

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19065

研究課題名（和文）多血小板血漿の間葉系幹細胞を介した筋衛星細胞増殖分化促進作用の解析

研究課題名（英文）Analysis of the promotion of mesenchymal stem cell-mediated muscle satellite cell proliferation and differentiation by multi-platelet plasma.

研究代表者

成田 理香（Narita, Rika）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90824590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000 円

研究成果の概要（和文）：2019年度には、骨髄間葉系幹細胞などの間葉系細胞を分離・培養し、血球成分を加えた培養の影響を検討した。2020年度には、分化能の評価と筋損傷モデルマウスの検討。2021年度には筋再生のgradingを行い、2022年度にはTNFなどのサイトカインの計測方法を確立し、PRP使用群と未使用群の比較を進めている。研究は、筋損傷治療に向けた有望な成果を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究は、骨髄幹細胞の利用により口唇口蓋裂治療に新たな可能性を開拓しています。組織再生や炎症抑制などのメカニズムを探ることで、治療の効果を向上させる道を拓きつつあります。その成果は、患者の生活の質の向上や医療技術の進歩に繋がり、口唇口蓋裂治療の分野における重要な貢献となるでしょう。

研究成果の概要（英文）：In FY 2019, we isolated multiple types of mesenchymal cells including bone marrow mesenchymal stem cells, added blood cell components, cultured and evaluated differentiation potential, and examined a mouse model of muscle injury. in FY 2020, we proceeded to evaluate differentiation potential and establish a mouse model of muscle injury, and in FY 2021, we graded muscle regeneration. In FY2022, we will establish a method to measure cytokines such as TNF and compare PRP-used and unused groups. These results indicate promising developments for the treatment of muscle damage

研究分野：口唇口蓋裂

キーワード：口唇口蓋裂 口蓋形成術 筋損傷

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

口蓋形成術では Push-back 法や Furlow 法をはじめこれまで多くの術式が報告されている (Timbang MR et al, Plast Reconstr Surg. 2014) が、基本的には粘膜弁を用いて、鼻腔側と口蓋側の粘膜を再建し、同時に可能な限り口蓋筋を再建する。口蓋筋のうち特に口蓋帆挙筋は軟口蓋を構成する主要な筋で、本来左右の筋が軟口蓋正中で癒合しているが、口蓋裂患者では左右に分離されている。そのため、口蓋形成時に左右の口蓋帆挙筋を縫合し軟口蓋を再建する。しかし、口蓋裂幅が広くて縫合部の緊張が強くなり、鼻腔側と口蓋側の間に死腔を生じるような場合や、下床の血流が悪い状況や感染創においては、筋線維は瘢痕組織となり、それらの条件が重なると、口蓋裂部に瘻孔を生じるだけでなく上顎全体の成長障害の原因となると考えられている。したがって、このような条件の悪い症例においても筋再生を促進する治療法の開発が求められている。

多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma; 以下 PRP) は血小板由来の PDGF, TGF- β , EGF, VEGF などの

多くのサイトカインを含み、筋、腱、軟骨あるいは骨の再生、および創傷治癒促進が報告されており、すでに多くの臨床実績がある。しかし、PRP は、血小板の濃縮率、白血球の有無、活性化の有無 (PAW 分類) により含有するサイトカインの種類も濃度も大きく異なることが知られている (DeLong JM et al, Arthroscopy. 2012)。サイトカインはそれぞれの濃度によって全く別の作用を有するものも多く、PRP の作用機序や治癒促進への寄与に関するメカニズムには不明な点が多い。これはそれぞれの疾患治療に最適な PRP を作製する上で大きな問題である。

筋肉は一度損傷を受けると、筋衛星細胞が増殖し、活性化した筋衛星細胞は損傷部へ遊走し筋再生を行うことが知られている。PRP はこの筋衛星細胞を活性化し、筋再生を促すという報告がある (Huang S et al, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010)。一方、特定条件での筋の再生時には筋の脂肪変性、骨変性、線維化を生じることがあるが、それら異常な組織は血小板由来成長因子受容体 α (PDGFR α) 陽性間葉系前駆細胞由来である可能性が示唆されている (Uezumi A et al, Nat Cell Biol. 2010)。しかし、一方では PDGFR α 陽性間葉系前駆細胞は筋衛星細胞を活性化し筋再生を促すことも知られている。PRP 投与は筋衛星細胞のみならず、この PDGFR α 陽性間葉系前駆細胞にも影響して筋再生を促進している可能性があるが、この細胞の多面的な働きにどのように影響するかはほとんど明らかになっていない。そのためこれらの細胞に対する PRP の詳細な機序を解明することで筋再生の促進と瘢痕形成の軽減についての知見が深まり、最適化した PRP を用いた効果的な治療法の確立につながる可能性がある (右図: Anuradha Natarajan et al, Cell Cycle. 2010 より引用)

2. 研究の目的

本研究の目的は、PRP が筋衛星細胞に対する直接作用のみならず、これまでほとんど注目されてこなかった PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を介した作用によっても筋再生を促進することを明らかにすることにある。マウス筋損傷モデルを用いた検討や、筋衛星細胞と PDGFR α 陽性間葉系幹細胞の共培養を行い、PRP の筋衛星細胞の増殖や筋細胞への分化に対する、直接、あるいは PDGFR α 陽性間葉系幹細胞を介した作用を検討することで、PRP の作用メカニズム (作用因子) を明らかにし、筋再生促進における最適な PRP 調整方法の確立につながる知見が得られると考えている。まず In vitro において、マウス組織よりフローサイトメトリーを用いて分取した筋衛星細胞や PDGFR α 陽性間葉系幹細胞に対して、様々な条件で作製した PRP を添加することで、PRP の作製法の最適化を行う。最適化した PRP と効果の少ない PRP の効果を筋損傷モデルマウスを用いて確認するとともに、プロテオームアレイを行いサイトカイン濃度の比較を行うことで、効果を発揮している候補因子の同定を行う。候補因子の阻害を in vitro 共存培養系や筋損傷モデルマウスにおいて行い、効果発現に関わる因子を同定する。そのために、具体的には以下の研究を研究期間内 (平成 31-33 年、3 年間) に行う。

3. 研究の方法

(1) in vitro における筋衛星細胞、PDGFR 陽性間葉系幹細胞共存培養における PRP の影響の評価

マウスの骨格筋から筋衛星細胞 (SM/C-2.6+) および PDGFR 陽性間葉系幹細胞 (CD13+, CD29+, CD34+, CD90+, Sca-1+ で CD31-, CD45-, CXCR4-, c-kit-, Integrin γ 7-) をセルソーターを用いて分取後それぞれを増殖培養する。別のマウスより血液を採取し、血小板の濃縮率、白血球の有無、活性化の有無などのパラメーターが異なる方法で PRP を作製する。それぞれの細胞の単独培養あるいは共存培養系に PRP を添加し、細胞増殖、筋、骨、軟骨、脂肪分化を遺伝子レベル、タンパクレベルで検討する。また、IL-1 あるいは TNF- α 等の炎症性サイトカ

インを添加した時の増殖、分化への影響と、さらに PRP を加えた時の効果を検討する。特に筋衛星細胞単独培養、共存培養時における PRP の効果の違いに着目する。

(2) 筋損傷モデルマウスの確立

マウスの両側腓腹筋を外科的にあるいは、蛇毒を用いて損傷させ筋損傷モデルを作成する。2 日目、7 日目、14 日目に組織を回収する。回収した組織を H.E 染色あるいは免疫染色し、筋再生、異所性脂肪沈着、線維化の程度を検討する。

(3) 筋再生に関する最適な PRP 作成条件の検討

(1)の検討において、もっとも筋衛星細胞単独培養で高い効果を示した方法で調製した PRP、共存培養で高い効果を示した方法で調製した PRP と、最も効果がなかった方法で調製した PRP を、(2)で作製した筋創傷モデルに投与する。(2)と同様に組織学的検討を行い、筋再生効果を比較し、in vitro での結果との関連について検討する。

(4) PRP に対するプロテオムアレイ

(3)と同様にマウスから PRP を単独培養あるいは共存培養で効果の高い方法、低い方法で作製し、プロテオムアレイ (Mouse XL Cytokine Array Kit、R&D 社)を用いてサイトカイン濃度を比較することで、筋衛星細胞の増殖、分化を直接あるいは PDGFR 陽性間葉系幹細胞を介して促進的している候補因子を同定する。

(5) 筋衛星細胞増殖分化促進因子の同定

(1)の共存培養系あるいは(3)の筋損傷モデルへの PRP 投与において、(4)で同定した候補因子に対する阻害剤を投与することで、筋衛星細胞の増殖、分化促進作用や、筋再生作用が阻害される分子を同定する。

4. 研究成果

2019 年度は、骨髄間葉系幹細胞を含む複数種の間葉系細胞を分離、培養した。また、血球成分を加えた培養を行い、その影響について検討した。さらに、これらの細胞を添加因子を含んだ培地で培養し、その分化能について評価した。加えて、筋損傷モデルマウスの確立に向けた検討を行った。筋衛星細胞増殖分化評価として、in vitro ならびに in vivo での TNF α などのサイトカインについて、計測をおこなった。特に、in vivo 評価方法については、周囲に漏出する体液をガーゼ用素材で経時的に吸収し、細切、溶解、遠心の後抽出し、ELISA で計測する方法を確立した。その結果、一定の検出が可能であることが確認された。今年度は、PRP 使用群と非使用群の比較検討を進めることを検討した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 西條英人、柏木美樹、成田理香	4. 巻 68
2. 論文標題 顎裂部骨移植と咬合管理(総説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 328-341
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.68.328	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 成田理香	4. 巻 27
2. 論文標題 【最新の口唇裂・口蓋裂の治療を理解し、小児歯科医としての関わりを考える】口唇裂・口蓋裂における機能再建を目的とした外科的治療(解説)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児歯科臨床	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 中村和貴、小松紀子、成田理香、久保田恵吾、西條英人、星和人	4. 巻 29
2. 論文標題 重度口腔粘膜炎が原因でペムプロリズマブによる加療の中止を余儀なくされた1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本有病者歯科医療学会雑誌	6. 最初と最後の頁 318-322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口 明紗子、西條 英人、福田 初、坂東 康太、柏木 美樹、成田 理香、星 和人	
2. 発表標題 両側唇顎裂患者に中間顎骨切りおよび骨移植を併用しインプラント埋入を行った1例	
3. 学会等名 日本顎顔面インプラント学会	
4. 発表年 2022年	

1．発表者名 清水 玲那，柏木 美樹，谷口 明紗子，成田 理香，坂東 康太，福田 初，西條 英人，星 和人
2．発表標題 唇顎口蓋裂患者にサイトランスグラニュールを併用しインプラント埋入を施行した1例
3．学会等名 日本顎顔面インプラント学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 川崎 秀斗，成田 理香，田中 里桜，榊原 安侑子，青木 絵里香，柏木 美樹，西條 英人，星 和人
2．発表標題 遺伝性球状赤血球症を有する唇顎口蓋裂患児に口蓋形成術を施行した1例
3．学会等名 日本小児口腔外科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 田中 里桜，柏木 美樹，成田 理香，青木 絵里香，榊原 安侑子，川崎 秀斗，西條 英人，星 和人
2．発表標題 心疾患,消化器疾患を合併した口唇口蓋裂児に対し嚴重な周術期管理を要した口唇形成術の1例
3．学会等名 日本小児口腔外科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 柏木 美樹，成田 理香，谷口 明紗子，平野 友紀子，高橋 路子，丸岡 亮，内野 夏子，岡安 麻里，末永 英之，大久保 和美，西條 英人，星 和人
2．発表標題 唇顎口蓋裂患者に対し顎裂部骨移植術と上顎骨切り術を同時に行った1例
3．学会等名 日本口蓋裂学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 成田理香
2．発表標題 若手口腔外科医のための顎裂部骨移植術における裂型別のポイント．
3．学会等名 日本口腔外科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 柏木美樹、成田理香、谷口 明紗子、内田 洋子、石橋 牧子、青木 絵里香、榊原 安侑子、成田 凜太郎、西條 英人、星 和人
2．発表標題 人工骨を併用しインプラント埋入術を行った唇顎口蓋裂患者への口腔ケア
3．学会等名 日本口腔ケア学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 成田 理香、西條 英人、青木 絵里香、柏木 美樹、久保田 恵吾、谷口 明紗子、丸岡 亮、内野 夏子、岡安 麻里、大久保 和美、星 和人
2．発表標題 Van der Woude症候群の下唇瘻孔に対し逆T型切除術を用いた治療経験
3．学会等名 日本口腔ケア学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 内野 夏子、大久保 和美、西條 英人、末永 英之、谷口 明紗子、成田 理香、岡安 麻里、丸岡 亮、宇賀 凜、松林 幸枝、星 和人
2．発表標題 口唇口蓋裂患者に対する顎矯正手術についての調査
3．学会等名 日本顎変形症学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 成田 理香，青木 絵里香，柏木 美樹，西條 英人，星 和人
2．発表標題 多数歯う蝕に罹患した両側唇顎口蓋裂患児に対して口蓋瘻孔閉鎖術を行った1例
3．学会等名 小児口腔外科学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 青木絵里香，成田 理香，西條 英人，星 和人
2．発表標題 東京大学医学部附属病院における救急外来口腔外科受診した小児患者の臨床的検討
3．学会等名 小児口腔外科学会
4．発表年 2021年

1．発表者名 岩田 歩，杉山 円，柏木 美樹，成田 理香，西條 英人，星 和人
2．発表標題 ハンディ・フードプロセッサの巨大な刃が貫通した舌外傷の1例
3．学会等名 日本口腔科学会
4．発表年 2020年

1．発表者名 内野 夏子，須佐美 隆史，大久保 和美，西條 英人，末永 英之，杉山 円，柏木 美樹，成田 理香，岡安 麻里，丸岡 亮，宇賀 凜，松林 幸枝，高橋 路子，平野 友起子，星 和人
2．発表標題 唇顎口蓋裂患者に用いる接着ブリッジ
3．学会等名 日本口蓋裂学会
4．発表年 2020年

1. 発表者名 青木 絵里香, 成田 理香, 中村 和貴, 石橋 牧子, 柏木 美樹, 小松 紀子, 藤原 夕子, 西條 英人 星 和人
2. 発表標題 口蓋裂を伴ったKniest 症候群に対する治療経験
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------