

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10174

研究課題名(和文) 低酸素応答の活性化を局所適用によって確立させる新規唾液腺組織再生法

研究課題名(英文) New strategy for tissue regeneration of salivary gland by activation of the hypoxic response

研究代表者

笠原 正貴 (Kasahara, Masataka)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：30328265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：唾液腺の再生医療を行うにあたり、薬物や低酸素応答幹細胞を局所適用する足場となる atelocollagen/gelatin sponge (ACG) の薬物担持能力と形態保持能力を高めるために、熱架橋と非熱架橋の有無が、これらの因子にどのような影響を及ぼすのかを検討した。熱架橋により薬物担持能力の向上、形態維持能力の向上が認められたため、この成果をDental Materials Journal に投稿し、公表された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身投与の薬物は、全身に作用を及ぼし、時に有害な作用を引き起こす可能性がある。一方、治療したい局所に薬物や幹細胞を適用する方法は、治療効果を高めるとともに、生体に及ぼす有害作用を軽減することができる。今回は治療効果を高めるために、足場としての atelocollagen/gelatin sponge を、熱架橋により薬物担持能力の向上、形態維持能力の向上が認められた。このことは治療の効果を高めることにつながる。

研究成果の概要(英文)：Atelocollagen-gelatin (ACG) sponge was fabricated from atelocollagen and gelatin by lyophilization without introducing toxic substances. This study aimed to investigate the effects of heat treatment on the 3-dimensional structural stability of ACG sponge biomaterial. ACG sponge samples were fabricated and heat treated at 125°C for 12 h in the vacuum. The results revealed that heat treatment did not affect porosity, pore size and mechanical compressive strength. Heat-treated ACG sponge showed decreased absorbance and peak shift of amid I (C=O) stretches, slightly higher water uptake degree and significantly decreased in vitro degradation rate. Moreover, heat-treated ACG sponge maintained good 3-dimensional surface morphology and porous microstructure throughout 7 days, while non-heat-treated ACG sponge collapsed in less than 24 h. The human mesenchymal stromal cells (hMSCs) were shown to adhere and grow well on heat-treated ACG sponges.

研究分野：薬理学

キーワード：再生医療 ドラッグデリバリーシステム 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

低酸素状態に対する生体反応(低酸素応答)は、主に転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) によって制御されているが、その HIF もまた “低酸素センサー” であるプロリン水酸化酵素 (PHD2) によって負に制御されているため (Minamishima et al, Blood 2008)、PHD2 が失活した細胞では HIF が活性化し、低酸素応答が恒常的に観察されるようになる (Minamishima and Kaelin, Science 2010)。HIF はエリスロポエチン (EPO) による造血を誘導し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) や platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB)、さらに basic fibroblast growth factor (bFGF) などの発現を誘導する。その結果、血管形成が促進され、最終的に酸素環境を改善する作用がある (Rey and Semenza, Cardiovasc Res, 86, 236-242, 2010)。PHD 阻害薬を用いた研究において申請者らは、極めて生命予後の悪い乳酸アシドーシスに対して、肝臓の低酸素応答を起動することで、マウスの生存率を著明に改善する機構を明らかにした (Suhara*, Hishiki*, Kasahara*, ..., Minamishima, PNAS 2015. *Equally contributed)。また、PHD 阻害薬の全身投与により、皮弁壊死の予防に有用であることを示した報告もある (Takaku et al, PLoS One, 7, e4296, 2012)。

唾液腺は再生力が弱く、病的障害や外科的傷害を受けた唾液腺は通常、萎縮もしくは消失する過程をたどる。我々はこれまでに、細胞内酸素濃度センサー-PHD2 を阻害することによる、臓器の恒常的な低酸素応答機構について研究を行ってきた。低酸素応答は血管形成の促進や酸素環境の改善を図ることから、低酸素応答を制御することにより、唾液腺組織の再生が期待できると考えた。一方、我々は、bFGF または EGF とコラーゲンを組み合わせて顎下腺損傷部位に適用することで、幹細胞や筋上皮細胞の増殖や分化が促進することや、腺房細胞と考えられる細胞の増殖を確認し、唾液腺組織再生の可能性を示した (Kobayashi, Matsuzaka et al, Int J Oral Sci 2015; Kobayashi, ..., Kasahara, Matsuzaka et al, Clinical Dentistry and Research, 40, 87-94, 2016)。そして、生体為害性のない足場としての atelocollagen /gelatin (ACG) 複合体の作製に成功した (Yang, ..., Kasahara et al, Dental Materials Journal, 36, 429-437, 2017)。また、ラット皮膚創傷モデルにおいて、足場としての ACG 複合体による創傷治癒促進効果を確認ができた。以上から、創傷治癒促進効果のある ACG 複合体を唾液腺の創傷治癒に応用すること、さらに低酸素応答を惹起させる PHD 阻害薬や低酸素応答を活性化させた幹細胞を唾液腺創傷治癒に応用できないかどうかを検討することが、本研究の研究開始当初の背景である。

2. 研究の目的

本研究目的は以下の3課題である。

- (1) 足場として顎下腺損傷部位に適用した ACG の組織再生に及ぼす影響を検証する。
- (2) ACG に担持させた PHD 阻害薬が顎下腺の創傷治癒に及ぼす影響を検証する。
- (3) ACG に播種した低酸素応答幹細胞が顎下腺の創傷治癒に及ぼす影響を検証する。

以上の解析により、効率のよい唾液腺組織再生の方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 当初の研究計画

足場として顎下腺損傷部位に適用した ACG の組織再生に及ぼす影響を検証する。

ラット顎下腺に円形の欠損を与えた『顎下腺創傷治癒モデル』(Kobayashi, Matsuzaka et al, Int J Oral Sci 2015)を用いて、ACGが顎下腺組織の創傷治癒に及ぼす影響ならびにそのメカニズムを明らかにする。組織再生に関わるマーカー(線維芽細胞、筋上皮細胞、導管上皮細胞、幹細胞など)の遺伝子発現量、さらにマイクロダイセクションにより唾液腺組織を腺房細胞と導管細胞とに分け遺伝子発現を解析し、低酸素応答による顎下腺組織再生の特性を明らかにする。

ACGに担持させたPHD阻害薬が顎下腺の創傷治癒に及ぼす影響を検証する。

顎下腺損傷部位への『atelocollagen/gelatin spongeの適用』と、PHD阻害薬(FG4592)による『顎下腺組織-低酸素応答ON』の組み合わせが、唾液腺組織再生において有効かどうかを明らかにする。

ACGに播種した低酸素応答幹細胞が顎下腺の創傷治癒に及ぼす影響を検証する。

さらに、顎下腺損傷部位への『atelocollagen/gelatin spongeの適用』と、脂肪由来幹細胞との組み合わせが、唾液腺組織再生において有効かどうかを明らかにする。

(2) 実際の研究方法

唾液腺の再生医療を行うにあたり、薬物や低酸素応答幹細胞を局所適用する足場となる ACG の薬物担持能力と形態保持能力をさらに高めるためこととした。熱架橋と非熱架橋の有無が、これらの因子にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

4. 研究成果

熱架橋を施すことで生体為害性がなく、足場としての atelocollagen /gelatin (ACG) 複合体の作製に成功した。そして、この ACG 複合体は熱架橋することで、薬物担持能力の向上、形態維持能力の向上が認められた (Yang, ..., Kasahara et al, Dental Materials Journal, 41, 337-345, 2022)。

引用文献

Yang, L., Miura, T., Kasahara M: Effectively improved 3-dimensional structural stability of atelocollagen-gelatin sponge biomaterial by heat treatment. Dental Materials Journal, 41:337-345, 2022

Yang, L., Tanabe, K., Miura, T., Yoshinari, M., Takemoto, S., Shintani, S., Kasahara M: Influence of lyophilization factors and gelatin concentration on pore structures atelocollagen/gelatin sponge biomaterial. Dental Materials Journal, 36:429-437, 2017

Kobayashi, F., Abe, H., Kasahara M, Horikawa, T., Matsuzaka, K., Inoue, T: Epidermal growth factor promotes the proliferation and differentiation on progenitor cells during wound healing of rat submandibular glands. Clinical Dentistry and Research, 40:87-94, 2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yang L, Miura T, Kasahara M	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Effectively improved 3-dimensional structural stability of atelocollagen-gelatin sponge biomaterial by heat treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------