルター(-))の上皮周囲には肉芽組織をあまり認めなかった。

AlloDerm® 内の新生血管数はフィルター(-))では継時的な変化は乏しく、またフィルター(+))に比べて血管数も少ない傾向にあった。

#### (4)考察

フィルター(-))とフィルター(+))の移植後初期ではどちらも重層上皮が認められたが、その後は経時的にフィルター(+))の方がフィルター(-))よりも AlloDerm® 内の血管新生および上皮周囲の毛細血管を豊富に含んだ肉芽組織の増生が顕著であった。

以上のことから、フィルター(-))に比べてフィルター(+))において血管新生が顕著であり、フィルター(-))の粘膜再生能がフィルター(+))よりも劣る可能性が示唆された。また上皮周囲の肉芽組織の増生がより著明であることから、上皮周囲の肉芽組織の増生は粘膜再生能と関連している可能性が示唆された。

今後はより臨床の状態に近いマウス口腔内移植モデルでも検討を行う必要があると考えられた

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小山 貴寛 (KOYAMA, Takahiro)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：30444178

### (2) 研究分担者

芳澤 享子 (YOSHIKAWA, Michiko)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：60303137

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：