

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03840

研究課題名(和文) “Precision Prosthodontics” に向けた骨機能チップの開発

研究課題名(英文) Development of Bone Organoid Models Towards the Precision Prosthodontics

研究代表者

江草 宏 (Egusa, Hiroshi)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30379078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、臓器レベルの細胞機能を試験管内で模倣して再現する生体機能チップの技術が注目されている。本研究で我々は、硬組織の生体機能チップの開発を目指し、iPS細胞を用いた骨/軟骨/歯オルガノイド培養系の確立に取り組んだ。iPS細胞を微小空間で培養することで細胞凝集塊を形成させ、骨様組織を導く技術や、振盪培養を応用することで、試験管内で軟骨細胞塊の分化を促進し、骨/軟骨複合体を導く技術を見出した。また、iPS細胞の段階的な分化誘導によりエナメル芽細胞を得る方法を確立した。本研究成果は、今後の生体機能チップの製作に寄与し、患者硬組織を試験管内に再現する精密補綴歯科医療の基盤技術に繋がることと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、個人差を適切な治療法の選択に利用する精密医療の有用性が認識されており、個人差の術前診断に向けたヒトの病態・体質を試験管内で再現・評価するモデル(オルガノイド)の開発が重要となっている。本研究は、万能細胞として知られるiPS細胞を利用して、試験管内で骨、軟骨、歯のオルガノイドの作製技術を検討したものであり、その成果は顎の骨や歯の個人差を分子生物学的に検出する基盤技術に繋がることと期待される。

研究成果の概要(英文)：Recently, organoid-on-a-chip technologies, which enable us to reproduce biological function of cells and tissues at the organ level in vitro, commands considerable attention. The aim of this study was to establish culture methods for the bone/cartilage/tooth organoids-on-a-chip using induced pluripotent stem (iPS) cell technology towards creating precision prosthodontics. We established induction method of iPS cells to bone organoid using micro-space culture wells. We also found a method to induce the bone/cartilage hybrid by applying a shaking culture. Furthermore, we established a step-wise culture method to induce iPS cells to enamelblasts. These results would contribute to the production of bone/cartilage/tooth organoids-on-a-chip in the future, and may lead to the basic technology of precision prosthetics that reproduces patient hard tissues in vitro.

研究分野：再生医学、歯科補綴学

キーワード：iPS細胞 オルガノイド 骨 軟骨 歯胚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯を失った後の顎堤吸収や骨再生の「個人差」は補綴・インプラント治療に大きな影響を与える。本研究では、生体組織を疑似した骨オルガノイド培養系を用いることで、患者個人の骨代謝・骨再生を試験管内に再現し、術前診断に活用する技術基盤の構築を目的とする。そのために、患者の体質を反映する iPS 細胞を用いた骨、軟骨、歯の生体機能チップ (Organoids-on-a-chip) 開発を試み、“Precision Prosthodontics (高精度補綴歯科治療)” への道筋を探索する。

2. 研究の目的

近年、臓器レベルの細胞機能を試験管内で微小環境を忠実に模倣して再現する技術である、生体機能チップが注目されている。一方、iPS 細胞はその多能性のため、理論上あらゆる組織の再構築が可能である。代表者は、これまで iPS 細胞を用いた硬組織のバイオエンジニアリングに取り組んできた経験から、iPS 細胞技術を利用して顎骨、軟骨、歯の生理学性を反映する“硬組織機能チップ”を開発し、個人差を分子生物学的に検出するツールに資することを着想した。本研究の目的は、硬組織の生体機能チップの開発を目指し、iPS 細胞を用いて生体における環境を疑似した骨/軟骨/歯オルガノイド培養系を確立することである。

3. 研究の方法

研究期間内に、以下の骨、軟骨、歯に関連するオルガノイド培養技術の確立に取り組んだ。

- (1) iPS 細胞の骨オルガノイド誘導におけるマイクロ空間の利用
マウス iPS 細胞の胚葉体を異なるサイズ (直径 500、400、900 μm) のマイクロ空間培養器 (Elplasia) で培養し、さらに骨芽細胞分化誘導培地を用いて 3 次元培養を行った。
形成された細胞塊の骨芽細胞分化について、RT-PCR 法や細胞組織切片観察で評価した。
最も成熟した骨芽細胞塊を誘導したマイクロ空間を用いて骨様オルガノイドを作製し、ラット頭蓋骨欠損モデルを用いてその骨形成能を評価した。
- (2) iPS 細胞にマイクロ空間および振盪培養を用いた骨/軟骨複合体誘導の試み
マウス iPS 細胞に直径 500 μm のマイクロ空間培養器を用いて胚葉体を作製し、これに振盪培養を加える培養系を設定した。この培養系において、骨芽細胞分化誘導培地および軟骨細胞分化誘導培地を組み合わせ、iPS 細胞の分化の方向性の制御を試みた。
- (3) iPS 細胞に振盪刺激を用いた軟骨組織誘導の試み
マウス iPS 細胞に 96-well プレートを用いて細胞塊を誘導し、軟骨細胞誘導培地で 3 日間静置培養した後、シーソー培養による振盪刺激を加え、その軟骨細胞分化への影響を評価した。
- (4) 間歇的圧縮刺激を用いた iPS 細胞胚葉体の分化方向の決定
自作したバイオリアクターを用い、マウス iPS 細胞胚葉体に間歇的圧縮刺激を与え、この刺激が iPS 細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について RNA シークエンスにより網羅的に解析した。
- (5) iPS 細胞に段階的誘導法を用いたエナメル芽細胞誘導の試み
マウス iPS 細胞から胚葉体を形成し、段階的に surface ectoderm (ステージ 1)、dental epithelial cell (ステージ 2)、エナメル芽細胞 (ステージ 3) への分化誘導培地を最適化し、効率的なエナメル芽細胞分化誘導法を確立した。また、iPS 細胞に組み込んだドキシサイクリン誘導性の遺伝子発現システムを活用し、各ステージにおける amelogenin (Amelx) あるいは epiprofin 遺伝子の過剰発現がエナメル芽細胞の分化誘導に及ぼす影響を RT-PCR、細胞組織切片観察、マイクロアレイ解析などで評価した。

4. 研究成果

- (1) 特定サイズのマイクロ空間培養は iPS 細胞の骨様オルガノイド形成を促進する
直径 500 μm のマイクロ空間培養器は、直径 400 および 900 μm のマイクロ空間培養器と比較して iPS 細胞の生存率を高めたまま胚葉体および骨芽細胞塊を形成することが明らかとなった。また、マウス iPS 細胞を直径 500 μm のマイクロ空間で 3 次元培養することで、類骨を豊富に含む骨様組織を作製することが可能であることを見出した。また、この骨様組織はラット頭蓋骨の再生を著明に促したことから、本技術は骨機能チップへの応用だけでなく、骨の再生にも有用である可能性が示唆された (Limraksasin P. et al., Stem Cells Int, 2020)。

- (2) マイクロ空間培養および振盪培養は iPS 細胞の骨/軟骨への分化誘導を制御する
マウス iPS 細胞にマイクロ空間培養を適用することにより、軟骨および骨組織への分化に有用な細胞凝集塊の形成を促すことが示唆された。この状態の細胞凝集塊は、振盪培養の刺激によって骨芽細胞への分化が容易となり、同時に軟骨細胞への分化も刺激されることが明らかとなった。そこで、培養系の後半で骨芽細胞分化誘導培地から軟骨細胞分化誘導培地に置き換えると、試験管内で骨/軟骨複合体を導くことが可能であった。この分化過程では、未分化から中胚葉系細胞を経て骨/軟骨に至るまで、生体の発生過程をある程度模倣した遺伝子発現様式を示した (Limraksasin P. et al., Int J Mol Sci, 2020)。
- (3) 振盪培養は iPS 細胞の軟骨組織塊への分化誘導を制御する
マウス iPS 細胞塊を軟骨細胞分化誘導培地の中で振盪培養することで、軟骨細胞の分化が著明に促進することが明らかとなった。この振盪培養の分化誘導促進作用の詳細を解析した結果、振盪刺激が TGF- β 発現および Wnt シグナル伝達を制御することによって iPS 細胞から 3 次元的な軟骨細胞塊への分化誘導が促進されることを明らかにした。 (Limraksasin P. et al., Sci Rep, 2020)。
- (4) 間歇的圧縮刺激は iPS 細胞胚葉体の細胞増殖およびアポトーシスを制御する
RNA シークエンスの結果、iPS 細胞胚葉体への間歇的圧縮刺激が p53 シグナル伝達経路を介して細胞増殖を促進する一方で、アポトーシスを抑制することが明らかとなった。この結果は、初期分化過程にある iPS 細胞胚葉体において、間歇的圧縮刺激を加えることで分化の方向付けを制御できる可能性を示唆している。また、間歇的な刺激を与えた後に骨芽細胞へ分化誘導すると、刺激を与えた細胞塊はその後の骨芽細胞分化が有意に亢進する可能性を明らかにし、今後の骨オルガノイド誘導技術への応用が期待される成果を得ている (Manokawinchoke J. et al., Int J Oral Sci, 2022)。
- (5) 段階的分化誘導法による iPS 細胞のエナメル芽細胞への効率的な分化誘導
マウス iPS 細胞から段階的に分化誘導する過程で、ステージ 2 の dental epithelial cell への誘導における lithium chloride、BMP-4、レチノイン酸添加の至適量を見出すこと等により、効率的にエナメル芽細胞を得る方法を確認した。さらに、誘導過程後期における Amelx 遺伝子の過剰発現が、細胞接着の促進および細胞増殖・移動を抑制することを明らかにした (Miao X. et al., Int J Mol Sci, 2021)。
また、iPS 細胞からエナメル芽細胞への分化誘導において、epiprofin 遺伝子の過剰発現が BMP-Smad シグナル伝達経路を調節したことから、今後のエナメル芽細胞の分化誘導技術の開発において epiprofin の制御がターゲットとなる可能性が示唆された (Miao X. et al., Front Bioeng Biotechnol, 2022)。
本知見は異なる分化ステージの歯原性上皮細胞を得るために重要な技術であり、今後、歯原性間葉細胞と相互作用させることで、歯胚オルガノイドの作製技術に繋がることを期待される。

以上の本研究成果は、今後の iPS 細胞を活用した生体機能チップの製作に寄与し、将来的にはその技術を活用して患者硬組織を試験管内に再現することで、硬組織を対象とした補綴歯科治療における術前診断、病態解明や治療法探索の基盤技術、Precision Prosthodontics に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Limraksasin P, Kosaka Y, Zhang M, Horie N, Kondo T, Okawa H, Yamada M, Egusa H	4. 巻 10
2. 論文標題 Shaking culture enhances chondrogenic differentiation of mouse induced pluripotent stem cell constructs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 14996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72038-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Limraksasin P, Egusa H	4. 巻 -
2. 論文標題 A method for in vitro fabrication of hybrid bone/cartilage tissue using mouse induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2021_361	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Limraksasin P, Kondo T, Zhang M, Okawa H, Osathanon T, Pavasant P, Egusa H	4. 巻 21
2. 論文標題 In vitro fabrication of hybrid bone/cartilage complex using mouse induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 581
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21020581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Limraksasin P, Okawa H, Zhang M, Kondo T, Osathanon T, Pavasant P, Egusa H	4. 巻 2020
2. 論文標題 Size-optimized micro-space culture facilitates differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into osteoid-rich bone constructs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells Int	6. 最初と最後の頁 7082679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/7082679. eCollection 2020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Manokawinchoke J, Limraksasin P, Okawa H, Pavasant P, Egusa H, Osathanon T	4. 巻 14
2. 論文標題 Intermittent compressive force induces cell cycling and reduces apoptosis in embryoid bodies of mouse induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Oral Sci	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41368-021-00151-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Manokawinchoke J, Pavasant P, Limjeerajarus CN, Limjeerajarus N, Osathanon T, Egusa H	4. 巻 125
2. 論文標題 Mechanical loading and the control of stem cell behavior	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 105092
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105092.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miao X, Niibe K, Zhang M, Liu Z, Nattasit P, Ohori-Morita Y, Nakamura T, Jiang X, Egusa H	4. 巻 22
2. 論文標題 Stage-specific role of amelx activation in stepwise ameloblast induction from mouse induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 7195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22137195.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Miao X, Niibe K, Fu Y, Zhang M, Nattasit P, Ohori-Morita Y, Nakamura T, Jiang X, Egusa H	4. 巻 -
2. 論文標題 Epiprofin transcriptional activation promotes ameloblast induction from mouse induced pluripotent stem cells via the BMP-Smad signaling axis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Bioeng Biotechnol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 1st Chiang Mai University-Tohoku University Special Online Dental Meeting 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 iPS細胞を用いた骨/軟骨バイオエンジニアリング
3. 学会等名 第128回 日本補綴歯科学会学術大会 シンポジウム「Biodental Engineering - 再生歯科補綴に向けた人工臓器の創成 - 」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 18th International College of Prosthodontists & 43rd European Prosthodontic Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS Cell-Based Strategies in Bone Tissue Engineering
3. 学会等名 2nd Joint Symposium Between School of Stomatology Wuhan University and Tohoku University Graduate School of Dentistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 Tohoku-Taiwan-YangMing Dental Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Emerging Approaches for Regenerative Prosthodontics
3. 学会等名 8th International Students' Dental Conference 2020, University of Sharjah Dental Student Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 iPS cell-based strategies in bone tissue engineering
3. 学会等名 Society of Dental Material Science, Chinese Stomatological Association & Academy of Dental Materials Joint Hybrid Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 Biodental Engineering ~2040年の補綴歯科治療に向けて~
3. 学会等名 第24回 日本歯科医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 次世代の再生補綴歯科治療に向けたイノベーションロードマップ
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 細胞を利用した再生歯科補綴治療法の開発
3. 学会等名 第19回 日本再生歯科医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 細胞を利用した再生歯科補綴治療法の開発
3. 学会等名 第21回 再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江草 宏
2. 発表標題 再生歯科医療を基盤としたヘルスプロモーションに向けて
3. 学会等名 第76回 日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Egusa
2. 発表標題 Future Directions for Regenerative Dentistry
3. 学会等名 GC 5th International Dental Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 堀江尚弘, 近藤 威, 江草 宏	4. 発行年 2019年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 250
3. 書名 関節・軟骨の再生医療 (執筆担当: 軟骨内骨化を利用した顎骨再生のアプローチ)	

〔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
研究分担者	新部 邦透 (Niibe Kunimichi) (50468500)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	山田 将博 (Yamada Masahiro) (90549982)	東北大学・歯学研究科・准教授 (11301)	

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

タイ	Chulalongkorn University			
中国	Shanghai Jiao Tong University			