

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463139

研究課題名(和文)口蓋裂術後の瘢痕拘縮分子メカニズムの解明と新規創傷被覆材開発への展開

研究課題名(英文)Elucidation of scar contracture molecule mechanism after cleft palate and development for development of new wound dressing

研究代表者

岐部 俊郎(KIBE, TOSHIRO)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：50635480

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：創部の瘢痕収縮によって生じる顔貌の変形や発育障害を防止するために、複数の創傷被覆材の治癒過程をラットを用いた実験で解析した。ネオベールでは初期の瘢痕収縮を抑制し、瘢痕収縮の原因である SMA 陽性細胞の発現を抑制した。本研究の結果、ネオベールは瘢痕収縮を防ぐ可能性を示したが、上皮はネオベールの表層に新生せず陥凹した。瘢痕収縮抑制を目的とした新規材料には、これらの問題を解決する必要があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The healing process of multiple wound dressings was analyzed using rat experiments in order to prevent deformation and developmental disorder of facial features caused by scar contraction of the wound. NEOVEIL restrained the initial scarring contraction and suppressed the expression of SMA positive cells, the cause of scar contraction. As a result of this study, NEOVEIL showed the possibility of preventing scar contraction, but the epithelium was recessed without renewing on the surface layer of NEOVEIL. It seems necessary to solve these problems for new materials aimed at suppressing scar contraction.

研究分野：口腔外科

キーワード：創傷治癒 瘢痕拘縮 筋線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂は、出生時に口唇や口蓋が裂けた状態で生まれてくる、最も頻度の高い先天異常の一つであり、日本人の約500人に一人の割合で発生する。口唇裂の患児に対しては、口唇形成術を、口蓋裂の患児に対しては口蓋形成術をそれぞれ行い形態の回復を行う。しかしながら、口蓋形成術は口蓋粘膜を上顎骨口蓋骨から剥離し、軟口蓋とともに後方へ移動させる方法であるため、口蓋前方部に粘膜の欠損部が手術直後に生じる。その欠損組織を創被覆材で覆うことが多い。同部の治癒では癒痕組織になることが多く、癒痕拘縮が生じやすい。そのため、口蓋形成術後の創部の癒痕拘縮によって口蓋部が内方に引っ張られてしまい、上顎骨の外方への成長抑制が起こるために起因する下顎前突や重篤な歯列の不正などの様々な不正咬合が惹起され、患者の咀嚼・発音機能が著しく障害されることが多い。歯列矯正治療並びに言語治療により、これらの機能は改善されるものの、治療は0歳から18歳くらいまで長期間にわたり、さらに患者の治療経過によっては二次手術が必要な場合もある。したがって、長期的な治療による身体的・精神的負担は患者本人だけでなく、その家族にとっても大きい。治療にかかる費用は国からの補助があり、口唇口蓋裂患者の場合では、患者一人当たりの治療に1000万円程度の治療費が国から援助される。日本では年間3000人近くの口唇口蓋裂をもった赤ちゃんが出生しているとされており、国の医療費の負担も大きい。口蓋形成術後の癒痕拘縮の抑制が可能になれば、患者本来の上顎骨成長が期待され、歯科矯正や言語治療期間の短縮や二次手術の減少が見込めるため、国の医療費の削減につながり国民全体の利益となる。

口蓋形成術は前述の如く、術式に伴って口蓋前方部に粘膜の欠損が生じる。多くの施設では、粘膜欠損部に創部の保護や癒痕抑制の目的で様々な被覆材が用いられている。しかし、その癒痕抑制についての効果についての報告はほとんど見られない。そこで、今回我々は既存の創被覆材をもちいたラットの創傷治癒の予備実験を行った。この実験結果から、創被覆材を用いないコントロール群と創被覆材使用群とでは、創部の閉鎖速度に差が生じることを見いだした。創の閉鎖速度には、上皮細胞や線維芽細胞の増殖だけでなく、癒痕拘縮による創の収縮も関与していると考えられる為、それぞれ創被覆材の群の組織を採取して、解析を行った場合、上皮や線維芽細胞、筋線維芽細胞の分化や増殖に関わる因子に差が認められる可能性が高いと我々は考えている。創傷治癒には一般的に止血期、炎症期、

増殖期、再形成期の4つのステージがあり、癒痕拘縮は主に増殖期に生じる線維芽細胞から分化する筋線維芽細胞の関与が推定されると、いくつかの研究グループが報告している。増殖期では、線維芽細胞は創部組織に浸潤しMMPなどのプロテアーゼや新たな細胞間基質を分泌し肉芽組織の形成を促進させる役割を持つ。その後、線維芽細胞の一部が筋線維芽細胞へと分化し創部の境界へ遊走し、弾性線維などを産生することで創の収縮力を生み出し、その結果として創の収縮と癒痕拘縮が生じると言われている。最近ではSmadやbFGF、TGF- $\beta$ などシグナル分子が癒痕拘縮に関与しているとする報告があり、癒痕では上皮細胞で産生されるbFGFが線維芽細胞の増殖を制御している可能性が報告されている。創傷治癒において様々な成長因子が発現し、上皮や線維芽細胞などの間葉系の細胞の増殖が制御されているため、我々はbFGF以外のシグナル分子においても上皮-間葉相互作用が働いている可能性があると考えている。

また、口蓋部の創傷治癒におけるin vitro系の研究ではマウスの細胞が用いられることが多く、ヒトの細胞での報告は少なく、ヒトの細胞を用いた実験報告も、それらは初代培養細胞を用いた実験である。初代培養細胞のため長期培養は不可能であることに加えて、利用可能なヒトの口蓋上皮由来の不死化細胞はないため、ヒトの細胞を用いた再現性のある創傷治癒のための実験系は知られていない。以上をまとめると、「癒痕拘縮を抑制することは、患者の生理的な上顎骨の発育を促し、患者とその家族の長期にわたる精神的・肉体的負担を軽減」することになり、「癒痕拘縮の抑制によって治療期間の短縮や二次手術の現象は国の医療費の削減」へとつながる。また、「筋線維芽細胞の分化・増殖を抑制することが癒痕拘縮の抑制と関連し、その解析のための実験系はまだ十分に確立されていない」と考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ラットを用いた研究から既存の創被覆材群とコントロール群で創部の治癒経過を比較し、差が認められる因子の特定を行うことを目的とする。その後、ヒトの不死化細胞を用いた共培養実験系でそれら因子の機能の解析を行い、癒痕抑制に働く因子を特定し、その因子を含有した新規創被覆材を用いたラットの創傷治癒における癒痕収縮について比較検討を行う。

## 3. 研究の方法

ヒト口腔上皮由来の不死化細胞樹立による

## ヒト細胞実験系の構築

通常、口腔上皮細胞は初代培養のままでは長期培養は困難で2ヶ月程度しか維持することができない。そこで我々はヒト口腔内の口蓋部上皮由来の不死化細胞を作成する為に、鹿児島大学病院口腔顎顔面外科にてボランティアから採取した右側口蓋部上皮組織をコラゲナーゼで処理して、分散させ分担者岐部、岸田らが初代培養を行った。いったん細胞を純化して凍結保存した後、国立がんセンターに送り、hTERT、CDK4、cyclinD1、ドミナントネガティブ型のp53をそれぞれ組み合わせる細胞にウイルスベクターで遺伝子導入し、ヒト口腔上皮由来の不死化細胞(MOE1a、MOE1b細胞)を樹立させた。樹立したMOE1細胞は、約3ヶ月以上継続的に培養しても細胞老化や細胞形態の明らかな変化は認めず、がん化の兆候も認められない。MOE1細胞及びHFF2細胞(既存のヒト不死化線維芽細胞)を用いた共培養実験系を確立させ、ヒト細胞による再現性のある解析システムの構築をすすめる。

ラットを用いた実験・評価方法の確立と創被覆材間の創傷治癒・瘢痕形成の比較

創被覆材をもちいないコントロール群、既存の創被覆材を用いたテルダーミス群、ネオベール群の3群のラット背部の創傷治癒過程の組織を採取し、HE染色の後に組織を観察したところ、創縁部から創の中央部へ向かった上皮の増殖・進展を解析した。さらに、創の閉鎖が上皮の増殖によるものなのか、創部の収縮による影響なのかを調べる為に、ラットの背部に受傷させたときに、創部の辺縁にマーキングを行い、上皮の増殖と創の収縮とを判別することによって、コントロール群及び創被覆材群間における収縮率の違いを解析した。

### 3. 研究成果

ポリグリコール酸(PGA)由来のネオベールでは初期の瘢痕収縮を抑制する効果が認められるとともに、瘢痕収縮の原因と言われているSMA陽性細胞の発現を抑制する効果を認めた。しかしながら、創傷被覆材に浸潤する細胞数は、コラーゲン由来のテルダーミスで著明に多く、また、上皮新生も被覆材表面に沿って進展している様子が認められた。そのため、創部の陥凹が少ない結果となった。本研究の結果から、被覆材の種類によって、その治癒過程は異なっていた。創部に長期感残存していたポリグリコール酸(PGA)由来のネオベールでは、創部の瘢痕収縮の要因である筋線維芽細胞の発現を抑制し、瘢痕収縮を防ぐこ

とができる可能性があることを示した。しかし、上皮はネオベールの素材の表層に新生することはなく、陥凹を認めた。そのため、瘢痕収縮抑制を目的とした新規材料には、これらの問題を解決する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 1 件)

Kibe T, Koga K, Fuchigami T, Yoshimura T, Nishihara K, Taguchi T, Nakamura N: Examination of the early wound healing process under different wound dressing conditions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod:123(3):310-319, 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

岐部俊郎, 大山健太郎, 淵上豊央, 吉村卓也, 松永和秀, 田口哲志, 西原一秀, 中村典史

人工創傷被覆材の違いにおける上皮欠損部の治癒過程の検討

第59回日本口腔外科学会総会・学術集会, 2014年10月17-19日, 幕張メッセ(千葉県千葉市)

Kibe T, Oyama K, Fuchigami T, Yoshimura T, Matsunaga K, Nishihara K, Taguchi T, Nakamura N

Examination of the process underlying healing of epithelial defects by using different wound dressings

96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition in conjunction with the Japanese Society and Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Sep 8-13, 2014, Honolulu (USA)

〔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

岐部俊郎 (KIBE, Toshiro)  
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教  
研究者番号：50635480

##### (2) 研究分担者

中村典史 (NAKAMURA, Norifumi)  
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授  
研究者番号：60217875

##### (3) 研究分担者

岸田昭世 (KISHIDA, Shosei)  
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  
研究者番号：50274064

##### (4) 研究分担者

田口哲志 (TAGUCHI, Tetsushi)  
国立研究開発法人物質・材料研究機構・パイ  
才機能分野・MANA 研究者  
研究者番号：70354264

##### (5) 研究分担者

淵上貴央 (FUCHIGAMI, Takao)  
鹿児島大学・附属病院・医員  
研究者番号：40772439