

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11756

研究課題名(和文) 新規三次元培養技術の再生医療への応用

研究課題名(英文) Nobel 3D culture technique for tissue regeneration

研究代表者

古橋 明大 (Furuhashi, Akihiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：60608975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では幹細胞を用いた再生医療における細胞培養方法に着目した。細胞培養で3次元の構造物を作製するうえでゲル中に細胞を播種する手法を用いた。ゲル中で幹細胞を培養し、特定の条件で分化・誘導させることで人工的に唾液腺オルガノイド様の構造物を誘導することに成功した。ゲル中で培養した未分化の幹細胞を組織損傷モデル動物の生体内に移植したところ、幹細胞が組織損傷部位へ移動し、組織再生を促進させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

失われた組織やその機能を回復させる再生医療は近年、大きな注目を集めている分野である。本研究ではその中で細胞培養手法に着目した。通常の細胞培養の際には、2次元的に細胞が増殖していくような手法を用いることが多い。この方法では細胞を縦方向に積層させることが難しく、3次元の構造物を作製することは困難であった。そこで本研究ではゲル中に細胞を播種し、特殊な培養条件を用いることで唾液腺の特徴を示す3次元の構造物を誘導することに成功した。このことは再生医療に向けた臓器再生へと繋がる知見であるといえる。

研究成果の概要(英文)：For the tissue regeneration, we focused on the three dimensional culture of the stem cells. In order to regenerate three dimensional structure, we used gel for cell culture. By culturing stem cells in gel with specific culture method, salivary gland like organoid could be induced. When undifferentiated stem cells cultured in gel were transplanted with gel to experimental animals, stem cells migrated to the damaged tissue and enhanced the tissue healing.

研究分野：再生医療

キーワード：幹細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

失われた組織やその機能を回復させる再生医療は近年、大きな注目を集めている分野である。その中でも細胞を用いた再生医療は一部で臨床応用が進められている。一方、失われた臓器そのものを人工的に再生し、移植して機能させるといった分野においてはクリアすべき課題が多く残っており、未だ実用化には至っていない。

その多くの課題の中で、本研究では細胞培養手法に着目した。通常の細胞培養の際には、平面状の細胞培養ディッシュの底面に 2 次元的に細胞が増殖していくような手法を用いることが多い。この方法では細胞を縦方向に積層させることが難しく、3 次元的な構造物を作製することは困難であった。その理由として挙げられるのが、多くの細胞は接着性の細胞である点である。接着性の細胞は細胞培養ディッシュの底面などのような基質に接着してはじめて増殖、移動、分化といった基本的な細胞機能を発現することができる。3 次元的な方向に細胞が接着するための足場となる構造が存在しない場合には細胞が進展していかないことが、立体的に細胞を増殖させるのが困難な理由の一つであると考えられる。

我々は先行研究にて、接着性の細胞を低接着性のコーティングを施した細胞培養ディッシュに播種すると細胞培養ディッシュに接着できない細胞同士がお互いに接着し、凝集塊を形成することを明らかにした。しかし、そのまま培養を続けると細胞塊が成長するにつれて、その形態を維持できずに自壊することがわかった。すなわち、細胞を 3 次元的な構造物として成長させるためには細胞の構造を支える何らかのサポートが必要であることが示唆された。

### 2. 研究の目的

今回の研究では、3 次元的なゲル中に細胞を培養する手法を解析することで、再生医療に応用するための知見を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

まず、第一ステップとして、実験に用いる細胞系である上皮系幹細胞、間葉系幹細胞の樹立を行うこととした。

また、樹立した細胞を特殊な低接着性ディッシュ上で培養することで塊上のスフェロイドを安定して作製するための培養条件を確立することとした。

次に、ゲル中に幹細胞を培養し、細胞が生存できること、その多能性が維持されること、を確認することとした。再生医療に用いるためには細胞がゲル中で生存できることが大前提であり、また幹細胞を用いた研究で常に考慮する必要があるのが、幹細胞の多能性が減弱してしまう点だからである。

ゲル中に播種した幹細胞をある種の条件で分化、誘導を行うことで特定の臓器に誘導することが可能であるのかを検証した。幹細胞の分化を十分にコントロールできず、ランダムな方向に分化してしまうようでは再生医療に用いることは困難であり、分化の制御が可能となれば大きな知見であるといえる。

また、細胞治療における応用として、ゲル中に播種した幹細胞をゲルごと生体中に移植し、組織に傷害を与えた動物実験モデルにてその組織再生効果について検証することとした。

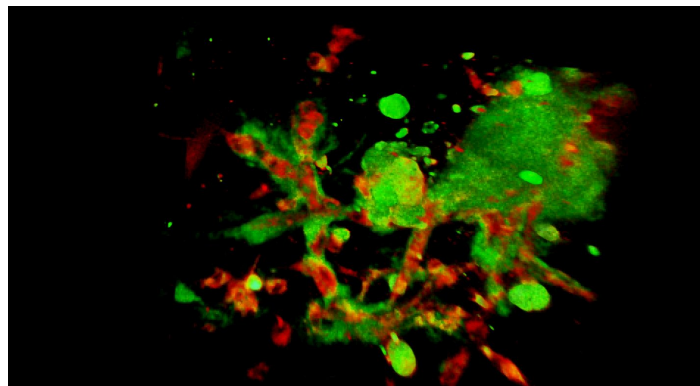
### 4. 研究成果

本研究の第一ステップである上皮系幹細胞、間葉系幹細胞の樹立を行うことができ、以下の解析へと進むことができた。

樹立した細胞を低接着性ディッシュに播種し、安定してスフェロイド形成を行うための培養条件を確立することができた。

また、幹細胞をゲル中に播種して培養を行い、1)ゲル中で細胞が生存できること、2)ゲル中で幹細胞の多能性が維持されることを確認した。

次に、上皮系の幹細胞をゲル中に播種した状態から特定の条件で分化、誘導を行った。3 次元的な構造を呈し、唾液腺に特徴的なマーカーを発現する細胞群を得ることができた。すなわち、幹細胞から唾液腺オルガノイド様の構造物を誘導することができたといえる(下図参照)。



Red: Duct cell marker (CK19), Green: Acinar cell marker (AQP-5)

この構造体でのタンパク発現の変化を確認したところ、上皮 間葉転換 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) や間葉 上皮転換 (MET: Mesenchymal-Epithelial Transition) の際にみられる Snail や Slug といったマーカーを発現していることがわかった。生体内での唾液腺の発生過程でも上皮系細胞と間葉系細胞との間で EMT や MET が起こっていることが知られており、今回の培養条件で生体内での唾液腺の発生過程と類似した現象が起きている可能性が示唆された。

また、ゲル中に播種した幹細胞をゲルごと生体中に移植し、組織に傷害を与えた動物実験モデルにて解析を行った。その結果、ゲル中から幹細胞が組織障害部位に移動し、組織の再生を促進したことを確認することができた。この結果より、ゲル中に細胞を播種してゲルとともに移植する手法が、組織再生を促進させるための幹細胞の供給源として用いるというアプローチに繋がる可能性が示唆された。

本研究を通じて、

- 1) ゲル中で幹細胞を培養し、特定の条件で分化・誘導させることで人工的に臓器オルガノイド様の構造物を誘導することに成功した。
- 2) ゲル中で培養した未分化の幹細胞を生体内に移植したところ、幹細胞が組織損傷部位へ移動し、組織再生を促進させることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rakhmatia Yunia, Ayukawa Yasunori, Furuhashi Akihiro, Koyano Kiyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Carbonate Apatite Containing Statin Enhances Bone Formation in Healing Incisal Extraction Sockets in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 1201 ~ 1201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma11071201	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 Imai Mikio, Ayukawa Yasunori, Yasunami Noriyuki, Furuhashi Akihiro, Takemura Yoko, Adachi Naomi, Hu Jiangqi, Zhou Xudiyang, Moriyama Yasuko, Atsuta Ikiru, Kurata Kosaku, Koyano Kiyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of a Single Injection of Benidipine-Impregnated Biodegradable Microcarriers on Bone and Gingival Healing at the Tooth Extraction Socket	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Wound Care	6. 最初と最後の頁 108 ~ 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/wound.2018.0834	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 Xu Q.L., Furuhashi A., Zhang Q.Z., Jiang C.M., Chang T.-H., Le A.D.	4. 巻 96
2. 論文標題 Induction of Salivary Gland-Like Cells from Dental Follicle Epithelial Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034517711146	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 古橋明大	4. 巻 51(4)
2. 論文標題 唾液腺様オルガノイドの誘導	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 42-43
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 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 Ueda Nobuyuki, Atsuta Ikiru, Ayukawa Yasunori, Yamaza Takayoshi, Furuhashi Akihiro, Narimatsu Ikue, Matsuura Yuri, Kondo Ryosuke, Watanabe Yu, Zhang Xiaoxu, Koyano Kiyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel Application Method for Mesenchymal Stem Cell Therapy Utilizing Its Attractant-Responsive Accumulation Property	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 4908 ~ 4908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/app9224908">https://doi.org/10.3390/app9224908</a>	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 Narimatsu Ikue, Atsuta Ikiru, Ayukawa Yasunori, Oshiro Wakana, Yasunami Noriyuki, Furuhashi Akihiro, Koyano Kiyoshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Epithelial and Connective Tissue Sealing around Titanium Implants with Various Typical Surface Finishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 4976 ~ 4984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b00499">https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.9b00499</a>	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 Sakamoto Yasushige, Ayukawa Yasunori, Furuhashi Akihiro, Kamo Michimasa, Ikeda Junji, Atsuta Ikiru, Haraguchi Takuya, Koyano Kiyoshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Effect of Hydrothermal Treatment with Distilled Water on Titanium Alloy for Epithelial Cellular Attachment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 2748 ~ 2748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3390/ma12172748">https://doi.org/10.3390/ma12172748</a>	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 Ayukawa Yasunori, Oshiro Wakana, Atsuta Ikiru, Furuhashi Akihiro, Kondo Ryosuke, Jinno Yohei, Koyano Kiyoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Long Term Retention of Gingival Sealing around Titanium Implants with CaCl <sub>2</sub> Hydrothermal Treatment: A Rodent Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1560 ~ 1560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8101560	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 Adachi Naomi, Ayukawa Yasunori, Yasunami Noriyuki, Furuhashi Akihiro, Imai Mikio, Sanda Koma, Atsuta Ikiru, Koyano Kiyoshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Preventive effect of fluvastatin on the development of medication-related osteonecrosis of the jaw	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific 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) 10.1038/s41598-020-61724-6	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Mikio Imai, Yasunori Ayukawa, Noriyuki Yasunami, Akihiro Furuhashi, Yoko Tomita, Jiangqi Hu, Yasuko Moriyama, Kiyoshi Koyano
2. 発表標題 The effect of locally-administered antihypertensive benidipine on the extraction socket healing
3. 学会等名 27th annual scientific meeting of the european association for osseointegration (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ueda N, Atsuta I, Ayukawa Y, Yamaza T, Furuhashi A, Narimatsu I, Matsuura Y, Kondo R, Watanabe Y, Koyano K.
2. 発表標題 Advanced Procedure for Systemic Injection of Mesenchymal Stem Cells with Collagen Gel
3. 学会等名 Academy of Osseointegration 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本安繁, 鮎川保則, 古橋明大, 熱田生, 原口拓也, Rakhmatia Yunia Dwi, 成松生枝, 古谷野潔
2. 発表標題 軟組織細胞親和性向上を目指したチタン表面処理技術.
3. 学会等名 日本歯科理工学会. 九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 上田将之, 熱田生, 鮎川保則, 松浦由梨, 古橋明大, 近藤綾介, 竹村陽子, 渡邊雄, 古谷野潔.
2. 発表標題 抜歯窩の治癒促進を目指した間葉系幹細胞の新規投与法について～コラーゲン製スキャホールド～
3. 学会等名 日本歯科理工学会. 九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Qilin Xu, Akihiro Furuhashi (Presenter), Qunzhou Zhang, Chunmiao Jiang, Ting Han Chang, Anh Le
2. 発表標題 Salivary Gland Regeneration Using Dental Follicle Epithelial Stem Cells
3. 学会等名 American Association for Dental Research Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wakana Oshiro, Akihiro Furuhashi, Yoshihiro Tsukiyama, Masafumi Kihara, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Kiyoshi Koyano
2. 発表標題 An early stage implant failure in the patient with progressive condylar resorption: a case report
3. 学会等名 26TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR OSSEOINTEGRATION (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 成松生枝, 鮎川保則, 熱田生, 大城和可奈, 安波礼之, 古橋明大, 古谷野潔
2. 発表標題 インプラント表面性状の違いが上皮および結合組織による軟組織封鎖性に与える影響
3. 学会等名 第47回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熱田生, 鮎川保則, 森本太郎, 古橋明大, 成松生枝, 近藤綾介, 古谷野潔
2. 発表標題 ブリッジにおけるポンティック底部は口腔粘膜と接着するの？
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第126回学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古橋明大, 鮎川保則, 熱田生, ラフマティアユニアドゥイ, 安波礼之, 古谷野潔
2. 発表標題 オルガノイドカルチャーに向けたスキャフォールドの検討
3. 学会等名 平成29年度 日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熱田生, 鮎川保則, 森本太郎, 古橋明大, 成松生枝, 近藤綾介, 古谷野潔
2. 発表標題 歯冠補綴装置に上皮付着は存在するか？（ブリッジのポンティック底部は口腔粘膜と接着するの？）
3. 学会等名 平成29年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 成松生枝, 鮎川保則, 熱田生, 大城和可奈, 安波礼之, 古橋明大, 古谷野潔
2. 発表標題 インプラント周囲組織における生物学的幅径及び軟組織封鎖性の検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第126回学術大会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 8. 熱田生, 鮎川保則, 近藤綾介, 松浦由梨, 古橋明大, 成松生枝, 上田将之, 古谷野潔
2. 発表標題 アスピリンを用いたインプラント周囲上皮封鎖性に対する間葉系幹細胞効果の増強
3. 学会等名 公益社団法人日本口腔インプラント学会第35回九州支部学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ikue Narimatsu, Yasunori Ayukawa, Ikiru Atsuta, Wakana Oshiro, Noriyuki Yasunami, Akihiro Furuhashi, Kiyoshi Koyano
2. 発表標題 Epithelial and connective tissue sealing around titanium implants with various typical surface finishes
3. 学会等名 2019 Joint Meeting of the ICP and EPA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井実喜生, 鮎川保則, 安波礼敬之, 古橋明大, 富田陽子, 胡江琪, 森山泰子, 古谷野潔
2. 発表標題 ベニジピン含有マイクロキャリア単回投与が抜歯窩の治癒におよぼす影響
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第49回本部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井実喜生, 鮎川保則, 安波礼敬之, 古橋明大, 富田陽子, 足立奈織美, 森山泰子, 熱田生, 古谷野潔
2. 発表標題 ベニジピン含有マイクロスフィア単回投与が抜歯窩の骨および歯肉の治癒におよぼす影響
3. 学会等名 第128回公益社団法人日本補綴歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熱田生, 鮎川保則, 森山太一朗, 古橋明大, 成松生枝, 古谷野潔
2. 発表標題 口腔粘膜上皮はブリッジのボンティック底部に対して接着性を有するか?
3. 学会等名 第128回公益社団法人日本補綴歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本安繁、鮎川保則、熱田 生、古橋明大、原口拓也、Rakhmatia Yunia Dwi、 成松生枝、古谷野 潔
2. 発表標題 上皮細胞接着性向上を目指したインプラント表面処理技術
3. 学会等名 令和元年度日本歯科理工学会九州地方会夏期セミナー
4. 発表年 2019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
研究分担者	鮎川 保則  (Ayukawa Yasunori)  (50304697)	九州大学・歯学研究院・准教授   (17102)	
研究分担者	熱田 生  (Atsuta Ikiru)  (30423487)	九州大学・歯学研究院・准教授   (17102)	
研究分担者	古谷野 潔  (Koyano Kiyoshi)  (50195872)	九州大学・歯学研究院・教授   (17102)	