

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17045

研究課題名(和文)幹細胞のTrophic効果におけるSemaphorin7aの役割の解明

研究課題名(英文)The role of Semaphorin7a in the trophic effect of stem cells

研究代表者

沢田 啓吾 (Sawada, Keigo)

大阪大学・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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)が分泌するSemaphorinファミリー分子の一つであるSemaphorin7aがヒト歯根膜細胞(HPDL)の細胞機能に与える影響について解析を行った。まず、Semaphorin7aがHPDLの細胞増殖能・遊走能に影響を与えるか検討したところ、HPDLの増殖能を促進したが、遊走能には影響を与えなかった。次に、Semaphorin7aがHPDLの硬組織形成細胞への分化能に影響を与えるか検討したところ、HPDLの硬組織関連遺伝子の発現上昇を認めた。これらの結果から、Semaphorin7aが歯根膜細胞の細胞機能を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

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が分泌するSemaphorin7aによる歯周組織の細胞機能に与える役割を明らかにした。この結果から、ADMPC由来のTrophic因子による歯周組織再生誘導機序の一端が明らかになり、特に間葉系幹細胞由来のSemaphorin7aが組織再生へ与える効果が明らかとなった。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と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this work, we analyzed the effects of Semaphorin7a, a Semaphorin family molecule secreted by adipose tissue-derived multisystemic progenitor cells (ADMPCs), on the cellular function of human periodontal pulp cells (HPDLs). First, we examined whether Semaphorin7a affected the cell proliferation and migration ability of HPDL, and found that recombinant Semaphorin7a promoted the cell proliferation ability of HPDL but did not affect cell migration ability. Next, we examined whether Semaphorin7a affected the differentiation potential of HPDL and found that recombinant Semaphorin7a up-regulated the expression of hard tissue formation-related genes in HPDL. These results indicate that Semaphorin7a activates the cellular function of periodontal cells.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病 歯周組織再生 間葉系幹細胞 Trophic効果 Semaphorin7a

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、臨床応用されている歯周組織再生療法は、主に歯周組織に内在する体性幹細胞を活性化することにより、歯周組織の再生誘導を図る治療法である。しかしながら、このような組織内在性の幹細胞数は加齢とともに減少し、その増殖能や分化能も低下することが知られている。そこで、他の組織より採取した幹細胞を歯周組織欠損部へ移植することで、歯周組織再生を誘導することが高齢者や重度歯周炎患者において有用と考えられる。申請者らは、犬実験的歯周病モデルにおいて、間葉系幹細胞の一つである脂肪組織由来多系統前駆細胞 (ADMP: Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cell) を歯周組織欠損部位に移植することで、その組織再生誘導効果を明らかにしてきた。

間葉系幹細胞移植による再生誘導メカニズムは、移植された幹細胞自身が組織を構成する細胞へと分化する Repair 効果と、幹細胞が出す液性因子により組織を構成する細胞を活性化することで組織再生を誘導する Trophic 効果があり、近年の研究により、Trophic 効果が組織再生において炎症反応・創傷治癒を制御し、組織再生の中心的な役割を担うことが報告されている。しかしながら、どのような Trophic 因子が組織再生に寄与するかについて、未だその分子メカニズムについて詳細な情報が無く、その解明が待たれている。また、歯周組織再生誘導効果を有する ADMP も多様な Trophic 因子を産生することが確認されており、その中から歯周組織再生誘導の中心的役割を担う「再生の鍵分子」を見出すことができれば、ADMP 移植療法の作用機序解明のみならず、新規歯周組織再生療法の開発にもつながる情報が得られると考えられる。これまでに申請者は、ADMP が分泌する Trophic 因子の中の成長因子に着目し、サイトカインアレイを用いた解析結果より、ADMP 由来の Insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6) がヒト歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御することを明らかにしてきた (Sawada et al, 2016, BBRC)。

ADMP は、従来の脂肪組織由来間葉系幹細胞の単離方法を改良して採取された細胞であり、従来の脂肪組織由来間葉系幹細胞と細胞表面抗原のプロファイルが異なることから、ADMP は旧来の脂肪組織由来間葉系幹細胞とは異なるプロファイルの Trophic 因子を分泌しているものと考えられる。さらに、近年のプロテオミクス解析の技術の進歩により、従来の方法では検出できなかったタンパク質も検出可能となる網羅的タンパク質解析が可能となってきている。そこで、申請者は ADMP と脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いて、網羅的プロテオーム解析を予備実験として行い、ADMP で特異的に発現しているタンパク質の同定を試みた。その結果、Semaphorin7a が特異的に高い発現を示すことが明らかとなった。

Semaphorin7a は神経ガイダンス因子として発見された Semaphorin family の一分子であり、その役割として、神経系での機能だけでなく、全身において様々な機能を持つことが報告されている。硬組織関連の研究では、骨芽細胞・破骨細胞の分化を制御することが報告されている。前述の様に、間葉系幹細胞移植による組織再生においては、移植された幹細胞が出す Trophic 因子が、組織を構成する細胞群の細胞機能 (増殖能・遊走能・分化能等) を賦活化する Trophic 効果が重要である。これらのことから、ADMP が分泌する Semaphorin7a が歯周組織においても、歯周組織構成細胞の細胞機能を活性化することで、歯周組織再生を誘導していることが想定される。

そこで、本研究では ADMP 移植による歯周組織再生誘導の機序として、ADMP が産生する Trophic 因子の一つである Semaphorin7a が歯周組織構成細胞の増殖・遊走・硬組織形成細胞への分化といった細胞機能を制御することで組織再生を誘導することにより、歯周組織再生に寄与しているのではないかという作業仮説を立案した。

### 2. 研究の目的

本研究では、ADMP における Semaphorin7a の発現および ADMP の細胞機能との関連について解析する。また、Semaphorin7a がヒト歯根膜細胞 (HPDL) の細胞機能に及ぼす影響を与えるかについて解析する。本研究の知見より、ADMP 由来の Semaphorin7a による歯周組織再生効果の分子機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 間葉系幹細胞における Semaphorin7a の発現解析

間葉系幹細胞における Semaphorin7a の発現について、プロテオミクス解析を用いて解析を行った。すなわち、10cm dish に ADMP、骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSC)、皮膚線維芽細胞 (Fibroblast) を播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行った後、無血清培地を添加し、3日間培養を行った。同培養上清を回収し、それぞれ ADMP-CM、BMSC-CM、FIB-CM とした。これらの培養上清をショットガンプロテオミクス解析することで、各細胞における Semaphorin7a の発現について検討を行った。また、当研究室で保有しているヒト皮下脂肪組織より単離した 4 系統の ADMP を用いて、上記と同様の方法で培養上清を回収し、各細胞の細胞機能と Semaphorin7a の発現の関連について、解析を行った。

#### (2) Semaphorin7a が HPDL の増殖に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の増殖能に及ぼす影響について解析を行った。すなわち、96well マルチ

プレートに  $2.5 \times 10^3$  個の HPDL を播種し、 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g/ml}$  のリコンビナント Semaphorin7a で 48 時間刺激した。細胞数は Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を用いて、450nm の吸光度をマイクロプレート分光光度計にて測定することで解析した。

#### (3) Semaphorin7a が HPDL の遊走に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の遊走能に及ぼす影響について Wound Healing Assay を用いて解析を行った。すなわち、12well マルチプレートに Wound Healing Assay インサートを設置し、 $1 \times 10^5$  個の HPDL を播種した。12 時間後にインサートを除去し、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ 、 $1.0 \mu\text{g/ml}$  のリコンビナント Semaphorin7a で 24 時間刺激した。その後、クリスタルバイオレット溶液で染色を行い、インサート除去部への細胞遊走を倒立顕微鏡にて写真撮影を行うことで評価した。

#### (4) Semaphorin7a が HPDL の硬組織形成細胞への分化能に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の硬組織形成細胞への分化能に及ぼす影響について解析を行った。すなわち、12well マルチプレートに  $1 \times 10^5$  個の HPDL を播種し、3 日間培養した後に、石灰化誘導培地に交換を行い、試験群にはリコンビナント Semaphorin7a  $0.4 \mu\text{g/ml}$  を添加して、長期培養を行った。14 日後に全 RNA を抽出した後に、逆転写反応を行い、置換された cDNA を定量的リアルタイム PCR に用いて、硬組織関連遺伝子の発現について解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) 間葉系幹細胞および歯周組織構成細胞における Semaphorin7a の発現解析

各間葉系幹細胞の培養上清における Semaphorin7a の発現についてショットガンプロテオミクス解析を行った。その結果、ADMPC-CM と BMSC-CM において、Semaphorin7a の発現が認められ、ADSC-CM と FIB-CM では Semaphorin7a の発現が認められなかった。

また、各培養上清における Semaphorin7a の発現を比較したところ、ADMPC は BMSC と比較して 13.6 倍の発現を認めた。次に、上記のヒト脂肪組織由来の 4 系統の ADMPC を用いて、プロテオミクス解析により、Semaphorin7a の発現を検討した。その結果、全ての ADMPC において Semaphorin7a の発現が確認された。さらに、ADMPC の細胞増殖能と Semaphorin7a の発現について、上記の 4 系統の ADMPC を用いて解析を行ったところ、増殖率が高い ADMPC において Semaphorin7a の発現量が低く、増殖率が低い ADMPC において Semaphorin7a が高い傾向が認められた。これらの結果から、ADMPC は他の間葉系幹細胞よりも多くの Semaphorin7a を発現していることが明らかとなり、その発現量と ADMPC の細胞増殖能との関連性が示唆された。

#### (2) Semaphorin7a が HPDL の増殖に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の増殖へ与える影響について解析を行った。上記の研究の方法に従って細胞を播種し、対数増殖期の 48 時間後に比色蛍光法にて細胞数を計測した。図 1 に示すように、対照群 ( $0 \mu\text{g/ml}$ ) と比較して、 $0.1 \mu\text{g/ml}$  および  $1.0 \mu\text{g/ml}$  では細胞数の増加が認められ、さらに  $1.0 \mu\text{g/ml}$  では有意な細胞数増加が認められた。このことから、Semaphorin7a が歯根膜細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

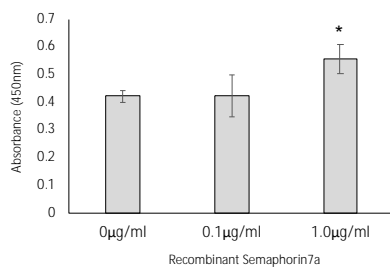


図 1. リコンビナント Semaphorin7a 添加時における HPDL の増殖能の検討

#### (3) Semaphorin7a が HPDL の遊走に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の遊走へ与える影響について解析を行った。上記の研究の方法に記載した手法に従って Wound Healing Assay を行い、24 時間後に細胞の遊走状態を観察した。図 2 に示すように、対照群 ( $0 \mu\text{g/ml}$ ) と比較して、 $0.2 \mu\text{g/ml}$  および  $1.0 \mu\text{g/ml}$  では HPDL の遊走状態において、顕著な差は認められなかった。このことから、Semaphorin7a は歯根膜細胞の遊走に影響を与えないことが明らかとなった。

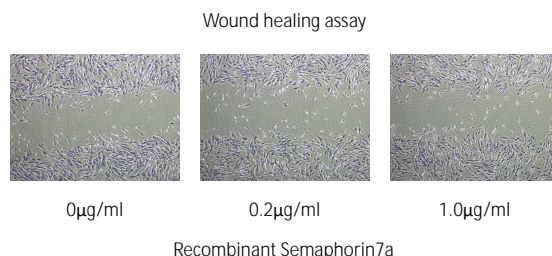


図 2. リコンビナント Semaphorin7a 添加時における HPDL の遊走能の検討

#### (4) Semaphorin7a が HPDL の硬組織形成細胞への分化能に与える影響の解析

Semaphorin7a が HPDL の硬組織形成細胞への分化に与える影響について解析を行った。図 3 に示すように、石灰化誘導 14 日後において、対照群 (石灰化誘導培地のみ) と比較して、Semaphorin7a 添加群では、硬組織形成関連遺伝子である *ALP*、*OC* の発現上昇および *COL1A1* の有意な発現上昇が認められた。このことから、Semaphorin7a が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を促進的に制御していることが明らかとなった。

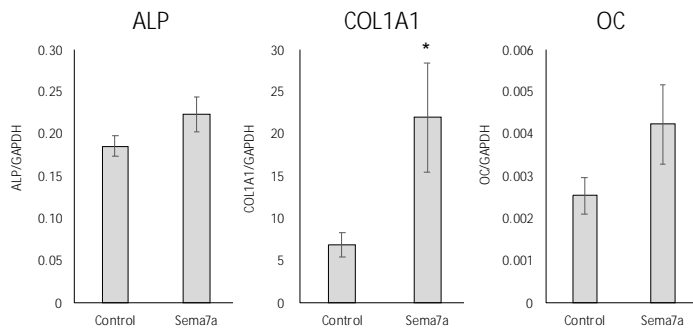


図 3. リコンビナント Semaphorin7a 添加時における HPDL の分化能の検討

#### 結論

本研究結果から、ADMPC が分泌する Semaphorin7a が、ADMPC の細胞増殖に対して抑制的に働くことが示唆された。また、Semaphorin7a が歯根膜細胞の増殖能および硬組織形成細胞への分化能を促進することが明らかとなった。

これらの知見は、ADMPC 由来 Trophic 因子である Semaphorin7a の歯周組織再生誘導能を示唆するものであり、今後、ADMPC における Semaphorin7a の発現制御について研究を加えることで、ADMPC 移植による歯周組織再生療法の効果をより高める方法が明らかになると考えている。

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 2件）

1 . 発表者名 Takedachi M, Sawada K, Morimoto C, Yamamoto S, Hirai A, Shimomura J, Narukawa Y, Kashiwagi Y, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2 . 発表標題 Clinical Evaluation of Periodontal Tissue Regeneration by ADMPC Transplantation
3 . 学会等名 2018 IADR GENERAL SESSION ( 国際学会 )
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Morimoto C, Takedachi M, Sawada K, Yamamoto S, Hirai A, Shimomura J, Narukawa Y, Kashiwagi Y, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2 . 発表標題 Therapeutic efficacy of autologous ADMPC transplantation for periodontal tissue regeneration
3 . 学会等名 第66回JADR総会・学術大会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 沢田啓吾, 竹立匡秀, 森本千晶, 平井麻絵, 下村純平, 川寄公輔, 岩山智明, 北村正博, 村上伸也
2 . 発表標題 脂肪組織由来多系統前駆細胞(ADMPC)由来Trophic因子のプロテオーム解析
3 . 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sawada K, Takedachi M, Morimoto C, Hirai A, Shimomura J, Kawasaki K, Iwayama T, Kitamura M, Murakami S
2 . 発表標題 Shotgun Proteomic Analysis of the humoral factors derived from ADMPC
3 . 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----