

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20566

研究課題名(和文)新規医療用シートの臨床応用に関する研究

研究課題名(英文)Study about a novel medical sheet for clinical use.

研究代表者

池田 裕子(Ikeda, Yuko)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80772748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、従来医療廃棄物として捨てられてきた羊膜と口腔上皮細胞それぞれが有する細胞特性をうまく組み合わせる事により、(羊膜を足場として使用し、その上で口腔上皮細胞を培養した)作成された培養上皮シートに対し、染色や免疫染色を行ったところ、角化を有する正常上皮組織と類似した重層扁平上皮であることを確認した。またマウスを用いた創傷治癒モデルでは、創部にこの培養上皮シートを移植したところ、優れた治癒経過を確認した。移植部の治癒組織を確認したところ、正常皮膚組織と類似の組織構造を有しており上皮の分化マーカーの発現も類似していることから正常機能を有することが確認できた。

研究成果の概要(英文)：Human amniotic membrane (AM) as a graft material has been used in various fields. Hyper-dry amniotic membrane(HD-AM) as a novel dried amniotic is easy to handle and can be preserved at room temperature without time limitation. Oral mucosa equivalent(OME) was fabricated by seeding human oral keratinocytes on HD-AM in serum-free culture system, and then transplanted onto full-thickness wounds on athymic mice. The wound healing was evaluated and the OME both before and after transplantation was analyzed with hematoxylin-eosin staining and immunohistochemical staining for CK10, CK16, and Ivolucrin(IVL). After transplantation to athymic mice, immunohistochemical staining for CK10, CK16, and IVL showed that OME both before and after transplantation exhibited the same characteristics as native gingival mucosa but different from those of mouse skin. In conclusion, the OME fabricated with HD-AM as a graft material offered a good morphology and stable wound healing.

研究分野：再生医療

キーワード：乾燥羊膜 臨床応用 keratinocyte

1. 研究開始当初の背景

米国では、死体から採取した皮膚を凍結保存する皮膚バンクと呼ばれるシステムやヒト新鮮屍体真皮を scaffold とする上皮培養研究が盛んに行われている。しかしわが国では、死体から皮膚を採取したりヒト新鮮屍体真皮を scaffold とする培養法は倫理的に問題がある。また、培養上皮研究の多くは、作成時にマウス feeder 細胞やウシ血清が使用されている。羊膜と口腔上皮を用いた過去の実験報告も例外でなく、上皮の重層化を目的にそれらが使用されているのが現状である。しかし FDA (アメリカ食品医薬品) のガイドラインでは、上皮細胞の培養にマウス feeder 細胞やウシ血清を用いる方法は、プリオンや未知のウイルスの混入の可能性があるため推奨されていない。

羊膜は生殖や胎盤免疫に深く関与しており、胎児を母体の免疫系から保護している神秘的な組織である。これまで羊膜は、火傷や皮膚潰瘍をはじめ古くからさまざまな医学分野で臨床応用が試みられてきたが、広く臨床に応用されるには至っていなかった。羊膜移植における羊膜の作用機序には未だ不明な点が多いとされているが、眼科領域などの再生医療分野で最も脚光を浴びている組織のひとつである。瘢痕形成が少なく正常に近い上皮組織が速やかに伸展したなど良好な結果が得られている。このような羊膜の優れた「創傷治癒機構」(各種増殖因子の放出・抗菌/抗炎症作用)や「免疫学的特性」(拒絶を惹起しにくい組織)は、臓器移植や遺伝子治療への応用にも期待され、最近では骨髄・臍帯血に続く第3の組織バンクとして再生医療支援機構が「羊膜バンク」を設立した。眼表面の再構築に、羊膜と口腔粘膜上皮の複合培養上皮が応用された報告も散見されており、2010年には「難治性眼疾患に対する羊膜移植術」に対し厚生労働省より先進医療の認可が下り、2014年には眼科疾患に対する羊膜移植に対し保険収載された経緯がある。

親不知を抜歯した際に付着している歯肉上皮細胞は、皮膚上皮細胞と比較し、増殖能が著しく高いなどの優れた細胞特性があるといわれ、培養歯肉上皮の口腔領域への応用や火傷治療などで既に臨床応用された報告もみられるが、現在まで口腔領域への羊膜の応用は試みられていない。

2. 研究の目的

本研究では、従来医療廃棄物として捨てられてきたこれら羊膜と口腔上皮細胞を、それぞれが有する細胞特性をうまく組み合わせる事により作成した羊膜・口腔上皮複合培養上皮シートに対し、免疫組織学的検討を行い、その機能を確認することとした。また in vivo study としてマウスを用いた創傷治癒モデルを用いて、その治癒経過を確認し、実際の臨床応用に向けた最適条件を明らかに

にする検討を行う。

3. 研究の方法

信州大学医学部附属病院特殊歯科・口腔外科で行われた埋伏智歯抜歯の際、縫合時トリミングし余剰となった歯肉上皮を、患者さんの同意のもと一部採取し、上皮細胞のみを抽出し培養する。培養した歯肉上皮細胞を乾燥羊膜上で約2週間と4日培養する。培養し作成した羊膜・口腔上皮複合培養上皮シートを採取し、ホルマリン固定後、免疫組織学的検討を行う。

図1 図2 図3



図4



図1: 乾燥羊膜. 図2: 乾燥羊膜固定装置. 図3: 三次元培養. 図4: 羊膜・口腔上皮複合培養上皮シート

図1に使用した乾燥羊膜を示す。この一部分を切除し、図2に示す乾燥羊膜固定装置の中央部分に羊膜を固定する。固定した羊膜を装置ごと培養液に浸し、その上部に採取し培養した歯肉上皮細胞をまく(図3)2週間と4日後に装置から外し、羊膜・口腔上皮複合培養上皮シートを採取する(図4)。

In vivo study

実験用マウスの背部皮膚表面に1×1cm四方の上皮欠損を形成し、欠損部へ羊膜口腔上皮複合培養シートを移植し、コントロール群と比較しその治癒効果を検討する。検討のため移植3週間後に瘢痕収縮の距離を計測後、移植部位を採取し免疫組織学的にコントロール群と比較検討する。



図5

図5に実際のマウス背部への羊膜口腔上皮複合培養シート移植の様子を示す。マウス背部の体毛を除去後約1×1cm四方の上皮欠損を作成している。

4. 研究成果

羊膜を scaffold として使用し、その上で口腔上皮細胞を培養した結果作成された培養上皮シートに対し、H-E 染色や免疫染色(CK10、インボルクリン)を行ったところ、角化を有する正常上皮組織と類似した

重層扁平上皮であることを確認した。羊膜・口腔上皮複合培養上皮シートは正常上皮組織と類似した分化像を呈し、上皮のバリア機構を有することが示された。

図 6 図 7

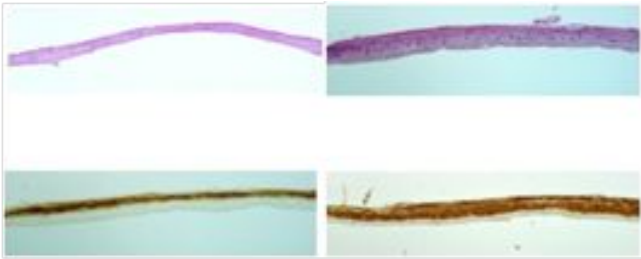


図 8 図 9

乾燥羊膜の H- E 染色像を図 6 に示す。ほとんど角化層のみであり、羊膜細胞はほとんど見られない。作成した上皮シートの H- E 染色像を図 7 に示す。基底層には上皮基底層細胞の列状配置が見られ、上層では細胞が少なくなり、角化している。上皮シートの CK10 染色像を図 8 に示す。基底層では染色性を示していないが、角化層での染色がはっきり表れている。上皮シートの IVL 染色像を図 9 に示す。基底層以外のすべての層で染色が表れている。(図 6~9 は全て 20 倍。)

またマウスを用いた創傷治癒モデルでは、創部(マウス背部に人工的に 1×1 cmの皮膚欠損を作成)にこの培養上皮シートを移植したところ、優れた治癒経過を確認した。移植部の治癒組織を移植 3 週間後に採取し確認したところ、正常皮膚組織と類似の組織構造を有しており上皮の分化マーカーの発現も類似していることから正常機能を有することが確認できた。

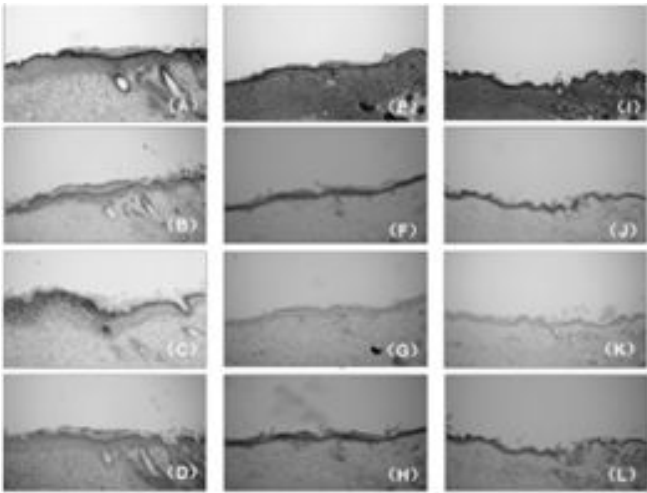


図 10 A- D, 羊膜・口腔上皮複合培養上皮シート移植後の免疫染色。E- H, A- D, コラーゲン膜・口腔上皮複合培養上皮シート移植後の免疫染色。正常組織の免疫染色。HE 染色 (A, E, I))、CK10 染色 (B, F, J)、CK16 染色 (C, G, K)、IVL 染色 (D, H, L)10X

マウス背部皮膚欠損作成後の上皮シート移植部とコントロール群(欠損部への移植無し)の瘢痕収縮率の比較では、明らかに上皮シート移植部での収縮率が低く、上皮シート移植により瘢痕収縮が予防できたことが認められた。



瘢痕拘縮の比較図を図 10 に示す。瘢痕拘縮の縮小率は、縮小した上皮欠損面積を A、拘縮により欠損部位に進出してきた非上皮欠損面積を B としたとき、A/(A+B) で算出した。

図 11 図 12



上皮シート移植 3 週後のマウス上皮欠損部位を図 11 に示す。

上皮欠損形成 3 週後のコントロール群(何も移植せず、自然治癒に任せた群)を図 12 に示す。

図 11 と図 12 を比較すると明らかに図 12 のほうが、瘢痕拘縮が大きかったことがわかる。

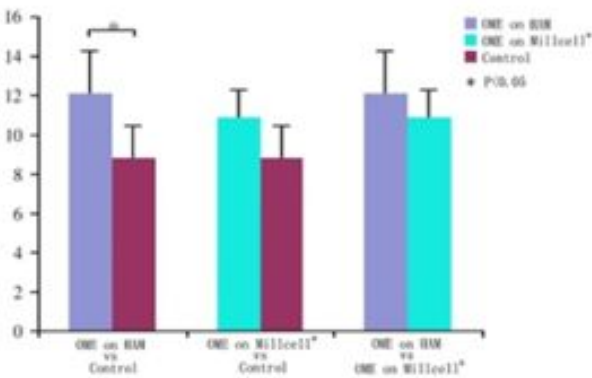


表 1

	OME on HAM	OME on Millicell®	Control
Before (mm²)	100	100	100
After (mm²)	12.03±2.14	10.89±1.36	8.77±1.60

表 2

瘢痕拘縮の縮小率の比較を統計学的に検討した(表 1、2)。

表 1、2 より移植群とコントロール群で、瘢痕収縮率に明らかに統計学的有意差($P<0.05$)がみられた。

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)
なし。

6．研究組織

(1) 研究代表者

池田 裕子 (Ikeda yuko)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80772748