

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463091

研究課題名(和文) 舌癌患者に対する間葉系幹細胞を用いた新たな舌再建法の確立

研究課題名(英文) Tongue muscle reconstruction 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは患者本人より採取した間葉系幹細胞より筋肉組織を再生し、舌癌で舌筋を欠損した患者へ使用する再生医療を目標に研究を行った。骨髄や歯髄より採取した幹細胞を用い、ある特殊な環境下で筋芽細胞へ分化を誘導することが可能であることが動物実験によって判明した。将来的に臨床応用できる可能性が示唆された。しかし分化する細胞の効率が良くなく、実際に臨床応用するには改善が必要である。また欠損部に用いる細胞シートの作製も試み動物実験に用いたが、舌という可動性の高い部位のため、実際に生着するには至らなかった。培養ならびに、移植可能な細胞シートの開発が必要である。

研究成果の概要(英文)：We performed a study to regenerate muscular tissue using human mesenchymal stem cells for patients defective by treatment of tongue cancer. It was proved by animal experiments that these cells could be induced differentiation to myoblastic cells under a special environment. The clinical possibility was suggested in the future. However the ration of differentiated cells was not efficient. Improvement method is necessary. We also tried the animal experiments with layered cell sheets to use for the loss of tongue. But, our cell sheet did not really engraft on mouse tongue, since a tongue was a high flexible part. Development of portable cell sheet is necessary near the future.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 筋組織 舌癌 温度感受性細胞シート

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進み、癌の罹患率が増加している中、口腔癌も緩やかではあるが増加傾向にある。舌癌は口腔癌の中で最も発生頻度が高く、その治療の第一選択肢として切除手術が挙げられる。切除後は機能回復のために、さまざまな皮弁を用い再建術を行うことが多い。しかし術後に運動、知覚障害を合併し、また審美的な観点からも多くの問題点が残っている。さらに皮弁採取のために、他部位への侵襲を加えなくてはならず、必ずしも患者への負担が少ない治療とは言えない。

近年、再生医療の技術が飛躍的に進んでおり、患者本人の幹細胞を使用することで組織再生を行い、すでに実際の臨床に応用することが可能となってきた。われわれはヒト間葉系幹細胞より筋肉組織を再生し舌の再建に応用できるか基礎実験を行ってきた。

2. 研究の目的

舌癌切除手術後には舌の実質欠損が生じる。これら患者に対して患者自身の骨髄幹細胞や、抜去した歯から採取した歯髄幹細胞を用い筋組織の再生治療を目標とする。特に細胞注入に関してはナノスキャホールドを用い再生効率を高める。あるいは *in vitro* で幹細胞を温度感受性細胞シート上で筋芽細胞へ分化させ、シートを重層して欠損部へ移植し舌再建を行う再生治療が可能かを検討し、臨床応用化を目指す。つまり低侵襲で安全な舌再生治療を確立することが目的である。

3. 研究の方法

- 1) 動物実験においてナノスキャホールドを用いた幹細胞の注入実験を行い、舌筋の再生が可能か組織学的に評価を行う。移植する細胞としてヒト骨髄幹細胞ならびに歯髄幹細胞を使用する。
- 2) 温度感受性細胞シート上で幹細胞を効率よく筋芽細胞に分化させる実験系を確立する。
- 3) この細胞シートを数層に重ね3次元培養を行い、人工的に作製したマウスの舌欠損部へ直接移植を行い、組織学的評価を行う。
- 4) 幹細胞の筋組織への分化を促す3次元培養の可能な scaffold を開発する。強度的にも直接、欠損部へ縫合固定が可能な scaffold の開発。

- 5) 幹細胞が効率よく筋芽細胞へ分化ならびに増殖するのに必要な Growth factor のカクテルを解明すること。

4. 研究成果

・免疫不全マウスの舌に人為的に欠損を作製し、その2日後に欠損部位へ直接、間葉系幹細胞を注入する実験を行った。注入した細胞の動向を知るため幹細胞を PKH26 red fluorescent 等でラベルして検討した。注入後2週間目に舌を採取し組織学的に評価した。注入された幹細胞の大多数は注入した部位に停滞していたが、舌筋内を遊走し、拡散している細胞も多く観察することができた。創傷部位への遊走も確認されたが、必ずしも創傷部位へ集中するわけではなく、全般的な遊走が確認された。

・舌欠損部に注入されたヒト幹細胞が、さらに他臓器、あるいは末梢にまで遊走されるのかを検討した。細胞注入後1週間目に尻静脈より血液を採取し検討を行ったが、明らかなヒト細胞の混入は確認されなかった。他臓器に関してはまだ十分に検討できていないため、今後、検討を続ける。

・本動物実験にさらに分化誘導因子として hIGF-1 (Human Insulin-like growth factor) 投与を舌筋内に行った。使用した細胞に hIGF-1 レセプターが発現していることは免疫染色にて確認した。投与後、2週間後の組織標本の結果では、頻度は少ないが MyoD 陽性細胞 (ヒト由来細胞) の存在を確認した。幹細胞による筋組織の再生の可能性が示唆された。ただその分化効率は非常に低く、観察視野中で約1~3%程度にとどまった。hIGF-1 投与回数や投与濃度により、その効率が上昇する可能性があり、検討を続けている。

・今回、幹細胞としては骨髄由来幹細胞と歯髄幹細胞を使用した。これら細胞の保存状態に関して検討した。約1年の凍結保存後であっても、採取直後とほぼ変わりなく細胞増殖能、あるいは分化能を維持できていることを確認した。両群間での差異はなかった。(ただし実験には継代10回目以内のものを使用した。)

・舌欠損マウスへの注入実験において、両幹細胞間で筋組織内への拡散傾向に大きな違いは認められなかった。さらに両細胞注入実験における hIGF-1 投与の影響を比較したが、その効率に大きな違いはなかった。現時点では、本研究において両幹細胞に有意差はないと考える。

・温度感受性細胞シートを用い、幹細胞を3次元培養する試みに関しては、培養そのものは可能で、5層ほど積層させても細胞の viability に問題は生じなかった。(ただしシート状に播種する適切な細胞密度、積層するシート数に関しては今後も検討が必要と考える)積層されたものは肉眼的、組織学的にも細胞形態などに特に変化を認めなかった。細胞接着分子や細胞骨格分子の検討はまだ行っておらず、今後、予定している。

・この積層状態に、先の hIGF-1 投与を行い培養することで、筋芽細胞への分化が起こるか検討した。5～7日間培養後の組織学的評価では MyoD 陽性細胞は確認されず、hIGF-1 単独投与では分化は起こらないことが判明した。

・積層した細胞シートを舌欠損マウスへ移植する実験を行ったが、縫合あるいは固定が困難で手技的にも安定しなかった。舌は可動部位なので生着する前に脱落しているケースが大半であった。材料、ならびに手技の改善が必要である。

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 1 件)

Aijima R, Wang B, Takao T, Mihara H, Kashio M, Ohsaki Y, Zhang JQ, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita Y, Masuko S, Goto M, Tominaga M, Kido MA. The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. FASEB J 2015. Vol.29, 182-192.
DOI:10.1096/fj.1530-6860 査読有

[学会発表](計 10 件)

Yoshimoto R, Aijima R, Oyama Y, Yoshizumi J, Kitsuki T, Danjo A, Yamashita Y, Kido M : Hydropic Degeneration of Labial Mucosal Epithelium and Infiltration of Macrophages in Xerostomia Patients. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 2015.10.30-31福岡

Danjo A, Yamashita Y, Aijima R, Katsuki T, Goto M : Histological Evaluation of the Bone Healing by Osteotomy with Ultrasonic Osteotomy Devices. 22nd International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery. 2015.10.27-30メルボルン

合島怜央奈, 木附智子, 吉本怜子, 大崎康吉, 張 旌旗, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂 : マウス口蓋創傷モデルの治癒過程における上皮間葉転換関連分子の発現解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11-13 日 新潟

吉本怜子, 合島怜央奈, 吉住潤子, 木附智子, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂 : 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口腔粘膜上皮の変性とマクロファージの浸潤. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11 - 13 日 新潟

山下佳雄 : 口腔がん切除後の顎口腔機能回復法を再考する. チームアプローチによる試み 第 18 回日本顎顔面インプラント学会学術大会 2014 年 11 月 30 日出雲

Aijima R, Yamashita Y, Danjo A, Kido MA, Goto M : The thermosensitive TRPV3 channel contributes to rapid wound healing in oral epithelia. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 96th Annual Meeting. 2014.9.8-13 ホノルル

宇都宮怜子, 合島怜央奈, 吉住潤子, 木附智子, 檀上 敦, 山下佳雄, 城戸瑞穂 : 口腔内乾燥を訴える患者に認められた口腔粘膜上皮のバリア機構の破綻. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2013 年 9 月 20-22 日 岡山

檀上敦, 山下佳雄, 合島怜央奈, 香月武, 後藤昌昭 : 超音波骨切削器具を用いて切削した骨の組織学的評価. 第 43 回日本口腔インプラント学会学術大会. 2013 年 9 月 13 日 ~ 15 日 名古屋

山下佳雄, 檀上 敦, 下平大治, 合島怜央奈, 後藤昌昭 : 舌癌患者に対する間葉系幹細胞を用いた舌再建法確立のための基礎的研究. 九州地区口腔癌研究会. 第 17 回学術講演会 2013 年 6 月 7 日福岡

合島怜央奈, 山下佳雄, 吉住潤子, 後藤昌昭, 城戸瑞穂 : 温度感受性 TRPV3 チャネルを介した口腔粘膜の新しい創傷治癒メカニズムの解明. 第 67 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会. 2013 年 5 月 22-24 日 栃木

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山下 佳雄 (YAMASHITA, Yoshio)

佐賀大学・

医学部歯科口腔外科学講座・准教授

研究者番号：50322300

(2)研究分担者

後藤 昌昭 (GOTO, Masaaki)

佐賀大学・

医学部歯科口腔外科学講座・教授

研究者番号：10145211

野口 信宏 (NOGUCHI, Nobuhiro)

佐賀県立病院好生館・

歯科口腔外科・その他

研究者番号：40284658

下平 大治 (SHIMOHIRA, Daiji)

佐賀大学・

医学部歯科口腔外科学講座・助教

研究者番号：70594844

檀上 敦 (DANJO, Atsushi)

佐賀大学・

医学部歯科口腔外科学講座・講師

研究者番号：80452712

(3)連携研究者

該当者なし