

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06290・19K21378

研究課題名(和文)低酸素環境下で培養した口腔粘膜線維芽細胞を用いた新規培養真皮開発技術基盤の構築

研究課題名(英文)Development of platform technology to construct a novel dermal substitute using oral mucosa fibroblasts in hypoxic environment.

研究代表者

齋藤 夕子(原夕子)(Saito, Yuko)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：80827676

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):3次元培養環境で線維芽細胞をコラーゲンゲルに埋入し複数の培養真皮を作成した。マイクロアレイにて口腔線維芽細胞と皮膚線維芽細胞、低酸素培養と通常酸素培養の4群で網羅的遺伝子発現検索し比較した。培養上清中のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、メタロプロテアーゼ阻害因(TIMP)などをタンパク質多項目同時解析装置で測定し、培養真皮の性能を評価・比較した。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)で培養上清のTypeIやIIIのコラーゲンの測定を行った。ウエスタンブロッティング法で培養真皮内の α -SMA(筋線維芽細胞に分化した線維芽細胞の表現型マーカー)、CEMIP(細胞遊走指標)の発現を測定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

創傷に対する既存治療法(成長因子投与や人工真皮移植など)では、長期間残存して難治化した傷に奏功せず、効果的治療法の開発は喫緊の課題である。口腔粘膜組織の線維芽細胞は癒痕形成が皮膚組織に比べわずかとされているが、口腔粘膜線維芽細胞による“培養真皮/結合組織”は開発されていない。本研究の目的である口腔粘膜線維芽細胞の2および3次元培養環境における低酸素応答をタンパクレベルで機能的に解析することや口腔粘膜線維芽細胞と皮膚線維芽細胞の比較検討は、口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだ再生医療用製品などの新規培養真皮開発技術基盤構築の第一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文):Fibroblasts were embedded in collagen gel. Using a microarray, comprehensive gene expression was searched for in 4 groups: oral fibroblasts vs skin fibroblasts, hypoxic cultures vs normal oxygen cultures. The matrix metalloprotease (MMP), the metalloprotease inhibitor (TIMP), etc. in the culture supernatant were measured by a multiplex assay, and the performance of the cultured dermis was evaluated and compared. Type I and III collagen in the culture supernatant was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Expression of α -SMA (phenotypic marker of fibroblasts differentiated into myofibroblasts) and CEMIP (cell migration index) in the cultured dermis was measured by Western blotting.

研究分野：再生医療

キーワード：低酸素環境 口腔粘膜線維芽細胞 3次元培養環境 皮膚線維芽細胞 マイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内患者数が約 130 万人いる難治性皮膚潰瘍は、褥瘡、糖尿病、閉塞性動脈硬化など高齢者特有の病態が原因ゆえ、超高齢者社会では患者数の増加が確実である。しかし、創傷に対する既存治療法（成長因子投与や人工真皮移植など）では、長期間残存して難治化した傷に奏功せず、効果的治療法の開発は喫緊の課題である。画期的治療法として、足場材に新生児由来包皮線維芽細胞を埋め込んだヒト同種培養真皮が開発・市販されたが、感染・壊死組織除去後の皮膚潰瘍が、異常なく肉芽化、上皮化して治癒する症例が多くなり、期待されたほどの臨床効果が得られていないのが実情で、既存の治療法に取って代わられるような製品は現状で存在しない。また、市販されてから 20 年以上経過したものの、改良されたことがない。瘢痕形成が皮膚組織に比べわずかとされている口腔粘膜組織の線維芽細胞は、真皮線維芽細胞とは顕著に異なる表現型を示す。例えば、局所の炎症を減弱させ、スムーズな組織リモデリングによる正常な組織再生が行われ、かつ血管新生を強く誘導する成長因子の分泌能が高い(Linch, 2018)。歯肉・口腔粘膜由来線維芽細胞の局所注入による皮膚急性放射線障害に対する治療効果は、骨髄間葉系幹細胞のそれより効果が高いという報告は、これを間接的に裏付ける(Hakkinen, 2014)。また、成人の場合、細胞の由来組織となる口腔粘膜は、皮膚/真皮に比べアクセスが簡便で、より低侵襲で入手できる利点もあるにもかかわらず、口腔粘膜線維芽細胞による“培養真皮/結合組織”は開発されていない。また、細胞移植治療に使用する骨髄由来間葉系幹細胞に対し、低酸素プレコンディショニングを行うと、低酸素応答により移植後の血管形成能が増強し、治療効果が向上することが報告されている(Muller, 2017; El-Sayed, 2016)。これは難治性皮膚潰瘍治療に有利に働く効果であるが、バラバラの細胞を移植する移植療法と違い、培養真皮では移植細胞の患部における長期生存が可能となる。それに伴い組織再生がより効率良く行えることから、難治性潰瘍治療の新規治療ツール開発の基盤情報として、組織リモデリング効率や細胞誘導ケモカイン分泌能など、3次元培養(3D)環境にある口腔粘膜線維芽細胞の低酸素応答も重要な知見となる。このような背景の中で3D培養環境下における口腔粘膜線維芽細胞固有の特徴何か?であり、さらに言えば、機能強化を図り、難治性皮膚潰瘍治療に効果的な培養真皮にするにはどのようにすればよいか?である。そこで、最適に制御された酸素濃度環境で培養された、口腔粘膜線維芽細胞を組み込んだ再生医療用製品としての培養真皮がそれを実現させる方法と考え、本研究から基盤情報を得ることを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜線維芽細胞固有の特徴により機能強化されるヒト同種培養真皮開発の基盤技術の構築に向け、成人の真皮線維芽細胞と比較しながら、成人の口腔粘膜線維芽細胞の3D培養環境における低酸素応答を機能的に解析することを目的とする。あわせて、広義の低酸素プレコンディショニングとして、口腔粘膜組織片採取から足場材料に細胞播種するまでの、2D培養期間における低酸素応答も把握し、口腔粘膜線維芽細胞を利用した、移植用新規培養真皮作成プロトコールとしての低酸素環境の最適化を目指す。生体組織内酸素濃度は通常 2-9%といわれ、組織損傷部位ではさらに低下している。一方、すべての移植用細胞治療製品は 20%酸素濃度環境で作成される。細胞にとって、移植前後の酸素濃度ギャップの影響は大きく、“生体模倣”に逆行している。細胞を用いた再生医療用製品に対して、今まで実施されてこなかった酸素濃度に関する“生体模倣”を利用することで、潰瘍治療に適用させる点が本課題の独自性である。また、速やかな組織リモデリング能や炎症に対する免疫応答があることが示されている口腔粘膜線維芽細胞の特徴は、局所注入などの細胞療法でも有効で、広く口腔内外への臨床応用の可能性が報告されていた。この点に着目し“培養真皮”構成細胞として口腔粘膜線維芽細胞を利用する発想は、創造性に富む。

3. 研究の方法

培養真皮作成プロトコールは、口腔粘膜組織片採取 線維芽細胞培養(2D) コラーゲンゲル埋入後の培養(3D) 製品出荷となる。本研究では作成プロトコールの全工程で酸素濃度が異なる環境に置き、各工程で機能的解析を行いながら、低酸素プロトコール最適化のためのパラメータ(酸素濃度など)を決定していく。具体的には真皮線維芽細胞を対照としながら、工程 1 では培養細胞の増殖能、工程 2 ではコラーゲンゲルから放出されるタンパク発現解析、さらに、作成過程における培養細胞/培養真皮の品質担保につながるマーカーの検討も行う。

2次元培養環境における細胞増殖能解析

採取される口腔粘膜は小組織片であるので、組織片培養で開始する。酸素濃度は 21%, 5%, 1%の3種類から開始し、80%コンフルエントになったのち、継代を5代実施し、Population DoublingとPopulation Doubling Timeにより増殖能を分析する。各継代において、一部の細胞を用いてコロニー形成能を解析。同時にBrdU AssayとApoptosis assayも補助的に行い、細胞増殖能と細胞死についての評価を行う。5%, 1%のうち、トータルの培養期間と総獲得細胞数を指標に最適な酸素濃度を決定する。細胞品質担保マーカーとして、FACS解析によるLight Scatter(細胞サイズと細胞内部の複雑さ)分析も評価に加える。口腔粘膜組織であっても皮膚真皮線維芽細胞の性格を示す細胞の混在は避けられないため、真皮線維芽細胞特異的マーカーと報告されているCD26の陽性細胞の混在比率の検討もFACSで同時に行う。

3次元培養環境(培養真皮作成)におけるタンパク発現解析

線維芽細胞をコラーゲンゲルに埋入し、複数の培養真皮を作成する。マイクロアレイにて口腔線維芽細胞と皮膚線維芽細胞、低酸素培養と通常酸素培養の4群で網羅的遺伝子発現検索をして比較する。タンパク発現解析は培養上清をサンプルとし、タンパク質多項目同時解析装置(ルミネックスアッセイ)で測定する。リモデリングに関係するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害因子(TIMP)、ケモカインパネルを用いて分析し、培養真皮の性能を評価、比較する。本解析では移植に適する培養期間の設定も行うため、培養上清採取を経時的に最長21日間に渡って実施し、最適な酸素濃度と同時に決定する。細胞品質担保マーカーとしては、複数作成した培養真皮の一部をウェスタンブロットに供して評価する。

4. 研究成果

上記の研究方法の中で3次元培養環境(培養真皮作成)におけるタンパク発現解析を主に行った。

MTTアッセイ

細胞生存率をテストし、異なるO₂濃度間での細胞生存率の統計的差異を示さなかったが、口腔粘膜線維芽細胞(以下OMF)と皮膚真皮線維芽細胞(以下SF)の両方について、5%と1%O₂濃度では2細胞生存率が1%O₂よりも低く、OMFの細胞生存率は同じO₂濃度でSFのそれよりも高いことが示された。

マイクロアレイ

1%O₂濃度での2日間の培養中に、OMFでは207の遺伝子が上方制御され、560の遺伝子が下方制御された。SFでは62の遺伝子が上方制御され、43の遺伝子が下方制御された。OMFとSFでは低酸素環境においてMMP-3、MMP-10、ヒアルロン酸結合タンパク質(CEMIP)Ⅰ型およびⅢ型のコラーゲンなど組織再構築能力に関連するタンパク質の発現レベルに違いがあった。

低酸素条件下でのコラーゲンゲル収縮とα-SMA発現

OMFとSFの両方のゲル収縮は酸素濃度依存的に抑制されたが、SFは統計的有意性の欠如にもかかわらず、OMFよりも大きなゲル収縮を示した。ウェスタンブロット法にてゲル収縮のプロセスを媒介することが知られている筋線維芽細胞に分化した線維芽細胞の表現型マーカーであるα-SMAの発現を解析した。OMFとSFのα-SMA発現レベルは、ゲル収縮と同様の方法で減少した。α-SMAはSFにおいて1%O₂で上昇した。

MMP-3およびMMP-10の測定

Multiplex MAP human cytokine/chemokine magnetic beads and human MMP panels (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)とxPONENT software version 3.1 (Luminex Corporation, Austin, TX, USA)を用いて測定した。MMP-3の分泌は、OMFとSFの両方で1%O₂と大幅に減少したが、OMFのMMP-3分泌レベルは、1%と21%O₂の両方でSFのそれよりも有意に高かった。対照的に、OMFは1%と21%のO₂濃度の両方で、SFよりもはるかに多くの量のMMP-10を放出したが、OMFとSFの低酸素条件下ではMMP-10の分泌レベルは変化しなかった。

細胞遊走誘導およびCEMIP発現レベルの測定

ウェスタンブロット法にて細胞遊走指標として知られているCEMIPを測定した。低酸素状態では、CEMIPはOMFとSFの両方で減少したが、OMFでのCEMIPの発現レベルは、正常酸素状態と低酸素状態の両方でSFよりもはるかに高かった。

TypeⅠおよびⅢのコラーゲンの測定

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (ACEL, Inc., Tokyo, Japan; Cloud-Clone Corp., Katy, TX, USA)を用いて測定を行った。OMFによるⅠ型プロコラーゲンの生成は、低酸素条件下では大幅に減少したが、SFではそうではなかった。しかし、OMFはタイプⅠプロコラーゲンをSF全体よりもはるかに多く産生し、正常酸素条件下では産生量がある

意に多かった。III型コラーゲンの産生は、低酸素状態ではOMFとSFの両方で大幅に減少したが、分泌されるIII型コラーゲンの量は、正常酸素状態と低酸素状態の両方のOMFよりもSFで有意に高かった。

上記研究結果をまとめ *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* に "Distinct differences in hypoxic responses between human oral mucosa and skin fibroblasts in a 3D collagen matrix." として投稿し受理された。 DOI : 10.1007/s11626-020-00458-1

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 Yuko Hara-Saito, Hiroko Kato, Naoaki Saito, Aki Shiomi, Atsushi Uenoyama, Ritsuo Takagi, Kenji Izumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Distinct differences in hypoxic responses between human oral mucosa and skin fibroblasts in a 3D collagen matrix.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology -Animal	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） DOI : 10.1007/s11626-020-00458-1	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
---------------------------	-----------------------	----