

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22711

研究課題名(和文) ナノ薄膜技術による3D歯根膜複合体の構築と新規細胞間相互作用解析システムの創出

研究課題名(英文) Fabrication of three-dimensional periodontal ligament tissue with nanometer-sized extracellular matrix films and creation of new system to analyze the cell-cell interaction

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) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ薄膜技術であるLayer-by-Layer法を用いてヒト歯根膜細胞(HPDL)とヒト血管内皮細胞あるいはヒトセメント芽細胞(HCEM)による三次元組織を構築することに成功した。また、HPDLの三次元培養が、同細胞に特徴的に発現するPLAP-1やPOSTN遺伝子の発現を亢進させることが明らかとなった。一方で、細胞間相互作用の解析から、HPDLとHCEMの共培養は、HPDLにIBSP遺伝子の発現を誘導するとともに、HPDLの硬組織形成細胞への分化能が活性化することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノ薄膜コーティング技術であるLbL法を世界で初めて歯科研究領域に取り入れ、歯周組織で最も重要な組織である歯根膜組織の三次元組織構築に成功したことは、今後、歯周病治療薬や歯周組織再生誘導剤の開発に際し、high throughputなスクリーニング方法の確立に向けた第一歩になった。また、細胞間相互作用の解明により新たな歯周組織恒常性維持機構の解明につながる情報が得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We succeeded in fabrication of three-dimensional tissue consisting of human periodontal ligament cells (HPDL) and human vascular endothelial cells or human cementoblasts (HCEM) by using a Layer-by-Layer method. In addition, it has been clarified that three-dimensional culture of HPDL enhanced the expression of PLAP-1 and POSTN genes that are characteristically expressed in HPDL. On the other hand, analysis of cell-cell interactions revealed that co-culture of HPDL and HCEM induced the expression of the IBSP gene in HPDL and stimulated the ability of HPDL to differentiate to hard tissue-forming cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜 LbL法 細胞間相互作用

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

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り構成され、歯根表面、歯槽骨表面にそれぞれ並ぶセメント芽細胞、骨芽細胞と密な連携を取りながら、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、歯周組織の再生過程においても極めて重要な役割を果たす。この歯根膜より採取される heterogeneous な細胞群は、硬組織形成細胞への分化能を有することが様々な *in vitro* 解析から広く知られている。一方、*in vivo* における歯根膜細胞の多様な分化の制御は、周囲の細胞との三次元的な位置関係と、細胞間での分子レベルの相互作用などによって制御を受けるものと考えられるが、その詳細については技術的な制約から全く情報が蓄積されていない。

近年、次世代薄膜コーティング技術として開発された交互積層法 (Layer-by-Layer (LbL) 法)¹⁾ を三次元の生体組織の構築に応用する試みが注目されている。LbL 法はカチオン性高分子とアニオン性高分子をナノオーダーの厚みで制御しながら交互積層する技術であり、元来、光学デバイス等の作製に有用な工学的技術として開発された。明石らは、本技術を細胞工学分野に応用し、フィブロネクチンやゼラチンなどの細胞外基質を細胞表面にナノオーダーの厚みでコーティングすることにより細胞接着を確保したまま生体の立体臓器に近い組織体を創製することを可能にした^{2),3)}。そしてこれまでに、心筋、肝臓、膵臓、皮膚、血管などの一部を *in vitro* で三次元的に組織構築させることに成功し、*in vivo* 同様に臓器の機能解析を行うとともに再生医療への応用についての検討が重ねられてきた⁴⁻⁶⁾。

2. 研究の目的

本研究課題では、ナノ薄層コーティング技術である LbL 法を歯科研究領域に取り入れ、歯根膜組織を生体類似の三次元立体組織として構築し、同組織内における細胞間相互作用を時空間で解析する実験モデルを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) LbL 法による三次元培養

ヒト歯根膜細胞 (HPDL) 単独、HPDL とヒト血管内皮細胞 (HUVEC)、HPDL とヒトセメント芽細胞 (HCEM) の組み合わせによる三次元組織を LbL 法にて構築した。すなわち、それぞれの細胞懸濁液をフィブロネクチン溶液とゼラチン溶液に交互に作用させ、6-10nm 程度の厚みとなる細胞外基質薄膜を細胞表面に形成後、多孔質膜を介して組織の下部から培地を供給できるトランズウェルシステムのカルチャーインサートに播種、培養することにより三次元組織体を構築した。

(2) 三次元組織の解析

組織学的解析：(1)にて構築した三次元組織を中性ホルマリンにて固定後、8 μ m のパラフィン切片を作製し、HE 染色および TUNEL 染色することで組織学的に解析を行った。さらに、同薄切切片を用いて好感度 ISH である RNA Scope にて遺伝子発現解析を行った。

三次元イメージング解析：レンチウイルスを用いて GFP 遺伝子を導入した HPDL を用いて三次元組織を構築した。さらに、組織構築後に 4%PFA にて固定後、抗 CD31 抗体を用いて whole mount の免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて三次元的な観察を行った。

遺伝子発現解析：LbL 法にて構築した三次元組織から全 RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を作製後、同 DNA を鋳型とし各遺伝子に特異的なプライマーを用いて real-time PCR を行った。

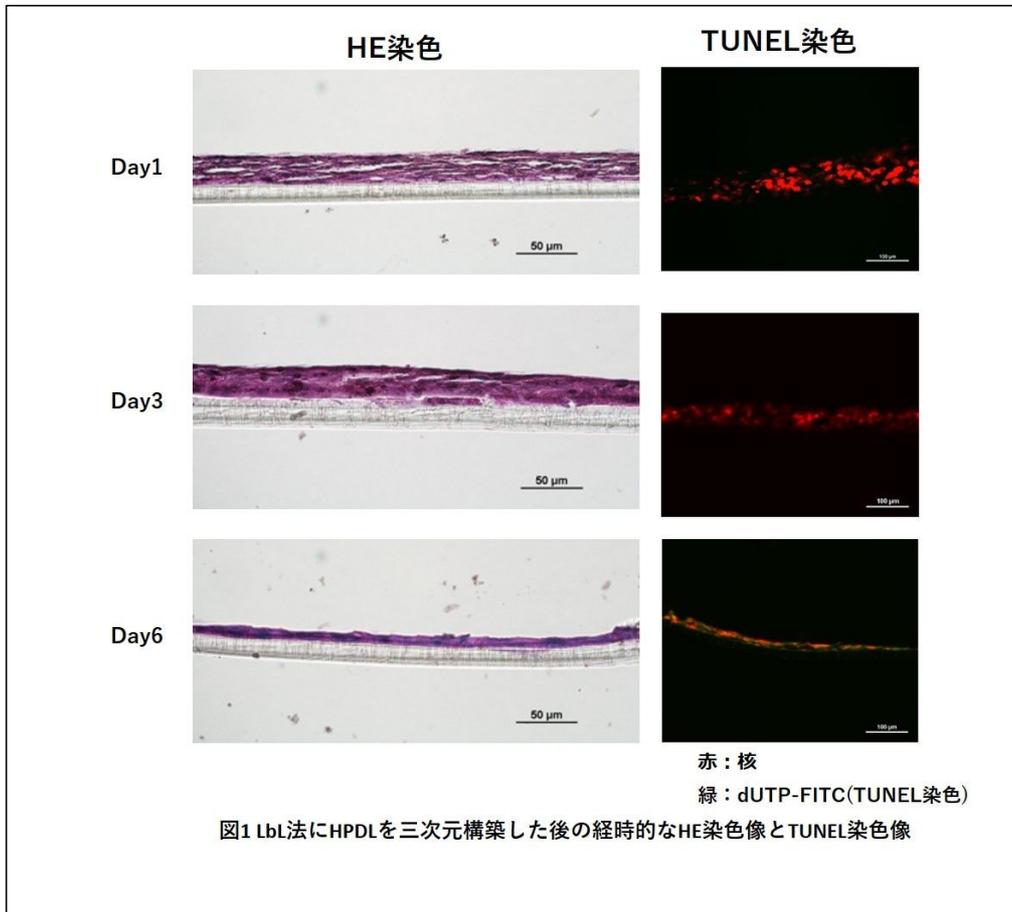
(3) 細胞間相互作用に関する解析

HPDL と HCEM を 1:1 の割合で混合し、培養皿に播種し、24 時間の培養後、両細胞を回収した。その後 HPDL のみをソーティングし、同細胞に発現する遺伝子発現を解析した。またソーティングした HPDL をアスコルビン酸、ベータグリセロリン酸を含有した石灰化誘導培地で培養し、アリザリン染色を行うことにより硬組織形成細胞への分化能を評価した。

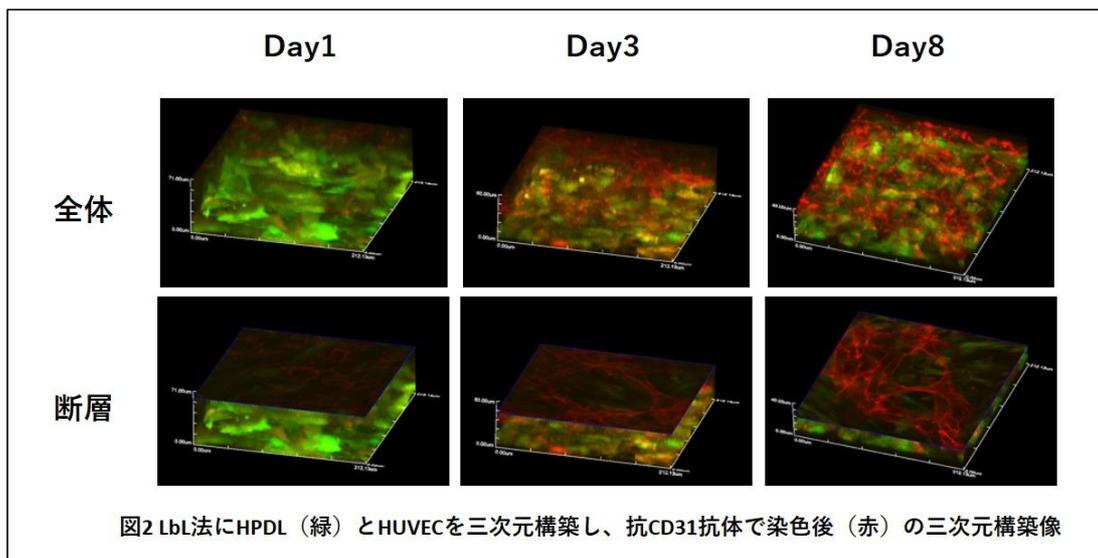
4. 研究成果

(1) LbL 法によるヒト歯根膜細胞を用いた三次元組織の構築

1x10⁶ 個の HPDL を LbL 法にて処理後 96 well 相当のカルチャーインサートに播種し、経時的な組織の厚みについて組織学的な解析を行った。その結果、播種 1 日後において、約 10 層程度の三次元組織が構築され、播種 3 日後まで同組織の厚みが維持されることが明らかとなった。播種 4 日目以降は組織内に TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が検出され、三次元組織が菲薄化することが明らかとなった (図 1)。



そこで、LbL法にて処理したHPDL 1×10^6 に対しHUVEC 1×10^5 を混和し播種したところ、播種三日後以降も組織の菲薄化は改善する傾向が見られた。また、GFP標識したHPDLと未標識のHUVECを用いて構築した三次元組織を抗CD31抗体で染色した結果、組織内に血管の管腔様の構造物が形成されていることが明らかとなった(図2)。

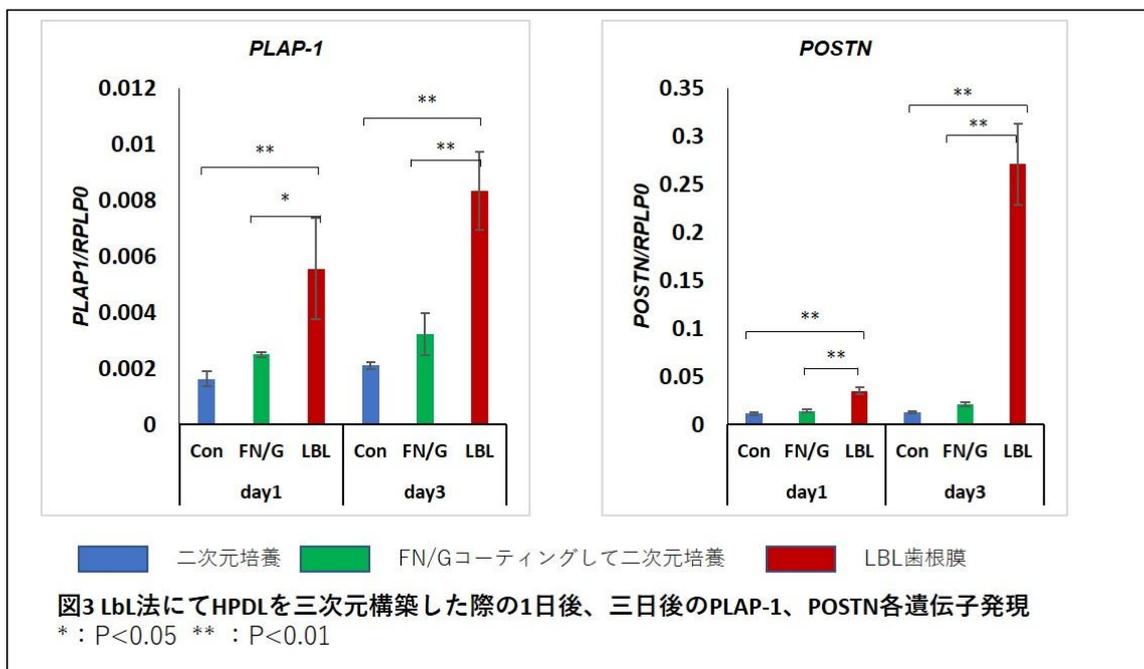


(2) ヒト歯根膜細胞の三次元培養が遺伝子発現に及ぼす影響の解析

LbL法にて三次元培養した際に、HPDLの遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。すなわち、LbL法にて処理したHPDLを播種し、1日後と3日後に、組織全体からRNAを回収し、歯根膜関連遺伝子であるPLAP-1およびPOSTNの発現をRT-PCR法にて検討した。その結果、LbL法にて処理した後に二次元培養を行った場合と比べ、同上遺伝子の発現は播種1日後、3日後で有意に上昇することが明らかとなった(図3)。

また、PLAP-1と同じsmall leucine rich repeat protein type IIに分類されるBGN、DCNも

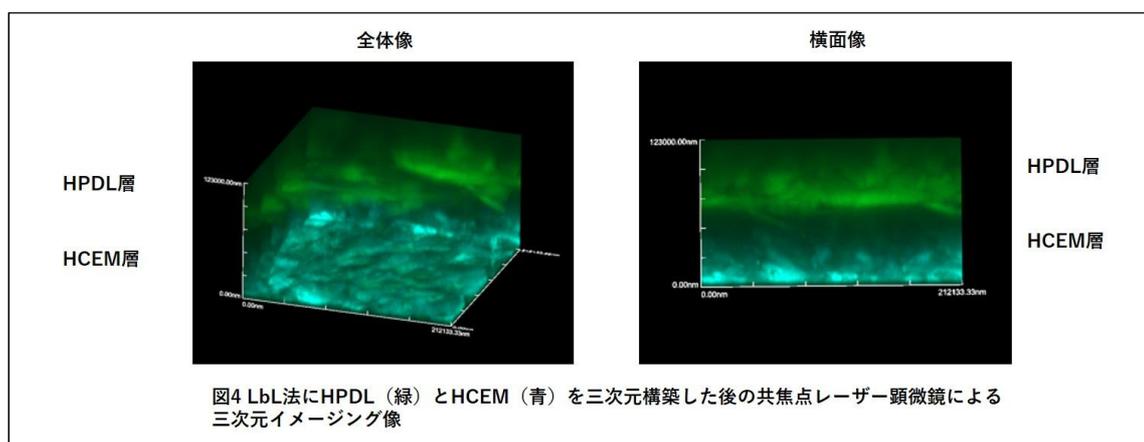
PLAP-1 同様にその発現が有意に上昇していることが明らかとなる一方、コラーゲン遺伝子については、COL3A1 は平面培養に比べ有意に上昇する一方、COL1A1 発現は有意に低下することが明らかとなった。



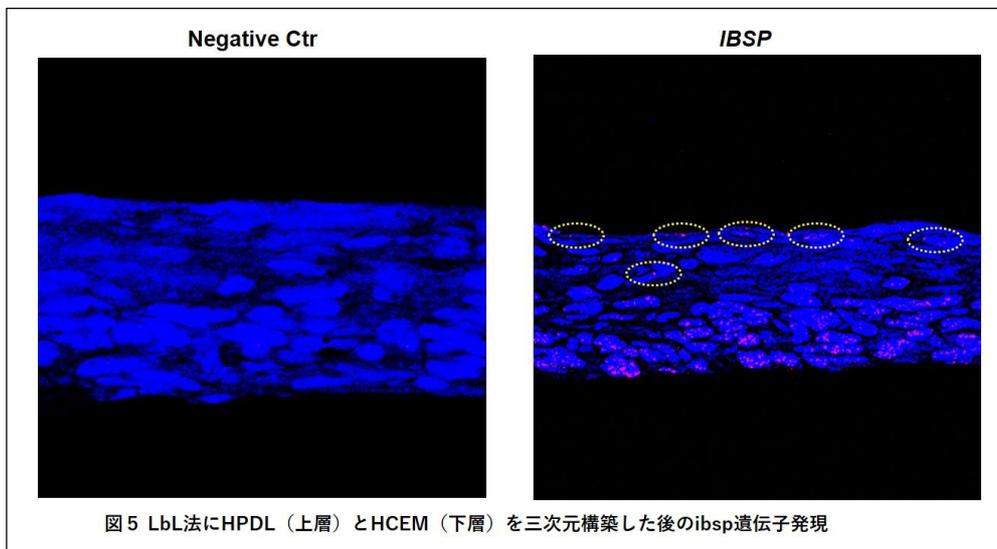
(3) ヒト歯根膜細胞とヒトセメント芽細胞の細胞間相互作用に関する解析

HPDL と HCEM との細胞間相互作用に関して蛍光標識した両細胞の単層共培養実験系で解析を行った。すなわち、両細胞を 1:1 の比率で混合し、培養皿に播種し、24 時間後に HPDL のみをソーティングし、その遺伝子発現や硬組織形成細胞への分化能について検討を行った。その結果、HCEM と共培養を行う前には HPDL にほとんど発現が認められなかった *ibsp* 遺伝子発現が HCEM との共培養後に発現することが明らかとなった。なお、トランズウェルを用いた非接触共培養では同発現は認められなかった。またソーティング後に再培養し、石灰化誘導培地を用いて分化誘導したところ、非共培養の HPDL に比べ顕著な石灰化ノジュール形成能を示した。

そこで次に HPDL、HCEM にそれぞれレンチウイルスを用いて GFP、TagBFP を導入し、LbL 法を用いて三次元組織を構築し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。その結果、組織構築後、3 日後までに HPDL 層と HCEM 層で境界明瞭な界面を形成した三次元組織を維持し続けることが明らかとなった (図 4)。



そして同三次元組織の界面における ibsp 遺伝子発現を ISH 法にて検討したが、HPDL 層での ibsp 遺伝子発現は HCEM との界面のみならず HCEM との直接的接着のない部位にも認められた (図 5)。



< 引用文献 >

1. G. Decher, *Science* 1997
2. M. Matsusaki et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007
3. A. Nishiguchi et al., *Adv. Mater.* 2011
4. Y. Amano et al., *Acta Biomater.* 2016
5. K. Sasaki et al., *Biomaterials* 2017
6. T. Akagi et al., *Tissue Eng. Part A.* 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morimoto Chiaki, Takedachi Masahide, Kawasaki Kohsuke, Shimomura Junpei, Murata Mari, Hirai Asae, Kawakami Kazuma, Sawada Keigo, Iwayama Tomoaki, Murakami Shinya	4. 巻 -
2. 論文標題 Hypoxia stimulates collagen hydroxylation in gingival fibroblasts and periodontal ligament cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	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） 10.1002/JPER.20-0670	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下村純平、竹立匡秀、沢田啓吾、森本千晶、平井麻絵、川崎公輔、村田真里、村上伸也
2. 発表標題 LBL法による三次元歯根膜組織の構築
3. 学会等名 第151回秋季歯科保存学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下村純平、竹立匡秀、沢田啓吾、森本千晶、平井麻絵、川崎公輔、村田真里、河上和馬、岩山智明、藤原千春、村上伸也
2. 発表標題 セメント芽細胞が歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第153回秋季歯科保存学会
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	北村 正博 (Kitamura Masahiro) (10243247)	大阪大学・歯学研究科・准教授 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三木 康史 (Miki Kouji) (10598395)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	
研究分担者	明石 満 (Akashi Mitsuru) (20145460)	大阪大学・生命機能研究科・特任教授（常勤） (14401)	
研究分担者	山口 佳則 (Yamaguchi Yoshinori) (20386634)	大阪大学・工学研究科・招へい教授 (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