

令和 5 年 4 月 25 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10275

研究課題名(和文) 口腔粘膜由来幹細胞様ケラチノサイトを用いた新規粘膜再生医療戦略

研究課題名(英文) A new strategy for mucosal regeneration by primary adult human epithelial progenitor/"stem cells" keratinocyte from oral mucosa

研究代表者

宮坂 孝弘 (MIYASAKA, TAKAHIRO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：30190755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜より単離したケラチノサイトから産生されたePUKs (epithelial Pop Up Keratinocytes)のin vitroでの生物学的評価を行った。培養を開始し、80%コンフルエントになった後培養上清中にePUKsが産生され始めた。ePUKsの細胞サイズは単層培養ヒトケラチノサイトと比較して小さく、また細胞生存率も高い結果となった。さらに本研究では採取したePUKsを播種し培養することでePUKsのモノレイヤーから産生されるpop-pop細胞についての評価も行った。またePUKsを用いた口腔粘膜シートを作製し、その評価をin vitro 免疫蛍光化学染色で行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床現場で必要となる質の高い十分量の幹細胞を採取、また生産することは難しい。本研究では口腔粘膜から、より幹細胞に近いヒト口腔粘膜由来のケラチノサイト"epithelial pop-up keratinocytes (ePUKs)" を獲得する事が出来た。一度に大量の幹細胞様ケラチノサイトを生産・採取することができれば将来、臨床現場において非常に有用な再生医療材料となるであろう。またePUKsに多分化能が認められたのなら、ePUKsで作製された細胞シートは口腔粘膜再生のみならず様々な組織の再生に役立つことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the biological activity of ePUKs in vitro. Primary human oral keratinocyte monolayers are cultured using twice the volume of medium without serum and lacking essential fatty acids. Once the cells reach 80% confluence, they begin to float up into the overlying medium and are called "epithelial pop-up keratinocytes (ePUKs)" allowing the cells to be passaged without the use of trypsin. In addition, the pop-pop cells produced by the monolayer of ePUKs were also evaluated. The cell sheets were prepared with ePUKs and evaluated with immunocytofluorescence biomarker staining. The animal experiments could not be performed, even though we were planning to use the ePUKs sheet for the model mouse of palatal full thickness defects.

研究分野：幹細胞

キーワード：幹細胞 再生医療 口腔粘膜 細胞シート ケラチノサイト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な細胞を利用した細胞治療の臨床研究が進んでいる。細胞治療のほかにも細胞を利用した組織工学や再生医療など様々な現場で多種多様な細胞が活躍している。そこで、これらの研究の鍵となってくるのが多能性幹細胞である。多能性幹細胞の中でも、間胚葉系幹細胞は、骨芽細胞、軟骨細胞や脂肪細胞に分化可能な細胞であり、組織の創傷治癒過程で重要な役割を果たしている (Science.2;284(5411):143-147,1999)。また、最近では Marynka-Kalmani らによって口腔粘膜から採取した細胞の中にも多能性幹細胞が存在するという報告がされている (Stem Cells,28:984-955,2010)。そこで、応募者らはこれまでに研究してきた口腔粘膜ケラチノサイト由来 ePUKs も多分化能があると予想している。口腔外科領域では粘膜移植を必要とする症例が数多くある。例えば、口腔前庭拡張術などの補綴前外科処置や遊離歯肉移植術を用いた歯周外科処置などである。従来これらの手術には口蓋や頬粘膜からの粘膜移植が行われてきたが、皮膚移植の場合と同様、粘膜採取部に新たな実質欠損を作り、瘢痕化することは避けられず、採取部の治癒期間の問題や患者の QOL 低下も避けられない。さらに広範囲の表在癌切除後などでは、当然広範囲の粘膜移植が必要となってくる。しかし、移植のために採取できる粘膜の量には限界があり、実際には植皮や皮弁を採取することになる。また最近では免疫拒絶反応や侵襲性の軽減のために口腔粘膜上皮シートが普及し始めたが、シートを作製する際には幹細胞を未分化な状態で維持するための feeder cell や動物由来の血清含有培地が必要である。またシート内に存在する幹細胞の数も未確認のままである。そこで、我々は、ePUKsこそがこれらの欠点を全て払拭できると考えている。本研究課題ではヒトの口腔粘膜から採取した初代ヒト口腔粘膜ケラチノサイトを使用し、ePUKs の生物学的評価を行ったうえで ePUKs を用いた新規口腔粘膜上皮細胞シートの開発に挑む。

2. 研究の目的

Feeder Cell を必要としない独自の培養方法を用いることによってヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトから ePUKs (epithelial Pop Up Keratincytes) を産生させる。また、その ePUKs の生物学的評価を行い、ePUKs を用いた口腔粘膜シートを作製する。

3. 研究の方法

(1) ヒト口腔粘膜を採取し、通常の方法でヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトを単離した。単離した細胞は 0.06M calcium chloride および Epilife™ Defined Growth Supplement (EDGS) 添加 Epilife 培地で培養した。培地交換は 2 日に一度行った。その後、約 80% コンフルエントになった時点で培地を 2 倍量にし、毎日培地交換を行うことで初代ヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトモノレイヤーから ePUKs を産生させた。また、回収した ePUKs をフラスコに播種し ePUKs と同様の培養方法で ePUKs をモノレイヤーとしその培養上清中に産生された細胞 (pop-pop 細胞) を産生させた (図 1)。それぞれ細胞のコンフルエント率と、ePUKs および pop-pop 細胞の産生量の相関を評価するために、産生された細胞数と細胞の生存率を毎日 Countess® (invitrogen) で測定した。その他にそれぞれの細胞サイズも計測した。

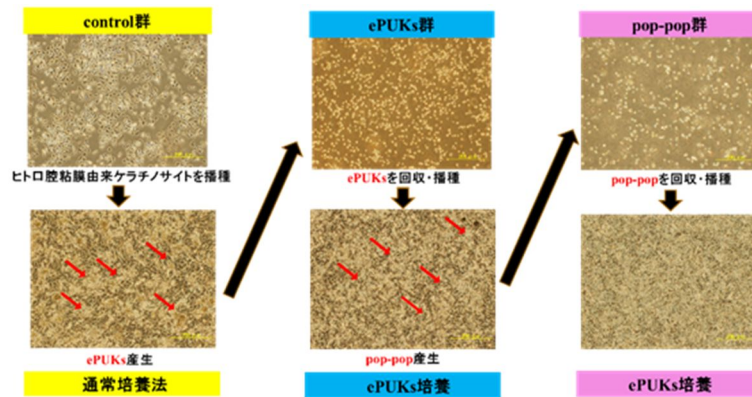


図 1

(2) プライマリーヒト口腔粘膜由来ケラチノサイト (control)、ePUKs および pop-pop 細胞をそれぞれ T75 フラスコに 2.0×10^6 cells 播種し、細胞増殖能を MTT assay で評価した。

(3) ePUKs および pop-pop 細胞の産生数と生存率が高い培養日数を検討し、その培養日数に採取した細胞をそれぞれ免疫蛍光化学染色に使用した。スライドの作製にはスライド塗抹標本キットの Smear Gell® (Geno Staff) を用いた。1 次抗体は幹細胞マーカーである p63 (abcam:ab32353) と増殖マーカーである Ki67 (abcam:ab16667) を使用し、2 次抗体には Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 488®) (abcam:ab150077) を使用した。作製したスライドは倒立型リサーチ顕微鏡 (Olympus IX71) で観察した。プライマリーヒト口腔粘膜由来ケラチノサイトをコントロールとして評価した。

(4) ePUKs および pop-pop 細胞培養における培地上清中の vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現量は培養後、3、5、7、9、11 日目に Quantikine® ELISA (R&D SYSTEMS) を用いて測定した。

(5) 培養を開始し、80%コンフルエント後、4 日目、5 日目に産生された ePUKs を用いて口腔粘膜細胞シートを作製した。Up Cell® 3.5cm ディッシュ (Funakoshi) の上に 5×10^4 cells の ePUKs を播種し、オーバーコンフルエントになるまで培養した後、Cell Shifter™ (Funakoshi) を用いて細胞シートを回収した。回収した細胞シートは O.C.T.compound® に包埋して凍結切片を作製した。

(6) ePUKs で作製した口腔粘膜細胞シートは免疫蛍光染色を行うことで評価した。一次抗体には口腔粘膜上皮で発現するケラチン 3、ケラチン 4、基底膜成分である IV 型コラーゲン、幹細胞マーカーである p63 を使用した。2 次抗体には FITC を使用した。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜から単離したプライマリーヒト口腔粘膜由来ケラチノサイト (コントロール群) を培養し 80%コンフルエント後から培養上清中に産生され始めた ePUKs を採取した。その回収した ePUKs を播種・培養し 80%コンフルエント後から培養上清中に産生され始めた pop-pop 細胞を採取した。培養日数と ePUKs および pop-pop 細胞の産生数との関係性を評価したところ両群共にほぼ同じ挙動を示した。培養 3~5 日後で急激に産生数が増加し、その後徐々に減少していった (図 2)。また、細胞生存率も両群で同様な挙動を示し、ePUKs 群では培養後 3 日目から上昇し始め、4、5 日目でピークとなりその後徐々に減少していった。pop-pop 細胞群では 4 日後に急増し、6 日後から徐々に減少していった (図 3)。細胞のサイズは両群共に培養開始後 3

日目から減少し始め、4, 5 日目で最小となり、その後徐々に増大していったが pop-pop 細胞群は ePUKs と比較して小さい傾向にあった (図 4)。

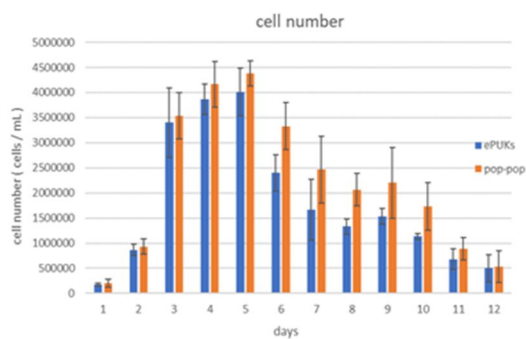


図 2

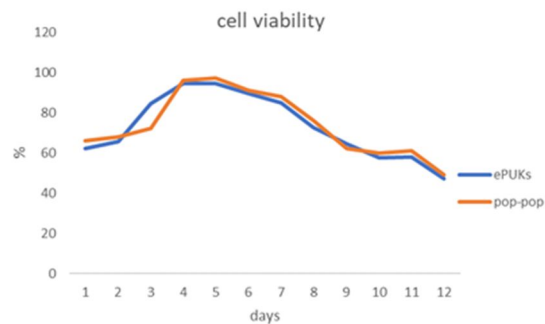


図 3

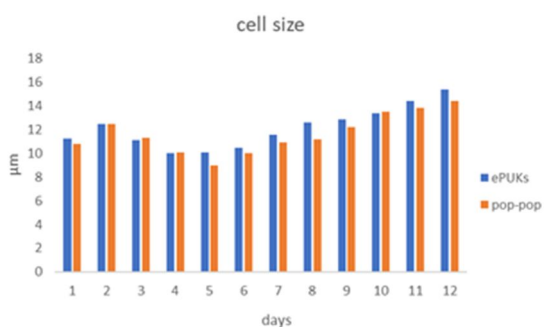


図 4

(2) 細胞増殖能は、播種した細胞数を 1 とした時の増殖率で比較した。ePUKs 群と pop-pop 細胞群に差はほとんど認められなかったが、両群とも control 群と比較して有意に高い増殖能を示した (図 5)。

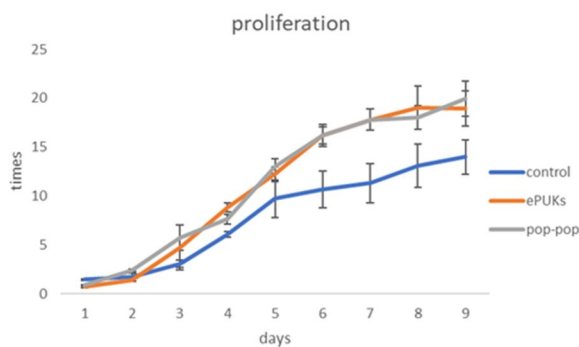


図 5

(3) 幹細胞マーカーである p63 と増殖マーカーである Ki67 で免疫蛍光化学染色を行ったところ ePUKs 群および pop-pop 細胞群はコントロール群と比較して有意に高い陽性細胞が認められた (図 6、7)。

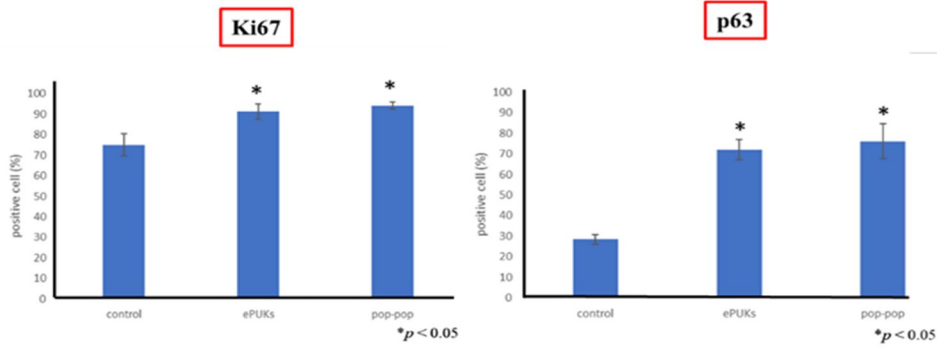


図 6

図 7

(4) コントロール群は3日目から7日目までは VEGF の値に大きな変化はなかったが9日目で上昇し11日目も9日目とほぼ同等の値となった。ePUKs 群は5日目で急増しそのまま11日目まで緩やかに上昇していった。さらに、pop-pop 細胞群は3日目から他群と比較して有意に高く11日目までほぼ同程度の値を示した。ePUKs 群と pop-pop 細胞群はコントロール群と比較してすべての日数において有意に高い値となった(図8)。

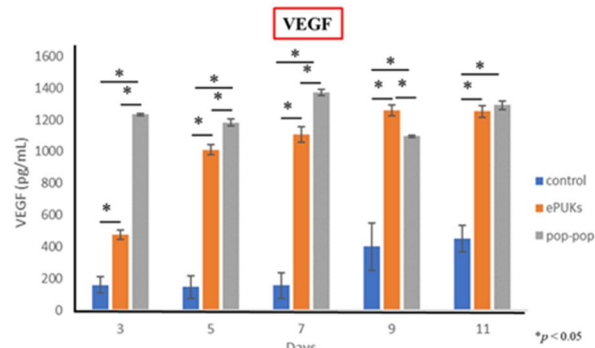


図 8

(5) 作製した ePUKs 口腔粘膜細胞シートをケラチン 3、ケラチン 4、基底膜成分である IV 型コラーゲン、幹細胞マーカーである p63 で免疫蛍光染色評価したが陽性細胞を確認することはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮澤敦子、宮坂孝弘、小林真左子、米山勇哉、山口友輔、稲田諒、小柳昌央、宮坂彩子、里見貴史
2. 発表標題 口腔粘膜由来幹細胞様ケラチノサイトを用いた新規粘膜再生医療戦略
3. 学会等名 第66回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	宮澤 敦子 (Miyazawa Atsuko) (00706997)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	
研究分担者	古賀 陽子 (Koga Yoko) (10392408)	東京女子医科大学・医学部・教授 (32653)	
研究分担者	近津 大地 (Chikazu Daichi) (30343122)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	
研究分担者	八重垣 健 (Yaegaki Ken) (40166468)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	削除：2022年1月14日

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	里見 貴史 (Satomi Takafumi) (70276921)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	松野 智宣 (Matsuno Tomonori) (80199827)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	米山 勇哉 (Yoneyama Yuya) (10759799)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	

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