

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592942

研究課題名(和文)再生医工学を用いた腸骨海綿骨非依存型顎裂部骨移植の臨床展開の可能性について

研究課題名(英文) Possibility of bone substitute by using tissue engineering, concerning the bone grafting operation to the alveolar cleft of CL/CP.

研究代表者

山崎 安晴 (YAMAZAKI, Yasuharu)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00210401

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：口唇裂・口蓋裂形成手術時に得られた上顎骨からの間葉系細胞で骨形成を確認した。また上顎骨由来の間葉性細胞を無血清培養し骨形成能が認められた。10年以上凍結保存された骨組織由来未分化間葉系細胞に染色体の形態異常及び myc 遺伝子、p53 遺伝子の異常発現が観察されないとともに骨形成能も確認されたことから、凍結保存された骨組織由来未分化間葉系細胞は代替骨組織のための細胞供給源となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Bone formation of Mesenchymal stromal cells(MSCs) derived from a surplus of maxillary bone fragments, in primary cleft lip / palate operation, was confirmed in vivo. When cultured with serum-free medium, maxilla-derived MSCs exhibited osteogenic potential in both in vitro and in vivo. With bone tissue-derived MSCs cryopreserved more than 10 years, in the safety assessment, no abnormality was found in G-band patterns as a morphologic investigation and in myc or p53 analysis. Moreover osteogenic potential and multipotency were maintained. Cryopreserved bone tissue-derived MSCs may be clinically useful.

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：未分化間葉系細胞 凍結保存 再生医工学

1. 研究開始当初の背景

唇顎裂や唇顎口蓋裂の一貫治療として、顎裂部骨移植は不可欠な治療となっている。手術時期は(5~6歳)から成人年齢(20歳前後)と広い年齢層に及び、またこれらいずれの骨移植も移植骨のdonorとしては自家腸骨海綿骨が第一選択されているのが実状である。しかし移植時期が低年齢であったり、recipientの母床の悪条件下では骨吸収が進行し再度の骨移植が必要な場合など、donorとしての腸骨に与える影響が大きく、採骨部の将来に及ぼす形態的・審美的影響は未知数である。そこで我々は腸骨採取の軽減の目的から採取された骨組織からの骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)の分離・増殖・凍結保存法の確立【Shimakura Y, Yamazaki Y.: Journal of Craniofacial Surgery14(1):108-116, 2003】と、その長期に凍結保存された骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)による再生医学を用いたハイブリッド型人工骨の開発【Matsui A, Yamazaki Y, ら J Craniofac Surg.19(3): 693-700, 2008. , Aoyagi K, Yamazaki Y, : J Craniofac Surg. 21(3): 666 -678,2010. TakaseT, Yamazaki Y: The Kitasato Medical Journal 40(2):122-128, 2010.】を行ってきた。その結果、唇顎裂や唇顎口蓋裂患者各自の骨髄由来間葉系幹細胞を長期に凍結保存させ、各患者の必要な時期に必要な量をdonor siteに侵襲を加えることなく骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)によるハイブリッド型人工骨を準備し臨床に供することが可能な段階となるに至り、凍結保存骨髄由来間葉系幹細胞の細胞遺伝学的性状の安全確認として染色体数分析と染色体染色による核板バンドパターン変化を行い、特に異常を認めない結果を得ている。

【平成14-15年度】ヒト骨髄間葉系細胞からの骨芽細胞の分離・保存・増殖法の確立と

臨床展開の可能性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費，基盤研究 C。

【平成16-17年度】凍結保存自己幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)を用いたハイブリッド型人工骨の開発 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費，基盤研究C。

【平成18-19年度】凍結保存幹細胞(骨髄由来間葉系幹細胞)の継代培養時の変化とその安全性 [代表：山崎安晴] 文部省科学研究費，基盤研究C。

さらに当科では数年前より、可及的に学童期での顎裂部骨移植を減少させる目的で唇顎裂や顎裂にcollapseのない唇顎口蓋裂の患者に対して初回口唇形成手術に併せて歯肉骨膜形成術【Millard ら (Plastic and Reconstructive Surgery, 1999) は、口唇形成時に歯肉骨膜形成術を行い、早期の顎裂閉鎖を行う方法を提唱し、その結果、従来混合歯列期に行われる顎裂部への骨移植の必要が減ると述べている】を行ってきた。しかしそれら歯肉骨膜形成術を行っても5~6歳時点で骨架橋は認められるものの、骨組織の絶対量の不足ため矯正歯科治療に支障があり通常の顎裂部骨移植に踏み切っているのが現状である。この原因の一つは歯肉骨膜形成を行って骨形成の環境を整えても「骨組織つくる細胞」そのものの絶対数の不足にあると考えられる。そこで我々は今までの研究を踏まえ、従来の顎裂部骨移植年齢時に腸骨骨髄をDonorとすることなく出生時、口唇裂形成手術、口蓋裂形成手術時に得られる、それぞれ臍帯血、顎裂骨膜、口蓋骨等から自己血 scaffold (フィブリンネット：PPP)、成長因子(PRP)、骨芽細胞系間葉幹細胞を単離・長期凍結保存し、顎裂部骨移植年齢時に再構成骨組織を代替骨としての臨床展開可能性を検討した。

前述の臍帯血に関しては、医療技術の進歩に伴い、妊婦の胎児エコー検査により出生

前に胎児の口唇裂・口蓋裂診断が可能となっている現在、本学でも術前診断に基づき紹介があり、年々増加傾向にある。胎児診断のご両親への形成外科的なケアは勿論であるが、出産時の臍帯血由来から自己血清、scaffold(フィブリンネット：PPP)、成長因子(PRP)を単離し、凍結保存後も有用であることを報告している【K Baba, Y Yamazaki:20th Congress of the European Association for Cranio - Maxillo- Facial Surgery:359-363,2010 (proceeding)】

【平成20-22 年度】臍帯血由来間葉系幹細胞の凍結保存と唇顎口蓋裂患者への臨床応用の可能性.文部科学省科学研究費，基盤研究C.

以上の研究を踏まえ、再生医工学による再生骨組織移植が可能となれば腸骨骨髓に依存しない学童期での顎裂部骨移植が可能と考えこの研究に着手するに至った。

2. 研究の目的

* 当院に産婦人科にて分娩される妊婦より、インフォームドコンセントを得て、分娩後破棄される臍帯より血液（臍帯血）を採取し、本研究に使用した。提供された上顎骨を初代培養し、得られた間葉系細胞を凍結保存、研究に併せて解凍後、その間葉系幹細胞を使用した。

- (1)胎児診断により口唇裂・口蓋裂を診断された新生児の臍帯血から自己血清の分離・保存と同患児の初回手術時で提供された骨組織由来間葉系細胞とで再構成し代替骨組織としての可能性を検討。
- (2)上顎骨由来間葉系細胞の分離・増殖・保存の確立。
- (3)上顎骨由来間葉系細胞の骨形成能の確認(in vivo, in vitro)。
- (4)10年以上凍結保存されたヒト腸骨由来間葉系細胞の安全性を確認。
- (5)臨床応用の可能性検討

3. 研究の方法

- (1)胎児診断により口唇裂・口蓋裂を診断された新生児臍帯血からの分離・保存と初回手術時に提供された下鼻甲介(骨組織)由来間葉系細胞とによるin vivoでの骨形成能を確認した。
- (2)上顎骨からの間葉系幹細胞を分離・増殖・保存を無血清培地で行った。
- (3)上顎骨由来間葉系幹細胞の骨形成能を無血清培地で確認した。
 - ・ in vitro：間葉系細胞を無血清培地かで骨分化誘導培養し細胞生化学的活性(Runx2, ALP, Osterix, OC)で確認した。
 - ・ in vivo：間葉系幹細胞を無血清培地で増殖、次に骨分化誘導培養。担体はハイドロキシアパタイトを使用。動物(ヌードマウス)に移植し骨組織の組織学・免疫組織学的に検索した。
- (4)10年以上凍結保存されたヒト腸骨由来間葉系細胞の安全性を確認した。
 - ・ 核板バンドパターン分析
 - ・ 腫瘍化の検索
- (5)臨床応用の可能性検討
10年以上凍結保存されたヒト腸骨由来間葉系細胞の骨形成能の確認した。

4. 研究成果

- (1)口唇裂・口蓋裂形成手術時に得られた下鼻甲介(骨組織)由来間葉系細胞の骨形成能を確認(in vitro, in vivo)した。in vitroでは、下鼻甲介より採取した骨組織由来間葉系細胞は、FBS添加培地ヒト血清添加培地、無血清培地のいずれの培養でもCaの産生が確認された。また骨芽細胞マーカーの評価ではALP,OCの発現を認めたことから骨芽細胞への分化能を有することが確認された。in vivoでは、自己臍帯由来血清と同児由来間葉系細胞の再構成代替骨組織に明らかな骨組織形成が確認された。培地としては自己血清が最も優れている

ことが確認された。

(2) 口唇裂・口蓋裂形成手術で得られる下鼻甲介(上顎骨)の検体数が少ないため,成人上顎骨由来の間葉性細胞で基礎研究をおこない,無血清培地(STK)による上顎骨由来間葉系細胞の分離・増殖・保存が可能であることが判った。

(3) 上顎骨由来間葉系細胞を無血清培地(STK)とFBS添加培地で培養し,両者の骨形成能についての比較検討し,上顎骨より得られた間葉系細胞は骨芽細胞の供給源となること,この細胞を利用した代替骨が作製可能であること,また培養では無血清培地の使用が可能であることが示唆された。FBS添加培地にもなう感染リスクや自己血清培地にもなう患者の負担軽減を考慮すると,無血清培地は有用と考えられた。

(4) 10年以上保存された腸骨由来間葉系細胞の安全性を無作為抽出した検体で検討した結果,染色体の形態異常は確認されなかった。またmyc遺伝子,p53遺伝子の異常発現は確認されなかった。

(5) 10年以上保存された腸骨由来間葉系細胞により骨組織形成が確認され,長期間凍結保存された骨組織由来間葉系細胞は,代替骨のための細胞供給源となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kenichi Kumazawa, Takayuki Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Osteogenic Potential, Multipotency and Cytogenetic safety of human bone tissue derived mesenchymal stromal cells (hBT-MSCs) after long-term cryopreservation. The Kitasato Medical Journal 44:95-103,2014. 査読有

<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ44-1/KMJ44-1.html>

Masashi Ishiguro, Yasuharu Yamazaki, Kyoko Baba, Kenichi Kumazawa, Takayuki Sugimoto, Akira Takeda, Eiju Uchinuma : Assessment of the Osteogenic Potential of Maxilla-Derived Mesenchymal Stromal Cells and the Utilization of Serum-Free Medium for Culture Thereof. The Kitasato Medical Journal 44: 84-94, 2014. 査読有

<http://mlib.kitasato-u.ac.jp/homepage/ktms/kaishi/pdf/KMJ44-1/KMJ44-1.html>

Takayuki Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, Kenichi Kumazawa, Umiko Sone, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: The Significance of Performing Osteogenic Differentiation in Human Bone Tissue-Derived Mesenchymal Stromal Cells. Journal of oral tissue engineering 11:103-112, 2013. 査読有
<http://www.jarde.jp/zasshi/e/abst11-2.html>

Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Osteogenic potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells. Journal of Cranio-Maxillo-facial Surgery 41 : 775-782, 2013 査読有

doi: 10.1016/j.jcms.2013.01.025

Akira Takeda, Yasuharu Yamazaki, Kyoko Baba, Masashi Ishiguro, Kazuya Aoyagi, Shigehiro Ikemoto, Eiju Uchinuma: Osteogenic Potential of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Cultured in Autologous

Serum: A preliminary Study Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 70:e469-e476,2012. 査読有

doi: 10.1016/j.joms.2012.03.021

Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki,

Shigehiro Ikemoto, Kazuya Aoyagi,

Akira Takeda, Eiju Uchinuma:

Osteogenic potential of human um-

bilical cord-derived mesenchymal

stromal cells cultured with um-

bilical cord blood-derived autoserum.

Journal of Cranio- Maxillofacial

Surgery 40 : 768-772,2012. 査読有

doi: 10.1016/j.jcms.2012.02.006

[学会発表](計 11 件)

杉本孝之, 熊澤憲一, 山崎安晴, 曾根

由美子, 武田 啓, 内沼栄樹: 長期凍結

保存された骨組織由来間葉系細胞の

骨形成能は代替骨として臨床応用可能

である. 第 13 回日本再生医療学会総会

2014 年 03 月 04 日 ~ 05 日 国立京都国

際会館 京都

馬場香子, 山崎安晴, 熊澤憲一, 杉本孝

之, 曾根由美子, 武田 啓, 内沼栄樹:

凍結保存後 臍帯血由来多血小板血漿中

の成長因子含有量 第22回日本形成外

科学会基礎学術集会 2013年11月07日

~ 08日 朱鷺メッセ 新潟

杉本孝之, 熊澤憲一, 山崎安晴, 曾根由

美子, 武田 啓, 内沼栄樹: 長期凍結保

存された骨組織由来間葉系細胞の特性

第22回日本形成外科学会基礎学術集会

2013年11月07日 ~ 08日 朱鷺メッセ 新

潟

熊澤憲一, 山崎安晴, 馬場香子, 青柳和

也, 武田 啓, 曾根由美子, 内沼栄樹: 長

期凍結保存された骨組織由来未分化間

葉系細胞による代替骨組織の可能性

第12回日本再生医療学会総会 2013年

03月21日 ~ 23日パシフィコ横浜 神奈川

馬場香子, 山崎安晴, 石黒匡史, 熊澤憲

一, 曾根由美子, 武田 啓, 内沼栄樹: 凍

結保存後の臍帯血由来多血小板血漿中

PDGF- · TGF- · VEGF含有量. 第12

回日本再生医療学会総会 2013年03月

21日 ~ 23日パシフィコ横浜 神奈川

馬場香子, 石黒匡史, 山崎安晴, 馬場香

子, 松尾あおい, 武田 啓, 内沼栄樹:

凍結保存後臍帯由来間葉系細胞の

viability. 第21回日本形成外科学会基

礎学術集会 2012年10月04日 ~ 05日

リステル猪苗代 福島

石黒匡史, 山崎安晴, 馬場香子, 池本繁

弘, 青柳和也, 曾根由美子, 武田 啓,

内沼栄樹: 無血清培地で培養した上顎

骨由来間葉系細胞の骨形成能 FBS添加

培地との比較検討. 第21回日本形成外

科学会基礎学術集会 2012年10月04日 ~

05日 リステル猪苗代 福島

熊澤憲一, 山崎安晴, 石黒匡史, 馬場香

子, 池本繁弘, 青柳和也, 武田 啓,

曾根由美子, 内沼栄樹: 上顎骨由来間葉

系幹細胞の骨形成能について. 第21回日

本形成外科学会基礎学術集会 2012年

10月04日 ~ 05日 リステル猪苗代 福

島

山崎安晴, 池本繁弘, 石渡靖夫, 武田 啓,

内沼栄樹: 口唇裂・口蓋裂患者と凍結保

存自己骨組織由来間葉系細胞の意義.

第36回日本口蓋裂学会総会・学術集会

2012年05月24日 ~ 25日 国立京都国際

会館 京都

熊澤憲一, 山崎安晴, 馬場香子, 青柳和

也, 武田 啓, 曾根由美子, 内沼栄樹:

長期凍結保存された骨組織由来の未分

化間葉系細胞による代替骨組織の可能

性. 第11回日本再生医療学会総会

2012年6月12日 ~ 14日 パシフィコ横浜

神奈川

石黒匡史, 馬場香子, 山崎安晴, 武田 啓,
曾根由美子, 内沼栄樹: 骨由来間葉系
細胞の FBS 添加培地, ヒト血清添加培
地, 無血清培地での骨形成比較検討 第
20 回日本形成外科学会基礎学術集会
2011 年 10 月 6 日(木)~7 日(金) ハイ
アット リージェンシー東京 東京

[図書](計 1 件)

Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Akira
Takeda, Eiju Uchinuma: Cord Blood:
Banks and Banking, Ethical Issues and
Risks/Benefits. Nova Science Pub-
lishers, 2013. 164(95-112)
[https://www.novapublishers.com/cat
alog/product_info.php?products_id=
37127](https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=37127)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 安晴 (YAMAZAKI Yasuharu)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 00210401

(2) 研究分担者

池本 繁弘 (IKEMOTO Shigehiro)
北里大学・医学部・助教
研究者番号: 90296492
(退職により平成 25 年 3 月 31 日付で削
除)

馬場 香子 (BABA Kyoko)
北里大学・医学部・特別研修生
研究者番号: 90327411

青柳 和也 (AOYAGI Kazuya)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 10337959

石黒 匡史 (ISHIGURO Masashi)
北里大学メディカルセンター・研究員

研究者番号: 40265640

(退職により平成 25 年 3 月 31 日付で削除)

熊澤 憲一 (KUMAZAWA Kenichi)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 60383618

(平成 25 年 4 月 1 日より研究分担者)

杉本 孝之 (SUGIMOTO Takayuki)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 20365133

(平成 25 年 4 月 1 日より研究分担者)

(3) 連携研究者

大井田 新一郎 (OIDA Shinichiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号: 10114745

望月 純子 (MOCHIZIKI Junko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号: 90306613