

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17163

研究課題名(和文) 結合組織乳頭構造をもつ培養口腔粘膜の開発と義歯装着インビトロ加齢モデルへの応用

研究課題名(英文) Development of a more biomimetic 3D in vitro model of oral mucosa and its novel application for denture-wearing and oral mucosa aging model

研究代表者

塩見 晶 (Shiomi, Aki)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：80736653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の第1の目的である、生体に見られる皮膚や口腔粘膜の下部組織に存在する、キッチンスポンジのような3次元の微細構造を反映させた、より生体に近い3次元培養口腔粘膜インビトロモデルの開発に関して、研究計画にあった作成方法の確立まではいかなかったものの、作成の課題とその課題を解決するための手がかりを得ることができたので、今後引き続き研究したい。第2の目的の、このモデルを利用した加齢に関する研究の実施はできなかったが、方法論としては問題なさそうであり、こちらも今後の研究を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで開発・報告されてきた培養皮膚、口腔粘膜モデルの上皮と上皮結合組織の界面はすべて平坦である。しかし実際ヒトでは微細な凹凸構造が存在する。本研究では、この3次元的な構造を付し、より生体に近い培養口腔粘膜モデルを作成できる糸口をつかんだ。こうした試みは口腔粘膜ではこれまでに行われていない。このモデルを確立し研究に利用することで、高齢化社会で増加の一途をたどっている義歯装着患者の義歯床下粘膜の病態を、実験室レベルでの研究を広く行うことができるようになるため、これが実現することで学術的、社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：The first purpose of this study was to develop a more biomimetic 3D in vitro model of oral mucosa in which an intrinsic 3D microstructure underlain skin (epidermis) and oral mucosa, like a kitchen sponge, was reproduced. Although the establishment of the methodology for manufacturing the model had not been able to achieve as originally planned, we were able to obtain the clue for solving the problem. Thus, we are willing to pursue this research project in the future.

The second objective was to implement the investigation of aging in oral mucosa using this model. Although anything was not done in this project, there seems to be no problem as a methodology, we aim to keep this research going.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：3次元口腔粘膜インビトロモデル 生体模倣 魚うるこコラーゲン足場材 乳頭様構造 義歯床下粘膜

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

### 1. 研究開始当初の背景

咀嚼して食べる行為は、脳や様々な身体器官を刺激・活性化するので欠損補綴による口腔機能回復はQOL(Quality of Life)の維持・向上や健康長寿に重要である。超高齢化社会にあるわが国ではインプラントの需要が増大しているが、保険適用という経済面も含めると、ライフステージに合わせたケアが可能な義歯の総合的なメリットは大きく、可撤性義歯の需要はますます増加すると考えられる。義歯装着でしばしば引き起こされる顎堤粘膜の変化や顎骨吸収は、義歯の維持安定を困難にする大きな要因となり、義歯床下組織の保全を図るため、義歯装着によって引き起こされるヒトの組織変化の要因やメカニズムを明らかにすることは肝要である。動物実験により義歯を支持する軟組織、硬組織の組織学的変化や、生体の組織反応を総合的に解析できるが、動物実験では口腔内細菌や免疫応答の個体差等、結果にバイアスを与える因子の排除は難しく、さらに標的としたい生体反応に特異的な細胞応答の解析もトランスジェニック動物を用いなければ解析困難である。一方、*in vitro* モデルを用いた実験系は無菌的な状態で構成細胞を単純化できるため、特定の細胞に着目でき、純粋な機械的刺激に対する細胞レベルの観察を可能にするので、義歯床下組織の解析に必要不可欠である。

口腔粘膜の組織工学的手法の発達は再生医療の臨床応用だけでなく、生体組織モデルとしても利用され、口腔病変の病態解析に大きく貢献してきた。最近では、表皮(皮膚)研究分野でヒト生体固有の組織である3次元微小環境が注目されている。すなわち、*In vivo* の表皮と真皮組織の界面では、表皮の釘脚と真皮の結合組織乳頭が互いに嵌合する形状を示し、“真皮-表皮接合(DEJ)”といわれている。この微細凹凸構造は、組織の機械的強度の維持、表皮前駆細胞の局在、細胞接着因子の発現に関連していることは教科書でも述べられていたが、DEJを再現した皮膚*in vitro* モデルでも、細胞の動態が生体に近い反応を示したので、*in vitro* モデルでの3次元微小環境の重要性が示唆されている。*In vivo* の口腔粘膜は皮膚に比較し、幅50  $\mu\text{m}$  x 深さ100  $\mu\text{m}$  程のかなり急峻な結合組織乳頭を持つ。本研究の予備実験から、口腔粘膜でも結合組織乳頭で形成される3次元微小構造と上皮前駆/幹細胞ニッチの関連性が示唆された。しかし、口腔粘膜上皮組織固有の微小環境を再現(生体模倣)した*in vitro* 口腔粘膜上皮は開発されていない。申請者はこれまでヒト口腔粘膜の*in vitro* 病態モデル開発に携わり、培養口腔粘膜(3D oral mucosa model, 3DOMM)に、義歯装着を想定した圧刺激を加えることで、義歯装着モデルとし、口腔粘膜上皮細胞の増殖能抑制と分化亢進が起こることを明らかにした。さらに、H27~H28 若手研究(B)では、義歯装着*in vitro* 口腔粘膜モデルをさらに応用し、骨代謝への影響も検討した。この研究では培養期間が通常より長期に渡るため、一部のサンプルでは上皮が足場材から剥離するという問題に直面し、実験継続に支障が出た。これは、現モデルは表面が平坦な線維芽細胞含有コラーゲンゲル上に上皮が形成されるという機械的強度の問題に加え、義歯装着を模した加圧刺激と長期間培養という過酷な実験条件により、上皮細胞と足場材との接着も細胞生物学的に弱いことに起因すると考えられた。そこで申請者は、過酷な実験条件下でも解析を続けるためには足場材の改善が不可欠であると考えた。

また、義歯使用患者は高齢者が多いことを考えると、臨床に即した義歯インビトロモデルによって義歯床下組織の研究を実施するためには、申請者が開発した義歯装着*in vitro* モデルを工夫して、すでに加齢変化を来した口腔粘膜上皮の義歯加圧による影響を解析する必要がある。意図的に継代を重ねた細胞を用いた予備実験でも、細胞が足場材から剥離しやすかった。このため、生体組織に近い応答をインビトロモデルから得るためには、結合組織に相当する足場材の上皮界面に、口腔粘膜のDEJを模した微細な凹凸形状を付与し、機械的強度が高い*in vitro* モデルを開発することが研究継続においても不可欠であるという発想に至った。

### 2. 研究の目的

まず、第一の目的は、上皮細胞の播種面であるコラーゲンゲルに不織布を押圧して口腔粘膜結合組織乳頭に類似した凹凸形態を付与した3DOMMを作成し、組織学的、免疫組織化学検討を加え、3DOMMにおける上皮-結合組織界面の3次元微小環境が上皮接着に与える影響を明らかにすることである。第二の目的は、意図的に継代した細胞を用い*in vitro* 口腔粘膜加齢モデルとして扱うことで、このモデルの細胞生物学的特徴を明らかにする。そして、加齢モデルに義歯装着を想定した圧刺激を加え口腔粘膜に与える影響を追究することで、義歯を使用している高齢者の口腔粘膜における組織変化、病態変化を解明し、高齢者の口腔健康の増進に貢献する。

### 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。また、加齢変化に至った細胞としては継代 6 代目以降の細胞を用いた。そのために、加齢細胞はそのまま該当する継代数まで培養を継続するが、コントロールとしての若い継代の細胞は、継代 1 代目のときに細胞を凍結保存し、再解凍することで実験に使用した。細胞の凍結は、通常通り 0.025% トリプシン EDTA 溶液で細胞をフラスコから剥がし、400 万の細胞あたり、培地 1.4mL、ウシ胎児血清 0.4mL、DMSO 0.2mL の割合で懸濁し、クライオプリザーブドチューブに入れ、液体窒素中で保管した。

#### (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。不織布は、架橋時にコラーゲン足場材の片面に圧接して、表面に凹凸構造を付与した。

#### (3) 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、表面に DEJ 様の微細凹凸構造を付した実験群のコラーゲン足場材と、対照群としての凹凸構造を付していない表面平坦な足場材を一晩、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

#### (1) 第一の目的に対する成果

不織布圧接により、3 次元的微細凹凸構造を付与した魚うろこコラーゲングルの作成に成功した。このゲルを実験群とし、不織布の圧接を行わず表面が平坦なゲルを対照群として、3DOMM の組織像を観察したところ、実験群と対照群ともに、コラーゲングル上に口腔粘膜上皮細胞によって重層扁平上皮が作成された。しかしながら、形成された上皮の基底層とコラーゲングルの界面を観察すると、微細凹凸構造を付与した足場材と再生上皮の間にはギャップが存在しない一方で、対照群として用いた平坦なコラーゲン足場材上に再生した上皮と足場材の間には、空隙が多く観察された。培養環境下やホルマリンの固定直後では、上皮と足場材の剥離は肉眼的に観察されなかったが、このような組織像からは、対照群における上皮と足場材の接着は脆弱であることが示唆された。以上から、不織布による 3 次元的凹凸微細構造の付与は 3DOMM の機械的強度、接着の向上に寄与していることが推察された。従って、インビトロモデルとして義歯装着や加齢口腔粘膜モデルへの応用は、十分にこのプロトコールによって達成される可能性がある。

一方、課題としてあげられるのは、不織布圧接による 3 次元的微細凹凸構造は、単純な凹凸であり、全く規格化されたサイズ、形状ではなく、口腔粘膜の DEJ 構造を生体模倣しているかどうかについては議論の余地が大いにあることが類推される。口腔粘膜というヒト固有の細胞生物学的解析を実施するためには、やはり、生体の DEJ 構造そのものを模した 3 次元的微細凹凸構造を付与することが望ましい。従って、今後は不織布圧接による方法とは異なった、より洗練された先端技術を駆使した、あるいは、医歯工連携を図ったようなプロジェクトにより、コラーゲングル表面上に DEJ 様構造を付与することが求められると考える。

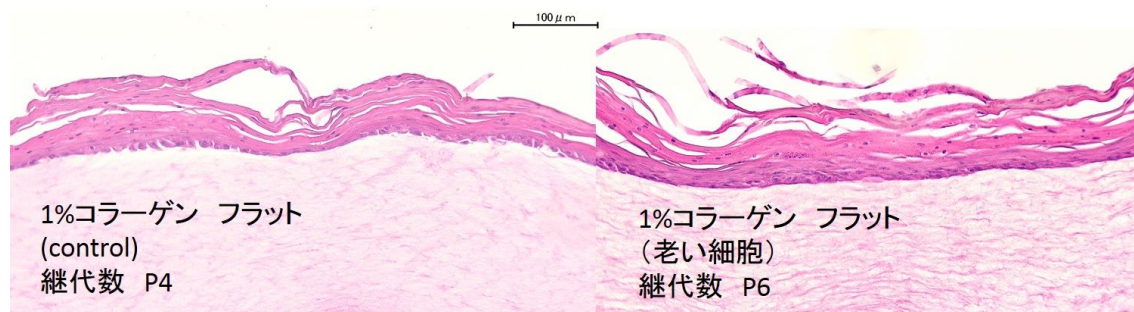
さらに、予想外の課題として挙げられることとして、今回組織像は示さなかったが、再生した口腔粘膜の上皮層は、実験群において非常に肥厚した上皮が形成された。これは単純に重層化した上皮層の数が対照群より多かったのみならず、足場材そのものの収縮が起こっていたため、足場材自体の収縮によって上皮が予想外に厚みを増したことが否定できない。したがって、これも今後の課題として、収縮しない足場材の開発工夫も必要と思われる。足場材の収縮の原因は主に上皮細胞の移動や増殖のときに発生する牽引力によるものと推測されるので、足場材の物性の強化というものがまず必要かもしれない。

#### (2) 第二の目的に対する成果

この目的を達成するために、同一患者から採取した口腔粘膜上皮細胞の継代数を変えたものを用意して、それらをゲル上に播種して 3DOMM を作成して、組織学的観察を試みた。しかし

ながら、数回実験を試みたが、継代数の増えた細胞は増殖能力が低下していくために、ゲル上に播種時には必要な細胞数を得ることができず、何度も失敗を繰り返した。ようやく、継代数が2つしか変わらない細胞を用いて、予備実験として表面が平坦なゲルを用いて作成した3DOMMの組織像を上に表示。いずれも十分に分化した重層扁平上皮が形成され組織学的な差異はほとんどみられなかった。このことから、実験系をもう少し検討する余地があると思われる。このため、3次元微細凹凸構造を付与したゲルには、細胞を播種することは実施しなかった。今後、引き続きこの実験プロトコルの確立は目指す予定である。

よって、義歯装着モデルの実施も本課題では実施に至らなかった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0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 茉由, 水野 潤, 齋藤 一誠, 早崎 治明, 泉 健次: マイクロパターン化した魚うろ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: 魚のうろコラーゲンを足場を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, 塩見 晶, 河上貴宏, 兒玉泰洋, 齋藤一誠, 早崎治明, 泉 健次: うろ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

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(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。