

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 上野山 敦士
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第319号
学位授与の日付 平成27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 Effects of C-xylopyranoside derivative on epithelial morphogenesis in an organogenesis model of oral mucosa
(3次元口腔粘膜培養モデルを用いたC配糖体が上皮形態形成に及ぼす効果の検証)

論文審査委員 主査 高木 律男 教授
副査 泉 健次 教授
副査 織田 公光 教授

博士論文の要旨

【研究の背景と目的】 培養口腔粘膜 (EVPOME) 臨床応用プロトコールでは、作成に万全を期しても薄い上皮しか形成されず、移植に適さない“不良品”が作成されることが現状では避けられない。これを移植した場合には、上皮細胞が分泌する創傷治癒促進因子の産生量が低下し、移植後創傷治癒に支障をきたすため、“不良品”の早期発見と発生予防が EVPOME 品質管理のカギとなる。現在はグルコース消費量測定のみで品質管理が行われているが、早期発見のより有効な手段の開発は遅れている。そこで私は EVPOME の品質向上のため、“不良品”の発生を抑え、予防する有効な手段として薬理的なアプローチを検証した。皮膚・口腔粘膜上皮の菲薄化に併発するプロテオグリカン (PG) 含有量の減少と相関するといわれている。PG は硫酸化多糖であるグリコサミノグリカン (GAG) がコア蛋白質に共有結合した糖蛋白で、細胞外基質の主要な構成成分として組織構築に重要な役割をもつと同時に、近年 GAG は多くの増殖因子や細胞接着分子と結合し、様々な細胞機能を調整することも分かってきた。本研究はグリコシルトランスフェラーゼ阻害剤で、GAG 合成を促進するとされる C 配糖体の一種である β -D-xylopyranoside-n-propane-2-one (XPP) を培地に添加し、3次元口腔粘膜培養モデルを用いて上皮の再生・形態形成を分析し、培養口腔粘膜の品質保証管理における有効性を検証した。

【材料と方法、および結果】 十分なインフォームドコンセントを得た患者から採取した歯肉から上皮細胞と線維芽細胞を単離し、それぞれを 0.06mMCa⁺⁺と 1.2mMCa⁺⁺含有無血清培地 (EpiLife)、および 10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) で単層培養した。実験はまず、各培地に 2, 10mM の XPP を加え、各細胞を 24, 48 時間単層培養し、細胞の代謝活性と培地中に放出された硫酸化 GAG (s-GAG) 量を測定した。代謝活性は、いずれの培養条件でも対照に対して有意差を認めず、2, 10mM の XPP に細胞毒性がないことが示された。さらに s-GAG 量は、1.2mMCa⁺⁺EpiLife で培養した上皮細胞で有意に産生量が増加していた。次に、3次元培養口腔粘膜モデル (3DOMM) に 2, 10mM の XPP を添加して培養を行った。作成した 11 個の試料で、組織学的分析と各種タンパクの発現解析を行い、培養上清も回収した。組織学的観察では、いずれの 3DOMM も錯角化を伴う重層扁平上皮が形成されており、XPP が上皮の重層化や分化に影響を及ぼさないことが示唆された。一方、形成された上皮は統計学的有意差は至らなかったものの、明らかに 2, 10mM の XPP を添加した 3DOMM で厚みが増していた。また 11 サンプル中、XPP 添加群の上皮厚さの最小値が対照に比べて増加しており、上皮の菲薄化が抑えられていた。そして特筆すべきことは、2mM の XPP で作成した 3DOMM は、形成された上皮の厚さのばらつきが非常に小さくなっていった。しかしながら、10mM の XPP で作成した 3DOMM にこの傾向は見られなかった。さらに上清中に放出された s-GAG 量は、XPP 添加群の 3DOMM で有意に増加しており、上皮の厚さの増加との関連が示唆された。最後に、こうした上皮形態形成に変化をもたらすメカニズムを解明する手がかりとして、細胞接着因子を含む上皮基底膜マーカータンパク (IV型コラーゲン、ラミニン、ニドゲン、インテグリン α 6 および β 1)、プロテオグリカン (デコリン、シンデカン、CD44)、細胞の増大や

タンパク合成に関わる Akt/mTOR シグナル経路 (Akt, S6K, S6) に注目し、それらに関するタンパクの発現量をイムノブロットングで、組織学的局在について免疫組織化学的手法で解析を進めた。イムノブロットングの結果から、検索したタンパクのうちラミニン、インテグリン β 1、S6 を除くすべてで10mM の XPP 添加により作成した 3DOMM は対照と比較して、1.5 倍以上の発現の増加が認められた。一方、2mM の XPP を添加した 3DOMM では、対照と比較してその発現が 1.5 倍増加したタンパクは、インテグリン α 6、CD44、Akt、S6K のみで、その他のタンパクで顕著な増加は認められなかった。また、これらのタンパクの局在に異常と考えられる所見はなく、その発現量はイムノブロットングの結果と一致していた。

【考察と結論】 以上から、2mM の XPP を培地に添加して 3DOMM を作成すると、培養口腔粘膜で形成される上皮の厚みが増加し、ばらつきを減少させると同時に薄い上皮形成も抑制し、上皮形態形成の改善に寄与していた。すなわち、2mM の XPP による薬学的アプローチは、規格外製品の発生予防に効果があることで培養口腔粘膜製品間格差を是正し、3DOMM における品質向上につながるため、現行の培養口腔粘膜作成プロトコルへ応用可能であることが示唆された。これには s-GAG 産生量の増加が大きいに関連し、それに伴うインテグリン α 6、CD44 の発現増加による上皮の質の向上や Akt/mTOR 経路の活性化による細胞の生存促進効果が考えられるが、10mM の XPP の添加では、主な上皮基底膜マーカータンパクやプロテオグリカンの発現が 2mM を添加した 3DOMM より増加していたにも関わらず、上皮形態形成の改善が 2mM 程度顕著ではなかったことから、さらにその原因とメカニズムを追究していく必要がある。

審査結果の要旨

一般に市販される製品の“ものづくり”の過程で、たとえ非常に低い頻度であっても出荷に値しない不良品（基準を下回った規格外製品）が生じるのは避けられない。従ってこうした不良品を出荷前に除外し、流通させない努力は、製造業者としての義務であり、消費者や社会からの信頼を獲得することに結びつく。これが、細胞を含みヒトの体内へ移植される治療用の再生医療製品において、その重要度は計り知れない。不良品の流通を回避する予防措置としては2つの手段が考えられる。1つは早期発見であり、もう一つが発生の予防である。工業製品において不良品の発生が避けられないことから、早期発見による対処法が特異性が高いので一般的であるといえる。同様のことが細胞を含む再生医療用製品に対してもあてはまる。しかしながら、ナマモノである再生医療用製品においては、早期発見の方法であっても画一的なもの存在せず、例えば心筋、神経、網膜など、組織・臓器の機能が違うので、その方法は各組織製品によって大きく異なるのは明らかである。しかも再生医療の世界では、何が各組織にとってふさわしい早期発見方法なのかという議論や検証は最近ようやくスタートしたレベルであり、現実的に、まだまだそうした手技の開発は未熟で発展途上といわざるを得ない。本学で行われている自家培養口腔粘膜による口腔粘膜欠損修復術治療においても、“不良”な培養口腔粘膜を発見するための出荷前検査では、組織学的に実証されているものの、培地中のグルコースレベルの測定のみで判断しているのが現状である。究極の目標としては、複数の検査項目、それも生物学的に上皮組織に特異的なマーカー（VEGF や IL-8 などの生物学的活性をもった創傷治癒に貢献するサイトカイン）などの測定により、総合的に出荷するに妥当な製品かどうかを判断するシステムの構築が待たれる。申請者は、このような基礎的、臨床的再生医学の背景を非常によく理解している、その一方で、本実験はこれまであまり扱われていなかった患者移植用培養口腔粘膜の不良品の、発生予防法“についての検討を行ったものである。申請者が全世界の人々の健康増進のために、また培養口腔粘膜に限らず、普遍的に再生医療用製品作成にあたっての欠陥品の発生予防措置についてのアイデアも常に考慮し、そして申請者が提出した論文が、学位論文としての価値が十分にあることは以下の3つの点から明らかである。

まず最初に、本研究の取り組み自体が、非常にチャレンジングな課題であるにも関わらず、こうした比較的困難な状況を打破するために申請者は、薬理的なアプローチ方法という、比較的簡便な方法を利用して、課題に取り組んで一定の結論を導きだしている点に価値を見出せる。課題解決につながる薬物に遭遇できたという幸運もあるかもしれないが、そのチャンスはある程度結果に結び付けることができている、むしろそうしたチャンスを見逃さずに、再生医療

の発展に貢献するような目をもって薬物を活用できた点は、思慮に長け、意義深いと考えられる。2点目として、本研究の終着点は、不良品の“発生予防”であるので、実験のエンドポイントはわかりやすいものといえる。ただし、作成された培養粘膜を包括的に検索しなければならぬ労力が必要とされるが、その困難な作業を実行した上に、生物学的なメカニズムのアプローチをも手がけたことに、更にこの研究の価値を見出すことができる。とはいうものの、実験結果の生物学的メカニズムの解明に関しては、あとでも述べるように結果的に十分行えたかという点、まだまだ実験の余地が残されていることは事実であり、この点は今後さらに追究を続けるべきであり、申請者にはそれを期待したい。3点目としてあげることができるのは、生物学的メカニズムの解明がやや未熟ではあるものの、欠陥品“として不良な培養口腔粘膜を、再生/形成した上皮層の薄い培養口腔粘膜と定義し、上皮組織の”老化“現象と相同であると捉えた視点が、本実験で生物学的メカニズム解明の糸口に結果的にはつながったといえる。この様に多角的な視野を持っていたがために成し得た実験であることも学位論文として評価される点である。