

令和元年6月18日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17271

研究課題名(和文) 異種動物由来の脱細胞化口腔粘膜基質による角化歯肉の誘導

研究課題名(英文) Development of xenogenic acellular oral mucosa matrix for keratinized gingival tissue reconstruction

研究代表者

江頭 寿洋(EGASHIRA, Kazuhiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：50638096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口腔粘膜欠損、特に角化歯肉の欠損や不足を補うための軟組織移植材料として、機能的・審美的な回復はもとより、汎用性に優れた新規生体材料を開発することにある。具体的には、異種動物(ブタ)から採取した(角化・非角化)口腔粘膜に脱細胞化処理を施した非免疫原性無細胞性歯肉を移植基質として、角化歯肉の回復を試みる。本研究期間中では、角化粘膜由来の脱細胞化基質の特性や有用性を検討したが、口腔粘膜細胞塊を播種して移植した場合の有用性について一部知見が得られたため、引き続き、角化歯肉誘導に対する有効性の高い脱細胞化基質の応用方法について検討を行っているところである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、生体材料としての脱細胞化基質の応用は、皮膚をはじめ、肺や心臓など様々な分野で既に臨床応用レベルにある。本研究は、低免疫原性で組織誘導性に優れた脱細胞化基質を角化歯肉の再生に応用することを特色としている。又、異種動物から作製することで、現在自己組織移植が臨床の主な手法となっている歯肉再生の分野に、容易で汎用性の高い移植材料を供給することが可能になる。異種動物の脱細胞化基質については、ブタの真皮基質などが既に臨床研究レベルにあることから、本研究による成果は早期に臨床研究レベルに移行でき、実現性の観点からも口腔領域の新しい再生医療の医薬品として開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The free gingival graft (FGG) and connective tissue graft (CTG) are currently considered to be the gold standards for keratinized gingival tissue reconstruction and augmentation. However, these procedures have some disadvantages in harvesting large grafts, such as donor-site morbidity as well as insufficient gingival width and thickness at the recipient site posttreatment. To solve these problems, the specific hypothesis of this study is that xenogenic acellular oral mucosa matrix (AAOM) can induce the keratinized gingival tissue reconstruction with having a low immunogenicity. As results, AAOM derived from porcine keratinized oral mucosa (K-AAOM) could not enhance the skin and connective tissue reconstruction in mice, obviously. However, we found K-AAOM may be useful when micronized gingival connective tissues were combined to the grafts. Therefore, we are currently trying to find the useful condition to apply K-AAOM for the gingival tissue reconstruction as a xenogenic material.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：口腔粘膜 再生 脱細胞化基質 異種 口腔粘膜細胞

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

1. 研究開始当初の背景

デンタルインプラントによる欠損補綴治療が一般化するにつれ、その治療における機能性や審美性の改善に対する要望が高まっている。インプラント治療は、歯槽骨や歯肉形態に配慮した適切な治療を行なうことが出来れば、機能性のみならず、清掃性や審美性が得られ、その結果予知性が担保される。しかしながら、咀嚼機能の再建がなされても、歯槽骨や角化歯肉の喪失に対する回復が十分でない場合、患者からの審美的な不満を生むだけでなく、口腔清掃をより困難にし、結果的に治療の予後を低下させる。つまり、インプラント治療部位の歯槽骨や角化歯肉の不足は、その周囲組織に炎症を引き起こし、それによりインプラント周囲炎を惹起させ得る。適切なインプラント治療を行なう上で、機能性・清掃性・審美性の3つの要素が保たれるには、インプラントの埋入位置や比量、上部構造に対する適切な形態付与のみならず、適切な角化歯肉の存在が不可欠と言える。一方、歯槽骨の萎縮が大きい部位へのインプラント治療を計画する場合、自家骨や人工骨の移植を伴う歯槽増大術が必要となる。この場合、移植された骨は歯肉粘膜によって一次閉鎖されることになるが、被覆歯肉が不足することが多く、閉鎖を可能にするための過度な減張切開や強い緊張を伴う縫合は、閉鎖創の裂開や治療後の癒痕形成を引き起こす。そのため、一次閉鎖部位において適切な角化歯肉を回復するため、閉鎖の補助となる有効な移植基質の開発が望まれる。

現在、インプラント治療に伴う角化歯肉の回復方法として最もスタンダードな手法は、遊離歯肉移植術(FGG)である。FGGは、口蓋から採取した角化口腔粘膜を移植に用いる方法で、自己組織を使用した予知性の高い手法である。しかし、この手法は採取のための二次的侵襲が大きく、採取範囲も限局されるため、供給量に制限がある。そのため、比較的広範に角化歯肉が必要とされる場合には、十分にその回復を誘導することは困難である。又、インプラント治療の予知性が向上した現在、それを埋入するに足る広範な顎骨組織の再生技術の確立は以前にも増して重要になっており、移植した骨を覆う粘膜の確保も重要な課題となっている。そのため、これらを解決するための研究は近年盛んに行なわれ、多様な生体材料などの可能性が示唆されているものの、現在のところFGG以外に確立された方法はない。

一方で、組織再生の足場となる生体材料について、近年、生体の細胞外基質が提供する微小環境が、幹細胞の分化・増殖に大きく影響することが見いだされて以降、従来とは異なる高次の生物学的機能を有する生体材料の研究が盛んに行われるようになった。そして、このような材料として、生体由来の蛋白質基質や生体模倣型の基質の開発が盛んに行なわれている。しかし、類似の物質で類似の物性を発揮させるには、生体組織をそのまま使用するのが最も有効と考えられることから、最近では生体組織の細胞成分を除去して構造蛋白のみを残した脱細胞化基質の開発研究も数多くみられるようになってきている。この脱細胞化基質に関しては、ヒト真皮や心膜、ブタ真皮や小腸、膀胱、ウシ心膜などが既に臨床研究に応用されており、例えば脱細胞化ヒト真皮基質であるAlloDermは、認可を受けた医療機器として既に臨床応用されている。AlloDermは皮膚組織から上皮組織と細胞成分を除去し、コラーゲンの3次元構造と基底膜を主な構成要素としているが、口腔粘膜への応用に関しては、そのみでは十分な角化歯肉上皮の誘導は困難であることから、AlloDermに口腔粘膜角化細胞を播種し、上皮を重層化させた培養複合口腔粘膜(EVPOME)が開発されている。

口腔粘膜は元来治癒力に優れ、癒痕形成も少ないことは周知の事実である。そして、口腔粘膜の創傷治癒が優れている一因として、口腔粘膜線維芽細胞が、皮膚線維芽細胞と比較してKGFやEGF、HGF、VEGFといった表皮の形成に関与する因子を多く分泌することが明らかになっている。さらに、皮膚と角化歯肉や歯槽粘膜のような非角化口腔粘膜では、各々の基底膜の構造や構成成分に違いがあることが明らかにされている。角化細胞は基底膜上に位置する基底細胞から分化するため、基底膜の特性の違いは角化歯肉を誘導する上で重要であると考えられる。これらの事実は、口腔粘膜由来の脱細胞化基質が、皮膚真皮基質に角化上皮を搭載したEVPOMEと同等、もしくはそれ以上の角化歯肉誘導能を持つ可能性を示唆している。

以上の知見から、脱細胞化処理を施した口腔粘膜基質を角化歯肉再生の移植材として企図するに至った。そして、これに異種動物由来の粘膜基質を応用することで、FGGに関わる組織採取や供給量の問題、細胞培養などに関わる労力・時間・経費といった問題点を補い、低免疫原性で汎用性の高い生体材料を創出できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔粘膜欠損、特に角化歯肉の欠損や不足を補うための軟組織移植材料として、機能的・審美的な回復はもとより、汎用性に優れた新規生体材料を開発することにある。具体的には、異種動物(ブタ)から採取した(角化・非角化)口腔粘膜に脱細胞化処理を施した非免疫原性無細胞性歯肉を移植基質として、角化歯肉の回復を試みる。この戦略は、現在、歯周組織再生やインプラント治療に必要な機能的・審美的歯肉形態の回復に施される遊離歯肉移植術における採取量の限界や採取側の二次的侵襲といった問題点を解決することを企図している。又、異種動物由来の移植基質を応用することで、汎用性に優れた生体材料の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) AAOMの作製と特性解析

角化・非角化の2種類の口腔粘膜を使用してAAOMを作製(角化粘膜由来;K-AAOM、非角化粘膜由来;U-AAOM)し、基質に残存する基底膜や血管網、コラーゲンの3次元構造と蛋白質の特性をAlloDermと比較することで解析を実施した。

AAOMの作製;

新鮮ブタ上顎骨から角化粘膜として口蓋粘膜、非角化粘膜として歯槽粘膜を採取した。採取した粘膜は、まず予め作製した専用の切断器にて、上皮組織部分を含めて1.0-1.2mmの厚さに粘膜を切断調節した。次に、0.25%トリプシンと1mM EDTAを含む混合溶液中に浸し、37°Cにて3時間インキュベートを行ない、上皮層を基底膜を含む固有層(真皮部分)から分離した。

その後、上皮層が分離された真皮部分を0.125%トリプシン、1mM EDTA及び0.25% Triton X-100を含む混合溶液に浸し、37°Cにて4時間震盪を行なうことで、真皮部分の細胞成分を除去し、基底膜とコラーゲン主体の真皮部分からなる基質のみとなるよう調整した。

無細胞化された基質をPBSにて十分に洗浄を行ない、基質の一部を細菌・真菌培養し、細菌と真菌の発育がない事を確認した。又、処理を施した基質の一部に対して、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行ない、無細胞化の程度とコラーゲン構造が保たれていることを確認した。

AAOMの性状解析;

基質全体像の観察には、HE染色と基底膜を染めるPAS染色にて基質全体の組織像を確認した。また、基底膜構造の観察には、IV型コラーゲンやラミニン(laminin-5, etc)、CD104(Integrin-β4)などにより、各基質の基底膜の構造の違いを詳細に観察した。さらに、真皮部分の観察には、口腔粘膜の線維芽細胞と皮膚由来に線維芽細胞が分泌する因子の違いが創傷治癒に影響を及ぼすことが知られているため、KGFやEGF、HGF、VEGFなどの蛋白発現について免疫染色を施し、発現の状態を観察した。これらにより、AAOMの性状を評価することとした。

(2) AAOM移植の有用性評価

AAOMとAlloDermをマウスの頭蓋骨膜上や背部皮膚欠損部にそれぞれ移植を行ない、皮膚・粘膜組織の再生過程の違いを観察することで、それぞれの基質のin vivoでの特性を評価した。C57BL/6Jマウス、および免疫不全マスの頭蓋骨膜上、および8x8mmサイズの背部皮膚欠損部に基質の移植を行ない、各基質による皮膚・粘膜組織の再生過程の違いを観察した。基質は、皮膚・粘膜欠損の大きさに合わせてサイズを調整し、移植した。移植部分の組織は、移植後5、7、14、21日で採取し、再生した表皮層の厚みや角化の程度を含めて、組織学的・免疫組織学的に評価を行った。

(3) AAOM移植の有用性評価

上記の移植実験と同時に、AAOMとAlloDermにヒト口腔粘膜線維芽細胞や角化細胞、さらに、それらの細胞塊を播種し、培養や上記と同様の移植を行なうことで、それぞれの基質における細胞の増殖・分化のスピードや分化の方向、分泌蛋白質などを解析した。細胞塊は組織から専用の機器を用いて100~200μmサイズの細胞塊を分離して使用した。

4. 研究成果

本研究は、まずブタ上顎から角化粘膜として口蓋粘膜(K-AAOM)、非角化粘膜として歯槽粘膜(U-AAOM)を採取し、それを脱細胞化处理することから開始した。その上で、脱細胞化处理を施した口蓋粘膜由来の脱細胞化口腔粘膜基質(K-AAOM)と歯槽粘膜由来のそれ(U-AAOM)の性状解析を開始した。解析は、HE染色から基底膜を染めるPAS染色、そして基底膜や真皮層における様々な蛋白発現の解析を実施したが、一部基底膜成分の蛋白発現に差異を認める知見が得られたため、現在詳細な解析を加えているところである。また、口蓋粘膜と歯槽粘膜を構成する線維芽細胞の培養を開始し、細胞増殖能や遺伝子・蛋白発現などの特性解析も開始した。しかしながら、これら2種に由来する細胞の特性に現在明確な差異を認めていない。次に、K-AAOMとAlloDermに口腔粘膜線維芽細胞や口腔粘膜角化細胞を播種し、培養を行い、各基質における細胞の増殖・分化のスピードや分化の方向、分泌蛋白質などをin vitroにおいて解析を実施した。上皮層の厚さや角化の程度など培養基質の組織学的・免疫組織学的な観察に加え、上皮部分のサイトケラチン(CK-5, 14, -19)の発現などについて検討を加えたところ、口腔粘膜角化細胞にてこれらの発現が明瞭であった。また、K-AAOMに口腔粘膜角化細胞塊を播種し、マウスの背部皮膚欠損部や頭蓋骨膜上に移植を行ったが、アテロコラーゲンスポンジに細胞を播種した場合と比較して粘膜組織の再生が優位ということではなかった。現在、K-AAOMに細胞を播種し、培養を行った場合の有用性について検討を行っているところであるが、K-AAOMの応用よりむしろ、口腔粘膜角化細胞塊の移植による有用性が高い結果となっている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

1. Egashira K, Sumita Y*, Zhong W, Umebayashi M, Takashi I, Nagai K, Asahina I: Bone marrow concentrate promotes the bone regeneration with a suboptimal-dose of rhBMP-2. PLoS One. 13(1):e0191099, 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0191099. (査読有)

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。