

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21032

研究課題名(和文) 帯状再生組織・スフェロイド羊水サンドイッチ組織による口唇裂の胎児再生治療法の開発

研究課題名(英文) Development of fetal stem cell therapy for cleft lip using sandwich-graft composed of bandage epithelial tissue(BET) and amniotic fluid spheroid

研究代表者

川上 大(KAWAKAMI, HIROSHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20908397

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：サンドイッチ組織は細胞シートおよびスフェロイドから構成される。当教室で培養を行っている羊水由来幹細胞は、表面マーカーの発現や増殖様式等の点で既報の羊水幹細胞とは若干の差異が認められ、未だ培養の確立には至っていない。そのため、予備検討として当教室で培養実績のある脂肪幹細胞由来の細胞シートの作製を試みた。C57BL6/Jマウスの鼠径脂肪を酵素処理し脂肪幹細胞を培養した。これらを温度応答性培養皿(セルシード社)を用い培養し、シート状に剥離、移植に適した形態に加工するための種々の条件検討を行い、脂肪幹細胞シートの作製法を確立した。今後、同様の方法で羊水幹細胞シートを作製予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口唇裂治療においては、癒痕形成、口輪筋再建の困難さなどは解決すべき課題である。胎児期の細胞治療により、スカーレスヒーリングと筋組織再生が実現する可能性がある。本研究では、羊水由来細胞より作製した表皮細胞(シート)と筋組織(スフェロイド)からなるサンドイッチ組織を、マウス胎児口唇裂モデルに投与することで、表皮および粘膜による口唇裂の閉鎖に加え、機能的な口輪筋の再生を目指した。今後、口唇裂に対する胎仔鏡を用いた再生治療が実現されれば、口蓋形成術時の癒痕抑制、顎裂部骨移植術時の骨再生といった頭蓋顔面領域の先天異常に対する治療全般に幅広い臨床応用が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A sandwich tissue is composed of cell sheets and spheroids. The amniotic fluid-derived stem cells cultured in our laboratory are different from the previously reported amniotic fluid stem cells in terms of surface marker expression and growth pattern, although the culture method has not yet been established. Therefore, as a preliminary study, we attempted to create cell sheets derived from adipose stem cells, which have been proven in our laboratory. Inguinal fat pad from C57BL6/J mice was enzymatically dissociated and cultured using a temperature-responsive dish (Cell Seed). Various conditions for harvesting cell sheets and processing them into a suitable form for transplantation were investigated. In the future, we plan to prepare an amniotic fluid stem cell sheet by a similar method.

研究分野：再生医療

 キーワード：胎児幹細胞治療 外科的口唇裂モデルマウス 羊水幹細胞 サンドイッチグラフト オルガノイド培養
 スフェロイド培養 スカーレスヒーリング 創傷治療

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口唇(口蓋)裂は本邦では比較的多い先天奇形である。出生後に口唇形成術が行われるが、瘢痕が整容的に大きな問題となる。また裂側の口輪筋の付着および走行の異常のため、機能的な口輪筋の再建は難しい。さらに裂側組織のポリウム不足や瘢痕のため、鼻および口唇に非対称を生じうる。妊娠 20 週前後に出生前診断が可能であるが、両親への介入はカウンセリング等限定的であり、出生時に体表奇形を有するわが子と対面する母親の精神的苦痛は計り知れない。

スカーレスヒーリングは胎生期のある時点までは創傷が瘢痕を残さず治癒する現象で、究極の体表奇形の治療法として研究されてきた。実際にヒト胎児口唇形成術の症例報告があり[Hedrick M.H., 1997]、手術は成功したものの、退院後早期に患児は死亡した。以後研究は下火であったが、近年の胎児治療技術の向上により低侵襲な治療法の可能性が高まり、再び動物実験等の基礎研究が行われている。しかし、大動物では再現性の高い外科的モデルの報告があるが、取り扱いが容易なマウスでは、自然発生口唇裂モデルがあるものの、発症率の低さや表現型のばらつきが問題となり、再現性の高いモデルが必要とされている。

口唇裂胎児治療の倫理性を担保するためには、従来口唇形成術よりも低侵襲な治療法の確立が必要であり、胎児鏡下に実施可能な細胞治療が現実的である。羊水幹細胞は羊水中に約 1%含まれる、間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell : MSC)の一種である。一般的な MSC より上流に位置し、iPS 細胞や ES 細胞に近似した幹細胞特性を有する[De Coppi, 2017]。従来 MSC 同様に骨・軟骨・脂肪および心筋[Sveva, 2010]などの中胚葉系統への分化が報告されており、心筋と同じく横紋筋である口輪筋への分化も期待出来る。また、胎児由来であり自家移植となるため免疫反応を回避可能であり、近年産科領域で研究が行われている。しかし、口唇口蓋裂の胎児治療への羊水幹細胞などの応用はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、口唇裂の胎児細胞治療の確立に向け、口唇裂動物モデルにおいて羊水幹細胞を用いた治療の有効性を示すことである。

申請者は大学院在学中の研究において、胎児外科的口唇裂モデルマウスの作製法を確立した。このモデルは胎仔口唇組織を切離し、24~48 時間後に創傷が治癒して裂を形成するという他に類を見ないマウス二段階法モデルである。取り扱いの容易さと高い再現性を兼ね備え、研究の推進におおいに寄与すると考えられる。また、申請者はマウス羊水幹細胞採取法の検討過程において、自律的にスフェロイドを形成する、これまでに報告のない細胞集団を見出している。先行研究では羊膜上皮細胞等のスフェロイド分画は接着分画に比べて幹細胞特性が高いことが示されており[Miki, 2005]、この細胞集団は通常の羊水幹細胞よりも幹細胞性の高い新規細胞集団の可能性がある。上述の様に口唇裂では機能的な口輪筋の再建は難しいが、幹細胞性の高い細胞を可塑性の高い胎児期に投与することで、スカーレスヒーリングに加えて口輪筋の再生を期待している。本研究は、上記の独自のマウスモデルと新規細胞集団を利用して、これまでに殆ど報告のない口唇裂に対する胎児細胞の有効性を検証する、極めて独創的な研究である。

3. 研究の方法

令和3年度： 羊水スフェロイドの特性評価：組織学的検討として HE 染色、CK カクテル抗体等外胚葉系マーカー・ビメンチン等間葉系マーカー・AFP 等内胚葉系マーカーの免疫染色および、Nanog・Oct4・Sox2 等の未分化マーカーの免疫染色を行う。また MSC の 3 系統+ の分化能を確認する。コロニー形成能、増殖能の評価を行う。 遺伝子発現検討：total RNA seq を行い、発現上昇・低下している遺伝子を網羅的に解析する。特に変化の大きいものは real-time PCR 法で定量化する。 培養法の確立：市販の羊水培地 AmnioMAX を用いて至適播種密度を検討する。

表皮・筋組織への分化誘導：Cellseed 社の温度応答性培養皿を用い、羊水幹細胞を帯状の表皮組織へ分化誘導するための条件を検討し、CK カクテル抗体免疫染色等により評価する。また、羊水スフェロイドに対し、MYOD1mRNA および POU5F1(Oct4)の siRNA のトランスフェクション[Akiyama, 2018]により高効率に筋組織へ分化誘導する。MyoD、Myogenin、MyF5 等の筋分化マーカーおよび MHC 免疫染色により、筋分化を確認する。

令和4年度： GFP(+)マウス胎仔から回収した羊水幹細胞から羊水帯状組織および羊水スフェロイドを作製し、それぞれ表皮・筋組織に分化させる。前者を外科的口唇裂モデルマウスに投与し裂を閉鎖し、その空隙に羊水スフェロイド担持ハイドロゲルを注入する。このようなサンドイッチ幹細胞治療による効果を評価する。HE、Azan、PSR 染色等の組織学的観察および、共焦点顕微鏡・2光子顕微鏡を用いた GFP の検出により、サンドイッチ組織の生着を観察する。

4. 研究成果

サンドイッチ組織は細胞シートおよびスフェロイドから構成される。当教室で培養を行っている羊水由来幹細胞は、表面マーカーの発現や増殖様式等の点で既報の羊水幹細胞とは若干の差異が認められ、未だ培養の確立には至っていない。そのため、予備検討として当教室で培養実

績のある脂肪幹細胞由来の細胞シートの作製を試みた。C57BL6/J マウスの鼠径脂肪を酵素処理し脂肪幹細胞を培養した。これらは温度応答性培養皿(セルシード社)を用いて培養され、シート状に剥離、移植に適した形態に加工するための種々の条件検討を行い、脂肪幹細胞シートの作製法を確立した。
今後、同様の方法で羊水幹細胞シートを作製予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川上 大, 西澤 悟, 疋田 温彦, 星 和人
2. 発表標題 マウス胎仔背部皮膚スカーレスヒーリングにおける組織化学的および形態計測学的解析
3. 学会等名 日本口腔ケア学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Kawakami, Satoru Nisizawa, Atsuhiko Hikita, Kazuto Hoshi
2. 発表標題 Histochemical and morphometrical analyses of scarless wound healing in mouse fetal model
3. 学会等名 The 1st Annual Meeting of the International Society of Oral Care (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 大, 西澤 悟, 疋田 温彦, 星 和人
2. 発表標題 口唇裂の胎児再生治療を目指したマウス胎仔口唇欠損モデルの作製
3. 学会等名 第75回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 大, 西澤 悟, 疋田 温彦, 星 和人
2. 発表標題 口唇裂の胎児再生治療を目指した細胞源としての羊水由来幹細胞 そのスフェロイド状の増殖および立体構造について
3. 学会等名 第77回 NPO法人 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------