

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06696

研究課題名(和文) バイオマテリアルの物理的操作による口腔粘膜のメカノバイオロジー研究基盤の創製

研究課題名(英文) Development of research platform on mechano-biology of oral mucosa by manipulating the physical properties of collagen scaffold

研究代表者

上野山 敦士 (UENOYAMA, ATSUSHI)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40804571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔粘膜上皮の再生に適した物理的微小環境の同定を目指し、足場材としてのコラーゲンの物性を、濃度調整やヒアルロン酸の添加により、“硬さ(ヤング率)”を調整し口腔粘膜上皮細胞の動態を探索しようとした。コラーゲン濃度の違いによる物性の差異は検討できたが、ヒアルロン酸のコラーゲンへの溶解は、ポリイオンコンプレックスという沈殿物のために、計画通りの添加が不可能であった。しかし、足場材の硬さの違いで形成する上皮の性質が異なるという手がかりを得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常培養細胞はプラスチック表面で培養されている。その硬さは、少なくとも口腔粘膜とは全く異なる。計画通りにYAPシグナリングの追究はできなかったが、タイムラプス顕微鏡観察したところ口腔粘膜上皮細胞は、硬と軟の材質の上で培養された場合に、その動態が変わったことは事実であった。より生体に近い培養口腔粘膜モデルを作成するのであれば、その足場は生体に近い軟らかさの表面であることが必要で、硬い材質で培養した細胞のデータの信憑性には疑問符を打たざるを得ない。こうした生体模倣といえる“場”の環境の研究を進め、今後データを収集し口腔粘膜メカノバイオロジー研究基盤につなげたい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to identify an optimal physical microenvironment for oral mucosa epithelial regeneration, and attempted to explore behavior of oral keratinocytes on different stiffness (Young's module) by adjusting the mechanical properties of collagen scaffold using the addition of hyaluronic acid. Although the differences of mechanical properties of collagen scaffold were investigated in this study, dissolution of hyaluronic acid into the collagen solution was not done as originally planned due to the deposition of poly-ion-complex. Nonetheless, this study was able to obtain the clues that the characteristics of regenerated oral epithelial layer differ depending on the stiffness of the underlying collagen scaffold.

研究分野：口腔外科

キーワード：メカノバイオロジー 3次元口腔粘膜インビトロモデル 魚うるこコラーゲン足場材 ヒアルロン酸 ヤング率 YAP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

メカノバイオロジーは張力やせん断応力といった物理的刺激が細胞、組織、臓器、生体に与える影響を解析する生物物理学の研究領域で、常に物理学的刺激が加わっている骨格系を扱う整形外科、血管を扱う循環器内科領域ではなじみのある研究分野であるが、皮膚を含めた軟組織ではまだ一般的でない。口腔領域での研究はさらに遅れており、矯正治療やインプラント、歯根膜など硬組織における知見があるにすぎない。しかし、皮膚を含め口腔粘膜は、常に物理的刺激を受けている組織である。例えば、口唇粘膜に切開を加えると傷は自然と開き、摘出された口唇粘膜片は切開線のサイズより縮む。一方、骨の裏打ちのある口蓋粘膜は切開しても傷は開かないことから、生体で口唇粘膜には常に大きな張力が加わっていることがわかる。口腔粘膜切開を日常的に行う歯科医師にとって、メカノバイオロジーを理解して臨床を行うことは有意義である。さらに文科省は、メカノバイオロジーを、ナノテクノロジーや物質表面改質を含む物理的・環境により革新的な医療技術の創出につながる領域と位置づけしている。昨今のメカノバイオロジー研究の進歩により、組織・細胞への機械的刺激は組織恒常性維持や細胞機能活性化などに大いに役立っており、細胞を取り巻く力学的環境の違いが、組織幹細胞の分化制御に関わることが明らかになってきた。言い換えると、組織幹細胞の運命はバイオマテリアル(=足場材)に依存、すなわち幹細胞ニッチ(物理学的、化学的、生物学的微小環境)に依存していることに他ならない。このことを顕著に示す事実は、間葉系幹細胞の分化がマトリックスの硬度に依存するという報告や、非常に軟らかいゲル上では細胞周期が静止期に入り、幹細胞性質保持に最適な条件の存在も示唆されている。さらに、小腸クリプト底部の上皮下結合組織の形状(弯曲率)そのものが、幹細胞ニッチである可能性が示されている。申請者はこれまで、患者移植用ヒト培養口腔粘膜の「品質向上」のため、薬理的アプローチによる品質保証・管理システムの構築に携わってきた。この研究では、上皮と上皮下結合組織の2層構造からなる培養口腔粘膜(3D oral mucosa model, 3DOMM)を取り扱うので、申請者はこの*in vitro* 口腔粘膜モデル作成の基盤技術を有している。3DOMMでは、上皮細胞を播種する口腔粘膜線維芽細胞含有コラーゲンゲルが上皮下結合組織に相当するが、再生する上皮との界面は平坦である。一方、*in vivo* 口腔粘膜上皮と粘膜下結合組織の界面には、表皮-真皮組織界面同様、乳頭様構造(と相補的な釘脚)が組織特異的に存在し、上皮基底層を弯曲させているが、この弯曲の生物学的意義は不明である。最近、実験的に異なる形状の乳頭構造をもった皮膚*in vitro* モデルの観察から、増殖・分化する細胞の局在が形状によって異なる結果となり、上皮幹細胞挙動や皮膚老化研究モデルとして、足場の乳頭構造の重要性が示唆された。従って、口腔粘膜*in vitro* モデルでもこの技法を応用し研究することで、口腔粘膜メカノバイオロジーの理解が深まり、未解明の上皮幹細胞の局在と挙動、ニッチ環境解明につながり、口腔粘膜を用いた再生医療の向上が期待される。分子レベルでは細胞外力学環境を感知するHippo経路で、YAPが重要な役割をもつことがわかってきた。それによると上皮細胞でも、硬い基質の上でYAPは核内移動し、活性化することで細胞は増殖。逆に軟らかい基質だと、YAPは細胞質に留まり不活性化状態になり、増殖しないことがわかっている。正常口腔粘膜の基底層では、核がYAP陽性の細胞が散在し、この層で細胞性の所見と一致した。一方、足場に乳頭構造がない3DOMMでは、核陽性細胞より細胞質陽性細胞が多く、乳頭構造があると、核陽性細胞は増え、厚い上皮が形成する所見と一致していた。このことは、接着位置の違いによる細胞変形に伴う内部応力の違いが、細胞代謝に顕著に影響することを示し、幹細胞ニッチを*in vitro* で再現する際のメカノバイオロジーの重要性を暗示している。幹細胞生物学にある“種と土壌”理論から、申請者は、細胞を追求するだけでなく、口腔粘膜上皮幹細胞ニッチ研究も期待できるアプローチ法として、幹細胞が育つ土壌(物理的環境)の整備も重要と考えた。その結果、*in vivo* 組織のメカノバイオロジカルな特徴を模倣し、その知見を背景に*in vitro* の上皮再生原理を研究するには、足場材になるバイオマテリアルの物理的環境操作が必要という発想に至った。

### 2. 研究の目的

ヒト生体における物理的微小環境とその応答因子の発現を解明した結果を、申請者が所有する3DOMM基盤技術に応用することで、バイオマテリアル(=足場材)の物性(硬さ)と物理的形狀に反映、操作し、口腔粘膜上皮の再生に適した物理的微小環境の同定を目指す。初年度は、*in vivo* 口腔粘膜のメカノバイオロジカルな特徴を、角化と非角化上皮をもつ口腔粘膜組織に対し、免疫組織化学的に検討を行う。それと並行し、申請者が今まで研究を進めてきたうろこコラーゲンゲルに、ヒアルロン酸(HA)を添加したバイオマテリアルを足場材に用いるための基礎的データを得る。次年度は、HA添加コラーゲンゲルに既製の不織布を押圧し、乳頭様構造を付与、上皮細胞を播種し3DOMMを作成する。メカノバイオロジーの視点から組織学的、免疫組織化学的検討を行い、物理的微小環境が上皮再生に与える影響を検討する。また、口腔粘膜創傷治療モデルとしての機能的検証も実施する。これにより、3DOMMを解析用ツールとした、口腔粘膜メカノバイオロジー研究基盤が構築できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

インフォームドコンセントを得た患者から採取した口腔粘膜組織を、2% Anti-Anti solution 含有 0.04% トリプシン溶液に浸漬インキュベートした後、上皮細胞を分離し、0.06mM のカルシウムを含む上皮細胞培養用培地 EpiLife® で培養を行った。培地は 2-3 日おきに交換し、継代を行った。通常の実験には継代 2-3 代目の口腔粘膜上皮細胞を用いた。

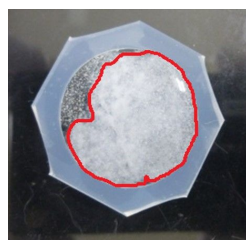
#### (2) コラーゲン足場材の作成

足場材の作成は、研究のご協力を頂いている(株)多木化学様よりご提供いただいた。使用したコラーゲンは、熱帯に生息する魚であるティラピアのうろこから精製した魚うろこコラーゲンである。まず凍結乾燥されたコラーゲンを、4、24 時間かけて塩酸で溶解させ、この液体を 1:9 で 10xDPBS に混ぜて、できた 1% 魚うろこコラーゲン溶液を専用の 12well サイズのシリコンラバー容器に注入し、25 度で一晩インキュベートすることでコラーゲンの線維化を図った。その後、ガンマ線照射によりコラーゲン線維の架橋と滅菌を図った。

魚うろこコラーゲンゲル単体の濃度としては、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%を設定し、それぞれに対して引っ張り試験を実施して、本体の物性を計測した。

#### (3) ヒアルロン酸添加コラーゲン足場材の作成

これの作成に多大な時間を費やさざるを得なくなり、これが本課題で繰越申請が必要になった要因である。研究計画では、コラーゲン：ヒアルロン酸 = 1：1 つまり、50%のヒアルロン酸を添加する計画にしていたが、ヒアルロン酸とコラーゲンがヒアルロン酸のカルボキシル基（マイナス電荷）とコラーゲンのアミノ基（プラス電荷）が結合してポリイオンコンプレックスを作り易く、沈殿物が先にできてしまった。出来上がったコラーゲン足場材も、他のプロテオグリカン（たとえばコンドロイチン硫酸）のように均一になっているかの判断が難しく、一様なコラーゲン足場材作成に相当難渋した。単にコラーゲンとヒアルロン酸を混ぜるだけでは不均一な足場材しか作成できないため（図）、混ぜ方を変えて作成を試みたところ、ヒアルロン酸濃度は溶液の粘性の観点から、コラーゲンに対して 10%であれば均一な足場材が作成可能であることがわかった。これは当初の計画よりかなり低い添加量となったが、やむを得なかった。



イオンコンプレックス

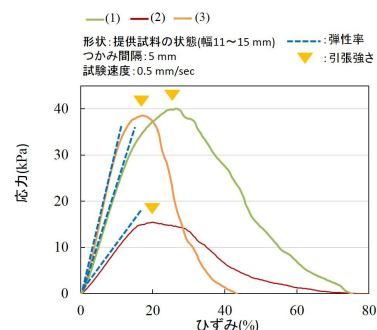
#### (4) 3DOMM の作成

本学医歯学総合病院で実施しているヒト臨床応用プロトコールに沿って、3DOMM を作成した。具体的には、コラーゲン製の足場材を一晩、4 において 0.05% のヒト 4 型コラーゲン溶液に浸漬した。0.025% トリプシン EDTA 溶液で播種予定の細胞をフラスコから剥がし、12well プレートひとつに相当するサイズのコラーゲン足場材 1 枚について 260 万個の細胞を播種した。この時点でカルシウム濃度は 1.2mM に上げた EpiLife® で培養を行った。4 日目までは、12well 中に沈んだ状態で毎日培地交換を行った。4 日目以降は、エアリキッドインターフェースフラスコに移し、7 日間気相液相培養を行った。培地交換は 1 日おきとした。7 日目に 3DOMM を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋し、HE 染色を施し組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

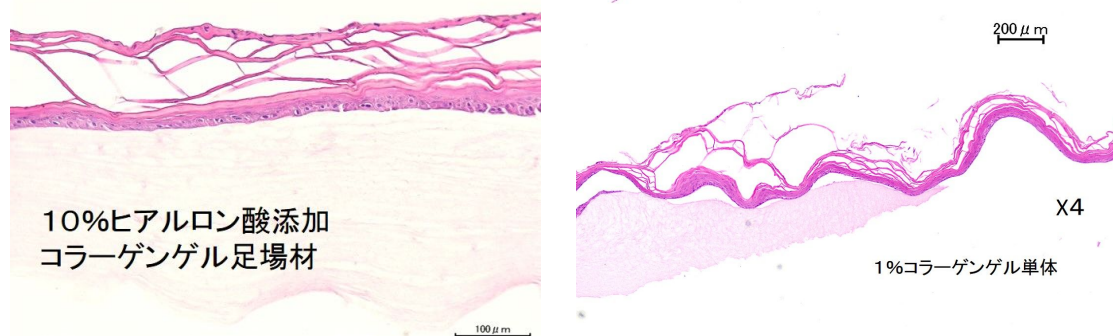
右に、コラーゲンゲル単体の引っ張り試験の結果を示す。図中点線で示したグラフ初期の傾きは弾性率を表し、傾きが大きいほど変形しにくく、傾きが小さいほど軟性であることがいえる。矢印で示した曲線の頂点部が引張強さであり、破断させるのに必要な荷重を表す。(1)(2)はコラーゲン濃度 1% で、(2)にはヒアルロン酸を 10% 添加した。(3)は同じくヒアルロン酸 10% 添加した 1.5% コラーゲンゲルである。弾性率は無添加群に比べヒアルロン酸添加群がより低い弾性率を示し、引張強さも無添加群に比較するとヒアルロン酸添加群が低い結果となった。

しかしながら、この試験方法ではゲル全体の物性の測定は可能であるが、細胞を播種するゲル表面の物性の測定はできていないため、原子間力顕微鏡などの他の測定機器でヤング率の測定を実施する必要がある。主観的な指標であるが、コラーゲン濃度が 2% のゲルでは足場材として板状を呈し、端を把持してもゲル自体が折れ曲がらない程度の強度を持つのに対し、0.5% ではピンセットで把持するとちぎれてしまい、引っ張り試験に耐え切れなかった。このことから、口腔粘膜上皮組織のメカノバイオロジーを研究する場合にコラーゲン濃度としては、1-1.5% を中心に、その前後の濃度がふさわしいことが示唆された。また、10% ヒアルロン酸を添加し



たコラーゲンゲル足場材は、コラーゲン単体よりも軟らかく、しなやかなハンドリング強度を示したので、ヒアルロン酸の添加によって、コラーゲン足場材の表面硬度の微調整も可能であることも示唆された。

さらに本課題では、3DOMM を1%コラーゲンゲル足場材と、それに10%のヒアルロン酸添加足場材を用いて作成を行った。組織像を写真に示す。両者の足場材において、連続し、かつ十分に重層化した口腔粘膜上皮層の形成が認められた。一方、ヒアルロン酸含有の足場材に形成された上皮組織は、HE染色で観察する限りより生活細胞層が多く存在し、上皮細胞の分化もコラーゲン単体に比べ正常に認められた。これから、さらに実験を重ね、足場材の硬さによる物理的環境と、ヒアルロン酸という生化学的環境のどちらが優位に上皮の形成に寄与しているか、当初の計画どおり、免疫組織化学的検討によってさらに解明を進めたい。



組織・細胞のメカノバイオロジー応答を操作するバイオマテリアルの開発は、再生医工学に用いる細胞外基質や足場材と、細胞・組織間相互作用の調節や最適化のための重要な基盤技術となり得る。口腔粘膜のメカノバイオロジーに関する知見はほとんど得られてない。本研究では実施できた研究は計画の半分にはかない程度であったが、引き続き研究は継続し、メカノバイオロジーの視点から口腔粘膜上皮の再生に適した*in vitro* 物理的微小環境の構築という、新しい視点が切り拓けると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- 1) 鈴木 絢子, 加藤 寛子, 干川 絵美, 羽賀 健太, 塩見 晶, 上野山 敦士, 兒玉 泰洋, 河上 貴宏, 三輪 慶人, 桑江 博之, 塩澤 菜由, 水野 潤, 齊藤 一誠, 早崎 治明, 泉 健次: マイクロパターン化した魚うろこコラーゲン足場材を用いた培養口腔粘膜の開発. 第 18 回日本再生医療学会総会, 神戸, 2019. 3. 21
- 2) Ayako Suzuki, Hiroko Kato, Takahiro Kawakami, Yoshihiro Kodama, Mayuko Shiozawa, Emi Hoshikawa, Kenta Haga, Aki Shiomi, Atsushi Uenoyama, Issei Saito, Haruaki Hayasaki, Hiroyuki Kuwae, Keito Miwa, Jun Mizuno, Kenji Izumi: Development of a Micropatterned Fish Scale Collagen Scaffold to Manufacture a Tissue-Engineered Oral Mucosa. 5th TERMIS World Congress, Kyoto, Japan, 2018. 9. 6
- 3) 鈴木絢子, 加藤寛子, 干川絵美, 塩見 晶, 上野山 敦士, 河上貴宏, 兒玉泰洋, 齋藤一誠, 早崎治明, 泉健次: 魚のうろこコラーゲンを足場に利用した培養口腔粘膜の開発. 第 17 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2018.3.21-23
- 4) 鈴木絢子, 加藤寛子, 干川絵美, 河上貴宏, 兒玉泰洋, 齋藤一誠, 早崎治明, 泉健次: うろこコラーゲンを使用した培養口腔粘膜の開発. 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会, 東京, 2017. 11. 20-21, 第 39 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集: 97, 2017.

## 6. 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 泉 健次

ローマ字氏名: Kenji Izumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。