

令和 4 年 4 月 28 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10133

研究課題名(和文) 継代培養による歯根膜細胞複製劣化に対するスフェロイド培養の応用と分子基盤の解明

研究課題名(英文) Application and molecular basis of spheroid culture to the deterioration of periodontal ligament cells due to frequent passage

研究代表者

臼井 通彦 (USUI, MICHHIKO)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10453630

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)：本研究ではRNA-seq解析を用いて、hPDLMSC(ヒト歯根膜間葉系幹細胞)スフェロイドに特異的に発現する遺伝子を見つけ、機能解析を行うことを目的とした。hPDLMSCのスフェロイド培養群と、単層培養群のトランスクリプトーム解析を行い比較した。我々はスフェロイド培養群に強く発現していた遺伝子として、転写因子であるNR4A2(Nuclear receptor 4A2)を見出した。NR4A2のノックダウンは、骨形成関連遺伝子の発現とALP活性、並びに石灰化結節形成を有意に上昇させた。以上の結果より、NR4A2はhPDLMSCスフェロイドにおいて、骨分化を抑制的に制御していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト歯根膜間葉系幹細胞を用いた細胞治療は、次世代の歯周組織再生治療として期待されている。しかし、再生に適した歯根膜幹細胞の培養条件については不明な点が多い。スフェロイド培養は幹細胞の生理的機能を上昇させることが知られているが、今回我々が見出したNR4A2がヒト歯根膜間葉系幹細胞のスフェロイド培養において、幹細胞性の維持・骨分化抑制に関与している可能性が明らかとなったことは学術的に意義深いと考える。

研究成果の概要(英文)：In present study, we performed RNA-seq analysis to find genes specifically expressed in hPDLMSC (human periodontal ligament mesenchymal stem cell) spheroids and to analyze their functions. The hPDLMSC spheroid culture group and monolayer culture group were compared by transcriptome analysis. We found that the transcription factor NR4A2 (Nuclear receptor 4A2) was strongly expressed in the spheroid culture group, and knockdown of NR4A2 significantly increased the expression of osteogenesis-related genes, ALP activity, and calcified nodule formation. These results suggest that NR4A2 negatively regulates osteogenesis in hPDLMSC spheroids.

研究分野：歯周病学

キーワード：スフェロイド 歯根膜幹細胞 骨分化 幹細胞性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) 歯根膜幹細胞

新たな歯周組織再生療法として、歯根膜細胞を用いた細胞治療が着目されている。歯根膜細胞には、間葉系幹細胞が存在し、多分化能を有する(Seo et al., Lancet 2004)。さらに、細胞工学技術を応用した歯根膜細胞シートが作製され、動物実験にて良好な再生能力を示している(Iwata et al., Journal of Clin Periodontol 2010)。また、ヒト臨床試験が行われ、ヒトの歯周組織欠損での効果も確認されている (Iwata et al., Regen Ther 2018)。しかし、大きな組織欠損を修復・再生させるには大量の細胞が必要となるが、幹細胞は単層培養にて継代を重ねると未分化性、増殖能や多分化能が低下することが報告されている (Di Battista et al., Inflamm Res 2014, Li C et al., Cell Biochem Biophys 2015, Vilchez D et al., Trends Cell Biol 2014)。我々もまた、歯根膜細胞を 15 回継代すると 3 回継代したものに比較して、増殖能とアルカリフォスファターゼ活性が低下することを確認している (未発表データ)。

#### (2) スフェロイド

スフェロイド (細胞凝集塊) とは、細胞が多数凝集して、3 次元状態になったものである。スフェロイド培養された細胞は、細胞-細胞間が接着タンパク質を介して接合することにより、細胞間コミュニケーションが行なわれ、細胞分化などの生理的機能が向上することが知られている(Franchini et al., Haemophilia 2009)。我々は、スフェロイド培養した歯根膜細胞が単層培養した歯根膜細胞に比較して、形成される石灰化結節量を増加させ、さらに、マウス頭蓋骨欠損モデルに移植すると、新生骨量を増加させることを明らかにした(Moritani et al., J Periodontal Res, 2018)。その研究の過程で、歯根膜細胞をスフェロイド培養すると、単層培養に比較して、幹細胞関連因子である OCT4、NANOG の遺伝子発現、並びに蛋白発現が増強していることを見出した。すなわち、スフェロイド培養は単層培養によって失われた幹細胞の未分化性並びに多分化能を回復する可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はスフェロイド培養が継代によって衰えた歯根膜細胞の生理機能を回復できるかを明らかにすることである。その前段階として、幹細胞性の上昇・骨分化能の上昇といった歯根膜細胞スフェロイドの特性のメカニズムを詳細に検証することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯根膜細胞スフェロイドの作製

インフォームドコンセントの得られた患者より第三大臼歯を抜歯し、採取した歯根膜 (PDL) から酵素法を用いてヒト歯根膜間葉系幹細胞 (hPDLMSC) を単離し、hPDLMSC スフェロイドを作製した。マイクロウェルチップを用いた hPDLMSC スフェロイドの作製は、堺らの方法に従った (Sakai Y et al., Acta Biomater. 2007)。マイクロウェルチップに、2,000 cells/well の細胞密度で hPDLMSC を播種し、10%FBS を添加した  $\alpha$ -MEM 溶液にて 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で 3 日間培養し、スフェロイドを形成させた。

#### (2) トランスクリプトーム解析

4 名の患者の抜去歯より採取した 4 種類の hPDLMSC をスフェロイド用マイクロウェルチップ内で 3 日間培養し、スフェロイドを調製した。また、対照群として同じ 4 種類の 3 日間単層培養した hPDLMSC を調製し、両群から RNA を回収した。Illumina HiSeq システムを使用して RNA-seq を実施した。fastq ファイルにおけるアダプター配列および低品質配列のトリミングは Trimmomatic(v.0.35)を使用した。配列決定されたリードを、HISAT2(v.2.1.0)を用いてヒトリフ

アレンスゲノム(hg38)に整列させた。uniquely mapped reads を、Fragments Per Kilobase of exon per Million reads mapped(FPKM)として正規化するために、Cufflinks(v.2.2.1)を使用した。2 群間で発現が変動した遺伝子 Differentially Expressed Genes(DEGs)を検出するために Cuffcompare , Cuffquant , Cuffdiff を使い、Cufflinks パッケージ中の Benjamini-Hochberg 補正( $q$  値)を使用して、各遺伝子の倍率変化 ,  $p$  値 , および False Discovery Rate(FDR)を計算した。 $q < 0.05$  かつ FPKM の fold change  $\geq 2.0$  を DEGs に定義した。hg38 および Refseq のデータは、UCSC Genome Browser(<https://genome.ucsc.edu/>)から得た。GO term エンリッチメント解析を、Database for Annotation , Visualization and Integrated Discovery (DAVID; <https://david.ncifcrf.gov/>)によって行った。特定の GO term を NCBI データベース (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/gene/DATA/>)から収集した。RNA-seq 解析のプロットとグラフの大部分は、ggplot 2 と R パッケージを用いて図示した。クラスタリング解析は、R パッケージの hclust 関数により行った。

#### 4 . 研究成果

##### ( 1 ) RNA-seq によるスフェロイド培養 hPDLMSC の遺伝子プロファイル

配列決定されたリードは HISAT2 を用いてヒトリファレンスゲノム(hg38)配列にマッピングした。次いで、各サンプルの遺伝子発現レベルを、Cufflinks パッケージを用いて、fragments per kilobase of exon per million reads mapped(FPKM)として正規化した。両群間の低発現遺伝子を除去するために、少なくとも一方の群で FPKM が 1 以上発現している RefSeq 遺伝子のみを用い、12,137 個の遺伝子が同定された。これらの遺伝子は異なる発現パターンを示す 3 つの遺伝子クラスターに分けられた(図 1-a)。クラスター1 は単層培養群と比較してスフェロイド培養群で上昇した 4,932 個の遺伝子から構成された。クラスター3 はスフェロイド培養群と比較して単層培養群で上昇した 5,292 個の遺伝子から構成された。クラスター2 は培養条件に発現が影響されない 1,913 個の遺伝子から構成された。各クラスターの遺伝子は特定の GO term により有意に濃縮された。クラスター1 の遺伝子は、細胞増殖の負の調節 , ヒストン脱アセチル化 , および BMP シグナリングのような特定の GO term を含んでいた。一方、クラスター3 の遺伝子は、細胞間接着、有糸分裂細胞周期の G2/M 移行、および G1/S 移行のような特定の GO term を含んでいた(図 1-a)。スフェロイド培養群はヒストン脱アセチル化などのエピジェネティックな変化を誘導し、細胞周期の停止を引き起こす可能性があることが示唆された。我々の RNA 配列解析はスフェロイド培養群の全遺伝子発現プロファイルは、単層培養群とは劇的に異なることを示している(図 1-b)。

##### ( 2 ) hPDLMSC スフェロイドにおける特異的遺伝子発現

スフェロイド培養群と単層培養群の 2 群間の DEGs(fold change  $\geq 2$ 、 $q$  値(Benjamini-Hochberg 補正による誤検出率(FDR))  $< 0.05$ )を分析し、2,196 の遺伝子を同定し、スフェロイド培養に関して潜在的に重要な調節因子を検出した。スフェロイド培養群と単層培養群の 2 群間の違いを検討するために、それぞれの群で遺伝子発現が上昇した DEGs を用いて GO term エンリッチメント解析を行い、上位 20 個の有意に濃縮された GO biological process terms( $q$  値  $< 0.05$ )を同定した。単層培養群において上昇した DEGs から同定された上位 20 個の GO term のほとんどは細胞周期に関連していた。興味深いことに、スフェロイド培養群において遺伝子発現が上昇した DEGs は、骨芽細胞分化および BMP シグナル伝達経路の正の調節のような骨芽細胞分化に関連する GO term を有していた。

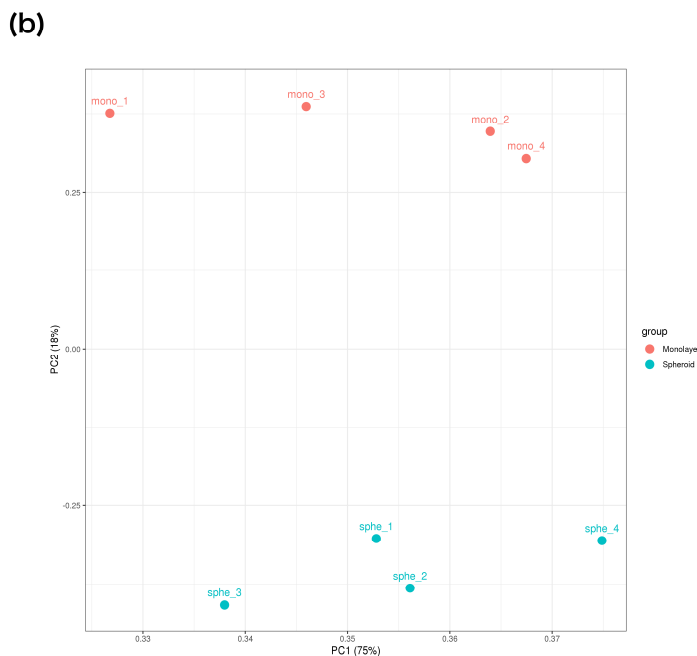
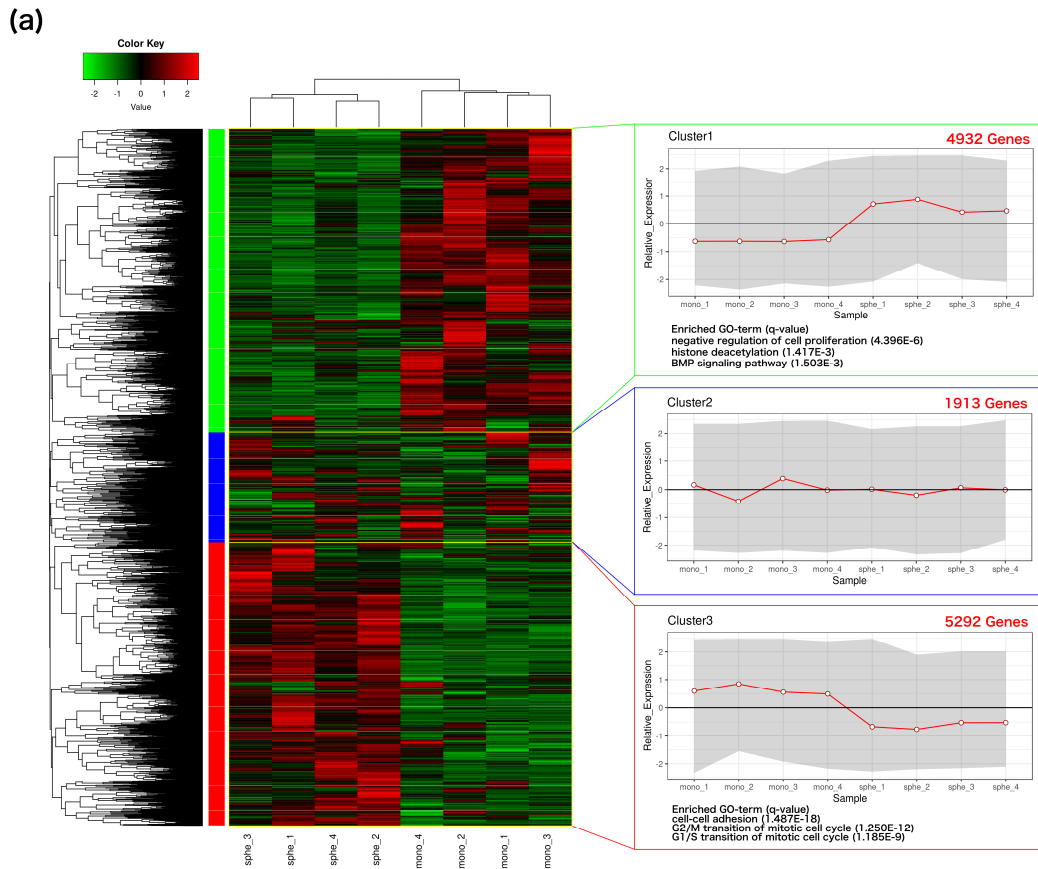


図 1 RNA-seq による遺伝子発現プロファイル

(a) RNA-seq は 12,137 の遺伝子 (FPKM 1.0) を検出し、それらは階層的クラスタリングアプローチにより 3 つのパターンに分類された (左図)。スフェロイド培養で発現が上昇していた遺伝子からなるクラスター 1 および単層培養で発現が上昇していた遺伝子からなるクラスター 3 は DAVID を用いて分析し、特定の GO term により有意に濃縮された。有意に濃縮された代表的な GO term (Benjamini Hochberg  $< 0.05$ ) を示す (右図)。(b) 主成分分析 (PCA) を 12,137 遺伝子 (FPKM 1.0) の発現データを用いて行った。PCA プロットは、赤色 (単層培養群) および青色 (スフェロイド培養群) クラスターとして示される 2 つの明確に区別可能なサンプルを示した。

スフェロイド培養群と単層培養群の 2 群間の DEGs に関して、スフェロイドにおいて fold

change 7,  $q$  値(Benjamini-Hochberg 補正による誤検出率(FDR)) < 0.05), スフェロイド培養群の FPKM > 50 の遺伝子を抽出した。その中で我々は転写因子である NR4A2 に着目し、機能解析を行った。

### (3) 骨分化条件での hPDLMSC スフェロイドにおける NR4A2 の機能解析

hPDLMSC スフェロイドにおける NR4A2 の機能を調べるために、siRNA ノックダウンアッセイを行った。まず最初に、siNR4A2 のノックダウン効果を確認した。siNR4A2 を導入した hPDLMSC スフェロイドにおける NR4A2 の mRNA 発現レベルは、non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドと比較して約 80%低下した(図 2-a)。また、ウエスタンブロット分析により、siNR4A2 を導入した hPDLMSC スフェロイドにおける NR4A2 タンパク質発現が、non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドと比較して著明に低下することが明らかとなった(図 2-b)。次に、骨形成における NR4A2 の役割を明らかにするために、hPDLMSC スフェロイドを用いて石灰化結節形成アッセイを行った。siNR4A2 または non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドを骨分化誘導培地(OIM) 条件下で 12 日間培養した。この骨形成条件下では、両方の siRNA ベクターで処理した hPDLMSC スフェロイドは、ともにアリザリンレッド陽性カルシウム沈着物を形成した。しかし、siNR4A2 を導入した hPDLMSC スフェロイド群のアリザリンレッド陽性結節の面積は、non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイド群よりも有意に大きかった(図 2-c)。

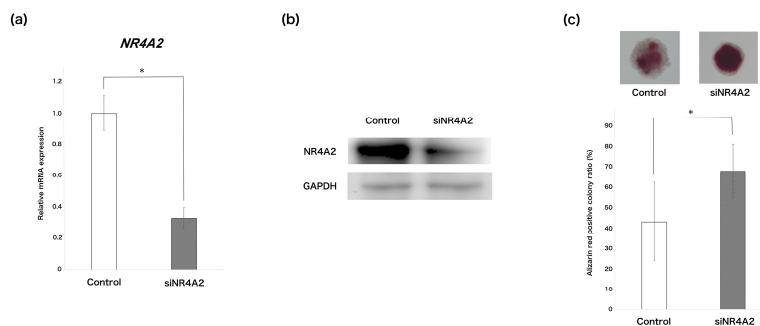


図 2 NR4A2siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドにおける骨形成の増強

(a)スフェロイド培養 hPDLMSC における siRNA による NR4A2 のサイレンシングの確認  
siNR4A2 は、NR4A2 の mRNA 発現を約 30%に減少させた。(b)NR4A2 のタンパク質発現は siNR4A2 導入によって減少した。(C)siNR4A2 または non-targeting control siRNA を導入後、OIM 条件下で培養した hPDLMSC スフェロイドの石灰化結節形成。細胞を siNR4A2 または non-targeting control siRNA でトランスフェクトし、OIM 条件下で 12 日間培養し、アリザリンレッドで染色した。

また、siNR4A2 を導入した hPDLMSC スフェロイドにおいて培養 7 日後, ALP, OPN および COL1 の mRNA の発現は、non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドと比較して有意に増加した。siNR4A2 を導入した hPDLMSC スフェロイドにおける ALP 活性は, non-targeting control siRNA を導入した hPDLMSC スフェロイドと比較して有意に増加した。これらのデータから、NR4A2 が hPDLMSC スフェロイドの骨形成を負に制御していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Iwasaki Masanori, Usui Michihiko, Ariyoshi Wataru, Nakashima Keisuke, Nagai-Yoshioka Yoshie, Inoue Maki, Kobayashi Kaoru, Borgnakke Wenche S., Taylor George W., Nishihara Tatsuji	4. 巻 11
2. 論文標題 Validation of a self-report questionnaire for periodontitis in a Japanese population	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-93965-4	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 該当する
1. 著者名 Usui Michihiko, Onizuka Satoru, Sato Tsuyoshi, Kokabu Shoichiro, Ariyoshi Wataru, Nakashima Keisuke	4. 巻 57
2. 論文標題 Mechanism of alveolar bone destruction in periodontitis ? Periodontal bacteria and inflammation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 201 ~ 208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2021.09.005	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 Suga Takenori, Usui Michihiko, Onizuka Satoru, Sano Kotaro, Sato Tsuyoshi, Nakazawa Kohji, Ariyoshi Wataru, Nishihara Tatsuji, Nakashima Keisuke	4. 巻 2021
2. 論文標題 Characterization and Study of Gene Expression Profiles of Human Periodontal Mesenchymal Stem Cells in Spheroid Cultures by Transcriptome Analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/5592804	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 Iwasaki Masanori, Usui Michihiko, Ariyoshi Wataru, Nakashima Keisuke, Nagai Yoshioka Yoshie, Inoue Maki, Kobayashi Kaoru, Nishihara Tatsuji	4. 巻 49
2. 論文標題 Sleep duration and severe periodontitis in middle aged Japanese workers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 59 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13561	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 Iwasaki Masanori, Usui Michihiko, Ariyoshi Wataru, Nakashima Keisuke, Nagai Yoshioka Yoshie, Inoue Maki, Kobayashi Kaoru, Nishihara Tatsuji	4. 巻 56
2. 論文標題 Interruption of regular dental visits during the COVID 19 pandemic due to concerns regarding dental visits was associated with periodontitis in Japanese office workers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontal Research	6. 最初と最後の頁 1091 ~ 1098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jre.12923	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 Iwasaki Masanori, Usui Michihiko, Ariyoshi Wataru, Nakashima Keisuke, Nagai-Yoshioka Yoshie, Inoue Maki, Kobayashi Kaoru, Nishihara Tatsuji	4. 巻 16
2. 論文標題 Evaluation of the ability of the trypsin-like peptidase activity assay to detect severe periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	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) 10.1371/journal.pone.0256538	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 Onizuka Satoru, Yamazaki Yasuharu, Park Sung-Joon, Sugimoto Takayuki, Sone Yumiko, Sj?qvist Sebastian, Usui Michihiko, Takeda Akira, Nakai Kenta, Nakashima Keisuke, Iwata Takanori	4. 巻 21
2. 論文標題 RNA-sequencing reveals positional memory of multipotent mesenchymal stromal cells from oral and maxillofacial tissue transcriptomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Genomics	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) 10.1186/s12864-020-06825-2	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 Shikayama T, Fujita-Yoshigaki J, Sago-Ito M, Nakamura-Kiyama M, Naniwa M, Hitomi S, Ujihara I, Kataoka S, Yada N, Ariyoshi W, Usui M, Nakashima K, Ono K.	4. 巻
2. 論文標題 Hematogenous apoptotic mechanism in salivary glands in chronic periodontitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	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) 10.1016/j.archoralbio.2020.104775.	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 Chuencheewit Thongsiri, Yoshie Nagai-Yoshioka, Ryota Yamasaki, Yoshiyuki Adachi, Michihiko Usui, Keisuke Nakashima, Tatsuji Nishihara, Wataru Ariyoshi	4. 巻
2. 論文標題 Schizophyllum commune -glucan: Effect on interleukin-10 expression induced by lipopolysaccharide from periodontopathic bacteria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Carbohydrate polymers	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) 10.1016/j.carbpol.2020.117285.	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 Wataru Ariyoshi, Michihiko Usui, Kotaro Sano, Aki Kawano, Toshinori Okinaga, Keisuke Nakashima, Kohji Nakazawa, Tatsuji Nishihara	4. 巻 41
2. 論文標題 3D spheroid culture models for chondrocytes using polyethylene glycol-coated microfabricated chip.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical research (Tokyo, Japan)	6. 最初と最後の頁 187-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.41.187	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 Iwasaki M, Usui M, Ariyoshi W, Nakashima K, Nagai-Yoshioka Y, Inoue M, Nishihara T.	4. 巻 8
2. 論文標題 A Preliminary Study on the Ability of the Trypsin-Like Peptidase Activity Assay Kit to Detect Periodontitis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dent J (Basel)	6. 最初と最後の頁 98
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/dj8030098.	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 Sano K, Usui M, Moritani Y, Nakazawa K, Hanatani T, Kondo H, Nakatomi M, Onizuka S, Iwata T, Sato T, Togari A, Ariyoshi W, Nishihara T, Nakashima K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Co-cultured spheroids of human periodontal ligament mesenchymal stem cells and vascular endothelial cells enhance periodontal tissue regeneration.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 59-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2019.12.008	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 菅毅典, 臼井通彦, 鬼塚理, 佐野孝太郎, 豊留-森谷友貴, 花谷智哉, 西原達次, 中島啓介
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析からみえるヒト歯根膜由来間葉系幹細胞スフェロイドの特異的遺伝子発現プロファイルの検討
3. 学会等名 第63回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2020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
研究協力者	有吉 渉  (Ariyoshi Wataru)  (40405551)	九州歯科大学・歯学部・教授	
連携研究者	中澤 浩二  (Nakazawa Kohji)  (00304733)	北九州市立大学・国際環境工学部・教授  (27101)	

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