

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月19日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592223

研究課題名（和文） 唇顎口蓋裂患者における間葉系幹細胞を用いた再生治療の確立

研究課題名（英文） Basic research on regeneration medicine to cleft lip and/or palate patients using human mesenchymal stem cells.

研究代表者

山下 佳雄（YAMASHITA YOSHIO）

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：50322300

研究成果の概要（和文）：

唇顎口蓋裂患者の初回手術時に採取できる摘出標本から、患者自身の間葉系幹細胞を得ることができた。この幹細胞は骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などへ分化可能な多分化能を有した細胞であった。この細胞を用いることで骨、脂肪、軟骨といった手術時に必要となる組織を他部から採取する必要がなくなる可能性を得た。つまり患者本人の細胞を用いることで侵襲の少ない、しかも安全な治療法が可能となる。しかし問題点として、得られる幹細胞の確立が非常に低いこと、また骨髄幹細胞や歯髄幹細胞と比較して骨産生能がやや劣ることが判明した。

研究成果の概要（英文）：

We discovered the tiny population of undifferentiated cells in surgical specimens from patients with cleft lip and/or palate. They have potential to promote the regeneration. They can differentiate into osteoblasts, adipocyte and chondrocyte, like as bone marrow stem cells and dental pulp stem cells.

Our data demonstrate that the mesenchymal stem cells may provide therapeutic benefits for treating cleft lip and/or palate patients. Stem cell based therapy holds great promise for establishing such a multifaceted therapeutic strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：再生医学・間葉系幹細胞・口唇口蓋裂

## 1. 研究開始当初の背景

我々は唇顎口蓋裂患児の一貫した治療を開校以来、行ってきた。顎裂患児に対しては8歳～10歳の時期に2次的骨移植術が必要となるが現在、骨移植の材料としては自家骨(腸骨、オトガイ骨等)が用いられており、他部位への外科的侵襲が問題となっている。できるだけ侵襲の少ない治療法を開発する上で、新たな移植材料を模索している。

現在、再生医療の分野において最も注目されているES細胞やiPS細胞はその将来性は計り知れないものがある。しかしながら、実際の臨床応用に用いるには解決しなくてはならない課題が残っている。一方で間葉系幹細胞に関しては、すでに皮膚や骨で臨床応用されており、今後、ますます需要が多くなると考える。過去にわれわれは、医療廃棄物となっている抜去智歯の幼若歯髄より間葉系幹細胞を採取し、骨芽細胞へ分化誘導することに成功し、再生治療に応用できる可能性を報告してきた(山下、他 日口科誌 Vol.54 2005年)。しかしながら抜去する智歯を得ることができる年齢は顎裂骨移植時期より後期で利用は困難である。

## 2. 研究の目的

唇顎口蓋裂患者は数回に及ぶ手術が必要な症例が多い。これら患者に対して初回、口唇形成術の際、採取できる組織標本から各人の間葉系幹細胞を採取、保存し、将来的にこの幹細胞を必要な細胞へ分化誘導させ患部に用いる再生治療を目標としている。つまり唇顎口蓋裂患者に対する新たな低侵襲で安全な再生治療を確立するための基礎研究さらには臨床研究を行う。

一方で、骨再生医療において現在問題となっている点は、その骨質(骨密度)や治療期間であるが、骨産生能を上げ、短期間に骨性治癒を促すためには増殖因子が必要となる。われわれはこれまでの実験結果からIGF-1(Insulin-like growth factor 1)やシスタチンCが骨芽細胞の分化ならびに骨造成を誘導することを論文にして報告してきた(Danjo, A., et al. BBRC Vol. 360, 2007)。これら因子が皮膚粘膜より得られる間葉系幹細胞に同様に作用するかを検討するとともに、その他因子の関与を解明していく。本研究より得られる結

果から、既存もしくは新たな因子の関与が明らかとなれば、臨床的にも治療期間の短縮に結び付くと確信する。

## 3. 研究の方法

- ①手術標本から効率よく間葉系幹細胞を採取するため、細胞の同定を行った。
  - ・唇顎口蓋裂患者の初回手術時(口唇形成術)に採取できる組織片より我々は骨芽細胞や脂肪細胞に分化できる未分化な細胞の存在を確認した。この幹細胞を同定、分離するために、まず組織片から多分化能をもつ未分化な細胞株の樹立を目指した。樹立した未分化細胞株はクローニングを行い、再度個々のcell lineの分化能ならびに継代能を確認した。
  - ・得られた細胞株を種々の細胞表面分子に対するモノクロナール抗体を用い免疫染色した。細胞表面抗原の同定を行い、分離に有効な細胞表面マーカーの組み合わせを解析した。
- ②必要な時期まで凍結保存が必要であるが、細胞活性に変化ないか検討した。
  - ・凍結保存した細胞の増殖能、分化能を継代ごとに分析した。分化能に関しては特に骨分化関連遺伝子の発現を確認した。
- ③動物実験において実際の骨欠損部を修復できる能力があるか確認した。
  - ・実際に得られた幹細胞が生体内で骨産生が可能で骨欠損部を閉鎖する能力があるか、動物実験にて検証した。具体的にはヌードラットの頭蓋に骨欠損を人工的に作製し、樹立した幹細胞の骨産生能を検討した。
- ④これら幹細胞が効率よく各成熟細胞へ分化するのに必要なGrowth factorを検討した。
  - ・IGF-1やシスタチンCの投与により骨芽細胞の骨産生能を増加できることを確認しているが、必ずしも分化効率には十分でない。現在、他の因子b-FGFなどとの関与を解析した。
- ⑤他種動物血清(牛など)を使用しない培養システムを確立する。
  - ・市販されている種々の血清フリー培養

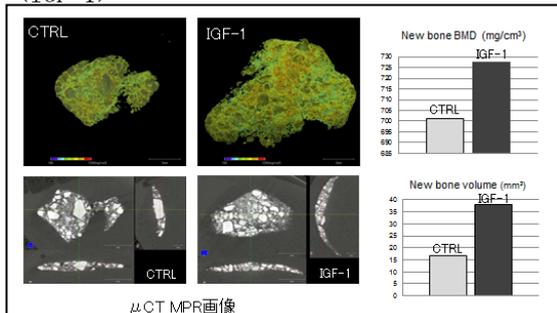
液による培養下での細胞増殖能や分化能を検討した。

- ⑥骨移植時に最適な scaffold を開発すること。  
 ・効率のよい骨移植術が行われるため移植する幹細胞の足場となる 3 次元的な scaffold の開発として抜去歯牙を活用することを検討した。

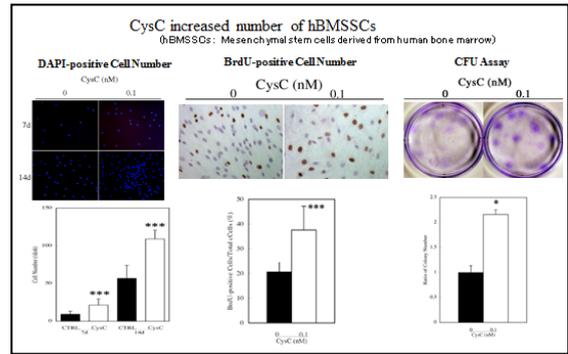
#### 4. 研究成果

- 1) 唇顎口蓋裂の初回手術より得られる組織片（皮膚ならびに粘膜組織）から未分化な細胞（間葉系細胞）が存在することを明らかにした。これら細胞が骨芽細胞、脂肪細胞に分化し、十分な骨組織、脂肪組織を再生することを明らかとした。この樹立した未分化な細胞は凍結保存した後も、その増殖能ならびに分化能を維持していた。つまり将来予定されている手術の際にも再利用できることが判明した。しかし症例を増やし検討したところ、骨髓より得られる骨髓幹細胞と比較すると幹細胞の得られる確率が非常に低いことが判明した。また骨髓幹細胞あるいは歯髓幹細胞と比較すると骨産生能がやや劣ることが判明した。この点に関しては、症例数を増やし確認する必要がある。
- 2) 樹立した幹細胞の骨分化、骨造成能を誘導する液性因子の解析に関しては IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) ならびにシスタチン C が有望であることを示した。このことは *in vitro*、ならびに研究代表者が確立した免疫不全マウス (NOD/scid) の皮下移植による *in vivo* の実験系の両者において証明が可能であった。その他の既知の液性因子に関して数種類 (b-FGF など)、検討を行ったが有望なものはない。現在、その他の液性因子についても検討中である。

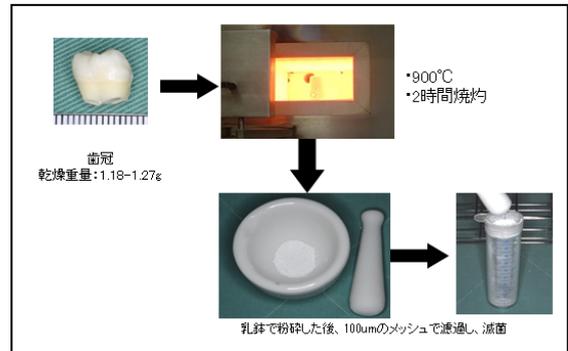
#### <IGF-1>



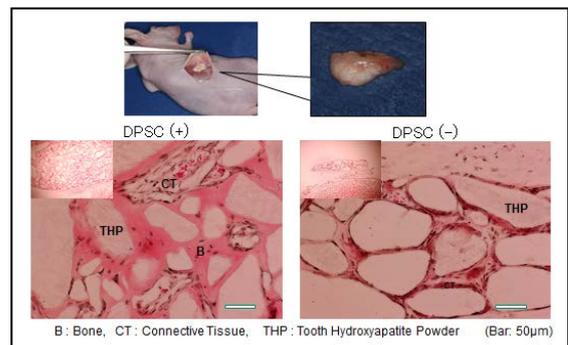
#### <シスタチン C>



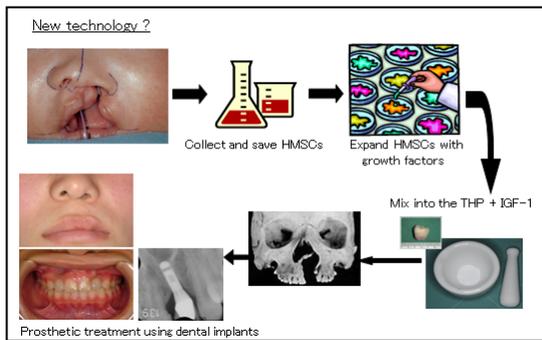
- 3) 細胞の足場としての scaffold 開発に関しては、抜去歯牙を高温焼却し無基質化したものに注目して実験を行った。



動物を用いた移植実験においては約半年後でも本物質は結晶として残存するものの、画像的ならびに組織学的にも十分な骨誘導を認め、さらには十分な強度のある骨ができることが判明した。安全性に関する検討を現在進めている。



このことで抜去した歯から再生治療に必要な幹細胞と scaffold の材料を一度に入手できる可能性を示した。



4) 患者自身の血清を用いた実験は施行できていない。血清フリーの培養液による実験では得られた幹細胞の増殖能、ならびに分化能ともかなりの減弱が認められた。やはり臨床応用するには、ヒト血清を用いる必要があると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 山下佳雄、黒田好美、後藤昌昭 「顎裂骨移植部へのデンタルインプラントの使用」  
日本口蓋裂学会雑誌 Vol. 36(1) p26-32, 2011年, 査読有
- ② 山下佳雄、森 啓輔、重松正仁、檀上 敦、野口信宏、後藤昌昭 「下顎骨再建に用いた移植骨へ埋入したインプラント周囲骨の経時的变化」日本顎顔面インプラント学会誌 Vol.10 p63-68, 2011年, 査読有
- ③ Yamashita Y., Otsuka T., Shigematsu M., Goto M. A long-term comparative study of two rigid internal fixation techniques in terms of masticatory function and neurosensory disturbance after mandibular correction by bilateral sagittal split ramus osteotomy.  
Int J Oral Maxillofac Surg. Vol. 40 p360-365, 2011. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 山下佳雄 「口唇口蓋裂患者の一貫治療 多職種とのチームアプローチ」第23回西日本臨床小児口腔外科学会 (招待講演) 2012. 10. 7 山口
- ② 山下佳雄 「顎骨再建症例に対するインプラント治療」第17回日本顎顔面インプラント学会教育研修会 (招待講演) 2012. 8. 26 東京
- ③ 山下佳雄 「唇顎口蓋裂患者における間葉系幹細胞を用いた再生医療の確立」第36回日本口蓋裂学会 シンポジウム 2012. 5. 29 京都
- ④ 山下佳雄 「インプラント医学の社会的貢献 唇顎口蓋裂患者に対する応用とその注意

点」第41回日本口腔インプラント学会 シンポジウム 2011. 9. 17 名古屋

- ⑤ 山下佳雄 「間葉系幹細胞による口腔内組織再生のための研究」第65回日本口腔科学会 (宿題報告) 2011. 4. 22 東京

[図書] (計1件)

- ① 後藤昌昭、山下佳雄  
口腔外科最新レビュー  
「インプラント義歯の歴史と概要」  
口腔外科ハンドマニュアル'10 口腔外科  
YEAR BOOK クインテッセンス出版  
p150-154, 2010年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 佳雄 (YAMASHITA YOSHIO)  
佐賀大学・医学部・准教授  
研究者番号：50322300

(2) 研究分担者

後藤 昌昭 (GOTO MASAOKI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：10145211

野口 信宏 (NOGUCHI NOBUHIRO)  
佐賀大学・医学部・講師  
研究者番号：40284658

檀上 敦 (DANJO ATSUSHI)  
佐賀大学・医学部・助教  
研究者番号：80452712

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：