

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11322

研究課題名(和文)顎顔面再建治療に向けた上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートの移植検証プロジェクト

研究課題名(英文) Cell sheets were prepared and layered to produce a hybrid cell sheet with verification of transplant

研究代表者

阿部 伸一 (Abe, Shinichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40256300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：筋芽細胞と間葉系細胞を使用して細胞シートを作製し、長期培養時の筋芽細胞に対する間葉系細胞の影響について調べた。その結果、間葉系細胞と共培養したシートではDesminやCollIVの発現は減少していた。細胞増殖性因子であるIGFは長期培養で間葉系細胞と共培養した時のみ発現していたことから、長期培養を行うことによっても間葉系細胞の存在により筋芽細胞の分化に影響を与えている可能性が考えられた。さらに、この積層シートを日本家兔頬粘膜に移植し、筋特有蛋白(デスミン)およびコラーゲンの局在を観察し、周囲と同化して生着している状況が確認された。

研究成果の概要(英文)：Cell sheets of myoblasts and mesenchymal cells were generated, and the effects of the mesenchymal cells on the myoblasts during long-term cultivation were investigated. Presence of desmin and collagen type IV seen in normal muscle tissues was also confirmed in the produced cell sheets. IGF, insulin-like growth factor, was expressed only when the mesenchymal cells and myoblasts were co-cultured, suggesting the presence of mesenchymal cells in the long-term co-culturing system could influence myoblasts proliferation. Furthermore, the cell sheet was transplanted into the rabbit lamina mucosa, and the localization of the muscle specific protein (desmin) and collagen was observed, and it was confirmed that the cell sheet was assimilated in the mucosa.

研究分野：組織解剖学

キーワード：筋芽細胞 Desmin IGF-1 コラーゲン 頬粘膜

1. 研究開始当初の背景

咀嚼・嚥下機能を担う口腔、咽頭へ続く粘膜は、その粘膜上皮直下に頬筋、咽頭収縮筋などの一層の筋層を有し、この連続する筋層が口腔、咽頭における機能の最も重要な役割を担う。

近年細胞シート工学が進歩し、舌癌、頬粘膜癌など広範な粘膜摘出後に自己口腔粘膜細胞を無細胞真皮上に積層し移植することが試みられているが、直下の結合組織層から筋層の再構築までは困難なことから、治癒後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで我々がこれまで取り組んできたことは、間葉系の細胞シートを積層させるという点であった。本申請期間内に、中間層である結合組織細胞シート、最深層である骨格筋細胞シートについての検討、さらに移植に適した積層シートの検討が必要であった。

2. 研究の目的

本研究は、口腔、咽頭粘膜実質再生を実現するために、口腔粘膜上皮、口腔粘膜上皮組織、筋組織から抽出された細胞を用いてそれぞれの細胞シートを創製することを目的とし、特に申請期間に移植後の組織への生着を目的としたハイブリッドシートの最内層（筋層）の成熟状態などを検討する。

3. 研究の方法

1) Preparation of rabbit oral mucosa tissue

この研究は東京歯科大学の実験動物委員会の承認（承認番号：270101）のもと行われた。日本家兎2羽に対しベントバルピタール (Kyoritsu Seiyaku CO., Tokyo, Japan) 50mg/ml を 4ml iv、1M K-CL (Wako, Osaka, Japan) 4ml iv にて安楽死後口腔粘膜組織を採取した。

2) Isolation of oral mucosal mesenchymal cell

口腔粘膜直下の骨格筋組織を分離した後、上皮と上皮組織とに分離するため、1.2U/ml dispase II, 37C, overnight 後 (Satake et al., 2013)、顕微鏡下で上皮結合組織を分離した。その後、上皮結合組織から 2 mg/ml, Collagenase, 37 で一晩処理し口腔粘膜上皮細胞を抽出した。増殖した口腔粘膜上皮細胞を 0.25% Trypsin, 37, Over night で処理し、0.8%, Methylcellulose single cell culture にて間葉系細胞を分離した。分離した間葉系細胞は、MSC growth medium (MSCGM) (Lonza, Walkersville, MD) supplemented with mesenchymal cell growth supplement (MCGS), L-glutamine and GA-1000 を培養液として使用し1週間隔で継代を行った

3) Isolation of oral mucosa myoblasts

口腔粘膜組織から分離した骨格筋組織を 0.125% Trypsin, 37, 2 hours で処理し、細胞を分離した (Terumo Co. Ltd., 2007)。筋芽細胞に関して始めは線維芽細胞の含有率が高いので、細胞の接着性の違いを利用した選択的接着法にて筋芽細胞の分離を行った (Terumo Co. Ltd., 2007)。採取した筋芽細胞は、A-DMEM + 10% FBS を培養液として使用し1週間隔で継代を行った。

4) 細胞シートの作製方法と培養条件

6 ウェルプレートインサート (Transwell; Corning, NY, USA) 上に日本家兎から採取した筋芽細胞を攪拌したコーゲンゲル (Cellmatrix^R; Nitta-gelatin CO, Osaka, Japan) を播種し、筋芽細胞層の上にコーゲンゲルを積層したもの（以下 Gel と記す）筋芽細胞層の上に日本家兎から採取した間葉系細胞を攪拌したコー

ーゲンゲルを積層したもの(以下 OS と記す)を用意し、共培養の有無による影響について検討した(Fig.1)。筋芽細胞数は 1.0×10^4 cells/0.8ml Collagen gel/well、間葉系細胞数は 0.25×10^5 cells/0.8ml

Collagen gel/well とした。シートを培養する時にコラーゲンゲルが溶解しないように 2ml A-DMEM + 10%FBS 当たり 5 μ l の Aprotinin(666 KIU/ml, Wako, Osaka, Japan)を加え、培養は上段が 0.5ml、下段は 1.5ml の液量にて培養した。培養経過を観察するため 2 週間隔 2、4、6 週で培養後シートを回収した。

5) Histochemical analysis

回収したシートを染色用として長さ約 1cm,幅約 0.5mm のシート片を 2 片切り取り、Tissue-Tek で包埋した。凍結切片を 5 μ m の厚さで作製し、組織学的な観察として H-E 染色と免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学的染色は固定 (2% Paraformaldehyde) 5min、ブロッキング (10% Normal Donkey Serum + 1% BSA-0.001PBS)for 60min 行って、1 次抗体としてそれぞれ抗 Desmin 抗体(1/300, D9,LSBio,LS-B7175)と抗 Collagen type 抗体 (1/300,Southern Biotec,1340-01)を使用し、室温 90min 反応させた。また 2 次抗体にはそれぞれ Cy3-Donkey anti-Mouse IgG (CHEMICON,AP192C) と Rho-Donkey anti-Goat IgG(Jackson,705-025-147)室温、30min にて標識した。細胞の核は 0.5mg/ml 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)for 5min で染色し、観察は florescence microscope (Axioplan2 imaging; Carl Zeiss Inc., NY, USA)を用いて行った。

6) RT-PCR

残りのシートは RNA 精製用として回収した。RNA は SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, USA)を使用し抽出し、相補的 DNA は、avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を使用し合成した。m-RNA レベルでの筋芽細胞に関連した遺伝子発現について調べるため、免疫組織化学的染色で染色した Desmin,Coll の他、増殖因子の HGF,IGF、筋芽細胞の未分化性因子である Pax7, Myogenin, MyoD, CD34、また IGF 関連因子である IGF-1R,Myoferlin について RT-PCR を行った。内部標準物質として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。RT-PCR の条件として、増幅プログラムは熱変性 : 95 ,30sec、アニーリング : 52 ,30sec、伸長反応 : 72 ,20sec を 30cycles 行い、最終的な伸長反応は 72 で 5min とした。また、泳動条件は、100WV,30min とした。使用したプライマーは Table 1 に示す。

7) Western blot

作製した細胞シートのタンパクは lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40; Calbiochem, Darmstadt, Germany) を用いて溶出した。タンパク濃度は DC protein assay (Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。全てのサンプルは 2 \times samples buffer (NuPAGE LDS sample buffer (4 \times) (Invitrogen)), 12% 2-mercaptoethanol (Wako) を用いて調整し、30 μ g/lane で 12% Bis-Tris gel (Novex NuPAGE; Invitrogen) を用いて泳動を行った。polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Billerica, MA,

USA)へ転写し、正常血清 (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いてブロッキングした。一次抗体は desmin (1:100)、collagen type IV (1:250)、 α -actin (1:1000, mAbcam8226; Abcam, Cambridge, UK) の希釈倍率で反応させ、2次抗体は biotinylated secondary antibodies (Vector Laboratories) を用いて反応を行った。バンドの可視化を行うため、Vectastain ABC Elite Kit (Vector Laboratories) と DAB (Vector Laboratories) を用いて反応させた。バンドは Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) の The plot profiles を用いて解析した。

4. 研究成果

1) 組織学的解析

H-E 染色像からは、長期培養を行っても培養条件に関係なく継時的に細胞数が多くなっている様子が観察できた。

Desmin の免疫組織化学的染色像からは、どの条件においても筋芽細胞層において Desmin の発現が認められることから、筋芽細胞の存在が確認出来た。Western blot においては間葉系細胞を共培養することによって Desmin の発現は減少していた。

Coll の免疫組織化学的染色像からは、今回の染色ではあまり大きな差は認められなかったが、6週の間葉系細胞との共培養ではその他のサンプルに比べて染色度が強い部位が見られ、Western blot においても間葉系細胞を共培養することによって Coll の発現は減少していた。

2) RT-PCR

RT-PCR の結果からは、Desmin, Coll の他、筋芽細胞の未分化性因子である Pax7 や Myogenin, MyoD, CD34 の発現が6週でも継続して認められた。また、筋芽細胞をはじめとして様々な細胞の増殖や運動などの調節因子として知られている HGF, IGF に対して PCR を行った結果、HGF は全ての培養条件で発現したが、IGF は4週と6週の間葉系細胞との共培養でのみ発現が認められた。IGF が筋芽細胞へどのような影響を及ぼしているか m-RNA レベルで調べるために、IGF-1 Receptor (IGF-1R) と Myoferlin の RT-PCR を行ったところ、全ての培養条件において発現が認められたが、間葉系細胞との共培養の有無による違いは認められなかった。

以上の結果から Desmin の発現は間葉系細胞と共培養することによって優位に減少したことから、筋芽細胞の分化が抑制された可能性が考えられた。この状態の積層シートを日本家兎の頬粘膜に移植したところ、特に異物反応もなく、生着した状態の組織像を得ることが出来た。

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3件)

- (1) Yoshimoto T, Serikawa M, Higa K, Kitamura K, Kasahara M, Yamamoto M, Abe S. Effect of mesenchymal cells on myoblast sheets embedded in collagen gel. The Bulletin of Tokyo Dental College, 59:87-95, 2018.
- (2) Yamane S, Higa K, Umezawa T, Serikawa M, Shimazaki J, Abe S. Engineered three-dimensional rabbit oral epithelial-mesenchymal-muscular hybrid sheets. International Journal of Oral Science,

8:145-154, 2016.

- (3) Umezawa T, Higa, M, Serikawa M, Yamamoto M, Matsunaga S, Shimazaki J, Abe S. Proliferative activity of skeletal myoblast sheet by paracrine effects of mesenchymal stem cells. Journal of Oral Biosciences, 58:158-166, 2016.

〔学会発表〕(計3件)

- (1) 小川雄大, 北村 啓, 山本将仁, 松永 智, 阿部伸一, 筋組織およびその周囲における弾性線維とヒアルロン酸の共存に関する組織学的研究 - 頭頸部筋とヒト尿道括約筋複合体の比較, 歯科学報 (0037-3710)116 巻 5 号 Page385(2016.10)(第302回東京歯科大学学会総会, 千代田区)
- (2) 奈良倫之, 北村 啓, 山本将仁, 永倉遼太郎, 阿部伸一, 軟口蓋器官形成における免疫組織学的解析, 歯科学報 (0037-3710)116 巻 5 号 Page399(2016.10)(第302回東京歯科大学学会総会, 千代田区)
- (3) 北村 啓, 山本将仁, 石川 昂, 阿部伸一, 山本 仁, 軟口蓋滑車構造形成における組織間作用の解明, The 122nd Annual Meeting of the Japanese Association of Anatomists Page187(2017.03)(第122回日本解剖学会総会・全国学術集会, 長崎市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 伸一 (Abe, Shinichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 40256300

(4) 研究協力者

山根 茂樹 (Yamane, Shigeki)

梅澤 貴志 (Umezawa, Takashi)

芹川 雅光 (Serikawa, Masamitsu)