

研究者：鈴木 絢子（所属：新潟大学医歯学総合病院 小児歯科・障がい者歯科診療室）

研究題目：小児特異性を有した魚うろこコラーゲン製三次元培養口腔粘膜の開発

目的：

ヒトの上皮組織は外部からの物理的刺激に抵抗するために“真皮表皮接合部”（DEJ：Dermo-epidermal junction）という結合組織乳頭と上皮脚から構成される微細な凹凸構造（マイクロパターン）を持ち合わせており、重要な役割を担っている（図1）。こうした微小環境は幹細胞ニッチを形成しているともいわれており、近年注目が高まっている。より機能的な培養口腔粘膜作成法を確立するため、医工連携を活用し、培養口腔粘膜の細胞足場材の表面にDEJを生体模倣して付与することに成功した（Suzuki A et al., J Biomater Sci Polym Ed, 2020）。すなわち、ナノテクノロジーを応用することで、作成した鋳型からコラーゲングル上にマイクロパターンの付与が可能になった（図2）。

また、小児と成人の口腔粘膜上皮では、錯角化の程度や機械的強度が異なること、DEJのサイズの違いなどが考えられる。

本研究では、小児に特異的なDEJを有した三次元培養口腔粘膜の開発を前提としたDEJサイズ設計の多種化を目的とし、既存の成人用モデルとの比較検討を行う。

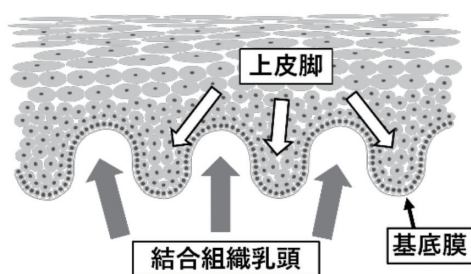


図1 口腔粘膜上皮の模式図

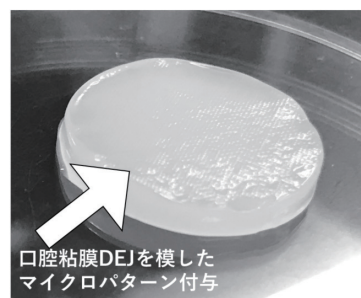


図2 うろこコラーゲングル製足場

方法：

(1) マイクロパターンの設計

DEJの形とサイズを組織学的に分析し、目標とするサイズと形状を決定する。コントロールをパターン無しとする。さらに、一般的な成人の口腔粘膜上皮脚の大きさから、深さ(a)・幅(b)・間隔幅(c)各100 μ mを基本形とし、各サイズを50~100 μ mの間で組み合わせ計9種のサイズを設計する（表1）。

(2) ナノテクノロジーを利用した各上皮組織特異的な鋳型の作成

シリコン(Si)モールドに異方性および等方性エッチングにより特異的なサイズのマイクロパターン微細構造を作成した後、Siモールドから、PDMS製の鋳型を作成する（図3）。

表1 コラーゲン足場材表面マイクロパターンの設計

Sample ID	Micropattern prototype	a	b	c	Aspect Ratio (b/a)	1% EDC
C	Non patterned	-	-	-	-	
1	格子状	100	100	100	1	+
2		100	50	100	0.5	
3		100	100	50	1	
4		100	50	50	0.5	
5		50	100	100	2	
6		50	50	100	1	
7		50	100	50	2	
8		50	50	50	1	

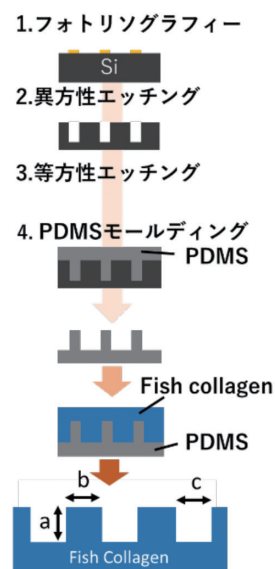


図3 作製工程

(3) マイクロパターンを付与したコラーゲンゲルの作成

PDMS モールドの鑄型に魚うろこ由来のI型コラーゲン溶液を流し込み、線維化させたのち、EDC 化学架橋を行い、 γ 線照射で滅菌する。完成後のコラーゲンゲルのマイクロパターンが設計通りかどうかを、走査型電子顕微鏡で評価、確認する。

(4) 培養口腔粘膜作成プロトコルで3次元モデルを作成、組織学的評価

口腔ケラチノサイトを使用し、上皮モデル作成は培養口腔粘膜作成プロトコルに準じて作成する。4日間浸漬培養した後、培養口腔粘膜は気相液相培養に移して、さらに7日間培養を続け単層だった上皮を重層化させる。その後、HE染色・免疫染色により組織学的に評価する。

結果および考察：

完成したPDMD モールド表面および転写されたコラーゲン足場材表面のSEM 画像結果より、異なるサイズ形状のマイクロパターンのデザインは設計通りのパターンが付与された(図4)。さらに、口腔ケラチノサイトを播種し作成した培養口腔粘膜のHE染色画像では、足場材のマイクロパターンに沿った上皮脚様構造を認め、重層化された口腔粘膜上皮組織が形成された(図5)。完成された培養口腔粘膜のマイクロパターン変形の程度としては、アスペクト比により異なるものの、概ね設計通りの形態が付与されていた。

以上より、異なるマイクロパターンの設計において、ナノテクノロジーによりコラーゲン足場材への転写および培養口腔粘膜の作成が可能であり、年齢や個体差に合わせた設計ができることが示唆された。基本形と比較しても、より細かなパターンが形状保持されていたこと、培養口腔粘膜が完成したことは十分評価でき、この技術を使用した口腔内外の組織特異的に異なるDEJ構造を有している欠損組織の移植材としても応用が期待される。

また、小児に特異的なin vitro 三次元口腔粘膜の用途としては以下の二つが考えられる。一つ目は、医薬品の安全性やスクリーニング評価、動物実験代替法など、三次元インビトロモデルとして基礎的研究使用できる。これにより小児の口腔粘膜に特異的な反応を研究することが可能に

なり、社会的な期待は甚大である。二つ目は、うろこコラーゲンは生体親和性の高い安全な材料であることから、組織再建材・移植材として足場材を単独で使用することも可能である。これが実現すると、移植手術に侵襲を伴わないので、患児の負担軽減となる。出生時や緊急時の手術でも利用が可能となり、多岐に渡り臨床応用が見込まれる。

今回は異なるパターンへの設計に着目し研究を進めてきたが、今後は小児口腔粘膜組織の特異的な力学特性にも注目し、物理的な強度、硬度や柔軟性を模したコラーゲン製足場材の作成を検討していきたい。

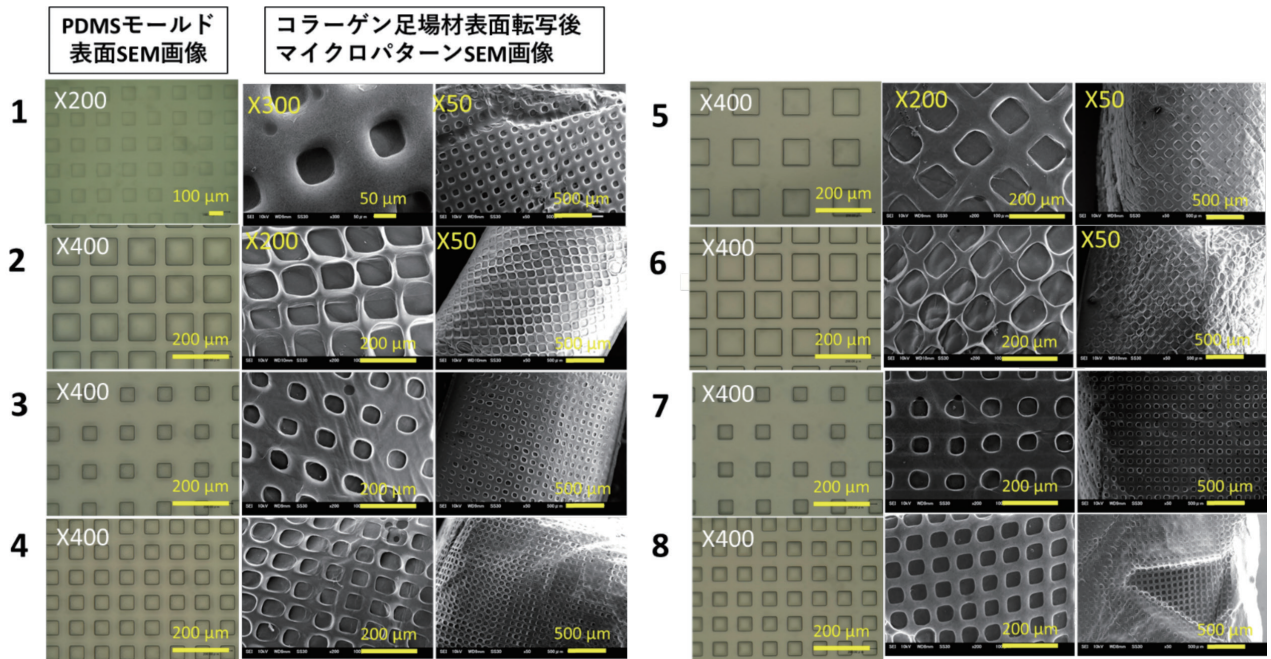


図4 PDMS モールド表面、コラーゲン足場表面の SEM 画像

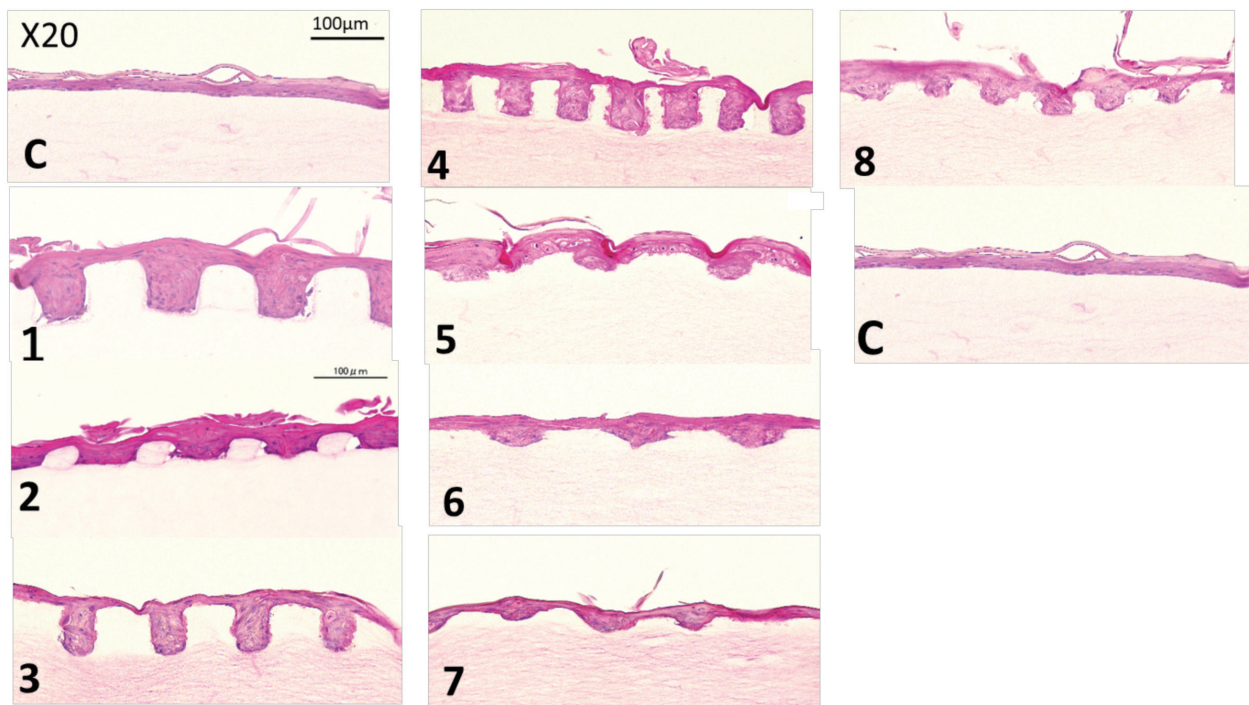


図5 HE 染色組織像

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

1. Suzuki A, Kodama Y, Miwa K, Kishimoto K, Hoshikawa E, Haga K, Sato T, Mizuno J, Izumi K. Manufacturing micropatterned collagen scaffolds with chemical-crosslinking for development of biomimetic tissue-engineered oral mucosa. Sci Rep. 2020 Dec 17 ; 10 (1) : 22192. doi : 10.1038/s41598-020-79114-3.
2. 鈴木絢子、兒玉 泰洋、山口 勇、岸本 一真、干川 絵美、羽賀 健太、Orakarn Suebsamarn、小松 隆史、水野 潤、泉 健次：表面をマイクロパターン化した魚うろこコラーゲン製材のヒト上皮組織の欠損再建材としての利用可能性の検証。第36回「歯科医学を中心とした総合的な研究を推進する集い」、東京、2021年3月17日