

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293420

研究課題名(和文) 低酸素発光プローブを利用した培養口腔粘膜作成過程に最適な低酸素ニッチ環境の確立

研究課題名(英文) Development of optical hypoxic environment for manufacturing a tissue-engineered oral mucosa by utilizing a hypoxia-sensing luminescent probe

研究代表者

泉 健次 (IZUMI, KENJI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：80242436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：移植用培養口腔粘膜上皮組織内の酸素濃度の定量のために、大気中の酸素濃度下で平面培養した細胞を細胞密度とカルシウム濃度を操作しながら、500 nM に調整したBTPDM1というイリジウム錯体で構成されるりん光プローブを用いて、りん光寿命イメージング測定装置で細胞内酸素濃度のキャリブレーションを行った。その結果、細胞内酸素濃度は細胞のサイズに依存する傾向があり、角質層が形成されても、平面培養では基底細胞層の細胞が極端な低酸素には陥らなかった。これにより、3次元培養されている培養口腔粘膜の酸素濃度は、細胞の分化度と角質層の出来に影響を受けることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to calibrate cellular oxygen levels to quantify oxygen levels of an epithelial layer within a tissue-engineered oral mucosa for clinical application. In this study, we used a new iridium complex BTPDM1 as an oxygen sensing probe, at a concentration of 500nM. When culturing oral keratinocytes in a monolayer, in a variety of culture conditions such as cell plating density and calcium concentration, we measured intracellular oxygen levels using confocal phosphorescence lifetime imaging microscope. Our results showed cellular oxygen levels appeared to be dependent on the size of cells, and the development of cornified layer did not cause severe hypoxic condition in the underlying cell layer. This suggests the intraepithelial oxygen levels of the EVPOME grafts may depend on the cellular differentiation and the quality of cornified layer.

研究分野：再生歯学

キーワード：低酸素 再生医療 口腔粘膜 角化細胞 幹細胞ニッチ

## 1. 研究開始当初の背景

本学医歯学総合病院では癌切除後や、インプラント移植術前の口腔粘膜再建に自家培養口腔粘膜を100例以上に用いている。また、口腔粘膜上皮は皮膚上皮細胞に比べ増殖が早いことや、組織採取が容易であることなどから、角膜や食道など口腔外でも臨床応用されており、再生医療実践の細胞ソースとして有望である。従って、口腔粘膜上皮幹細胞が分離され、長期培養が可能となれば、口腔粘膜培養細胞の再生医療での優位性がさらに高まると考えられる。一方で、口腔粘膜は上皮幹細胞マーカータンパクが発見されていないので、幹細胞集団の局在が不明なため、口腔粘膜上皮幹細胞ニッチ環境の研究は皆無であり、効率的かつ効果的な再生医療には早急に解決しなければならない課題の一つである。

再生医療、アンチエイジング、がん治療を実践するために組織幹細胞システムの理解は不可欠であるが、幹細胞の分離に成功しても、幹細胞の運命を決める微小環境の研究なくして長期維持が不可能であることから、組織幹細胞の維持には周囲の微小環境(幹細胞ニッチ)による制御が重要である。最近、幹細胞と周囲ニッチの双方を取り囲む物理的な環境因子として酸素濃度の変化が注目され、様々な組織で幹細胞ニッチは低酸素環境にあること、自己複製能と細胞周期静止という幹細胞の特性は、低酸素ニッチ環境からの低酸素細胞応答と細胞機能維持によって制御されていることが明らかとなった。

低酸素誘導性転写因子HIF-1は細胞の低酸素応答の中心的役割を担う酸素分圧センサーとして働く転写因子で、低酸素ニッチにある造血幹細胞で活性化されている。ただ、3次元的な組織を対象とする場合に、リアルタイムの分析は非常に困難をきわめる。研究分担者の飛田博士は金属錯体のりん光を用いた光イメージングシステムを開発した。この低酸素発光プローブは酸素があると消光、つまり酸素濃度に反比例して発光する。このイメージング法は低酸素状態にあるがん組織を選択的かつリアルタイムに検出するために開発されたものだが、我々はこのプローブが、正常組織における低酸素細胞の非侵襲的イメージングや、細胞内酸素計測にも応用可能であるという、これまでに他で利用されていない方法を見出した。それによると、同じ低酸素濃度下にあっても細胞サイズの違いから低酸素応答/酸素需要に差異があることが示唆され、口腔粘膜上皮細胞の未分化性を維持できる低酸素ニッチは、極度の低酸素環境ではなく、適度な低酸素分圧であると考えられる。また、2.5%酸素濃度下では通常培養よりコロニー形成能と、細胞周期の静止期細胞比率が増加し、低酸素下では幹細胞性が強く発現されることが示された。そこで我々は、細胞サイズに依存する細胞増殖能/

分化傾向は、低酸素下で細胞内酸素濃度によって特異的に制御され、幹細胞性の細胞の細胞内酸素濃度が至適ならば、幹細胞性が維持されるのではないかと考え、酸素濃度が口腔粘膜上皮細胞の分化度を制御しているのではないかという仮説を立てるに至った。この仮説から導き出される現象は、口腔粘膜上皮に特異的な低酸素環境による幹細胞制御システムが存在する、ということである。

## 2. 研究の目的

上記仮説を検証するために、細胞内酸素濃度をイメージングしながら、ヒト口腔粘膜上皮細胞を低酸素環境で培養し、低酸素細胞応答を解析することによって、in vitroにおける口腔粘膜上皮幹細胞ニッチに相当する至適な低酸素培養環境を確立し、3次元培養作成過程へ応用することを目的とし、4つの段階的研究目標を設定した。

- (1) 細胞周期を静止状態に誘導する低酸素濃度の決定
- (2) 低酸素濃度下の上皮幹細胞集団の機能的解析
- (3) 非培養細胞の細胞内酸素濃度の同定
- (4) 低酸素濃度制御による3次元培養口腔粘膜作成プロトコルの最適化

これ4つの研究課題を解決することにより、口腔粘膜上皮幹細胞ニッチに相当する至適な低酸素培養環境を確立し、その結果を現在臨床適応している患者移植用培養口腔粘膜作成プロトコルに反映する。

現実的には(1)(2)は実施することができて論文として発表することができたものの、(3)(4)については実施に至らなかった。理由としては、りん光プローブと測定用顕微鏡の改良は研究期間中に群馬大学の飛田博士のラボで実施できたものの、顕微鏡の性能が、3次元的に再生したインビトロ口腔粘膜モデルの撮影を実施するには、スペックが足りないことが明らかであった。現在は、(3)(4)の実現にあと1年あっても実質不可能であるものの、なるべく当初の目的に近づけるように、本課題を延長し実験を継続している。

## 3. 研究の方法

新潟大学医歯学総合病院の口腔外科外来にて抜歯などの小手術をうける患者様に研究の説明を行い、インフォームドコンセントを得られた方の粘膜骨膜弁の端から組織を提供いただき、実験室にて0.04%トリプシン溶液に室温で一晩放置。翌日、組織をトリプシンインヒビター液に移して、上皮細胞を単離して採取。5%CO<sub>2</sub>、37度、湿潤環境のインキュベーター内で初代培養を開始する。この環境での酸素濃度は20%前後と想定され、この条件で培養した細胞を対照群とした。培地はEpiLifeを用いて、1日おきに培地を交換し、80%コンフルエントになったら継代を実施する。本実験には継代が4-7代目のを使

用した。

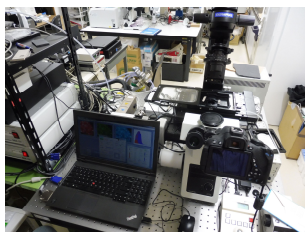
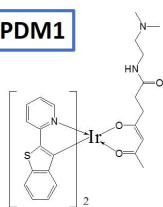
低酸素環境での培養は、酸素濃度 2%と 0.5%を設定した。専用の低酸素培養チャンバーを用いて、それぞれの(低)酸素濃度に調整されたガスボンベからエアを2分間供給したのち、細胞培養皿を設置して低酸素環境での培養を実施した。また、培地は24時間以上前に低酸素チャンバーに保管しておき、培地交換時も培地内の酸素濃度が低酸素で一定になるように行った。

細胞周期は、48-72時間低酸素環境下で培養した細胞を氷温のメタノールで固定し、2%のウシ血清アルブミン溶液で洗浄した後、PIで染色してFACS Aria IIにて解析を行った。

また、機能的解析には、コロニー形成能を測定した。5000個の細胞を6well-plateに播種し、7日間、2%と0.5%の低酸素環境下および、20%通常酸素濃度環境下で培養を続け、メタノールで固定した後、2%クリスタルバイオレットで染色した。定量的観察は、16細胞以上で形成されるコロニー数の計数(マイクロ定量)と、ImageJで取り込んだ画像から1mm以上のサイズのコロニー数を(マクロ定量)カウントした。

また、現在実験継続中のため、最新の結果をお出しできないことはご容赦願いたいですが、低酸素プローブによる細胞内低酸素状態のモニタリングには群馬大学の飛田博士のラボで開発されたりん光発光プローブを用いる。本研究では、培養口腔粘膜上皮細胞に対する好ましい条件の検討を重ねた結果、BTPDM1というイリジウム錯体で構成されるりん光プローブを、最終濃度500nMに調整し、2時間培地でインキュベートし、りん光寿命イメージング測定装置で解析した(写真下)。測定する口腔粘膜上皮細胞は、通常の0.06mMカルシウム濃度培地で培養した細胞で、コンフルエントな状態と、コンフルエントに程遠い細胞密度の状態の2条件に加え、細胞を分化させるべく、1.2mMカルシウム培地にした細胞で、細胞密度の異なる2条件を合わせて4条件での測定を試みた。

BTPDM1

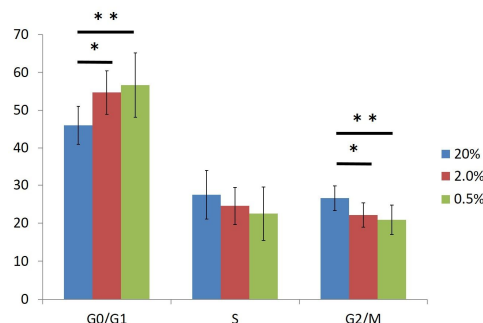


#### 4. 研究成果

##### 細胞周期

21%酸素環境下で培養された細胞に比べて、2類の低酸素環境下で培養された細胞ではいずれもS期G2/M期の細胞の割合は少なく、低酸素環境下で口腔粘膜上皮細胞はG0/G1期がメインとなり、静止状態にあることが示唆された。これが不可逆的な細胞周期停止状態かどうかについてはp21染色を同時に行っ

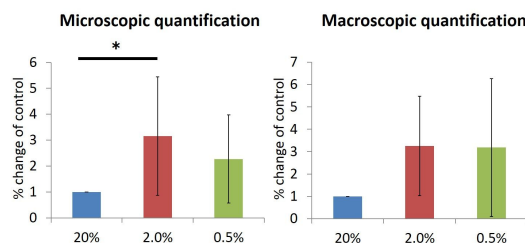
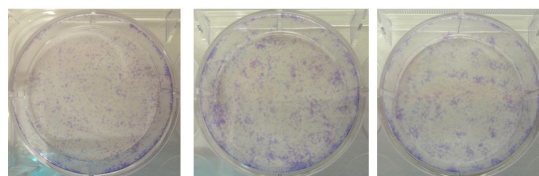
た。p21陽性細胞は通常酸素濃度環境下に比べ、低酸素環境で明らかに少なかった。このことは、低酸素環境においては細胞周期停止が起こりやすくなっているものの、それは不可逆的なものでないことから、長期培養に効率的に働いていることが示唆された。



##### コロニー形成能

マイクロ定量、マクロ定量においても、コロニー形成能は低酸素環境においた細胞で、通常酸素濃度で培養した細胞より2-3倍高い結果を示した。この増殖能の亢進は過去の様々な細胞で示されてきている結果と一致する。

20% O<sub>2</sub>      2.0% O<sub>2</sub>      0.5% O<sub>2</sub>



しかし、これは細胞周期停止という結果と一見矛盾する結果である。これは以下の2つの考え方で説明できる。ひとつは、本研究で用いている細胞はヒトの初代培養細胞であり、細胞集団の性質は均一ではないということである。つまり、個々の細胞の増殖能は非常に不揃いとなっており、低酸素環境によって引き起こされる増殖と細胞周期停止が、一律に細胞に起きているわけではなく、様々な状態の細胞が混在しているものの、その平均値として1つの細胞集団の性質が分析結果として示されたと考える。もうひとつの考え方は”poised state”という解釈である。低酸素環境下に細胞が置かれた後48-72時間後の測定でG0/G1期が有意に通常酸素濃度より多かったわけであるが、この“静止状態”は、細胞増殖において、増えないという不活性化状態ではなく、むしろ、いつでも増殖に転じられる準備状態に置かれていると考えている。このように低酸素環境にある細胞が一見矛盾した解析結果を示したことは、過去の報告

でもあり、低酸素環境にある細胞は、逆説的な結果を示すこと明らかになった。

### りん光プローブによる PLIM 測定

本課題の研究期間中に、通常酸素濃度において酸素需要の多少によって、どれくらい細胞内が低酸素濃度に変化するのかを、カルシウム濃度を人為的に変えて、細胞が増殖状態にある場合と、分化させる方向に置いた場合で細胞内がどれくらい低酸素になるかを測定した。培地にカルシウム濃度を上げて細胞を培養することで、基底細胞様細胞層を分化させて角質層を作らせた2層の細胞にした場合であっても、単層培養した細胞にガラス板を置くと、板の下におかれた細胞層は低酸素に陥るということは観察されず、角質層が形成されても、酸素透過性は保たれているようで、角質層下の基底細胞様細胞層で極度の低酸素状態に変化することはなかった。加えて、カルシウム培地を 0.06mM のままで増殖能を保ったままの培養環境下においては、極端ではないが、細胞内の酸素濃度が低下している細胞が見られた。特に、多核の細胞ではりん光寿命が長くなる傾向は一致して観察されたことから、通常の平面培養では、個々の細胞の酸素需要に関連して細胞内酸素濃度が低下しているのではないかと考えている。これは、本課題の研究期間は終了したが、この点をさらに追究するために、実験を継続して行う予定である。

### 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 1 件)

(1) Kato H, Izumi K, Uenoyama A, Shiomi A, Kuo S, Feinberg SE: Hypoxia induces undifferentiated phenotype of oral keratinocytes in vitro. *Cells Tissues Organs* 199(5-6): 393-404, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) Izumi K, Yoshihara T, Kato H, Hara Y, Saito N, Maeda T, Tobita S: Application of phosphorescent Ir(III) complex for monitoring oxygen levels in a tissue-engineered, ex vivo produced oral mucosa equivalent (EVPOME) - A preliminary study. Hypoxic conference. Tokyo, 2015. 7. 25 .

(2) Kato H, Izumi K, Shiomi A, Uenoyama A, Kuo S, Feinberg SE, Maeda T: Hypoxia induces undifferentiated phenotype of oral keratinocytes in vitro. TERMIS Americas 2014 Annual Conference and Exposition, Washington, D.C., 2014. 12. 15, *Tissue Engineering Part A* 20(Suppl): S-17, 2014.

(3) 泉 健次, 加藤寛子, 塩見 晶, 上野山

敦士, 前田健康: 低酸素環境が培養ヒト正常口腔粘膜上皮細胞に及ぼす影響. 第 12 回がんとハイポキシア研究会, 佐賀, 2014 年 11 月 21 日, 抄録集: 38 頁, 2014 .

(4) 泉 健次, 加藤寛子, 塩見 晶, 上野山敦士, 前田健康: 低酸素環境が培養ヒト正常口腔粘膜上皮細胞に及ぼす影響. 第 2 回低酸素研究会, 東京, 2014 年 7 月 26 日, 2014 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

泉 健次 (IZUMI, Kenji)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 80242436

#### (2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 40183941

飛田 成史 (TOBITA, Seiji)  
群馬大学・大学院理工学府・教授  
研究者番号: 30164007

#### (3) 連携研究者

( )

#### (4) 研究協力者

( )