

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792049

研究課題名(和文)口唇口蓋裂初回口唇形成術時の自己臍帯血由来間葉系幹細胞移植による顎裂閉鎖の研究

研究課題名(英文)Primary bone graft for cleft lip and palate using umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

研究代表者

安村 和則 (Yasumura, Kazunori)

横浜市立大学・大学病院・助教

研究者番号：40351621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂は胎児診断率が高く、出産時に臍帯由来間葉系幹細胞と臍帯血清を採取して体外で増幅培養し、出生3～6か月頃に施行される口唇口蓋形成術時に顎裂部に骨細胞に分化させて移植する、という治療の可能性を探る研究を行った。現在の治療法では5～10歳頃に腸骨海綿骨を移植して良好な顎骨が得られるが、臍帯由来の幹細胞は腸骨海綿骨由来の幹細胞とは性質が異なり、骨に分化しにくい傾向が認められた。骨への分化傾向をもつ臍帯由来幹細胞を免疫不全マウスの顎裂欠損モデルに移植しても、幹細胞移植のないモデルと比較して顎骨形成に差は認められなかった。移植細胞だけではなく移植床周辺環境の検証も重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Prenatal diagnosis of cleft lip and palate is accurate. We investigated the clinical applicability of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells harvested at birth for primary gingivoperiosteoplasty and bone grafting 3 to 6 months after birth. Secondary bone grafting, which is usually performed when the patient is 5 to 10 years old using iliac cancellous bone, provides good results. Our findings revealed that the quality of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells differed from that of iliac cancellous bone-derived mesenchymal stem cells, because differentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into bone cells was difficult to achieve. We detected no difference between the bone formations in the umbilical cord-derived mesenchymal stem cell graft model and those of the non-cell graft model using the nude mouse with partial maxillary defects. Studies of the recipient niche might be as important as the cell quality.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形成外科

キーワード：臍帯由来間葉系幹細胞 口唇口蓋裂

1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂患者の顎裂に対する治療は、腸骨などから十分な量の海綿骨採取が可能になる6才頃まで成長を待って骨移植を行う二期的顎裂部骨移植術がスタンダードである。しかし、生後3カ月頃に初回口唇形成術と同時にされる歯肉粘骨膜形成術Gingivoperiosteoplasty (GPP)を施行した症例の中には、顎裂はある程度再生骨によって閉鎖され、少なくとも歯牙誘導の面では二期的顎裂部骨移植術を回避できたとする臨床報告もある。

GPPは顎裂骨欠損部を歯肉周囲の粘骨膜弁で被覆して骨欠損部を骨膜と顎骨で囲まれた閉鎖腔として静置することで顎裂骨欠損部に骨再生を図る手技である。GPPと同時にこの骨欠損スペースに質の高い骨細胞や骨幹細胞などを移植すればより有用な口唇口蓋裂の顎裂に対する治療につながると考えられる。さらに、一般的にGPPで作成される骨欠損スペースは、低年齢である、頭頸部という血流豊富な領域である、全面的に骨幹細胞の存在する骨膜と骨そのものによって裏打ちされる、歯牙萌出という機能により移植後の評価が可能である、という点で、レシピエントとして最良の条件を備えていると考えられる。しかし、実際の臨床では生後間もない乳児の全身どこからであっても、移植に十分な量の骨髄(海綿骨)を採取することが不可能である。現状では、口唇口蓋裂に対する初回手術で施行するGPPでわずかな下鼻甲介骨を採取して移植すれば顎裂部に骨再生は認められるが、歯牙萌出に十分な骨量を伴う顎骨が形成される症例は非常に稀であり、ほとんどの患児が二期的顎裂部骨移植術を受けている。

一方、口唇口蓋裂は超音波による顔面スクリーニングで50%以上の胎児診断が可能であり、意識してスクリーニングを施行すれば90%以上の正診率とされる。出生前診断を受けた児の両親が出生前に形成外科を受診する機会は確実に増加しており、産科と連携してそのような児の出生時に臍帯や臍帯血を採取することは困難なことではない。臍帯血や臍帯間質には間葉系幹細胞 Mesenchymal Stem Cell (MSC)が含まれることが知られており、各分野で臨床応用に向けた研究が行われている。本研究では、超音波検査による出生前診断を受けた口唇口蓋裂児の出生時に臍帯を採取し、臍帯間質からMSCを分離、増幅培養し、最終的に骨に分化させて初回口唇口蓋形成術時にGPPを施行した顎裂骨欠損部に移植するという治療の可能性について検証した。

2. 研究の目的

採取した臍帯由来MSCの効率的な増幅培養

法について検証する。ウシ胎児血清を用いず、臍帯採取時に採取できる臍帯血清による増幅培養がどの程度可能かどうか、培養したMSCを分化させて骨細胞が得られるかどうかについて検証する。培養細胞を用いる動物実験を最終目標として、当施設併設のCell Processing Center (CPC)で施行する移植産物作成法に準じて臍帯由来MSCの管理を行う。臨床応用を見据えてこのような培養と骨細胞の作製を手術までの3-6カ月に行う場合の問題点を見つけ出す。

培養したMSCについて、Fluorescence activated cell sorting (FACS)を用いて臍帯由来MSCの幹細胞としての特性解析を行う。分化培地を用いて臍帯由来MSCの多分化能についても検証する。骨分化能については骨髄などの異なる組織由来のMSCと比較する。

動物実験では、上顎骨に欠損を作成した顎裂モデルに対して、臍帯由来MSCから分化させて作成した骨細胞を移植し、有効な骨再生が得られるかどうかを検証する。移植細胞の性質によって骨再生に差を認めるのであれば、より効率的な移植法や移植環境について検証する。

3. 研究の方法

口唇口蓋裂児、非口唇口蓋裂児を問わず、出産時に同意を得て得られたヒト臍帯からMSCを分離、培養する。同時に採取する臍帯血清を用いた培養とウシ胎児血清を用いた培養で増幅効果を比較する。臨床応用を想定して3カ月程度でどの程度の細胞が得られるかを検証する。

増幅培養して得られた細胞について、FACSを用いて幹細胞としての細胞特性を解析する。分化培地を用いて脂肪、軟骨、骨への分化能を検証する。幹細胞としての特性や多分化能については骨髄由来幹細胞をコントロールとして比較する。

動物実験ではマウスの上顎骨に骨欠損を作成した顎裂マウスモデルを用いる。免疫不全マウスで顎裂モデルを作成し、臍帯由来MSCを様々な条件で移植し、病理組織学的に検証する。

4. 研究成果

MSCをヒト臍帯から効率よく採取し、同時に採取した臍帯血清を用いた増幅培養でもウシ胎児血清と同等の増幅効果が得られることを確認した(n=29)。血清(遠心分離後の上清のみ)は胎盤剥離以前の採取では平均20ml採取可能であったが、娩出後の採取では平均4mlの採取にとどまった。胎盤剥離以前の採取は臍帯静脈穿刺により、胎盤娩出後の血清は臍帯動静脈のカットダウンによる。臍帯は自然分娩、帝王切開とも1個体で20cm採取して使用したが、コンタミネーションの

割合に差は認めなかった。MSC の分離，培養という点では，自然分娩，帝王切開にこだわる必要はないが，自家臍帯血清だけを用いる培養では，児娩出直後の臍帯静脈穿刺による血液を回収しなければ，ウシ胎児血清の使用は回避できないと考えられた。児娩出直後の臍帯静脈穿刺で得られた約 20ml の血清で初期培養を行い，その後は適宜患児から採血して血清を得るという流れでウシ胎児血清の使用を回避できる可能性があると考えられた。

臍帯採取から初回細胞播種までの時間は平均 8.5 時間であった。臍帯採取から初回分離細胞播種までの時間と関係なく，3 継体までの培養で細胞の増殖能や細胞の形態に大きな個体差を認めた。中には形態的に仮足を認めないままほとんど増殖せず，3 カ月では十分な量の MSC が得られないと判断できるケースも存在した。このような個体で分離手法や初回細胞播種までの時間が他の個体と異なることはなく，臍帯間質に存在する細胞の活性については，分娩以前で個体差が決定されている可能性が示唆された。臨床応用を想定した場合には，活性が低く移植には適さない MSC しか採取できない個体が存在する可能性があることを考慮すべきであると考えられた。

FACS による初回播種で得られた細胞の特性解析では，CD73，CD90 は陽性であるが，CD105 が検出されない傾向があり，骨髄由来 MSC とは大きく性質が異なることが予想された。分化誘導培地を用いる多分化能の検証では，脂肪，軟骨への分化傾向は骨髄由来 MSC との差を認めなかった。しかし，臍帯由来 MSC は明らかに骨への分化傾向に乏しいことが確認された。骨に分化しうるとは確認できるため，多分化能を有すると判断できたが，分化培地の性状や添加物を変更しても骨髄由来 MSC と同等の骨分化は困難であった。今後，分化の手法について検証を重ねれば骨髄由来 MSC と同等の骨分化能を引き出すことが可能かもしれないが，FACS の結果と合わせて考えても臍帯由来 MSC は骨髄由来 MSC と比べて幹細胞としての特性が大きく異なる可能性が示唆された。

顎欠損に MSC 移植を行う動物実験モデルの作成では，顕微鏡下の操作で免疫不全マウス上顎骨に直径 2mm の骨欠損を作成して移植を行う GPP モデルを作成した。口唇口蓋裂で施行する GPP 同様，上顎骨の骨孔は全面骨膜と骨で囲まれるスペースであることに配慮して作成した。このような GPP マウスモデルに対して，MSC そのもの，骨への分化誘導を行った MSC，MSC 移植なし（コントロール）という条件でヌードマウスの GPP モデルへの移植を行った。骨移植部を含む上顎骨薄切標本の病理組織学的評価では，移植細胞の性質，骨への分化度によって骨欠損部の骨再生に量的差を認めなかった。細胞の性質，移植法がすべて同じ条件であるはずの同一群内で

骨再生に量的差を認め，中には MSC 移植なしでも骨再生が良好なケースも認められた。手技的な問題で移植条件が一定していない可能性があると考えられた。この結果から，骨再生における細胞移植法（移植部周辺環境）の検証は移植細胞の質の検証と同程度に重要であると考えられる。また，骨再生が必要なスペースにできるだけ多くの骨細胞，骨幹細胞を播種した方がよいか，という疑問も生じるため，今後は骨再生に適量な移植骨細胞，骨幹細胞の検証，スペースを埋めるためのスキャフォールドとの組み合わせ移植についての検証なども必要になってくると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Flow cytometric identification and characterization of endothelial progenitor cells in human umbilical vein endothelial cells, 鄭 允文, 安村和則, 他, 第 13 回アジア移植外科学会, 2013 年 9 月 3 日, 京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
安村 和則 (横浜市立大学 附属病院)

研究者番号： 40351621

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：