

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11376

研究課題名(和文) 新たな唇顎口蓋裂治療戦略の開発に向けた臍帯・臍帯血と手術余剰組織による組織再生

研究課題名(英文) Tissue regeneration by umbilical cord / umbilical cord blood and surgical surplus tissue for development of innovative treatment strategy for cleft lip and palate

研究代表者

馬場 香子 (BABA, Kyoko)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90327411

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、臍帯から間葉系細胞(多様な細胞に分化する能力を持つ)を得て、これと骨由来の細胞を共培養(培養液などを共有して共に培養する方法)し骨芽細胞を、軟骨細胞を共培養して軟骨組織を得た。これにより、無侵襲で得られる本人臍帯から、手術に必要な組織・細胞を得られる可能性が示唆された。加えて、これらの再生医療材料の凍結保存は安全である可能性が高く、手術で必要とするまで一定期間の保存ができることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唇顎口蓋裂の治療は長期にわたり、かつ複数回の手術を要する。機能を回復するためには、先天的に欠損している組織を補うため手術で体の他の部位から採取し、必要とする部位に移植しなければならない。現在は手術に際して、必要な種類と量の組織を患児本人から採取している。このような患児の外科的侵襲軽減は長年の課題である。

本研究結果から、出生時に無侵襲で得られる臍帯・臍帯血を活用し、凍結保存後に組織再生を行える可能性が示唆された。これにより、必要な組織の採取が軽減され、低侵襲な治療戦略開発に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We conducted the present study to investigate osteogenesis and chondrogenesis by using human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells (UC-MSCs) under co-culture. Consequently, the differentiation of UC-MSCs into osteoblasts and chondrocyte were verified. In addition, the safety of cryopreserved UC-MSCs were indicated. The provision of autologous tissues as biomedical materials for regenerative medicine suggests the possibility of the safe clinical application thereof to pediatric patients.

研究分野：外科系臨床医学 形成外科学 再生医療

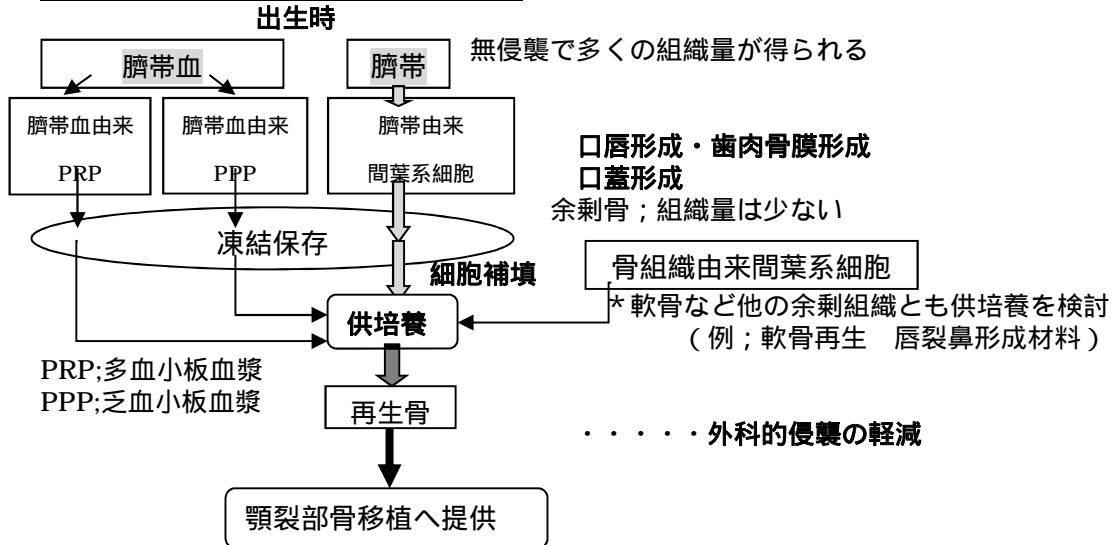
キーワード：臍帯由来間葉系細胞 臍帯 臍帯血由来多血小板血漿 臍帯血 凍結保存 共培養 骨再生 軟骨再生

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂は日本人に比較的高頻度頻度に認められる先天異常である。その治療は新生児期から成人期まで長期間におよび複数回の手術を要する。この一連の治療の中で正常な咬合の獲得は重要である。このためには顎裂骨欠損部に骨を形成して歯牙の適切な萌出を促さねばならない。この難題に対し過去より多くの専門家が治療法を検討してきた。骨形成環境に着目した Millard らの報告 (1999 年) をもとに、我々も適応患者に対し歯肉骨膜形成術を行っている。しかし骨量不足となる症例が存在し、腸骨海面骨の顎裂部骨移植を混合歯列期に施行している。それでも移植骨吸収や成長による骨変形のため複数回の移植を要する症例が存在する。このような患児への外科的侵襲を軽減することは長年の大きな課題である。我々は骨形成細胞の補填で顎裂部骨形成の改善が期待できると考えている。近年、間葉系幹細胞の臨床応用の期待が高まっている。当教室も間葉系細胞の骨形成能を用い顎裂部の骨形成を改善する方法を検討してきた。これまで、骨髄由来間葉系細胞の分離・増殖・凍結保存法を確立【Shimakura Y.ら J Craniofacial Surge, 2003 年】し、ハイブリッド型人工骨を開発【Matsuo A.ら J Craniofacial Surge 2008 年】してきた。間葉系幹細胞が注目されるなか、臍帯由来間葉系細胞の存在も認識されるようになった【Lee O.K. ら Blood 103:1669-167,2004】。臍帯・臍帯血は出産時に容易に無侵襲で多量の組織を採取できる。胎児エコー検査等で先天異常の出生前診断がつけば出生時に採取した臍帯・臍帯血を自己の治療に利用できる。自家組織は倫理面・安全面で優れており、患児への利点は大きい。以上より我々は臍帯由来間葉系幹細胞と臍帯血由来組織からの骨組織形成を目的とした研究を 2008 年開始し【馬場香子 2009 年科学研究補助金若手 (B) 課題番号: 21791750】骨芽細胞への分化を確認した【Baba. K.ら J Craniomaxillofacial Surg, 2012 年】。しかしながら、臍帯由来間葉系細胞は骨髄由来間葉系細胞と同条件では骨組織形成に至っていない。間葉系幹細胞はその供給組織により相違があると報告【梅澤明弘ら日本臨床 2008 年】されるが、我々の研究でも骨髄由来と臍帯由来の間葉系細胞の動態には相違があった【馬場香子 2009 年科研費若手 (B)】。また、胎児と成人の間葉系幹細胞の性質は異なり【Dominici M.ら Cytotherapy 2006 年】、臍帯由来間葉系幹細胞は胎児と成人の幹細胞の中間の性質で柔軟な分化能を有するとの報告がある【Orbay H.ら 2012 年】。即ち、骨髄由来間葉系幹細胞より臍帯由来間葉系幹細胞は多くの要因に組織形成に影響される可能性が示唆される【Baba K.ら Perinatal Stem Cells, 2013 年】。これらより、臍帯由来間葉系細胞は単一での硬組織形成は困難であるが、その特徴より共培養する細胞の特徴に影響されると推論した。臍帯由来間葉系細胞と骨由来間葉系細胞との共培養により効率的な骨組織再生が可能ではないかと考え、本研究で検討を行う。出生時に採取した臍帯・臍帯血由来組織を凍結保存し、歯肉骨膜形成手術時に得られた余剰組織と共培養することで骨組織が得られないかを検討する。余剰組織が少量でも臍帯は無侵襲で大きな組織量を得られるので、臍帯由来間葉系細胞が骨形成細胞を増加・補填となる。また、共培養することで、骨以外の組織再生の細胞補填供給源として広く活用できないかと考えた。この可能性が見いだせれば多様な組織欠損へ応用範囲が拡大する。この検討に手術で得られる余剰組織-具体的には、骨・軟骨・脂肪・粘膜など-との共培養による組織再生の preliminary study を行う。本研究において臍帯血由来多血小板血漿の活用を予定する。多血小板血漿は多様な成長因子を含有し、有用性は認識されている。我々は末梢血ではなく臍帯血から多血小板血漿を得てきた【馬場香子 2009 年科研費若手 (B)】。臍帯血由来成長因子が臍帯由来間葉系幹細胞の骨分化に有利に働くとの報告がある【Murphy M.ら Biomaterials 2012 年】。我々も臍帯血由来血小板血漿の有用性を報告した【Baba. K.ら J Craniomaxillofacial Surg, 2012 年】【Baba. K.ら J Craniomaxillofacial Surg, 2013 年】【Baba K.ら Cord Blood: Banks and Banking, Ethical Issues and Risks/Benefits, 2013】。出生時に採取する臍帯・臍帯血の臨床応用には凍結保存が必要と考え、すでに臍帯由来間葉系細胞と臍帯血由来血漿の凍結保存を開始している。本研究では凍結保存した臍帯血由来多血小板血漿の活性と、臍帯由来間葉系細胞の細胞活性と安全性を検討する。凍結保存した臍帯・臍帯血由来の材料を活用した組織再生により、新たな治療戦略開発に寄与し、患児の負担軽減に貢献したいと本研究の着手に至った。

【 本研究で目指す新たな治療戦略 】



2. 研究の目的

本研究では臍帯由来と骨由来の間葉系細胞を共培養して骨組織形成を検討し、共培養での臍帯由来間葉系細胞の可能性を検討する。加えて臨床応用への展開を見据え、凍結細胞と臍帯由来材料の凍結保存の安全性を検討する。

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞の細胞活性と安全性の確認

凍結保存後の臍帯由来多血小板血漿の成長因子活性

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と余剰骨由来間葉系細胞の共培養方法の確立

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と軟骨等余剰組織由来細胞の共培養方法の確立

3. 研究の方法

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞の細胞活性と安全性の確認

安全性を、細胞形態・細胞増殖率・real time RT-PCR による human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT) 遺伝子発現・FISH (SKY 法) による染色体数および構造異常で安全性を検討した。細胞活性は骨分化誘導後に ALP 活性測定とカルシウム-Ca-定量で行った。また、

ヌードマウスに移植し骨組織の組織学・免疫組織学的に検討した。

Primer sequences (Primer 3 GeneBank sequence)

hTERT

Forward; cgggtgtgcaccaacatctac

Reverse; ggggtcttccaaacttgctg

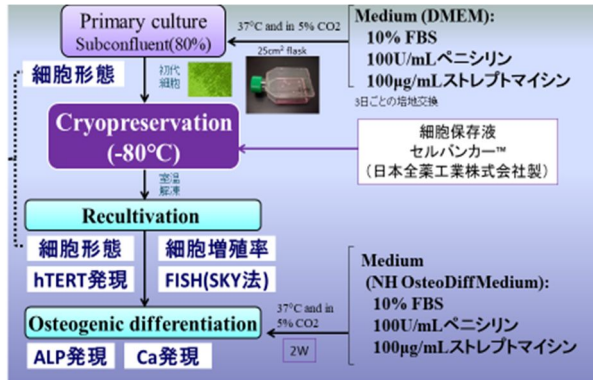
TATA box binding protein (TBP)

forward; ttcggagagtctgggatg

reverse; ctcatgattaccgcagcaaa

PCR primers; Primer 3 software program

(<http://primer3.sourceforge.net/>)



凍結保存後の臍帯由来多血小板血漿の成長因子活性

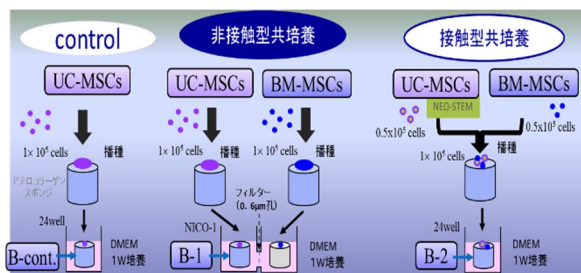
PDGF, TGF- β , VEGF, EGF の含有量を ERISA で測定した。

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と余剰骨由来間葉系細胞の共培養方法の確立・骨形成評価 in vitro: 凍結保存臍帯由来間葉系幹細胞と骨由来間葉系細胞を非接触型・接触型で共培養し骨分化誘導後に HE 染色・アリザリンレッド染色で確認した。

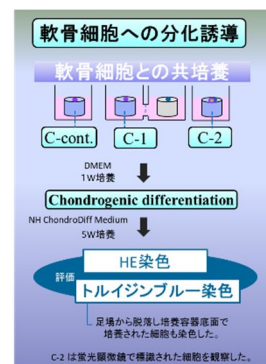
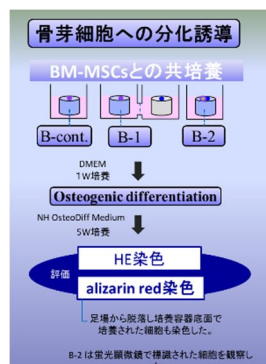
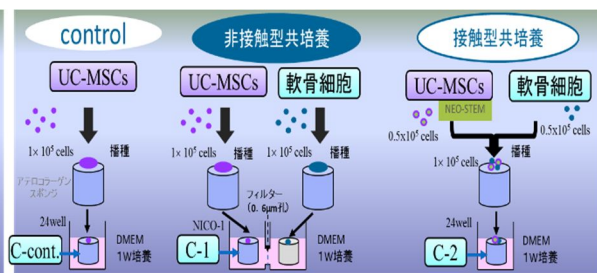
凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と軟骨・脂肪等余剰組織由来細胞の共培養方法の確立。

Seo ら (Lancet. 2004 年) の報告を参考に共培養で軟骨形成を行い組織学的に検討した。

《骨髄由来間葉系細胞との共培養》



《軟骨細胞との共培養》



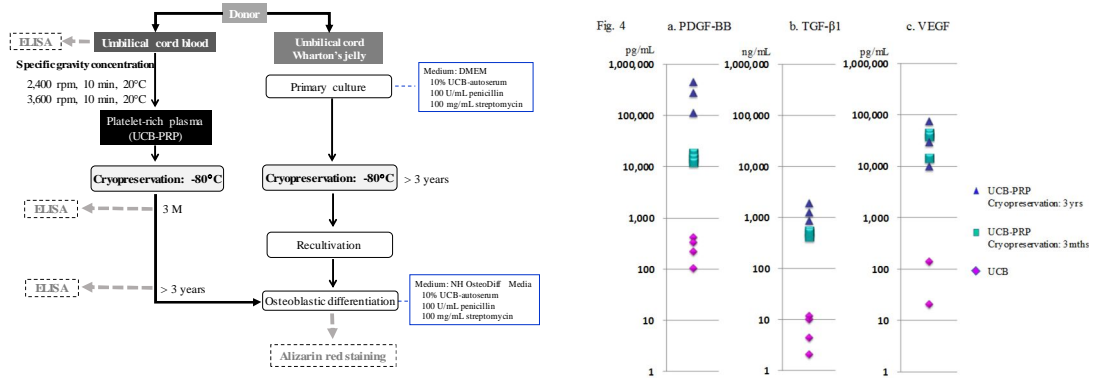
4. 研究成果

凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞の細胞活性と安全性の確認

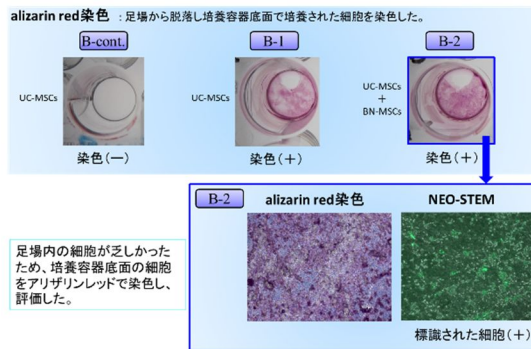
凍結保存後の細胞の増殖率は継代に伴い減少し、有限であった。継代を繰り返すと細胞は次第に粗大で不均一になった。また、hTERT 遺伝子発現は認めなかった。加えて染色体数・構造に異常は認めなかった。以上より、検索しえた範囲で凍結細胞の安全性は示された。また、ALP 活性が優位に増加し、Caの発現も認められ、細胞活性が保たれていることが示された。ラットの頭蓋骨へ移植した検体内に、UC-MSCs 由来の骨組織を確認できた。

凍結保存後の臍帯血由来多血小板血漿の成長因子活性

凍結後、成長因子含有量は増加し、生物活性も保たれていた。

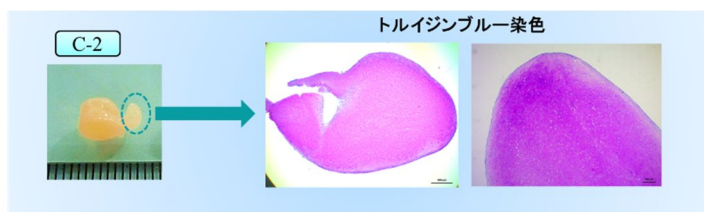
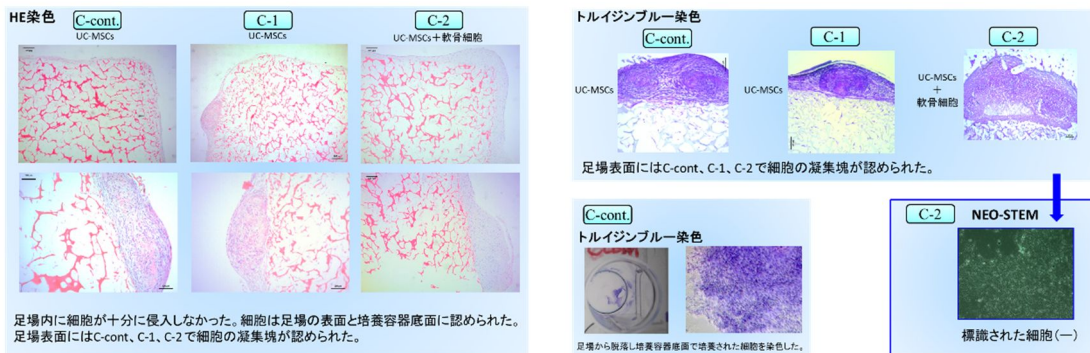


凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と余剰骨由来間葉系細胞の共培養方法の確立・骨形成評価
共培養により骨芽細胞への分化誘導が確認できた。接触型共培養と非接触型共培養に有意な差は観察されなかった。足場内に細胞が乏しくさらなる検討を要すると考える。



凍結保存後の臍帯由来間葉系細胞と軟骨等余剰組織由来細胞の共培養方法の確立

共培養により軟骨細胞への分化誘導が確認できた。接触型共培養より非接触型共培養が有利である可能性が示唆された。足場内に細胞が乏しくさらなる検討を要すると考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Baba Kyoko, Yamazaki Yasuharu, Sone Yumiko, Sugimoto Yoshika, Moriyama Kazuno, Sugimoto Takayuki, Kumazawa Kennichi, Shimakura Yasuhito, Takeda Akira	4. 巻 47
2. 論文標題 An in vitro long-term study of cryopreserved umbilical cord blood-derived platelet-rich plasma containing growth factors?PDGF-BB, TGF- β , and VEGF	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 668 ~ 675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.01.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 17Kazuno Moriyama, Yasuharu Yamazaki, Yoshika Sugimoto, Takayuki Sugimoto, Kennichi Kumazawa, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Akira Takeda	4. 巻 50
2. 論文標題 Differences in pluripotency of jawbone- and iliac bone-derived mesenchymal cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Kitasato Medical Journal	6. 最初と最後の頁 18-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 馬場香子	4. 巻 308
2. 論文標題 形成外科医が伝えたい創傷のお話し 形成外科のご紹介から最近のトピックまで	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 北足立郡医師会会報	6. 最初と最後の頁 37-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Yumiko Sone, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Akira Takeda
2. 発表標題 Umbilical cord blood derived fibrin net and platelet-rich-plasma have potency in osteogenic regenerative medicine.
3. 学会等名 Society For Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Yasuharu Yamazaki, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Takayuki Sugimoto, Takanori Iwata, Satoru Onizuka, Akira Takeda
2. 発表標題	Biological differences of human mesenchymal cells derived from different bone tissues and comprehensive gene expression analysis.
3. 学会等名	Society For Biomaterials (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Yoshika Sugimoto, Yasuharu Yamazaki, Kazuno Moriyama, Kyoko Baba, Yumiko Sone, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Akira Takeda
2. 発表標題	Examination of Exosome purification method derived from culture supernatant of the mesenchymal cells from human ilium bone(hBMCs) which we chose and the bone differentiation inducibility.
3. 学会等名	Society For Biomaterials (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Yumiko Sone, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Akira Takeda
2. 発表標題	Cryopreserved Umbilical cord derived Mesenchymal Stromal Cells have Osteogenic potency as the source of osteogenic regenerative medicine.
3. 学会等名	14th KJPRS (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Yumiko Sone, Yoshika Sugimoto, Kazuno Moriyama, Takayuki Sugimoto, Kenichi Kumazawa, Akira Takeda
2. 発表標題	Co-culture of Umbilical Cord derived Mesenchymal Stem Cells (UCMSCs) and Bone Marrow derived Mesenchymal Stem Cells (BMMSCs) /Chondrocytes improved the Osteogenic/Chondrogenic differentiation.
3. 学会等名	TERMIS World Congress (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 骨由来間葉系細胞の分化能。増殖能・老化現象の確認～20年・15年・10年・5年・1年と保存されたものを比較して.
3. 学会等名 第21回北里形成外科フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森山和の、杉本佳香、山崎安晴、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 顔面骨由来および腸骨由来間葉系細胞の多分化能の差異について.
3. 学会等名 第21回北里形成外科フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場香子、山崎安晴、曾根由美子、杉本佳香、森山和の、熊澤憲一、杉本孝之、武田啓
2. 発表標題 共培養で得られた臍帯間葉系細胞由来再生軟骨の組織学的評価
3. 学会等名 第18回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 骨組織由来間葉系細胞の分化能・増殖能・老化現象の確認～20年・15年・10年・5年・1年の保存検体を用いて～
3. 学会等名 第18回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山和の、山崎安晴、杉本佳香、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 顎骨由来および腸骨由来間葉系細胞の多分化能の差異について .
3. 学会等名 第18回再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場 香子
2. 発表標題 臍帯由来間葉系細胞の共培養における組織形成
3. 学会等名 第26回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場 香子
2. 発表標題 共培養における臍帯由来間葉系細胞の骨・軟骨分化能
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場 香子
2. 発表標題 凍結保存後臍帯由来間葉系細胞の骨形成能と安全性 (第2報)
3. 学会等名 第25回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 杉本佳香、山崎安晴、森山和の、杉本孝之、熊澤憲一、馬場香子、曾根由美子、武田啓
2. 発表標題 長期凍結保存した骨由来間葉系細胞の分化能・増殖能の検討-20年、15年、10年、5年、1年の保存検体を比較して
3. 学会等名 第28回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場香子
2. 発表標題 形成外科医が伝えたい創傷のお話し～形成外科のご紹介から最近のトピックまで～
3. 学会等名 桶川北本伊奈地区医師会 学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山崎 安晴 (Yamazaki Yasuharu) (00210401)	北里大学・医学部・非常勤講師 (32607)	
研究分担者	武田 啓 (Takeda Akira) (20197297)	北里大学・医学部・教授 (32607)	
研究分担者	杉本 孝之 (Sugimoto Takayuki) (20365133)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	熊澤 憲一 (Kumazawa Kenichi) (60383618)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
連携 研究者	望月 純子 (Mochizuki Junko) (90306613)	北里大学・医学部・準教授 (32607)	