

氏名	なかにし よしたか 中西 義崇
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第 76 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 23 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	The Expression of VEGF in Mucosa Substitutes (培養複合口腔粘膜における血管内皮細胞成長因子(VEGF)発現)
論文審査委員	主査 教授 齊藤 力 副査 教授 前田健康 教授 高木律男

博士論文の要旨

目的

培養複合口腔粘膜(ex vivo produced oral mucosa equivalent; EVPOME)は無細胞性ヒト新鮮屍体真皮 AlloDerm®上に無血清、no feeder layer で培養したヒト口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化して作製した生体材料である。これまでに EVPOME を SCID マウス皮下へ移植し、EVPOME の *in vivo* における動態を観察した結果、AlloDerm®単独移植の対照群に比べ、EVPOME 移植群では上皮下に多数の血管新生が認められたという報告があり、EVPOME が産生、放出する様々な血管成長因子が関与していることが推測されているものの、具体的な成長因子については述べられていない。

そこで、本研究では強力な血管新生因子である血管内皮細胞成長因子(VEGF)に焦点を当て、EVPOME が発現している VEGF の mRNA とタンパクの局在および培養上清中への放出量について調査するとともに、EVPOME から産生される VEGF がヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMVEC)に及ぼす増殖活性についても検討を行なった。

研究方法

口腔外科小手術時に余剰となった健常ヒト歯肉上皮細胞を用いて、前述の方法でヒト口腔粘膜ケラチノサイトを培養した。培地には HKGS-V2 と PSA を加えた EpiLife®を使用した。1 回継代した後、ケラチノサイトをそれぞれ EVPOME 作製群と単層培養群に分けて 18 日間培養を続けた。

単層培養群ではこの間 2 日おきに、培養上清を採取・保存し、かつ 1 ウェル中の細胞数を測定した。一方、EVPOME 作製群では、2 日おきに培養上清を採取・保存し、EVPOME も 4%パラホルムアルデヒドでその都度固定を行い、今回の研究に用いた。固定した EVPOME は H-E 染色を行い、さらに EVPOME 上皮内の VEGF mRNA の局在を ISH 法、VEGF タンパクの局在を免疫組織化学的染色により検索した。また正常ヒト歯肉における上皮細胞の VEGF 発現についても検索した。

ヒトケラチノサイトおよび EVPOME から放出された培養上清中への VEGF 放出量測定には、ELISA 法を用いて検討した。

また EVPOME の 6、12、18 日目の培養上清とヒトリコンビナント(rh)VEGF を加えた EpiLife®、および上述した培地に抗 VEGF 抗体を予め加えた培地を用いて、HDMVEC を 4 日間培養し、EVPOME から放出された VEGF による HDMVEC の生物学的増殖活性を細胞数で判定した。

結果

EVPOME の作製開始から 18 日間、EVPOME を構成する上皮の基底層と傍基底層の細胞で VEGF mRNA とタンパクが発現していた。一方、ヒト正常歯肉の上皮細胞には VEGF の発現は mRNA、タンパク共に少なかった。

またケラチノサイトを単層培養した培養上清中の VEGF 量は 2 日目から増加し続け、10～12 日目に最大に達し、その後ほとんど変化しなかった。これはウェル内の細胞数の増加と正の相関を示した。一方 EVPOME を製作した培養上清中の VEGF 量は 2 日目から減少を始め、培養 6 日目で最も少なくなったが、その後 VEGF 量は増加に転じ、培養 10 から 12 日目で放出量は最大となった。これは上皮の重層化と相関した。その後 18 日目まで若干減少するのが観察された。

HDMVEC を EVPOME の培養上清と rhVEGF を加えた EpiLife®により培養すると HDMVEC 基本培地で培養したときと比べ約 3～5 倍に細胞数が増加した。しかし、この HDMVEC に対する増殖活性は、それぞれの試験培地に抗 VEGF 抗体を 1 時間インキュベートした培地で HDMVEC を培養すると、逆に細胞数に減少が見られた。

考察

遊離歯肉移植においては、血管新生が遊離移植片の生着とその後の創傷治癒に必須であり、血管透過性と内皮細胞の分裂を促進する VEGF が、その重要な役割を担っている。今回の実験で EVPOME からは恒常的に VEGF が放出され、放出された VEGF は HDMVEC の増殖を促進した。すなわち SCID マウス皮下への EVPOME 移植実験で観察された血管新生には、EVPOME 上皮が産生、放出する VEGF が移植後の血管新生に大きく関わり、EVPOME の生着と移植後の創傷治癒に大きく関与していたことが示唆された。

審査結果の要旨

培養複合口腔粘膜(ex vivo produced oral mucosa equivalent; EVPOME)は無細胞性ヒト新鮮屍体真皮 AlloDerm®上に無血清、no feeder layer で培養したヒト口腔粘膜上皮細胞を播種、重層化して作製した生体材料である。これまでに EVPOME を SCID マウス皮下へ移植し、EVPOME の *in vivo*における動態を観察した結果、AlloDerm®単独移植の対照群に比べ、EVPOME 移植群では上皮下に多数の血管新生が認められたという報告があり、EVPOME が産生、放出する様々な血管成長因子が関与していることが推測されているものの、具体的な成長因子については述べられていない。

そこで、本研究では強力な血管新生因子である血管内皮細胞成長因子(VEGF)に焦点を当て、EVPOME が発現している VEGF の mRNA とタンパクの局在および培養上清中への放出量について調査するとともに、EVPOME から産生される VEGF がヒト皮膚微小血管内皮細胞(HDMVEC)に及ぼす増殖活性についても検討を行なっている。

研究には口腔外科小手術時に余剰となった健常ヒト歯肉上皮細胞を、前述の方法で培養して用いた。培地には HKGS-V2 と PSA を加えた EpiLife®を使用した。1 回継代した後、ケラチノサイトをそれぞれ EVPOME 作製群と単層培養群に分けて 18 日間培養を続けた。

単層培養群ではこの間 2 日おきに、培養上清を採取・保存し、かつ 1 ウェル中の細胞数を測定した。一方、EVPOME 作製群では、2 日おきに培養上清を採取・保存し、EVPOME も 4%パラホルムアルデヒドでその都度固定を行い、今回の研究に用いた。固定した EVPOME は H-E 染色を行い、さらに EVPOME 上皮内の VEGF mRNA の局在を ISH 法、VEGF タンパクの局在を免疫組織化学的染色により検索した。また正常ヒト

歯肉における上皮細胞の VEGF 発現についても検索した。

ヒトケラチノサイトおよび EVPOME から放出された培養上清中への VEGF 放出量測定には、ELISA 法を用いて検討した。

また EVPOME の 6、12、18 日目の培養上清とヒトリコンビナント(rh)VEGF を加えた EpiLife®、および上述した培地に抗 VEGF 抗体を予め加えた培地を用いて、HDMVEC を 4 日間培養し、EVPOME から放出された VEGF による HDMVEC の生物学的増殖活性を細胞数で判定した。

その結果、EVPOME の作製開始から 18 日間、EVPOME を構成する上皮の基底層と傍基底層の細胞で VEGF mRNA とタンパクが発現していた。一方、ヒト正常歯肉の上皮細胞には VEGF の発現は mRNA、タンパク共に少なかった。

またケラチノサイトを単層培養した培養上清中の VEGF 量は 2 日目から増加し続け、10～12 日目に最大に達し、その後ほとんど変化しなかった。これはウェル内の細胞数の増加と正の相関を示した。一方 EVPOME を製作した培養上清中の VEGF 量は 2 日目から減少を始め、培養 6 日目で最も少なくなったが、その後 VEGF 量は増加に転じ、培養 10 から 12 日目で放出量は最大となった。これは上皮の重層化と相関した。その後 18 日目まで若干減少するのが観察された。

HDMVEC を EVPOME の培養上清と rhVEGF を加えた EpiLife®により培養すると HDMVEC 基本培地で培養したときと比べ約 3～5 倍に細胞数が増加した。しかし、この HDMVEC に対する増殖活性は、それぞれの試験培地に抗 VEGF 抗体を 1 時間インキュベートした培地で HDMVEC を培養すると、逆に細胞数に減少が見られた。

遊離歯肉移植においては、血管新生が遊離移植片の生着とその後の創傷治癒に必須であり、血管透過性と内皮細胞の分裂を促進する VEGF が、その重要な役割を担っている。今回の実験で EVPOME からは恒常的に VEGF が放出され、放出された VEGF は HDMVEC の増殖を促進した。すなわち SCID マウス皮下への EVPOME 移植実験で観察された血管新生には、EVPOME 上皮が産生、放出する VEGF が移植後の血管新生に

大きく関わり、EVPOME の生着と移植後の創傷治癒に大きく関与していたことが示唆された。

口腔外科手術による口腔粘膜欠損に対しては、様々な方法がとられている。近年再生医療に関する関心が高まってきており、その中でも EVPOME は新潟大学において開発、発展されてきた生体材料で、1999 年に倫理委員会の承認を得て臨床応用を開始しており、良好な治療成績を収めている。EVPOME 移植は血管新生を促すことが報告されているが、この血管新生が VEGF によるものであることを、様々な観点から調査したものである。

本審査では VEGF in situ hybridization に用いたプローベの作成法と特異性の検定、本培養法を用いた他上皮組織培養への応用の可能性、細胞培養方法と VEGF 発現量との関係、EVPOME 作成法と VEGF 発現量との関係、臨床において移植した EVPOME 細胞の生着、再生医療における EVPOME の位置付け、EVPOME 移植時の VEGF の役割、歯肉と EVPOME での VEGF 発現の違い、VEGF の臨床応用に可能性、VEGF 以外の成長因子などについて質問を行ったが、いずれも妥当な回答が得られた。また、この研究は、EVPOME 移植において観察される血管新生には、EVPOME 上皮が産生、放出する VEGF が移植後の血管新生に大きく関わり、EVPOME の生着と移植後の創傷治癒に大きく関与していたことが示唆されたことから価値あるものと認めた。