

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18577

研究課題名（和文）臨床応用に向けた歯周組織再生スフェロイドブロックの開発

研究課題名（英文）Development of spheroid block for clinical application of periodontal tissue regeneration

研究代表者

佐野 孝太郎（Sano, Kotaro）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10852486

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：スフェロイドブロックのもととなる歯根膜細胞スフェロイドは、単層培養細胞に比べて幹細胞関連遺伝子発現、および骨関連遺伝子発現が有意に上昇していた。スフェロイドブロックはピンセットを用いて把持可能で、Live/Dead染色より、中心壊死することなく形態を維持できていた。また、骨分化誘導時に石灰化結節を形成することがALP染色により明らかとなった。また、ブロック内部が疎にならず構成されており、軟骨分化・脂肪分化条件下で誘導すると、それぞれに分化誘導されることが組織学的評価で確認できた。これより、多分化能および内部生存性を有する、操作性を確保したスフェロイドブロックを作成できたことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根膜幹細胞スフェロイドが歯周組織再生に有効であること、スフェロイドが単層培養細胞と比べて生理的機能が向上していることは報告されている。我々は歯根膜幹細胞スフェロイドをマウスおよびラットモデルに移植し、組織再生が可能であることを実証してきたが、スフェロイドの直径が100 μ m程度であり単独での移植が不可能であったため、スキャホールドを併用して実験を行っていた。本研究により、多分化能および内部生存性を有する、操作性を確保したスフェロイドブロックを作成できたことで、歯根膜幹細胞スフェロイドをスキャホールドフリーで移植可能となった。この技術は、細胞治療・再生医療の発展の点で意義深い研究だと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Human periodontal ligament mesenchymal stem cell (hPDLMSC) spheroids, which is the source of the spheroid block, significantly increased expression of stemness markers and osteogenesis-related genes, compared with monolayer-cultured hPDLMSCs. hPDLMSC spheroid block could be held with tweezers, and we confirmed that the morphology of block could be maintained without central necrosis by Live / Dead staining. In addition, ALP staining showed that hPDLMSC spheroid block formed nodules through the osteogenic differentiation. Moreover, the histological evaluation revealed that the inside of the block was not sparse and hPDLMSC spheroid block was induced under the conditions of chondrogenic and adipogenic differentiation. These data suggested that we could prepare a spheroid block with pluripotency, internal viability and operability.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 再生医療 スフェロイド 歯根膜幹細胞 細胞移植

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

歯周組織は種々の組織によって複雑に構成されており、近年、失われた歯周組織を再生するために、成長因子を用いたサイトカイン療法などの数々の再生療法が行われているが、現在のところ、歯周病により失われた歯周組織を完全に再生させることはできていない（Kitamura et al., J Bone Miner Res 2016）。歯周組織を構成する歯根膜に存在する歯根膜幹細胞は多分化能を有し（Seo et al., Lancet 2004）。現在臨床で行われているエナメルマトリックスデリバティブを応用した術式は、歯根膜由来の未分化間葉系細胞に作用することで、失われた歯周組織を再生させる。このように、歯根膜は歯周組織の再生に重要であることが臨床的にも実証されている（Needleman et al., Cochrane Database Syst Rev. 2006）。スフェロイドとは細胞が多数凝集して3次元構造になったもので、スフェロイド培養された細胞は、*in vivo*の培養条件に近く、幹細胞性が向上することが報告されている（Page et al., Cell Tissue Res. 2013）。

我々は、歯根膜幹細胞スフェロイドによる組織再生について検証を行ってきた。スフェロイド作製用マイクロチップ（ウェルの直径 500 μm 、2,000 wells/chip）を用いて培養した歯根膜幹細胞スフェロイドをマウス頭蓋骨欠損モデルに移植すると、単層培養した歯根膜幹細胞よりも新生骨量が増加したことを見出した（Moritani et al., J Periodontal Res. 2018）。また、歯周組織再生能の向上を目的に、歯根膜幹細胞と血管内皮細胞を共培養して作製した共培養スフェロイドをラット歯周組織欠損モデルへ移植すると、歯根膜幹細胞スフェロイドを移植した群に比較して、新生セメント質形成が有意に亢進していたことを明らかにした（Sano et al., Regen Ther. 2020）。

しかし、マイクロウェルチップにより形成されるスフェロイドの直径は 100–200 μm であり、単独で移植することは不可能であった。一方で、スフェロイドを形成する細胞数を増加させ、粒径を大きくすると、スフェロイド中心部に栄養や酸素が供給されにくくなり壊死を起こしてしまう。そのため、過去の研究ではスキャホールドを併用して移植実験を行ったが、移植の際の操作性が課題であった。

そこで、血管内皮細胞に覆われた肝細胞スフェロイドを閉鎖空間に充填して1つの組織とし、毛細血管網を構築したという研究（Okudaira et al., J Biosci Bioeng. 2016, 2017）に着目し、本研究ではスキャホールドフリーで移植可能な方法として、スフェロイドをファイバー化あるいはブロック化するためのデバイスを利用することで、スフェロイドを歯周組織欠損への移植に適した組織に構築できないかという仮説を立て、検証したものである。

2．研究の目的

本研究では、歯根膜幹細胞を用いて作製した歯根膜幹細胞スフェロイドの表面を、血管内皮細胞で覆うことで2層構造のスフェロイドを作製する。さらに、2層構造のスフェロイドからスフェロイドファイバーおよびスフェロイドブロックを作製し、形態的・機能的解析、およびラット歯周組織欠損モデルに移植し歯周組織再生能の検討を行う。

歯根膜幹細胞と血管内皮細胞をコラーゲンコートして作製する共培養スフェロイドモデルは、今までに報告のない新規の歯周組織再生技術であり、スフェロイドをファイバー状およびブロック状に構築する技術は、細胞移植に有効な手法となるため、細胞治療・再生医療の発展の点で意義深い研究だと考えられる。

3．研究の方法

（1）血管内皮細胞に被覆された歯根膜幹細胞スフェロイドの作製および解析

2層構造の共培養スフェロイドの形成および空間分布の確認

スフェロイド作製用マイクロウェルチップ（ウェルの直径 4 mm、4 wells/chip）を用いて、健康なヒトの智歯から酵素法で単離した歯根膜幹細胞より歯根膜幹細胞スフェロイドを作製する。コラーゲン溶液（新田ゼラチン社製）を用いて、歯根膜幹細胞スフェロイド表面にコラーゲンを被覆し、細胞非接着性のディッシュ上で血管内皮細胞（ヒト臍帯静脈内皮細胞；HUVEC）と共培養を行い、血管内皮細胞に被覆された歯根膜幹細胞スフェロイドを形成する。生細胞染色キット（PromoKine 社製）を用いて、形成された2層構造の共培養スフェロイド内部の歯根膜幹細胞および血管内皮細胞の空間分布を評価する。

生/死細胞の分布、幹細胞性、多分化能の検証と比較

コートされた2層構造の共培養スフェロイドと、歯根膜幹細胞と血管内皮細胞を同時にチップに播種して作製した共培養スフェロイド（コートなし）における生/死細胞の分布をLive/Dead染色で確認する。また、コートされた2層構造の共培養スフェロイドと、コートなしの共培養スフェロイドにおける幹細胞マーカーの発現をリアルタイムPCR法にて解析、比較する。さらに、コートされた2層構造の共培養スフェロイドと、コートなしの共培養スフェロイドを骨分化条件（ascorbic acid、 β -glycerophosphate、dexamethasoneを含む培地）で培養し、14日後、リ

リアルタイム PCR 法およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色法で評価、比較する。

(2) スフェロイドファイバー、ブロックの作製・移植実験

スフェロイドファイバーの作製

血管内皮細胞に被覆された歯根膜幹細胞スフェロイドを血漿分離用中空糸に充填し、スフェロイドファイバーを作製する。作製したファイバーについて、組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で形態の検証を、免疫染色で歯根膜幹細胞および血管内皮細胞の分布を評価する。

スフェロイドブロックの作製

で得られたスフェロイドファイバーをネットモールドキット (TissueByNet 社製) に投入して細胞ブロックを作製し、作製したブロックを HE 染色および免疫染色で検証する。

ラット歯周組織欠損モデルへの移植

ラット上顎第 1 大臼歯に歯科用バーを用いて歯周組織欠損を作製し、で得られたスフェロイドブロックを移植する。手術の 4、8 週間後に 3 次元マイクロ CT 撮影および、組織切片 (HE 染色・アザン染色) にて歯周組織再生能 (新生歯槽骨、新生セメント質、新生歯根膜) について検討する。さらに、歯根膜幹細胞と HUVEC の免疫染色により、再生された組織の由来を同定する。

4. 研究成果

(1) 歯根膜幹細胞スフェロイドの作製および解析

これまでの研究で用いてきたスフェロイド作製用マイクロウェルチップとは異なるデザインのチップ (ウェルの直径 4 mm、4 wells/chip) を使用するため、まずは歯根膜幹細胞スフェロイドが形成可能かどうかを調べた。健康なヒトの智歯から歯根膜幹細胞を単離し、細胞数が 2.5×10^5 、 3.0×10^5 、 5.0×10^5 の 3 通りでマイクロウェルチップに播種し、播種 1、3、5、7、10、14 日後の歯根膜幹細胞スフェロイドの直径を計測した。いずれの細胞数の場合でも歯根膜幹細胞スフェロイドが形成され、播種 3 日後に直径が最大となり、その後は収縮していることがわかった (図 1)。本研究では、細胞数 3.0×10^5 、播種 3 日後の歯根膜幹細胞スフェロイドを使用することとした。

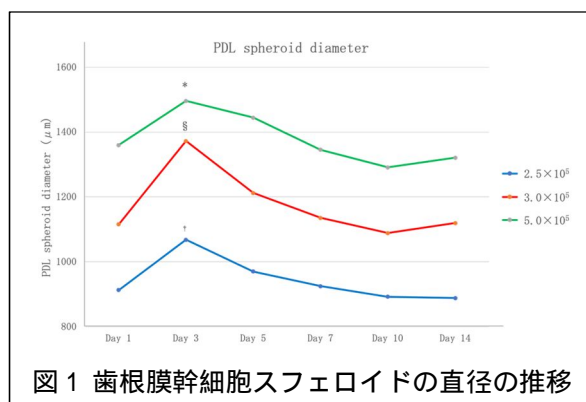


図 1 歯根膜幹細胞スフェロイドの直径の推移

次に、幹細胞の自己複製および幹細胞性の調節に重要な転写因子である *OCT4*、*NANOG* の発現を検討した。リアルタイム RT-PCR の結果より、培養 3 日目での歯根膜幹細胞スフェロイドでの発現は、単層培養した歯根膜幹細胞と比べて有意に上昇していた (図 2)。また、歯根膜幹細胞スフェロイドが、骨分化誘導による骨関連遺伝子発現に影響を与えるか否かを検証するために、リアルタイム RT-PCR 法により骨関連遺伝子 (*ALP*, *BSP*, *RUNX2*, *COL1*, *OCN*, *OPN*) の mRNA 発現を測定した。すべての骨関連遺伝子の mRNA 発現において、単層培養歯根膜幹細胞と比べて有意に発現が増加していた。

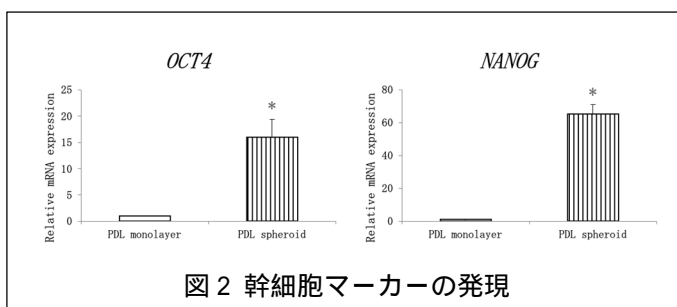


図 2 幹細胞マーカーの発現

さらに、マイクロウェルチップ上で作製した歯根膜幹細胞の表面にコラーゲンを被覆し、血管内皮細胞と共培養を行い、コートされた 2 層構造の共培養スフェロイドを形成する予定であった。しかし、マイクロウェルチップ上で、スフェロイドにコラーゲン被覆をさせながら、血管内皮細胞を共培養させることが困難であることが判明した。

(2) スフェロイドブロックの作製および解析

歯根膜幹細胞スフェロイドをネットモールドキットに投入し、7 日間培養するとスフェロイドブロックを形成することが可能であった (図 3(a))。歯根膜幹細胞スフェロイドのみから作製したスフェロイドブロックは大きさが 3mm × 3mm × 1mm 程度でピンセットを用いて把持可能であり、移植を想定した操作性に支障はないと考えられた (図 3(b))。また、Live/Dead 染色の結果より、ブロックの中心が壊死することなく形態を維持できていることが確認できた (図 4)。これらの結果より、当初予定していたスフェロイドファイバーの作製は中止し、歯根膜幹細胞スフェロイドブロックについて検証を進めることとした。

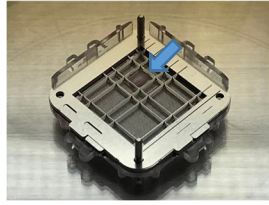


図 3(a) ネットモールドキットに歯根膜幹細胞スフェロイドを投入して7日後。形成されたブロックを矢印で示す。

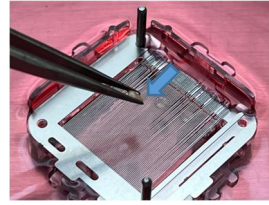


図 3(b) ブロック（矢印）はピンセットで把持可能であった。

スフェロイドブロックの骨分化能を検討するために、骨分化条件で培養したスフェロイドブロックの石灰化結節の解析を行った。歯根膜幹細胞スフェロイドをネットモールドキットに投入した翌日、骨分化条件の培養に変更し、7日間培養後、ALP 染色を行った。歯根膜幹細胞スフェロイドブロックは培養時(図 3(a))と比べて青色に染色され、骨分化誘導時に石灰化結節を形成することが明らかとなった(図 5)。また、スフェロイドブロックの内部構造および多分化能を検証するために、組織学的分析を実施した。HE 染色により、ブロック内部が疎にならずに歯根膜幹細胞で密に構成されていることが明らかとなった。さらに、軟骨分化・脂肪分化条件下で誘導すると、それぞれに分化誘導されることが組織学的評価で確認できた。なお、本研究期間中には、スフェロイドブロックをラット歯周組織欠損モデルに移植し、歯周組織再生について検討する *in vivo* 実験を実現することができなかった。

以上の結果より、多分化能および内部生存性を有する、操作性を確保したスフェロイドブロックを作成できたことが示された。

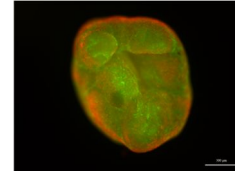


図 4 歯根膜幹細胞スフェロイドブロックの Live/Dead 染色。緑；生細胞、赤；死細胞を示す。



図 5 歯根膜幹細胞スフェロイドブロックの ALP 染色

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------