

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390479

研究課題名（和文） 間葉系幹細胞と発生学を考慮した頭蓋顔面再生

研究課題名（英文） Craniofacial regeneration in consideration of mesenchymal stem cells and embryology

研究代表者

平野 明喜 (HIRANO AKIYOSHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90208835

研究成果の概要（和文）：

発生学的解析では非症候群性口唇裂を顎裂の有無で選別検討したが染色体8q24及びその浸透性には関連を見いだせなかった。頭蓋発生時の成長抑制に放射線治療後の変形があるが、非ヒト前臨床試験モデルとしてミニブタを使用したところ、サイトカインである塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)製剤を放射線照射後早期から投与した場合、頭蓋顔面領域においても放射線照射の影響検討は有効であると推測され、幹細胞の移植などによる組織再生治療が有効と推測された。

研究成果の概要（英文）：

Recent genome-wide association studies identified susceptibility loci for nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate (NSCL±P) on 8q24.21, 10q25.3, 13q31.1, 15q13.3, 17q22 and 18q22 in Europe-origin populations. Our study was to determine whether 8q24.21 was a susceptibility locus for the development of NSCL±P in Japanese patients using DNA samples. Our results suggest that the 8q24.21 locus is not associated with susceptibility to NSCL±P in Japanese patients and provide further evidence that ethnicity is a strong factor in determining susceptibility loci, albeit using a limited number of samples. Further study is needed to identify regions involved in the development of NSCL±P in the Japanese population.

Next, a high dose of ionizing external radiation damage to the skin and soft tissue and craniofacial embryonic development results in changes in function as well as in the general body condition. Basic fibroblast growth factor (bFGF) is primarily considered as a potent angiogenic growth factor. Resurfacing with a dermal component is required, and bFGF stimulates wound healing and enhances human skin-derived mesenchymal stem cells under serum-free conditions in a dose-dependent manner. The bFGF improved and maintained the tissue viability after immediate irradiation in the skin and soft tissue through tissue stem cells in situ.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,500,000  | 1,950,000 | 8,450,000  |
| 2010年度 | 3,300,000  | 990,000   | 4,290,000  |
| 2011年度 | 3,600,000  | 1,080,000 | 4,680,000  |
| 総計     | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋顔面領域の再建・再生・修復・治癒を、再生能、増殖能に優れた間葉系幹細胞を用い、骨組織のみならず、放射線照射後、腫瘍切除後、脈管系異常後、高度外傷後に認められる障害を克服可能であるのか基盤的研究を行う。

### (1) 研究の学術的背景

#### ① 細胞を用いた研究実績と展望

これまでに間葉系幹細胞は優れた自己再生能を有し、頭蓋骨治癒、異所性骨再生への分化能を認めたが (Akita S, et al. Wound Repair Regen 12: 252-259, 2004; Fukui M, Akita S, et al. Wound Repair Regen 13: 332-340, 2005)、緑色蛍光タンパク遺伝子導入ヒト間葉系幹細胞を用いた、ヌードラットへの頭蓋骨欠損部への投与では、術後1週、2週での有意な骨塩量の増加を二重エネルギーX線吸光分析法で明らかとなり、組織像において、より成熟した骨稜形成を認めるのみならず、骨成熟タンパクの指標でもあるオステオカルシンの有意な発現上昇と骨転写調節因子であるRUNXの発現調節を、緑色蛍光分布と共に認めた。これらから移植したヒト間葉系幹細胞は局所で増殖し、分化による骨再生することが明らかとなった。頭蓋顔面外科領域で認められる、重症外傷、ガンなど切除後広範囲欠損、ガン制御目的での放射線照射後、リンパ管・血管などの脈管性異常、von Recklinghausen's disease、に代表される神経系異常、あるいはFibrous Dysplasiaに代表される良性ではあるものの難治性かつ臨床的には高度の異常程度を呈する頭蓋顔面の潜在的な変形・形成不全に対して、早期、もしくは、晩期からでの幹細胞を用いた治療開始によって回復・再生可能か検討するものであり、極めて臨床的な再生の妥当性を有する重要な研究テーマであると思われる。これまでの幹細胞医療への報告において頭蓋顔面に焦点をしばったものは極めて少なく、いわゆる“幹細胞”のカテゴリーの中で、頭蓋顔面形態形成に特に関連するとされる、神経提(neural crest)細胞との時間・空間的発現、調節、協調・拮抗作用を検討することにより、現実的な頭蓋顔面領域が可能か、適切な時期での発現タンパクの検索と調節因子の同定などを含めた包括的頭蓋顔面領域の再生を目指した。

#### ② 頭蓋顔面領域での疾患関連遺伝子同定

頭蓋顔面領域の先天異常(奇形)関連遺伝子の同定と臨床像との照合検証を実施し、該当疾患に対して幹細胞の関与、関連因子の同定を実施しようとした。

## (2) 臨床疾患モデル作成

頭蓋顔面再生治療モデルとして、放射線障害モデルにおける組織損傷、因子による組織保護性などの検証。

## 2. 研究の目的

### (1) 体性幹細胞(脂肪幹細胞など)同定と組織再生に関与と治療への応用可能性の検討

侵襲の少ない、実現可能な細胞の分離と合目的かつ有効安全な手法の検索

### (2) 頭蓋顔面疾患先天異常(奇形)例からの関連染色体・遺伝子の末梢血からの同定

多遺伝子疾患と考えられる非症候群性唇顎口蓋裂など患者サンプルからの一塩基多型調査

### (3) 放射線障害モデルの作成と予防、治療効果をもたらす因子、細胞治療方法の調査

外放射線障害が組織へもたらす変化と治療可能性の大型モデルを用いた検討

以上(1)~(3)の確立と得られた知見から時間・空間制御可能な疾患像を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 小動物(マウス)及び大動物(ミニブタ)皮下脂肪由来幹細胞の抽出、細胞同定

小動物(マウス)では糖尿病モデルであるNOD(Non-Obese Diabetic)マウス(n=4)とそのlittermateであるICR(n=4)マウスを用い、更に皮下組織の萎縮効果と続発する“脂肪萎縮”モデルとして、放射線を外照射した。放射線照射は原爆後障害医療研究施設4階にてISOVOLT TITAN 320を用い5Gy照射とした。脂肪由来細胞は、ヒトにおける実際と同様に放射線照射以外部位のソケイ部位などから脂肪採取し、ヒトにおける閉鎖系回路が使用不可能なことから、肉様膜を含めて皮膚切開し皮下脂肪を採取し10cmペトリ皿上でリン酸緩衝液添加し、組織をmincingし、50ccチューブ内に移動し、ヒトと同じCelase™(0.5単位/ml脂肪組織)を加え、37℃にて30分間インキュベート、更に10分37℃で震盪器にて攪拌。組織消化後、600×g 5分間で室温沈降。滅菌BSA(Bovine Serum Albumin) 5ml入れ再度攪拌し準備した。細胞数計測後対照群に $2.97 \times 10^6$ 細胞個/5ml、放射線群  $3.8 \times 10^6$ 細胞個/5ml細胞を洗浄脂肪組織と混和して皮下に移植注入した。体重変化などの経過観察と4週後の組織採取し検討した。

大動物（ミニブタ）については自己脂肪組織採取し、ヒト臨床と全く同じ“閉鎖系”細胞分離装置(Celution システム)を用いて細胞分離・精製後、対照群と“脂肪萎縮”群としての放射線照射群で検討した。放射線照射は外科用 X 線システム (DHF-105CX-B, 日立メデイコ) にて線源を照射面から 20cm 高さで固定し、放射線 (60 kV, 25 分, 最長 9 分の 20 分間隔で 3 回照射) 発生させた。放射線照射部位に線量計 (ガラス素子) を 8 つ貼付し、照射後に長崎大学アイソトープセンターにて線量計算した。組織移植細胞源である脂肪は、ヒト実際と同様に吸引法によりそけい部、大腿から採取し、回路で分離精製後、細胞測定後全量を洗浄脂肪組織と混和して注入移植した。術後 4 週まで経過観察し、4 週後に全身組織検診を含む検討した。ミニブタは毎日の一般状態の観察、体重測定は移植前、移植後、7, 14, 21, 28 日で実施し血液顕微鏡検査は放射線照射前、移植術後、移植後 14、21 日に前大動脈洞カニューレから採取し血液学検査、血液生化学検査実施した。28 日剖検時、脳、肺、心、肝、脾、腎、副腎、移植部位皮膚・皮下組織について病理組織検診した。

#### (2) 非症候群性唇顎口蓋裂のゲノムワイド法を用いた責任遺伝子同定

学内倫理委員会承認の下、承諾頂いた非症候群性唇顎口蓋裂患者 122 例と対象正常者 190 名からのサンプルをゲノムワイド関連法を用いて、浸透性と一塩基多型調査した。

#### (3) 放射線照射モデルの確立

ミニブタモデルを用い、外放射線照射装置 (原爆後障害医療研究施設 4 階にて ISOVOLT TITAN 320、及び外科用 X 線システム (DHF-105CX-B, 日立メデイコ) を用いたモデル確立し、自家幹細胞移植による効果検討と共に糖タンパクを用いた放射線障害予防効果検討した。

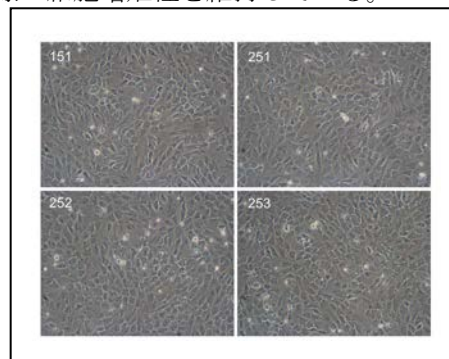
### 4. 研究成果

#### (1) 幹細胞同定と移植後の組織状態

①皮下脂肪への影響がある (糖尿病マウス, NOD とその野生型マウス, ICR) を用いたマウス実験では 4 週間観察期間で、対照群、放射線照射群共に、全マウス 10% の体重増加を認め、行動なども異常を認めなかった。脂肪由来幹細胞と脂肪組織を混和した注入した皮下組織部位にも拒絶などの炎症反応、異物反応は一切認められなかった。また、主要臓器である肝、筋 (大腿筋)、心臓、腎臓、大腸、小腸、脳などにも組織学的な病理所見を認めておらず、皮下・皮膚は対照群、放射線照射群で全く組織学的異常を認めなかった。

#### ② ミニブタにおける自家脂肪幹細胞

以下、151 (左上、対照)、251 (右上、放射線 5Gy)、252 (左下、放射線 5Gy)、253 (右下、放射線 5Gy) から採取された自家脂肪由来幹細胞の増殖性は、正常ヒト脂肪由来幹細胞、ADSC と同じ special 培地中ヒト ADSC と同様の細胞増殖性を維持している。



一方で、正常ヒト ADSC の分化培地では、ミニブタ ADSC を分化させるのは困難であり、分化培地中でほとんどの細胞がアポトーシスを起こして死滅したため、*in vitro* 中の分化能検討には培地条件の検討が必要と考えられた。

#### (2) 非症候群性唇顎口蓋裂の遺伝子単離

8q24.21 遺伝座から 13 の一塩基多型、SNP についてゲノム DNA からの直接シーケンス法で検討したところ SNP は 357 個で確認されたが有意差検定で表現形間の有意差を認めず、8q24.21 遺伝座は非症候群性唇顎口蓋裂の浸透性には無関係であった。

#### (3) 放射線照射モデルにおける塩基性線維芽細胞増殖因子、bFGF の組織防護効果

幼弱ミニブタ (4~8 週) を用い、双茎皮弁下に組織拡張器 (tissue expander) を挿入し、10Gy 放射線照射した実験における組織保護性、皮弁活性では、術後 2 週までに bFGF 使用群で組織保護性が有意に高く、真皮-表皮接合部の細胞増殖性、CD31、 $\alpha$ -SMA シメされる成熟血管数が有意に上昇し、アポトーシス一知る細胞数は有意に低下したため、放射線照射直後からの bFGF 投与は防護効果を有すると考えられた。

### 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 19 件)

- Hikida M, Tsuda M, Watanabe A, Kinoshita A, Akita S, Uchiyama T, Yoshiura KI. No evidence of

- association between 8q24 and susceptibility to nonsyndromic cleft lip with or without palate in Japanese population. Cleft Palate Craniofac J. 2011, epub ahead of print.
2. Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Yamashita S, Hirano A. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. Clin Plast Surg. in press, 2011.
  3. Akita S, Akino K, Hirano A. Basic fibroblast growth factor in scarless wound healing. Wound Healing Society Year Book, in press
  4. Kinoshita N, Tsuda M, Hamuy R, Nakashima M, Nakamura-Kurashige T, Matsu-Matsuyama M, Hirano A, Akita S. The usefulness of basic fibroblast growth factor for radiation-exposed tissue. Wound Repair Regen, in press, 2011.
  5. Yoshimoto H, Akino K, Hirano A, Yamashita S, Ohtsuru A, Akita S. Efficacy of patients' own adipose-derived regenerative cells for chronic intractable radiation injuries. The Journal of Wound Technology, 10: 22-25, 2010.
  6. Akita S. The Efficiency and benefit of combined use of artificial dermis with growth factor in clinical cases. The Journal of Wound Technology, 10: 6-9, 2010.
  7. 秋田定伯. 創傷治癒・創傷治療における“幹細胞”の意義と役割 創傷 1: 13-19, 2010
  8. 秋田定伯. トピック bFGF製剤を用いた局所療法. 救急医学【特集 熱傷治療ガイド2010】34: 4: 439-440, 2010
  9. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Non-cultured autologous adipose-derived stem cells therapy for chronic radiation injury. Stem cells International, 532704:1-8, 2010.
  10. Akita S, Akino K, Yakabe A, Tanaka K, Anraku K, Yano H, Hirano A. Basic fibroblast growth factor is beneficial for post-operative color uniformity in split-thickness skin grafting. Wound Repair Regen, 18: 560-566, 2010.
  11. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. Health Physics, 99: 858-862, 2010..
  12. 秋田定伯. 【血管奇形の治療戦略】静脈奇形の硬化療法 硬化剤の選択について. 形成外科 52: 1161-1171, 2009
  13. 秋田定伯. 【ケロイド・肥厚性癬痕の最新の治療】ケロイド・肥厚性癬痕の評価・分類 国際比較. PEPARS 33: 1-6, 2009
  14. 秋田定伯. 【特集】細胞増殖因子と創傷治療 白血病抑制因子(LIF). 形成外科 52: 491-499, 2009
  15. 秋田定伯、平野明喜. 特集 口唇裂二次修正術 2. 鼻翼基部 顎裂骨移植の有用性. PAPER 28: 30-37, 2009
  16. 秋田定伯. 最新の創傷治癒・創傷治療. 治療 91: 255-263, 2009
  17. 秋田定伯. 【Regenerative Medicine 期待される 21 世紀の新しい医療】 感覚器・皮膚・粘膜 皮膚の再生医療の実際と課題. 総合臨床 58: 118-123, 2009
  18. 境 隆博、田崎 公、倉富英治、中野 基、安楽邦明、秋田定伯、矢野浩規、田中克己、平野明喜. 8字真皮縫合法の検討. 形成外科. 52: 451-456, 2009
- [学会発表] (計 52 件)
1. Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Ohtsuru A, Hayashida K, Hirano A, Suzuki K, Yamashita S. Autologous mesenchymal stem cell therapy in local radiation injury-A Japanese approach. 3<sup>rd</sup> International conference on regenerative surgery, Rome, December 14-16, 2011. Invited lecture
  2. Akita S, Hayashida K. Quality of pediatric burn scar is improved by early administration of basic fibroblast growth factor (bFGF). 1<sup>st</sup> International Pediatric Wound Care Symposium, Rome, October 27-29, 2011, Invited lecture

3. Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Ohtsuru A, Hayashida K, Hirano A, Suzuki K, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy in local radiation injuries-A Japanese approach. 5<sup>th</sup> International REAC/TS (Radiation Emergency Assistance Center/Training Site) Symposium, Miami, September 27-29, 2011. Invited lecture
4. Akita S, Murakami R. Versatility of thin groin flap and adipose-derived stem cell therapy for burn scar contracture. The 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Burn Congress & the 3<sup>rd</sup> congress of the Asian Wound Healing Association, Bangkok, September 11-14, 2011. Invited lecture
5. Akita S. Future of wound care and stem cell therapy. 1<sup>st</sup> joint Asia-Pacific Wound Conference, Singapore, September 1-3, 2011. Invited Lecture
6. 木下直志、Rodrigo Hamuy、吉本 浩、林田健志、芳原聖司、中島正博、平野明喜、秋田定伯  
サイトカインおよび人工真皮とともに実施した同時植皮の生着性、術後拘縮および癒痕性状の検討。第3回日本創傷外科学会、パネルディスカッション、札幌、2011年7月8日
7. Akita S. Mesenchymal stem cell therapy for local radiation injuries-Nagasaki experience. 13<sup>th</sup> Coordination and planning meeting of the REMPAN, Speaker, Nagasaki, February 16-18, 2011.
8. Akita S. Autologous stem cell delivery. Wound healing congress St. Thomas, Virgin Islands, USA, December 11, 2010
9. Akita S, Hayashida K, Yoshimoto H, Akino K, Yakabe A, Hirano A. Human recombinant basic fibroblast growth factor (bFGF) improves scar quality such as softness, elasticity of the scar and stratum corneum function and color-match as well as accelerates wound healing. International scar meeting in Tokyo 2012, Tokyo, Japan, December 1, 2010
10. Akita S. St. Petersburg Medial Academy of Postgraduate Studies, Visiting professor, Burn, Scar, Trauma management and regenerative medicine, St. Petersburg, Russia, November 18-20, 2010
11. Akita S. Bioengineered alternative tissue. 1<sup>st</sup> Asian Academy Wound Technology meeting, Seoul, Korea, September 11, 2010.
12. Akita S. Autologous adipose-derived stem cell therapy for chronic radiation injuries. 10<sup>th</sup> Korea-Japan Congress of plastic and reconstructive surgery, Busan, June 16, 2010
13. Akita S. Regenerative medicine for intractable skin ulcer and lipodystrophy. St. Petersburg medical academy of postgraduate studies 125<sup>th</sup> anniversary joint conference on biomedical sciences. St. Petersburg, Russia, June 10, 2010
14. Akino K, Imaizumi T, Hirano A, Akita S. Role of the neural adaptor protein, Shc, on mesenchymal stem cell wound healing and scar process. 第39回日本創傷治癒学会 Japan-Korea Joint session、指名講演、東京、12月9日、2009年
15. Akita S, Akino K, Kinoshita N, Hirano A, Yamashita S. Mechanism and treatment with mesenchymal stem cells in radiation injuries. ETRS/WHS joint meeting, Limoges, August 25-29, 2009
16. Akita S. How to diagnose and treat aged difficult wounds. European Academy of Wound Technology, Elancourt, July 6-8, 2009
17. Akita S. Learning in wound care from the Japanese perspective. 19<sup>th</sup> EWMA, Helsinki, plenary lecture, May 20-22, 2009
18. 秋田定伯. 当科における血管奇形の治療戦略。第37回日本血管外科学会 (パネル) (名古屋)、5月14日、2009年
19. Akita S, Akino K, Kinoshita N, Hirano A, Yamashita S. Role of mesenchymal stem cells in radiation injuries. Wound Healing Society, Dallas, April 26-29, 2009

20. Akino K, Imaizumi T, Hirano A, Akita S, Role of SHC signaling protein in neural differentiation and mesenchymal stem cell wound healing. Wound Healing Society, Dallas, April 26-29, 2009

21. 秋田定伯、秋野 公造、大津留 晶、山下 俊一. 難治性放射線潰瘍に対する自家脂肪組織由来幹細胞の開発臨床研究. 原子力安全委員会 原子力施設等防災専門部会 被ばく医療分科会第 21 回 会合、4 月 14 日、東京、虎ノ門三井ビル 2009 年

22. 秋田定伯、今泉敏史、秋野 公造、平野明喜. 間葉系幹細胞を用いた神経再生と創傷治療. 第 1 回日本創傷外科学会 (東京)、1 月 17 日、2009 年

[図書] (計 6 件)

1. Akita S. Surgical management of pressure ulcers. Surgical wound Management, Second Edition Eds. Mark S. Granick and Luc Teot, Informa Healthcare, London, 2011.

2. Akita S.  
Prevention of scar using bFGF  
Chapter 9: Color atlas of burn reconstructive surgery. Pp. 62-71, Eds. Hyakusoku H, Orgill DP, Teot L, Pribaz JJ, Ogawa R, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 499 pages in total, 2010  
Akita S, Editions MF, Paris, October, 2010, 51 page 3.

3. 秋田定伯  
【熱傷】できる医師の紹介・逆紹介  
治療 92: 1207-1212, 2010

4. Akita S  
Editorial, “Progress in Bioengineered Alternative Tissue”, Journal of Wound Technology, Editor, Akita S, Editions MF, Paris, 2009, 79 pages

5. 秋田定伯  
特集「創傷治療」プライマリ・ケアで対処できる多種多様な“キズ”とその最新知見! 編集 秋田定伯、南山堂、東京、2009 年、195 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 間葉系幹細胞の培養方法および間葉系幹細胞を用いてなる培養臓器

発明者: 秋田定伯

権利者: 秋田定伯、秋野公造、中川浩志

種類: 特許開示

番号: 2005-34030

出願年月日: 2005 年 2 月 10 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: TRANSGENIC MOUSE MODEL FOR PITUITARY DISORDERS ASSOCIATED WITH LIF OVER-EXPRESSION AND/OR GH UNDEREXPRESSION AND ITS USE FOR TESTING THERAPEUTIC DRUGS FOR THE CONDITIONS

発明者: Melmed S, Akita S, Readhead C

権利者: Melmed S, Akita S, Readhead C

種類・番号: US patent 5,824,838/European 0194419B1

取得年月日: October 20, 1998US/June 30, 2004, Europe

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/plastics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平野 明喜 (HIRANO AKIYOSHI )

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 90208835

(2) 研究分担者

秋田 定伯 (AKITA SADANORI )

長崎大学・病院・助教

研究者番号: 90315250

吉本 浩 (YOSHIMOTO HIROSHI )

長崎大学・病院・助教

研究者番号: 90513309

(3) 連携研究者

該当なし

