

## 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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791966

研究課題名（和文）口唇口蓋裂の一貫治療への患児由来羊膜および羊膜間葉系細胞の応用に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Basic Study on Application of the Amnion and Amniotic Mesenchymal Cells Derived from Cleft of Lip and Palate Patients Themselves.

研究代表者

津野 宏彰（HIROAKI TSUNO）

富山大学・大学病院・医員

研究者番号：70377290

研究成果の概要（和文）：筆者は口唇口蓋裂患者への一貫治療において、患児由来の羊膜を応用することを検討している。本研究では、羊膜組織から間葉系細胞を単離し、その骨芽細胞分化誘導を行った。羊膜間葉系細胞は優れた骨分化能を示し、骨組織工学への応用の可能性が示唆された。また、乾燥保存した羊膜を口蓋裂手術へ応用することを想定したラット口蓋粘膜欠損モデルにおいて、乾燥羊膜が若年時の手術による上顎発育への影響を抑制する効果があることを示した。これらの結果より、羊膜組織の口唇口蓋裂治療への有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, mesenchymal cells were isolated from the amnion and they were then induced to osteogenic differentiation. The cells demonstrated excellent osteogenic differentiation ability that suggested the cell would be applied to bone tissue engineering. In addition, on the animal study assuming application of dried amniotic membrane to cleft of palate operation, the effect of the membrane on jaw growth following palate operation was indicated. These results suggested that the amnion would be a useful material for the treatment of cleft of lip and palate patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：歯科医学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口唇口蓋裂、再生医学、羊膜

## 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂の治療は患児の両親の精神的サポートから始まり、哺乳指導、形成外科

手術、言語訓練、歯列矯正を含む咬合管理など、チーム医療による一貫的治療体系が確立されてきた。それに伴い、患児とその両親へ

の負担は軽減傾向にあるものの、未だ患児が成人に至るまで、複数回にわたる手術が必要である。これに対し、通常時期を分けて行う口蓋形成術と顎裂閉鎖術を同時に行うなど、手術回数の低減の試みも行われているが、十分な組織補填が困難な早期の手術浸襲による顎発育抑制の問題がある。近年、研究がすすめられている再生医学の概念を応用し、幼児期の手術においても組織欠損部に十分量の組織補填を行うことにより、これらの問題が解決される可能性があると考えられ、申請者らはその組織・細胞供給源として、従来医療廃棄物とされている胎盤から得られる羊膜組織に着目している。

## 2. 研究の目的

筆者は口唇口蓋裂の治療体系の中で、患児本人由来の羊膜組織を活用する方法を検討している。本研究では、①顎裂部骨移植に必要な移植骨への羊膜由来間葉系細胞を用いた組織工学の応用、また②口蓋形成術時に生ずる粘膜欠損に用いる組織補填材としての羊膜（乾燥羊膜）の応用を前提に、基礎的研究による本法の有効性の確認を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 羊膜の採取と乾燥羊膜の作製・羊膜間葉系細胞の単離：富山大学医学部倫理委員会に承認されたプロトコールにより患者より提供を受けた羊膜を使用した。富山大学再生医学講座で所有する GMP 準拠 Cell Processing Room (CPR) で羊膜を細胞採取用と乾燥羊膜作製用に二分し、以下の処理を行った。

①羊膜間葉系細胞 (HAM) の分離：羊膜を PBS で洗浄後、1 cm 大に細分する。0.25% トリプシン溶液で酵素処理を繰り返し、羊膜上皮細胞を完全に除去後、1% コラゲナーゼ溶

液にて処理し、間葉系細胞を分離した。

②乾燥羊膜 (DAM) の作製：羊膜を両面シリコン樹脂加工耐油紙 (クッキングシート：日本製箔株社) 上に広げ、マイクロ波、遠赤外線、真空を利用する装置 (Hyper-Dry、株式会社千代田製 所) により DAM を作製した。作製された DAM は 25K Gy の  $\gamma$  線で滅菌処理を行った。

(2) HAM の増殖能と幹細胞特性の評価：各個体から得られた HAM を培養後、増殖曲線を作製するとともに、継代後ある程度増殖能が確認された細胞 (第 5 継代：P5) を用いて以下の方法での幹細胞特性を評価した。

①Flowcytometry 法：における表面抗原

(CD14, 34, 44, 45, 73, 90, 105,) の発現を検討。

②免疫組織化学染色：幹細胞遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Nanog, klf4, c-myc) の発現を確認。

(3) HAM の骨芽細胞分化誘導と分化能の評価：これまで報告に準じ、

$\beta$ -glycerophosphate、ascorbic acid、dexamethasone を含む骨芽細胞分化培地により、HAM の骨芽細胞への分化誘導を行い、以下の方法で、骨分化能を評価した。

①分化誘導の有無により、ALP 活性・カルシウム沈着量の差を定量的に評価した。

②分化誘導後の骨芽細胞マーカー遺伝子の発現様式を確認した。

③2 種類のリン酸カルシウム系の担体 ( $\beta$  三リン酸カルシウム： $\beta$  TCP、ハイドロキシアパタイト：HA) 内での三次元培養と、骨芽細胞分化への効果を SEM による形態学的評価と骨芽細胞マーカーの遺伝子発現様式により検討を行った。

(4) HAM の生体内での骨形成能の評価：7 週齢 Wistar 系ラットを用いて頭蓋骨欠損モデルを作成し、骨欠損部に (3) ③ で作製した HAM と担体の複合体を移植した。担体のみ移植した対照群との比較を含め、術後 6 週もしくは 12 週後に検体を採取し、骨欠損部の骨再生の評価を行った。またヒト細胞に特異的な抗 I 型コラーゲン抗体を用いて、HAM 由来の組織再構築について評価した。

(5) 口蓋粘膜欠損モデルの作成と、乾燥羊膜の移植：Pushback 手術を想定し、3 週齢 Wistar 系ラットで以下の 4 群を設定し、後述の①、②について検討した。

Defect 群：口蓋右半側に 2×5mm の範囲にて口蓋粘膜欠損を作成

Bond 群：A 群の粘膜欠損部を皮膚用接着材で被覆

DAM 群：群の粘膜欠損部に DAM シートを移植  
control 群：非手術群

① 4 週齢（術後 1 週）で口蓋部組織を採取し、創治癒について組織学的および免疫組織化学的評価を行った。

② 10 週齢（術後 7 週）で頭部を採取し、食品用蛋白分解酵素・タシナーゼ N-11-100（協和発酵工業）で処理し、乾燥頭蓋骨標本作製。骨標本の正中縫合線と第一大臼歯間距離を実体顕微鏡で観察・測定し、左右の顎発育の差を検討した。

#### 4. 研究成果

(1) HAM の増殖能と幹細胞特性の評価：

① HAM 細胞の多くは数継代後、形態が変化し、その増殖能が低下した。しかしながら、本研究では、線維芽細胞様の形態を維持したまま、良好な増殖能を維持する細胞群を複数の羊膜から得ることが可能であった（図 1）。本研

究ではこれらの HAM 細胞を、通常の HAM 細胞とは区別し、HAM  $\alpha$  細胞として、以下の研究に用いた。

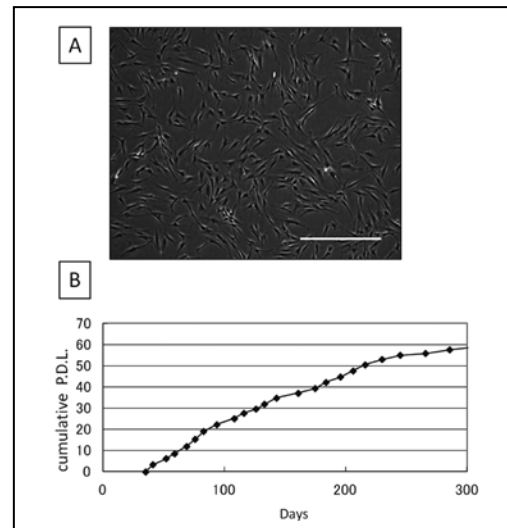


図 1: HAM  $\alpha$  細胞の形態 (A) と増殖曲線 (B)

② HAM  $\alpha$  細胞の表面抗原の発現を

Flowcytometry 法にて確認したところ、HAM  $\alpha$  細胞は間葉系幹細胞マーカー (CD44, CD73, CD90, CD105) に高い陽性率を示し、造血系幹細胞マーカー (CD14, CD34, CD44, HLA-DR) は陰性であった。また、免疫化学細胞染色において、大部分の HAM  $\alpha$  細胞で幹細胞マーカーである Sox2, Klf4, SSEA4, Oct3/4 抗体に対する染色性を認めた。これらの結果は 3 人のドナーから得られたすべての細胞群において一様の結果が認められた。

(2) HAM  $\alpha$  細胞の骨分化能の評価：

① 3 人のドナーから得られた HAM  $\alpha$  細胞を用いて同条件で骨芽細胞分化誘導を行ったところ、すべての細胞群で ALP 活性およびカルシウム沈着量の上昇を認めた。また RT-PCR 法において骨芽細胞マーカーである I 型コラーゲン、オステオカルシンの遺伝子発現の上昇を認めた。

② HAM  $\alpha$  細胞を 2 種類のリン酸カルシウム系担体 ( $\beta$  TCP, HA) 内での 3 次元培養を行った

ところ、担体表面への良好な生着を示し、一定期間の培養後、細胞表面にカルシウム沈着を示唆する顆粒形成を認めた (図 2)。定量的 RT-PCR 法において、オステオカルシンの遺伝子発現量を確認したところ、担体との 3 次元培養群では、平面培養群に比較し、有意な遺伝子発現の上昇を認めた (図 3)

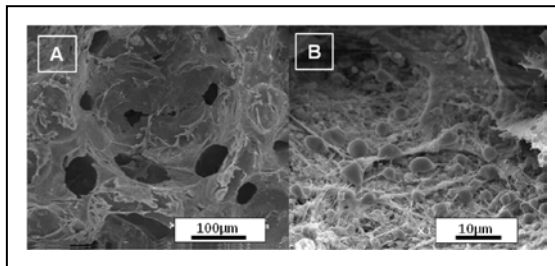


図 2: HAM  $\alpha$  細胞の 3 次元培養の SEM 像  
培養 1 日目 (A)、培養 7 日目 (B)

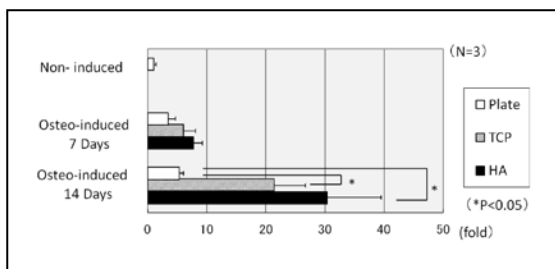


図 3: 3 次元培養による骨芽細胞マーカーの遺伝子発現の増強

(3) HAM  $\alpha$  細胞の生体内での骨形成能：  
 $\beta$  TCP 内で 3 次元培養を行った HAM  $\alpha$  細胞をラット頭蓋骨欠損モデルに移植を行い、6 週間後に採取した検体で免疫組織化学的検索を行ったところ、ヒト由来の I 型コラーゲン線維の染色が認められた。また術後 12 週後の組織学的評価において、骨新生に対する効果が認められ、HAM  $\alpha$  細胞由来の組織再構築による骨新生効果の可能性が示唆された。

(4) ラット口蓋粘膜欠損モデルへの DAM の応用とその効果：  
口蓋形成術を想定した口蓋粘膜欠損モデル

に DAM を応用したところ、術後 1 週間の組織学的検索において、粘膜下組織の良好な再構築が確認された。また、術後 7 週間の乾燥頭蓋骨標本を観察したところ、DAM 使用群ではその他の群の比較し、臼歯部歯列の内側傾斜が有意に抑制されており、DAM 応用群で施術側の顎発育の影響が抑制されることが確認された (図 4)。

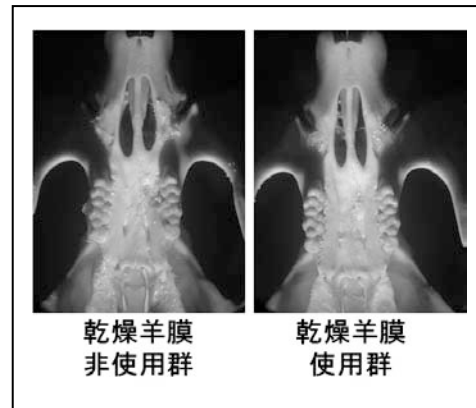


図 4: 口蓋粘膜欠損モデルの乾燥頭蓋骨標本

以上の結果より、本研究では以下の事が示された。

- 1) 羊膜間葉系細胞は、良好な骨分化能を示す細胞群 (HAM  $\alpha$  細胞) が含まれていることが示され、顎裂部骨移植への患児由来羊膜間葉系細胞の臨床応用が将来的に可能であることが示唆された。
- 2) 乾燥保存した羊膜を、口蓋裂手術を想定した動物モデルに応用し、施術による顎発育への影響を抑制し得たことより、患児由来の羊膜を乾燥保存し、口蓋裂治療へ応用することが有効であることが示唆された。

#### 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 1 件)

①Nogami M, Tsuno H, Koike C, et al.  
Isolation and Characterization of Human  
Amniotic Mesenchymal Stem Cells and Their  
Chondrogenic Differentiation.  
Transplantation (査読有). 2012, in  
press.

[学会発表] (計2件)

①津野宏彰, 口蓋粘膜欠損部へのヒト乾燥羊  
膜の応用に関する基礎的研究. 第35回日本  
口蓋裂学会総会・学術大会, 2011, 5, 26,  
新潟市.

②Tsuno H, Application of induced  
human amniotic mesenchymal cells  
for bone regenerative therapy. 9th  
Asian Congress on Oral and Maxillofacial  
Surgery, 26, Nov, 2010, Kuala Lumpur,  
Malasia

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

津野 宏彰 (TSUNO HIROAKI)

富山大学・大学病院・医員

研究者番号：70377290