

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592345

研究課題名(和文) 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  
臨床応用の可能性研究課題名(英文) The cryopreservation of umbilical cord blood derived mesenchymal stem cells and  
the possibility of clinical application of those cells to  
cleft lip and palate patient.

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

研究成果の概要(和文)：

臍帯血由来の間葉系幹細胞を確認することができなかつたため、本研究は臍帯由来の間葉系幹細胞で行った。3か月間凍結保存後の臍帯由来間葉系幹細胞の増殖能・多分化能は骨髄由来間葉系幹細胞のそれらより明らかに劣っていた。凍結保存された骨髄由来間葉系幹細胞は骨誘導培地環境下で骨芽細胞系細胞に容易に分化するのに対して、同条件の臍帯由来間葉系幹細胞は b-FGF 存在下に臍帯由来間葉系細胞を増殖させた後に BMP-2 を添加し骨誘導分化を行ったが in vitro, in vivo の生物学的活性は低値であった。したがって再生骨組織の細胞供給源としての臍帯血及び臍帯由来の凍結保存間葉系幹細胞は臨床応用の可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：

This research was done with the umbilical cord derived mesenchymal stem cells, because the cord blood derived mesenchymal stem cell couldn't be confirmed. Three months of cryopreservation later, the proliferation potency and multipotency of the umbilical cord derived mesenchymal stem cell were apparently inferior to those of bone marrow derived mesenchymal stem cell. The bone marrow derived mesenchymal stem cell differentiated easily in the osteoblast-like cell under the bone induction medium, but the biological bone viability of the umbilical cord derived mesenchymal stem cell was low, even if bone induction was done with added BMP-2 after the umbilical cord derived mesenchymal cell proliferated with b-FGF. Therefore, as cell source for the regenerated bone, We thought that clinical application of the cryopreserved mesenchymal stem cell from an umbilical cord or blood origin was difficult.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：再生医工学，未分化間葉系幹細胞，臍帯血，臍帯

## 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. ら Journal of Craniofacial Surgery 14(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)による再生医工学を用いたハイブリッド型人工骨の開発【Matsui A, Yamazaki Y. ら Journal of Craniofacial Surgery 19(3):693-700, 2008.】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)の由来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、現在、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。

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も、骨組織の絶対

量が不足の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、最近、間葉系幹細胞が臍帯血中から見出されたこと【Lee O. K. et al: Blood(2004)】や臍帯より間葉系幹細胞の分離・増殖の報告【Sarugaser R et.al: Stem Cells (2005)】から新生児の骨組織 donor として臍帯血および臍帯からの間葉系幹細胞に着眼した。また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、出産時の臍帯血および臍帯からの間葉系幹細胞を凍結保存し、初回口唇形成手術に際し再生医工学による骨組織移植が可能となれば学童期での顎裂部骨移植をさらに減少させることが可能と考えこの研究に着手するに至った。

尚、臍帯および臍帯血は当院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提供いただき本研究に使用した。

【北里大学倫理委員会において「B 倫理 07-13」で承認（平成 19 年 5 月 25 日）】

## 2. 研究の目的

臍帯及び臍帯血から再生医療の三要素の細胞、成長因子、担体を確立し、「唇顎口蓋裂」と出生前診断された患児が学童期に受ける顎裂部骨移植を軽減することを目的に基礎研究を行う。臍帯血から上記すべての三要素を分離する。臍帯及び臍帯血から間葉系幹細胞を得る。また臍帯血の上清から自己血清と血漿とを分離し自己血清培地と担体を作製する。さらに多血小板血漿(PRP: Platelet -Rich Plasma)層からは間葉系幹

細胞を分離後 PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, EGF 等を含む PRP 作製する. それぞれを凍結保存し有用性を検討する(図 1).

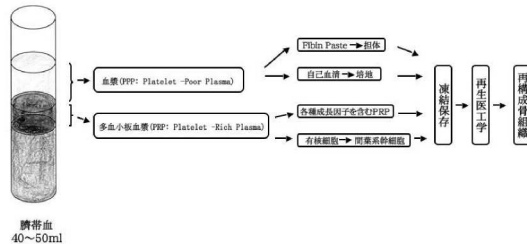


図 1: 自己由来の組織や成分で再構成した再生医療(免疫等の安全面が確保される)

### 3. 研究の方法

提供された臍帯及び臍帯血を初代培養し得られた間葉系幹細胞を凍結保存, 研究に併せて解凍後, その間葉系幹細胞を使用した.

- 1) 臍帯血由来有核幹細胞から間葉系幹細胞の分離・増殖: Lee O. K. et al (2004)の方法により分離・増殖し, 一部細胞に骨誘導をかけ骨芽細胞へ分化させた.
- 2) 臍帯由来有核幹細胞から間葉系幹細胞の分離・増殖: 臍帯からの間葉系幹細胞の分離・増殖を行う. 臍帯由来間葉系幹細胞の多分化能の確認と凍結保存による間葉系幹細胞の増殖能・多分化能の比較・検討 (in vitro, in vivo).
- 3) 臍帯血上清から多血小板血漿 (PRP) と Fibrin Paste (PPP: 担体) とを作製. またそれらの凍結保存の可能性を検討: 多血小板血漿 (PRP: Platelet-Rich Plasma) 層からは, PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, EGF 等を含む PRP 作製した. また血漿層から自己血清培地と Fibrin Paste (担体) を分離した. それぞれを凍結保存し PRP はその成長因子の活性を, Fibrin Paste は担体としての有用性をそれぞれ検討した.

### 4. 研究成果

- 1) 臍帯血由来有核幹細胞から間葉系幹細胞の分離・増殖: いずれの検体(10 検体)も未分化間葉系細胞の増殖が不十分で継体できなかつた. そこで臍帯血由来有核幹細胞からの間葉系幹細胞の分離が難しいと判断し, Sarugaser R et. al (Stem Cells:2005) の報告に従い「臍帯血管周囲組織」より間葉系幹細胞の分離・増殖に 2009 年 1 月より移行した.
- 2) 臍帯由来有核幹細胞からの間葉系細胞の分離・増殖と骨分化能: 臍帯からは比較的容易に間葉系幹細胞の分離が可能であった. 次に臍帯由来間葉系細胞の分化能の確認 (in vitro) として脂肪細胞と骨芽細胞への分化誘導を行い, in vitro 染色の Oil red O 染色と Alizarin Red S 染色でそれぞれの分化誘導が確認された. また臍帯由来間葉系細胞を骨芽細胞への分化誘導時では in vitro で runx-2, アルカリフォスファターゼ, オステオポンチンとオステオカルシンの RT-PCR で発現が認められた. さらに多孔質 Hydroxy-apatite を担体とし臍帯由来間葉系細胞の骨分化誘導細胞をヌードマウスに移植する in vivo の実験系で, 多孔内に硬組織が形成され, HE 染色, ヒトオスレオカルシン免疫染色, ヒトミトコンドリア免疫染色でヒト骨組織であることが確認された. また分化誘導された骨芽細胞の石灰化を観察し, 通常の骨形成であることを走査電顕で確認した.

3 か月凍結保存による臍帯由来間葉系細胞の増殖能・多分化能の詳細を検討した (特に H2 1 年度臍帯由来間葉系細胞は骨芽細胞への分化誘導が通常の骨誘導培地では落ちる傾向にあった. そこで H2 2 年度は BMP 等の骨誘導因子を添加し in vitro, in vivo での生物学的活性を再検討した).

凍結保存可能であった臍帯由来間葉系細胞4検体で行い、増殖能は1検体を除き増殖能の低下が認められた。b-FGF依存により積極的に臍帯由来間葉系細胞を増殖させた後にBMP-2を添加し骨誘導分化を行ったがin vitroの生物学的活性は低値であった。3か月凍結保存による臍帯由来間葉系幹細胞の増殖能・多分化能は骨髓由来間葉系幹細胞のそれらより明らかに劣っており、特に骨髓由来間葉系幹細胞は通常の骨誘導培地環境下で骨芽細胞系細胞に容易に分化するのに対して臍帯由来間葉系幹細胞は積極的な骨誘導を行っても分化抑制が確認された。また多孔質Hydroxy-apatiteを担体として3か月凍結保存による臍帯由来間葉系細胞からハイブリッド型代替骨を作製し、in vivoでその臨床展開への可能性を検討したが明らかな骨組織形成は認められなかった。

3) 多血小板血漿 (PRP) と Fibrin Paste (PPP: 担体) と凍結保存の可能性を検討: PRP は凍結保存を行っても PDGF, TGF- $\beta$ , VEGF, EGF 等の活性が維持されること, Fibrin Paste (担体) は凍結保存を行っても担体として有用であることが判った。

#### 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 6 件)

- ① Chikara Takase, Yasuharu Yamazaki, Aoi Matsuo, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Differing effects of allogenic, heterologous sera and scaffold structures on the bone forming ability of undifferentiated mesenchymal stem cells. The Kitasato Medical Journal 40(2):122-128, 2010. (査読あり)
- ② Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma

Potential of regenerative medicine of bone tissue using the autologous umbilical cord and umbilical cord blood 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery; p359-363 2010. (査読なし)

- ③ Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Kyoko Baba, Eiju Uchinuma: Proliferative and differential potentials of human bone marrow derived mesenchymal cells cultured with autologous serum 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery; p377-382 2010. (査読なし)
  - ④ 山崎安晴, 中久木康一, 石渡靖夫, 瀬崎晃一郎, 内沼栄樹: 唇顎裂症例に対する早期顎裂部骨移植の評価. 日本口腔外科学会雑誌 56(5):305-312, 2010.(査読あり)
  - ⑤ Kazuya Aoyagi, Yasuharu Yamazaki, Aoi Matsuo, Yasuhito Shimakura, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Significance of CD271 in bone marrow mesenchymal stem cell changes by cryopreservation. J Craniofac Surg. 21(3):666-678, 2010. (査読あり)
  - ⑥ Yasuharu Yamazaki, Koichi Nakakuki, Yasuo Ishiwata, Koichiro Sezaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Clinical evaluation of early alveolar bone grafting in patients with cleft lip and alveolus aged younger than 8 years. The 11th International Congress on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies Brazil: 195-197, 2009. (査読なし)
- [学会発表] (計 10 件)
- ① 馬場香子, 山崎安晴, 武田啓, 曾根由美子, 内沼栄樹: 臍帯血由来 fibrin の自家組織

scaffold としての可能性 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 1-2 日.

- ② 山崎安晴, 武田啓, 馬場香子, 曾根由美子, 内沼栄樹: 自己血清培養下におけるヒト骨髄由来間葉系細胞の増殖能と分化能. 第 10 回日本再生医療学会総会 東京 2011 年 3 月 1-2 日.
- ③ Kyoko Baba, Akira Takeda, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Eiju Uchinuma: Potential of UCB-derived Plasma as the source of regenerative medicine ; 12th International Congress of Oriental Society of Aesthetic Plastic Surgery. Tokyo November 1-3, 2010.
- ④ Kyoko Baba, Yasuharu Yamazaki, Kazuya Aoyagi, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Potential of regenerative medicine of bone tissue using the autologous umbilical cord and umbilical cord blood; 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Belgium September 14-17, 2010.
- ⑤ Yasuharu Yamazaki, Akira Takeda, Kyoko Baba, Eiju Uchinuma: Proliferative and differential potentials of human bone marrow-derived mesenchymal cells cultured with autologous serum; 20th Congress of the European Association of Cranio-Maxillo-Facial Surgery. Belgium September 14-17, 2010.
- ⑥ 馬場香子, 武田啓, 山崎安晴, 青柳和也, 曾根由美子, 内沼栄樹: 臍帯由来間葉系幹細胞と臍帯血を用いた骨組織の再生: 第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会 神奈川 2010 年 9 月 16-17 日.
- ⑦ Yasuharu Yamazaki, Koichi Nakakuki, Masahiko Ozeki, Koichiro Sezaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma: Long-term

evaluation of 11 cases who underwent dental implant treatment in bone-grafted alveolar cleft. 6<sup>th</sup> congress of the international cleft palate foundation. Seoul. Korea. June 9-12, 2010.

- ⑧ 馬場香子, 山崎安晴, 武田 啓, 内沼栄樹: 臍帯由来間葉系細胞の骨形成能の検討. 第 9 回日本再生医療学会総会, 広島 2010 年 3 月 18-19 日
- ⑨ 馬場香子, 山崎安晴, 武田 啓, 内沼栄樹: 臍帯由来間葉系細胞の骨形成能の検討. 第 18 回日本形成外科学会基礎学術集会. 東京, 2009 年 10 月 1-2 日.
- ⑩ Yasuharu Yamazaki, Koichi Nakakuki, Yasuo Ishiwata, Koichiro Sezaki, Akira Takeda, Eiju Uchinuma : Clinical evaluation of early alveolar bone grafting in patients with cleft lip and alveolus aged younger than 8 years. The 11th International Congress on Cleft Palate and Related Craniofacial Anomalies. Brazil. September 10-13, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

瀬崎 晃一郎 (SEZAKI KOICHIRO)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号: 20216542  
馬場 香子 (BABA KYOKO)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号: 90327411  
青柳 和也 (AOYAGI KAZUYA)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号: 10337959  
池田泰裕 (IKEDA YASUHIRO)  
北里大学・医学部・助教  
研究者番号: 20327430  
(H20)

(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 (MOCHIDUKI JUNKO)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：90306613