

平成 30 年 4 月 11 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15759

研究課題名(和文)臍帯血幹細胞を用いた再生医学的アプローチによる早期顎裂閉鎖に向けて

研究課題名(英文) Early closure of alveolar cleft by tissue regeneration using umbilical stem cells

研究代表者

須田 直人 (Suda, Naoto)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90302885

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)：満期妊産婦から採取したヒト臍帯を酵素処理(EZ)により分離し培養を行った(UC-EZ)。継代数2のUC-EZを磁気分離法(MACS)により、間葉系幹細胞マーカーであるCD146陽性細胞の分離を行った(UC-MACS)。2種の細胞とも全ての間葉系幹細胞マーカーが陽性であった。UC-EZではNanog、Oct3/4は陽性だったがSox2は陰性であった。多分化能解析において、2種の細胞ともAlizarin red陽性の石灰化物とOil red O陽性の脂肪小滴の形成を認めた。UC-MACSは全ての間葉系幹細胞マーカーと未分化維持関連遺伝子に陽性で、骨芽細胞と脂肪細胞への高い分化能を認めた。

研究成果の概要(英文)：Human umbilical cells (UC-EZ) were derived from enzymatic digestion. Using magnetic-activated cell sorting (MACS), CD146-positive mesenchymal stem cells (US-MACS) were isolated. Two kinds of cells were positive for stem cell markers. UC-EZ were positive for Nanog and Oct3/4 but negative for Sox2. Two cells formed alizarin red-positive calcified matrix and oil red O positive lipid droplets. UC-MACS were positive for all stem cell markers and undifferentiated maintenance-related genes. UC-MACS showed high capacity to differentiate toward osteoblasts and adipocytes.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：口蓋裂 再生 骨 臍帯幹細胞 顎裂

1. 研究開始当初の背景

近年、唇顎口蓋裂児の顎裂閉鎖において、しばしば歯槽歯肉骨膜形成術(GPP)が行われる。GPPは、主に乳児期に顎裂部を両側の骨膜弁により被覆し、骨架橋形成を促すことを目的に行われる外科手術である。GPPによる歯槽堤の連続性獲得は、口腔機能の正常な発達や顎裂への舌の突出防止を、顎裂部二次骨移植が行われる時期よりはるかに早期に実現することができる。これまで我々は、片側性唇顎口蓋裂児に対し、術前顎矯正治療後にGPPを施行した症例の短期的な術後成績を評価し、前後的に劣成長のない上顎骨と狭窄のない歯列が獲得できることを報告した。

しかしながら、顎裂部を三次元的に評価したところ、必ずしも骨架橋形成は十分でなく、垂直的にも唇舌的にも骨形成量が不十分な例もあった(左図)²⁾。今後は、いかに顎裂部の骨架橋形成量を向上させるかが大きな課題と考えている。

この点に関し、機関内におけるIRBの承認のもと、現在GPPと共に患児の骨髄の移植を局所へ行っている。しかしながら、乳児期の骨髄液採取により患児への外科的侵襲が増加する問題や、骨髄採取が困難な例がある。

2. 研究の目的

骨髄液とは異なり臍帯血はその採取がきわめて容易で、患児や母体に対する侵襲性もない。そこで本課題では、GPP施行後に顎裂部に形成される骨架橋量を、臍帯血中に存在する間葉系幹細胞の移植により向上させることを目的とする。具体的には、採取後の臍帯血をどのように培養し、どのような条件で幹細胞移植を行えば、GPPの成績向上が得られるかを動物実験により明らかにする。

3. 研究の方法

・主たる研究成果

産科医院で同意を取得後、帝王切開を施行した満期妊産婦から採取したヒト臍帯を酵

素処理(EZ)により分離し、培養を行った(UC-EZ)。継代数2のUC-EZを磁気分離法(MACS)により、間葉系幹細胞マーカーであるCD146陽性細胞の分離を行った(UC-MACS)。UC-EZ、UC-MACSともに、継代数3にて、細胞形態評価、細胞増殖能評価、表面抗原解析、遺伝子発現解析、多分化能解析を行った。

4. 研究成果

細胞形態は、UC-EZの多くは紡錘形の線維芽細胞様細胞を呈したのに対し、UC-MACSは球状で胚性幹細胞様の形態を示した。細胞増殖能評価では、倍加時間はUC-EZよりもUC-MACSでより長かった。表面抗原解析では、2種の細胞ともすべての間葉系幹細胞マーカーが陽性であった。遺伝子発現解析より、UC-EZではNanog、Oct3/4は陽性だったがSox2は陰性であったのに対し、UC-MACSではすべての未分化維持関連遺伝子の発現が認められた。多分化能解析において、2種の細胞ともAlizarin red陽性の石灰化物和Oil red O陽性の脂肪小滴の形成を認め、特にUC-MACSにおいてより多くの石灰化物を認めた。

表面抗原解析と遺伝子発現解析より、UC-MACSはすべての間葉系幹細胞マーカーと未分化維持関連遺伝子に陽性であり、かつ骨芽細胞と脂肪細胞への高い分化能を認めたことから、UC-MACSはUC-EZよりもMSC特性の高い細胞集団であると考えられた。現在、顎裂の動物モデルにおいてUC-MACSの移植実験を行っている。

・当初計画した基礎的研究に関連して、今後の研究を進めていくにあたり、以下の重要な臨床的知見が得られた。

1) GPPは、早期の顎裂閉鎖を可能にし、連続性を持った顎堤形態の獲得と共に、舌の突出がない良好な口腔機能の発達を促す。GPPは、上顎の発育に対しマイナスとなり交叉咬

合を誘発するという報告や、施行後に十分な骨架橋が得られないといった報告もあり、その効果には懐疑的な意見もある。そこで、明海大学病院矯正歯科で咬合管理を行っている5歳児UCLPのうち、埼玉医科大学形成外科でGPPを施行した症例と非施行例間の顎発育と歯列形態を比較した。

明海大学病院矯正歯科において出生直後より口蓋床を用いた術前顎矯正を行った後、埼玉医科大学病院形成外科において生後4-7か月時に口唇形成術(Noordhoff法)1.1□1.6歳時に口蓋形成術(Furlow変法)を行ったUCLP児を対象とした。これらのうち5例(平均5.2歳)は口唇形成術時とGPPを同時施行し、3例(平均5.2歳)はGPP非施行であった。側面頭部X線写真を撮影しセファロ分析により顎発育を、歯列模型より歯列形態を評価した。またオルソパントモグラフを用いて、顎裂部の骨架橋を観察した。

セファロ分析より、SNA、SNB、ANB、上下顎乳前歯の歯軸のいずれもGPP施行例と非施行例間に有意な差はなく、共に骨格性□級の傾向を示した。上顎歯列の長径と犬歯間幅径は施行例と非施行例間に有意な差はなかったが、第二乳臼歯間幅径は施行例で大きかった。非施行例はいずれもoverjetがマイナスであった。また施行例は5症例とも顎裂部に骨架橋がみられた。

5歳までの評価では、GPPの施行は顎発育や歯列形態に悪影響を与えず、顎裂部に非施行例にはない骨架橋が形成された。このような良好な短期成績が得られたことに、GPP施行前の術前顎矯正によって歯列を狭小化させないよう十分留意した点と、注意深くGPP適用症例を選んだことが関係したと考えられる。このようにGPPでは、その適用例を十分に検討して施行を決定することが、良好な術後成績を得る上で重要である。

2) 術前顎矯正(PIO)は、口唇裂・口蓋裂児

における哺乳障害、口唇や鼻の形態異常、上顎歯槽形態の改善を目的として行われる。これらに加えPIOは、口唇形成術や歯肉骨膜形成術(GPP)の施行前に、披裂を近接させ手術成績を向上させる役割も担う。特にGPPでは、顎裂間距離が大きい例はその施行自体が困難となる。一方で、PIOにより無理な顎裂縮小を図った例では、GPP後に上顎の劣成長や歯槽弓の狭小化をきたす。このようにPIO開始前に歯槽形態改善の難易度が評価できれば、GPPの適用を含めた手術計画の立案や手術成績の向上に役立つ。そこでPIOの治療結果に関連する因子を検討した。

出生直後より口唇形成術直前までPIOを行ったUCLP児13例(平均30日齢)のPIO開始前の歯列模型を用いた。True Definition Scanner(3MTM社)で採得したSTLデータ上に、三次元分析ソフトPoint Master(日本ビジュアルサイエンス社)を用い、基準点・基準平面を設定し距離・角度計測を行った。またPIO終了後の口腔内を直接計測した。

PIO後、8例で両側歯槽突起が接触し(接触群)、5例で接触がなかった(非接触群)。接触群と非接触群間で、PIO開始前の顎裂間距離(両側歯槽突起の近心断端間水平距離)に有意な差はなかった。一方、PIO開始前の鼻中隔下端と正中矢状平面間の水平距離や鼻中隔下端の側方偏位量は、非接触群に比べ接触群で有意に大きかった。またPIO開始前の鼻中隔下端と正中矢状平面間の水平距離と、PIO前後の顎裂間距離の減少量間に正の相関があった。

UCLPにおいてPIOによる歯槽形態の改善は、PIO開始前の顎裂間距離でなく、鼻中隔を含む鼻上顎複合体の側方偏位と関連性があった。以上より、GPP施行にあたりPIOにより上顎歯槽弓を狭小化させないように留意し、PIO開始前にみられた鼻上顎複合体の側方偏位が改善された症例に限りGPPを適用することが望ましいと考えられる。

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 7 件)

- 1) Shinagawa-Ohama R, Mochizuki M, Tamaki Y, Suda N, Nakahara T. Heterogeneous Human Periodontal Ligament-Committed Progenitor and Stem Cell Populations Exhibit a Unique Cementogenic Property under In Vitro and In Vivo Conditions. *Stem Cells Dev.* 2017 Jan 31. doi: 10.1089/scd.2016.0330.
- 2) Fujimoto M, Suda N, Katagiri T. Molecular mechanisms for activation of mutant activin receptor-like kinase 2 in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Journal of Oral Biosciences.* doi:10.1016/j.job.2017.03.004
- 3) 権田秋華, 真野樹子, 長谷川紘也, 須田直人. ニッケルアレルギーに配慮し上顎歯列の狭窄と骨格性開咬に対し SARPE と上下顎同時移動術を施行した 1 例. *Orthodontic Waves-Japanese Edition*, 76, 39-45 (2017.3)
- 4) Sasaki A, Hasegawa N, Adachi K, Sakagami H, Suda N. Orthodontic treatment-induced temporal alteration of jaw-opening reflex excitability. *J Neurophysiol.* 118, 2289-2295, 2017. (10.1152/jn.00379. 2017).
- 5) Minoda A, Mizoguchi N, Kobayashi M, Suda N, Muramoto K. Intracortical signal processing of periodontal ligament sensations in rat. *Neuroscience*, 335, 212-224, 2017 (10.1016/j.neuroscience. 2017.04.045)
- 6) Suda N. Growth of maxillo-facial region and related anomalies. *Clin Calcium*, 27, 1357-1362, 2017 (CliCa171013571362)

- 7) Machiya A, Tsukamoto S, Ohte S, Kuratani M, Fujimoto M, Kumagai K, Osawa K, Suda N, Bullock AN, Katagiri T. Effects of FKBP12 and type II BMP receptors on signal transduction by ALK2 activating mutations associated with genetic disorders. *Bone*, 111, 101-108, 2018.

[学会発表] (計 22 件)

- 1) Mano M. A Japanese Nationwide Survey on Occlusal Outcome after Orthodontic Treatment for Patients with UCLP, 13th International Cleft Congres, 8-12 February, 2017, Chennai, India.
- 2) Suda N. Maxillary canine inclination after gingivoperiosteoplasty in patients with unilateral cleft lip and palate (UCLP), 13th International Cleft Congres, 8-12 February, 2017, Chennai, India.
- 3) Suda N. Occlusal management of CLP children in non-metropolitan Japanese area, 13th International Cleft Congres, 8-12 February, 2017, Chennai, India.
- 4) 真野樹子. 多施設共同研究による片側性唇顎口蓋裂の矯正歯科治療後の咬合評価. 第 40 回日本口蓋裂学会. 2016 年 5 月 26-27 日, 大阪市, 大阪.
- 5) 須田直人. 先天性多数歯欠如症例への集学的アプローチ. サテライトセミナー. 2016 年 11 月 7 日, 徳島市, 徳島.
- 6) 真野樹子. シンポジウム「頭蓋外顔面外科領域での外科医と矯正歯科医のコラボレーション」咬合と呼吸機能の改善から考

- える頭蓋骨縫合早期癒合症の治療計画.
第34回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会.
2016年11月10-11日, 東京.
- 7) 藤本舞, 真野樹子, 時岡一幸, 長谷川紘也,
重松久夫, 奥結香, 中塚貴志, 坂下英明,
須田直人. 歯肉骨膜形成術を施行した片
側性唇顎口蓋裂児における上顎永久犬歯
の歯軸傾斜. 第40回日本口蓋裂学会. 2016
年5月26-27日, 大阪市, 大阪.
- 8) 土屋隆子, 長谷川尚哉, 坂上宏, 安達一典,
須田直人. 矯正治療に伴う疼痛に対する
炭酸ガスレーザーの効果. 第10回 三叉神
経領域の 感覚 - 運動統合機能研究会.
2016年11月26-27日, 長野.
- 9) 川尻朱美, 松井成幸, 佐々木会, 遠藤則和,
上里忠成, 東金由莉, 須田直人. 骨格性反
対咬合症例における下顎窩の位置と頭蓋
骨形態との関連性. 第26回日本顎変形症
学会. 2016年6月24-25日. 東京
- 10) 長谷川尚哉, 佐々木会, 土屋隆子, 坂上
宏, 安達一典, 須田直人. 矯正歯科治療に
伴う疼痛に対する新規疼痛制御物質の探
索. 第134回日本薬理学会関東部会. 2016
年7月9日, 栃木.
- 11) 品川令, 佐々木会, 藤本舞, 加藤悠歩, 大
貫那未, 小貫裕之, 嶋田淳, 須田直人. イ
ンプラント補綴と矯正治療により咬合改
善を図った2例. 第75回東京矯正歯科学
術大会. 2016年7月14日, 東京.
- 12) 長谷川尚哉, 佐々木会, 土屋隆子, 坂上
宏, 安達一典, 須田直人. 矯正治療に伴う
疼痛に対する新規疼痛制御物質の探索.
第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8
月24-26日, 北海道.
- 13) 町谷亜位子, 自見英治郎, 須田直人, 片
桐岳信. 成体マウスの切歯形成における
TGF- β ファミリーの関与. 第58回歯科基
礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日,
北海道.
- 14) 箕田碧, 溝口尚子, 村本和世, 須田直人.
歯根膜領域刺激の情報処理における体性
感覚野および島皮質の役割. 第75回日本
矯正歯科学会大会. 2016年11月7-9日, 徳
島.
- 15) 長谷川尚哉, 佐々木会, 土屋隆子, 坂上
宏, 安達一典, 須田直人. 矯正治療に伴う
疼痛に対する動物モデルを用いた評価系
の開発 -第3報- : 種々の疼痛制御物質の
評価. 第75回日本矯正歯科学会大会. 2016
年11月7-9日, 徳島.
- 16) 大貫那未, 森脇由華, 金子優, 加藤悠歩,
大塚雄一郎, 須田直人. 舌小帯切除を施行
した舌強直症4例における舌機能の定量
的評価. 第75回日本矯正歯科学会大会.
2016年11月7-9日, 徳島.
- 17) 真野樹子, 藤本舞, 品川令, 土屋隆子, 土
肥洋介, 長谷川紘也, 須田直人. 唇顎口蓋
裂児の術前顎矯正における口腔内スキャ
ナ使用の試み. 第75回日本矯正歯科学会
大会. 2016年11月7-9日, 徳島.
- 18) 町谷亜位子, 自見英治郎, 片桐岳信, 須
田直人. 生後のマウス切歯形成における
Smad4 の関与. 第75回日本矯正歯科学会
大会. 2016年11月7-9日, 徳島.
- 19) 長谷川尚哉, 佐々木会, 土屋隆子, 坂上
宏, 安達一典, 須田直人. 矯正治療に伴う
疼痛に対する作用機序の異なる疼痛制御

物質の評価. 第 10 回 三叉神経領域の 感
覚 - 運動統合機能研究会. 2016 年 11 月
26-27 日, 長野.

20) 豊田亜希子, 品川 令, 時岡一幸, 須田
直人. 早期顎裂閉鎖の成績向上を目的とし
たヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた歯
槽再生. 第 42 回日本口蓋裂学会総会・
学術集会, 2018 年 5 月 24-25 日, 大阪.

21) 真野樹子, 長谷川紘也, 藤本舞, 品川
令, 奥結香, 時岡一幸, 坂下英明, 須田
直人. 歯肉骨膜形成術 (GPP) 施行例
と非施行例における顎発育の短期成績
の比較. 第 42 回日本口蓋裂学会総会・
学術集会, 2018 年 5 月 24-25 日, 大阪.

22) 藤本 舞, 真野 樹子, 時岡 一幸, 品
川令, 長谷川紘也, 奥結香, 坂下 英明,
須田 直人. 術前顎矯正による上顎歯槽
形態の改善に関する因子の検討. 第
42 回日本口蓋裂学会総会・学術集会,
2018 年 5 月 24-25 日, 大阪.

〔図書〕(計 1 件)

1) 須田直人, マルファン症候群ガイドブ
ック (第 3 版), 9. 歯科医の立場から, 150
- 161 頁, 監修 沼部博直, マルファンネ
ットワークジャパン, 2017 年 2 月 14 日.

〔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: 無

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須田 直人 (SUDA, Naoto)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号: 90302885

(2) 研究分担者

真野 樹子 (MANO, Mikiko)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号: 00333005

時岡 一幸 (TOKIOKA, Kazuyuki)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 70332616

(3) 連携研究者: 無し

(4) 研究協力者: 無し