

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19301

研究課題名（和文）ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いた早期顎裂閉鎖に向けた基礎研究

研究課題名（英文）The basic study for early closure of alveolar clefts using human umbilical cord mesenchymal stem cells

研究代表者

品川 令（SHINAGAWA, Rei）

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：90818296

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：唇顎口蓋裂児の顎裂は、口腔の形態と機能の異常の原因となる。近年、唇顎口蓋裂児の早期顎裂閉鎖を目的として、口唇形成術施行時に歯肉骨膜形成術（GPP）が行われている。GPPにおいて、間葉系幹細胞（MSCs）を用いた再生医療により、顎裂間の骨架橋形成の改善が期待できる。本研究では、顎裂モデルラットへの移植によるヒト臍帯（hUC）由来MSCsの骨形成能を検討した。hUC由来細胞は、in vitroにおいてMSC遺伝子/表面抗原の発現と多分化能を示した。マイクロCTおよび組織学的染色の結果、in vivoにおいてhUC由来細胞は担体単独移植よりも多くの骨形成を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髓液とは異なり、臍帯はその採取が極めて容易で、患児や母体に対する侵襲性もないため、臨床応用を想定した時の利便性に優れている。また、従来MSCsの培養にはウシ胎仔血清（fetal bovine serum: FBS）含有培養液が多用されているが、FBSの使用は、プリオンや病原性ウイルスなどの未知の感染因子の混入や免疫反応などのリスクを伴う可能性がある。異種成分を含まない（ゼノフリー）無血清培養臍帯由来幹細胞を使用した顎裂部骨再生の臨床応用が可能となれば、唇顎口蓋裂児のQOL向上に繋がる。本研究で得られた知見は、唇顎口蓋裂以外の歯槽部骨欠損の再建を目的とした歯科の再生医療においても有用である。

研究成果の概要（英文）：The alveolar cleft causes the morphological and functional abnormality in cleft lip and palate patients. Recently, gingivoperiosteoplasty (GPP) is performed with cheiloplasty for early closure of the alveolar cleft. At GPP, regenerative medicine using mesenchymal stem cells (MSCs) is expected to improve the bone bridge formation between alveolar clefts. In this study, we examined the bone formation ability of MSCs derived from the human umbilical cord (hUC) by transplantation into the rat alveolar cleft model. Cells derived from hUC showed MSC gene/surface marker expression and multipotency in vitro. The results of micro computed tomography and histological staining showed that the cells derived from hUC induced more abundant bone formation than scaffold implantation solely in vivo.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：再生医療 唇顎口蓋裂 臍帯由来間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂児の顎裂は、口腔の形態と機能の異常の原因となる。近年、唇顎口蓋裂児の顎裂閉鎖において、しばしば歯肉骨膜形成術 (gingivoperiosteoplasty: 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の獲得は、口腔機能の正常な発達や、顎裂への舌の侵入防止を、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。これまで申請者の所属機関では、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 (松本ら、日口蓋誌、2013)。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はなく、垂直的にも唇舌的にも骨形成量が不十分な例もあった (真野ら、日口蓋誌、2014)。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である。

骨架橋形成量の向上には、顎裂部での骨再生が効果的と考えられる。再生医療の分野では、胚性幹細胞 (embryonic stem cell; ES 細胞) や人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS 細胞) に関する研究が盛んであるが、これらの細胞は腫瘍化の危険性があり、臨床応用のためには解決すべき課題も多い。その一方で、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells: MSCs) は生体に由来する組織幹細胞であるため、腫瘍化やがん化の危険性が低く、安全な臨床応用が期待できると考えられている (Zuk PA et al., Tissue Eng 7, 2001)。MSCs は成体マウスの骨髄吸引液中から同定され (Friedenstein AJ et al., Exp Hematol 4, 1976)、再生医療の幹細胞移植療法の細胞源として有力視されてきた。しかし、骨髄由来幹細胞を分離するには、骨髄液を得るために骨髄穿刺を行わなければならない、患者の負担が大きいことが欠点の一つとして挙げられてきた。現在申請者の所属機関の関連施設においても、IRB の承認のもと、GPP と共に患児由来の骨髄を移植することで、その成績向上を図っている。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もある。現在、「どのようにすれば、乳児期の骨髄採取に伴う問題点を解決し、顎裂部の骨架橋形成量を向上させることができるか」は未だ不明である。

2. 研究の目的

骨髄液以外の幹細胞源が模索される中で、近年、母体や胎児に対し外科的侵襲を伴わず採取できる臍帯由来間葉系幹細胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells: UCMSCs) が注目されている (Yuri A et al., Stem Cells 21, 2003)。通常これらは医療廃棄物となる臍帯から得られるため倫理的問題が少なく、自家幹細胞を用いた安全な臨床応用として期待されている。申請者らはこれまで、GPP 施行後に顎裂部に形成される骨架橋量を、未分化性が高く、出生後不要となるヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells: hUCMSCs) の移植により向上させることを目的として、歯槽骨欠損モデル動物を作製し、骨形成能を検討してきた。本研究課題においては、引き続き *in vivo* での解析を進めると共に、更に他種由来成分を含まない (ゼノフリー) 細胞培養法を用いて、将来的な臨床応用に向けたより安全かつ実践的な基礎技術の確立を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 異なる分離・培養法で得られた hUCMSCs の *in vitro* における幹細胞特性の評価

ヒト臍帯は、産科医院で同意を取得後、予定帝王切開を施行した健常な満期妊産婦から採取した（ヒト臍帯を用いたすべての実験は、当該医院及び明海大学歯学部倫理委員会の承認済 A1603）。臍帯からのヒト臍帯間質細胞（human umbilical cord stromal cells: hUCSCs）の分離は、静置培養法（outgrowth法）および酵素処理により細胞を解離する方法（enzymatic digestion）により分離した。具体的には、臍帯を5 cm毎に切断後、片刃メスにて約2×2 mmに細切し、細切した組織小片を培養皿に静置した。市販のヒト間葉系幹細胞用ゼノフリー培地で培養を行い、組織小片から外生した付着細胞を、UC-XENOとした。一方で、細切した臍帯組織小片をcollagenase/dispase混合溶液中で酵素処理を行った後、10%ウシ胎仔血清（fetal bovine serum: FBS）含有 - minimum essential medium（MEM）培地で培養を行ったものをUC-EZとした。UC-EZをもとに磁気分離法（magnetic associated cell sorting: MACS）を用いて、CD146陽性細胞の分離を行ったものをUC-MACSとした。*In vitro*における多分化能、MSC関連マーカー/遺伝子発現等の幹細胞特性を比較解析した。

（2）歯槽骨欠損モデルラットへの細胞移植実験による *in vivo* での骨架橋形成能評価

先行研究（Nguyen P et al, *Plast Reconstr Surg*, 2009）に従い、16週齢の雄性SDラット上顎骨歯槽部に低速エンジン、カーバイドバーを用いて、 $5 \times 2.5 \times 1 \text{ mm}^3$ の骨欠損を作製した。担体として用いるハイドロキシアパタイト+コラーゲン複合物（HA + CoI）上に播種したUC-MACSをラット歯槽骨欠損モデルに移植し、非移植群、HA + CoI単独移植群、HA + CoI + UC-MACS移植群の骨架橋形成を比較した。いずれも8週間後にサンプリングを行い、 μ CT撮影による三次元形態解析や、組織切片を用いた組織学的検討（一般染色、免疫組織化学染色）により、骨欠損部の骨架橋形成を定量的・定性的に評価した。

（3）カルデクリン遺伝子発現による骨吸収抑制の検討

口唇口蓋裂の治療では、顎裂部骨移植後に、歯列矯正により適切な位置に歯を並べる必要がある。ヒト臍帯由来間葉系幹細胞を用いたアプローチは将来的には顎裂部の歯槽骨再生に有用なバイオリソースとなりえる可能性がある。しかしながら、歯列矯正による歯の移動は、歯槽骨のリモデリングを伴いながら行われる。そのため、顎裂部の歯槽骨再生によって出来た骨が、歯の移動に伴う骨代謝によって吸収される可能性は否定できない。そこで、この骨代謝を制御することが可能となれば、顎裂部骨移植後の骨吸収を抑制することが可能になるのではないかと考えた。今回、骨代謝において、骨吸収を担う破骨細胞の制御出来ないかと考えた。そこで、以前から所属分野で解析が進められているカルデクリンの遺伝子発現による関節リウマチへの影響について解析を行った。

実験動物として、関節炎誘発モデルマウス（DBA/1J、雄性）を用いた。製作には、牛型コラーゲンを2回皮内投与し、後足のみを対象として全指に腫脹もしくは変形を認めた個体のみを実験に使用した。実験は、関節炎誘発モデルマウスの大腿部に筋肉内注射を1度行い、関節リウマチによる骨吸収に対するカルデクリンの薬剤効果を確認した。

投与する薬剤として、カルデクリンをコードする遺伝子のcDNAを、制限酵素を用いて組み込んだプラスミドDNAを製作した。製作したプラスミドDNAは、Applied Biosystems 3730xl DNA analyzer（ThermoFisher製）を用いてインサートしたcDNAのすべての塩基配列を確認した。実験は、3群（カルデクリン投与群：関節炎を誘導し、カルデクリンプラスミドDNA投与した群、Vehicle群：関節炎を誘導し、生理食塩水投与した群、Normal群：偽手術を施行し、生理食塩水を投与した群）に分けて行った。マウスの大腿部に投与し、4週間後に屠殺

した。その後、試料を用いて非脱灰切片およびリアルタイム PCR で検討した。なお、本研究は明海大学歯学部遺伝子組換え実験安全運営委員会の承認（0128）と明海大学歯学部動物実験倫理委員会の承認（承認番号：A2009）を得て実施した。

4. 研究成果

(1) 異なる分離・培養法で得られた hUCMSCs の *in vitro* における幹細胞特性の評価

細胞形態は、いずれも線維芽細胞様細胞形態を示した。表面抗原解析では、血球系マーカー（CD14、CD19、CD34、CD45）がすべて陰性であったのに対し、間葉系幹細胞マーカー（CD44、CD73、CD90、CD105、CD146）はいずれも陽性であった。UC-EZ、UC-MACS は多分化能を有し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化を認めた。リアルタイム PCR の結果、UC-XENO は UC-EZ と同等の未分化維持関連遺伝子（*NANOG*、*SOX2*、*OCT3/4*）の発現を認めた。

(2) 歯槽骨欠損モデルラットへの細胞移植実験による *in vivo* での骨架橋形成能評価

μCT 所見及び組織学的染色の結果、非移植群では骨架橋形成は認められなかったが、HA + Col 単独移植群では薄い骨架橋形成を認めた。さらに HA + Col + UC-MACS 移植群ではより多くの骨架橋形成と周囲の新生骨の形成を認めた。免疫組織化学染色の結果、HA+Col 単独移植群と HA+Col+UC-MACS 移植群では、新生骨の骨表面と骨中に埋入されたオステオポンチン陽性細胞を認めた。HA+Col+UC-MACS 移植群においては、ヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞が新生骨表面に沿って認められ、UC-MACS が顎裂間の骨架橋形成に関与したことが示唆された（図 1、Cell Transplantation, 2021）。

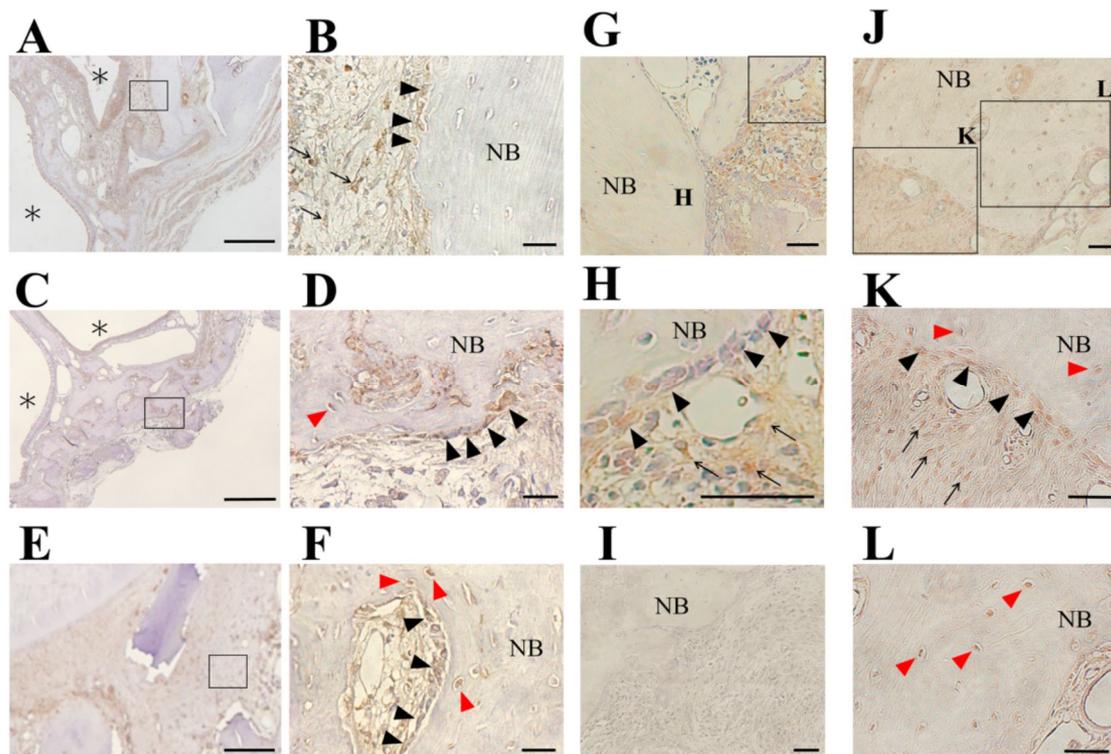


図 1. 移植 4 週/8 週後のラット歯槽骨欠損の免疫組織化学的染色
 移植 8 週後のオステオポンチン（OPN）の免疫組織化学的染色（A-F）、対照群（A、B）、HA + Col 単独移植群（C、D）、HA + Col + UC-MACS 移植群（E、F）。B、D、F は、それぞれ A、C、E の四角で囲まれた領域の高倍率像。矢印は OPN 陽性細胞を示す。
 移植 4 週後（G-I）および 8 週後（J-K）のヒト特異的ミトコンドリアの免疫組織化学的染色。HA + Col 単独移植群（I）、HA + Col + UC-MACS 移植群（G、H、J-L）。H は G の、K と L は J の四角で囲まれた領域の高倍率像。矢頭と矢印はヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞を示す。

(3) カルデクリン遺伝子発現による骨吸収抑制の検討

カルデクリン投与群は、Vehicle 群と比較して、大腿骨の骨端線において明らかな再生を認めた。骨量も増加傾向が認められ、骨芽細胞数の増加と破骨細胞数の減少が骨形態計測において認められた。また、カルデクリン投与群は Normal 群と比較すると、同程度の状態を示すことから、カルデクリンは破骨細胞を抑制するだけでなく、正常組織への再生効果も示唆された。

また、リアルタイム PCR において、カルデクリンが MMP-3 産生を抑制することを見出した。関節リウマチで増殖した滑膜細胞から産生される MMP-3 は、軟骨破壊に直接作用し大きな役割を演じている。また、TNF- α も間接的に抑制することから、カルデクリンは病的な破骨細胞の増殖による骨破壊を抑制することが示唆された。

顎裂部における骨移植の状態は病的な状態ではないため一概に判断は出来ないが、カルデクリン投与が骨吸収を抑制する可能性が高いことから、顎裂部骨移植の際にも骨吸収抑制効果があるのではないかと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Toyota Akiko, Shinagawa Rei, Mano Mikiko, Tokioka Kazuyuki, Suda Naoto	4. 巻 30
2. 論文標題 Regeneration in Experimental Alveolar Bone Defect Using Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689720975391	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木大喜, 李美乃, 品川令, 藤本舞, 長谷川紘也, 真野樹子, 須田直人
2. 発表標題 明海大学病院矯正歯科における過去20年間の口唇裂・口蓋裂患者の臨床統計的検討
3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤本舞, 佐々木会, 品川令, 真野樹子, 坂下英明, 須田直人
2. 発表標題 Le Fort I型骨切り術単独により上顎骨の前下方移動とyawingの改善を図ったUCLPの1例
3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木大喜, 品川令, 藤本舞, 長谷川紘也, 真野樹子, 須田直人
2. 発表標題 明海大学病院矯正歯科における1999年以降の口唇裂・口蓋裂患者の臨床統計
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野尻尚子, 真野樹子, 藤本舞, 品川令, 土屋隆子, 鈴木大喜, 長谷川紘也, 須田直人
2. 発表標題 術前顎矯正治療における光学印象の試み(第4報) 唇顎口蓋裂児における撮像
3. 学会等名 第44回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2020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
研究協力者	須田 直人 (SUDA Naoto)		
研究協力者	真野 樹子 (MANO Mikiko)		
研究協力者	長谷川 紘也 (HASEGAWA Hiroya)		
研究協力者	藤本 舞 (FUJIMOTO Mai)		
研究協力者	豊田 亜希子 (TOYOTA Akiko)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	鈴木 大喜 (SUZUKI Masaharu)		
研究協力者	野尻 尚子 (NOJIRI Naoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関