

2019年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題 (副題)	臍帯由来幹細胞を用いた再生医学的アプローチ —早期顎裂閉鎖に向けた基礎研究—
キーワード	①唇顎口蓋裂、②臍帯由来幹細胞、③再生医療

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	シナガワ レイ 品川 令	所属等	明海大学歯学部形態機能成育学講座 歯科矯正学分野 助教
プロフィール	2011年3月 明海大学歯学部歯学科卒業 2016年3月 明海大学大学院歯学研究科理工系歯材応用研究群歯科矯正学専攻 博士課程修了(博士(歯学)) 2017年11月 明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野 助教 現在に至る 所属学会：日本矯正歯科学会、東京矯正歯科学会、日本口蓋裂学会、日本顎変 形症学会		

1. 研究の概要

同意の得られた満期妊産婦の臍帯組織を採取し、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells: hUCMSCs) を分離・培養した。In vitroにおいて、細胞形態、細胞増殖能、表面抗原、遺伝子発現、多分化能等の間葉系幹細胞特性を評価した。また、歯槽骨欠損モデル動物を作製し、移植担体と共にhUCMSCsを歯槽骨欠損部分に移植して、in vivoにおける骨形成能を検討した。

骨髓液とは異なり、臍帯はその採取がきわめて容易で、患児や母体に対する侵襲性もない。また、従来MSCsの培養にはウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS) 含有培養液が多用されている。FBSの使用には、プリオンや病原性ウイルスなどの未知の感染因子の混入の可能性、免疫反応などのリスクを伴う可能性が否定できない。そこで本研究では、他種の動物由来の成分を含まない(ゼノフリー)細胞培養法を用いて、将来的な臨床応用に向けたより安全かつ実践的な基礎技術の確立を目標とした。

2. 研究の動機、目的

唇顎口蓋裂は、口唇裂、口蓋裂および顎裂が合併した1/500という高い発症率の先天性疾患である。唇顎口蓋裂児の顎裂は、口腔の形態と機能の異常の原因となる。唇顎口蓋裂児の顎裂閉鎖において、しばしば歯肉骨膜形成術(gingivoperiosteoplasty: GPP)が行われる。GPPは、主に乳児期に顎裂部を両側の骨膜弁により被覆し、骨架橋形成を促すことを目的に行われる外科手術である。GPPによる歯槽堤の連続性の獲得は、口腔機能の正常な発達や、顎裂への舌の侵入防止を、顎裂部二次骨移植が行われる時期よりはるかに早期に実現することができる。当分野では、口唇形成術施行時にGPPを行うことで、乳児期(生後3-6ヶ月)に早期の顎裂閉鎖を行ってきた。しかしながら、顎裂部を三次元的に評価したところ、必ずしも骨架橋形成は十分ではなく、垂直的にも唇舌的にも骨形成量が不十分な例もあった(真野ら、日口蓋誌、2014)。今後は、いかに顎裂部の骨架橋形成量を向上させるかが大きな課題と考えている。

近年、骨の再生に間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)が有用であると報告されている。間葉系幹細胞は生体に由来する組織幹細胞であるため、腫瘍化やがん化の危険性が低く、安全な臨床応用が期待できると考えられている(Zuk PA et al., Tissue Eng 7, 2001)。

MSCs は成体マウスの骨髄吸引液中から同定され(Friedenstein AJ et al., Exp Hematol 4, 1976)、再生医療の幹細胞移植療法の細胞源として有力視されてきた。しかし、骨髄由来幹細胞を分離するには、骨髄液を得るために骨髄穿刺を行わなければならない、患者の負担が大きいことが欠点の一つとして挙げられてきた。現在当分野においても、IRB の承認のもと、GPP と共に患児由来の骨髄を移植することで、その成績向上を図っている。しかしながら、乳児期の骨髄液採取により患児への外科的侵襲が増加する問題や、骨髄採取が困難な例もある。現在、どのようにすれば、乳児期の骨髄採取に伴う問題点を解決し、顎裂部の骨架橋形成量を向上させることができるかは未だ不明である。

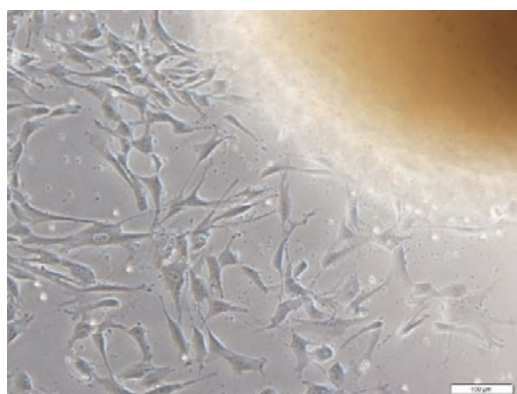
骨髄液以外の幹細胞源が模索される中で、近年、母体や胎児に対し外科的侵襲を伴わず採取できる臍帯由来間葉系幹細胞 (umbilical cord mesenchymal stem cells: UCMSCs) が注目されてきている(Yuri A et al., Stem Cells 21, 2003)。通常これらは医療廃棄物となる臍帯から得られるため倫理的問題が少なく、自家幹細胞を用いた安全な臨床応用として期待されている。

そこで本研究では、GPP 施行後に顎裂部に形成される骨架橋量を、ヒト臍帯由来間葉系幹細胞 (human umbilical cord mesenchymal stem cells: hUCMSCs) の移植により向上させることを目的として、hUCMSCs の分離、培養を行い、骨形成能を検討した。

3. 研究の結果

(未発表データのため、概略のみ記載)

hUCMSCsの細胞形態は、線維芽細胞様の形態を示した。*In vitro*解析において、hUCMSCsは間葉系幹細胞マーカーが陽性で、未分化維持関連遺伝子を発現し、多分化能を有していた。*In vivo*評価では、ハイドロキシアパタイトとコラーゲンの複合体から成る担体にFBS含有培養液で培養したhUCMSCsを播種し、ラットの顎裂モデルへ移植した。マイクロCTおよび組織染色により骨形成の評価を行ったところ、担体単独に比べてhUCMSCsを加えた移植は骨形成量を増加させた。新生骨周囲にはオステオポンチン陽性の骨芽細胞様細胞が集積し、ヒト特異的ミトコンドリア陽性細胞も観察された。



臍帯組織小片 (右上) から増殖してきた細胞

4. 研究者としてのこれからの展望

今後はさらに個体数を増やし、個体間の差を検証するとともに、ゼノフリー培養液を用いた細胞分離・培養条件の最適化を図る。*In vitro*において分離・培養条件を最適化した hUCMSCs を、ゼノフリー担体上に播種し、*in vivo*での骨形成を定量的・定性的に評価する。なお対照として、担体単独移植および、hUCMSCs の培養上清を添加した担体移植による骨形成も検討する計画である。このような唇顎口蓋裂のような先天性疾患に関する研究に留まらず、歯科医療を通じて幅広く社会に貢献できるよう尽力していきたい。

5. 社会に対するメッセージ

本研究により、唇顎口蓋裂以外の歯槽部骨欠損の再建を目的とした歯科の再生医療においても多くの知見が得られ、今後の臨床に飛躍的な進歩が期待できると考えております。本研究を実施するにあたり、研究助成を交付していただいた、日本私立学校振興・共済事業団ならびに関係者の方々に深く感謝申し上げます。