

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K20694

研究課題名（和文）歯周病治療に向けた歯肉組織のカドヘリン結合を調節するポリロタキサン足場の構築

研究課題名（英文）Polyrotaxane scaffolds to modulate cadherin binding for periodontal therapy

研究代表者

有坂 慶紀 (Arisaka, Yoshinori)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：70590115

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、ポリロタキサン表面の分子可動性が上皮細胞の細胞-細胞接着に果たす役割について評価した。分子可動性の高いポリロタキサン表面では、上皮細胞内の転写因子YAPが細胞質に局在化し、分子可動性の低い表面ではこのYAPが核に局在する傾向があった。さらに細胞質内のYAP局在は、タイトジャンクションに関連した遺伝子の発現を増加させた。このようなポリロタキサンを基盤としたバイオマテリアルは、生体内における物理的な免疫システムの改善や生体組織の修復のための強力なツールとして期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科においては細菌感染によるタイトジャンクションの損傷が歯肉炎や歯周炎を引き起こし、歯周病の原因となることが知られている。歯周病は歯槽骨の破壊や歯の喪失のみでなく、アルツハイマー病、脳卒中、心臓病、糖尿病などとの関連が指摘されている重大な疾患である。細胞-細胞間接着を促す生体材料は、生体組織の再建を助けるのみでなく、炎症を抑えることで組織を治癒・修復することが期待される。バイオマテリアルを用いた生体組織の再構築と修復の両立は、組織再生において合理的であり大きなメリットをもつ。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the role of molecular mobility of polyrotaxane surfaces on cell-cell adhesion in epithelial cells. On polyrotaxane surfaces with high molecular mobility, the transcription factor YAP in epithelial cells localized to the cytoplasm, while on surfaces with low molecular mobility, YAPs tended to localize to the nucleus. Furthermore, YAP localization in the cytoplasm increased the expression level of genes associated with tight junctions. Such polyrotaxane-based biomaterials hold promise as powerful tools for improving the physical immune system in vivo and for repairing biological tissues.

研究分野：バイオマテリアル科学

キーワード：ポリロタキサン 超分子 歯周組織 物理バリア機能

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

細胞は周囲の微小環境を感知するため *in vitro* 系においては細胞接着材料の形状や性状に応じた応答を示すことが知られている。しかし、そのような細胞接着材料の特性が細胞-細胞間の接着に与える影響については未だ不明な点も多い。本研究では、ポリロタキサン表面の分子可動性が上皮細胞の細胞-細胞接着に果たす役割について評価した。分子可動性の高いポリロタキサン表面では、上皮細胞内の転写因子 **yes-associated protein(YAP)**が細胞質に局在化し、分子可動性の低い表面ではこの YAP が核に局在する傾向があった。すなわち転写因子である YAP の局在はポリロタキサン表面の分子可動性によって切り替え得ることを明らかにした。さらに細胞質内の YAP 局在は、タイトジャンクションに関連した遺伝子の発現を増加させた。スクラッチアッセイでは、分子可動性の低い表面上の上皮細胞が速やかに遊走を開始する一方で、分子可動性の高い表面上の細胞は遊走開始が遅れることを見出した。これらは分子可動性の高いポリロタキサン表面は、YAP を細胞質に局在化することで細胞-細胞間接着の強化に寄与している可能性がある。このようなポリロタキサンを基盤としたバイオマテリアルは、生体内における物理的な免疫システムの改善や生体組織の修復のための強力なツールとして期待できる。

### 1. 研究開始当初の背景

ポリロタキサンは、直鎖状の高分子鎖が多数の環状分子の空洞部を貫通したインターロック構造の超分子集合体である。これまでに研究代表者らは両末端に疎水性セグメントを配したポリロタキサントリブロック共重合体をガラスや金に被膜し、分子可動性ポリロタキサン表面を設計した。このポリロタキサン表面上で線維芽細胞や内皮細胞、間葉系幹細胞を培養したところ、分子可動性の高いポリロタキサン表面に接着した細胞は細胞骨格であるアクチン線維の形成が抑制された一方で、分子可動性の低いポリロタキサン表面に接着した細胞はその形成が促進される傾向を示した。さらに表面の分子可動性に依存した細胞骨格の形成は **ras homolog family member A(RhoA)-Rho-associated protein kinase (ROCK)**や **yes-associated protein (YAP)**に関連した細胞内シグナル伝達を介して細胞の増殖・遊走・分化など様々な細胞機能発現に影響を与えることを明らかにし、ポリロタキサンを基盤としたバイオマテリアル設計が細胞の機能操作や生体組織の再生足場に有用であることを見出した。また人工多能性幹細胞(iPS細胞)をポリロタキサンの表面で培養したところ、表面の分子可動性が細胞-材料間のみでなく、細胞-細胞間の接着にも影響を与えることを見出した。細胞-細胞間接着は細胞集団の形成や隣接細胞間の直接的なコミュニケーションに関与しており、組織工学における三次元生体組織の構築に重要な役割を担っている。また細胞-細胞間接着は物理的な免疫システムとして機能することも注目すべき点である。例えば上皮細胞にはタイトジャンクション・アドヘレンスジャンクション・デスモソームなどの細胞間接着様式があり、病原体の侵入や感染を防ぐ物理的バリアとして機能している。特にタイトジャンクションは、オクルディン、クローディン、接合部接着分子(JAMs)や **zonula occludens(ZO)-1, 2, 3**によって構成されており、歯科においては細菌感染によるタイトジャンクションの損傷が歯肉炎や歯周炎を引き起こし、歯周病の原因となることが知られている。歯周病は歯槽骨の破壊や歯の喪失のみでなく、アルツハイマー病、脳卒中、心臓病、糖尿病などとの関連が指摘されている重大な疾患である。以上のことから、細胞-細胞間接着を促す生体材料は、生体組織の再建を助けるのみでなく、炎症を抑えることで組織を治癒・修復することが期待される。このようなバイオマテリアルを用いた生体組織の再構築と修復の両立は、組織再生において合理的であり大きなメリットをもつ。

### 2. 研究の目的

分子可動性の異なる硫酸化ポリロタキサン表面を用いた上皮細胞モデルの培養を通じて、ポリロタキサン表面の分子可動性が上皮細胞の細胞間接着に与える影響について解析する。

### 3. 研究の方法

#### 3. 1 硫酸化ポリロタキサン表面の作製

Poly(ethylene glycol)( $M_n=20,000$ )と硫酸化  $\alpha$ -CD からなるポリロタキサンの両末端に poly(benzyl methacrylate)を配した硫酸化ポリロタキサントリブロック共重合体を合成し、細胞培養用ポリスチレン製培養器材(TCPS)表面に被膜した(図 1)。その際、硫酸化  $\alpha$ -CD の貫通数が 5 分子(SPE-PRX5)もしくは 86 分子(SPE-PRX86)のポリロタキサン表面を作製した。ポリロタキサン表面の分子可動性は、QCM-D(Quartz Crystal Microbalance with dissipation)や接触角ヒステリシス測定から  $\alpha$ -CD の貫通数が減少するほど高くなることを報告しており、本研究で作製した SPE-PRX5 表面は SPE-PRX86 表面より分子可動性が高いことが予想される。

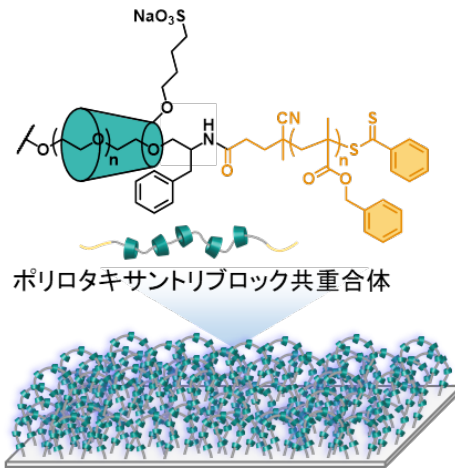


図 1. ポリロタキサン表面

### 3. 2 KLN205 細胞の培養

マウス肺扁平上皮癌由来細胞(KLN205 細胞)を SPE-PRX5 および SPE-PRX86 表面に  $2 \times 10^3 \text{ cells cm}^{-2}$  の密度で播種し、5 日間培養した。SPE-PRX5 および SPE-PRX86 表面に接着した KLN205 細胞の倍化時間は、培養 2 日目および 4 日目の接着細胞数から算出した。転写因子である YAP の細胞内局在については、免疫蛍光染色法によって解析した。細胞間接着関連遺伝子の発現評価として、E-カドヘリン、zo-1、zo-2 遺伝子を対象に RT-PCR 解析を行った。細胞間接着を評価するために、スクラッチアッセイを行った。KLN205 細胞を SPE-PRX5 および SPE-PRX86 表面上でコンフルエントに達するまで培養した後、表面をピペットチップの先端で直線状に"スクラッチ"した。細胞形態およびスクラッチ領域は、位相差顕微鏡を用いて 2 時間毎に観察した。

## 4. 研究成果

### 4. 1 KLN205 細胞の増殖・形態および細胞内 YAP 局在

ポリロタキサン表面の分子可動性が上皮細胞の接着、形態、および増殖などの細胞応答に与える影響について評価した。KLN205 細胞の SPE-PRX5 表面への初期接着率は、SPE-PRX86 表面への接着率と同程度であり、接着した細胞はコロニーを形成しながら増殖した。SPE-PRX5 および SPE-PRX86 表面に接着した細胞の倍加時間は、それぞれ 14.9 時間および 14.1 時間であり、有意な差は認められなかった。一方で SPE-PRX86 表面上に接着した細胞のアスペクト比（細胞の形を楕円フィッティングした際の長軸/短軸の比）は SPE-PRX5 表面上の接着細胞よりも大きい傾向があった。これは、分子可動性の低いポリロタキサン表面において細胞の伸張が促進することを示唆しており、先行研究の結果と一致している。また SPE-PRX5 および SPE-PRX86 表面に接着した細胞の核内 YAP 局在の割合を解析したところ、それぞれ  $22.9 \pm 5.0 \%$  および  $31.0 \pm 4.7 \%$  であった。これらの結果から、上皮細胞は細胞骨格系シグナル経路を介してポリロタキサン表面の分子可動性を認識し、YAP の細胞局在を変化させることが示唆された。

### 4. 2 細胞間接着関連遺伝子の発現

ポリロタキサン表面で培養した KLN205 細胞における細胞間接着の形成を、E-cadherin、ZO-1、ZO-2 の免疫蛍光染色により確認した。その上で KLN205 細胞における E-cadherin、ZO-1、ZO-2 遺伝子の発現を RT-PCR により解析した。SPE-PRX5 表面で培養した細胞における E-cadherin 遺伝子の発現は、SPE-PRX86 表面で培養した細胞と同程度であった。一方、ZO-1 および ZO-2 の発現は SPE-PRX86 表面で培養した細胞より SPE-PRX5 表面上において有意に高かった。この結果は、高い分子可動性を持つポリロタキサン表面がタイトジャンクションの形成に寄与していることを示唆している。詳細なメカニズムは明らかでないが、ポリロタキサン表面の高い分子可動性によって YAP の細胞核から細胞質への移行が誘導され、これによって YAP が ZO-2、angiomotin、claudin-18 などのタイトジャンクション関連タンパク質と結合することによってタイトジャンクションの形成が促進された可能性がある(図 2)。

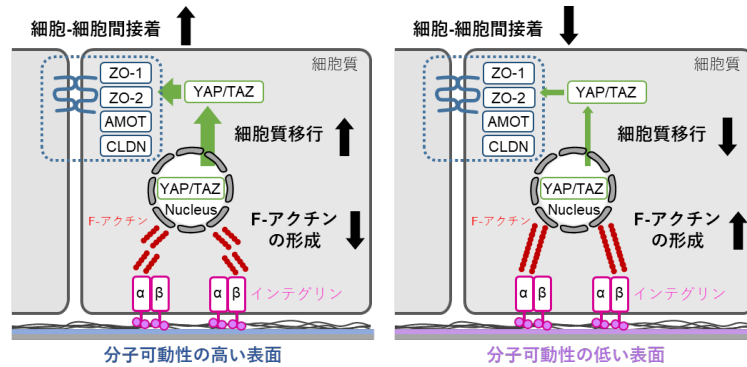


図2. ポリロタキサン表面の分子可動性が細胞間接着に与える影響

#### 4. 3 スクラッチアッセイによる細胞間接着の評価

ポリロタキサン表面の分子可動性が上皮細胞間接着に与える影響を評価するために、スクラッチアッセイを実施した。一般に、スクラッチアッセイは、培養器材などの表面上における二次元的な細胞の遊走・増殖を経時的に定量解析するための手法である。このアッセイでは、細胞が細胞培養器材表面上で単層になるまで増殖した後、表面をピペットの先端でスクラッチし、創傷の様な隙間を形成させる。その後、細胞の遊走によってスクラッチした面が閉じていく過程を経時的に画像解析する。薬物やサイトカインを添加しない細胞培養系では、細胞の遊走は細胞-材料表面間や細胞-細胞間での相互作用に大きく依存すると考えられる。そこで、KLN205 細胞における細胞-細胞間接着をスクラッチアッセイによる細胞遊走解析を通じて間接的に評価できると考えた。スクラッチしてから2時間後のスクラッチ面積を解析したところ、SPE-PRX86 表面では  $10.3 \pm 2.8 \%$ 、SPE-PRX5 表面では  $0.6 \pm 8.2 \%$  の減少が認められた。この面積減少率の違いは SPE-PRX5 表面によって細胞遊走の開始が遅れが生じたことを示しており、その原因として細胞間接着の安定性の違いが考えられる。すなわち細胞間接着が成熟して強固になれば細胞遊走の開始が遅れ、細胞間の接着が弱く未熟であれば遊走は速やかに開始される可能性がある。これまでに細胞-細胞間の接着が、インテグリンを介した細胞-材料表面間の接着と強く関連していることが報告されている。上皮細胞が遊走する際には、細胞-細胞間の接着を弱め、細胞と ECM の間のインテグリンを介した接着が促進される。一方、集団化した細胞を高密度化するために、インテグリンを介した接着を弱め、細胞間の接着が促進されることが知られている。すなわち、分子可動性の高いポリロタキサン表面での細胞-細胞間接着の促進が、細胞とポリロタキサン表面とのインテグリンを介した接着を阻害し、結果として細胞の遊走が遅延させたことが考えられる。以上より、ポリロタキサン表面の分子可動性は、上皮細胞の細胞間相互作用と細胞-材料表面間の相互作用を調節する材料パラメータとして期待できる。

※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、研究者個人に帰属されます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hakariya Masahiro, Arisaka Yoshinori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Iwata Takanori, Yui Nobuhiko	4. 巻 23
2. 論文標題 Suppressed Migration and Enhanced Cisplatin Chemosensitivity in Human Cancer Cell Lines by Tuning the Molecular Mobility of Supramolecular Biomaterials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200438 ~ 2200438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200438	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 Arisaka Yoshinori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Phototethering of Collagen onto Polyetheretherketone Surfaces to Enhance Osteoblastic and Endothelial Performance	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200115 ~ 2200115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200115	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 Tanaka Takemura Yuka, Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Masuda Hiroki, Mikami Ryo, Sekiya Aoyama Ruriko, Iwata Takanori, Yoda Tetsuya, Ono Takashi, Yui Nobuhiko	4. 巻 22
2. 論文標題 Independent Roles of Molecular Mobility and Zeta Potential on Supramolecular Surfaces in the Sequence of RAW264.7 Macrophage Responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200282 ~ 2200282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200282	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 Masuda Hiroki, Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Iwata Takanori, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Synergy of molecularly mobile polyrotaxane surfaces with endothelial cell co-culture for mesenchymal stem cell mineralization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 18685 ~ 18692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA01296G	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 Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Iwata Takanori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Tamura Atsushi, Yui Nobuhiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Surface-tethering of methylated polyrotaxanes with 4-vinylbenzyl groups onto poly(ether ether ketone) substrates for improving osteoblast compatibility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 813 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2020-332	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 Hakariya Masahiro, Arisaka Yoshinori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Tamura Atsushi, Iwata Takanori, Yui Nobuhiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Tissue Adhesion-Anisotropic Polyrotaxane Hydrogels Bilayered with Collagen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gels	6. 最初と最後の頁 168 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/gels7040168	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 Mikami Ryo, Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Iwata Takanori, Yui Nobuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Improved epithelial cell-cell adhesion using molecular mobility of supramolecular surfaces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 7151 ~ 7158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1BM01356D	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 Arisaka Yoshinori, Masuda Hiroki, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Delayed Senescence of Human Vascular Endothelial Cells by Molecular Mobility of Supramolecular Biointerfaces	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2100216 ~ 2100216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202100216	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 Masuda Hiroki, Arisaka Yoshinori, Sekiya-Aoyama Ruriko, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Biological Effects of Polyrotaxane Surfaces on Cellular Responses of Fibroblast, Preosteoblast and Preadipocyte Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 924 ~ 924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym12040924	査読の有無 無
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 Arisaka Yoshinori, Tonegawa Asato, Tamura Atsushi, Yui Nobuhiko	4. 巻 138
2. 論文標題 Terminally cross linking polyrotaxane hydrogels applicable for cellular microenvironments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Polymer Science	6. 最初と最後の頁 49706 ~ 49706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/app.49706	査読の有無 無
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 Sekiya-Aoyama Ruriko, Arisaka Yoshinori, Hakariya Masahiro, Masuda Hiroki, Iwata Takanori, Yoda Tetsuya, Yui Nobuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Dual effect of molecular mobility and functional groups of polyrotaxane surfaces on the fate of mesenchymal stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 675 ~ 684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/DOBM01782E	査読の有無 無
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 Arisaka Yoshinori, Yui Nobuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular mobility of polyrotaxane-based biointerfaces alters inflammatory responses and polarization in Kupffer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 2271 ~ 2278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/DOBM02127J	査読の有無 無
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 Arisaka Yoshinori、Yui Nobuhiko	4. 巻 290
2. 論文標題 Anchoring -cyclodextrin-based polyrotaxanes to biological tissues via riboflavin-mediated photo-crosslinking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 129460 ~ 129460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2021.129460	査読の有無 無
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 Arisaka Yoshinori、Yui Nobuhiko	4. 巻 40
2. 論文標題 Suspending Polyrotaxane Dissociation via Photo Reversible Capping of Terminals	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Macromolecular Rapid Communications	6. 最初と最後の頁 1900323 ~ 1900323
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/marc.201900323	査読の有無 無
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 Arisaka Yoshinori、Masuda Hiroki、Yoda Tetsuya、Yui Nobuhiko	4. 巻 263
2. 論文標題 Simple treatment of cell culture surfaces with water-dimethyl sulfoxide mixtures impacts YAP localization in vascular endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials Letters	6. 最初と最後の頁 127245 ~ 127245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.matlet.2019.127245	査読の有無 無
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 Sekiya Aoyama Ruriko、Arisaka Yoshinori、Yui Nobuhiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Mobility Tuning of Polyrotaxane Surfaces to Stimulate Myocyte Differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 1900424 ~ 1900424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.201900424	査読の有無 無
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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