

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463059

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞による粘膜再生機構の解明 血管新生の意義

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism of oral mucosa regeneration by tissue engineered oral mucosa fabricated with oral mucosal progenitor/stem cells -importance of angiogenesis-

研究代表者

芳澤 享子 (Yoshizawa, Michiko)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60303137

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは培養口腔粘膜(EVPOME)の粘膜再生能について検討してきた。しかしこれまでの方法では増殖能、分化能が不均一な上皮細胞集団であったため、口腔粘膜上皮前駆/幹細胞より作成したEVPOMEの粘膜再生能を評価した結果、良好な粘膜再生能と上皮細胞の長期の生存およびその再生過程に血管新生が関与していることが示唆された。本研究では、細胞増殖能の高いEVPOMEによる粘膜再生機構、特に新生血管がその過程において果たす役割について検討した。その結果、上皮幹細胞、前駆細胞を多く含むEVPOMEの方がより早く上皮の伸長や重層化が進行し、それを新生血管の豊富な肉芽組織が誘導していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have investigated the application of ex vivo-produced oral mucosa equivalent (EVPOME) and evaluated its ability of oral mucosa regeneration. However, cultivated epithelial cells using the present methods has heterogeneity, consequently, there is a risk that EVPOME possess poor cell growth activity and capability of oral mucosa regeneration. The previous study was to investigate the capability of EVPOME fabricated with small-sized cell population in which oral mucosal progenitor/stem-cells enriched subpopulation present and the change after EVPOME grafting subcutaneously in mice histologically. In the present study, we elucidated the mechanism of oral mucosa regeneration, especially the role of angiogenesis. As a results, EVPOME with small-sized cell population has high activity and capability of oral mucosal regeneration and faster elongation of epithelium is led by angiogenesis.

研究分野：外科系歯学

キーワード：移植・再生医療 口腔顎顔面再建外科学 口腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

(1) 培養粘膜に関する研究

1990年代に組織工学による培養上皮シート研究が多く行われたが、強度的に脆弱で取り扱いにくいこと、スローウイルス感染を引き起こしうるウシ胎仔血清や、細胞の増殖を促すためにマウスの細胞 (feeder layer) と患者の細胞が一時的に共培養されることが問題点に挙げられていた。

(2) 培養複合口腔粘膜(EVPOME)の開発と臨床応用

私たちはウシ由来物質やマウスの細胞との共培養を除外した培養方法を採用し、米国FDAの認可を受け、世界的に広く臨床応用されているヒト無細胞性真皮 (AlloDerm®、米国LifeCell社) と患者自身の口腔粘膜上皮細胞とを用いて培養複合口腔粘膜 (以下EVPOME) の作製に成功した。EVPOMEは、より安全性の高い培養システムを用いることと、ヒト無細胞真皮 (AlloDerm®) に口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化しているために口腔粘膜と組織学的に類似している上に操作性に優れていることが大きな特徴である。2000年に新潟大学歯学部倫理委員会承認を得て、臨床応用を開始し、2002年度から2004度には文部科学省高度先進医療開発経費 (B) が採択され、神戸大学、富山大学とEVPOME移植の適応拡大を目的とした共同研究をすすめ、3施設で合計約100例の臨床応用を経験し、全例生着し、瘢痕も少ない良好な結果を得ている。

(3) EVPOMEの粘膜再生過程に関する基礎的研究

一方、基礎的研究として、動物移植モデルや臨床応用例でのEVPOMEによる再生過程について検討し、ヌードマウス皮下移植モデル、口腔内移植モデルより、以下のことが解明されている。

①EVPOME上皮は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を放出、血管新生を誘導

②EVPOME上皮は移植後速やかに再生上皮を誘導

③EVPOME基底膜はリモデリングにより上皮再生を誘導

これらの研究よりEVPOMEの培養細胞が粘膜再生に大きく関与していることが明らかである。

しかしながらこれまでの方法で培養した上皮細胞はその増殖能、分化能が不均一な細胞集団であり、患者によっては細胞増殖能の不良なEVPOMEが作製されるリスクが危惧され、実際に培養細胞の増殖が遅いために組織採取を複数回行った症例や最終的にEVPOME移植を断念した症例も私たちは経験している。そこでより多くの症例に対して臨床応用を進めるには、安定した高い粘膜再生能を有するEVPOMEの作製が必要であることから、増殖能が高い均一な細胞集団である口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団が多く含まれると考えられる小型細胞集団より

作成したEVPOMEの生体内移植後の粘膜再生能を評価したところ、良好な粘膜再生能と上皮細胞の長期の生存およびその再生過程に血管新生が関与していることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、細胞増殖能の高いEVPOMEがどのような機構ですぐれた粘膜再生を獲得するのか、特に新生血管がその過程においてどのような役割を果たすのかについて解明するために、口腔粘膜上皮前駆/幹細胞集団より作製したEVPOMEをこれまでに開発した口腔内移植モデルに応用し、口腔粘膜再生機構を検討した。

3. 研究の方法

(1) EVPOMEの作製と組織学的、免疫組織学的検索

①ヒト口腔粘膜上皮細胞をEpiLife培地で培養し、1, 2回目の継代時にフィルターシ

ステム (Falcon, 70 μ m) を用いて、小型の細胞群を選別してEVPOMEを作製 (実験群)。対照群として従来の方法でEVPOMEを作製。

ホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

②上皮細胞マーカーであるサイトケラチン17(CK17)、細胞増殖マーカーであるKi-67、口腔粘膜幹細胞マーカーのひとつと考えられているp63に対する抗体を用いてEVPOMEの上皮細胞の増殖能や分化能を免疫組織化学的に検索した。

(2) EVPOMEをヌードマウス背部皮下に移植、組織学的、免疫組織学的観察

①5週齢のヌードマウス(BALB/c)の背部皮膚を約10mm切開し、両群のEVPOMEをそれぞれ底面が皮膚側になるように移植し、移植後5, 14, 21日目にEVPOME移植部を周囲組織も含めて切除し、摘出。

②摘出物をホルマリン固定、パラフィン連続切片を作製して組織学的に観察した。

③CK17、Ki-67、p63に対して免疫組織化学的に検索した。

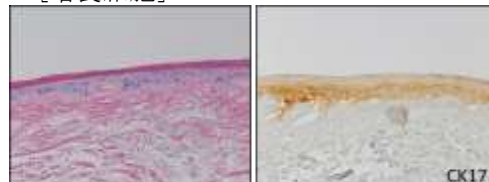
4. 研究成果

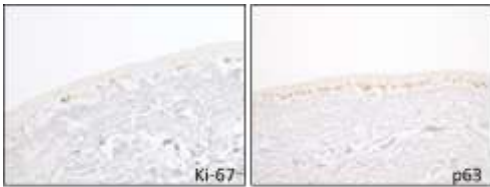
(1) 細胞選別とEVPOME

<実験群>



[培養細胞]



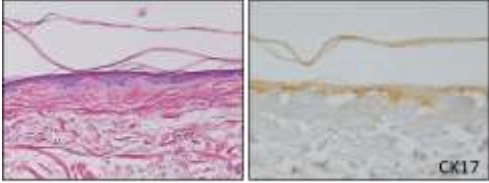


[EVPOME]

<対照群>



[培養細胞]



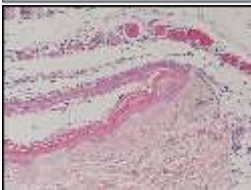
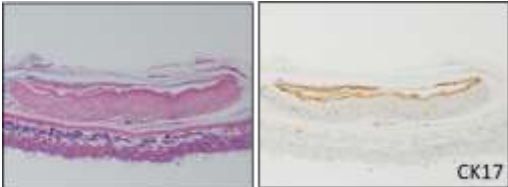
[EVPOME]

実験群の方が細胞形態が均一である。
EVPOME 上皮層も厚く、剥離なく、Ki-67, p63 陽性細胞が多い。

(2) 移植実験

1) 移植後 5 日目

<実験群>



<対照群>

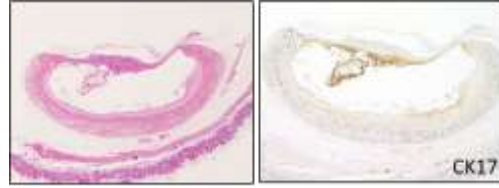


EVPOME 上皮細胞は CK17 陽性を示す。
両群ともに EVPOME 上皮の上に毛細血管を多数に含む肉芽組織が被覆し、上皮はそれに沿って両端より伸長しているが、実験群の方が血管も多く、肉芽組織も厚い。
Ki-67 陽性細胞は上皮伸長部の基底層に多くみられるが、実験群の方により多くみられる。
P63 陽性細胞は両群とも基底層とその上層にみられる。

p63 陽性細胞は両群とも Ki-67 陽性反応を示さないものが多い。

2) 移植後 14 日目

<実験群>



<対照群>



EVPOME 上皮細胞は CK17 陽性を示す。両群ともに EVPOME 上皮が毛細血管が豊富な肉芽組織にそって伸長しているが、実験群の方がその速度が速く、両端の上皮が連続し腔状を呈している。

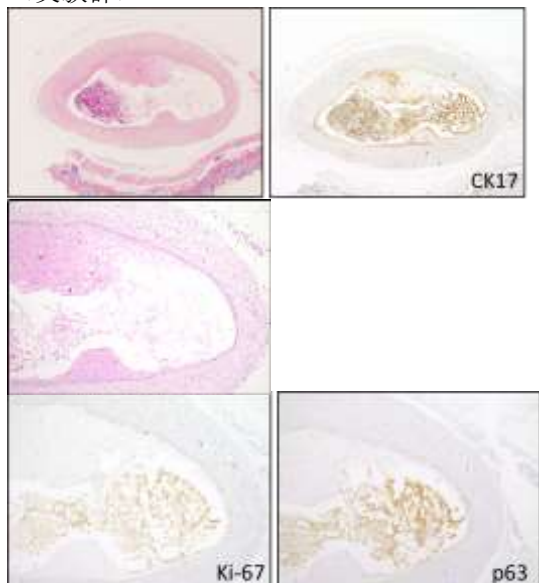
Ki-67 陽性細胞は上皮伸長部に認めるが、実験群の方が多く認められる。

P63 陽性細胞は両群とも基底層およびその上層にみられるが、実験群の方が多い。

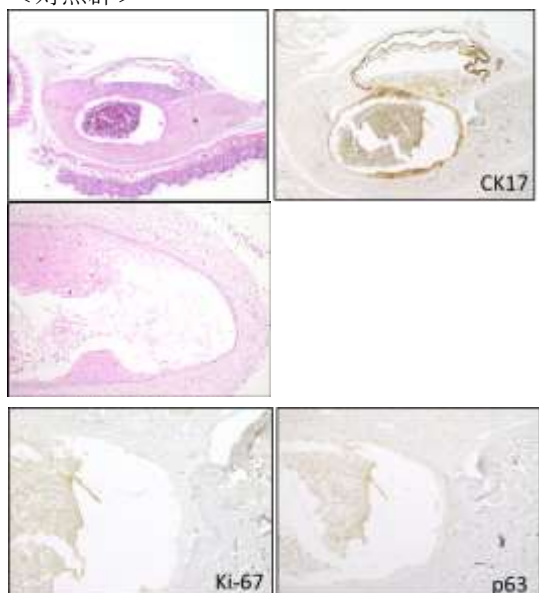
p63 陽性細胞は両群とも Ki-67 陽性反応を示さないものが多い。

3) 移植後 21 日目

<実験群>



<対照群>



実験群では、EVPOME 全体が両端で連続して腔状を呈し、上皮層は部分的に厚く重層化している。対照群は全体的には腔状を呈し、EVPOME 両端間の上皮は連続しているものの、AlloDerm®部分は連続せず、厚い肉芽組織が介在している。EVPOME 上皮細胞は CK17 陽性を示す。

Ki-67 陽性細胞は上皮伸長部に認めるが、実験群の方が多く認められる。

P63 陽性細胞は両群とも基底層およびその上層にみられるが、実験群の方が多い。

p63 陽性細胞は両群とも Ki-67 陽性反応を示さないものが多い。

(3) まとめと考察

I. 実験群の培養細胞は小型の細胞が多く、EVPOME も重層化し Ki-67 陽性細胞が多く認められた。P63 陽性細胞は両群とも基底層に連続的に認められ、実験群ではより上層にまで認めた。EVPOME 上皮細胞は両群ともサイトケラチン 17 陽性を示した。

II. 移植後 5, 7 日目では両群とも EVPOME 両端より上皮が伸長し、同部には Ki-67 陽性細胞が目立ち、実験群ではより多かった。p63 陽性細胞は基底層とその上層に認めたが、実験群の方が多くみられた。

III. 移植後 14 日目では両群ともに EVPOME は腔状を呈し、実験群では上皮両端が連続した。21 日では実験群は無細胞真皮両端も連続した腔となり、上皮層は対照群よりも重層化した。Ki-67 陽性細胞は実験群に多かった。p63 陽性細胞は両群とも基底層とその上層にみられたが、実験群の方がより上層まで分布し、数も多かった。

IV. どの時期においても p63 陽性細胞は Ki-67 陰性反応を示す細胞の方が多かった。

以上の結果より、実験群の方が上皮の伸長が早く、より重層化し、粘膜再生能を有することが示唆された。伸長する上皮は常に毛細血管が豊富な肉芽組織に誘導されるように、それに沿って進展していた。さらに免疫組織化学的に実験群の方が上皮幹細胞、前駆細胞が多く存在することが示唆され、これにより早い上皮の伸長や重層化が進んだと考えられた。

上皮幹細胞、前駆細胞を多く含む EVPOME の方がより早く上皮の伸長や重層化が進行し、それを新生血管の豊富な肉芽組織が誘導していることが示唆された。

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)

- ① Yoshizawa M, Niimi K, Sugai T, Aoyama S, Koyama T, Inoue M, Kobayashi T. Cervical resorption of autotransplanted tooth with complete root formation. *JSM Dentistry* 4: 1066, 2016. (査読あり)
- ② 小島 拓, 芳澤 享子, 齊藤 力, 小林 正治. 熱可塑性吸収性プレートと β -TCP 顆粒を用いた三次元的骨再生の実験的評価. *日口外誌* 61(12): 642-649, 2015. (査読あり)
- ③ Yoshizawa M, Koyama T, Izumi N, Niimi K, Ono Y, Ajima H, Funayama A,

Mikami T, Kobayashi T, Ono K, Takagi R, Saito C: Autotransplantation or replantation of cryopreserved teeth: a case series and literature review. Dental Traumatol, 30: 71-5, 2014. doi: 10.1111/edt.12039. Epub 2013 Mar 10.
(査読あり)

[学会発表] (計 5件)

- ① Yoshizawa M, Koyama T, Funayama A, Mikami T, Kobayashi T: Tissue-engineered oral mucosa fabricated with oral keratinocyte-enriched populations of small-sized progenitor/stem cells maintains a high potential of regeneration post-grafting in mice. The 57th Congress of the Korean Association of Oral and maxillofacial Surgeons, April 22-24, 2016, GSCO (Gunsan, Korea).
- ② 芳澤享子, 小山貴寛, 三上俊彦, 船山昭典, 齋藤直朗, 小島 拓, 新美奏恵, 小林正治: 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞を応用した培養複合口腔粘膜の皮下移植モデルにおける形態学的検討. 第 13 回日本再生歯科医学会学術大会・総会, 2015年8月29日, 日本歯科大学新潟生命歯学部(新潟).
- ③ Yoshizawa M: Intraoral Grafting of Tissue-Engineered Human Oral Mucosa. Symposium IV – Tissue engineering in OMFS, The 56th Congress of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. April 23-25, 2015, KINTEX (Goyang, Korean).
- ④ 芳澤享子, 小山貴寛, 船山昭典, 三上俊彦, 小野由起子, 小林正治: 口腔粘膜上皮前駆/幹細胞を応用した培養複合口腔粘膜の皮下移植後の動態. 第 68 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2014年5月7-9日, 京王プラザホテル(東京).
- ⑤ 小野由起子, 芳澤享子, 齋藤直朗, 小島 拓, 坂上直子, 三上俊彦, 船山昭典, 小林正治: 骨髄細胞・多孔性 β -TCP ブロック複合体の骨形成過程における培養骨芽細胞様細胞の動態. 第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 2014年5月7-9日, 京王プラザホテル(東京).

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/surgery1/classroom02.html>

<http://bmrctr.jp/saisei/project/project3>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳澤 享子 (YOSHIZAWA MICHIKO)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 60303137

(2) 研究分担者

泉 健次 (IZUMI KENJI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 80242436

(3) 連携研究者

寺師 浩人 (TERASHI HIROTO)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号: 80217421

(4) 研究協力者

()