

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10006

研究課題名(和文) 幹細胞を誘導し高度立体構造をもつ歯根膜シートを創製するマイクロ・ナノパターン探索

研究課題名(英文) Development of micro/nano-patterns to create periodontal ligament sheets with three-dimensionally structures by guiding stem cells

研究代表者

吉田 靖弘 (Yoshida, Yasuhiro)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90281162

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)：本課題では幹細胞として胚性幹細胞(ES細胞)および乳歯歯髄幹細胞(SHED)に注目し、各種微細パターン上での細胞挙動を検討した。マウスES細胞をマイクロパターン上で培養し、三胚葉の分化マーカーを免疫染色した。多くのパターンでは外胚葉>内胚葉>中胚葉の順で多かったが、2μm以下のパターンの一部では内胚葉への分化の割合が少し上昇した。次に、SHEDのマイクロパターン上での細胞挙動を検討した。細胞接着では付着数に差がなかったが、細胞増殖や石灰化では特定のパターンにて促進が観察された。以上より、パターンのデザインにより幹細胞の挙動を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、研究成果であるパターンによる幹細胞の挙動制御は、将来的には歯根膜や象牙質を含む歯牙および歯周組織再生に繋がる。また細胞挙動の形状による制御の法則を導くことができるためバイオマテリアルの学問領域を広げることとなる。

本研究の社会的意義としては、重度の歯周病やインプラント周囲炎での歯の脱落の治療に繋がることから考えられる。現在、国民のQOLを大きく低下させるこれらの疾患は、早急に解決すべき課題であるとともに、解決が難しい課題でもある。一つの解決法としては正常な歯根膜の再生があり、特にパターン基材で再生ができれば、比較的安価な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells (ES cell) and deciduous dental pulp stem cells (SHED) were focused on as stem cells and their behaviors on various micro/nano-patterns were investigated. Mouse ES cells were cultured on micropatterns and immunostained for differentiation markers in the three germ layers. In most patterns, the order was ectoderm > endoderm > mesoderm, but the proportion of differentiation into endoderm was slightly increased in some of the patterns below 2 μm. Cell behaviors on the SHED micropatterns were then investigated. There was no difference in the number of adherent cells in cell adhesion assay, but in cell proliferation and calcification, promotion was observed in specific patterns. These results suggest that the behaviors of stem cells may be controlled by the design of patterns.

研究分野：歯科理工学

キーワード：マイクロナノパターン 幹細胞 ES細胞 乳歯歯髄幹細胞 歯根膜再生 象牙質再生

## 1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎は早急に解決すべき課題であり、難題としてはインプラント周囲での正常歯根膜の再生が挙げられる。現在、歯根膜再生のためには、エムドゲインやリグロスなどの療法が効果的であることが知られている。今後、より適応範囲を広げるためには、安価でより効果が高い方法の開発も必要である。特に微細構造を高度に制御した基材に関しては、セメント質、象牙質、シャーピー線維などの生体内で特殊な立体構造を持つ歯牙・歯周組織の再生を誘導できる可能性を秘めている。一方で、微細構造材料を生体内に埋めたときに様々な細胞が作用することになるが、歯牙・歯周組織関連の幹細胞の制御も重要な課題となってくる。そのため基礎として微細構造に対する幹細胞作用の法則化が望まれる。

## 2. 研究の目的

本課題では、歯根膜再生や象牙質再生を含む歯牙および歯周組織再生を将来目標として、大きな役割を担うこととなる幹細胞に注目した。超立体微細パターン作製技術にて、関連した幹細胞を用いた「バイオ系微細パターンによる各種幹細胞の立体培養や分化誘導の法則化」、「超立体階層化パターンによるコラーゲン線維など歯根膜構造の再生」を目的とした。特に幹細胞としては、胚性幹細胞 (ES 細胞) および乳歯歯髄幹細胞 (SHED) を選択し、その挙動を観察した。なお SHED については象牙質やセメント質様構造の産生が可能のため、コントロール次第で歯根膜のシャーピー線維部分を再生できる可能性を秘めている。

## 3. 研究の方法

### (1) パターンの作製

シリコンマスターモールド (形状: ピラー、ホール、グループ、サイズ: 直径または幅 500 nm ~ 50 $\mu$ m、高さまたは深さ: 2 ~ 10 $\mu$ m) を用いてシクロオレフィンポリマー (COP; 厚さ 40 ~ 188 $\mu$ m、日本ゼオン製) フィルムに対しナノプリントを行った。モールドに COP フィルムを被せ、熱プレスを用いて 175 ~ 185 $^{\circ}$ C で 4 分間加圧し形状を転写し、パターン化フィルムを得た。得られたパターン化フィルムは卓上プラズマ照射器にて 0s、4s、120s プラズマ処理し、表面の親水性をコントロールした。その後、細胞培養ディッシュにパターン化フィルムを熱融着固定し、UV 滅菌後、細胞培養アッセイに使用した。一方で、超精細 3D プリンタを用いて幅 100 $\mu$ m、高さ 150 ~ 200 $\mu$ m レベルのホールとグループを組み合わせた形状を設計し、生体適合性プラスチックを材料として光重合にてプリントした。その後、得られた形状からポリスチレンフィルムへ転写後、乳歯歯髄幹細胞 (SHED) の培養アッセイに用いた。

### (2) 胚性幹細胞 (ES 細胞) の培養

胚性幹細胞 (ES 細胞) を様々なマイクロパターン上で培養して、パターン形状により ES 細胞の分化誘導に違いがみられるか検証した。親水化マイクロパターン上にマウス ES 細胞株 B6-6 (AES0187、フィーダーフリー、理研セルバンク) を播種し、LIF を除いた DMEM 培地に KnockOut Serum Replacement 等を添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 環境下、12 日間培養した。培養後、ホルマリンにて細胞固定し、外胚葉 (Sox1)、中胚葉 (PDGFR $\alpha$ )、内胚葉 (Sox17) 分化マーカーで免疫染色を行った。その後、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) にて各種分化マーカーの蛍光を観察した。同時に DAPI を用いて核染色を行い、パターン上にある細胞量を推定し、分化した細胞の割合を求めた。

### (3) 乳歯歯髄幹細胞の培養

ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED; キッズウェル・バイオ) を、未分化増殖培地で培養し、冷凍保管した。その後、各種のマイクロパターン上に SHED を播種し、DMEM に 10%FBS と antibiotics (ペニシリン・ストレプトマイシン・アムホテリン B) を添加した培地にて培養した。接着試験では 30 分間インキュベートし、増殖試験では 3 日間培養した。細胞のカウントのためには、2.5% グルタルアルデヒドで固定後、ギムザ染色または DAPI 染色し、光学顕微鏡または蛍光顕微鏡にて細胞カウントした。石灰化試験では、上記培地に加え、石灰化誘導剤 (デキサメサゾン・グリセロフォスフェート・アスコルビン酸) を添加し、3 週間培養した。その後、アリザリンレッド染色を行い、色素を抽出後、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。細胞形態観察のため、2.5% グルタルアルデヒドで固定後、エタノールで段階脱水し、臨界点乾燥した。その後、Pt-Pd コートし、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った。

## 4. 研究成果

## (1) ES 細胞の培養

パターン形状による胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化誘導の違いを観察するため、各種マイクロパターン上でマウス ES 細胞を LIF 不含培地で培養して三胚葉の外胚葉 (Sox1)、中胚葉 (PDGFR)、内胚葉 (Sox17) 分化マーカーを免疫染色で検出し、その割合を算出した (図 1)。

全体的な傾向としては、平面のコントロールも含め、大部分のパターンで三胚葉の蛍光割合の大小は外胚葉 > 内胚葉 > 中胚葉の順になった。特に外胚葉分化マーカーの蛍光割合が大きく、同一パターン内で中胚葉や内胚葉分化マーカーの蛍光と比較すると 1.6~34 倍の蛍光割合となった。高さ 10 $\mu\text{m}$ 、直径が 1~10 $\mu\text{m}$  の比較的大きなパターン系列では、いずれの大きさのパターンでも外胚葉に分化する細胞が多く、他の胚葉と比較して 3.3~34 倍となった。よって、今回用いたパターンフィルムではマウス ES 細胞株 B6-6 は多くが外胚葉に分化することが分かった。高さ 2 $\mu\text{m}$ ・直径 0.5~2 $\mu\text{m}$  の比較的小さなパターン系列では、上記パターンと同様に外胚葉に分化する細胞が他の胚葉と比較して多かった。しかしながら、サイズが大きい系統のパターンと比較すると、1 $\mu\text{m}$  と 0.5 $\mu\text{m}$  のパターンでは内胚葉に分化する細胞が若干多くなる傾向があった。また、2 $\mu\text{m}$ -ホールのパターンでは他のパターンと比較すると中胚葉に分化する細胞が若干多くなる傾向があった。

マイクロパターン上でマウス ES 細胞株 B6-6 を培養すると、多くの細胞が外胚葉に分化する傾向は、パターンがない平面フィルム上 (None) の結果と同様である。しかしながら、いくつかのパターン上では内胚葉や中胚葉に分化する割合が大きくなるものがあり、パターン形状によって分化していくマウス ES 細胞における三胚葉の割合を変化させることができる可能性が見出された。今後、歯根膜は中胚葉・間葉系であるため、今後、表面組成などの他の制御因子にも注目し、選択性を上げる条件を見出したい。

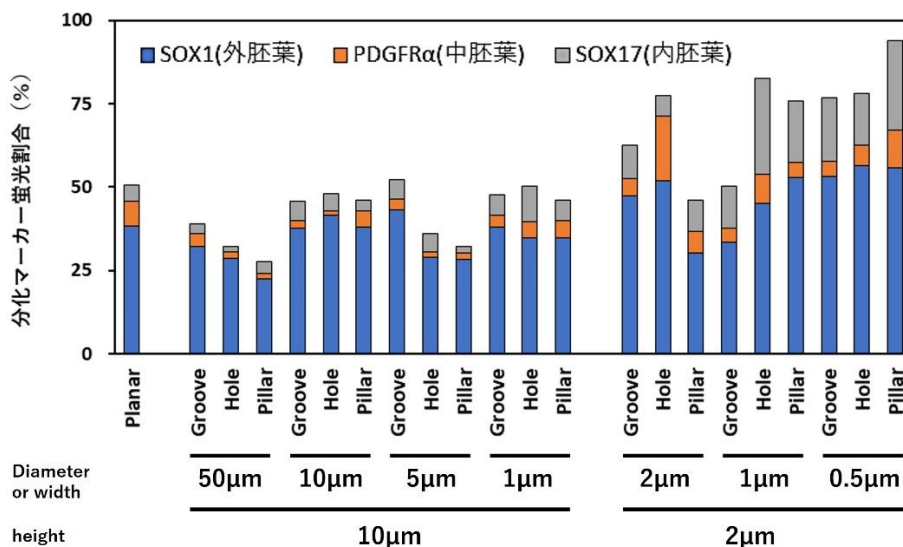


図 1 パターン上での培養によるマウス ES 細胞の三胚葉分化マーカーの蛍光割合

## (2) 乳歯歯髄幹細胞の培養

ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) のマイクロパターン上での挙動を検討した。細胞接着試験では、各パターン上に付着した細胞数に有意差のある違いは観察されなかった (図 2 左)。また、コントロールである平面と比較すると、接着数がわずかに減少する傾向が観察された。細胞付着形態を SEM にて観察したところ、パターンの形やサイズにより、細胞の形状の違いが観察された (図 2 右)。グループ上では、グループの方向に沿った細胞配向が観察された。ピラーでは、四方に伸展する細胞形態を示し、1 $\mu\text{m}$  付近で細胞が大きく伸展していた。ホールでは平面上の細胞と形態が似ており、あまり伸展していなかった。以上、付着細胞数に差はないものの、付着細胞形態としてはパターンの種類により大きく影響されることが分かった。



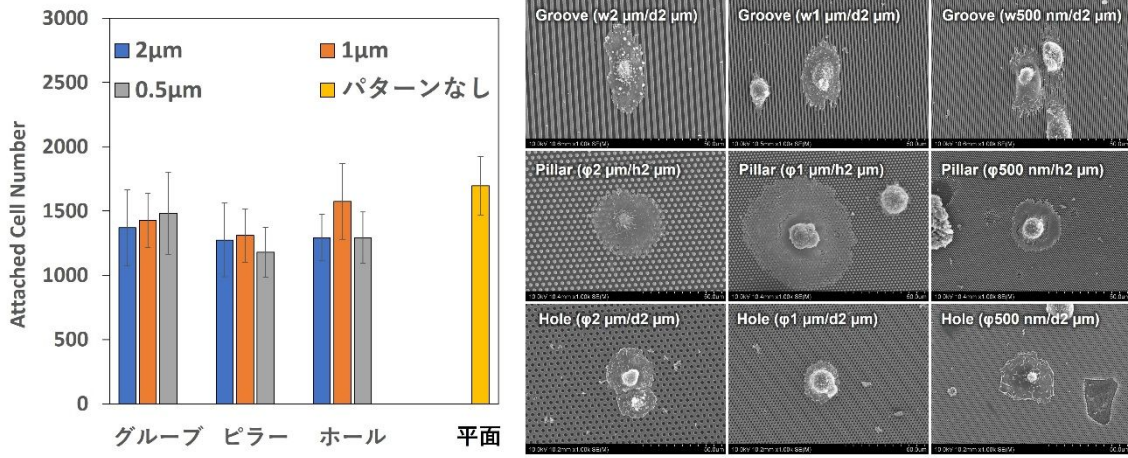


図2 接着試験による付着細胞数(左)と付着細胞の走査型電子顕微鏡像(右)

細胞増殖試験の結果(図3) 各々の形状グループ内で比較すると幅および直径が1μmのパターンで細胞数が最も多かった。形状間での比較をすると傾向は似ており大きな差はなかった。一方、平面との比較では、パターンを付与することでいずれも細胞数が増えることが分かった。これらは、微細な凹凸が接着強度を適度に向上し、そのため基材上で安定したため増殖にもプラスに働いたものと推測できる。

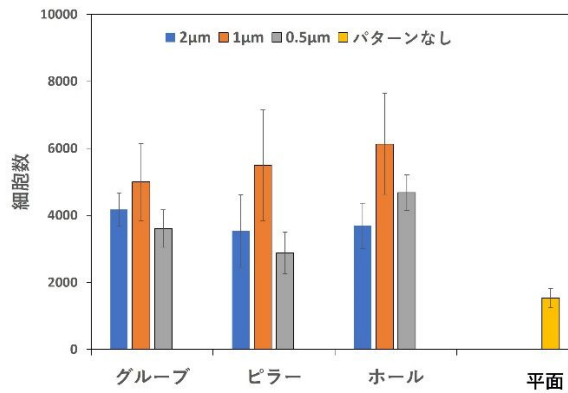


図3 増殖試験でのパターン種による細胞数の違い

石灰化試験でのアリザリンレッド抽出液による石灰化物の定量では、有意差はないものの幅1μmおよび500nmのグループ上で石灰化物の産生が多い傾向があった(図4右)。また、アリザリンレッド染色を行った結果(図4左)、全体的に薄い赤色で染色され、顕著な違いは判別できなかった。黒く染まる石灰化結節も各パターン上で多数観察されたが、定量的な違いがあるかまでの判別はできなかった。今後、石灰化物の詳細な観察を行い、石灰化物の配向やパターンとの関係など特徴的な事象が起きていないか検討する必要がある。

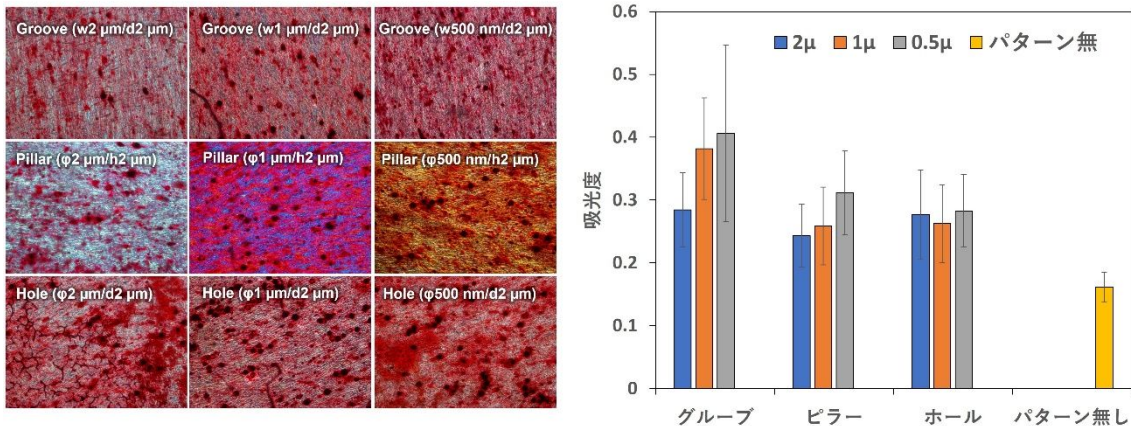


図4 石灰化試験でのアリザリンレッド染色像(左)アリザリンレッド抽出による石灰化量(右)

### (3) 超精細 3D プリンタでの形状

3D プリンタ製パターンのポリスチレンへの転写を検討したところ、強度不足を補助するデザインにより、転写時の破損を大幅に減少させることができた。作製した数種のパターン上で SHED 細胞を培養し、象牙質マーカーである象牙質シアロリントパク (DSPP) 染色により凹凸デザインの効果を検討した結果、ホール形状で象牙質マーカーの上昇が観察された。他にも 3D プリンタにて作製したホールとグループの組み合わせ形状でも、形状により象牙芽細胞マーカーの発現が比較的上昇していた。以上より、パターンの選択により、SHED から象牙芽細胞へ分化が促進される可能性が示された。しかしながら、現在十分に象牙質への分化条件を設定できていないため、今後、より詳細に検討していきたい。

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 Tsukasa Akasaka, Hiroshi Hayashi, Miho Tamai, Yoshitaka Yoshimura, Yoh-ichi Tagawa, Hirofumi Miyaji, Ko Nakanishi, Yasuhiro Yoshida	4. 巻 -
2. 論文標題 Osteoclast formation from mouse bone marrow cells on micro/nano-scale patterned surfaces	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	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） 10.1016/j.job.2022.04.001	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤円, 吉田靖弘, 横山敦郎
2. 発表標題 マイクロナノパターンの表面形状がヒト歯根膜線維芽細胞に与える影響について
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会 第41回 東北・北海道支部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片谷謙、飯田俊二、赤坂 司、吉田靖弘、井上 哲
2. 発表標題 表面微細構造が乳歯歯髓幹細胞に与える影響について
3. 学会等名 第57回高分子学会北海道支部研究発表会
4. 発表年 2023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	赤坂 司  (Akasaka Tsukasa)  (00360917)	北海道大学・歯学研究院・准教授    (10101)	

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	玉井 美保  (Tamai Miho)  (20619704)	沖縄科学技術大学院大学・免疫シグナルユニット・研究員    (38005)	
研究分担者	鈴木 伸吾  (Suzuki Shingo)  (70847839)	北海道大学・歯学研究院・技術職員    (10101)	

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