

令和元年5月31日現在

機関番号：34408

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12883

研究課題名（和文）力学刺激特異的バイオマーカーの探索に向けた細胞核変形模倣デバイスの開発

研究課題名（英文）Development of stretchable device mimicking deformation of cellular nuclei for exploring specific biomarkers of mechanical stress

研究代表者

本田 義知（HONDA, Yoshitomo）

大阪歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：90547259

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：口腔癌などで生じた骨欠損修復において、力学刺激が負荷された部位での骨再生は今だ困難を極める。その一因として、細胞が力学刺激を感知するメカニズムの解明が未だ発展途上にあり、特に、細胞核の変形に起因する遺伝子発現の変化に関する研究が黎明期にあることがあげられる。もし、新たな評価法が開発され同メカニズムの解明が加速すれば、将来的に新たな再生治療の開発に繋がり患者の生活の質的向上へ大きく寄与できる。本研究期間では、細胞核が接着しかつ伸縮可能な細胞核結合シートの合成と材料学的評価を行った。更に、細胞核抽出法の検討と、同シート上での細胞核の伸展の可否を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本助成期間では、細胞核を優位に接着可能なナノリン酸カルシウムを強固に固定したNano-CaP/高分子膜のプロトタイプの創成に成功した。さらに、同高分子膜上で細胞核に伸展刺激を付与可能であることを確認した。これらの結果を基に本計画が発展し、細胞核の変形に伴う力学刺激特異的バイオマーカーの同定がなされた暁には、生体内で力学刺激を受けている細胞の存在位置や、その応力を受けている程度を定量的に明示することが可能なる。これらの知見は、骨軟骨系の応力受容メカニズムの解明に加え、他の力学刺激に関わる医療分野の研究にも影響を与え、メカノバイオロジーや再生医療等への貢献が期待できると予想される。

研究成果の概要（英文）：Bone regeneration is still challenge at the condition under the excess mechanical stress. Lacking the findings of detailed mechanisms underlying how cells sense the above mechanical stress precludes the further development of techniques on the regenerative therapy. If novel devices are discovered in order to accelerate the elucidation of above mechanisms, regenerative medicine would progress and it raise the quality of life of patients. In the present study, we fabricated new device which can attach and stretch the cell nuclei under ex vivo condition. Additionally, we compared the methods for isolating cell nuclei.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：細胞核伸展装置

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が伸展・圧縮刺激や基盤の硬さなどの機械的刺激に反応して、分化・増殖・細胞死など様々な細胞応答を示すことは広く知られた現象である。これらの機械的刺激の受容システムは、生体の生理的・病的現象を左右することから近年その詳細な解明が求められている。歯科領域に目を向けると、口腔癌などで生じた骨欠損修復において、力学刺激が負荷された部位での骨再生は今だ困難を極める。その一因として、やはり細胞が力学刺激を感知するメカニズムの解明が未だ発展途上にあり、特に、細胞核の変形に起因する遺伝子発現の変化に関する研究が黎明期にあることがあげられる。もし、新たな評価法が開発され同メカニズムの解明が加速すれば、将来的に新たな再生治療の開発に繋がり患者の生活の質的向上へ大きく寄与できる。また、細胞核の変形に伴う力学刺激特異的バイオマーカーの同定がなされた暁には、生体内で力学刺激を受けている細胞の存在位置や、その応力を受けている程度を定量的に明示することが可能になる。これらの知見は、骨軟骨系の応力受容メカニズムの解明に加え、他の力学刺激が関わる医療分野の研究にも影響を与え、メカノバイオロジーや再生医療等への分野を超えた大きな貢献が期待できる。

## 2. 研究の目的

力学的刺激による細胞核の変形は、遺伝子発現挙動に直結し細胞機能・分化を制御する。しかしながら、この細胞核の変形のみに応答するバイオマーカー（遺伝子）はほとんど明らかになっていない。本研究は、申請者が独自に開発を進めている「大量の細胞核を強固に固定化しつつ定量的な伸展刺激をかけうる細胞核伸展シート」を完成させ、*in vitro* で力学刺激をかけた細胞核の変形を再現し、特異的バイオマーカー探索の基盤を築く事を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、下記の手順の研究を計画した。

- (1) タンパク質との結合能の高いナノリン酸カルシウム (Nano-CaP) が強固に結合した高分子膜 (細胞核結合シート) の創成。
- (2) 細胞核抽出法の比較検討
- (3) 細胞核結合シートを用いた細胞核の伸展挙動の確認
- (4) 細胞核伸展に伴う遺伝子発現解析

### 3-1 細胞核結合シートの作製

細胞核を固定化する高分子シートには、シリコンとポリジメチルシロキサン (PDMS) を選択した。PDMS は、透明性、細部再現性に優れていることから採用し、定法で作製した (Koschwanetz et al, *Plos one* 2009)。未修飾の PDMS は細胞核と結合性に乏しいと予想されるため、Nano-CaP の固定化を試みた。Nano-CaP の結晶構造は X 線回折装置を用いて評価した。Nano-CaP と高分子膜の結合には、ソフトナノセラミック・プロセッシング法を用いた。同手法では、Nano-CaP 固定に先んじて、カルボキシル基を持つポリアクリル酸 (PAA) の修飾を、コロナ放電処理とグラフト重合にて行う。その後、Nano-CaP スラリーを用いて高分子膜をコーティングした。CaP の結晶粒子径と凝集具合は、CaP の剥離のし易さや、力学的刺激受容時の粒子間で起こる破壊に影響を与えることから、吸着している Nano-CaP が単層でコーティングしうる条件を探索した。得られた細胞核結合高分子膜の物性は、フーリエ変換型赤外分光光度計、走査型電子顕微鏡 (SEM)、X 線光電子分光法 (XPS)、原子間力顕微鏡 (AFM)、リン酸・カルシウム濃度測定にて確認した。

### 3-2 細胞核単離

市販の核抽出キット (NUCLEI EZ PREP NUCLEI ISOLATION KIT) や、Rosner や Hancock らの方法を応用して細胞核の単離を行った。細胞質成分の混入度合いはその後の遺伝子発現結果に影響を及ぼしうる。細胞質成分の混入が少なく純度の高い細胞核の抽出法を探索した。特に抽出液の成分濃度などに注意し、抽出法を改良した。得られた核の量・質は、免疫染色 (アクチン、DAPI) にて評価した。細胞核は、市販のヒト骨髄由来間葉系幹細胞から採取した。その後、単離した細胞核分散液に膜を浸漬し、細胞核と修飾膜を結合させた。

### 3-3 細胞核の剥離耐性試験

(3-2) で得られた細胞核結合高分子膜は最終的に代表者が所属する施設に設置済の細胞伸縮装置 (ストレックス社製 STB-140) に装着して、力学応答評価を行う。その予備的検討として、手動式の STB-100 に設置して、周期的な力学的刺激を付与し、細胞核の膜に対する結合安定性を評価した。

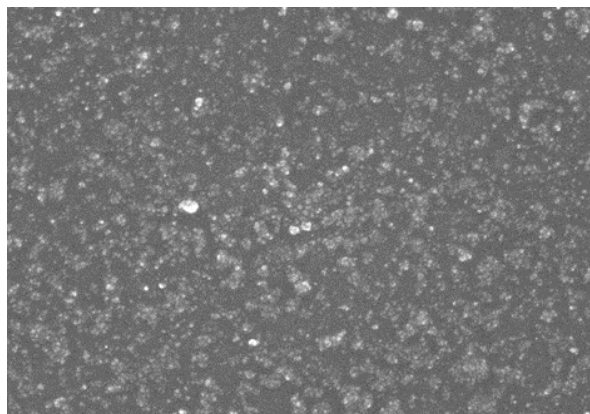
### 3-4 力学的刺激による細胞核の変形挙動の評価

(3-3)で細胞核が安定して結合している事が確認された Nano-CaP 結合 PDMS 膜を用い、力学的刺激を加えた際の細胞核の変形を免疫染色 (DAPI) にて評価した。

## 4 . 研究成果

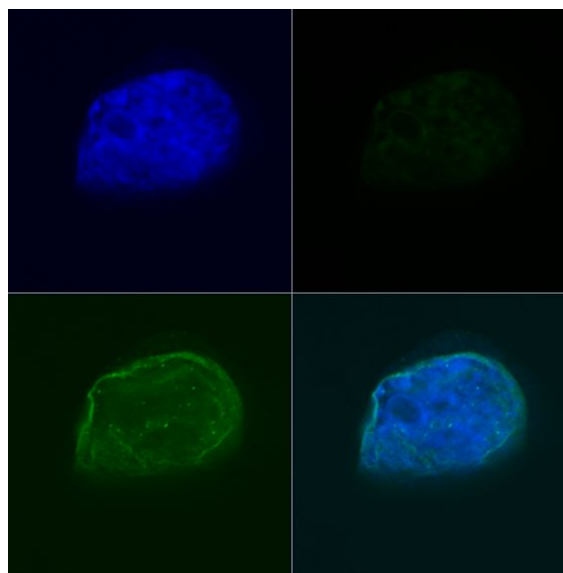
### 4-1 細胞核結合シートの作製

合成した Nano-CaP の粒径は、約 100 nm 程度であった。走査型電子顕微鏡、XPS、AFM にて Nano-CaP の吸着具合を確認したところ、Nano-CaP に帰因するカルシウムとリンのピークが確認できるとともに、接着している CaP は主に単層で存在していることが確認された(図右)。本計画では Nano-CaP はシリコンや PDMS に強固に結合し脱離しない必要がある。Nano-CaP の脱離具合を評価するために、空気内、リン酸緩衝液内で伸展刺激を与えて確認したところ、ひずみ 10%、1HZ、3 日間の条件下においても Nano-CaP は脱離せず強固に結合していることを確認した。



### 4-2 細胞核単離

上記に記述した様に細胞核を 3 種類の方法を用いて抽出し比較検討した。その結果、浸透圧法 (Rosner らの方法) では、一部ラミン構造の破綻が認められた(図右)。NUCLEI EZ PREP NUCLEI ISOLATION KIT では、核が凝集して回収されるとともに、アクチンの不完全な除去が認められた。一方、HanCock らの方法を改良した場合、アクチンの混入度合いが低下する像が確認された。



### 4-3 細胞核の脱離耐性試験および力学的刺激による細胞核の変形挙動の評価

3-1 で作製した Nano-CaP 結合 PDMS と PDMS (対照) 上に細胞核を播種し、核の吸着度を比較した。タンパク吸着能に優れる Nano-CaP が存在する Nano-CaP 結合 PDMS 膜上に多くの核の接着が認められた。

また、STB-100 を用いて、吸着している細胞核に伸展刺激を加えたところ、細胞核の変形が認められた。また、一定の伸展ひずみまで細胞核が脱離しないことを確認した。

本助成期間中には、細胞核が吸着し脱離しない細胞核結合シートの開発、より純度の高い細胞核の抽出方法の探索、同細胞核結合シート上に結合した細胞核の伸展の可否を確認した。当初予定していたこれらの細胞核の変形に呼応した遺伝子発現の解析には至っていない。しかし、本研究で創製した細胞核伸展シートの変形に強く応答した遺伝子発現は、細胞膜にある受容体を通じた液性因子による刺激の介在がない事から力学刺激に直結したバイオマーカー群となる可能性が考えられる。更に、これらの遺伝子群は新たな治療法開発に繋がる可能性があるため、今後も詳細な検討を進める予定である。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

1: 南浦 亮介, 本田 義知, 上田 衛, 上向井 徹, 古園 勉, 硬組織の力学的シグナル解明を指向

した動的細胞培養基材の作製と評価, 第 63 回日本透析医学会学術集会・総会, 2018

2: 南浦 亮介, 本田 義知, 上田 衛, 小粥 康充, 上向井 徹, 古園 勉, 動的細胞培養を可能とする HAp 複合培養基材の創出と材料評価, 第 40 回日本バイオマテリアル学会大会, 2018

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：古園 勉

ローマ字氏名：(FURUZONO, Tsutomu)

※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。