

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 SUEBSAMARN ORAKARN
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第519号
学位授与の日付 令和4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 In-process monitoring of a tissue-engineered oral mucosa fabricated on a micropatterned collagen scaffold: Use of optical coherence tomography for quality control (マイクロパターン化コラーゲン足場材で作製した培養口腔粘膜のインプロセスモニタリング：品質管理のための光干渉断層撮影の使用)

論文審査委員 主査 教授 泉 健次
副査 教授 魚島 勝美
副査 教授 早崎 治明

博士論文の要旨

【緒言】

ティッシュエンジニアリング技術の発達により、培養皮膚はすでに製品化に至っているが、培養口腔粘膜の開発は後塵を拝している。国民の口腔 QOL の向上、口腔機能維持のために培養口腔粘膜の製品化も加速する必要がある。我々は既存の培養皮膚との差別化を図るため生体模倣に着目し、上皮細胞播種面にマイクロパターンという真皮表皮接合部 (Dermal Epidermal Junction, DEJ) を模した凹凸微細構造を付すために、MEMS 技術を用いて魚うろこコラーゲン足場材を開発し、上皮脚構造をもつ培養口腔粘膜作製に成功した。

報告では、PDMS 鋳型からコラーゲン足場材表面にマイクロパターンを付与したが、より生体模倣させた培養口腔粘膜を作製するために、曲線で構成されたマイクロパターン作製法を求め、私はレーザー加工による金型鋳型に着目した。

一方、ヒトの細胞が組み込まれた再生医療製品の作製に当たっては、製品の質が移植後の治療効果に影響を及ぼすため、製品製造中のモニタリングと評価などの品質管理が必須である。製品の品質管理はリアルタイムで無菌的、かつ非侵襲的に製品をモニタリングしなければならないにも関わらず、これまで3次元構造をもった再生医療製品に対して利用可能なツールがほとんど存在しないことは、再生医療の発展を大きく損ねていた。今回私は、眼科の診断などで汎用されている薄い組織内部構造を高解像度でリアルタイムに撮影できる光干渉断層撮影 (Optical Coherence Tomography, OCT) イメージングシステムに着目し、培養口腔粘膜の品質管理に利用できるのではないかと考えた適用を試みた。

以上より、私の研究チームが目指す培養口腔粘膜の臨床応用実現に向け、レーザー加工した金型鋳型から、より生体に類似したマイクロパターン構造を作製すること、および、非侵襲的培養口腔粘膜品質管理法として、OCT イメージングシステムの利用可能性を検証することの2点を本研究の目的とした。

【材料と方法】

足場材に湾曲したマイクロパターン構造を付与するために、DEJ 構造を模倣した曲面で構成された凹凸構造デザインをピコ秒レーザーでステンレス鋼の上に表面加工した。これを陰性金型として1.1%魚うろこコラーゲン溶液を流し込み、線維化させマイクロパターン付きコラーゲン足場材を作製した。一方、培養口腔粘膜の作製は、これまでの方法に準じ、インフォームドコンセントを得た患者歯肉から単離した口腔ケラチノサイトを無血清培地で培養した後、マイクロパターン化されたコラーゲン足場材の表面に播種して作製した。

作製した培養口腔粘膜は Cell3 Imager Estier (SCREEN Holdings, Inc.) を用い OCT 画像を取得した。同一部位を8日目と11日目に撮影するため培養口腔粘膜にマーキングした後、中央部の1×1 mmのエリアを選択し、Z軸方向は200 μm以上の厚さまで、1 μm/ピクセルの解像度で撮影した。11日目のOCT画像を取得した後、培養口腔粘膜は4%パラホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋し、組織学

的分析のためにヘマトキシリンおよびエオシン（HE）で染色した。さらに、培養口腔粘膜の上皮層の厚さを定量評価するため OCT 画像解析により上皮層の厚さも算出した。

【結果】

SEM よりコラーゲン足場材には湾曲したマイクロパターンが複製、転写されていた。OCT 画像では 8 日目、11 日目ともに、足場材のマイクロパターンとその上に形成された上皮細胞層が明瞭に識別できた。

また、足場材と上皮層の界面も描出できることで、製品の欠陥になり得る足場材と上皮層間のギャップも検出できた。さらに、深層学習を応用し上皮層を抽出したことで、8 日目と 11 日目の培養口腔粘膜の上皮層の厚さの増加や分布も解析でき、上皮層の厚さに関する定量評価も可能であった。HE 観察により上皮脚構造も観察できた。

【考察】

ピコ秒レーザーで表面加工した陰性ステンレス製鋳型から、DEJ を模倣した曲面で構成されるマイクロパターンが付与されたコラーゲン足場材を作製できたことと、この鋳型が何度でも繰り返し使用できることを考えると、本法を用いえば様々なマイクロパターン形状を付与したコラーゲン足場材の作製が可能で、かつ足場材の大量生産も可能となるので、画期的な工程であることが示唆された。

そして、OCT 画像により培養口腔粘膜の上皮層とマイクロパターン化した足場材は明瞭に可視化でき、かつ、上皮層とその下にあるマイクロパターン足場との間のギャップも描出できた。これは、これまでの解析方法では決して検出できない、培養口腔粘膜作製途中で培養口腔粘膜の内部に発生した欠陥の発見につながり、不良品を除去できることにつながる有用な非侵襲的ツールとなり得る。また本イメージングシステムに深層学習を応用することで、培養口腔粘膜の上皮層の厚みなどの品質管理に応用できる定量評価も可能となり、OCT イメージングシステムの利用価値が高いことも明らかとなった。

【結論】

ピコ秒レーザー表面加工されたステンレス製鋳型は、コラーゲン足場材にマイクロパターンを付与する陰性鋳型として使用可能であることが示唆された。さらに、OCT イメージングシステムが再生医療製品の品質管理ツールとして、培養口腔粘膜を非侵襲的かつ定量的にモニタリング、評価することが可能であることが示唆された。

審査結果の要旨

傷ついたヒトの臓器組織を修復するための標準的治療法として、再生医療/ティッシュエンジニアリングの進歩はめざましい。口腔粘膜上皮細胞は再生医療という枠組みの中で細胞ソースとしては歴史が長く、わが国で製品化されている数少ない細胞のひとつであり、その利用価値は非常に高い。口腔粘膜上皮細胞を、再生医療/ティッシュエンジニアリングの世界においてさらに活用していくために、細胞のみならず足場材と組み合わせ合わせた複合材料の開発も進んでいる。しかし、製品化されているものすべてが上皮細胞と足場材との界面が平坦である。このことは、外力に対する抵抗性が弱く、移植材のみならず医薬品のテスターとしての有効性も高いとは言いがたい。本研究は、ORAKARN氏が所属する研究室でこれまで用いてきた生体移植材としての魚うろコラーゲン製足場材料に対して、生体模倣の観点から、異分野（歯工）連携を図ることでコラーゲンシートに対してマイクロパターンと呼ぶ3次元波状構造を付与する新製法の開発と、細胞を播種した後の、いわゆる“培養口腔粘膜”の品質管理方法として望ましいとされる非侵襲的評価を、光干渉断層撮影（OCT）を初めて応用し、その利用価値を検証した。上記の2点において、口腔粘膜の再生医療の発展につながる可能性を秘めた非常に有意義な研究である。

一般に、海洋生物から得られる物質はバイオマテリアル、医薬品、食品、および化粧品に利用できる無限のコラーゲン資源である。一方、毎年魚のうろこは「廃棄物」として廃棄されており、原価的に哺乳類のコラーゲンより安価で手に入る。さらに魚のうろこはコラーゲンとアパタイトからなっており、ピュアなコラーゲンを得やすい特性を有する。人獣共通感染症がなく優れた生体適合性、高い生体内分解性をもち、低い免疫原性と抗原性で、播種した細胞の増殖性の維持など、優れた生物活性特性を備えている廃棄される海産物を有効利用する点は新しい視点であり、他の研究分野にも波及効果が高く、貢献できると考えられることが、まず本研究のユニークさを際立たせている。

中でも本研究において特筆すべき点は、異分野（歯工）連携を図ることでコラーゲンシートに対してマイクロパターンと呼ぶ3次元波状構造を付与する新製法を開発した点である。具体的には、ヒト口腔粘膜

上皮化組織に存在する微細構造である結合組織乳頭を生体模倣するためにピコ秒レーザーによるレーザー加工により基盤とする金型を作製、利用した。このレーザーは、熱影響の少ない μm オーダーの高速微細加工に用いられ、最新の産業用レーザーとして利用されており、レーザー加工でステンレス表面の上に湾曲したマイクロパターンを作製するための要件を満たしていることから、本研究でピコ秒レーザーが適切なレーザー加工技術として研究に用いるに至った。この観点と技術は、今までの樹脂製鋳型からコラーゲン足場材を作製する概念を覆すブレイクスルーをもたらすポテンシャルを有しており、本研究はその科学的価値の高さを有している。一方で、従来から利用されている樹脂製鋳型の利点も認めており、ステンレス製鋳型と樹脂製鋳型の使い分けを模索している柔軟性のある研究である点も評価される。

本研究では、マイクロパターン付きコラーゲン足場材の優れた点として、この足場材上作製された上皮層は十分に分化し、足場材から剥離しなかった。顕微鏡評価では、マイクロパターン化されたコラーゲン足場材上に錯角化した上皮層が観察され、*in vivo*口腔粘膜のような上皮脚構造の形成が確認され、上皮細胞と足場材の接着を有意に促進したことを示している。このことは生体模倣の観点を取り入れた新たな培養口腔粘膜作製法の新しい突破口となり得るこの貴重なデータは、重要なポイントであることから本研究の影響力の大きさが期待できる。

さらに、培養口腔粘膜の臨床応用に必要なことが、製造過程の品質管理である。本研究ではそのためのツールとして世界で初めてOCT撮影技術を使用し、その利用価値を検証した。上皮細胞層部分にあたったレーザーは散乱しやすく、足場材の部分に当たったレーザーが散乱しにくいことから、上皮層がより白く、足場材はやや黒っぽく描出されることから識別が可能となることを明らかにした。さらに深層学習も導入し、OCT画像から、自動的に撮影画像から細胞成分を抽出した二値化画像を作成することができ、OCTイメージングでは、上皮層とその下にあるコラーゲン足場材との間に空隙（ギャップ）が見つかりました。これは形成した上皮層と下部コラーゲン足場材の接着が弱いことを示し、培養口腔粘膜作製過程で上皮が剥がれやすいものを非侵襲的に見つけ出す手段となり得、培養口腔粘膜上皮部分の品質管理に有用であることを明らかにしたことは、特筆すべきであり、大きな意義があるものと認められる。一方、OCTシステムの限界も把握しており、今後のシステムの向上に対する課題も見えていることで研究の発展性も併せ持つ。

一方で、細胞接着においても生体模倣に関しても基底膜成分がこの足場材に存在しないことはこのコラーゲン材料の欠点となっている。基底膜は表皮の恒常性を維持する上で複数の複雑な役割を果たし、ケラチノサイトの接着、分化、層化、および生存の制御に関与するシグナルも提供するため、今後の研究の方向性も確立している。最近の3Dプリンター作製技術を応用することで、基底膜成分の付与が可能であるかもしれない手がかりをつかんでおり、研究のターゲットが広がり、今後の成果につながることで予想されるので、興味深い。

本研究で作製されるコラーゲン足場材は線維状構造を示すが、それを口腔内移植する場合、創傷治癒や組織リモデリングの面でも、今後足場材の内部形状についても目を向けるという戦略の開発という課題も残されていることから、将来性をもった非常に意義のある研究といえ、学位論文としての十分な価値が認められる。ORAKARN氏の最終目標は、バイオミメティックな培養口腔粘膜を作製し、臨床的にヒト口腔粘膜の組織欠損部に移植して、口唇裂や口蓋裂、口腔がんなど口腔創傷欠損の再生治療ができるようにすることとしている。本研究を推進することで、科学的基盤を元にした生体模倣したヒトにとっての欠損組織再建材の開発が可能となり、臨床においての新規生体移植材料の開発が可能になると思われ、本論文が口腔粘膜の再生医療の発展へ大きく寄与することを期待する。