

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15837

研究課題名(和文) 骨梁形成における細胞極性の関与について

研究課題名(英文) The involvement of cell polarity in trabecular formation

研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA, HIROSHI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80253219

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)：骨芽細胞株Saos2にsiRNAを用いたNesprin-1のノックダウン実験を行った。Si-Nesprin1を導入することで、Nesprinの核局在が減少していることを確認した。さらにsi-Nesprin1が蛋白レベルでの発現を抑制していることが確認された。次に、凹凸表面構造を用いたノックダウン細胞の極性変化を観察した。しかし、細胞の配列において有意な差は認められなかった。メカニカルストレスにおけるSaos2の極性に与える変化をみるため細胞の伸展実験を行った。しかしながら、Saos2ではメカニカルストレスに対する極性の変化はみられなかったためにNesprinの関与を検討するに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：A knockdown experiment of Nesprin - 1 using siRNA for osteoblast cell line Saos 2 was performed. By introducing Si - Nesprin 1, it was confirmed by immunofluorescence that nuclear localization of Nesprin decreased. Furthermore, it was confirmed that si-Nesprin 1 suppresses expression at the protein level by the Western blotting method. Therefore, it was confirmed that si-Nesprin 1 was introduced into Saos 2 cells. Next, culture experiments of knockdown cells using uneven surface structures were performed. As a result, there was no significant difference between the two in the arrangement of the cells. Next, in order to examine the change of Saos 2 in cell polarity in mechanical stress, cell extension experiment with flexer cell unit was performed. However, in Saos 2, no change in polarity to mechanical stress was observed, so Nesprin's involvement was not considered.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：細胞極性 骨形成

1. 研究開始当初の背景

LINC 複合体(Linker of nucleoskeleton and cytoskeleton complex)は、核膜の内外面に位置し、細胞骨格に結合することで核の位置を一定に保ち細胞に極性を与えている。近年、この複合体の発現をノックダウンした細胞は、その走化性に支障をきたすことが報告されている。一方、骨芽細胞は基質産生を行う時に、細胞極性を持つことが知られている。しかしながら、なぜ骨梁が一定の方向に伸展し、その太さを増して行くのかは、明らかになっていない。つまり、研究の背景として、骨梁形成と細胞極性の関連については、全く未知の分野であり、LINC 複合体を制御し、その現象を探索しようとする研究は国内外において報告されていない。

2. 研究の目的

小さな細胞から産生された基質によって組織構造は形成される。形成された組織は、これら細胞の共同作業により極性を持ち、かつ、その大きさを増す。骨梁も同じ機構により、一定方向へ伸び、太く成熟していくと考えられている。しかし、どのようにして細胞が骨梁に極性を与え、均一にその太さを増すのかは明らかになっていない。そこで本研究では細胞極性に着目し、近年注目されている核と細胞骨格を結ぶ LINC 複合体を siRNA で阻害することにより、核の局在を喪失させ、極性を失わせた骨芽細胞を作成し、その細胞の骨梁形成に着目する。

3. 研究の方法

1) siRNA を用いた Nesprin-1 ノックダウン実験

骨芽細胞様細胞株 Saos2 細胞に対して、Nesprin-1 遺伝子の siRNA を遺伝子導入することで、細胞骨格アクチンと細胞核との結合

を切断し、細胞極性を失わせる。遺伝子導入後、3日経過した時点で細胞固定およびタンパク回収を行い、Nesprin-1 に対する蛍光免疫染色およびウエスタンブロッティング法によりノックダウンの効果を確認する。これまでに、血管内皮細胞において Nesprin-1 を発現抑制すると、機械的刺激に対する細胞核の形態反応が異なることが報告されていることから、上記の Nesprin-1 ノックダウン細胞を用い、ストレッチチャンパー内で培養後、顕微鏡にて細胞核の形態・大きさを確認し、力学応答機構に及ぼす影響を確認する。また、同時に mRNA およびタンパクを回収し、骨芽細胞の分化マーカーとして知られる Type Collagen・ALP・Osteocalcin といった遺伝子の mRNA およびタンパクレベルにおける発現変化をリアルタイム PCR にて確認する。

具体的には、以下のものである。

細胞培養ディッシュ (60) に骨芽細胞を播種して 24 時間後に siRNA 導入を行った。まず、siRNA (20 μ M) 溶液をサンプリングチューブに 10 μ M 入れ、低血清培地 OPTI-MEM (Life Technologies) を 90 μ L を加えピペティングした。別のサンプリングチューブにリポフェクション試薬である DharmaFect1 Transfection Reagent (Dharmacon) を 2 μ M、OPTI-MEM を 98 μ M 加えピペティングした。5 分間静置した後それぞれのチューブの溶液を混合し、更に 20 分間静置した。その後、OPTI-MEM で 2 回洗浄した細胞培養ディッシュに siRNA 溶液および OPTI-MEM を 1.8mL 加えた (siRNA 終濃度 100nM)。インキュベーター内で 24 時間培地した後、トランスフェクション培地を取り除いて MEM-培地に交換し、更にインキュベーター内で 48 時間培養した。

ストレッチチャンパー (Strex) の底面を親水化処理装置 (Vacuum Device) で処理した後、0.1mg/ml の I 型コラーゲン溶液をストレッチチャンパー内に入れ 4°C で一晩静置した。クリーンベンチ内でリン酸緩衝生理食塩

水で3回洗浄した。20,000 cells/mlになるように希釈した細胞溶液2mlをチャンバーに加え24時間培養し実験に用いた。

2) 繰り返し進展刺激負荷

細胞を播種したストレッチチャンバーを装着しインキュベーター内において繰り返し伸展刺激を24時間負荷した。伸展刺激負荷の周波数1Hz、ひずみ15%とした。無負荷群として静置培養した骨芽細胞を用意した。

伸展刺激後のストレッチチャンバーから培地を取り除き、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で15分間静置し細胞を固定した。次に、PHEM bufferで希釈した0.1%Tritonx-100に5分間浸した。ブロックエース(メグミルク)を加え1時間静置した。ブロックエースで希釈した一次抗体、続いて二次抗体を加え、それぞれ1時間静置した。Hoechst33342(Invitrogen)を加え5分間静置した。最後にAlexa Flour 546 phalloidinを加え20分間静置した。細胞の観察には蛍光顕微鏡(Olympus)を用いた。

形態解析には画像解析ソフトImage J (National Institutes of Health)を用いて細胞面積、逆アスペクト比、配向角を求めた。まず画像から細胞輪郭を手動的に抽出した。細胞輪郭を相当楕円に近似し、楕円短軸長を長軸長で除したものを逆アスペクト比として細胞伸長の指標とした。配向度は、近似した楕円形状の長軸方向と伸展方向に垂直な方向とのなす角で0°から90°までの範囲で求めた。

3) 凹凸表面構造を用いたノックダウン細胞の培養実験

骨芽細胞の細胞極性が、凹凸表面構造の認識に重要であることを検討するため、上記実験で作製したノックダウン細胞を、立体構造を持つ三次元細胞培養用シート上で培養し、細胞増殖の方向性や形態に及ぼす影響を顕

微鏡にて確認する。また、実際に幼弱な骨梁構造が成熟する過程を再現するために、ニトリ頭蓋冠における凹凸構造の鋳型を作製し、リソグラフィーにて作製した凹凸構造上で上記同様に細胞培養を行う。細胞が凹凸表面構造上にいかにして増殖し、形態変化をおこすのかを、共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、ノックダウン細胞と正常骨芽細胞との挙動差異を明らかにする。また、上記実験と同様に分化マーカーおよび基質産生に与える影響を確認する

4. 研究成果

si RNAを用いたNesprin-1のノックダウン実験を行った。準備できるsi RNAはヒト用であることから、対象細胞はヒトの骨芽細胞様細胞株Saos2細胞とした。DharmaFECTを用いたトランスフェクション法およびLipofectamineを用いたトランスフェクション法の両方によって、si-Nesprin1を導入し、Nesprinの核の局在が減少されるのを抗Nesprin1抗体を用いた免疫蛍光法にて観察した。その結果、両方法ともコントロールsiRNAを用いた群に比べてNesprin1の核局在を著しく減少させた。さらにWestern blotting法によりsi-Nesprin1が蛋白レベルでの発現を抑制していることが確認された。よって、Saos2細胞へのsi-Nesprin1の導入はなされていることが確認された。

次に、凹凸表面構造を用いたノックダウン細胞の培養実験を行った。骨芽細胞の細胞極性が、凹凸表面構造の認識に重要であることを検討するため、上記実験で作製したノックダウンSaos2細胞を、立体構造を持つ三次元細胞培養用プレート上で培養し、細胞増殖の方向性や形態に及ぼす影響を顕微鏡にて確認する。三次元Nanoculture plateとしてScivax社の培養プレートを用いて20 μ 四方のマイクロウェルに1-4細胞が入るように培養液を調整した。Nesprin1のノックダウンに伴う細胞極性の消失が細胞のマイクロウェル

内での細胞の配列になんからの影響を与えるかを検討した。観察には、抗 Nesprin1 抗体による免疫蛍光法および蛍光標識されたファロイジンを用いた蛍光化学法による2重染色を行った。結果として、Nesprin1 の発現の抑制は確認されたものの細胞の配列において両者に有意な差は認められなかった。

同時にメカニカルストレスにおける Saos2 の細胞極性に与える変化を観察するために研究分担者である首都大学東京システムデザイン学部の坂元尚哉先生に依頼して Saos2 に対して flexer cell unit による細胞の伸展実験を行った。しかしながら、コントロールとして用いたマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞では細胞が進展された方向に対して、直角に配列することが確認されたが、Saos2 ではそのようなメカニカルストレスに対する配列の変化は生じることがなかった。よって、Nesprin1 をノックダウンした Saos2 細胞の実験はコントロール細胞でのレスポンスが観察されないことから行われなかった。このような背景のもと、現在対象として用いる細胞をヒトからマウスへの変更するために、siRNA の設計から再度見直しを迫られている状況である。

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 3 件)

M. Hashimoto, N. Nagaoka, K. Tabata, T. Tanaka, R. Osumi, N. Odagaki, T. Hara, H. Kamioka, Three-dimensional morphometry of collagen fibrils in membranous bone. Integrative Biology. Vol. 9 pp.868-875, 2017. (査読有)

N. Sakamoto, M. Ogawa, K. Sadamoto, M. Takeuchi, N. Kataoka: Mechanical role of nesprin-1-mediated nucleus-actin filament binding in cyclic stretch-induced fibroblast elongation.

Cellular and Molecular Bioengineering, Vol. 10, pp. 327-338, 2017. (査読有)

N. Sakamoto, K. Sadamoto: Effect of low oxygen conditions on matrix metalloproteinase-9 production of macrophages subjected to cyclic stretching: involvement of ERK and Rho kinase pathways. Journal of Biomechanical Science and Engineering, Vol. 12, pp. 16-00590, 2017. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

坂元 尚哉, 香嶋謙志郎, 定本 紀代美, 小川 麻衣, 片岡 則之, 竹内 雅貴: 伸展刺激による線維芽細胞核力学特性変化に対する Nesprin を介した力学伝達の寄与. 日本機械学会第 30 回バイオエンジニアリング講演会. 京都, 2017 年 12 月 14 日. (ポスター)

坂元尚哉, 定本紀代美, 小川麻衣, 片岡則之, 竹内雅貴, 香嶋謙志郎: 細胞核-アクチンフィラメント結合が伸展刺激による細胞核力学特性変化に果たす役割. 第 37 回バイオトライボロジシンポジウム. 東京, 2017 年 3 月 11 日 (口頭)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上岡 寛 (KAMIOKA, Hiroshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80253219

(2) 研究分担者

坂元 尚哉 (SAKAMOTO, Naoya)
首都大学東京・システムデザイン研究科
・准教授

研究者番号：20361115

早野暁 (HAYANO, Satoru)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20633712