

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670779

研究課題名(和文) 患児の自己臍帯血由来細胞を用いた唇顎口蓋裂児の顎裂再建治療の基礎研究

研究課題名(英文) The feasibility of regenerative treatment for alveolar cleft with umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells.

研究代表者

赤松 正 (Akamatsu, Tadashi)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10276850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：母体の超音波検査による唇顎口蓋裂患児の出生前診断情報を、出産と同時に行う患児の自己臍帯血採取とリンクさせることで、患児の顎裂部骨欠損の再建を自己臍帯血幹細胞により実現することを目的とする基礎実験である。ヒト臍帯血から分離した凍結保存単核球細胞群からin-vitroで骨芽細胞に分化させる実験の結果、骨形成能を有する間葉系幹細胞の分離は確認できなかった。免疫不全ラットを用いた動物実験でヒト臍帯血由来単核球群移植による骨再生実験は継続中である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research was to evaluate the feasibility of regenerative treatment for alveolar cleft with umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Recent progress of ultrasound examination has brought prenatal diagnosis of cleft lip and palate, and also brought the opportunity for the umbilical cord blood harvest of the patient. We examined the possibility for osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood and in-vivo osteogenesis in severe immunodeficiency rat.

研究分野：唇顎口蓋裂

キーワード：唇顎口蓋裂 出生前診断 臍帯血 間葉系幹細胞

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂児の顎裂治療は、骨欠損の修復が必要であるという点で、口唇裂治療、口蓋裂治療とは大きく異なる。現在一般的に行われている治療方法は80年代に確立されたもので、学童期の自家腸骨移植術とそれに続く歯科矯正治療からなる。この顎裂部腸骨移植が確立してから患児の口腔内の状況は飛躍的に改善し、裂の存在したことが判別できないような連続した歯槽堤と審美的に排列された永久歯列が得られるようになった。しかし、この学童期の自家腸骨移植術は、腸骨採取部に癒痕や変形を残すことや、術後の痛みなどの侵襲により、患児の手術に対する拒否感を強めて、その後の唇顎口蓋裂治療に対する障害となるなど、さまざまな問題点を有する。これに対し、Millard-Latham らが提案した GPP(Gingivo-periosto plasty)は乳児期の顎裂部手術により顎裂部に骨架橋を得て、学童期の腸骨移植術を回避する治療法であった。この方法は骨移植回避率が60%とされ、成功すれば極めて有効ながら、その成功率はまだ充分とはいえなかった。研究代表者は2001年から唇顎口蓋裂児に対し生後6ヶ月での早期唇顎口蓋閉鎖を試みてきた。その際、顎裂部の閉鎖には、自家骨移植なしで顎裂部再建を可能にする Millard type の歯槽堤再建(GPP)を施行してきた。しかし我々のプロトコールによる術後成績でも、骨架橋形成率は63%と低く、しかもその骨架橋の程度は不十分なものが多い。

最近では、自己腸骨骨髓液を吸引採取しこれを吸収性の人工骨材料などと混合して顎裂の移植床に注入する臨床研究の報告も散見される。しかし月齢3から6ヶ月の乳児からの骨髓液採取は依然として侵襲度が高く、採血量も限られる。90年代以降、骨髓中の間葉系幹細胞を *in vitro* で骨芽細胞へ分化させ、骨基質の生成を確認した報告や、それを生体に移植した研究が多数報告されている(Ohgushi, H.:Acta Orthop. Scand., 1990)。しかし骨髓有核細胞中での間葉系幹細胞の数は新生児で1/10,000と非常に少ないため、有効な移植細胞数を得ようとすると20ml以上の採血が必要で、小児への臨床応用のためには骨髓採取量が大きいという問題がある。安全な臨床応用につなげる次の展開として、材料を患児の自己臍帯血にできれば、大きなメリットがあると考えられる。

このような現状に対し、今後、出生前超音波診断の情報をもとに患児の臍帯血を確保し、この自己臍帯血由来細胞を材料とした顎裂再建が可能になれば、患児にとって大いなる福音となると考えた。自己臍帯の採取保存は、一部の施設では行われているが、患児の自己臍帯血を確実に確保することができなければ一般的治療として確立さ

せることは困難である。

産婦人科領域では、超音波診断装置の進歩により胎児の口唇顎裂の出生前診断が高率で可能になった。しかし、この出生前診断の結果は患者家族への説明や、形成外科などの関連病院への事前紹介などに用いられるのみで、有効に利用されているとはいえない。母体の超音波検査による出生前診断情報を、出産と同時に患児の自己臍帯血採取とリンクさせることで、顎裂部骨移植術が不要となれば、いままでも試みられたことのない、新たな治療の扉が開かれる。また将来この研究は顎裂再建のみでなく、小耳症患者に対する再生軟骨の材料やあらゆる先天外表異常の患児の治療における骨・軟骨の再生手段として広く応用可能である。

2. 研究の目的

本研究では、患児の顎裂部骨欠損の再建を自己臍帯血幹細胞からの再生医療により実現することを目的とする。小児への臨床応用をめざし、安全性の点で臨床応用への障害となる *in vitro* での増殖を行わずに、臍帯血採取後に無菌操作下で単核球細胞の分離を行うのみとする。臍帯血中の間葉系幹細胞数も骨髓液中と同様、極めて少ない事が知られているが、その条件下で十分な骨再生能のある細胞と、細胞数が得られること、および移植後に移植床で良好な骨再生環境が得られかどうかを明らかにする。

安全性の点から臨床応用への障害となる *in vitro* での細胞分化や細胞増殖を排し、シンプルな形での移植方法を実現したい。しかし、そのような細胞移植条件のもとで、十分な骨再生能のある細胞とその数が得られるかという点、および移植後に移植床で良好な再生環境が得られるかなどについては未だ全く報告がない。この点について明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 臍帯血は1例につき30から120mlと、容量には差があり、また単位容積あたりの細胞数も異なる(Qiao, C.:Cell Biol Int., 2007)。臨床において患児の自己臍帯血から分離できる臍帯血由来単核細胞群から、はたして骨再生能を有する間葉系幹細胞が十分数得られるかどうかを確認し、その細胞数を計測することとした。当初東海大学臍帯血センターから、実験用保存臍帯血の提供を受け、10例の臍帯血を標本として細胞数をの計測を行う予定であったが、臍帯血センターの閉鎖移転が発生したことにより本研究計画への実験用臍帯血の提供を受けられなくなった。そのため、ヒト臍帯血単核細胞群は理化学研究所バイオリソースセンターから、実験用臍帯血由来単核細胞として購入した。購入量は120バイアル(1ml x 10⁷個)。1バイアルは臍帯血1検体の約10分の1の細胞数に調製され

ている。同一検体からのバイアルは存在せず120検体からの120バイアルである。

1 バイアル中の細胞数を計測するために以下の方法を用いた。15 mL チューブに DMEM + 10%FBS 培地を 9mL 分注する。37 °C ウォーターバス上で凍結保存臍帯血由来単核球群を解凍する。半分程度解けたら引き上げる。解凍した懸濁液を手順 1 の 15 mL チューブに回収する。再度バイアルを培地で共洗いし、回収する。1,200 rpm (345 xg), 4 で 10 分間遠心する。遠心後、上清を除き DMEM+10% FBS 培地 4 mL で懸濁する。細胞懸濁液 20ml とトリパンブルー 20ml を混合し (2 倍希釈)、細胞数を計測する。細胞懸濁液を 2 mL/ウェルずつ 2 ウェルに播種する。37 °C, 5% CO₂ インキュベーター内で培養する。次に、この OPC (Osteogenic progenitor cell) を MSC 用の骨芽細胞誘導培地で培養し、骨芽細胞への分化と骨基質の産生を確認する。分化した骨芽細胞は Osteoblast-specific marker である Alkaline phosphatase と Runx2 の 2 種類を用いて同定し、細胞数を計測する。困難であれば DNA 量の計測で代用する。また形成された骨基質のオステオカルシン量を 10%ギ酸によるサンドイッチ EIA 法で計測、アルカリフォスファターゼ活性定量を IFCC 法による吸光度測定で計測し、骨基質の確認を行う。

(2)

ヒト臍帯血由来単核球細胞群を、ヌードラット頭蓋骨に人工的に形成した直径 5mm、の骨欠損部に移植する実験を行い、臍帯血由来のヒト骨芽細胞からの骨形成を確認した。ヌードラットは F344/NJcl-rnu/rnu 系統を用いた。ヒト臍帯血由来単核球細胞群は仔牛真皮由来アテロコラーゲンスポンジ (テルダーミス; テルモ株式会社製) を担体としてこれに含浸させた後、移植した。細胞移植を行う週齢は 11 週齢時とした。この実験により骨欠損部での骨新生促進の効果をみる。また、この対象群としてコラーゲンスポンジの担体のみを埋入群を作った。さらに Positive control として、市販の Human osteoblast (Promo Cell 社) を培養して骨形成能を確認した骨芽細胞を、同様にコラーゲンスポンジの担体と共に埋入した群を設定し、合わせて 3 群を比較検討した。骨欠損の容積は約 19.625 μ l。これに対し、移植細胞は 1×10^7 /ml の細胞密度で懸濁液は PBS 液。コラーゲンスポンジディスクに十分に含浸させると移植細胞数は 2×10^5 個程度と予想された。細胞移植は以下の方法で行った。ラットの頭蓋正中部皮膚に矢状方向の切開線をデザインした。切開後すぐに頭蓋骨に達するので、骨膜起子を用いて頭蓋骨骨膜下に入り、皮膚と骨膜を一体として挙上した。両側の頭頂骨を露出したら、ダイヤモンドバー (直径 5mm) を用い

て頭蓋骨全層を穿孔する。これにより直径 5mm、深さ 1mm の円柱形の骨欠損が形成される。切削の際、摩擦熱による骨組織の障害が発生しないよう、生理食塩液を注水して冷却した。また、硬膜はできるだけ損傷しないで温存した。移植細胞の担体となる牛コラーゲンスポンジ (テルダーミス) を骨欠損と同形に切削形成した。

ネガティブコントロール群はコラーゲンスポンジに移植細胞を含まない PBS のみ含浸させたもの全く同様に作製した骨欠損に充填した。移植を行ったら、乾燥や流出を避けるためすみやかに骨膜を含む皮弁を縫合して、創を閉鎖した。縫合には針付き 6-0 ナイロン糸を用い、短結紮縫合を行い移植手術を終了した。

細胞移植後の骨形成の評価として、

各個体の骨形成量の計測は麻酔下の CT 撮影により行った。

骨新生の定性的評価として殺処分後、頭骨の組織標本を作成し新生骨組織を HE 染色、Masson 染色し観察を行う。

免疫染色により骨芽細胞マーカーである osteocalcin、骨マトリクスマーカーの Osteopontin を証明する。

以上を行う事とした。

4. 研究成果

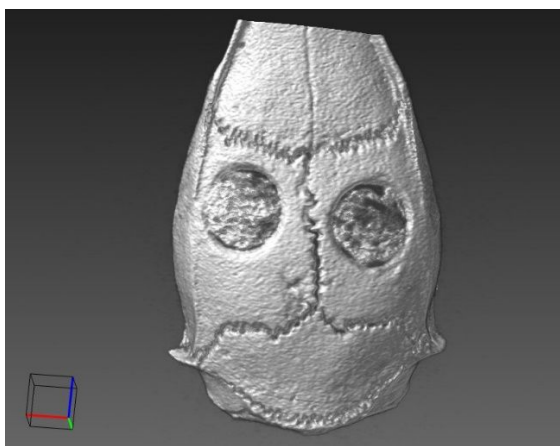
(1) 臍帯血由来間葉系幹細胞を分離培養し in-vitro で骨芽細胞に分化させる実験を行った。DMEM+10% FBS で 14 日間培養した後、Stem Pro osteogenesis differentiation kit (Invitrogen) で 20 日間培養し、評価を行った。MSC 表面抗原 Positive: CD29, CD44, CD90, CD105, Negative: CD14, CD45 での確認、骨芽関連遺伝子発現 (PCR)、骨芽関連タンパク発現 (ALP, TRACP 酵素活性) の方法に付き、これらすべてを行ったが、いずれも確認できなかった。

臍帯血由来間葉系幹細胞からの骨芽細胞の誘導と樹立に関する報告は複数あるが、1 個体の臍帯血に含まれる間葉系幹細胞は $10^7 \sim 10^8$ 個含まれる単核球細胞のうち 1 ~ 10 個程度と考えられている (0.01 ~ 0.001% 以下)。臍帯血中大部分を占めるマクロファージを除去しない限り vitro での培養は困難であると思われた。そのため、細胞を取り除く方法として CD45 陽性細胞であるマクロファージを Rosette Sep 法を用いて分離する方法を試みた。細胞懸濁液に RosetteSep 製 Human CD45 depletion cocktail を加えて細胞を凝集沈殿させたうえで培養を行ったが、間葉系幹細胞は確認できなかった。

M.W.Lee et al. の論文によれば、臍帯血から Ficoll 液で単核球を分離した後に凍結し、解凍後に播種して MSC が得られたとある。方法自体は我々の方法と同じで、解凍後の培養方法も特別なことはしていない。本研究で MSC が得られなかった理由は不明

であるが、得られるとしても極めて少数しか得られないであろうことは明らかとなった。一方 Terai M. Mol Biol Cell. 2005 Mar;16(3):1491-1499.によれば、新鮮臍帯血 5mL から MSC の樹立を試みたところ 40 検体中 8 検体で間葉系細胞が樹立できたと述べている。その方法は、出産後採取して、翌日または週明けまで冷蔵保存した臍帯血を遠心して上清を 2 倍希釈して播種し、さらに沈殿を 20%FBS/DMEM に懸濁して 10cm ディッシュ 2-4 枚に播種するというもので、最初の 2 週間から 3 週間は単核球が増殖・分化して増殖が停止する。そして 3-4 週間後、MSC がコロニー形成開始し、増殖を始める際、細胞同士で架橋を作ると述べている。本研究も実験材料を凍結保存臍帯血から新鮮臍帯血に変更することで、骨形成能を有する間葉系幹細胞を得られる可能性はあると思われた。

(2) ラットの頭蓋骨の骨欠損に臍帯血細胞を移植し、in vivo での骨再生を確認する実験について。
SCID マウスの頭蓋骨に直径 3mm の骨欠損を作る実験では移植容積の維持が困難である事が実験により判明した。動物種を重症免疫不全ラット (F344/NJcl-rnu 系) に動物種を変更し、移植腔も直径 5mm、厚さ 1mm の頭蓋骨欠損に変更したが、この骨欠損はラットの骨細胞により完全に修復されてしまう事が分かった。ヒト臍帯血由来単核球細胞移植群、ヒト骨芽細胞移植群、コントロール群の 3 群ともに移植後 2 週間の時点で相当量のラット再生骨で修復されており、しかも 3 群に有意差を認めなかった【Fig.1】。



【Fig.1】移植後 2 週間での Micro 3DCT 画像。向かって左側がの骨欠損は移植細胞なし群。向かって右側がヒト臍帯血由来単核球細胞移植群で、両者ともラット再生骨による修復が進んでいる。

そのため更に移植条件を変更し、ラットの頭蓋骨骨膜下に気腔率 60% の -TCP ブロックで作製した移植腔 (内径 5mm 厚さ 1mm)

とすることで、骨芽細胞が良好に増殖する移植条件が得られないか検討中である。現在も臍帯血由来単核細胞群移植による in-vivo での実験を継続中である。

参考文献

Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. M.W.Lee, Y.J.Moon, J.S.Park, Biochemical and biophysical Research Communications. 2004; 320: 273-278.

Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. Terai M,Uyama T,Sugiki T,Li XK,Umezawa A,Kiyono T Mol Biol Cell. 2005 Mar;16(3):1491-1499.

Critical Parameters for Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood K.Bieback, S.Kern Stem Cell. 2004; 22(4):625-634.

Osteoblast Differentiation of Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells and Enhanced Cell Adhesion by Fibronectin. N.K.Mekala, R.R.Baadhe, S.R.Parcha, Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2012; 9(5):259-264.

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)

〔学会発表〕(計 13 件)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時形成術の長期経過-言語成績-第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2016.05.26-27. ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪市北区)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時形成術の長期経過-顎発育-第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2016.05.26-27. ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪市北区)

村松裕之 2 次骨移植を実施していない歯肉骨膜形成術施行症例における顎裂の変化第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2016.05.26-27. ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター (大阪市北区)

村松裕之 両側性唇顎口蓋裂患者への取り組みと問題点 第40回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2016.05.26-27. ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター(大阪市北区)

赤松正 口蓋単独裂児の術前矯正の試み-Latham型 Pin-retention口蓋矯正装置による裂幅の狭小化 第40回日本口蓋裂学会総会・学術集会 2016.05.26-27. ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター(大阪市北区)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時形成術の長期経過-言語成績- 第59回日本形成外科学会総会学術集会 2016.04.13-15. 福岡国際会議場(福岡市博多区)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時形成術の長期経過-顎発育- 第59回日本形成外科学会総会学術集会 2016.04.13-15. 福岡国際会議場(福岡県博多区)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時手術の長期経過-顎発育- 第33回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2015.11.12-13. 宝塚ホテル(兵庫県宝塚市)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた唇顎口蓋同時手術の長期経過-言語成績- 第33回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 2015.11.12-13. 宝塚ホテル(兵庫県宝塚市)

村松裕之 歯肉骨膜形成術施行症例に於ける顎裂の変化 第39回日本口蓋裂学会総会学術集会 2015.05.21-22. 砂防会館(東京都千代田区)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた早期口蓋形成術の長期経過-10才時の顎発育と言語- 第38回日本口蓋裂学会総会 2014.05.29-30. 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

村松裕之 術前顎矯正治療を施行した片側唇顎口蓋裂症例に対する第1期矯正歯科治療による変化について 第38回日本口蓋裂学会総会 2014.05.29-30. -札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

花井潮 術前顎矯正装置を用いた早期口蓋形成術の長期経過-言語成績得を中心として- 第57回日本形成外科学会総会学術集会 2014.04.09-11. 長崎ブリックホール(長崎県長崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者
赤松 正 (AKAMATSU, tadashi)
東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10276850

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号: