

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：27102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15696

研究課題名(和文) スフェロイドを応用した共培養システムによる骨リモデリングの共役因子の解明

研究課題名(英文) Eluciation for coupling factors for bone remodeling using 3-D spheroid culture system

研究代表者

西原 達次 (Tastuji, Nishihara)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80192251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨リモデリングに関与する骨芽細胞、間質細胞、軟骨細胞それぞれの細胞株のスフェロイドを作成し、その分化や機能に及ぼす影響について検討した。

いずれの細胞株もマイクロウェル型スフェロイド形成・融合チップ上で、良好なスフェロイドの形成が観察された。また、形成されたスフェロイドは2次元培養群と比較して、分化能や破骨細胞指示能等の機能が有意に亢進していた。

本研究の結果から、スフェロイドを用いた生体類似構造の構築は、骨・軟骨のリモデリングに関わる新たな共役因子や、細胞間相互作用の解明に新たな知見をもたらし、それが破綻した炎症性骨破壊の機序解明に関して、有用なツールとなり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Spheroids, spherical clusters of cells formed by self assembly is a method for creating three-dimensional (3D) aggregations of cells and their extracellular matrix without a scaffold, which provides physiological cell culture conditions that mimic the actual tissues.

In this study, we used microcell chip coated with non-adhesion surface for the spheroid system that allows effective formation of spheroid of homogeneous osteoblastic, stromal and chondrocytic lineage cells. Easy handling high throughput are also benefits of this system. We also found up-regulation of the differentiation marker gene expression mediated by in 3D spheroid-cultured system compared with that in 2D monolayer-culture system.

Based on these results, we conclude that our spheroid culture systems serve as a novel culture platform for various cell-based assays to demonstrate the coupling factors in bone remodeling.

研究分野：歯周病学

キーワード：骨リモデリング 共役因子 スフェロイド 炎症性骨吸収

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、血液幹細胞から単球・マクロファージ系細胞を経て分化誘導される過程で、分化に必須の RANKL や M-CSF を産生する骨芽細胞の支持が必要である。しかし、前駆細胞の形成過程については不明な点が多い。骨の恒常性の維持に重要な役割を担う骨リモデリングでは、多くの因子が複雑に、しかも厳密に制御されており、このメカニズムの解明にはそれぞれの分子の作用機序に加えて、破骨細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用の解明が必須となってくる。しかしながら、これまでの単層培養技術では、骨リモデリングを評価するための生理的環境及び再現性のある破骨細胞と骨芽細胞の共培養系の構築は不可能である。

低接着性容器を用いた新規の3次元培養法により形成されるスフェロイドは、細胞同士が集合・凝集化した細胞集合体である。スフェロイド内部には、生体類似構造が再構築されており、単層培養法よりも高機能発現を長期的に維持できることが知られている。また共培養化によって高次ミクロ組織化が可能となるとともに、細胞接着分子の活性評価も可能となる。

2. 研究の目的

骨のリモデリングにおいて、骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞、およびメカノセンシング機能を担うと考えられている骨細胞の間には、多くの力学的・生化学的なシグナル伝達が存在する。骨細胞によるメカノセンシングから、力学・生化学シグナル変換の過程を経て、骨芽細胞・破骨細胞のリモデリングが調節される現象は、時間的な調節だけでなく、細胞間の距離や配置に依存した空間的な調節を受けている。このため、骨芽細胞と破骨細胞の共役機構を解明する上で、従来の単層培養法では、生体内と大きく細胞環境が異なり、遺伝子発現プロファイルおよび形態学的特性が失われるため困難である。

そこで、本研究プロジェクトでは、マイクロウェルチップを用いて、骨芽細胞と破骨細胞の共培養スフェロイドを形成し、骨リモデリングにおける細胞間相互作用に関して新たな知見を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞様細胞スフェロイドの作製と骨芽細胞分化能の評価

マウス骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞のスフェロイド形成能について、ハンギングドロップ法を用いて検討した。スフェロイドをポリエチレングリコール (PEG) で表面を修飾したマイクロウェルチップ上で作製した。作製したスフェロイド中の細胞生存については Live / Dead assay を用いて評価した。また、作製したスフェロイド中の細胞の

遺伝子発現については real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

(2) 間質細胞スフェロイドの作製と破骨細胞支持能の評価

マウス間質細胞様である ST2 細胞のスフェロイドを作製し、破骨細胞分化制御に関連する遺伝子発現については、real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

(3) 軟骨細胞様細胞スフェロイドの作製と軟骨細胞分化能の評価

マウス軟骨細胞様細胞である ATDC5 細胞を PEG で表面を修飾したマイクロウェルチップ上で作製し、インスリン及びアスコルビン酸刺激下に培養した。作製したスフェロイド中の細胞生存については Live/Dead assay を用いて評価した。また、作製したスフェロイド中の細胞の遺伝子発現については real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞様細胞スフェロイドの作製と骨芽細胞分化能の評価

ハンギングドロップ法において、MC3T3-E1 細胞は強い凝集能を示した。(図1)

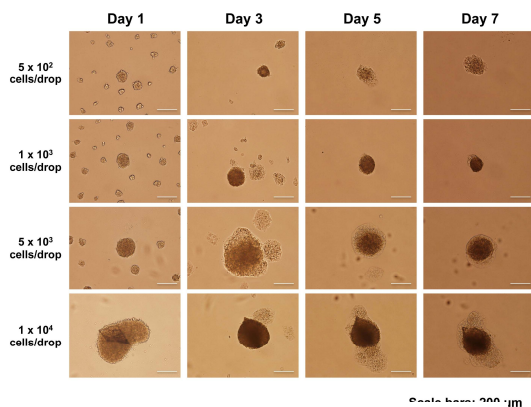


図1 MC3T3-E1の凝集能

また、マイクロウェルチップ上で、細胞は速やかに凝集し、播種後 24 時間で良好なスフェロイドが形成され、培養 14 日目においてもサイズの縮小は観察されたものの、形態は維持された。(図2) また Live/Dead assay による染色結果から、形成後 1 週間にけるスフェロイド中の細胞は、生細胞が主体で、死細胞の比率はわずかであった。

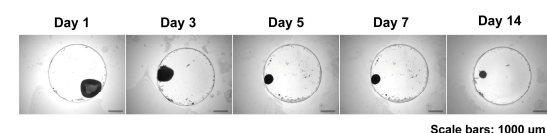


図2 MC3T3-E1 スフェロイドの作製

さらに、2次元培養群と比較して、スフェロイド中の細胞では、アスコルビン酸による骨芽細胞分化マーカー (ALP、osteocalcin、osteopontin) の発現誘導が亢進していた(図

3)。以上の結果から、骨芽細胞スフェロイドは、2次元培養と骨比較して、骨分化能が亢進していることが示唆された。

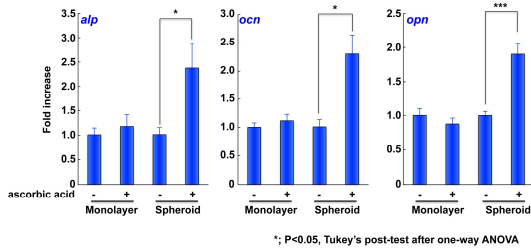


図3 MC3T3-E1 スフェロイドの骨分化能

(2) 間質細胞スフェロイドの作製と破骨細胞支持能の評価

非接着プレート上において、ST2 細胞は速やかに凝集し、播種後1日間で良好なスフェロイドが形成され、培養14日目においても、形態が維持された。さらに、2次元培養群と比較して、スフェロイド中の細胞では、活性型ビタミン D3 に誘導される破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) の遺伝子発現が亢進していた (図4)。

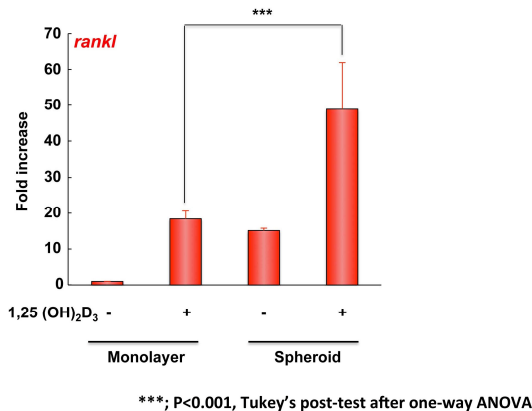


図4 ST2 スフェロイドの破骨細胞支持能

(3) 軟骨細胞様細胞スフェロイドの作製と軟骨細胞分化能の評価

マイクロウェルチップ上で、ATDC5 細胞は速やかに凝集し、播種後24時間で良好なスフェロイドが形成され、培養14日目においてもサイズの縮小は観察されたものの、形態は維持された (図5)。

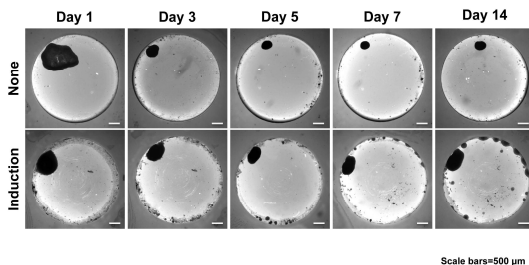


図5 ATDC5 スフェロイドの作製

また Live/Dead assay による染色結果から、形成後1週間におけるスフェロイド中の細胞は、生細胞が主体で、死細胞の比率はわずかであ

った (図6)。

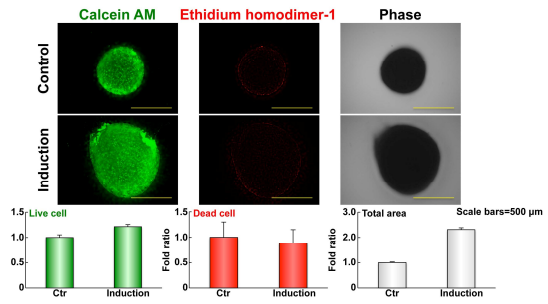


図6 ATDC5 スフェロイド構成細胞の生死判定

さらに、2次元培養群と比較して、スフェロイド中の細胞では、インスリンおよびアスコルビン酸による軟骨細胞の分化マーカー (type II collagen, sox9, aggrecan) の発現誘導が亢進していた (図7)。以上の結果から、軟骨細胞スフェロイドは、2次元培養と骨比較して、軟骨分化能が亢進していることが示唆された。

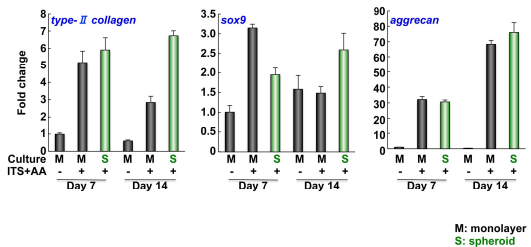


図7 ATDC5 スフェロイドの軟骨分化能

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Nakagawa A, Okinaga T, Ariyoshi W, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T, Effects of proinflammatory cytokines on odontoblastic differentiation and mineralization of odontoblast-like cells, *Inflammation and Regeneration*, 査読有, 35 (4), 2015, 210-217 https://www.jstage.jst.go.jp/article/inflammregen/35/4/35_210/_pdf

Tabé S, Hikiji H, Ariyoshi W, Hashidate-Yoshida T, Shindou H, Okinaga T, Shimizu T, Tominaga K, Nishihara T, Lysophosphatidylethanolamine acyltransferase 1/membrane bound O-acyltransferase 1 regulates morphology and function of P19C6 cell-derived neurons, *The FASEB Journal*, 査読有, 30 (7), 2016, 2591-2601.

DOI: 10.1096/fj.201500097R

〔学会発表〕(計 3 件)

Nishihara T, Dental. Medical and Engineering collaboration in Kitakyushu, Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move -Showcase Review in Kitakyushu-. Kitakyushu, Japan, January 22-23, 2016.

Tabé S, Hikiiji H, Ariyoshi W, Okinaga T, Nishihara T, Lysophosphatidyl-ethanolamine, acyltransferase 1 regulates morphology and function of P19C6 cell-derived neurons, IADR/APR General Session & Exhibition, Seoul, Republic of Korea, June 22-25, 2016.

田部士郎、引地尚子、有吉 渉、沖永敏則、西原達次、ATDC5 細胞の軟骨分化におけるリゾリン脂質アシル転移酵素の働き、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、札幌市、2016 年 8 月 24 日-26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

ホームページ等

http://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/infection_molecule

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西原 達次 (NISHIHARA, Tatsuji)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80192251

(2) 研究分担者

有吉 渉 (ARIYOSHI, Wataru)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40405551

沖永 敏則 (OKINAGA, Toshinori)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60582773

(3) 連携研究者

中澤 浩二 (NAKAZAWA, Koji)

北九州市立大学・国際環境工学部・教授

研究者番号：00304773

(4) 研究協力者

なし