

平成 27 年 5 月 8 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593061

研究課題名(和文)顎顔面再建治療へ向けた上皮-間葉ハイブリッド型細胞シートの創製プロジェクト

研究課題名(英文)Cell sheets were prepared and layered to produce a hybrid cell sheet

研究代表者

阿部 伸一 (Abe, Shinichi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40256300

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔粘膜上皮、口腔粘膜上皮下組織、筋組織から抽出された細胞を用いてそれぞれの細胞シートを作製し、それらを積層したハイブリッド型細胞シートの創製を目指した。その結果、創製した積層シートには、粘膜上皮、結合組織層、筋層とそれぞれ特有のタンパクが、重層化にともなって継日的に増加していた。すなわち、今回の研究によって創製された積層シートには、生体と類似した構造タンパクが発現していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, cell sheets were prepared using cells extracted from the oral mucosal epithelium, subepithelial tissue of the oral mucosa, and muscle tissue, and layered to produce a hybrid cell sheet. In the layered sheet, the mucosal epithelium, connective tissue layer, and muscle layer and their specific proteins increased over time with stratification. Specifically, the same structural proteins as those in vivo were expressed in the sheet.

研究分野：口腔解剖

キーワード：筋シート 細胞シート デスミン ケラチン

1. 研究開始当初の背景

咀嚼・嚥下機能を担う口腔、咽頭へ続く粘膜は、その粘膜上皮直下に頬筋、咽頭収縮筋などの一層の筋層を有し、この連続する筋層が口腔、咽頭における機能の最も重要な役割を担う。

a. 口腔粘膜上皮シートについて

近年細胞シート工学が進歩し、舌癌、頬粘膜癌など広範な粘膜摘出後に自己口腔粘膜細胞を無細胞真皮上に積層し移植すること (Izumi, Tissue Engineering, 2003) が試みられているが、直下の筋層の再構築までは困難なことから、治癒後の咀嚼・嚥下機能障害という問題点が指摘されている。そこで我々が注目したのは間葉系の細胞シートを積層させるという点である。

b. 骨格筋細胞シートについて

骨格筋細胞は極めて高い可塑性があることが知られ、移植後周囲の細胞とも癒合し筋線維特性も変化させながら機能を獲得していく。骨格筋細胞シートは筋疾患への治療のみならず、心筋への移植 (Memon, Thorac Cardiovasc Surg, 2005) など多くの研究がなされ良好な結果が報告されている。この特性を利用し、最下層には骨格筋細胞シートを筋管に分化する前の段階で積層し、他の層とハイブリッドさせる。

c. 結合組織細胞シートについて

口腔粘膜上皮シートと骨格筋細胞シートとの間の結合に重要な役割を呈する結合組織細胞シートについて作製方法を確立する。これまでの培養上皮シート移植はすでに臨床

応用されるに至っている (Nakamura, IOVS, 2003)。しかし上皮下組織についてはほとんど研究されていなかった。各組織にはその組織に必要な細胞を供給する細胞源となるものが存在し、栄養供給という点からも恒常性を維持するために必須であると考えられる。近年、口腔粘膜下組織で間葉系幹細胞の存在が明らかになっており、角膜シート作製のための細胞として注目されている (Satake, Arch Ophthalmol, 2008)。よって、この上皮下の結合組織層が、口腔粘膜上皮シートと骨格筋細胞シートの間で、接着だけでなく細胞供給など重要な役割を担う可能性がある。

以上のことから、口腔粘膜上皮下組織には上皮と筋層をつなぐ重要な因子を発現する可能性と、細胞供給源となりうる細胞が存在する可能性が考えられる。そこで自己口腔粘膜上皮 - 間葉ハイブリッド型細胞シート創製へ向けた研究として、本申請研究期間中に移植に耐えうる積層シート作製方法の確立と動物実験による検証を目的とし、3年間の研究アウトラインを立案した。

2. 研究の目的

本研究は、口腔、咽頭粘膜実質再生を実現するために、口腔粘膜上皮、口腔粘膜上皮下組織、筋組織から抽出された細胞を用いてそれぞれの細胞シートを作製し、それらを積層したハイブリッド型細胞シートの創製を目的とする。さらに積層シートの構造維持に必須な細胞骨格である中間径フィラメント、接着タンパクの局在について検証を行う。これ

により、本研究は口腔、咽頭粘膜実質疾患の術後粘膜再生および機能回復に対する新しいアプローチとしての応用を目指す。

本研究が目指す積層シートは上皮、間葉という由来の異なる細胞シートをハイブリッドさせることにあるため、生体の構造にどこまで近づけられるかについて Integurin だけではない各種接着タンパクの発現とタンパク発現の量的な変化について検証する。また口腔粘膜上皮シートについては Air-lift culture 法(Higa, Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007)を導入し、最表層には上皮特有の敷石状の構造と積層過程で重層扁平上皮様構造を付与させ、移植後直ちに機能させるための構造獲得を目指す。

本研究で、口腔粘膜へ移植可能な上皮 - 間葉ハイブリッド型細胞シート作製方法が確立されれば、腫瘍摘出など深部への広範な実質欠損後の治療の新しいアプローチとして発展する可能性がある。また、研究協力者である比嘉は、患者の口腔粘膜から上皮細胞を採取し作製した上皮シートについて、患者自身の角膜へ移植手術を行っている東京歯科大学眼科の研究グループの一員です。すなわち細胞シート作製に十分な経験と多くのノウハウを持つ。この事をベースに、今回申請させていただき臨床応用へ向けた上皮 - 間葉ハイブリッド型細胞シートの創製を目的とした研究を進められることは、総合病院を持つ東京歯科大学の独創的な面である。

よって本研究成果は歯科領域のみにとどまらず、東京歯科大学市川総合病院において、

医科領域も含め臨床応用へ向けた総合的な研究グループへ発展させたいと考えており、そのための重要な基盤となる研究である。

3. 研究の方法

上皮細胞はフィブリンをコートしたインサート上に播種し、MMC 処理済み 3T3 フィーダー細胞と 2 週間共培養を行う。さらに、Air-lift culture を 1 週間行う。同条件で作製した細胞シートについて、表面構造が敷石状であること、HE 染色像から層構造が形成されていることを必ず確認し、目的である口腔粘膜上皮細胞シートとする。

口腔粘膜上皮組織から分離した細胞を直接インサート上に播種し 48 時間培養を行い、結合組織細胞シートを作製する。同様に骨格筋細胞シートはフィーダーやフィブリンを使用せず、インサート上に直接胎生期マウス咬筋より採取した筋芽細胞を播種後 36 時間培養し、骨格筋細胞シートを作製する。胎生期マウスは受精後筋芽細胞としての集積のみで、筋管構造に分化していない時期 (Usami, Anatomia Histologia Embryologia, 2003) である胎生 14 日のものを使用する。結合組織細胞シート、口腔粘膜上皮シートの順で移動する。細胞シートの移動は、支持リングを使用しインサートのメンブレンから剥離後行う。この方方法論は、研究協力者である比嘉らの報告に従う。(Shimazaki J, Higa K, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009)その後、積層 24 時間後から 6 時間ごとに 7 日間経時的観察を続ける。積層化シート

の観察は、凍結連続切片を作製し、HE 染色による形態観察、免疫組織化学的染色を施し評価する。使用する抗体は、上皮組織付属器官の中間径フィラメントとして Keratin4(K4)、pan-Cytokeratin(PCK)、間葉組織の中間径フィラメントとして Desmin および Vimentin(Yamamoto M, et al., J Anat, 2011)、接着関連タンパクとして Type collagen、Integrin alpha6 とする。

口腔粘膜上皮、口腔粘膜上皮組織、筋芽細胞を用いて上皮 - 間葉ハイブリッド型細胞シートを創製し、口腔粘膜広範実質欠損部への応用を目指すため、まず我々はそれぞれの細胞シートの作製方法を確立し、さらには3種の細胞シートを積層後に発現する構造タンパク、接着タンパクの局在を明らかにする。また動物実験において生体との適合、治癒過程を同タンパクの発現を解析する事によってその有効性を評価する。これらの研究は当大学の眼科・角膜研究グループと連携し、細胞の採取から培養、シート作製から積層、そして動物実験とそれぞれの知識・経験を活用しながら効率よく行い、目的を達成した。

4 . 研究成果

本研究は、口腔、咽頭粘膜実質再生を実現するために、口腔粘膜上皮、口腔粘膜上皮組織、筋組織から抽出された細胞を用いてそれぞれの細胞シートを作製し、それらを積層したハイブリッド型細胞シートの創製を目的としている。

粘膜上皮特有の細胞骨格タンパクである

ケラチン 4 と 13 を、免疫組織化学的染色にて検索すると、ともに、上皮組織全体にまんべんなく観察された。実際のタンパク量の変化を確認するために、Western blot を行ったところ、アクチンに対するケラチン 13 のタンパク量の継日的な変化は増加傾向にあったものの、有意な差は観察されなかった。また、ウェスタンブロット法によりデスミンの継日的なタンパク量の変化を観察したところ、アクチンに対するデスミンの量は5日目、7日目において1日目に比べ有意に増加が認められた。

免疫組織化学的染色において、基底膜接着タンパクであるコラーゲンタイプ I は上皮基底層、コラーゲン層ならびに筋層でも発現が認められ、ラミニンは上皮基底層でのみ発現が認められた。ウェスタンブロット法にて、コラーゲンタイプ I の継日的なタンパク量の変化を検索したところ、アクチンに対するコラーゲンタイプ I の量に、有意な差は見られなかった。

以上のように作製した積層シートには、生体と類似した構造タンパクが発現していることが明らかとなった。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

Suzuki, M., Yamane, S., Higa, K., Umezawa, T., Serikawa, M., Shimazaki,

J, Abe S. Expression of cross-linked protein on tissue-engineered epithelial cell sheets from rabbit oral mucosa. Journal of Hard Tissue Biology, 23:275-280, 2014

Hinata N, Shibata S, Abe S, Murakami G, Honda M, Isoyama, T, Sejima T, Takenaka T. Coexistence of elastic fibers with hyaluronic acid in the human urethral sphincter complex: A histological study. Journal of Urology, 190:1313-1319, 2013.

Abe S, Kikuchi R, Nakao T, Cho BH, Murakami G, Ide, Y. Nerve terminal distribution in the human tongue intrinsic muscles: an immunohistochemical study using mid-term fetuses. Clinical Anatomy, 25:189-197, 2012

〔学会発表〕(計 3 件)

梅澤貴志, 山根茂樹, 芹川雅光, 阿部伸一, 間葉系細胞の共培養が骨格筋筋芽細胞の MHC に与える影響, 第 56 回 歯科基礎医学会学術大会, 平成 26 年 9 月 26 日, 福岡市

芹川雅光, 梅澤貴志, 山根茂樹, 井出吉信, 阿部伸一, 比嘉一成, 島崎 潤、骨格筋細胞シートの解析, 第 296 回 東京歯科大学学会総会, 平成 25 年 10 月 19 日, 千代田区, 歯科学報, 113:432, 2013

下尾嘉昭, 山根茂樹, 比嘉一成, 島崎 潤,

井出吉信, 阿部伸一, 細胞シートとコラーゲンを用いた口腔粘膜組織の再生, 第 293 回 東京歯科大学学会例会, 平成 24 年 6 月 2 日, 千葉市, 歯科学報, 112:161, 2012

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 伸一 (ABE, Shinichi)

東京歯科大学・解剖学講座・教授

研究者番号 : 40256300