

学位研究紹介

培養複合口腔粘膜における血管内皮細胞 成長因子の発現について The expression of vascular endothelial growth factor in oral mucosa equivalents

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
顎顔面再建学講座 組織再建口腔外科学分野

中西 義崇

Divisions of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial
Region, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Course for Oral Life science, Niigata University Graduate School
of Medical and Dental Sciences
Yoshitaka Nakanishi

【目 的】

培養複合口腔粘膜 (EVPOME) は、患者自身の口腔粘膜上皮細胞とヒト新鮮屍体真皮である AlloDerm から構成される生体材料である。本材料は、血清および feeder layer を用いない培養システムで作製されるため外来感染等の危険がなく、臨床応用するにあたり安全な粘膜代替材料であり、また scaffold として AlloDerm を使用しているため、手術に用いる際の強度や操作性が向上するなどの利点がある。

この EVPOME を SCID マウス皮下へ移植した実験では、上皮層のない AlloDerm のみの移植群に比べ移植後早期に、より多くの血管が形成されることが報告されている。この現象には EVPOME 上皮からさまざまな成長因子が放出され、血管新生促進に関与していると考えられるが、分子レベルでの解明はされていない。

そこで本研究では、強力な血管新生因子の一つである VEGF に注目し、EVPOME の VEGF mRNA とタンパクの局在および培養上清中への VEGF 放出量を調査し、さらに EVPOME から産生される VEGF がヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) に及ぼす増殖活性について検討した。

【方 法】

採取した健常ヒト歯肉から口腔粘膜上皮細胞を単離し、カルシウム濃度 0.06mM ケラチノサイト培養液

EpiLife を用いて無血清、no feeder layer 培養システムでケラチノサイトを培養、増殖したケラチノサイトを回収し、AlloDerm 上に細胞を播種後、カルシウム濃度 1.2mM EpiLife で 4 日間液相培養、その後気相液層培養を行って EVPOME を作製した。

作製した EVPOME は H-E 染色、ISH 法および免疫組織化学的染色を行い、組織像と VEGF mRNA および VEGF タンパクの局在を調査した。

また、EVPOME から培養上清中に放出された VEGF 量を ELISA 法で測定し、その培養上清を用いて HMVEC 培養を行い、EVPOME から放出された VEGF が HMVEC に与える影響について検討した。

【結 果】

3 次元培養中の EVPOME は上皮が重層化し、そ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。また培養上清中に放出された VEGF 量は、上皮の重層化と比例して増加し、3 次元培養 6 ~ 8 日目 が最大となった。さらに、EVPOME の培養上清を用いて HMVEC を培養したところ、HMVEC 基礎培地使用时と比較して約 3 ~ 5 倍の増殖活性を認めたと、この HMVEC に対する増殖活性は抗 VEGF 抗体を加えることでほぼ抑制された。

【考 察】

EVPOME を組織学的に観察したところ、EVPOME の粘膜上皮層には VEGF の mRNA およびタンパクが培養期間中常時発現し、培養上清中には EVPOME で産生された VEGF が恒常的に放出されており、その放出量は EVPOME の上皮化の亢進に伴い増加していくのが確認された。

さらに VEGF が放出された培養上清は、血管内皮細胞の増殖を促進し、培養上清に抗 VEGF 抗体を用いた場合ではその増殖は抑制されることから、EVPOME から放出された VEGF が血管内皮細胞の増殖活性を促進すると考えられた。

以上より、SCID マウス皮下への EVPOME 移植実験で観察された血管新生は、EVPOME より産生、放出される VEGF が多大に関与して血管内皮細胞の増殖活性を促進させて引き起こされていることが示唆された。さらに移植後の母床から粘膜下への早期の血管新生は、EVPOME の生着と培養細胞自身の生存にも寄与し、創

傷治癒を促すと考えられた。

【文 献】

Izumi K, Terashi H, Marcelo CL, Feinberg SE.
Evaluation of transplanted tissue-engineered oral

mucosa equivalents in severe combined immunodeficient mice. *Tissue Eng* 2003; 9: 163-174.
Izumi K, Feinberg SE, Ida A, Yoshizawa M. Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 32: 188-197, 2003.