

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10163

研究課題名（和文）羊膜由来間葉系幹細胞オルガノイドを利用した口蓋裂治療法の検討

研究課題名（英文）Investigation of cleft palate treatment using amnion-derived mesenchymal stem cell organoids

研究代表者

倉林 くみ子 (Kurabayashi, Kumiko)

東京大学・医学部附属病院・届出研究員

研究者番号：40586757

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：口蓋裂症例に対する治療は、口蓋形成術を選択する機関が多く、良好な効果が得られている。しかし、口蓋形成術では術後の瘢痕収縮などから惹起される上顎劣成長などの長期的な問題が多く、次世代の口蓋裂治療方法の開発は喫緊の課題である。近年、オルガノイドを始めとする3次元培養技術が進歩し、より自然な生理条件に近い組織再生を可能とする3次元モデル構築への道が開いてきている。本研究では、羊膜由来上皮幹細胞をソースとして歯科印象採得にて作成したモールドを元にin vitroにて上皮-間葉相互作用を利用した3次元オルガノイドを作製し、充填・閉創することにより、より生理的組織に近い口蓋形成を目指すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、臨床での口唇口蓋裂治療に応用できないかと考え、口蓋裂隙に充填するオルガノイドを作製し、特に従来の手術療法では回避できない、瘢痕収縮による上顎劣成長、骨露出などの問題点を改善できないかと考えた。

申請者はこれまで口唇口蓋裂に伴う鼻変形治療に対するインプラント型再生軟骨の開発と臨床応用に成功したグループにて再生軟骨の研究に従事しており、特に過去の研究でハイドロゲルと成長因子の組み合わせによる徐放効果を利用した体細胞増殖法を確立している、ハイドロゲルを用いたサイトカインのデリバリーシステムを構築する技術を有している。本研究の遂行により、口唇口蓋裂治療に飛躍的な発展を寄与するものと考えた。

研究成果の概要（英文）：Many institutions choose palatoplasty as a treatment for cleft palate cases, and good results have been obtained. However, palatoplasty has many long-term problems such as maxillary undergrowth caused by postoperative scar contraction, etc., and the development of next-generation cleft palate treatment methods is an urgent issue. In recent years, progress has been made in three-dimensional culture technology including organoids, opening the way to construction of three-dimensional models that enable tissue regeneration closer to natural physiological conditions. In this study, we used amniotic membrane-derived epithelial stem cells as a source and created three-dimensional organoids in vitro using epithelial-mesenchymal interactions based on dental impression-taking molds. , aims at palatal formation closer to physiological tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：オルガノイド 羊膜上皮幹細胞 口蓋裂

## 1. 研究開始当初の背景

昨今、口唇口蓋裂患者を対象とした再生医療の臨床研究が加速度的に行われている。再生医療では、第一世代として、幹細胞移入療法が進められており、多くの疾患に対して臨床研究が進んでいる [Broekers et al. Science 2005]。第二世代として、人工担体と細胞を組み合わせた組織形成技術が発達し再生軟骨 [Hoshi K, et al. J Clin Trials 2017] [Hoshi K, et al. Regenerative Therapy 2017] などの臨床応用が上市されている。さらなる次世代再生医療として、細胞シートやオルガノイドを用いた器官単位で再生する器官再生医療が期待され始めている。これは細胞が臓器特異的機能を発揮するために必要な一定の多細胞構造を *in vitro* で再構築し、対象部位に移植するものである。器官原基法 [Nakao K et al. Nature Methods 2007]、また胎仔期の上皮性間葉性幹細胞を共培養し、その細胞間相互作用による器官誘導能を利用し、歯 [Ikeda et al. PNAS 2009] や毛根 [Toyoshima et al. Nature Commun 2012]、唾液腺 [Ogawa et al. Nature Commun 2013]、涙腺 [Hirayama et al. Nature Commun 2013] の再生に成功した。その後 ES 細胞にアクチビン、bFGF を添加し内胚葉を、BMP7 添加で中胚葉を、P38MAPK 阻害薬 SB203580 の添加にて神経外胚葉系を分化させ、三胚葉同時期に分化誘導される培養系も発表された [Nobuaki S, et al. Biochem Biophys Res Commun]。Ips 細胞ではレチノイン酸の投与により外胚葉と内胚葉分化が誘導され、また CHIR99021 および cyclopamine の添加により中胚葉に分化する [Zujur, et al. Sci. Adv. 2017]。これまでヒト ips 細胞に複数の分化・増殖因子を段階的に添加することにより、小腸様組織を分化誘導していた [Spence JR, et al. Nature 2011] のに対し、外部から段階的に増殖因子を添加することなく、ips から集合体である胚様体 EB を経て外胚葉オルガノイドを培養液中 (EGF, Noggin, R-spondin 添加) にて培養する CDB 法をに成功した [Takagi R, et al. Sci Adv. 2016]。また長期培養によって、各々成熟した組織へ分化する性質を認めた。これらの先行研究から最終的には ES 細胞を培養皿の蓋につる下 hanging drop 法にて、成長因子を添加することなく三胚葉系すべて細胞で構造される管腔構造 *i-gut* の作製 [Keller et al. Curr Opin Cell Bio 1995]、また、肝オルガノイドの作成 [Takebe T, et al. Nature 2013] に成功する段階まで発展してきている。

このような背景から申請者らは、口蓋裂隙に充填するオルガノイドを作製し、臨床での口唇口蓋裂治療に応用できないかと考えた。臨床現場では実際に口唇口蓋裂患者の問題点を具体的に目の当たりにしている。特に従来の手術療法では回避できない、瘢痕収縮による上顎劣成長、骨露出などの問題点を可能な限り解消する事ができれば、患者の肉体的、心理的、経済的負担を大幅に減らすものと思われる。

申請者はこれまで口唇口蓋裂に伴う鼻変形治療に対するインプラント型再生軟骨の開発と臨床応用に成功したグループにて再生軟骨の研究に従事しており [Hoshi K, et al. J Clin Trials 2017]。特に申請者は過去の研究でハイドロゲルと成長因子の組み合わせによる徐放効果を利用した体細胞増殖法を確立している [Iwata K, Takato T, Hoshi K. 2012 Biomaterials] ため、ハイドロゲルを用いたサイトカインのデリバリーシステムを構築する技術を有している。

本研究の遂行により、口唇口蓋裂治療に飛躍的な発展を寄与するものと考えた。

## 2. 研究の目的

口唇口蓋裂疾患に対する再生治療法方法は、顎裂に対して MSC や臍帯血幹細胞を利用した若干の報告があるものの、確立された方法は構築されておらず、特に口蓋裂単独症例に関しては再生医療研はほとんど皆無である。口蓋裂再生治療を困難とする理由として、一つには経時的に裂隙の形態・ボリュームが変化することにあるだろう。申請者らは、確立された唇顎口蓋裂の手術療法とこれまでに培ってきた再生医療研究の融合的・総合的治療として、従来にはなかった、より正常組織に近い安全でかつ有効な飛躍的な口蓋裂治療法を実現できるのではないかと考えた。

歯科印象採得の要領で口蓋裂隙の形態を付与した三次元的オルガノイドを *in vitro*

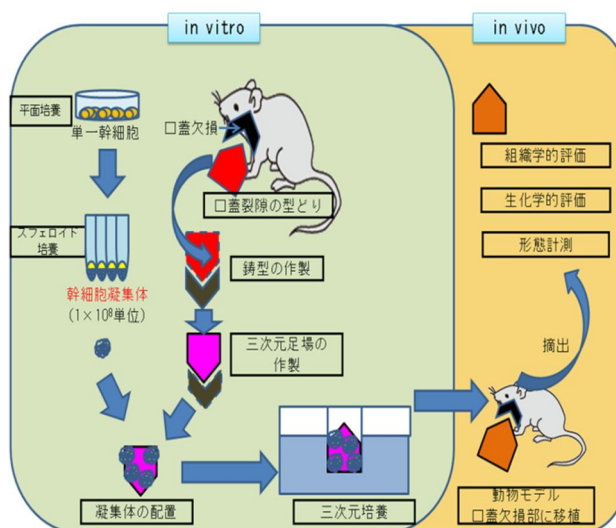
にて作製し、術部に填入・閉鎖することにより、従来の手術療法（口蓋形成術）では達成し得なかった、理想的な口蓋形成を目指した。

また細胞ソースとしては、羊膜由来幹細胞の外胚葉組織への分化作用を利用し、安全で有効な細胞治療が期待できると考えた。ヒト羊膜幹細胞は ES 細胞様の特性を持ち、Nanog、Oct-4、Sox-2 を発現しており、外胚葉、内胚葉、中胚葉への分化作用があり。最近、羊膜は再生医療法の新たな細胞供給源として、着目されている。羊膜は、胎児を形成する胚盤葉上層に由来する羊膜上皮、および胚外中胚葉の一部から構成されており、多能性幹細胞が含まれている可能性があると考えられている。また羊膜細胞は、たとえ移植時に HLA の一致が不十分な場合でも、レシピエントの免疫反応が比較的穏やかで、拒絶されにくく、また、MSC に比べ増殖活性が高いことが報告されている [Hass R Cell Commun Signal 2011]。

具体的には、モデルラットの口蓋に粘膜欠損を作製し口蓋裂に見立てて AMSC 口蓋オルガノイド再生を行う。AMSC は初めにペレット培養、旋回培養、吊り下げ培養等にて凝集体を作製しアテロコラーゲン等の足場素材にて包埋し、三次元培養する。

この際、AMSC の口腔内裂隙部への保持、また、AMSC を分化誘導する成長因子やサイトカインの持続的作用の必要がある。そこで歯科印象採得材料にて口蓋裂隙のモールドを作成し、それを鋳型にて石膏模型を作成し、さらにアテロコラーゲン等基材を用い細胞足場素材を用い口蓋裂隙レプリカを三次元的形状を保持したまま培養する。口蓋粘膜閉鎖術を施行することで AMSC の流出を最小限に抑え、裂隙部への保持とその後の再生組織構築が可能となると考えた。

図1：オルガノイド移植実験系



### 3. 研究の方法

1. ヒト羊膜由来上皮幹細胞の特性の同定、単離、培養、多分化能の検討
2. 羊膜由来上皮幹細胞による口蓋オルガノイドの作製
  - ・細胞培養の検討(至適播種密度、播種のタイミング、培養方法、培養期間の検討)
  - ・添加因子の検討(組み合わせ、至適濃度、添加時期の検討)
  - ・足場素材の検討(形態、硬さ、熱可塑性の検討)
3. 口蓋裂モデルを用いたオルガノイド型移植片の口蓋形成に関する検証
  - 免疫不全ラットの口蓋裂モデルを用いた移植実験および評価
  - ビーグル犬の口蓋裂モデルを用いた移植実験および評価。

### 4. 研究成果

#### 1. in vitro における AMSC の純化・培養法の確立

AMSC は東京大学医学部倫理審査委員会の承認のもと、同意の得られた帝王切開予定患者から採取する。胎児を帝王切開で娩出後、剪刀で卵膜を 5 cm 四方に切り、手動的に羊膜と絨毛膜に分ける。羊膜を collagenase 処理する。10% FBS を添加した MEM-alpha を用いて 15 cm noncoated dish に播種し、室温 37 °C・湿度 95%・5%二酸化炭素濃度下で培養を行う。細胞特性は flow cytometer (FACS Canto II, BD)を用いて解析した。

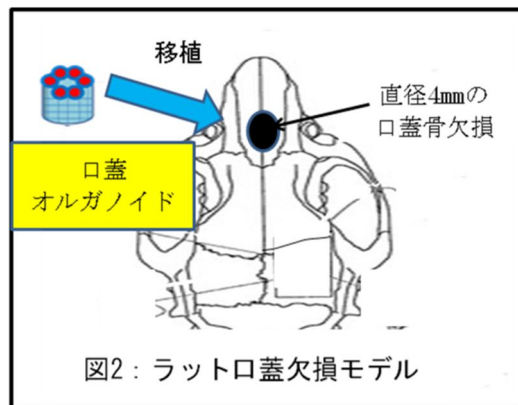
#### 2. AMSC によるオルガノイド型移植片の作製

平面培養にて細胞増殖後、三次元培養プレートにて培養にてスフェロイド様の AMSC 凝集体を多数作製する。この際、スフェロイド培養期間も検討する。口蓋裂裂隙レプリカタイプの足場素材を準備するために、歯科用印象材にて裂隙を型取り、石膏模型を作成する。模型を鋳型として、アテロコラーゲンを填入し、3次元

的口蓋裂隙と等しゲルを形成し、これを足場素材とする。これに先述の AMSC スフェロイドを 3 次元的に配置し、transwell lplate インサートに静置する。外側にはアクチビン、bFGF、BMP 7、P38MAPK 阻害薬 SB203580 添加した DMEM/F12 培養液を加え、三次元培養する。この際 AMSC の至適細胞濃度、スフェロイド培養期間、サイトカイン投与のタイミングや組み合わせ、至適サイトカイン濃度、を検証した。作製されたオルガノイドを口蓋裂開窓部に填入し閉鎖。

### 3. 口蓋裂モデルを用いたオルガノイド型移植片の口蓋粘膜上皮誘導能に関する検証 免疫不全ラットの口蓋裂モデルを用いた移植実験および評価。

生後 7 日齢雄性 SD 系ラットを用い、第一臼歯部の口蓋部粘膜を剥離し、直径 1mm の半球状にラウンドバーにて口蓋骨を削除し、口蓋裂に見立てた口蓋骨欠損モデルを確立する。前項にて作成した三次元オルガノイドを口蓋裂隙に挿入し、口蓋粘膜閉鎖術施行する。創閉鎖時、創閉鎖後 1 週間、1 か月で、創部の形態計測、吸啜圧の測定もおこなう。また、AMSC の局在、炎症性細胞および線維芽細胞の浸潤を組織学的、免疫組織学的に評価し、リアルタイム RT-PCR、western blotting にて IL1b, IL2, IL6, IL8, TNFa, MMP2, MMP8, MMP9、また肉芽形成・収縮の指標である COL1a1, TGFb, SMA を測定し、生化学的評価。



### ビーグル犬を用いた口蓋裂モデルを用いた移植実験および評価

3 か月齢の雌イヌを用い、左側上顎第三切歯を抜去し、歯槽から口蓋 10 mm 程度の裂隙を作製し、口蓋裂モデルとし、以下ラットモデルと同様に移植実験、評価する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------