

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16993

研究課題名(和文)大規模歯周組織欠損の再生を目指した神経堤細胞由来骨/軟骨複合型オルガノイドの創成

研究課題名(英文)Generation of bone/cartilage organoids from neural crest cells to regenerate critical-sized periodontal tissue defects.

研究代表者

本池 総太(Souta, Motoike)

京都大学・iPS細胞研究所・特別研究員(PD)

研究者番号：80881292

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):申請者はヒト間葉系幹細胞(MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)からなる細胞集塊(Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs))を樹立した。さらに、生体外でC-MSCsから膜性骨化様式の骨様組織を作製することに成功した。一方で、低栄養状態に強い骨化様式である軟骨内骨化を応用した骨再生治療が注目されている。

本研究では、顎骨の発生を担うヒト神経堤細胞由来間葉系細胞に軟骨誘導と骨オルガノイド作製技術を併用することによって、骨/軟骨複合型オルガノイドを作製することに成功した。

現在、移植実験によって軟骨内骨化様式の大規模歯周組織再生が可能か評価している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵襲性歯周炎や重度歯周炎のように大規模な骨組織破壊に対しては欠損部が血液供給不足によって低酸素・低栄養状態に陥り、移植体の機能が十分に発揮されない可能性がある。

本研究結果から、生体外で骨組織と軟骨組織の混在するオルガノイドを作製することができた。この骨/軟骨複合型オルガノイドの移植は、低栄養状態に抵抗し、軟骨内骨化によって効果的な組織再生を誘導することが可能と予想される。

本研究が遂行された場合、従来治療困難とされてきた大規模な歯周組織破壊に対しても有効な治療成果を獲得することができる。

研究成果の概要(英文):Previously, we have developed Clumps of mesenchymal stem cells (MSCs) / extracellular matrix (ECM) complexes (C-MSCs), which consisted of cells and self-produced ECM. Moreover, we have generated bone-like tissue from C-MSCs in vitro by mimicking membranous ossification.

Endochondral ossification is resistant to hypoxic or undernutrition environments and can induce vascularization effectively.

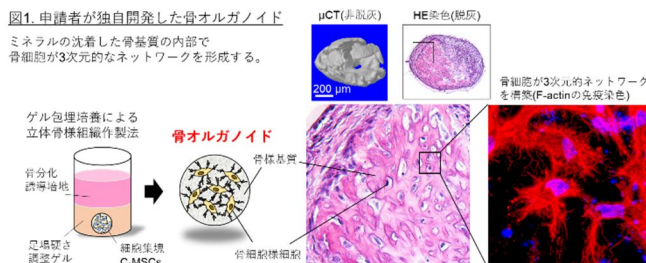
In this study, we have generated bone/cartilage organoids from human neural crest cells-derived ectomesenchyme by using chondrogenic induction and our novel method which produces bone-like tissue from C-MSCs. Besides, we transplanted bone/cartilage organoids into immunodeficient rats' critical-sized periodontal tissue defect model. We have been currently evaluating whether bone/cartilage organoids can regenerate tissue defects effectively via endochondral ossification.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞集塊 歯周組織再生 軟骨内骨化 神経堤細胞

## 1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまでに、骨/歯周組織欠損を効果的に再生することのできる移植体として、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)からなる、直径 1mm 程の 3 次元細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complexes (C-MSCs)を樹立した。さらに、C-MSCs の ECM 硬さを制御することで、YAP/TAZ メカノシグナルを介した骨分化が亢進することを見出した。この事実に基づき、C-MSCs を骨形成指向性の足場硬さを付与したゲルに包埋し、骨分化誘導を行ったところ、生体外においてミネラルの沈着した骨基質と骨形成細胞からなる骨オルガノイドを作製することに成功した(図 1)。さらに、骨オルガノイドを免疫不全マウス頭蓋冠欠損に移植することで、膜性骨化様式によって骨再生を促進することを見出した。



しかし、実際の臨床現場で遭遇する侵襲性歯周炎や重度歯周炎のようなより大規模な骨組織破壊に対しては、欠損部が血液供給不足によって低酸素・低栄養状態に陥り、移植した骨オルガノイドの機能が十分に発揮されない可能性がある。ここで、低栄養状態に強く、効果的に血管新生を促す骨化様式である軟骨内骨化を利用した骨再生治療が注目されている。軟骨内骨化では、MSCs から分化した軟骨細胞が肥大軟骨へと成長しながら軟骨基質を形成する。さらに軟骨基質の石灰化と、基質表面への骨芽細胞誘導が起こり、破骨細胞と協調して軟骨基質を骨へと置換していく。つまり、石灰化軟骨基質と骨形成細胞を含む移植体を生体外で作製し、これを骨欠損部に移植することで軟骨内骨化を効率的に誘導できる可能性がある。実際に、iPS 細胞から作製した細胞集塊に骨分化誘導・軟骨分化誘導を段階的に施すことで軟骨細胞・骨形成細胞複合体を作製した報告がある(Egusa et al., Int J Mol Sci, 2020)。ここで申請者は、浮遊培養が C-MSCs の YAP/TAZ 活性を低下させ、効果的に軟骨分化を誘導することを見出した。さらに、この軟骨分化した C-MSCs にゲル包埋培養下で骨分化誘導を施すことで、軟骨組織と骨組織が混在した複合体を形成することに成功した。

以上のことから、C-MSCs と YAP/TAZ メカノシグナルを制御する浮遊培養下軟骨誘導と骨オルガノイド作製技術の応用によって、石灰化軟骨基質と骨形成細胞を含む骨/軟骨複合型オルガノイドを作製し、軟骨内骨化によって大規模歯周組織欠損を再生させることを着想した。

一方で、発生学的に顎骨・歯周組織を含む顎顔面領域の骨組織は中胚葉系 MSCs ではなく、神経堤細胞(NCCs)由来 MSCs(NCC-MSCs)から形成されることが報告されており、その再生治療にも NCC-MSCs を利用できることが理想であると考えられる。申請者は iPS 細胞由来 NCC-MSCs(iNCC-MSCs)に C-MSCs 作製技術を応用することで、細胞集塊 C-iNCC-MSCs を樹立した。そこで、この C-iNCC-MSCs から骨/軟骨複合型オルガノイドを作製することで、より効果的な歯周組織再生を誘導することを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、C-iNCC-MSCs に YAP/TAZ メカノシグナルを制御する浮遊培養下軟骨誘導と骨オルガノイド作製技術を応用することで、低栄養状態に強い軟骨内骨化を誘導する骨/軟骨複合型オルガノイドを作製し、大規模歯周組織欠損を再生させることである。

## 3. 研究の方法

### (実験 1) 骨髄由来 C-MSCs からの骨/軟骨複合体の誘導法の確立

予備的検討からヒト骨髄 MSCs から作製された C-MSCs に血清含有培地と浮遊状態で軟骨分化誘導を施し、さらにゲル包埋培養条件で骨分化誘導を行うことで骨組織/軟骨組織が混在した複合体を形成することができていた。そこで、本培養をすべて XF 条件下で行うことによって、より均一性・再現性のある複合体の形成を目指した。具体的には、申請者の報告した方法に従い、XF 条件下に C-MSCs を作製した。C-MSCs を XF 軟骨誘導培地にて浮遊培養し、肥大軟骨細胞を含む軟骨組織を誘導した。これを硬さ調節可能な多糖ベースのハイドロゲルに包埋し、XF 骨分化誘導培地にて培養することで骨/軟骨複合体への誘導を行った。その培養過程において、経時的な軟骨細胞・骨形成細胞マーカーの遺伝子発現を qPCR で定量し、さらに軟骨基質の産生を組織学的観察(HE, Safranin-O)によって評価した。

### (実験 2) 骨/軟骨複合体の骨組織再生効果の評価

実験 1 で得られた骨/軟骨複合体を SCID マウスの頭蓋冠 4mm 骨欠損に移植し、μCT と組織学的観察によって骨組織再生効果を評価した。

### (実験 3) C-iNCC-MSCs から骨/軟骨複合型オルガノイドの誘導

XF 条件下で iNCC-MSCs を誘導し、集塊化させることで C-iNCC-MSCs を作製した。これを実験 1 から決定した培養条件を基軸に培養し、骨/軟骨複合型オルガノイドの誘導を行った。

## 4. 研究成果

### (成果 1) 骨髄由来 C-MSCs からの骨/軟骨複合体の誘導法の確立

XF 条件下に C-MSCs を作製(XF-C-MSCs)し、浮遊培養条件下に XF 軟骨誘導を 14 日行ったところ、その内部に Safranin-O に濃染する軟骨基質と、基質に囲まれた軟骨細胞様細胞が観察された(図 2-A)。また、軟骨関連マーカー遺伝子の明らかな発現上昇が確認された。

この軟骨分化 XF-C-MSCs を足場硬さ調整ゲルに包埋し、XF 骨分化誘導を 14 日間行ったところ、軟骨組織と骨組織が混在した複合体を作製することに成功した(図 2-B)。この骨/軟骨複合体は、軟骨関連マーカーと同時に、骨芽細胞マーカー(Runx2, Sp7, ALPL, OCN, OPN)と骨細胞マーカー(PHEX, DMP1, SOST)を高発現していた。

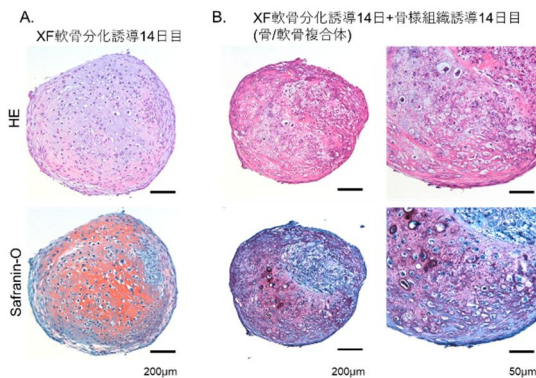


図2. C-MSCsから作製した骨/軟骨複合体

### (成果 2) 骨/軟骨複合体の骨組織再生効果の評価

成果 1 の骨/軟骨複合体を SCID マウス頭蓋冠骨欠損モデルに移植したところ、移植 4 週間で欠損部に X 線不透過性の石灰化構造体が複数確認された。またその内部は Safranin-O に濃染する軟骨基質と、染色性の低い骨基質で構成されており、軟骨内骨化を示唆していた。さらに、構造体の内部に血管新生を確認した。移植 6 か月の長期的観察を行ったところ、これらの構造体は宿主の骨と結合し、内部の構造もより成熟な骨組織へと置き換わっていた(図 3)。

以上のことから、C-MSCs から XF 条件下に作製した骨/軟骨複合体は、軟骨内骨化の様式を経て、効果的な骨再生を促す可能性が示唆された。

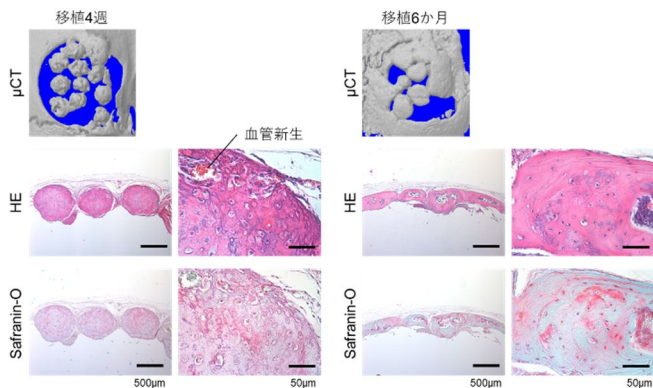


図3. C-MSCsから作製した骨/軟骨複合体の骨組織再生効果

### (成果 3) C-iNCC-MSCs から骨/軟骨複合型オルガノイドの誘導

成果 1 の培養条件を基軸に、C-iNCC-MSCs から骨/軟骨複合型オルガノイドの誘導を行ったが死細胞が多く出現したため、培養条件の大幅な改変が必要と判断し実験を行った。その結果、iNCC から 3 次元的に間葉系細胞を誘導する新たな培養方法を樹立した(特許出願)。この細胞集塊は、C-iNCC-MSCs と比較し骨分化能が高く、成果 1 の培養条件を応用することで、骨/軟骨複合型オルガノイドを誘導することが可能であった。現在、この骨/軟骨複合型オルガノイドをヌードラット大規模歯周組織欠損に移植し、歯周組織再生効果を評価する実験を進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daisuke Kamiya, Nana Takenaka-Ninagawa, Souta Motoike, Mikihiro Kajiya, Teppei Akaboshi, Chengzhu Zhao, Mitsuaki Shibata, Sho Senda, Yayoi Toyooka, Hidetoshi Sakurai, Hidemi Kurihara, Makoto Ikeya	4. 巻 15;7
2. 論文標題 Induction of functional xeno-free MSCs from human iPSCs via a neural crest cell lineage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 npj regenerative medicine	6. 最初と最後の頁 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-022-00241-8	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 Shin Morimoto, Mikihiro Kajiya, Hiroki Yoshii, Mai Yoshino, Susumu Horikoshi, Souta Motoike, Tomoyuki Iwata, Kazuhisa Ouhara, Toshinori Ando, Tetsuya Yoshimoto, Tomoaki Shintani, Noriyoshi Mizuno	4. 巻 -
2. 論文標題 A Cartilaginous Construct with Bone Collar Exerts Bone-Regenerative Property Via Rapid Endochondral Ossification	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem cell reviews and reports	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/s12015-023-10554-w	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
---------	---------