

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18771

研究課題名(和文) 歯周組織オルガノイド併用による調和のとれた自家歯牙移植法の開発

研究課題名(英文) Development of a harmonious tooth transplantation method using periodontal tissue organoids

研究代表者

安永 まどか (YASUNAGA, Madoka)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80845264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：自家歯牙移植法は移植後の骨性癒着、歯根吸収および移植歯の喪失を防ぐため、再構築される歯周組織の調和の獲得を目的とした、歯周組織オルガノイドの作製実現について研究を進めた。オルガノイドの一部となるセメント芽細胞分化の促進を図るため歯根膜幹細胞を用いて研究を進めた。歯根膜幹細胞を用いてスフェロイド形成、その後にコラーゲンゲル内で培養を行い3次元培養を図った。プラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI-1)を添加し3次元培養で分化能が向上した細胞にセメント芽細胞分化の誘導を図った。また、セメント質分化誘導の確立のため、歯根膜幹細胞にCEMP-1遺伝子導入を図った。

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組織化された細胞を移植に併用することが重要である。本研究課題は、細胞シート培養法と多細胞スフェロイドのコラーゲン培養法を組み合わせることで細胞が組織化された状態である歯周組織オルガノイドを形成することである。オルガノイド培養は、多細胞が生体と同様に相互的に作用し合うことで生体組織と同様の働きを再現できる。生体組織においては、それぞれの細胞は他の細胞と共同で作用するために、細胞自身の分化度を調節している可能性が考えられる。したがって、移植後の調和のとれた歯周組織を再現するために、歯根膜線維、セメント質、骨への分化制御を図った歯周組織オルガノイドを作製することが重要である。

研究成果の概要(英文)：To prevent failures of autologous tooth transplantation such as synostosis, tooth root resorption, and loss of the transplanted tooth, I attempted to produce periodontal tissue organoids with harmonious reconstructed periodontal tissue. In this study, human periodontal ligament stem cells were used because those cells can promote a differentiation of cementoblasts. Using plasminogen activator inhibitor (PAI-1) stimulation organoids generated by a combination of spheroids and collagen gel revealed a multilayer of periodontal tissue. Furthermore, I attempted to transfect cementum-1 gene into periodontal ligament stem cells to accelerate cementum differentiation in periodontal tissue organoids.

研究分野：再生医療

キーワード：自家歯牙移植法 歯周組織オルガノイド 3次元培養法

1. 研究開始当初の背景

歯の欠損に対する歯科治療法の一つとして、「自家歯牙移植」がある。試行錯誤を繰り返して、移植法の臨床的手技は確立されてきた。しかしながら、そのような確立した手技を用いても移植後の骨性癒着、歯根吸収や移植歯の喪失が生じる場合がある。骨性癒着と歯根吸収の原因としては、移植歯の歯根膜損傷による移植歯歯根膜と受容側コラーゲン線維の再生・修復不全が考えられる。また、移植歯喪失の原因としては受容側の骨吸収などの受け入れ側の不適応が挙げられる。すなわち、移植の失敗は移植歯と受容側で再構築する歯周組織の不調和によると考えられる。したがって、確実な自家歯牙移植法の実践にあたっては、歯根膜を主体とした歯周組織の再生療法を組み合わせた術式の開発が必要であると考えられる。また、近年 *in vitro* での細胞の組織化 = オルガノイドについての研究が進んでいる。オルガノイドの移植により再生・修復が促進される報告があり、自家歯牙移植法においても応用可能であると思われる。

歯周組織複合体の再生・修復を良好に促し、移植歯と受容組織の調和を図ることが自家歯牙移植法の重要なポイントである。そのためには、歯根膜を主軸とした移植歯におけるセメント質の再生および受容組織における歯槽骨の再生が必要である。したがって、歯周組織オルガノイドを用いた再生療法の開発が必要である。そして、これらのオルガノイド併用法を実現するには、オルガノイド形成の根幹である細胞の分化誘導をコントロールする手段も必要となる。

2. 研究の目的

3次元培養法を応用して歯周組織オルガノイドを作製し、移植歯と受容組織が調和の取れる歯周組織複合体の再現を行う。具体的には、1) 3次元培養を構成する細胞間における分化度の調和を図るために、幹細胞の歯根膜、セメント質および骨への分化誘導・調節法を検索する、2) セメント質、歯根膜、骨分化誘導をしたスフェロイドおよび細胞シートをコラーゲン・ゲル包埋培養法で培養し歯周組織オルガノイドを形成する、3) 歯牙移植モデルを使用して形成されたオルガノイドを含有するゲルを受容側に埋入して移植を行う。

3. 研究の方法

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

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

ii) 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。

iii) 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。

iv) 分化誘導の評価: 評価には位相差観察、Western blotting (WB) 法および免疫細胞染色(ICC)法を用いた。

2) セメント質分化誘導能促進のために、HPLSC を不死化した後にセメント質分化誘導能のある ementum protein-1(CEMP-1)遺伝子導入を行った。

i) HPLSC をヒト歯根膜幹細胞用培養培地 (Human Periodontal Ligament Stem Cell Culture Complete Growth Media with Serum)で培養を行った。

ii) 不死化細胞の樹立のため、Lenti-SV40T (Puro) レンチウイルス感染後に薬剤スクリーニング (Puromycin による選択培養を行い、Puromycin 耐性のある細胞の増殖を確認)した。

iii) 不死化バルク細胞にレンチウイルス作製用ベクターである pSMPUW-cDNA (標的遺伝子: CEMP1) を使用して作製したレンチウイルスを感染させ、薬剤スクリーニング (G418 600 で選択培養)を行った後、増殖した細胞をクローン化した。

iv) SV40T 抗原及び目的遺伝子: CEMP1 の発現確認のため、WB 解析を行った。

4. 研究成果

1) PAI-1 による HPLSC スフェロイドと ECM(コラーゲンゲル)の相互作用について検証

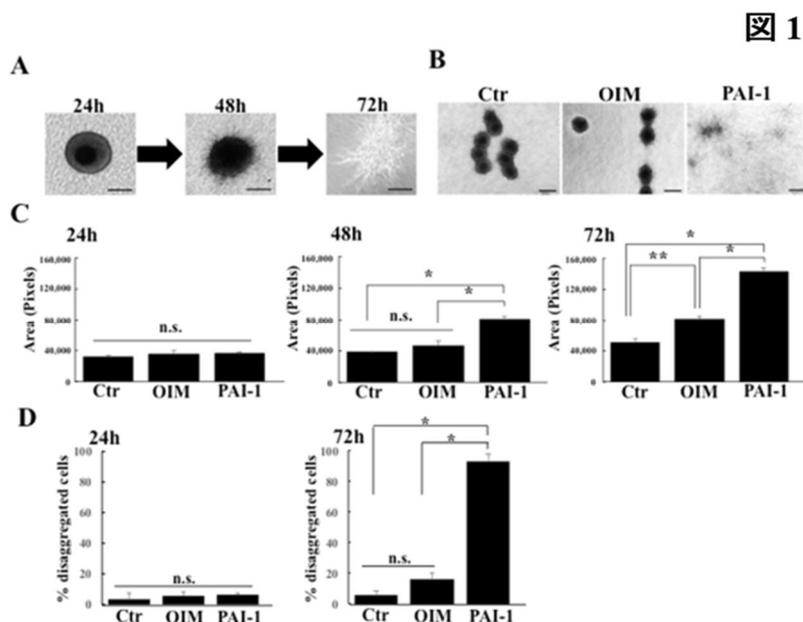


図 1

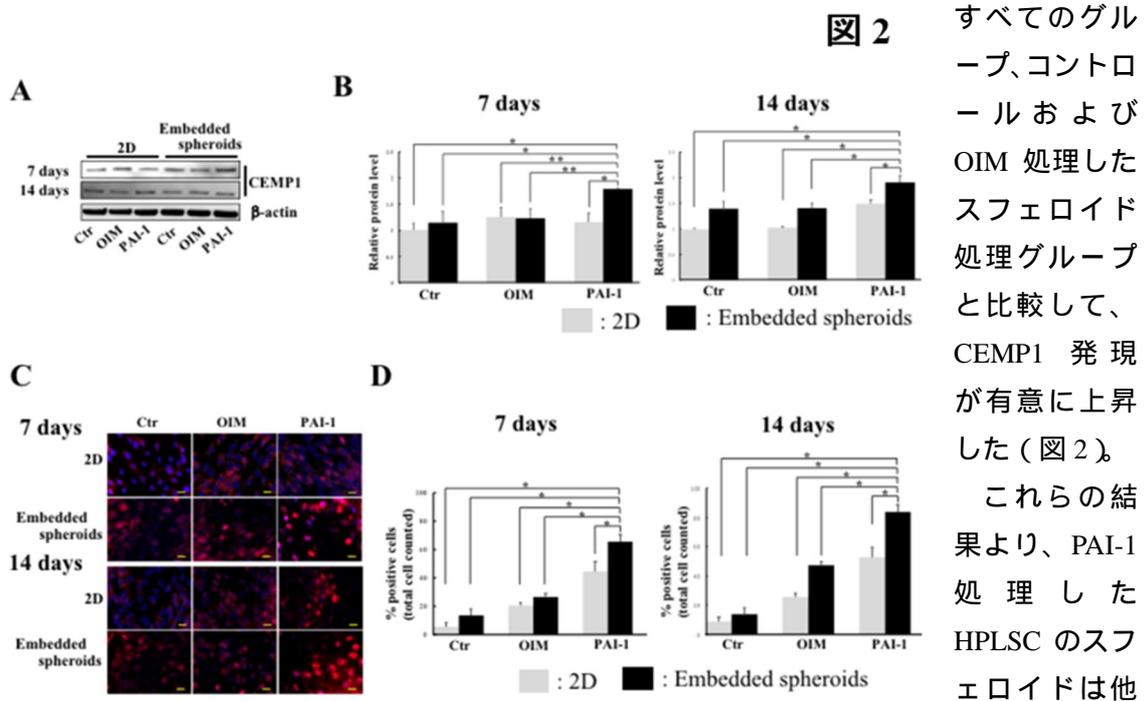
PAI-1 で処理した埋め込みスフェロイドの表面は 48 時間で多数の棘で覆われ、ウニのような形態を示した。PAI-1 処理の 72 時間後、多くのスフェロイドが分解され、分離された細胞はコラーゲンゲルに移動して拡散した(図 1A)。コントロールグループと OIM グループのスフェロ

イドは 72 時間後もボール状または棘の出た形状のままであった(図 1B)。24 時間後、各グループのスフェロイドの範囲に有意差は認められなかった。48 時間後と 72 時間後、PAI-1 で処理したスフェロイドの拡散領域は、コントロールグループと OIM 処理グループよりも大きくなった(図 1C)。PAI-1 群は、対照群および OIM 群と比較して、72 時間で埋め込まれた球状体の分解率が高かった(図 1D)。PAI-1 処理では、コントロールおよび OIM 処理群と

比較して、埋め込まれた HPLSC スフェロイドの早期の分解が示された。PAI-1 処理スフェロイドの早期の分解について、スフェロイドの周辺部に局在する遊走細胞に加えて、非遊走期に参与していた細胞も遊走細胞に変化したことを示している可能性がある。したがって、PAI-1 処理は埋め込まれたスフェロイドと ECM 内のコラーゲンの相互作用を可能にし、それが HPLSC スフェロイドのセメント質形成分化の誘導に寄与している可能性がある。

2) PAI-1 刺激下の 3 次元培養法におけるセメント分化誘導の促進の検証

WB 分析および ICC 法の結果では、PAI-1 で処理した包埋スフェロイドでは、2D 培養の



すべてのグループ、コントロールおよび OIM 処理したスフェロイド処理グループと比較して、CEMP1 発現が有意に上昇した(図 2)。これらの結果より、PAI-1 処理した HPLSC のスフェロイドは他

のグループよりも高いセメント質分化能力を示した。

3) HPLSC の不死化および CEMP-1 遺伝子導入の検証

WB 結果(図 3)よりサンプル#8 で高い SV40 Large T 抗原の発現量が認められた。WB 結果(図 4)よりレンチウイルス感染細胞での CEMP1 の高発現が認められた。不死化と CEMP1 の高発現の HPLSC(サンプル#8)が得られた。

図3 WBによるHPLSCにおけるSV40Large T抗原の発現

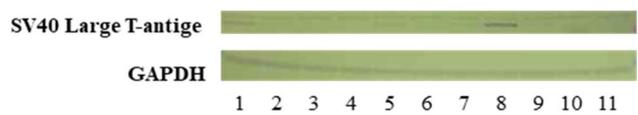
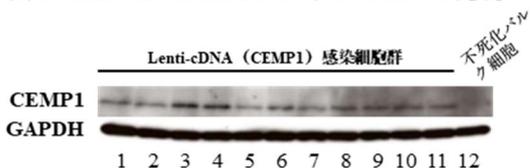


図4 WBによるHPLSCにおけるCEMP1の発現



4) まとめ

HPLSC でのスフェロイド形成およびプラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (PAI-1 および OIM) で刺激をしてセメント芽細胞分化及び骨芽細胞を分化誘導した細胞群を細胞シート及びスフェロイド混合コラーゲン・ゲル包埋培養法により 3 次元歯周組織複合体の形成を行った (Int J Mol Sci 23: 2022)。さらに、確実にセメント芽細胞を分化誘導するために、歯根膜幹細胞に CEMP-1 遺伝子導入を行い、CEMP-1 発現不死化細胞を作製した。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3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yasunaga M, Ishikawa H, Tamaoki S, Maeda H, Ohno J	4. 巻 23
2. 論文標題 Embedded Human Periodontal Ligament Stem Cells Spheroids Enhance Cementogenic Differentiation via Plasminogen Activator Inhibitor 1	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2340 ~ 2340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23042340	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 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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Madoka Yasunaga, Sachio Tamaoki, Jun Ohno
2. 発表標題 3D collagen-embedded spheroids of periodontal ligament stem cells enhance cementogenic differentiation via plasminogen activator inhibitor 1
3. 学会等名 Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Meeting 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安永まどか、鍛冶屋浩、利光拓也、中嶋宏樹、玉置幸雄、石川博之、前田英史、大野純
2. 発表標題 ヒト歯根膜幹細胞の骨分化誘導への初期オートファジーの関与
3. 学会等名 第29回硬組織再生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋沙希、安永まどか、中嶋宏樹、大野純、玉置幸雄
2. 発表標題 軽度DNA損傷はオートファジー誘導を介して骨分化誘導を促進する
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yasunaga M, Yamaguchi M, Seno Kei, Yoshida M, Ohno J	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 25
3. 書名 Role of autophagy in dysregulation of oral mucosal homeostasis. In: Inflammation and oral cancer from Bench to Beside	

1. 著者名 Seno K, Yasunaga M, Mori-Yamamoto N, Ohno J	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 24
3. 書名 Oral mucosal graft-versus-host disease and its possibility of antitumor effects. In: Inflammation and oral cancer from Bench to Beside	

〔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
---------	---------