

2023年6月6日

新潟大学
北海道大学

口腔粘膜上皮角化細胞の運動・増殖を制御する

分子メカニズムの解明

－再生医療に用いる細胞の効率的培養につながる分子基盤－

新潟大学大学院医歯学総合研究科生体組織再生工学分野の泉健次教授、同大医歯学総合病院顎顔面口腔外科の小林亮太医員らの研究グループは、北海道大学大学院先端生命科学研究院の芳賀永教授、石原誠一郎助教との連携により、口腔粘膜上皮角化細胞（※1）の運動能と増殖能を制御する分子メカニズムを明らかにしました。

本研究成果は、2023年6月4日に国際学術誌「FEBS Open Bio」のオンライン版に掲載されました。

【本研究成果のポイント】

- 本研究グループは、これまで再生医療の細胞資源として注目される口腔粘膜上皮角化細胞の増殖能が、画像解析により細胞運動能を非侵襲的に評価することで可能であることを立証し、細胞品質管理ツールとしての将来性が見込まれています。
- 一方で、口腔粘膜上皮角化細胞の運動能と増殖能を制御する分子生物学的メカニズムの解明までは至っていませんでした。
- 本研究により、EGF/EGFR/Src/PI3K/Akt/mTORのシグナル伝達経路によって口腔粘膜上皮角化細胞の運動能と増殖能が制御されていることを突き止めました。
- この知見は、再生医療における細胞製品製造中に本シグナル経路を活性化することで、細胞の効率的培養法や大量細胞技術へつながることが期待されます。

1. 研究の背景

再生医療の進歩は目覚ましく、細胞移植によって難治性疾患治療に希望の光をもたらしました。細胞シート（※2）作製技術の開発により、自家口腔粘膜上皮角化細胞シートを角膜、食道などへ移植する細胞治療は、最近先端医療として確立し、世界的にも普及していることから、口腔粘膜上皮角化細胞は再生医療を実践する貴重な細胞資源として注目を浴びています。一方で、患者さんの口腔内から採取できる口腔粘膜組織量は限られており、初代培養（※3）であることから細胞の大量培養は難しいため、さらなる再生医療の発展のためには、より効率的に細胞を増やす技術の確立が急務といえます。

患者さんに移植される細胞は再生医療を実践する製品である以上、細胞の品質を担保/管理する技術の開発が求められますが、本研究グループはこれまでに、オプティカルフローアルゴリズム（※4）を用いることで、ラベルフリー（※5）で細胞品質を非侵襲的に評価できる技術を開発しました。その研究では、細胞運動能が細胞増殖能および上皮再生/分化能と相関することを明らかにしましたが、口腔粘膜上皮角化細胞の運動能と増殖能を制御する根本的な分子生物学的メカニズムは解明されていませんでした。運動能と増殖能という二つの細胞機能を調節するメカニズムが明らかになれば、薬理的操作により、細胞の安全かつ効率的な培養と大量培養技術の開発につながると考えられます。このメカニズムを応用して口腔粘膜上皮角化細胞を効率的に増殖させることができれば、初代培養細胞の培養期間の短縮につながり、組織片採取から移植までの期間を短縮でき、医療経済的にもメリットがあります。

II. 研究の概要と成果

本研究グループは、細胞培養時に培地に加える増殖因子の中から EGF/EGFR（上皮成長因子/上皮成長因子受容体）シグナル経路（※6）に着目しました。それぞれの培養細胞の挙動をオプティカルフローアルゴリズムで解析した結果、EGF を添加した細胞では添加していない細胞に比べて、有意な運動能/増殖能の亢進が認められ（明らかに細胞の動きが速く、かつ細胞数が増加した）、EGFR 阻害剤を添加するとこれらは有意に低下しました。加えて、EGF/EGFR シグナル経路の下流に位置する分子の阻害剤を用いて解析した結果、Src/PI3K/Akt/mTOR という分子が口腔粘膜角化細胞の細胞運動能と増殖能を制御していることが明らかになりました。

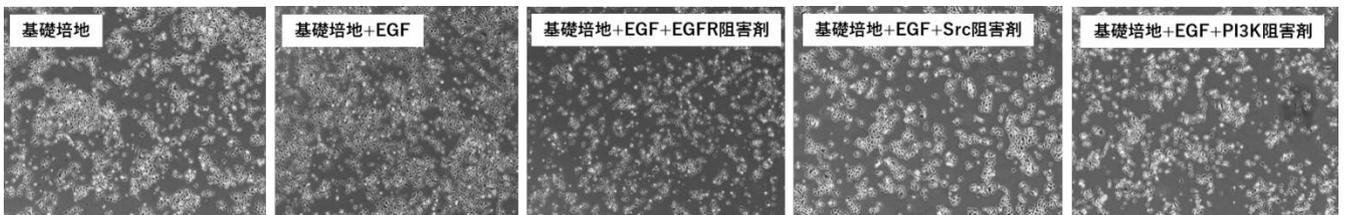


図1 同じ細胞密度でタイムラプス撮影を開始しています。EGF を添加すると基礎培地よりも細胞増殖が促進され、各種阻害剤添加すると、基礎培地よりも細胞増殖が抑制されていることがわかります。

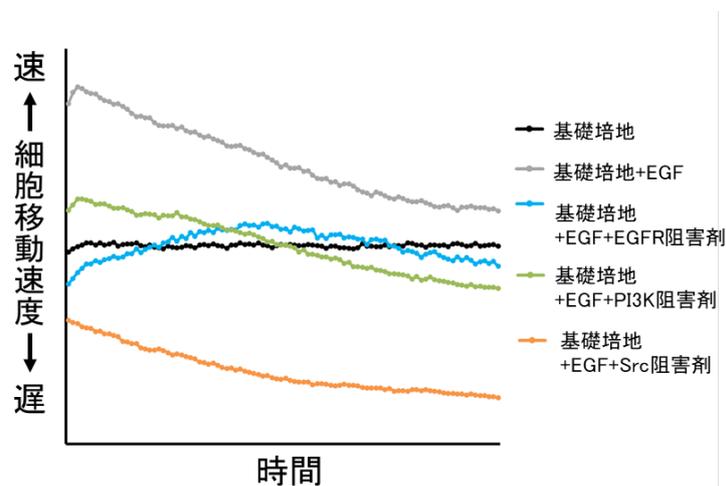


図2 オプティカルフローアルゴリズムで運動能を測定すると、EGF 添加で基礎培地よりも移動速度が上昇、各種阻害添加で移動速度が低下していることがわかります。

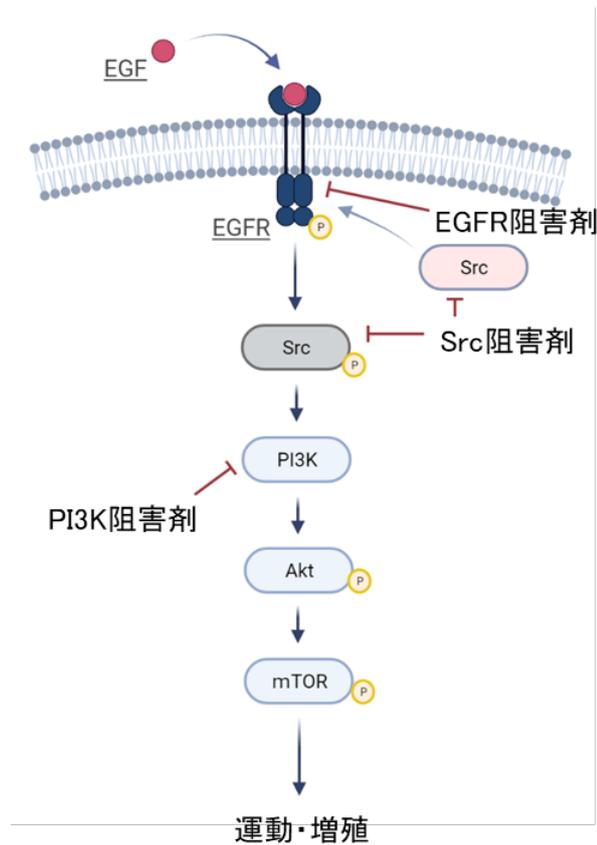


図3 口腔粘膜上皮角化細胞の運動能/増殖能を制御する分子と経路

III. 今後の展開

本研究が明らかにした口腔粘膜上皮角化細胞の運動と増殖のメカニズムは、患者さんから採取した小さな口腔粘膜組織から、大量かつ効率的に細胞を増やす技術の開発に寄与することが期待されます。また、患者さんにとって手術までの期間が短縮されると同時に、細胞培養期間短縮によるコスト削減や再生医療が抱える医療経済学に対する貢献度が大きいと考えられます。今後、さらに特異的な分子を解明することができれば、大量培養技術にとどまらず、将来的に口腔粘膜創傷治療の薬理的な操作のターゲットとなる可能性も期待できます。

IV. 研究成果の公表

本研究成果は、2023年6月4日、科学誌「FEBS Open Bio」に掲載されました。

論文タイトル：The EGF/EGFR axis and its downstream signaling pathways regulate cultured oral keratinocyte motility and proliferation

著者：小林亮太、干川絵美、佐藤大祐、Suebsamarn Orakarn、内藤絵里子、鈴木絢子、石原誠一郎、芳賀永、富原圭、泉健次

doi: 10.1002/2211-5463.13653

V. 謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業（17H04398、20H03870）の支援を受けて実施されました。

【用語解説】

※1 口腔粘膜上皮角化細胞

口の中の粘膜や歯ぐきを覆っている、一番表層にある細胞。皮膚に例えると「皮がむけた」時の“皮”にあたる細胞。

※2 細胞シート

温度感受性培養皿上で培養した細胞が増殖し、培養皿表面に充満した後、培養皿の温度を 37 度から 20 度に低下するだけで回収することができるシート状の培養細胞を指す。この細胞シートは患者の創面へ縫うことなく、そのまま貼り付けて移植可能である。自家口腔粘膜上皮角化細胞シートは商品化されたものも存在し、角膜移植による視力の回復や、食道の内視鏡的粘膜下層剥離術後の狭窄予防に臨床応用されている。

※3 初代培養

生体組織から切り取られ、生体外で培養された細胞。生きた細胞が培養皿に接着し、最終的に培養皿全体を覆うくらいに増殖するまで、長い時間を要する。

※4 オプティカルフローアルゴリズム

2 枚の連続する画像間で、1 枚目の画像を構成する多数の（あるいはすべての）点が 2 枚目の画像においてどこに移動したかを推定する画像解析技術。オプティカルフローは物体の動きを 2 次元のベクトル上で示し、矢印の長さから移動速度がわかる（矢印の向きが移動の方向、矢印の長さが移動の速さに対応）。コンピュータービジョンでは昔から研究されており、物体追跡や動きの推定など多くの分野で応用されている汎用性の高い方法。

※5 ラベルフリー

培養細胞を生きている状態で顕微鏡観察する方法として（1）何らかの試薬を用いて細胞を“染色（ラベル）”して、細胞や細胞の一部をより見やすくしてから行う方法と、（2）何もせずそのまま観察する方法の 2 種類存在します。ラベルフリーとは（2）の方法で、試薬を使っていないため、その後患者さんに移植することができます。一方、（1）の方法で観察した細胞は患者さんへの移植には使えません。

※6 EGF/EGFR（上皮成長因子/上皮成長因子受容体）シグナル経路

細胞増殖、生存、移動など、上皮細胞のいくつかの重要な生物学的事象に重要な役割を果たしていると考えられる経路。

本件に関するお問い合わせ先

【研究に関すること】

新潟大学大学院医歯学総合研究科（歯学系）生体組織再生工学分野

教授 泉 健次（いずみ けんじ）

Tel：025-227-2850

E-mail：izumik@dent.niigata-u.ac.jp

北海道大学大学院先端生命科学研究院

先端融合科学研究部門細胞ダイナミクス科学分野

教授 芳賀 永（はが ひさし）

Tel：011-706-4909

E-mail：haga@sci.hokudai.ac.jp

【広報担当】

新潟大学広報事務室

Tel：025-262-7000

E-mail：pr-office@adm.niigata-u.ac.jp

北海道大学社会共創部広報課広報・渉外担当

Tel：011-706-2610

E-mail：jp-press@general.hokudai.ac.jp