

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09936

研究課題名（和文）細胞間三次元ネットワークによるTrophic効果増強シグナルの解明

研究課題名（英文）Evaluation of trophic factor activated by 3D intracellular networks.

研究代表者

沢田 啓吾（Sawada, Keigo）

大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員

研究者番号：70733054

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、間葉系幹細胞移植による三次元的歯周組織再生効果におけるTrophic効果の解明を目指し、脂肪組織由来幹細胞(ADSC)および歯根膜細胞(HPDL)を用いてLbL(Layer-by-Layer)法による三次元組織を作成し解析を行った。ADSCを三次元組織化することで硬組織関連遺伝子の発現上昇を認め、HPDLを三次元組織化することで炎症反応や血管新生等の組織再生に關与する遺伝子群の発現上昇を認めた。これらの結果から、移植された間葉系幹細胞および歯周組織構成細胞は生体内においてTrophic因子の発現を調節することで歯周組織再生を誘導する機序の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで明らかにされてこなかった間葉系幹細胞移植による三次元的歯周組織再生におけるTrophic効果の關与を明らかにした。本研究結果から、生体内を模倣した三次元環境において、脂肪組織由来間葉系幹細胞および歯根膜細胞がTrophic因子の発現を調節することで組織再生を誘導している可能性が示唆された。これらの知見は、今後の間葉系幹細胞移植による組織再生機序の解明に寄与するものであり、本研究成果は重要な学術的意義および社会的意義を有するものと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, to reveal the trophic effect of stem cell transplantation on three-dimensional periodontal tissue regeneration, we created three-dimensional tissue using adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) and periodontal ligament cells (HPDLs) by the layer-by-layer (LbL) method and analyzed the results. The expression of genes involved in tissue regeneration, such as inflammatory response and angiogenesis, was upregulated in the three-dimensional tissue of ADSCs. These results suggest that transplanted mesenchymal stem cells and periodontal tissue component cells induce periodontal tissue regeneration by regulating the expression of trophic factors in vivo.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯根膜細胞 脂肪組織由来間葉系幹細胞 LbL(Layer-by-Layer)法 Trophic効果

1. 研究開始当初の背景

細胞移植による歯周組織再生効果には、幹細胞が出す液性因子による組織再生誘導効果 (Trophic 効果) が重要な役割を果たしている。申請者らは、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) の歯周組織における Trophic 効果を *in vitro* の二次元培養系にて明らかにしてきた。一方で、細胞移植による歯周組織療法においては、移植された幹細胞が立体的・三次元ネットワークを構成し、血管内皮細胞や歯周組織構成細胞と Trophic 因子を介した細胞間情報伝達を行うことで、組織再生が誘導されると考えられる。近年、様々な生体組織の三次元的解析手法として、生体を模倣したオルガノイドが用いられている。そこで、本研究では、幹細胞移植による三次元的組織再生誘導における Trophic 効果の解明を目指し、脂肪幹細胞の移植体および生体歯周組織を模倣したオルガノイドを LbL (Layer-by-Layer) 法で作製し、ADSC および歯根膜細胞 (HPDL) の三次元組織が分泌する Trophic 因子について解析する。本研究の成果より、ADSC 移植による歯周組織再生療法の有効性の向上に繋がる基盤情報が得られるものと考えている。

2. 研究の目的

近年、幹細胞の Trophic 効果が注目されているが、申請者らは、ADSC が分泌する IGFBP6 や Semaphorin7a が歯周組織再生誘導に関与することを報告してきた。しかしながら、近年の三次元培養を用いた研究から、実際の生体内環境下では、移植された ADSC は三次元的足場材の中で、二次元的環境下とは異なる Trophic 因子の分泌を行っていることが想定される。今後、より詳細に ADSC の Trophic 効果を明らかにするためには、生体内環境を模倣した三次元的空間で ADSC の解析を行うことが必要である。本研究では、従来の三次元培養よりも、細胞の立体構築や細胞の物理的ストレス回避の点で有用である LbL-三次元組織モデルを用いて、ADSC と HPDL の三次元組織体を構築し、ADSC および HPDL の三次元組織が分泌する Trophic 因子について解析する。

3. 研究の方法

本研究では、脂肪組織由来間葉系幹細胞 (ADSC) および歯根膜細胞 (HPDL) が分泌する組織再生誘導因子 (Trophic 因子) の中でも、特に LbL (Layer-by-Layer) 法を用いた三次元培養を行うことで増強される因子を同定する。

(1) 三次元組織化 ADSC における Trophic 因子の解析

まず、ADSC を用いて二次元組織体および三次元組織体の作製を行った。すなわち、ADSC に Fibronectin および Gelatin で LbL 処理を行い、細胞に薄膜層を形成した後、24well トランズウェルインサートに播種した。LbL 処理を行った群を LbL (+) 3D-ADSC、LbL 処理を行っていないものを LbL (-) 3D-ADSC として 48 時間培養した。さらに、三次元組織体と同じ細胞数の ADSC を 6well セルカルチャープレートに播種したものを二次元組織体 (2D-ADSC) として 48 時間培養した。各組織体から total RNA を回収し、LbL 処理の有無および二次元培養/三次元培養が、ADSC の Trophic 因子関連遺伝子の発現に如何なる影響を与えるかについて解析した。

(2) 三次元組織化 HPDL における Trophic 因子の解析

(1) と同様の方法を用いて、LbL 処理を行わない二次元組織体 (LbL (-) 2D-HPDL)、LbL 処理を行った二次元組織体 (LbL (+) 2D-HPDL)、LbL 処理を行わない三次元組織体 (LbL (+) 3D-HPDL)、LbL 処理を行った三次元組織体 (LbL (+) 3D-HPDL) を作製し、各組織体の Trophic 因子の遺伝子発現プロファイルについて解析した。すなわち、各組織体から total RNA を回収し、次世代シーケンサーによる遺伝子発現の網羅解析を行った。解析方法としては、主成分分析、階層クラスタリング解析および Gene Ontology (GO) 解析を行い、二次元培養および三次元培養が、HPDL の Trophic 因子関連遺伝子の発現に如何なる影響を与えるかについて解析した。

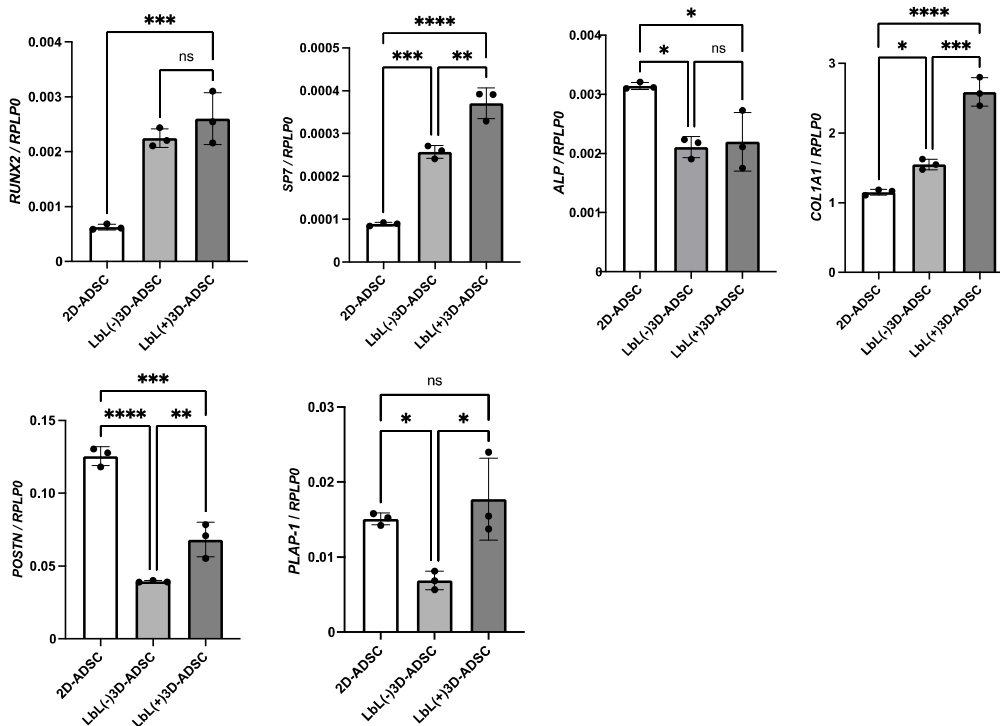
4. 研究成果

(1) 三次元組織化 ADSC における Trophic 因子の解析

上記の方法に従って解析を行った結果、LbL (+) 3D-ADSC は LbL (-) 3D-ADSC と比べて、*SP7*, *COL1A1*, *POSTN*, *PLAP-1* の有意な発現上昇を認めた。LbL (+) 3D-ADSC は 2D-ADSC と比べて、*RUNX2*, *SP7*, *COL1A1* の有意な発現上昇を認め、*ALP*, *POSTN*, *PLAP-1* の有意な発現低下を認めた。

以上の結果より、LbL 処理を行うことで細胞外基質関連遺伝子および歯根膜関連遺伝子の発現が上昇すること、三次元培養を行うことで硬組織形成関連遺伝子の発現が上昇し、歯根膜関連の遺伝子発現が低下することが明らかとなった。これらのことから、LbL 処理や三次元培養を行うことで ADSC における Trophic 因子関連遺伝子の発現が変化し、ADSC の分化が制御されている可能性が示唆された。

図 1. 三次元組織化 ADSC における Trophic 因子関連遺伝子の解析



(2) 三次元組織化 HPDL における Trophic 因子の解析

上記の方法に従って解析を行った結果、主成分分析により上記の 4 群のサンプル間で乖離を認めた。二次元組織体の 2 群のサンプルは近傍に位置していたが、二次元組織体と三次元組織体は顕著な乖離を認め、さらに LbL(-)3D-HPDL と LbL(+)-3D-HPDL も顕著な乖離を認めた。また、階層クラスタリング解析により、各サンプルのクラスターの分離を認め、主成分分析と同様の傾向が認められた。これらの結果から、培養環境の三次元化および LbL 処理が HPDL の遺伝子発現プロファイルを変化させることが明らかとなり、特に三次元培養においては LbL 処理が顕著な影響を与えることが明らかとなった。また、GO 解析の結果から、LbL(+)-3D-HPDL は LbL(+)-2D-HPDL と比較して、炎症反応、血管新生、低酸素応答関連の遺伝子発現上昇を認めた。その一方で、細胞外基質産生、細胞分化、細胞接着関連の遺伝子発現低下を認めた。

以上の結果から、歯根膜細胞を LbL 法で三次元培養することで遺伝子発現プロファイルが顕著に変化すること、さらに組織再生に関与する炎症反応および血管新生等の遺伝子発現が上昇することが明らかとなった。

図 2. 3D-HPDL で発現上昇を認めた遺伝子群

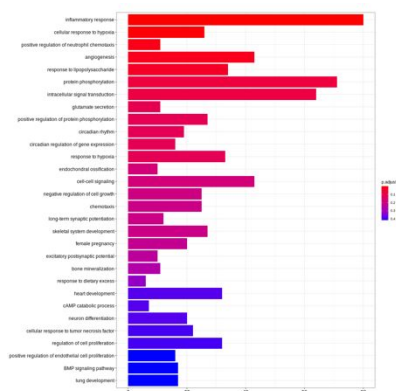
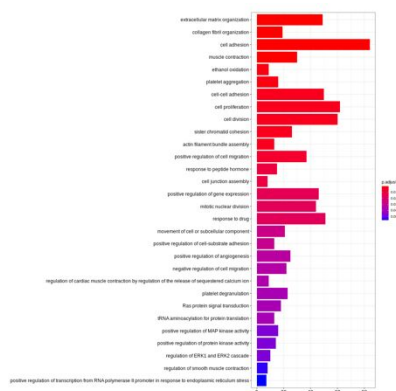


図 3. 3D-HPDL で発現低下を認めた遺伝子群



<結論>

本研究では、幹細胞移植による三次元的歯周組織再生効果における Trophic 効果の解明を目指し、ADSC および HPDL を用いて LbL(Layer-by-Layer)法による三次元的組織を作成し解析を行った。本研究結果から、ADSC および HPDL は生体内を模倣した三次元環境において、Trophic 因子の発現を調節することで、組織再生を誘導している可能性が示唆された。

本研究は、「三次元的空間における Trophic 効果の解析」という点で学術的独自性が高く、国内外における研究での報告が無いことから、学術的インパクトが高いと考えている。

今後、ADSC および HPDL の複合的三次元組織体の作製を行い、これらの細胞・組織間相互作用について解析を加えることで、幹細胞と歯周組織構成細胞の三次元的な動的挙動および幹細胞の三次元的空間における Trophic 効果の中心を担うシグナル経路を明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川寄公輔、竹立匡秀、沢田啓吾、下村純平、村田真里、河上和馬、三木康史、竹下登、佐倉千萬、松山晃文、大倉 華雪、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 幹細胞移植による歯周組織再生療法における炭酸アパタイトの足場材としての有効性の検証
3. 学会等名 第65回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川寄公輔、竹立匡秀、沢田啓吾、下村純平、村田真里、河上和馬、三木康史、竹下登、佐倉千萬、松山晃文、大倉 華雪、北村正博、村上伸也
2. 発表標題 炭酸アパタイトを足場材とした脂肪組織由来多系統前駆細胞の自己移植による歯周組織再生効果
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川寄公輔、竹立匡秀、山本智美、森本千晶、平井麻絵、下村純平、村田真理、河上和馬、沢田啓吾、村上伸也
2. 発表標題 PLAP-1による低酸素誘導因子HIFの活性制御
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会(第153回)
4. 発表年 2020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、川寄公輔、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 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会(第153回)
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	三木 康史 (Miki Koji) (10598395)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	
研究 分担者	竹立 匡秀 (Takedachi Masahide) (60452447)	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
---------	---------