

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10192

研究課題名（和文）スフェロイド形成による間葉系幹細胞のstemness制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of stemness regulation of mesenchymal stem cells on spheroid formation

研究代表者

李 憲起 (LI, Xianqi)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：60350831

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、特定の低接着性培養プレートを用いることで自発的スフェロイドを形成し、24時間後の遺伝子発現を調べた。自発的スフェロイドでは、付着細胞と比べて幹細胞性マーカーとEGF、IGF1の発現が有意に上昇し、GM-CSFの発現は有意に低下していた。以上から、自発的スフェロイド形成過程では、EGFに代表される細胞分裂促進に関するシグナル伝達系が活性化される一方で、炎症性サイトカインの過剰活性は抑制されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自発的スフェロイドは、高い幹細胞性を有するとともに、生体に近い細胞-細胞間、細胞-細胞外基質間の相互作用を再現することが可能である。スフェロイド形成過程における遺伝子発現の解析は、幹細胞科学の発展のみならず、安定したスフェロイド培養やスフェロイドに関する評価法の確立など幅広い再生医療の臨床応用や、新たな医薬品開発のためのツールとしての応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we used a specific low-adhesion culture plate to form spontaneous spheroids and investigated the gene expression profile after 24 hours. Spontaneous spheroids showed significantly higher expression of stem cell markers, EGF and IGF1, and the expression of GM-CSF were suppressed compared with those of adherent cells. Those results suggest that the signal transduction relating to cell division was accelerated, while the expression of inflammatory cytokines was suppressed during the spontaneous spheroid formation.

研究分野：口腔再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 スフェロイド stemness 遺伝子発現 シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

我々は骨髄由来間葉系幹細胞（Bone Marrow-derived mesenchymal stromal/stem cell: BM-MSC）を二次元培養し、骨芽細胞へと分化させることで、優れた骨再生が得られることを報告しているが（Tissue Eng Part B Rev. 20(3):229-232, 2014.）、BM-MSCでは増幅に伴って幹細胞性や骨形成能が失われるために、得られる細胞数や再生骨量には限界があった。一方、スフェロイドによる三次元培養法は、幹細胞本来の性質を維持しやすい優れた培養方法であることが知られている。そこで、間葉系幹細胞のスフェロイドを骨再生の細胞源として用いることで、幹細胞性を保った多量の細胞が得られる可能性があると考えた。

これまでのスフェロイド培養には、重力による凝集（ハンギングドロップ法や非接着性の multi well dish）や攪拌などによる機械的スフェロイド形成法が主に使われてきた。これらの方法は効率的であるものの、スフェロイドは常に浮遊しており、また動的培養では細胞の位置は一定しないため、スフェロイド形成過程の詳細を観察することは困難であった。我々は、一定の疎水性を有する培養ディッシュを用いることで、自発的なスフェロイド形成が効率的に起こることを発見し、さらにスフェロイド形成細胞は高い幹細胞性を獲得することを報告した（Tissue Eng Part C Methods. 2018 Sep 20. doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0188.）。このモデルを用いることで、播種された細胞が徐々に集合してスフェロイドを形成する過程の詳細を観察することができる。

これらの研究や他の多くの研究報告から、スフェロイド形成が優れた幹細胞の培養法であることは明らかになりつつあるが、スフェロイド形成のメカニズムや、スフェロイド形成による幹細胞性獲得の分子機構については十分に知られていない。また、今後スフェロイド培養を用いた臨床応用が進むものと考えられるが、それにはスフェロイドについてより基礎的な理解が不可欠と考えるようになった。

## 2. 研究の目的

自発的なスフェロイド形成では、培養中に幹細胞とプレートとの接着が失われ、その一方で他の細胞とは3次元的な接着を起こす。従って細胞のディッシュから剥離によるインテグリン等の接着分子からのシグナルや、細胞同士の接着によっておこる細胞間相互作用がスフェロイド形成や幹細胞性を新たに獲得する脱分化の過程に重要な役割を果たしていると考えられるが、その一連の過程を分子レベルで理解することは重要な研究課題である。そのために本研究では、スフェロイド形成の初期過程の制御機構を時空間的に理解することで、スフェロイド形成による幹細胞性獲得（脱分化）を支える分子基盤を明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究では、我々の開発したスフェロイド培養法を用いることで、以下の研究を行った。

#### (1) スフェロイド形成過程のバイオイメージングと幹細胞性の解析

Tomato 陽性細胞 (LepR-Cre/ Tomato/ Col1(2,3) マウスの骨髄由来間葉系間質細胞) を用いることで、スフェロイド形成過程幹細胞性の獲得についてバイオイメージングにより解析した。Time-Lapse 蛍光顕微鏡でスフェロイド形成されるまでのプロセスを連続的に観察するとともに、SOX2 などの幹細胞マーカーの発現についても解析し、単層培養細胞と比較した。

#### (2) 自発的スフェロイド形成初期における遺伝子発現解析

スフェロイド形成 24 時間後と単層培養細胞から RNA を回収した。RNA-seq 解析により単層培養細胞との遺伝子発現の比較を行った。

#### (3) スフェロイド形成による幹細胞性獲得メカニズムの解明

単層培養細胞との比較で 2 倍以上の変化を示す遺伝子の中で、特に幹細胞性の維持に働く重要な細胞内シグナル系との関連を解析した。

### 4. 研究成果

(1) Tomato 陽性細胞では、間葉系幹細胞マーカーであるレプチンの発現細胞は赤く標識される。自発的スフェロイド形成過程においては、幹細胞 (Tomato 陽性細胞) が増殖・凝集して自発的スフェロイドを形成した。また、自発的スフェロイド中の細胞ほぼすべてがレプチン陽性細胞であった (図 1 A)。自発的スフェロイドでは、単層培養細胞と比較して多能性幹細胞マーカーである Nanog、Sox2、FUT4 (SSEA1) Oct4 (図 1 B)、と、間葉系間質細胞マーカーである Sca-1 (図 1 C) を高発現していた。

(2) 自発的スフェロイドと単層培養細胞との間で発現量に差がある遺伝子について、volcano plot (図 2) に示す (ピンクのドットそれぞれが一つの遺伝子を示す)。現在自発的スフェロイドで高値であった遺伝子群と低値であった遺伝子群についての解析を行っている。

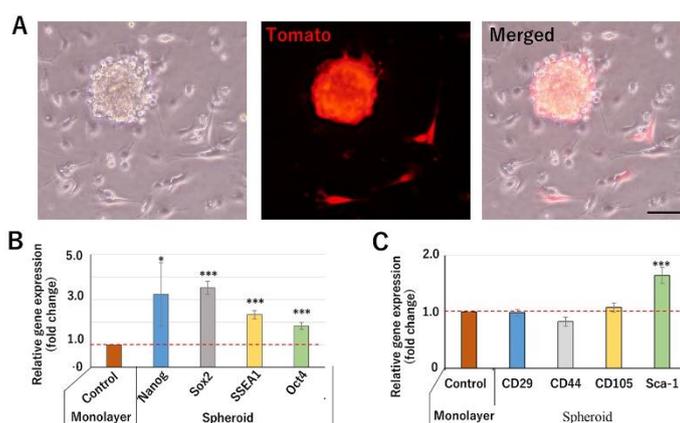


図1. LepR-Cre/ Tomato/ Col1(2,3) マウスの骨髄由来間葉系幹細胞により形成されたスフェロイド。A: スフェロイド中に Tomato 陽性細胞が確認できた。B: 多能性幹細胞マーカーと、C: 間葉系間質細胞マーカーの発現。Scale bar: 50µm; \*p<0.05; \*\*\*p<0.001

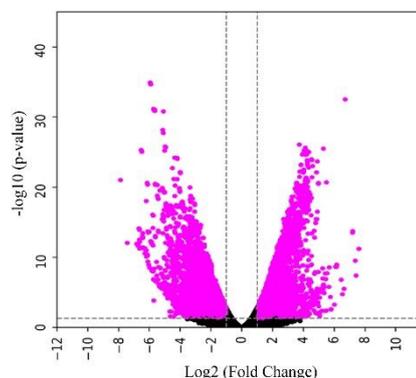


図2. 自発的に形成されたスフェロイドと単層培養細胞の間で変化した遺伝子 (n=3)。

(3) 単層培養細胞と比べ、自発的スフェロイドでは上皮成長因子 (EGF) とインスリン様成長因子 1 (IGF1) の発現が有意に上昇していた ( $\text{Log}_2\text{FC} > 1.5$ ,  $p < 0.001$ )。また、炎症サイトカインである GM-CSF の発現は有意に減少した ( $\text{log}_2\text{FC} < -2.5$ ,  $p < 0.0001$ )。さらに、自発的スフェロイドでは p38 転写因子及びその下流の ETS1 が低発現していたことから、自発的スフェロイドを構成する細胞は細胞増殖能および抗炎症、抗老化 (抗アポトーシス) に優れていることが示唆された (図 3)。

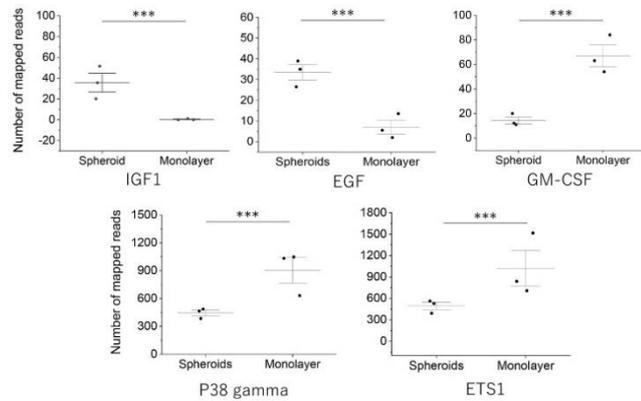


図3. スフェロイドによる成長因子の変化. 自発的スフェロイドでは単層培養細胞と比較して、IGF1とEGFの発現が有意に高く、GM-CSF、P38 gammaおよびETS1の発現が有意に低下していた ( $n = 3$ ). \*\*\* $p < 0.0001$

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 1件）

1. 著者名 Dong H, Li X, Chen K, Li N, Kagami H	4. 巻 27
2. 論文標題 Cryopreserved spontaneous spheroids from compact bone-derived cells as potential ready-to-use products for bone tissue engineering.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Eng Part C Methods.	6. 最初と最後の頁 253 - 263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.tec.2021.0001	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 Li N, Chen K, Dong H, Yang J, Yoshizawa M, Kagami H, Li X	4. 巻 21
2. 論文標題 Alliin inhibits adipocyte differentiation by down-regulating Akt expression: implication for metabolic disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Ther Med	6. 最初と最後の頁 563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2021.9995.	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 Uchikawa E, Yoshizawa M, Li X, Matsumura N, Li N, Chen K, Kagami H	4. 巻 27
2. 論文標題 Tooth transplantation with a $\beta$ -tricalcium phosphate scaffold accelerates bone formation and periodontal tissue regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Dis	6. 最初と最後の頁 1226-1237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13634.	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13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hongwei Dong, Xianqi Li, Kai Chen, Ni Li, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami.
2. 発表標題 Effect of cryopreservation on viability, stemness and osteogenic capability of spontaneous spheroids from mouse compact bone derived cells
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ni Li, Xianqi Li, Kai Chen, Hongwei Dong, Hideaki Kagami.
2. 発表標題 Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村奈穂美、李 憲起、内川恵里、芳澤享子、各務秀明
2. 発表標題 マウス歯牙移植モデルにおいて骨髄単核球細胞が歯周組織再生に及ぼす効果
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内川恵里、李 憲起、松村奈穂美、芳澤享子、各務秀明
2. 発表標題 骨髄由来単核球を用いた歯の移植に関する基礎的研究
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松村 奈穂美, 李 憲起, 内川恵里, 董 宏偉, 芳澤享子, 各務 秀明
2. 発表標題 ティッシュエンジニアリングの併用による移植歯周囲への骨形成促進
3. 学会等名 第65回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kai Chen, Xianqi Li, Ni Li, Hongwei Dong, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami
2. 発表標題 Spontaneously formed spheroids from mouse compact bone-derived cells retain highly potent stem cells with enhanced differentiation capability
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ni Li, Xianqi Li, Kai Chen, Hongwei Dong, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami
2. 発表標題 Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 董 宏偉、李 憲起、陳 凱、李 二;、各務秀明
2. 発表標題 マウス皮膚骨由来幹細胞の生存率および骨形成能に対する凍結保存の影響
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 内川恵里, 芳澤享子, 松村奈穂美, 李憲起, 各務秀明
2. 発表標題 骨再生治療を併用した歯の移植に関する基礎的検討
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村奈穂美、芳澤享子、内川恵里、李 二;、陳 凱、董 宏偉、李 憲起、各務秀明
2. 発表標題 マウス歯牙移植モデルにおける骨髄単核球細胞が歯根膜再生に及ぼす効果
3. 学会等名 第64回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李 憲起、芳澤享子、各務秀明
2. 発表標題 皮膚骨由来細胞から自発的に形成されたスフェロイドによる骨再生
3. 学会等名 第 23 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hongwei Dong, Xianqi Li, Kai Chen, Ni Li, Michiko Yoshizawa, Hideaki Kagami
2. 発表標題 Effect of cryopreservation on viability, stemness and osteogenic capability of spontaneous spheroids from mouse compact bone derived cells
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ni Li, Xianqi Li, Kai Chen, Hongwei Dong, Hideaki Kagami
2. 発表標題 Characterization of spontaneous spheroids from oral mucosa-derived cells and their direct comparison with spheroids from skin-derived cells
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会
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 分担者	各務 秀明  (KAGAMI Hideaki)  (80242866)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授   (33602)	
研究 分担者	溝口 利英  (MIZOGUCHI Toshihide)  (90329475)	東京歯科大学・歯学部・准教授   (32650)	

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