

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10183

研究課題名(和文)顎口腔組織幹細胞を用いたオルガノイド試験管内再構築法確立のための革新的基礎研究

研究課題名(英文) Innovative basic research to establish the organoid using oral tissue stem cells

研究代表者

阿部 成宏 (ABE, Shigehiro)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：00510364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト根未完成歯抜歯の際に歯原性細胞を単離することができる。代表者は、ヒト根未完成歯抜歯時に歯嚢、歯乳頭および歯根膜を採取し、幹細胞生物学的に解析を行った。歯嚢組織由来上皮細胞の培養が可能であった。間葉系組織である歯髄および歯根膜においては、容易に培養が可能で神経堤幹細胞様特性を保持し、組織特異的マーカーを見出した。歯原性上皮ならびに間葉組織由来の細胞からスフェアを形成し、再構築するオルガノイド培養法を検討した。各種オルガノイド培養法を改良し、見出した培養法においてマトリゲルにて包埋後に浮遊培養を行うことで長期培養が可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一患者から採取した歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜由来の多能性細胞の幹細胞特性の違いを初めて報告した。また、今まで未知であった発生段階の歯根形成中の歯の組織特異的分子マーカーとしてCD24およびCD56を同定した。このことは、将来の歯原性間葉組織を区別するためのマーカーとなることが示唆される。さらに、今後は、分子細胞生物学的にこの培養法を改良していく必要があるが、代表者が開発した培養法においてヒト歯原性細胞からなるオルガノイド(アッセンプロイド)を長期間培養することが可能であり、将来の歯の再生におけるオルガノイド培養法において一步を踏み出すことに成功したと考えている。

研究成果の概要(英文)：We isolated the odontogenic cells, including the dental sac, apical papilla, and periodontal ligament, during extraction of human teeth with immature apices and analysed for stem cell biology. We have successfully cultured odontogenic epithelium from dental follicle tissue. Mesenchymal tissues, apical papilla and periodontal ligament were readily culturable, retained neural crest stem cell-like characteristics, and identified each tissue-specific markers. We investigated organoid culture methods for the formation and reconstruction of spheres from cells derived from odontogenic epithelium and mesenchyme. We improved various organoid culture methods and found that long-term culture was possible by floating the culture after Matrigel embedding in the culture method we developed.

研究分野：再生歯学

キーワード：幹細胞 歯原性上皮細胞 歯原性間葉細胞 オルガノイド 歯の再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生体内の多くの正常組織には、自己複製能と多分化能を保持した幹細胞が存在し、組織の発生や損傷修復において極めて重要な役割を果たしている。顎口腔領域においても、現在までに多くの幹細胞分離とその性状解析に関する報告が相次いでおり、その組織採取の簡便性とその利用価値が非常に高いことが注目を集めている。顎口腔組織の器官培養誘導法においてES細胞やiPS細胞のような多能性幹細胞を用いることは決定的な誘導因子が不明であることと、未分化性が高いがゆえに非常に困難と考える。また、近年報告されている歯の器官培養誘導法は、ある特定時期のマウスの組織から細胞を分離し再構築することで組織再生を行っているが、ヒトの再生医療においてこのような手法を用いることは不可能である。したがって、現時点ではヒトの顎口腔組織のオルガノイドによる試験管内器官再構築法では成体組織幹細胞を用いた器官再生誘導法が最も現実性があるものとする。

顎口腔領域において再生すべき組織は、口腔粘膜組織、象牙質・歯髄複合体、歯周組織さらには歯の再生であるが、まだ完全な複合組織再生には至っておらず、複合幹細胞分化誘導ならびに試験管内器官再構築法に関する報告は非常に少ない。

幹細胞研究は、現在新たなステージへと突入しようとしている。従来の単層培養系などを用い、表面マーカー解析や多分化能によって幹細胞特性を評価するものを第1世代とすれば、3次元培養法を用いて単離した幹細胞研究が第2世代である。現在では、それらを複合化組織としてオルガノイド形成によって器官再生や創薬開発などを旨とする研究が第3世代の幹細胞研究といえる。

代表者らは、各種顎口腔組織からの単層培養法を用いた第1世代の幹細胞分離と性状解析としてヒト根末完成歯 (S Abe *et al.* Oral Sci Int, 2007., S Abe *et al.* Biochem Biophys Res Commun, 2008.) および下顎骨から (C Yoshida *et al.* J Craniofac Surg, 2016) の幹細胞単離に関して報告している。さらに、3次元培養を用いた第2世代としてのヒト根末完成歯の根尖部歯髄組織から (S Abe *et al.* Stem Cell Res Therap, 2011., S Abe *et al.* Cell Boil Int, 2012)、ヒト口腔粘膜固有層から (S Abe *et al.* Stem Cells Transl Med, 2016.) の神経堤幹細胞分離と再生医学的研究に関して報告している。これらのそれぞれの幹細胞特性は評価をされているが、同一患者由来の組織由来細胞での検討がなされておらず、その違いが何であるかが検討されていない。さらに、それらをかけ合わせることでどのような組織再生が可能でありどこまでが限界であるのかという結果には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究では多種の顎口腔組織幹細胞の違いとそれらの組み合わせによる組織再生が可能であるのかということ明らかにし、個々の幹細胞集団の適切な組み合わせによるオルガノイド試験管内器官再構築法開発のための革新的基礎研究を行うことを目的とする。

本研究では日本大学医学部倫理委員会の承認の下、ヒト顎口腔領域由来の幹細胞(歯髄、歯根膜、口腔粘膜由来の神経堤幹細胞ならびに歯原性上皮幹細胞)を今までの代表者が行ってきた幹細胞学的手法によって、その細胞を単離し、性状解析を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) 顎口腔領域の組織幹細胞の単離と3次元培養による幹細胞純化

ヒト根末完成智歯抜歯時に採取された口腔粘膜、歯根膜、歯乳頭および歯冠包組織から単離

され、凍結保存された各種幹細胞を用いて、スフェア分離法による3次元培養（無血清のDMEM/F12培地にN2サプリメント、EGF、bFGFを添加した培地下に超低付着培養皿にて単離）を行い、各種幹細胞を単離する。各ストックサンプルの細胞の幹細胞生物学的な性状解析をおこなった。

（2）それぞれの組織幹細胞の組み合わせによるオルガノイド培養と*in vitro*での性状解析  
歯の再生の可能性...歯原性上皮幹細胞、口腔粘膜間葉系幹細胞、歯根膜幹細胞および歯乳頭由来幹細胞を用いて歯の再生の可能性に関して検討する。培養法に関しては、マトリゲル中にスフェアを包埋するマトリゲルドーム法を用いて、既存のオルガノイド培養法を改良した培地を用いて培養を行う。この際に、これらの因子の適切な濃度と細胞数の検討を行う。オルガノイド成熟培地として歯の発生に重要な成長因子を加え最適な培養法を確立する。オルガノイド培養開始からExpansion Medium培養での10日目、Maturation Medium培養1、2および3週目培養した。

（3）組織幹細胞の組み合わせによる器官再構築法の*in vivo*再生能の検討

オルガノイド培養した上記の組織を免疫不全マウスの頭蓋骨欠損マウスへ移植し、移植後12週後の再生能を検討した。

#### 4. 研究成果

（1）口腔組織からの多能性細胞の幹細胞特性の違いと組織特異的分子マーカーの同定

全ての組織由来細胞は、大部分が神経堤幹細胞マーカーである *nestin*<sup>+</sup>/*CD44*<sup>+</sup>細胞集団であり、細胞生物学的解析では差は認められなかった。網羅的遺伝子解析の結果、歯乳頭は *CD24*<sup>+</sup>/*CD56*<sup>+</sup>、歯根膜は *CD24*<sup>+</sup>/*CD56*<sup>+</sup>、口腔粘膜では *CD24*<sup>+</sup>/*CD56*<sup>+</sup>であった。これらは、ヒト組織においても同様の所見を示した。*in vitro* 分化能に関しては、全ての組織由来細胞が神経堤細胞系統への分化能を保持していたが、硬組織形成細胞分化能では、歯乳頭および歯根膜由来細胞が脂肪細胞分化能では口腔粘膜由来細胞が有意に分化能が高かった。また、*in vivo* での硬組織再生は、歯乳頭由来細胞が歯根膜および口腔粘膜よりも有意に高かった。各組織由来細胞は単純な解析では同様の神経堤幹細胞様の表現型を示すが、その分子マーカーおよび分化能は異なっていた。また、*in vivo* 硬組織再生能は臨床的な各組織の特徴を保持していた。同一患者から採取した歯乳頭、歯根膜および口腔粘膜由来の多能性細胞の幹細胞特性の違いを初めて報告した。また、今まで未知であった発生段階の歯根形成中の歯の組織特異的分子マーカーとして *CD24* および *CD56* を同定した（図1）（S Abe et al. Cell Prolif, 2022.）

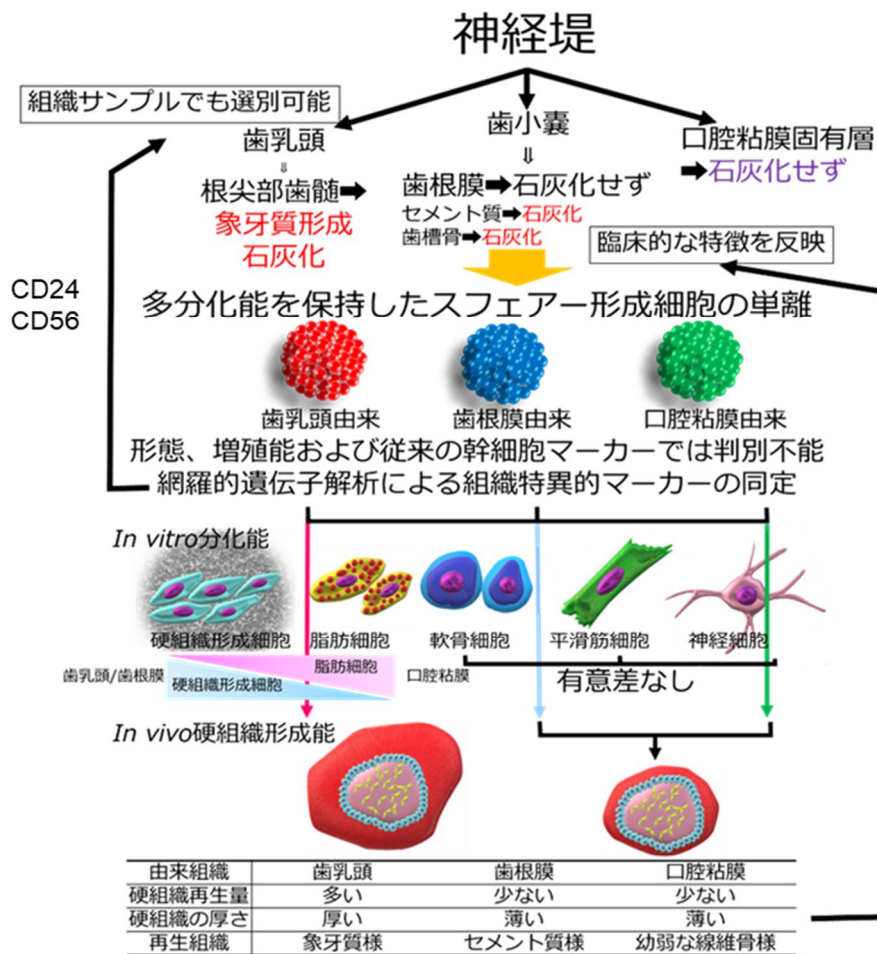


図 1 : 組織採取別の幹細胞特性の違いと組織特異的分子マーカーの同定

## (2) 各種細胞を用いたオルガノイドの検討

これらの幹細胞と歯囊組織から単離した歯原性上皮幹細胞を同一患者から単離することが可能となっている。しかしながら、歯囊組織由来の歯原性上皮細胞の培養には、個体差が非常に大きいこと、培養者によって単離できる確実性が異なることが明らかになった。個体差に関しては、患者由来の歯囊組織の組織学的検討にて残存している上皮細胞が非常に少ないことが原因であることが判明した。

今までの研究成果により、これらの歯原性細胞を用いたオルガノイド培養法に関して様々なミニ臓器モデルのオルガノイド培養法ならびに候補成長因子の検討により、歯原性細胞から効率よく、かつ長期間のオルガノイドに似た細胞集団を培養できる培養法をついに見出すことに成功した(図2)。しかしながら、歯囊由来の上皮細胞は3次元培養でのスフェア形成がしにくく、各組織由来細胞からのアッセンブロイド形成を行うも上皮細胞が間葉から分離してきってしまうことが問題であった。

また、免疫不全マウスへの移植実験では頭蓋骨に5mmの骨欠損を作成し、移植を行ったが、12週の時点では、移植していないコントロール群でも骨再生が認められ、明らかな違いを確認できなかった。また、歯牙様の構造物の再生を認めなかったため、やはり上皮細胞の問題を解決する必要があると考えた。

今後は、歯原性上皮細胞の性状解析と3次元培養法の検討を行うことが課題として残った。

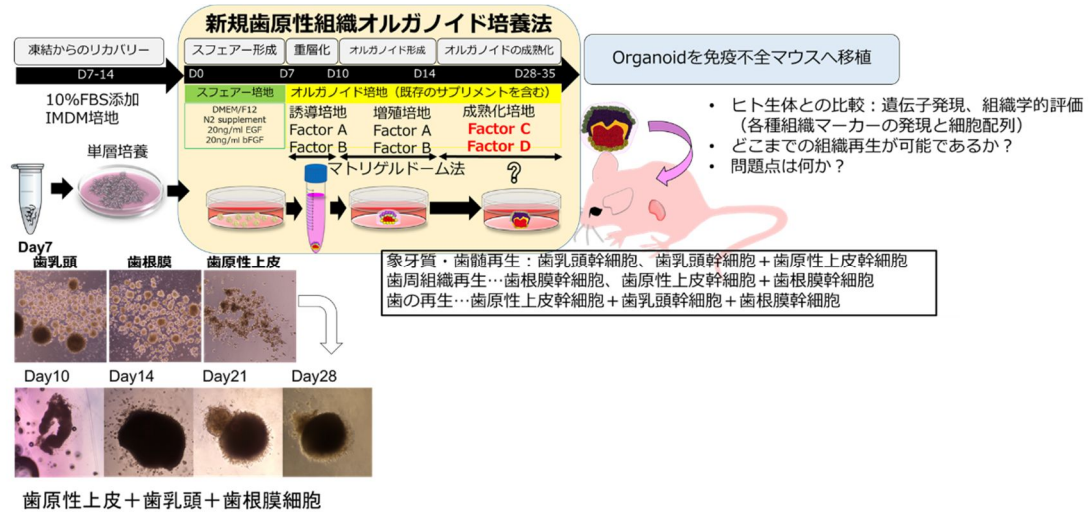


図 2: 代表者が確立した 3次元長期培養システム

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kitano Hisataka, Koyama Naoko, Ishikawa Tomomi, Takahashi Mamiko, Abe Shigehiro, Takemoto Toru	4. 巻 7
2. 論文標題 A case of coagulation factor XIII deficiency which was diagnosed by examinations immediately before tooth extraction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral and Maxillofacial Surgery Cases	6. 最初と最後の頁 100214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omsc.2021.100214	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 -
1. 著者名 Kobayashi Tatsuro, Abe Shigehiro, Yokomizo Naoko, Kitano Hisataka, Ono Takashi, Takeda Toshiaki, Kobayashi Yutaka	4. 巻 63
2. 論文標題 Identification of malocclusion risk factors after closed treatment of condylar fractures using a novel three-dimensional computed tomography approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.20-0600	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 -
1. 著者名 高橋 真美子、阿部 成宏、篠田 健太、眞宮 淳、武元 徹、相澤 聡一、北野 尚孝	4. 巻 27
2. 論文標題 急速な増大を示した顎骨転移を伴わない肺腺癌の歯肉転移の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本口腔内科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 33
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 横溝 尚子、阿部 成宏、小林 裕	4. 巻 67
2. 論文標題 抜毛癖・食毛癖を有する患者に発症した毛髪を核として形成された顎下腺管内唾石の1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 626
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Abe Shigehiro, Kaida Atsushi, Kanemaru Kazunori, Nakazato Keiichiro, Yokomizo Naoko, Kobayashi Yutaka, Miura Masahiko, Miki Toshio, Hidai Chiaki, Kitano Hisataka, Yoda Tetsuya	4. 巻 55
2. 論文標題 Differences in the stemness characteristics and molecular markers of distinct human oral tissue neural crest derived multilineage cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Proliferation	6. 最初と最後の頁 e13286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpr.13286	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Fujiwara Yuusuke, Tanizawa Yuu, Shinoda Kenta, Nagai Tomoya, Mamiya Atsushi, Aizawa Sohichi, Abe Shigehiro, Kitano Hisataka	4. 巻 35
2. 論文標題 Unicentric plasma cell type of Castleman's disease in the submandibular: A case report and literature review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	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) 10.1016/j.ajoms.2023.01.002	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Abe Shigehiro, Yokomizo Naoko, Asano Masatake, Mishimagi Takashi, Hyodo Katsuya, Kobayashi Yutaka, Admin	4. 巻 73
2. 論文標題 Multifocal intraoral ductal ectasia with metaplasia and focal epithelial proliferation: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the Pakistan Medical Association	6. 最初と最後の頁 187~190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.47391/jpma.5453	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Abe Shigehiro, Kobayashi Tatsuro, Yokomizo Naoko, Hyodo Katsuya, Kitano Hisataka, Kobayashi Yutaka	4. 巻 34
2. 論文標題 Evaluation and Prediction of Healing Morphology After Closed Reduction for Unilateral Mandibular Condyle Fractures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 865 ~ 869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SCS.00000000000008978	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川埜 天平、阿部 成宏、篠田 健太、高山 裕正、永井 智也、小宮山 和寛、高橋 真実子、眞宮 淳、武元 徹、北野 尚孝
2. 発表標題 当科における下顎智歯抜歯症例における有病者患者の臨床統計学的検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高山 裕正、川埜 天平、阿部 成宏、篠田 健太、川埜 天平、永井 智也、小宮山 和寛、高橋 真実子、眞宮 淳、武元 徹、北野 尚孝
2. 発表標題 ステロイド薬服用患者における智歯抜歯時の臨床統計学的検討
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠田 健太、阿部 成宏、眞宮 淳、高山 裕正、川埜 天平、高橋 真実子、相澤 聡一、永井 智也、北野 尚孝
2. 発表標題 Marfan症候群患者に対して周術期管理に配慮して抜歯を行った1例
3. 学会等名 212回日本口腔外科学会関東支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 兵頭 克弥、横溝 尚子、阿部 成宏、小林 裕
2. 発表標題 下唇に生じたグロームス腫瘍の1例
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 小宮山 和寛、北野 尚孝、阿部 成宏、眞宮 淳、藤原 祐輔、正岡 鷹、高橋 真実子、日台 智明
2. 発表標題 Del1とタキソイド系抗悪性腫瘍薬の併用による口腔扁平上皮癌への影響
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部 成宏、中里 圭一郎、横溝 尚子、小林 裕、北野 尚孝、依田 哲也
2. 発表標題 口腔組織由来多能性細胞の採取部位別幹細胞特性の違いと組織特異的分子マーカーの同定
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------