博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名　鈴木　絢子
学　　位　博 士 (歯学)
学位記番号　新大院博 (歯) 第440号
学位授与の日付　令和元年9月20日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
博士論文名　Development of Microstructured Fish Scale Collagen Scaffolds to Manufacture a Tissue-Engineered Oral Mucosa Equivalent.
(マイクロパターン化した魚うろこコラーゲン足場材を用いた培養口腔粘膜の開発)

論文審査委員　主査　教 授　泉 健次
副査　教 授　早崎 治明
副査　教 授　大峡 淳

博士論文の要旨

【緒言】インビトロモデルやヒト臨床応用に用いられる培養口腔粘膜(Tissue-Engineered Oral Mucosa Equivalent: TEOME)は、足場材となる生体材料に口腔ケラチノサイトを播種して作成される。我々は足場材として、動物由来のコラーゲン製材と比べ、安全、安心、安価で、安定供給可能なバイオマテリアルである魚のうろこコラーゲンに着目した。一方で、上皮組織特有の構造として、真皮-上皮接合部 “Dermal-epidermal junction (DEJ) ”という微小な凹凸構造がある。これまで報告されてきた各種 TEOME をはじめ、すでに製品化されている、いわゆる培養皮膚でも、DEJ 構造が再現されている製品は開発されていない。これまで我々は、うろこ由来の I 型コラーゲンゲルに不織布を圧接することによって、DEJ のトポグラフィーを有した TEOME を作成してきた(特開 2017-147951)が、ロット差が生じるのは避けられず、マイクロパターン構造を足場材に付与するには、不織布の圧接方法は最適ではないと判断している。また、1%うろこコラーゲン製の足場材で培養口腔粘膜を作成すると、極度に収縮することは克服すべき課題であり、物性の工夫が必要であった。本研究の目的は、半導体技術を用い、形状の異なるマイクロパターンのプロトタイプを、安定的に付与できる魚うろこコラーゲン製足場材作成法の開発、及び異なるマイクロパターンプロトタイプ形状の足場材上に形成される TEOME 上皮の組織学的な差異の検討、そして、コンドロイチン硫酸添加による TEOME の収縮について解析することである。
【材料と方法】本実験ではグリッド型、ピラー型の基本形状に、矩形と波形の外形を組み合わせ４種類のマイクロパターンプロトタイプをデザインした。半導体技術を用いてグリッド状マイクロパターン付与用にポリジメチルシロキサン製、ピラー状マイクロパターンにシリコン製の陰性鋳型を作成し、ここへコラーゲン溶液(1%コンドロイチン硫酸添加または無添加)を填入し、γ線架橋を行った。インフォームドコンセントを得た患者から単離した口腔粘膜上皮細胞を足場材に播種し、本学の臨床応用プロトコールに準じて TEOME を作成した。経時的にサイズを測定し、HE 染色及び免疫染色でマイクロパターン形状と上皮組織像を観察した。
【結果】半導体技術を用いて鋳型を介して作成したコラーゲン足場上のマイクロパターンのプロトタイプを、SEM 画像で観察したところ、概ね設計した鋳型に対応したサイズと形状は保持されていたが、ピラーパターンより、グリッドパターンの方が、より精密にコラーゲンゲルに転写されていた。一方、組織学的に、マイクロパターンの内部構造を観察したところ、コラーゲンゲルに見られるエオジン好性の線維状構造は、グリッドパターン部には観察されたが、ピラーパターン部では疎になっていた。マクロ像解析より、コンドロイチン硫酸を添加した群は無添加群に比べ収縮抑制の効果を認めた。組織学的観察では、すべての TEOME において連続した上皮層の形

成を認めたものの、コンドロイチン硫酸の添加の有無にかかわらず、コラーゲン足場上に付与したマイクロパターンのプロトタイプ形状は保たれていなかった。マイクロパターンの変形に関しては、乳頭構造の高さの減少が顕著であった。上皮細胞の分化や増殖能に応じて特徴的な発現パターンを示す抗体を用いた免疫組織化学的検討では、TEOME 上皮細胞層の特徴的染色パターンに、大きな差はなかった。

【考察】本研究の 1 つめの目的である、半導体技術を駆使して PDMS 製と Si 製の鋳型を作製し、口腔粘膜の DEJ 形態に模した 4 種類のマイクロパターンのプロトタイプを、足場材である 1%うろこ I 型コラーゲンゲルに転写することは成功した。また、コンドロイチン硫酸は、口腔粘膜下結合組織にも含まれている成分であり、それを添加することでコラーゲンゲルの収縮が抑制されたことは、生体に近い足場材の組成が上皮細胞に対する力の作用機序を改変した可能性が考えられた。一方、TEOME の組織学的観察の結果から、コンドロイチン硫酸の添加の有無にかかわらず、全足場材で連続した口腔粘膜上皮は形成されたものの、付与したマイクロパターンプロトタイプ形状の原形が保たれていなかったため、2 つめの目的としたマイクロパターン形状の違いによって形成される上皮の特徴の比較・評価は出来なかった。その理由は、コラーゲン製足場材の材料学的性質に起因する可能性があり、物理化学的、機械的性質の向上が必要不可欠である。今後は、架橋、硬度、コラーゲン溶液の濃度など、足場材の製造プロセスの改良を行いマイクロパターンが変形しない足場材の作成を目指す。本技術をより発展させ、将来的に TEOME の製品化を目指す。

【 審査結果の要旨 】

まず、今回試みた方法に至るまでの技術的背景として、初期には、簡便であることからナイロン製の不織布により微細凹凸構造を付与していたが、微細構造の規格化が困難で、ロット差が激しい上に、足場材の微細構造は細胞播種後に大部分が平坦化した。医工連携を模索している中、半導体技術を実装し、バイオマテリアルに興味を持っていた早稲田大学の研究者の提案により、半導体を作成するのと同様な方法である Si と PDMS モールドを使用した方法を試み、陰性鋳型を用いることで、コラーゲンゲルへの微細構造の転写がほぼデザインどおりにできることがわかった。一方、半導体の作成方法はどうしても直線が基本となる。3 次元構造は再現できたが、生体組織では曲線が基本である。そのため今度は、3D プリンタを利用しコラーゲン足場材表面の微細構造を曲線的に作成する方法を提案されているようで、今後検討が進むことを期待する。

また、生体模倣の観点から、本モデルでは基底膜構造がないことが欠点と思われるが、技術的、および細胞生物学に考えられる改善策について述べてもらったところ、技術的には①基底膜を人工的に作成する、細胞生物学的には、②基底細胞層に合成を促進させる。③線維芽細胞をコラーゲンに混ぜるという 3 つの方法が考えられるという基本的な答えに続いて、各論として①基底膜成分は非常に多くの分子が含まれ、粘性が高く非常に薄い構造であるため、現段階でコラーゲンゲルと同時に作成することは難しい。現時点では、スプレー化などの技術をもってすれば、2 次的にコラーゲン足場材に付着させることは不可能でないと考えている。ただし、ゲルとの接着など、不確定要素は多い。また、ナノレベルの薄さではあるが、シート状やゲル状で別途作成し足場材に貼り付けるなどの方法は、今後可能かもしれない。②基底膜は上皮側の透明層と結合組織側の緻密層でできている。透明層は上皮基底細胞層によって合成されることから、合成能の高い基底細胞層を増やすことで、細胞からの基底細胞成分を合成促進させるという考えである。合成能の高い基底細胞層は、今回の研究で探索する、細胞の（物理的な）微小環境を整えるなどで実現可能であるというのが私たちの仮説である。また、足場材表面にあえて酵素などで分解させ表面処理を施した後、IV型コラーゲン等の①の技術でコーティングすることで細胞活性・合成の促進につながるかもしれない。③基底膜は基本的に上皮細胞と線維芽細胞の相互作用で構築されるので、コラーゲンに線維芽細胞を混ぜるのもひとつの方法である。線維芽細胞の培養には血清を含む培地が必要なので、インビトロモデルではこれが可能を思っている。これまでだれも成し遂げたことのない、未開拓な部分が多いからこそ、研究する余地があり、方策に努めていく意思を確認した。

続いて、トランスレーショナルリサーチとして今後必要と思われる動物実験について、どんな動物のどこに移植して、何を検討するかを問うたところ、動物実験で、培養口腔粘膜のインビボにおける細胞動態を組織学的に観察すると回答し、まず小型動物の免疫不全マウス、ラットを用い、口腔内移植がベストであるが、サイズが小さく、外科的に移植歯は不可能なため、代わりに、背部に空間を作成し、筋膜上培養口腔粘膜を挿入して、動態を観察する。時間的には1，

３，８、１２、２４週で摘出し、組織学的観察をしたい。組織学的に、炎症性細胞浸潤、コラーゲンゲルの宿主組織への置換度、かつ、上皮層の残存度と分化度、活性度を検討する。HE 染色のほか、免疫染色も併用する。その後、イヌやブタなど大型動物で、口蓋に欠損部を作成後、培養口腔粘膜を移植し、シーネによる保護する。これは、ヒトへの移植使用する際と、同じ方法で行うこと（シミュレーション）が肝要である。炎症性細胞浸潤、周囲上皮との連続性、欠損部組織の再生や結合組織の成熟度など、移植材として有効性を検討という回答を得た。

一方、材料学的な観点から、今回使用した Fish コラーゲンの概要について説明を求めたところ、原材料となる魚はティラピア（イズミダイ）を使用し、魚のうろこ部分のみ取り出し、乾燥させ粉末状に砕いた後、水で溶かし、溶液化させる。その後、必要な濃度に調整し、実験に使用しているということで、コラーゲンに架橋を加えることで液体から固体へと変化させることもでき、形状付与も容易に行える材料であり、今回の研究では使用していないが、シート状や紐状に形状を付与させた製品も出回っており、今後も再生医療分野で期待される製品であるという説明を受けた。

改めて、大観的に本研究の目的とそれに至るまでの経緯を述べてもらった。腫瘍や外傷、先天性異常に伴う口腔粘膜欠損には自家組織を用いた植皮や人工真皮が組織再建に用いられるが、植皮の場合は発毛や角化様式の違い、人工真皮の場合は瘢痕収縮などの合併症がみられる。そこで本学医歯学総合病院では、自家口腔粘膜上皮細胞を Alloderm®というヒト新鮮屍体真皮に播種して作成した培養口腔粘膜でヒト臨床応用を実施してきた。しかし、Alloderm®は本邦では販売していないため、輸入が必要でコストがかかる、ロットによって厚さが違うなどの欠点がある。さらに、すでに製品化されている培養口腔粘膜として使用する移植材の多くが動物由来コラーゲンであり、主な原料がウシやブタ由来の物が多く、人獣共通感染症を起こす危険性もある。これらの問題点を解決するため、安全で安価な足場材を開発し、培養口腔粘膜へ応用することが本研究のプライマリの目的である。その上で、これまで開発、報告されてきた培養皮膚・培養口腔粘膜は上皮層と下部結合組織界面が平坦であった。ヒトではこの界面が平坦であることはなく、必ず上皮脚と結合組織乳頭から成る凹凸構造をもっている。この生体模倣の観点から、培養細胞製品であっても、微細な凹凸構造を再現することでより、生体に近い３次元構造をもった培養細胞製品が作成可能であり、幹細胞研究にも一役買えると考え、各種作成方法を開発しているという、大きな目標とビジョンを語ってくれた。

逆に、各論的に、最終的に Grid 型で PDMS モールド、Pillar 型で Si モールドを使用し、それぞれ別のモールドを使用した理由を問うたら、皮膚真皮の形状を模倣する実験的研究では、微細構造を作成する際に PDMS モールドを鋳型とし、PDMS は生体への為害性が少ない材料で、安定していることから、当初は Grid 型と Pillar 型の両方で PDMS モールドを選択していた。しかしながら、付与したい凹凸構造が微細であることから、Pillar 型ではコラーゲンゲルにたまった気泡の除去が難しかったという回答を得た上で、そのため、Pillar 型では Si モールドをコラーゲンへ直接圧接する形で形状を付与し、問題の解決に至ったので、Pillar 型では Si モールドを使用することにした。従って、結果的に Grid 型と Pillar 型で別々のモールド使用することとなったと的確に説明された。

続いて各論的に、コンドロイチン硫酸を添加した理由を尋ねたところ、グリコサミノグリカンの１つであるコンドロイチン硫酸は、細胞外基質のプロテオグリカンとして、細胞外マトリックスとして体内に広く存在している。その役割として、水分の保持やコラーゲン線維の安定化、弾性や衝撃への耐性といった機能があり、シワの予防効果があることが報告されており、これがゲルの収縮抑制に効果があるのではないかと考え選択した、との説明をうけ、本研究で使用している I 型コラーゲンにグリコサミノグリカンを添加することで、生体により近い足場材となることを期待し添加した。特に、口腔粘膜や皮膚においてはコンドロイチン硫酸 B の割合が多いことから、コンドロイチン硫酸を選択したという解説を受けた。

また、基礎的な質問に立ち返り、生体の組織と比較した本研究における微細構造と細胞層との関係性について述べてもらったが、ヒト生体における真皮上皮接合部のトポグラフィーは、組織の構造と機械的特性を維持するだけでなく、毛細血管による栄養成分の供給が主な役割とされていたが、近年の研究で、幹細胞ニッチを形成しているとも言われ、その再生能力を方向付ける上で重要な役割を果たしている。口腔ケラチノサイトにおける報告は未だ認められないが、１）皮膚においては、真皮と表皮の間の表面積を増加させ皮膚の機械的強度を強くする、２）細胞微小環境はケラチノサイトの細胞機能を特異的に向上させる、３）上皮幹細胞が真皮乳頭の先端部に優位に位置するなど、真皮上皮接合部によって構成される物理的微小環境と皮膚ケラチノサイトとの関係性について研究されている。口腔ケラチノサイトも類似した構造を保持していることから、上皮と結合組織の界面構造のトポグラフィーとケラチノサイトの関係性について研究を進める所存である。それらを解明することにより、より培養口腔粘膜上皮細胞にとって、心地より環境を開発、提供することができると考えるとし、歯学を追究してきた研究者の卵として相応しい答えを得た。

それに関連した質問として、生体における DEJ の特徴とそれを再現することの意義について問うたところ、ＤＥＪはヒト生体における真皮上皮接合部のことを指すと説明し、この構造によって両者の接触する表面積を増大させることで、上皮と結合組織の接着をより強固にさせる一方で、上皮の伸展による口腔粘膜の可動性にも寄与している。さらに、

表面積の増大は、毛細血管網による上皮層への栄養の供給も高める。本研究は、DEJ を再現することで、培養口腔粘膜上皮細胞に含まれているとされる、上皮幹細胞にとっての物理的微小環境を生体模倣できることを想定している。そのため、再生した上皮がより長期に渡り恒常性を維持でき、より生体に近い上皮分化が行われ、移植材としてより優れたものが作成できるとの考え、本人の研究の仮説を聞くことが出来た。

再度材料学的な質問になってしまったが、Fish コラーゲンの濃度を１%にした理由が気になったので尋ねると、過去の実験において、10%、5%、2% の Fish コラーゲン濃度による培養口腔粘膜を検索したが、2%以上の濃度の場合、上皮は形成されず、足場材も極度に収縮した。また、濃度に比例して材料の硬度が高くなり、扱いにくくなることも明らかとなった。移植材には、縫合時に裂けないような強度が必要である一方、組織に適合できる適度な柔軟性も要求される。濃度を１%にした場合、上皮形成を認め、移植材としての適正な硬さと柔軟性を有していたため、最適濃度は１%と決定し、実験を進めることにした。一方、縫合時に裂けないような強度を確保するためには、さらにコラーゲン線維の安定を図る必要があると考えていると、過去、現在、未来の構想を述べてくれた。

材料学的な観点から少し飛躍して、生物物理学的視点から、足場材の微細構造の設計の根拠を問うたら、上皮脚の長さと幅は、ヒト口腔粘膜の部位によって異なるが、過去の研究では、歯肉上皮で長さと幅ともに約 100μm、口蓋粘膜上皮で約 200μm であるとの報告があった。まずは、より臨床での移植頻度の高い口蓋粘膜上皮の 200μm を基準に高さと幅を設計した。そのため、上皮脚の間隔に関しても、その口蓋粘膜上皮における約 100μm を本研究での設計に採用したという背景を十分説明してくれた。

すでに論文を投稿し、現在リバイス中と言うことで論文の中身についても、上皮細胞播種前の SEM 画像（Fig.7）や HE 染色（Fig.8）では微細構造が転写されているが、上皮細胞播種後の HE 染色（Fig.10）では微細構造が反映されていないのでその要因を尋ねた。

SEM 画像解析の結果（Fig.7）から、PDMS 及び Si モールドから Fish コラーゲンへの微細構造の転写は概ね成功したことが確認できた。上皮細胞播種前の足場材の HE 染色（Fig.8）でも概ね形状が保たれていたが、Grid 型、Pillar 共に若干の高さの圧縮が認められた。一方、上皮細胞播種後の HE 染色（Fig.10）では、CS 無添加群に上皮層により押しつぶされたような形状、CS 添加群に鋸歯状の形態が認められ、どちらも播種前の形状を維持していなかった。今回提出した学位論文には記載していないが、物性の強度を測定した際に、CS 添加群は CS 無添加群に比べ、引張り強さ、弾性率共に低い値であった。これは、CS を添加することによりコラーゲン繊維１本１本が太くなり(Fig. 6)、繊維同士の間隔が CS 無添加群に比べ粗になり、物性として弱い材料となり足場材の微細構造が変形したと考えている。CS 無添加群で認められた高さの圧縮の要因としては、①足場材自身の自重、②上皮層の重さ、③細胞による引張力、④重力、が考えられる。全てが複雑に関与していると考えられるため、今後は物性をはじめ、これらの要因全てを改善した足場材の開発が必要と思われるという返答があり、論文の内容についてしっかり細部まで把握していることを確認できた。

さらに、論文の結果から考察できそうな、足場材と上皮層は組織化学的に接着しているのかについて質問したところ、免疫染色で TypeIV コラーゲン(Supplemental Fig. 6)の局在を検索した結果、EVPOME に比べ、明瞭な局在は認められなかったことから、足場材表面と上皮基底層は組織化学的に接着していることは考えにくい。作製工程において、ヒト胎盤由来の TypeIV コラーゲンを足場材表面にコーティングしたが、Fish コラーゲン内に線維芽細胞は入っていないため TypeIV コラーゲンが新たに合成されることはないため、未成熟な染色像しか得られなかったと推察している。しかし、理想的な物理的微小環境を作り出すことができれば、組織学的にも今より強固な接着の再現ができると考えていると、基礎と臨床を橋渡しするような回答を得た。

最後にまとめの質問として、今後の研究の展開について述べてもらったところ、研究の目的は、足場材に付与された微細構造に沿って上皮の再生を促し、より生体に近い上皮細胞形成を再現し、より優れた口腔粘膜移植材を開発することにあるが、本研究ではまだ、生体に近い上皮形成、再生には至らなかった。第一義的な原因はデザインした微細凹凸構造が原型をとどめられなかったことにあると考えている。達成には、足場材である Fish コラーゲンが上皮層、重力、自重などに耐えられる物性改良がまず必要であると思われる。その上で適切な硬さ、しなり、圧縮強さを得るための Fish コラーゲンの架橋の変更または追加を考えている。さらに、今回は CS を添加することで収縮抑制を成功させたが、組織的に満足できる結果ではなかったため、収縮抑制の方法についても再検討を行なっており、実験継続中である。さらに、同じ口腔粘膜でも、歯肉や頬粘膜、口蓋粘膜など、部位によっても上皮脚の幅や深さは異なることから、設計を個々の部位に合うように幅、深さ、間隔を変化させ、部位特異的な移植材としての応用も考えていきたい、とのことで、学位論文の審査に対して、いずれも的確な回答を得たので、大学院修了レベルに相応しい知識と対応力があると判断できる。