

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19599

研究課題名（和文）ラマン分光sortingの導入による歯根膜シングルセル解析の高機能化

研究課題名（英文）Enhancement of Single Cell Analysis of Periodontal Ligament by Raman Spectroscopy Sorting

研究代表者

竹立 匡秀（Takedachi, Masahide）

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60452447

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ヘテロな細胞集団から構成される歯根膜の特徴を一細胞単位で解明することを目的に、フォトニクス技術とゲノミクス解析を融合した新しいシングルセル解析手法を確立するために研究を遂行した。その結果、骨などの硬組織形成細胞への分化段階を複数のラマンスペクトルの組み合わせによりプロファイリングできる可能性を見出だすとともに、ビーグル犬抜去歯のシングルセル解析条件を明らかにした。一方で、マウス歯根膜分子の発現プロファイル解析から、歯根膜の炎症に特徴的な分子の発現変動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果は、歯周組織の恒常性維持に極めて重要な役割を担う歯根膜を新たな実験手法で解析するための基盤構築につながる。また、歯周組織再生療法の非臨床研究としてゴールドスタンダードとして用いるビーグル犬の歯根膜を対象にシングルセル解析の条件を整備したことは、新しい歯周組織再生療法の開発に際し、作用機序の解明に活用可能な実験手法の樹立につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we conducted studies to establish a new single-cell analysis method that combines photonics technology and genomics analysis, with the aim of elucidating the characteristics of the periodontal ligament, which is composed of a heterogeneous cell population, at the single-cell level. As a result, we discovered the potential to profile the stages of differentiation into hard tissue-forming cells such as osteoblasts by combining multiple Raman spectra. Furthermore, we clarified the conditions for single-cell analysis of extracted teeth from mice and dogs. On the other hand, through the analysis of expression profiles of mouse periodontal ligament, we demonstrated a molecule characteristic of periodontal inflammation.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 ラマン分光法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯根膜は、線維芽細胞や血管内皮細胞に加え、間葉系幹細胞や骨芽細胞、セメント芽細胞の前駆細胞などの未分化な細胞群によって構成され、歯槽骨・歯根膜・セメント質の硬軟組織複合体の恒常性を維持するとともに、歯周組織の再生において極めて重要な役割を果たす。しかしながら、この歯根膜から採取される heterogeneous な細胞群を構成する各細胞種は、特異的な細胞表面抗原や遺伝子の発現等により識別されるには至っておらず、その全貌を明らかにするためにはシングルセルレベルでの解析が必須である。申請者らは、この課題に対し、フォトニクス技術の歯科研究分野への応用に着目し、ラマン分光イメージング技術を *in vitro* における骨芽細胞や歯根膜細胞の分化過程に応用することで、石灰化関連分子である beta-carotene およびヒドロキシアパタイトの集積を非侵襲かつ経時的に single cell レベルで観察することに世界で初めて成功した (A. Hashimoto et al., *J Raman Spectrosc.* 2014, A Hashimoto et al., *Sci Rep* 2015)。

一方、近年のシングルセルゲノミクスの発展は、一細胞から数千個に及ぶ遺伝子の発現プロファイルを解析可能とし、肝臓や腎臓、膵臓など各種臓器を構成する細胞群の heterogeneity に関する統合的理解を推進するだけでなく、組織学的な細胞分類では叶わなかった新規の細胞種を同定するに至っている。また、未分化な細胞が複数の細胞種へ分化する分岐点を決定し、細胞系譜を疑似的に構築することで全身の細胞地図をカタログ化する試みも進められている。しかしながら、亜集団から一細胞ごとに単離することにより、周囲の細胞との空間情報は失われ、RNA-seq を中心とした生化学的な解析手法を用いることはスナップショットの情報のみを取得することになり、時間情報の欠落を伴うことも否めない。このような問題点を解決するために、シングルセルへの単離時にシングルセルレベルでの識別情報を取得し、同情報をもとにシングルセル遺伝子発現の解析結果を亜集団細胞群にフィードバックするプラットフォームの確立が必要である。特に、歯根膜のように構成する各細胞種の分子生物学的特徴がまだ十分に確立されていない場合には、クラスタのアノテーションが困難であるため、シングルセルでの遺伝子発現プロファイルに基づいたクラスタリング後に、クラスタ毎に *in vitro* で細胞機能の詳細について解析することが必須となる。

2. 研究の目的

本研究課題では、歯根膜を構成する heterogeneous な細胞群の特徴解明に、フォトニクス技術とゲノミクス解析を融合したシングルセル解析手法の確立によって挑む。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞分化マーカーラマンスペクトルの決定

歯根膜細胞の分化マーカーラマンスペクトルの決定に先駆け、マウス骨芽細胞の分化過程におけるラマンスペクトラムの解析を行った。すなわち、マウス骨芽細胞 KUSAA1 細胞石英ディッシュ上に播種後、石灰化誘導培地 (10mM beta-glycerophosphate、50ug/ml アスコルビン酸含有培地) にて培養し、7日後のラマンスペクトルの変化を解析した。

(2) 分化能の異なる歯根膜細胞を特徴づけるラマンスペクトラムの探索

(1)にて得られたラマンスペクトラムの情報を分化能の異なる歯根膜細胞の判別に活用可能か否かについて検討した。すなわち、我々がマウス歯根膜から FGF-2 存在下でクローニングし樹立した分化能の高い細胞株と低い細胞株をラマン顕微鏡で観察し、特徴的なラマンピークを探索した。

(3) シングルセル解析のためのビーグル犬歯根膜処理方法の検討

シングルセル解析を行うためにビーグル犬から抜去した前臼歯から歯根膜を回収する方法について検討を行った。すなわち、イヌの抜去歯の歯根表面から機械的に軟組織を剥離する、あるいは抜去歯ごとコラゲナーゼあるいはリペラーゼによって酵素処理することにより細胞懸濁液を作製した。その後 FACS にて 7-AAD、MitoTracker でそれぞれ死細胞、生細胞を染色しシングルセル解析に適した処理方法を検討した。その後シングルセル解析を実施し、アノテーションが可能か否かの検討を行った。

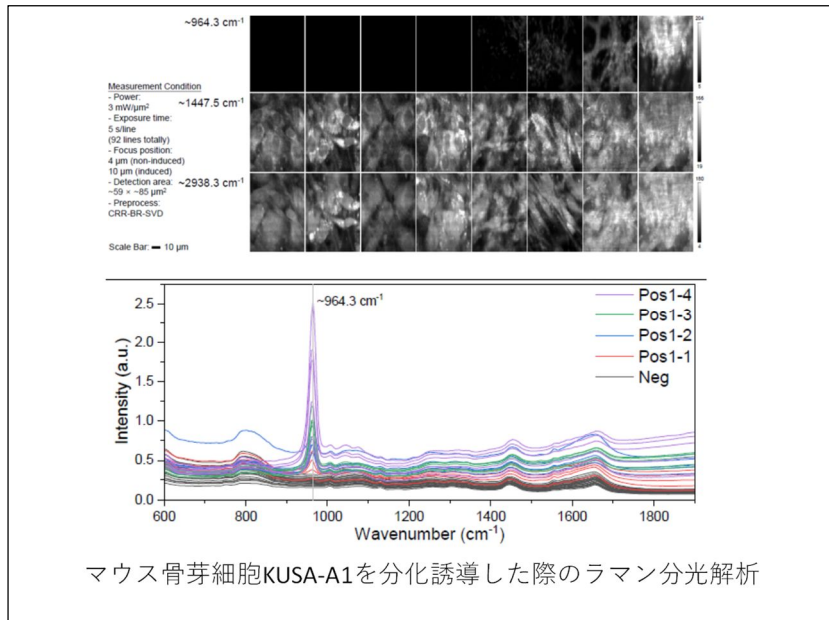
(4) マウス絹糸結紮歯周炎モデルの歯根膜における分子発現解析

絹糸結紮マウス歯周病モデルの歯根膜を対象にプロテオーム解析を行い、炎症マウス歯根膜に発現する分子を解析することで歯根膜 heterogeneity 解明の一助とした。すなわち C57BL/6 マウスの上顎第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮し 7 日後に歯根膜を採取しプロテオーム解析を行った。同解析にて結紮側で発現上昇した myosin-9 に関して *in situ hybridization* および免疫染色により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞分化マーカーラマンスペクトルの探索

マウス骨芽細胞 KUSA-A1 を分化誘導し、骨芽細胞の分化に特異的なラマンスペクトルの変動を検索したが検出に至らなかった。一方で、分化度を違いについて複数のスペクトルの組み合わせでプロファイリング出来る可能性が示唆された。

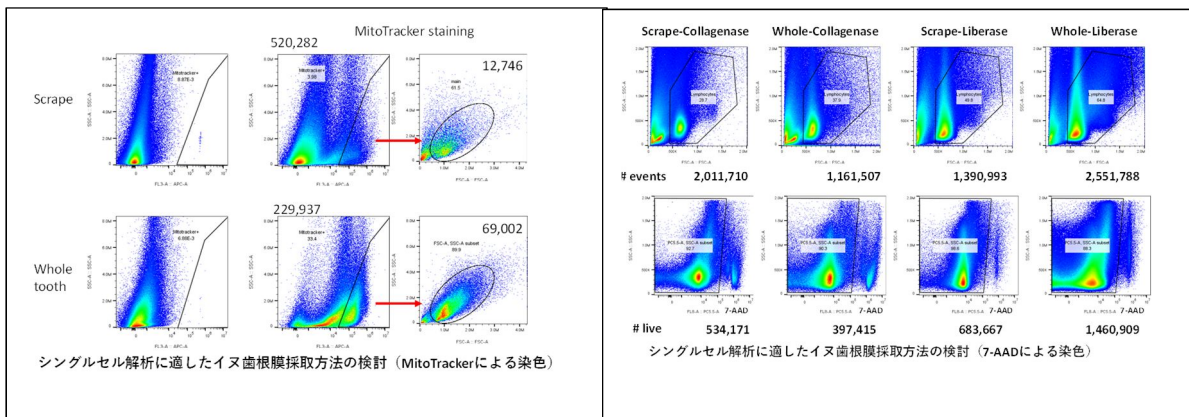


(2) 歯根膜細胞の分化度を特徴づけるラマンスペクトラムの探索

(1)にて得られたプロファイルをもとに硬組織形成細胞への分化能が異なるマウス歯根膜細胞クローンの分化過程におけるラマンスペクトル情報を様々な条件で取得し、分化能を特徴づけるスペクトルの探索を行った。しかしながら分化能の差異を特異的に検出するラマンスペクトルの検出には至らなかった。

(3) シングルセル解析のためのビーグル犬歯根膜処理方法の検討

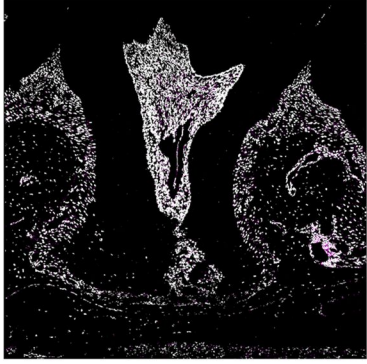
ビーグル犬抜去歯から機械的に軟組織を剥離することなく、そのままリパーゼにて処理することにより、高い回収率にて生細胞が回収可能であることが明らかとなった。また、FACSにて sorting 後にシングルセル解析を行うことによって、ビーグル犬歯根膜のアノテーションが可能であることが明らかとなった。



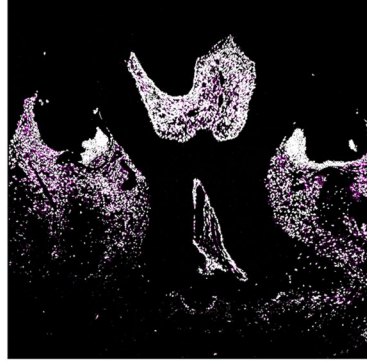
(4) マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおける myosin-9 の発現上昇

絹糸結紮 7 日後の歯根膜を対象としたプロテオーム解析の結果から、コントロール側に比べ myosin-9 の発現が有意にしていることが明らかとなった。顎骨を固定脱灰後にパラフィン切片を作製し、RNAscope を用いた遺伝子発現解析を行った結果、非結紮と比較し結紮側においてより強いシグナルを検出した。また凍結切片を作製し、抗 myosin-9 抗体を用いた免疫染色の結果、非結紮側と比較し結紮側において高い発現を確認した。

非結紮側

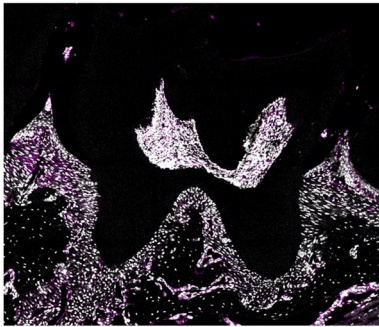


結紮側

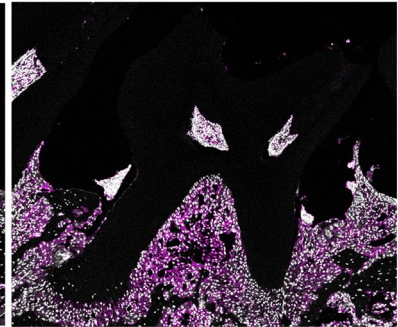


マウス絹糸結紮歯周病モデルにおけるmvosin-9遺伝子の発現

非結紮側



結紮側



マウス絹糸結紮歯周病モデルにおけるmyosin-9分子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	山口 佳則 (Yamaguchi Yoshinori) (20386634)	大阪大学・大学院工学研究科・特任教授 (14401)	
研究分担者	山下 元三 (Yamashita Motozo) (90524984)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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