

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：2022～2023

課題番号：22K17242

研究課題名（和文）自家歯牙移植へのマイトファジー制御型歯周組織オルガノイド併用法の開発

研究課題名（英文）Development of mitophagy-regulated periodontal tissue organoids for autologous tooth transplantation

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：歯周組織オルガノイド作製法にマイトファジー促進を加えて、極性を付与した歯周組織複合体の作製を試みた。セメント芽細胞への分化誘導を確実にするために、遺伝子導入法を応用してCEMP-1発現歯根膜幹細胞を作製した。複合体への極性付与には、細胞にマイトファジー亢進あるいは抑制状態として検討した。作製法は、線維組織並びに骨芽細胞の分化誘導には細胞シートで行い、CEMP-1発現細胞からスフェロイドを作製した。最終的にマイトファジー誘導剤を添加してオルガノイドを作製した。その結果、マイトファジー促進細胞群からの歯周組織複合体においてセメント芽細胞-歯根膜線維-骨芽細胞の配列が再現できる傾向を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

確実な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した。さらに、オルガノイドにマイトファジーによる細胞極性を付与した。これらの研究結果は、極性を伴うオルガノイドを作製したことにより、より生体環境にマッチした組織複合体となった。すなわち、極性を付与した歯周組織複合体は自家歯牙移植法における失敗例を克服して、同移植法の安定性に貢献できると考える。本研究成果は、移植医療を含め歯科領域において歯周病並びにインプラント治療への応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：I attempted to create the polarized periodontal tissue complex by enhancement of cementoblastic differentiation using organoid culture of the periodontal tissue. To induce CEMP-1-expressing human periodontal ligament stem cells (HPLSCs) were generated by gene transfer methods. Cell sheets of stem cells were attempted to generate fibrous tissue and osteoblasts. CEMP-1-expressing HPLSCs were used to generate cementoblast-rich spheroids. Mitophagy-enhanced or -suppressed HPLSCs were used to examine a polarity of the periodontal tissue organoids that produced by a mixture of cell sheets and spheroids. The results showed that the periodontal tissue organoids generated from mitophagy-enhanced cell spheroids maintained the polarization of periodontal tissue complex.

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“極性の逸脱”による移植歯と受容側で再構築する歯周組織複合体の不調和によると考えられる。

自家歯牙移植法の目標は、移植歯と受容側で再構築された歯周組織の調和を図り機能させることである。そのためには、移植歯を含めた複合体を構成する細胞間の極性を復元する必要がある。これらの細胞群が適切な極性を持つには、2つの条件が必須であると考えられる。一つは、移植歯と周囲歯周組織の調和を図るための、歯根膜を主体とした歯周組織再生療法を組み合わせた移植法の開発である。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。そこで、次に述べる方法で極性を付与した歯周組織オルガノイドを作製し、自家歯牙移植に併用すれば移植歯を含む歯周組織は調和の取れる状態になると考える。二つ目は、オルガノイド作製に用いる幹細胞を適切に分化誘導することである。細胞間の分化程度を適正化することによって極性が保持され、生体と同様の組織構築が再現できると考える。申請者は歯根膜幹細胞の骨分化誘導にオートファジーが関与し、オートファジーを人為的に亢進すると分化誘導が促進することを報告した(J Hard Tissue Biol 2019)。この結果は、歯周組織複合体を構成する細胞群の分化誘導がオートファジーにより制御できる可能性を示唆する。さらに細胞の分化不全には細胞内ストレスが関与することが明らかとなった。ストレス・センサーであるミトコンドリアの損傷が細胞分化の障害に関与すると考える。マイトファジーは傷害を受けたミトコンドリアを分解する選択的オートファジーである。そこで、マイトファジーによるミトコンドリアの品質管理を維持して、幹細胞を適切な分化に誘導すれば歯周組織オルガノイド内において細胞間の極性が付与されると考える。

すなわち、移植歯と受容組織からなる歯周組織複合体における極性の再現を図ることができる歯周組織オルガノイドを併用した移植法の開発が必要である。さらに、極性を付与したオルガノイド形成の根幹となる適切な細胞分化の誘導をコントロールするマイトファジーによる調節が必要である。

2. 研究の目的

自家歯牙移植法の確立(移植歯と受容側で再構築された歯周組織の調和を図り機能させること)を目的とする。そのためには、移植歯を含めた複合体を構成する細胞間の極

性を復元する必要がある。これらの細胞群が適切な極性を持つには、2つの条件が必須であると考えられる。一つは、移植歯と周囲歯周組織の調和を図るための、歯根膜を主体とした歯周組織再生療法を組み合わせた移植法の開発である。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。そこで、極性を付与した歯周組織オルガノイドを作製し、自家歯牙移植に併用することで移植歯を含む歯周組織は調和の取れる状態になる。二つ目は、オルガノイド作製に用いる幹細胞を適切に分化誘導することである。そのためにはミトファジーによるミトコンドリアの品質管理を維持して、幹細胞を適切な分化に誘導する方法の確立を図る。

3. 研究の方法

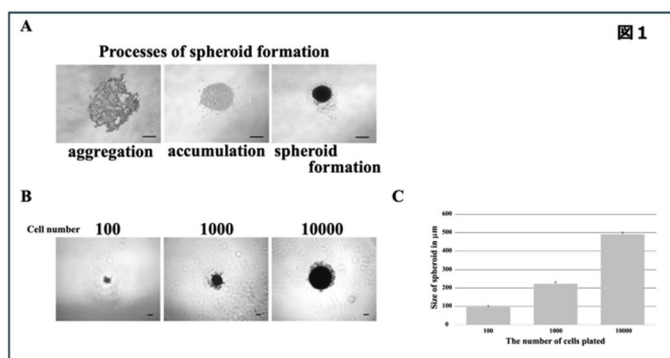
ミトファジーによる歯周組織オルガノイド構成細胞の極性および分化度の調整、歯周組織オルガノイドの作製を進めて行く。ミトファジーによる歯周組織オルガノイド構成細胞の極性、分化調整については、分化誘導前に歯根膜由来幹細胞(HPLSC)へミトファジーの亢進あるいは抑制を行い、それぞれセメント質、骨および歯根膜分化への薬剤あるいは遺伝子導入(セメント質分化には CEMP-1 遺伝子導入)による分化誘導を行う。ミトファジー誘導には、(1) CCCP による薬剤刺激法、(2) ミトファジー関連遺伝子である Beclin-1 および Parkin ペプチド投与方法および(3) Beclin-1 および Parkin 遺伝子プラスミド導入法により検討する。ミトファジー抑制法としては、(1) 抑制剤である 3-MA および CQ による薬剤刺激法および(2) siRNA(Beclin-1 および Parkin)による遺伝子ノックダウン法により検討する。ミトファジーへの反応性を確認後、オルガノイド形成に用いる細胞の適切な分化度は、各々の細胞での共培養による分化および極性状態から判断する。歯周組織オルガノイドの作製については、多細胞性細胞シートとスフェロイドを混合したコラーゲン・ゲル培養法を応用してセメント質/歯根膜線維/歯槽骨からなるオルガノイドを形成する。方法は以下の3ステップからなる。(1) 多細胞性細胞シートの作製: セメント芽細胞・歯根膜細胞・骨芽細胞の3層からなる複合体細胞シートの作製を行う。温度応答性培養を応用した細胞シート・キットを用いて HPLSC に各細胞への分化誘導試薬を添加する。各細胞シート形成後、それぞれを積層して3層からなる複合体細胞シートを作製する。(2) スフェロイドの作製: セメント芽細胞分化群には HPLSC 単独、歯根膜細胞と骨芽細胞分化群には HPLSC と血管内皮細胞(HUVEC)の懸濁液を作製し、Low binding plate で分化誘導し、3細胞からなるスフェロイドを作製する。(3) コラーゲン・ゲル培養による歯周組織オルガノイドの作製: I型コラーゲン・ゲルに複合体細胞シートおよび各細胞スフェロイドを包埋する。極性を付与したオルガノイド併用歯牙移植法の有用性について評価する。

4. 研究成果

歯の欠損に用いられる「自家歯牙移植法」を確実な治療法に導くには、移植歯の周囲

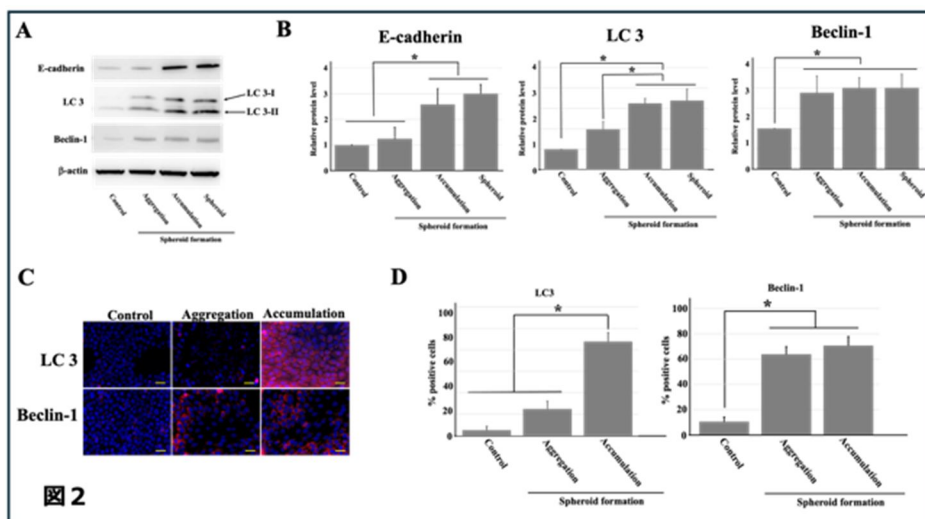
に調和の取れた歯周組織を復元する必要がある。調和の取れた歯周組織とは、同組織を構成する細胞群に適切な極性を付与することである。本研究では歯周組織を構築する細胞群に極性を付与するために、マイトファジーによる適切な極性誘導法の開発を試みた。さらに、極性の取れた歯周組織複合体を再現するために、多層化細胞シート及び細胞凝集体であるスフェロイドを作製した。作製した細胞シート及びスフェロイドを混合したコラーゲン・ゲル包埋培養法を用いて、極性を付与した歯周組織オルガノイドの作製を試みた。

具体的には、先ず、HPLSCスフェロイドの形成を検討した。HPLSCスフェロイドの形成はaggregation→accumulation→spheroidの3ステップ過程で進行する(図1A)。また、



HPLSCスフェロイドの大きさは播種細胞数に依存することが明らかとなった(図1B&C)。HPLSCスフェロイド形成へのオートファジーおよびマイトファジーの関与を検討した。その結果、オートファジー形成過程で

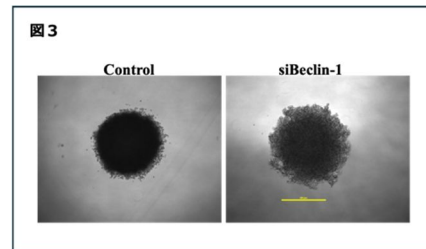
aggregation→accumulationおよび



spheroid形成の段階で、E-cadherin発現の亢進を認めた(図2A&B)。すなわち、スフェロイド形成への細胞接着にはE-cadherinが関与することが明

らかとなった。そして、この形成段階においてオートファジー・マーカーであるLC3-IIおよびBeclin-1発現が亢進した(図2A&B)。とくに、オートファジーはaggregationからaccumulation段階に強く関与することが明らかとなった(図2C&D)。これらの結果から、スフェロイド形成への細胞密集および接着に対してオートファジーが強く関与することが示唆された。スフェロイド形成へのオートファジー関与については、E-cadherin発現を促進するのか、あるいはE-cadherin以外のpathwayに関与するのかは、現時点は不明である。しかしながら、オートファジーがスフェロイド形成accumulationに関連することを証明するために、オートファジーを薬剤的および遺伝子的に抑制して

スフェロイド形成について検討した。その結果、3-MA（オートファジー抑制剤）およびsiBeclin-1導入によりオートファジーを抑制すると、スフェロイド形成過程は aggregationの段階で停止しaccumulationに進まないことが明らかになった（図3）。これらの結果から、オートファジーがスフェロイド形成のaccumulation過程を制御している可能性が示唆された。HPLSCでのスフェロイド形成へのオートファジー関与を明らかにして、歯根膜幹細胞をプラスミノゲン・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試みた。さらに、確実なセメント芽細胞を分化誘導させるために、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。構築した歯周組織複合体の極性付与へのマイトファジー関与については、マイトファジー促進あるいは抑制を薬剤投与により誘導した歯根膜幹細胞およびCEMP-1発現細胞を用いて歯周組織オルガノイドを作製して検討を行なった。その結果、現在までのところ、マイトファジーを誘導することによりセメント芽細胞-歯根膜線維-骨芽細胞の配列が再現できる傾向を得た。



本研究では、動物実験まで進展させることができなかった。しかしながら、得られた in vitro は動物実験でも有用であると考えている。今後、動物実験を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1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

〔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
---------	---------