

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24158

研究課題名(和文) 歯周組織オルガノイドを併用した自家歯牙移植法の開発

研究課題名(英文) Approach for autologous tooth transplantation using organoid of periodontal tissue

研究代表者

安永 まどか (Yasunaga, Madoka)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80845264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：調和の取れた歯周オルガノイドを形成するための3次元培養法調整を主体に研究を行った。ヒト歯根膜幹細胞(HPLSC)を用いて、骨芽細胞、セメント芽細胞および線維芽細胞の分化誘導法を検討した。その結果、HPLSC細胞をセメント芽細胞に分化誘導するには、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)を誘導刺激因子として有効であった。また、培養法としてはスフェロイド培養とコラーゲン・ゲル包埋法を組み合わせた方法により、通常の2次元平面培養に比較してセメント芽細胞への分化誘導が亢進した。良好なオルガノイド形成には、同培養方法が有用であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

予後の良い自家歯牙移植法には、歯周組織を構成する細胞群をin vitroにおいて組織化して移植と併用することが重要であると考えた。そのためには、コラーゲン培養法を組み合わせた3次元培養法により歯周組織オルガノイドの形成が必要である。このオルガノイドを併用した移植により、歯根膜を介した歯槽骨と移植歯セメント質からなる調和の取れた歯周組織複合体の再現され、確実な生着による機能回復が期待される。また、矯正歯科治療における便宜抜去された歯牙の欠損部への再利用も一般的な治療方法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To prepare the periodontal organoids that evoke an harmonious complex of regenerative periodontal tissue after autologous tooth transplantation, three-dimensional (3D) culture system have been applied in regenerative medicine strategies because they provide a convenient in vitro model for cell-cell and cell-matrix interaction. This study examined where the cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells (HPLSCs) can be accelerated using 3D culture systems. In 2D culture system, HPLSCs treated with plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) showed increased expression of cementum protein 1 (CEMP1) and cementum attachment protein (CAP), indicating that PAI-1 could induce cementogenesis in HPLSCs. In contrast, cementogenesis were enhanced in HPLSC spheroid embedded in collagen-gel treated with PAI-1. 3D culture of HPLSC, using spheroids, are more susceptible for PAI-1-induced cementogenesis.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：自家歯牙移植 歯周組織オルガノイド スフェロイド 細胞シート コラーゲン培養 PAI-1 Cementum protein 1 ヒト歯根膜幹細胞

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

欠損歯の歯科治療法として、天然歯列に近い状態で咬合維持および生理機能を回復できることから、“歯の自家移植（自家歯牙移植）”が注目されている。これまでに、自家歯牙移植に関しては数多くの臨床的研究が報告され、術式に関しては確立している。しかしながら、実際の臨床現場においては、移植後にいくつかのトラブルに遭遇することが経験されている。すなわち、移植歯と受容側で再構築される歯周組織の不調和による移植の失敗という弱点を露呈している。再構築される歯周組織における不調和の原因としては、移植歯側の歯根膜の損傷あるいは欠損、移植歯歯根膜と受容側のコラーゲン線維の修復不全および歯槽骨の修復不全が考えられる。これらの原因により、移植歯の生着障害や移植歯の骨性癒着および歯根吸収などの失敗が惹起される。さらに、移植の適応として受容側における歯槽骨の骨量も重要な要素になることが知られている。以上のことから、自家歯牙移植の成功ポイントは、移植後に再構築される歯周組織の不調和を解消することであると考へた。

移植後に調和のとれた歯周組織を再構築するためには、移植される歯をサポートする再生療法が必要であると思われる。移植歯と受容側の歯槽骨との機能面も含めた真の生着は、“移植歯-歯根膜線維-歯槽骨”複合体が再生されることである。すなわち、再生療法によるサポートとは移植歯と歯槽骨の両者を生体と同様に歯根膜で有機的に結び付けることである。そのためには、細胞シートおよびスフェロイド培養法に代表される3次元培養法を応用して、*in vitro*で歯周組織複合体を構成する細胞の組織化（オルガノイド）必要であると考えられる。近年、オルガノイドの研究は進んで、オルガノイドの移植による欠損部などでの再生および修復治癒が促進されるとの報告がある。以上のことから、自家歯牙移植のサポート療法として歯周組織オルガノイドを併用することは、移植後に調和のとれた歯周組織複合体を再現できる可能性が期待される。形成されたオルガノイドで重要なことは、“移植歯-歯根膜線維-歯槽骨”の複合体として極性が構築されていることである。そのためには、オルガノイド作製に関しては、それぞれの細胞の分化程度が重要な要素となると考えられ、通常の分化誘導法では限界があり極性を保ったオルガノイド形成に適した誘導法の検索が必須事項であると考えられる。

2. 研究の目的

移植歯と受容組織とが調和の取れた歯周組織複合体を再現できるように、移植歯の生着をサポートする適切な歯周組織オルガノイドが必要である。研究遂行に当たっての目的としては、複合体を構成するセメント質、歯根膜および歯槽骨に対する適切な分化方法の検索、歯周組織オルガノイド形成のために、多細胞性スフェロイドおよび細胞シート法とコラーゲン・ゲル包埋培養法を組み合わせた培養法の開発、形成されたオルガノイドの歯牙移植モデルへの応用の3点が挙げられる。予備実験において、期待される機能を果たすオルガノイドの作製には複合体を構成する細胞群の分化程度の調節が最も決定的なファクターであることが明らかとなった。そこで、本研究ではセメントおよび骨分化誘導に関して誘導刺激法および培養法の検索を主体とする目的とした。

3. 研究の方法

調和のとれた歯周組織オルガノイド作製のために、本研究では3次元培養法を応用して、ヒト歯根膜幹細胞（HPLSC）を用いてセメントおよび骨分化誘導法について検討した。

1) 使用した細胞：HPLSC細胞をgrowth medium (GM)として10% FBS含有DMEM培地で培養を行なった。

2) 骨分化およびセメント質分化誘導：骨分化誘導にはosteogenesis-induced media (OIM)を用いた。セメント質誘導には、OIMにrecombinant human plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)をGMに混合して使用した。

3) 培養法：通常の2次元培養とスフェロイド培養にコラーゲン・ゲル包埋法を組み合わせた3次元培養法を用いて、両者による分化誘導の促進について比較検討した。

4) 分化誘導の評価：評価にはWestern blotting (WB)法および免疫細胞染色（ICC）法を用いた。

4. 研究成果

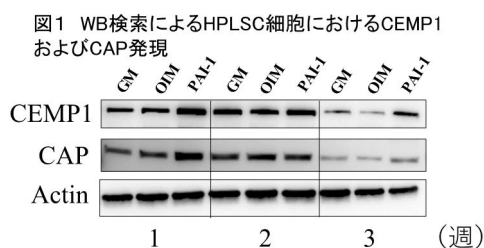
1) 2次元培養における分化誘導の検証

(1)HPLSC細胞への骨分化誘導

HPLSC細胞を、それぞれGM, OIMおよびPAI-1で平面培養（2次元培養）して骨分化の誘導について検索した。その結果、OIMおよびPAI-1培養HPLSC細胞において骨分化マーカーであるRunx2およびosterixの発現亢進がWB検索による明らかとなった。これらの細胞ではICCにおいてRunx2の核内発現が著明となった。また、ALP染色の亢進もOIMおよびPAI-1培養HPLSC細胞で認められた。これらの結果は、使用している間葉系幹細胞は通常の培養法において、骨分化が誘導されることが明らかとなった。また、OIMとPAI-1において骨分化誘導の促進程度に差異は認めなかった。

(2) HPLSC細胞へのセメント分化誘導

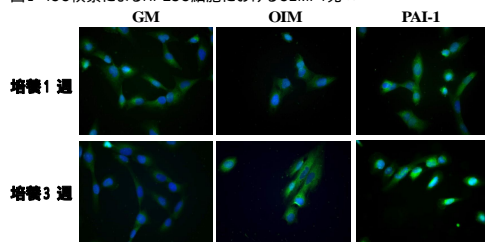
次に、セメント分化誘導について検討した。セメント芽細胞マーカーであるcementum protein-1 (CEMP1) およびcementum attachment protein (CAP) のWB検索（図1）で、培養1週間目からPAI-1細胞においてGMおよびOIM細胞と比較して、著しい発現の亢進が認められた。



また、CEMP1のICC検索において、GM培養HPLSC細胞においては染色性を認めなかったが、OIM細胞およびPAI-1細胞においては培養1週間で細胞質に陽性所見がみられた。さらに、培養3週間ではPAI-1細胞において陽性所見が核内に移行したが、OIM細胞においては細胞質染色が維持されていた（図2）。これらの結果は、PAI-1細胞においてはCEMP1転写が

活性化してセメント芽細胞への分化誘導が亢進した。

図2 ICC検索によるHPLSC細胞におけるCEMP1発現



ALPおよびアリザリン (ARS) 染色性を検討し、ALP染色性は1週および2週のPAI-1細胞がOIM細胞よりも染色性が強く認められた。また、同様に、ARS染色においてもPAI-1細胞で著明な染色性がみられた。ALPおよびARSの染色結果は、PAI-1細胞においてはセメント質基質の形成が開始されていることを示唆している。以上の結果から、PAI-1はHPLSC細胞の骨分化誘導に対しては著明な効果は示さなかったが、セメント

分化誘導には基質形成の促進を含む誘導効果を示すことが明らかとなった。このPAI-1刺激は、HPLSC細胞でのCEMP1転写活性を亢進することによってセメント分化を誘導促進すると考えられた。

2) 3次元培養法におけるセメント分化誘導の促進

PAI-1刺激は2次元培養HPLSC細胞におけるセメント質の分化誘導を亢進することを示した。そこで、3次元培養が2次元培養よりもセメント分化誘導に対して有効であるかを検討した。3次元培養法としては、スフェロイド培養法および細胞シート法を行ったが、予備実験においてHPLSCスフェロイドがより分化誘導を亢進したことから、スフェロイド法での結果を提示する。

スフェロイド体の形成は、U字底の非接着性プレートにHPLSC細胞を播種して作製した。播種後1日で、球形のスフェロイドが形成される。さらに、本研究においては調和のとれたオルガノイド形成を目的としているために、スフェロイド周囲にはマトリックスが必要であると考え、コラーゲン・ゲルにスフェロイドを包埋する培養法を応用した。

(1) コラーゲン・コーティング2次元培養法とスフェロイド含有コラーゲン・ゲル包埋3次元培養法によるCEMP1発現の比較

コラーゲン・コーティング2次元培養HPLSC細胞においても、PAI-1刺激群でのCEMP1陽性細胞は他群と比較して有意に多くみられた。同様にHPLSCスフェロイドをコラーゲン・ゲルに埋入した3次元培養法においても、CEMP1陽性細胞はPAI-1群において最も多く認められた。また、PAI-1細胞における2次元培養と3次元培養でのCEMP1陽性細胞数のICC法による比較は、3次元培養群において多い傾向を示した。これらの結果は、HPLSC細胞でのセメント分化誘導に対しても、3次元培養が有用であることを示唆している。

(2) セメント分化誘導におけるコラーゲン・ゲル包埋HPLSCスフェロイドの有用性

(1) で示したICC法に加えて、コラーゲン・コーティング2次元培養法と比較してコラーゲン・ゲル包埋HPLSCスフェロイドがセメント分化誘導を促進することをWB法ならびにALPおよびARS染色法により検討した。OIM群およびPAI-1群における比較では、両群共に3次元培養細胞で

のRunx2発現の亢進が明らかであった。また、CEMP1に関しても3次元培養PAI-1細胞が2次元培養細胞と比較して発現が亢進していた。3次元培養細胞においても、CEMP1によるセメント分化誘導は、PAI-1細胞がOIM細胞よりも促進していることが認められた。ALPおよびARS染色によるセメント基質の形成に関しても、HPLSCスフェロイドでの染色性が2次元培養細胞よりも増強していることが明らかとなった。

3) まとめ

今回の研究結果から、歯周組織複合体でのセメント質と歯槽骨の連絡役を務める歯根膜線維に含まれる歯根膜幹細胞の分化誘導には培養法の工夫が必要であることが分かった。とくに、歯周組織複合体を再構築させるために用いるスフェロイド培養においても、スフェロイド単体ではなく生体における細胞間マトリックスの役割を果たすと考えられるコラーゲン・ゲルへの埋入が、それぞれの細胞の分化をスムーズにさせることが示唆された。本研究で明らかとなった分化調節をしたコラーゲン・ゲル包埋HPLSCスフェロイドを使用したオルガノイド形成により、細胞間の極性が付与された調和のとれた複合体が形成できるものとする。

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 Madoka Yasunaga, Hiroyuki Ishikawa, Kenichi Yanagida, Sachio Tamaoki	4. 巻 21
2. 論文標題 An orthodontic perspective on Larsen syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12903-021-01454-x	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 Hiroki Nakashima, Madoka Yasunaga, Mizuki Yoshida, Masahiro Yamaguchi, Saki Takahashi, Hiroshi Kajiya, Sachio Tamaoki, Jun Ohno	4. 巻 30
2. 論文標題 Low concentration of etoposide induces enhanced osteogenesis in MG63 cells via Pin 1 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 175-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.30.175	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 安永まどか, 大野純, 玉置幸雄, 石川博之
2. 発表標題 歯根膜幹細胞における骨分化誘導とAMPK / mTOR経路の関連
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------