

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10176

研究課題名（和文）象牙芽細胞突起の機能を有するヒト象牙質オルガノイド作成の試み

研究課題名（英文）Challenges to create human dentin organoids with functional odontoblast.

研究代表者

岡 暁子（OKA, KYOKO）

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：60452778

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、象牙質-歯髄複合体のモデルとして有用な3次元構築物を作製することである。本研究では、マウスの頭蓋神経堤細胞株09-1細胞を用いてスフェロイドを作成し、これをバイオ3Dプリンターを用いて剣山様針に刺入することで3D構造体を作成した。

3次元構造体では、外側に細胞増殖領域とテネascin Cの発現が確認されたが、DMP1の発現は観察されなかった。しかしながら、石灰化誘導培地で培養した場合は、DMP1の発現が促進された。細胞外マトリックスタンパク質であるテナascin CとDMP1は、スフェロイド内で極性発現しており、象牙芽細胞分化に何らかの影響を与えることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

象牙質-歯髄複合体をex vivoで再現することができれば、生体内の歯において、有髄の歯にどのような象牙質修復メカニズムが存在しているのか、また象牙質修復を活性化する因子の探索を生体に近い状態で解析することが可能になる。

遺伝性疾患である象牙質形成不全症や、齲蝕が外傷などで破損した象牙質に対し、第3象牙質の形成を促すことが出来るようになれば、歯科医療において大きく貢献する。また、象牙質修復を促すための薬理学的作用の検証なども行うことができ、覆髄剤等の開発にも寄与できる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to create a 3D construct as a model of the dentin-pulp complex. 3D construct created using 09-1 cells' spheroid, cranial neural crest cell line from mice. The 3D construct was created by skewering spheroids using KENZAN bio-3D printer. Cell proliferation area and tenascin C and DMP1 expressions were observed in the outer layer of spheroids. In addition, expressions of tenascin C and DMP1 in spheroids were significantly enhanced compared to two-dimensional cultures. In the 3D construct created by the bio-3D printer, cell proliferation regions and tenascin C expression were confirmed on the outside of the construct, although little DMP1 expression was observed. Interestingly, in a 3D construct cultured in calcification induction medium, DMP1 expression was promoted, and DMP1-positive cells existed in the outermost layer, without overlapping with tenascin C expression.

研究分野：小児歯科

キーワード：スフェロイド バイオ3Dプリンター Tenascin C DMP1 象牙質 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

象牙質は、象牙芽細胞によって生涯維持されており、齲蝕などの侵襲に対して‘修復象牙質’を新生し歯髄を保護している。近年、エナメル-象牙境まで伸びる象牙芽細胞突起は、生涯にわたって象牙質全体の石灰化を担っていることが報告され (Int. J. Biol. Sci. 2018)、象牙質は、萌出後もその性質を高めることができる組織であることが報告され、‘生活歯髄を失った歯は、象牙質の強度が低下し最終的に寿命が短くなる’という臨床的事実に沿ったエビデンスが示された。

これまでに、象牙質形成に変異を示す遺伝子改変マウスの解析から、象牙芽細胞分化マーカーや象牙マトリックス蛋白が同定され、さらに間葉系細胞を用いた培養によって象牙質の石灰化を含むシグナル調節などが解明されてきた。しかし、生体において象牙芽細胞突起がどのように機能し、生涯にわたって象牙質の維持に寄与しているかについては殆ど明らかとなっていない。象牙質-歯髄複合体を模した 3次元構造体は、象牙質形成メカニズムを解析するための強力なツールとなり得ることから、象牙質-歯髄複合体を模した 3次元構造体作成を試みることにした。

2. 研究の目的

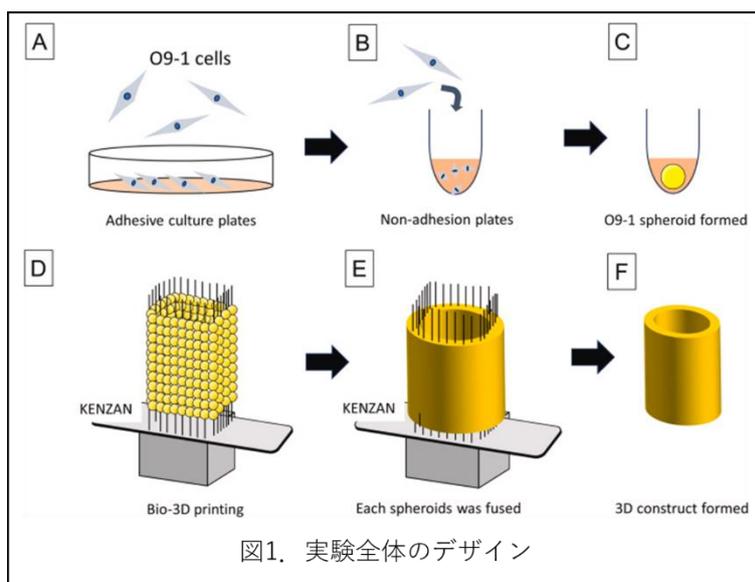
神経堤由来の間葉系細胞株を用いて、細胞極性を有する 3次元構造体を作成し、象牙芽細胞層を誘導し、象牙質-歯髄複合体となるオルガノイドの再生を目指す

3. 研究の方法

実験全体のデザイン

非接着培地を用いて、スフェロイド形成を行う (図 1. A-C)。このスフェロイドをバイオ 3D プリンターを用いて積層し 3次元構造体を得る (図 1. D-F)。

本研究において使用するバイオ 3D プリンターは、スフェロイドをロボットアームで剣山様の土台へと刺入し積層していきながら構造体を作成する。そこで、この剣山式バイオ 3D プリンターに適用できるスフェロイド作成条件 (直径 550 μ m であり、ロボットアームが把持できる適切な硬度) を決定する必要がある (実験 1) その後、実際にバイオ 3D プリンターによって積層された 3次元構造体が組織学的にどのような特性を示しているかを解析する (実験 2)。



実験 1: 剣山式バイオ 3D プリンターに応用するスフェロイド形成の試み

細胞: 歯原性間葉系細胞株: O9-1(マウス頭蓋神経堤細胞株)
 培地: ES Cell 培地: Complete ES Cell Medium, 15%FBS, LIF, bFGF
 EGM/FGM: 血管内日細胞増殖培地 (EGM) と線維芽細胞増殖培地 (FGM) 1:1 の混合培地
 評価: スフェロイド直径の経時的な変化を記録 (1-3 日)
 HE 染色 免疫組織化学染色 (Periostin, Tenascin C, Ki-67)
in situ hybridization(RNA Scope®) (DMP1, DSPP)
Real time PCR (Collagen I, Periostin, Tenascin C, Runx2, ALP, Osterix, DMP1, DSPP)

実験 2: 剣山式バイオ 3D プリンターを用いた構造体作成

細胞: 歯原性間葉系細胞株: O9-1(マウス頭蓋神経堤細胞株)
 培地: ES Cell Medium: Complete ES Cell Medium, 15%FBS, LIF, bFGF
 石灰化誘導培地: DMEM High Glucose, 2mM Ca, 20%FBS
 評価: スフェロイド直径の経時的な変化を記録 (1-3 日)

HE 染色 免疫組織化学染色 (Periostin, Tenascin C, Ki-67)
in situ hybridization(RNA Scope®) (DMP1, DSPP)
Real time PCR (Tenascin C, DMP1, DSPP)

4. 研究成果

1. O9-1 細胞および ES Cell medium を用いて作成したスフェロイドの特性

スフェロイドの作製においては、ES Cell 培地と EGM/FGM 培地の 2 種の培地を用いて比較検討を行った。非接触培地による培養を開始し、2 日目まで目的の直径 (500 μ m) に達するスフェロイド形成ができる細胞数を決定した (図 2A, B)。さらに、組織切片を作成し、HE 染色および Ki-67 免疫組織化学染色による細胞増殖活性を観察した。ES Cell 培地を用いて作成したスフェロイドは、球体の外層に Ki67 陽性を強く示し、スフェロイド外層での細胞増殖が高いことがわかった (図 2D)。

次にこのスフェロイド体が有する特徴を明らかにすることを目的として、2 次元培養時と比較した遺伝子発現について、*Real time* PCR にて、細胞外マトリクス蛋白の発現比較を行った。その結果、Periostin および Tenascin C の発現がスフェロイドにおいて高くなっていることが明らかとなった (図 3B, C)。そこでこの 2 つの蛋白の発現パターンを免疫組織化学的に解析したところ、Periostin は、スフェロイド全体に発現を認め、特徴的な発現パターンを示さなかったのに対し、Tenascin C は、ES Cell 培地で培養した場合、スフェロイドの外層に帯状に強く発現していることがわかった。

2 次元培養との比較において、象牙芽細胞及び骨芽細胞の分化マーカーとされる各遺伝子の発現を *Real Time* PCR を用いて調べたところ、Runx2, Osterix, ALP については 2 次元培養と比較して発現の有意な上昇は認められなかったが、象牙芽細胞・骨芽細胞の分化マーカーの 1 つである DSPP および DMP1 については明らかな発現上昇が見られた (図 4)。

O9-1 細胞を ES Cell 培地を用いて作成したスフェロイド体を組織学的に観察すると、球体の外側には、Tenascin C の発現が強く (図 5C)、その領域には、KI-67 陽性の細胞層が観察された (図 5B)。*Real time* PCR において発現上昇が観察された DSPP は、*in situ* hybridization では、その mRNA 発現を確認することができなかったが、DMP1 の発現は、スフェロイドの最外層に強い陽性反応を確認することができた。

2. 剣山式バイオ 3D プリンターを用いた 3 次元構造体作成

バイオ 3D プリンターを応用するためのスフェロイド形成については、プロトコールが確立されたため、3 次元構造体の作成を開始した。スフェロイドの積層方法については、図 6 に示すように、立方体構造や中心に積層を行わない管腔構造をとるものなどをパイロット実験として施行した。培地の供給という面で管腔構造での積層は、構造体が出来た後も培養を継続していくうえでアドバンテージがあると判断したため、本研究では円柱状に積層が行われるようプログラミングを行った。

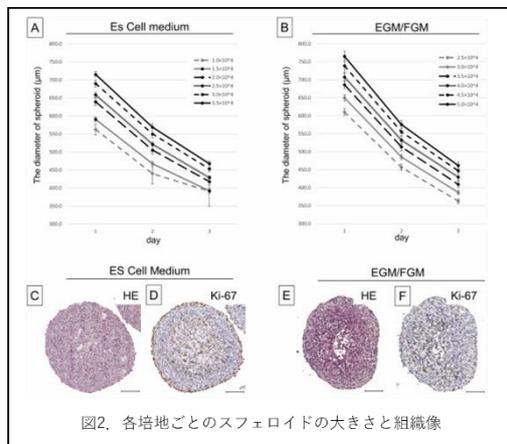


図2. 各培地ごとのスフェロイドの大きさと組織像

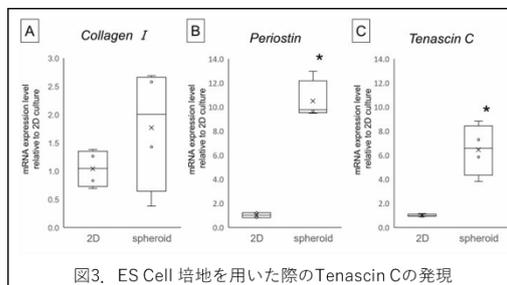


図3. ES Cell 培地を用いた際の Tenascin C の発現

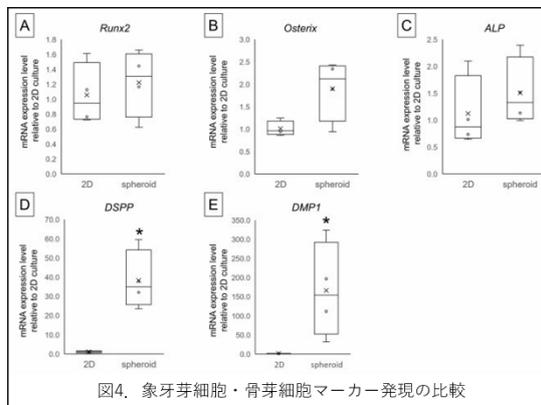


図4. 象牙芽細胞・骨芽細胞マーカー発現の比較

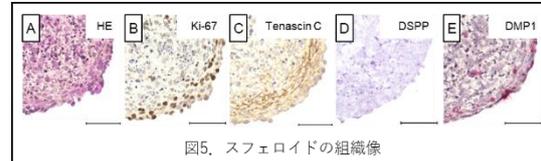


図5. スフェロイドの組織像

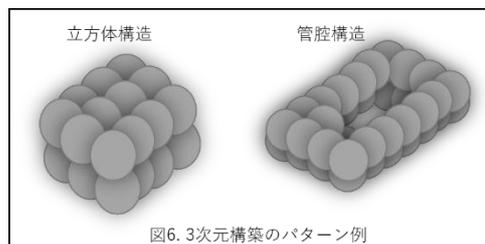


図6. 3次元構築のパターン例

プリンティングに用いた培地は、スフェロイド形成に用いたものと同じ ES Cell 培地とした。剣山に刺入しながら積層された各スフェロイドは、積層後 3 日でそれぞれが連続し、積層後 7 日目には、境界がわからないほどになり、剣山を撤去してもそのままの形態を維持できるまでになっていた (図 7)

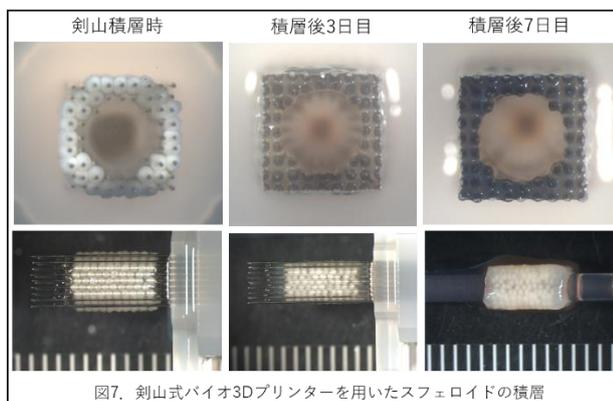


図7. 剣山式バイオ3Dプリンターを用いたスフェロイドの積層

この 3 次元構造体がどのような特徴を有しているかを明らかにするため、組織学的解析を行ったところ、スフェロイドに観察された時と同じように外層に **Tenascin C** の発現が帯状に観察され、その外層に **Ki67** 陽性の細胞層が存在していた。しかしながら、スフェロイドにおいて発現が確認された **DMP1** については、反応がなかった。

象牙芽細胞への分化を構造体の外側で誘導するため、何らかの分化誘導因子を培地に添加することを考え、**DMEM High Glucose, 2mM Ca, 20% FBS** での石灰化誘導培地を調整し、スフェロイド積層後、石灰化誘導培地にて培養を行った。**Real time PCR** を用いて、遺伝子発現量について **ES Cell** 培地と比較したところ、

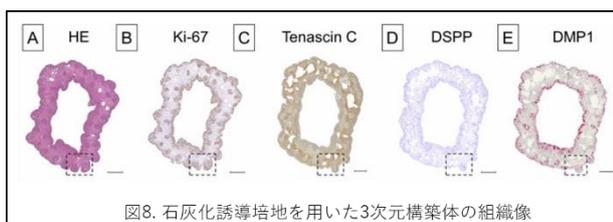


図8. 石灰化誘導培地を用いた3次元構築体の組織像

DMP1 mRNA の発現量に明らかな促進を認めた。組織学的な解析においては、**Ki67** 陽性の細胞層が 3 次元構造体の外層に観察され、その内側に **Tenascin C** の発現を認めた。また **DMP1 mRNA** 発現を **in situ hybridization** にて確認したところ、最外層に強い陽性反応を認めた。またこれらの発現パターンは、スフェロイド体で確認したパターンと類似していた (図 8)。

今回の研究において、神経堤由来の未分化な間葉系細胞を用いた 3 次元構造体は、細胞増殖活性を有し、**Tenascin C** 蛋白を外層に発現し、そのさらに外層に骨芽細胞、象牙芽細胞の分化マーカーとなる **DMP1** を発現する細胞が存在するという特徴を示しており、歯髄に類似した構造体であるということができる。しかしながら、**DMP1** 以外の象牙芽細胞マーカー、**DSPP** や **Nestin** の発現は誘導できておらず、構造体の外層に存在する細胞が象牙芽細胞様の細胞とは言えない状況にある。今後は様々な培養条件を探索し、象牙蛋白を分泌する細胞への誘導を試みていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 4件）

1. 著者名 Taguchi Masahide, Yoshimoto Shohei, Suyama Kanako, Sumi Satoko, Ohki Shirabe, Ogata Kayoko, Fujimoto Ryota, Murata Daiki, Nakayama Koichi, Oka Kyoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Creating 3D constructs with cranial neural crest-derived cell lines using a bio-3D printer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	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） 10.1016/j.job.2024.05.005	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 Yoshimoto Shohei, Taguchi Masahide, Sumi Satoko, Oka Kyoko, Okamura Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of a novel protocol for formalin-fixed paraffin-embedded organoids and spheroids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Open	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） 10.1242/bio.059882	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 Masashi Shin, Aya Matsushima, Hiroshi Kajiya, Fujio Okamoto, Kayoko Ogata, Kyoko Oka, Hayato Ohshima, John D Bartlett, Koji Okabe	4. 巻 131(2)
2. 論文標題 Conditional knockout of transient receptor potential melastatin 7 in the enamel epithelium: Effects on enamel formation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal Of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 e12920
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12920	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 Kyoko Oka	4. 巻 60(8-9)
2. 論文標題 Fibrillin protein, a candidate for creating a suitable scaffold in PDL regeneration while avoiding ankylosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genesis	6. 最初と最後の頁 e23486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/dvg.23486	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口雅英, 岡 暁子, 陶山可奈子, 吉本尚平, 緒方佳代子, 大木 調, 尾崎正雄
2. 発表標題 歯源性細胞を用いたバイオ3Dプリンターによる3次元構造体の作成の試み
3. 学会等名 第60回 日本小児歯科学会大会
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
---------	---------