

令和元年5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19745

研究課題名（和文）口唇裂の胎児治療を目指した帯状再生組織によるマウス胎仔口唇欠損の修復と融合の検証

研究課題名（英文）Validation of scarless healing and fusion of the fetal mouse cleft lip like defect by administrating the Bandage-type engineered tissue achieving fetal treatment for the patient with a cleft lip.

研究代表者

星 和人（Hoshi, Kazuto）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30344451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：C57BL/6系統マウスの胎齢16.5において外科的口唇裂モデル作製法を確立した。種々の検討を行い、外科的に不全唇裂様の欠損を高い再現性をもって作製するためには、少なくとも幅1mm、長さ2mmの組織欠損が必要であることがわかった。また欠損を加えた後、少なくとも48h以上経過すると創断端が上皮化し、自然発生不全唇裂に類似した組織像を呈することを見出した。またICR系統マウスの羊水由来細胞を培養し、遺伝子発現および表面マーカーの解析を行って幹細胞特性を評価した後、帯状再生組織の作製および投与を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇裂の新規治療法として胎児治療法が現実味を帯びつつあるが、臨床応用の前段階として実験動物における種々の条件検討が必要である。これまで山羊や霊長類等の妊娠期間の長い大型哺乳類においては外科的口唇裂モデルが報告されているが、マウスではない。マウスはヒトと遺伝子の相同性が高く、遺伝的背景が詳細に研究されており、入手しやすいため、さらなる研究の促進に有用である。ヒトにおける口唇裂の胎児治療が実現すれば、口輪筋の再建により、自然な咀嚼・嚥下機能を獲得することが出来る。既存の標準的治療法から口唇形成術を省略することで、生涯消えない瘢痕の醜形を大幅に軽減し、患者を精神的苦痛から解放することができる。

研究成果の概要（英文）：We have established surgically induced cleft lip-like defect in a C57BL/6 strain fetus at the embryonic day 16.5 which achieving high reproducibility and histologically similar to the spontaneous cleft lip fetus.

We have found that to induce defect at least 1mm width × 2mm length upper lip defect must be needed.

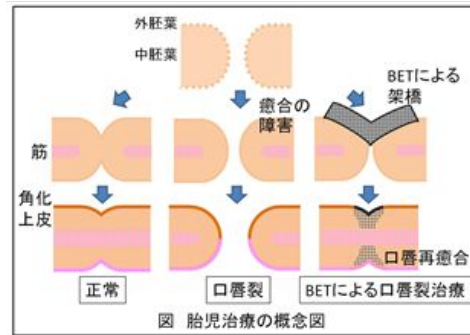
Also, we have tried to transplant three-dimensional regenerative tissue originated from mesenchymal stem cell from mouse amniotic fluid.

研究分野：軟骨・骨代謝

キーワード：口唇口蓋裂 口唇裂 スカーレスヒーリング 幹細胞治療 胎児治療 帯状再生組織 羊水幹細胞 創傷治療

1. 研究開始当初の背景

口唇は、胎芽期（胎生7週ころ）に上顎突起と内側鼻突起とが癒合することによって形成される。この時期の上皮は細胞一層で、角化もなく、上皮の消失と同期して速やかに癒合が起こる。この癒合が何らかの原因で障害されると口唇口蓋裂、特に口唇裂が生じる。本研究は、角化があまり進行していない胎生期においては、上皮組織は癒合しやすく、欠損部を表皮や真皮、脂肪、筋肉などに分化しうる幹細胞あるいは外胚葉系・中胚葉系の帯状再生組織 bandage-type engineered tissue、BET で架橋すれば再癒合が起こるとする仮説に基づく（図 胎児治療の概念図）。角化が進んでいない胎生期であれば、癒合の契機となる上皮の吸収が進行する環境が整えやすい。また、幹細胞や前駆細胞は組織へ統合されやすいため、免疫寛容性が高い胎生期であれば、比較的単純な構造の再生組織 BET で、移植細胞の統合と外・中2胚葉系の修復が極めて円滑に進むと思われる。さらに、このような出生前の処置により、癒合も少なく済み、また、出生後の2次変形も予防できる。このような口唇裂に対する再生組織による胎児治療は、理想的な口唇口蓋裂治療を実現する可能性が高く、挑戦的研究を立ち上げ知見を積み重ねてゆく意義は極めて大きい。



2. 研究の目的

口唇口蓋裂は、本邦において頻度が高い先天性顔面形態異常であり、上唇や上顎の歯茎、口蓋（口の天井の部分）に生まれつき披裂が生じる病気である。多彩な表情を作り、個性や人格を彩る顔面の中央部分に、披裂や術後の癒合、2次変形などが生じるため、機能的障害や患者や家族への精神的負担は、極めて重大である。出生後3か月頃に口唇形成術、1歳前後に口蓋形成術、5～9歳で顎裂（歯茎の披裂）骨移植を行う。言語管理、歯科矯正治療が必要であり、思春期以降に上下顎骨切り術あるいは唇裂鼻2次修正術を行うなど、複数回の手術や多くの集学的治療が必要となり、肉体的、精神的、経済的負担は大きい。

出生前超音波診断技術の発達により、妊娠25週前後には診断できるといわれているものの、予防法や根本的な治療はないため、出生前にできることは親へのカウンセリングと将来の治療体制の検討のみである。出生時に親が感じる重大な精神的ストレスは想像を絶するものがある。また、披裂により上唇や上顎の歯茎、口蓋に連続性が絶たれることにより出生後や成長中に2次的変形を来し、多感な成長期や思春期に形態異常や変形が悪化することも同疾患の治療を困難にさせる一因となっている。

したがって、この治療を披裂が生じる胎生期に治療できれば、出生時の精神的な負担やその後の2次変形を劇的に改善させることができると期待される。また、手術月齢が低いほど手術癒合は減少すると言われており、出生前に修復を行えば、stigma（キリストの聖痕）にも喩えられ、一生消えることのない顔面癒合を回避（スカレス・ヒーリング）でき、口唇口蓋裂の根本的な治療に繋がると考えられる。

近年、胎児手術の成功例が散見されるようになった。双胎間輸血症候群に対する胎児鏡下胎盤吻合血管レーザー凝固術や胎児胸水に対する胎児胸腔羊水腔シャント術は、本邦においては高度先進医療として実施されている。胎児に対する低侵襲手術およびその麻酔技術が確立されつつある現況において、今日の再生組織作製技術と、元来備わっている胎生期の組織可塑性が加わり、これら3つの要素が融合すれば、これまで実施できなかった口唇口蓋裂の出生前治療が可能となると思われる。

3. 研究の方法

(1) 外科的口唇裂の作製

C57BL/6J マウス胎齢 E16.5 時に開腹・開子宮下で胎仔の左側上口唇に幅 1 mm × 深さ 2 mm の矩形の組織欠損を加えた。24h 経過後の E17.5 時に再度子宮に侵入し、胎仔を回収し 4%PFA を用いて固定。母獣は麻酔下で放血し安楽死させた。胎仔を固定後、パラフィン包埋切片を作製、HE 染色、PSR 染色・MT 染色等の特殊染色、CKT5・IVL 等の免疫組織学的評価を行った。また PSR 染色に関しては偏光下で観察、HE 染色に関しては 3 μm 厚で連続切片を作製し切除断端の評価および積層立体構築による 3 次元的评价を行った。

(2) 羊水由来細胞培養

ICR マウス胎齢 E14.5 時に開腹・開子宮し羊水を回収。1500rpm、室温で5分間遠心した後、上清を吸引除去。AmnioMAX 培地で希釈し細胞数を計測。約 300 万細胞/cm² の濃度で播種し初代培養を行った。約 6 万細胞/cm² の濃度で継代を行い、P3 時に PCR・realtimePCR による遺伝子発現解析および各種 MSC 表面マーカーを用いた FACS による解析、幹細胞特性を評価した。

4. 研究成果

外科的に組織欠損を加えた部位に一致し、不全唇裂様の表現型に類似した裂を認め、現状では対象群の 80~90%に同様の所見が見られた。裂は本来内側鼻突起と上顎突起が癒合する部位に一致して走行し、上端は鼻孔に達していた(Fig.1)。裂側は組織学的に口唇の連続性が絶たれており、健側と比較し組織のボリュームが少なく、口唇の栄養動脈の切断による影響が考えられた。このことにより口唇は左右非対称となっており、不全唇裂様の表現型を呈していた。切除断端には基底細胞層様のヘマトキシリン好性の細胞の集積を認めるものの、核の小さな類円形の炎症細胞の浸潤は見られなかった。また PSR 染色の偏光観察により、コラーゲン線維の配列・走行に異常のないことを確認し、上皮の修復のみならず、上皮下の真皮層に関しても癒痕形成を伴わない組織修復形態、すなわち既報のスカーレスヒーリングと考えられる組織所見を認めた。この現象を利用し、自然発生日唇裂様の表現型を炎症反応を伴うことなく作製することが出来た(Fig.2)。

切除断端全域において上皮化および炎症反応のないことを確認するために下端から上端までおよそ 100 枚の連続切片を作製し、さらにこれらを 3次元構築した。その結果、断端全域で上皮化が見られ、炎症細胞浸潤のないことが確認できた(Fig.3)。

Bandage-type engineered tissue : BET(帯状再生組織)の移植のための予備検討として、ICR マウス胎齢 14.5 時に羊水を採取し、MSC 用細胞の培養に成功した。既報では単層接着培養するといわれているが、本研究では継代を重ねることに低接着性となり、単層培養にも関わらず、自然にスフェロイドを形成する所見が認められた(Fig.4)。ES 細胞に類似したスフェロイド形成および細胞増殖様式を示し、現在その幹細胞特性について遺伝子発現および表面抗原等について解析中である。移植に適した 3次元培養組織作製法確立のための端緒として重要な知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

Fujihara Yuko, Kikuta Shu, Sugiyama Madoka, Kubota Keigo, Ishibashi Makiko, Igarashi Masaki, Saijo Hideto, Hoshi Kazuto, A case of cleft lip and palate associated with unilateral choanal atresia, Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 査読有, vol.30(6), 2018, pp.538-541
<https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.06.007>

Sugiyama Madoka, Nakatsuka Takashi, Saijo Hideto, Fujihara Yuko, Kanno Yuki, Hikita Atsuhiko, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto, Clinical Findings of a Cantilever Iliac Bone Graft for Secondary Correction of Cleft Lip-Nose Deformities, Journal of Craniofacial Surgery, 査読有, vol29(3), 2018, pp.741-746
 DOI : 10.1097/SCS.0000000000004070

Inaki Ryoko, Fujihara Yuko, Kudo Akira, Misawa Masaki, Hikita Atsuhiko, Takato Tsuyoshi, Hoshi Kazuto, Periostin contributes to the maturation and shape retention of tissue-engineered cartilage, Scientific Reports, 査読有, vol8(1), 2018, 11210
 DOI : 10.1038/s41598-018-29228-6

Hoshi Kazuto, Fujihara Yuko, Yamawaki Takanori, Harai Motohiro, Asawa Yukiyo, Hikita Atsuhiko, Biological aspects of tissue-engineered cartilage, Histochemistry and Cell Biology, 査読有, vol149(4), 2018, pp.375-381
 DOI : 10.1007/s00418-018-1652-2

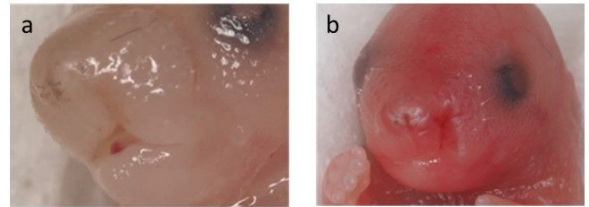


Fig.1 マウス胎仔唇裂モデル a.左側面 b.左斜め45度

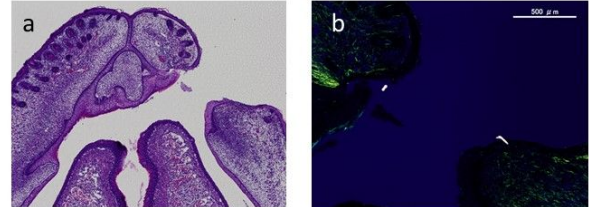


Fig.2 唇裂部の組織所見 a.HE染色 b.PSR染色偏光下

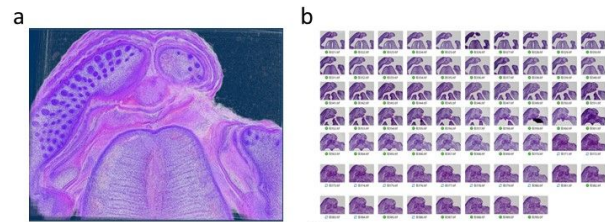


Fig.3 HE染色-3次元構築画像

a.3次元構築画像 b.3µm連続切片×10

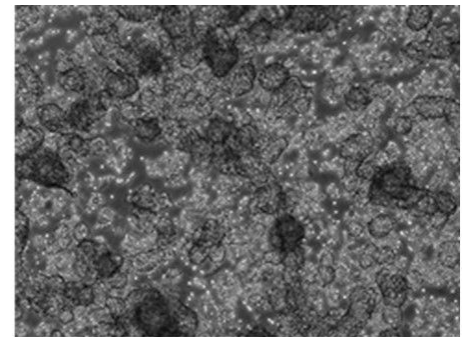


Fig.4 羊水由来細胞スフェロイド培養

Hoshi Kazuto, Fujihara Yuko, Saijo Hideto, Asawa Yukiyo, Nishizawa Satoru, Kanazawa Sanshiro, Uto Sakura, Inaki Ryoko, Matsuyama Mariko, Sakamoto Tomoaki, Watanabe Makoto, Sugiyama Madoka, Yonenaga Kazumichi, Hikita Atsuhiko, Takato Tsuyoshi, Implant-type Tissue-engineered Cartilage for Secondary Correction of Cleft Lip-nose Patients: An Exploratory First-in-human Trial, 査読有、vol7(3)、2017、pp.315
DOI : 10.4172/2167-0870.1000315

Harata Mikako, Watanabe Makoto, Nagata Satoru, Ko Edward Chengchuan, Ohba Shinsuke, Takato Tsuyoshi, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto, Improving chondrocyte harvests with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) coated materials in the preparation for cartilage tissue engineering, Regenerative Therapy, 査読有、vol7、2017、pp.61 71
DOI : 10.1016/j.reth.2017.08.002

Hoshi Kazuto, Fujihara Yuko, Saijo Hideto, Kurabayashi Kumiko, Suenaga Hideyuki, Asawa Yukiyo, Nishizawa Satoru, Kanazawa Sanshiro, Uto Sakura, Inaki Ryoko, Matsuyama Mariko, Sakamoto Tomoaki, Watanabe Makoto, Sugiyama Madoka, Yonenaga Kazumichi, Hikita Atsuhiko, Takato Tsuyoshi, Three-dimensional changes of noses after transplantation of implant-type tissue-engineered cartilage for secondary correction of cleft lip-nose patients, Regenerative Therapy, 査読有、vol7、pp.72-79
DOI : 10.1016/j.reth.2017.09.001

[学会発表](計9件)

星 和人、Tissue-engineered autologous cartilage for cleft lip-nose patients、5th TERMIS World Congress (国際学会)、2018

星 和人、Three-dimensional tissue-engineered cartilage for the secondary repair of cleft lip-nose deformity、13th Asian Congress of Oral & Maxillofacial Surgery TAIPEI 2018 (国際学会)、2018

正田 温彦、13th Asian Congress of Oral & Maxillofacial Surgery TAIPEI 2018 (国際学会)、Frontiers 2018 Symposium、2018

星 和人、ティッシュ・エンジニアリングが拓く新しい骨・軟骨再建、東京大学医学部附属病院 先端医療シーズ開発フォーラム 2018、2018

星 和人、インプラント型再生軟骨の治験から見たティッシュ・エンジニアリングの新しい可能性、17 回日本再生医療学会総会 ランチョンセミナー、2018

星 和人、インプラント型再生軟骨の製造販売承認に向けたこれまでの動きと今後の展開、第 18 回日本再生医療学会総会 共催セミナー、2018

星 和人、3次元組織構築を基盤とした骨・軟骨再生医療技術、第 18 回日本再生医療学会総会 シンポジウム、2018

星 和人、インプラント型再生軟骨を用いた顎顔面治療、第 18 回日本再生医療学会総会 シンポジウム、2018

星 和人、Tissue-engineered cartilage for the secondary repair of cleft lip-nose deformity、58th Congress of KAOMS (Korean Association of Oral & Maxillofacial Surgeons)、2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：西條 英人

ローマ字氏名：SAIJYO, Hideto

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80372390

研究分担者氏名：正田 温彦

ローマ字氏名：HIKITA, Atsuhiko

所属研究機関名：東京大学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

部局名：医学部附属病院

職名：特任准教授

研究者番号(8桁): 60443397

研究分担者氏名：西澤 悟

ローマ字氏名：NISHIZAWA, Satoru

所属研究機関名：東京大学

部局名：医学部附属病院

職名：特任助教

研究者番号(8桁): 00646200

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。