

## 骨芽前駆細胞の骨分化過程における細胞核の力学特性の計測

Measurement of the mechanical properties of the nucleus  
in bone differentiation process of osteoblastic cells

○児玉文基(名工大) 長山和亮(名工大) 松本健郎(名工大)

Fumiki KODAMA, Nagoya Institute of Technology, Gokiso-cho, Syowa-ku, Nagoya 466-8555

Kazuaki NAGAYAMA, Nagoya Institute of Technology

Takeo MATSUMOTO, Nagoya Institute of Technology

**Abstract:** The purpose of this study is to elucidate the effects of the mechanical environment of cell nuclei and their mechanical properties on bone differentiation in osteoblastic cells. We investigated the changes in the three dimensional morphology of nuclei in osteoblastic cells during their calcification process, and found that the nuclei reduced their height and volume significantly during calcification. We also measured Young's modulus of the nuclei in the calcified and uncalcified cells using atomic force microscope-based nano-indentation tests. No significant difference was observed in Young's modulus of nuclei between the two groups. These results may indicate that mechanical environment around cell nucleus rather than its mechanical properties affect the bone differentiation process of osteoblastic cells.

## 1. 緒言

細胞は与えられた力学環境に応じて、増殖性や運動性、物質産生などの機能や、細胞の分化の方向までも変化させる<sup>(1)</sup>。骨形成を担う骨芽細胞も、力学環境に応じて能動的な機能変化を見せる代表的な細胞であり、そのことから当研究室では、引張・圧縮などの力学刺激が骨芽細胞様細胞に対してどのような影響を与えるか詳しく調べてきている。最近、骨芽細胞様細胞の細胞密度が上昇すると、細胞内のアクチンフィラメントが細胞の輪郭に分布し、さらに細胞核の面積が減少し、石灰化に至ることなどが分かってきた<sup>(2)</sup>。これらのことから、細胞の骨分化が進む過程では、細胞内の力の分布や構造の変化が生じ、細胞核に加わる力やひずみ、さらには核の構造や力学特性などが変化する可能性がある。そして、そのような変化が核内の特定の遺伝子の発現などに影響を与えている可能性があるが、その詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、細胞核の構造や力学特性の変化と細胞の分化との関連性を明らかにすることを目的とした。今回は、その第一歩として、まず、骨芽細胞様細胞の骨分化が進行し、石灰化が生じる過程において、細胞核の形態を観察し、核の体積・高さの変化を調べた。さらに、核の力学特性に注目し、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた微小押込み試験によって、核膜近傍の弾性率の変化を調べた。

## 2. 実験方法

## 2.1 試料

試料にはヒト骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞株 Saos-2 を用いた。これを 10% ウシ胎児血清 (ICN) と抗生物質 (Penicillin-Streptomycin, Gibco) を含む  $\alpha$ -MEM (Wako) 培地 (以下通常培地) 中で、37°C、湿度 ~100%、5% CO<sub>2</sub>-95% Air の環境で継代培養した。

## 2.2 石灰化に伴う細胞核の形状変化の観察

直径 50 mm のガラスボトムディッシュ (GWS-5040, WillCo-dish) のガラス面に、細胞接着を促すために 0.05% 濃度のコラーゲン溶液を 1ml 滴下し、完全乾燥させることでコラーゲンコートした。そして、Saos-2 を 100 cells/mm<sup>2</sup> の細胞濃度で播種した。細胞の石灰化を促すため、通常培地 500 ml に  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウム 5.4 g、アスコルビン酸 0.025 g、デキサメタゾン 20  $\mu$ g (いずれも Wako) を溶かした培地 (以下、骨誘導培地) に交換して培養した。

5 日ごとに培養中のディッシュをランダムに 1 つ選択し、10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、細胞核を SYTO13

(Invitrogen) で蛍光染色した。そして、1 条件につき 15 個の細胞をランダムに選択し、共焦点レーザー顕微鏡システム (Digital Eclipse C1, Nikon) および 60 倍油浸対物レンズ (NA=1.45) を用いて、細胞の最上部から最下部までの断面画像を 0.25  $\mu$ m 毎に取得した。得られた断面画像を用いて核の断面積を画像解析ソフトウェア (Image J, NIH) で計測した。複数枚の断面画像の中で、核の断面が最大となる画像について自動で二値化処理を施し、核の輪郭の輝度閾値を求めた。そして、この閾値を他の各画像にも適用して、各断面の核の面積を求めた。それぞれの画像での核の断面積の和と画像間距離 0.25  $\mu$ m との積をとり、細胞核の体積を得た。最後にアリザリンレッド S (Wako) により染色して石灰化の有無を確認し、細胞の骨分化の進行度合いを検討した。

## 2.3 石灰化前後の細胞核の弾性率の計測

石灰化前後の細胞核の力学特性を比較するために、2.2 節と同様に通常培地と骨誘導培地で培養した細胞を準備した。通常培地で培養した細胞を未分化群とし、骨誘導培地で 25 日間培養して石灰化を確認した細胞を骨分化群とした。これらに対し、予め核を Hoechst33342 (Invitrogen) で蛍光染色して可視化し、原子間力顕微鏡 (BioScope Catalyst, Bruker AXS: 以下 AFM) のカンチレバーによる核の微小押込み試験を以下のように行った。

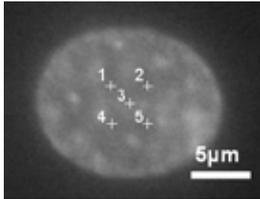
細胞内の核に対して押込み試験を行うと、核周辺の細胞骨格が大きく影響する可能性がある。特にアクチンフィラメントと微小管は細胞内張力に大きな影響を与えていると考えられ<sup>(3,4)</sup>、核の力学特性への影響が大きいことが予想された。そこで本研究では、細胞内に核が保持された状態で、これらの細胞骨格を、それぞれサイトカラシン D (2  $\mu$ g/ml) とコルヒチン (1  $\mu$ g/ml) で 1 時間処理して選択的に脱重合した後、押込み試験を行った。

カンチレバーの押込みは、核上面の核の投影面積の重心と、それを中心とする 1 辺 3  $\mu$ m とする正方形を定義し、その頂点 (4 点) で押込み試験を行うこととした (Fig.1)。使用したカンチレバーのばね定数は約 0.07 N/m で、1  $\mu$ m/s の押込み速さで、荷重が 1 nN に達するまで押込んだ。特に核膜近傍の力学特性を求めるために、得られた荷重とカンチレバーの下降量の関係 (フォースカーブ, Fig. 2) について、押し込み量が約 300 nm の範囲をヘルツモデル (式 1) で曲線近似して、核膜の弾性率を求めた。

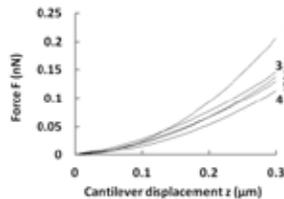
$$F = \frac{2E \tan \alpha}{\pi(1-\nu^2)} \delta^2 \quad (1)$$

$$\delta = z - \frac{F}{k} \quad (2)$$

ここで  $F$  は押し込み荷重,  $E$  は核の弾性率,  $\alpha$  は探針の先端の半角,  $k$  はカンチレバーのバネ定数である.  $\delta$  は試料の変形量であり, 試料に接触した後のカンチレバーの下降量  $Z$  からレバーのたわみ  $F/k$  を引いた値である.  $\nu$  は試料のポアソン比であり, 非圧縮性を仮定して  $\nu=0.5$  とした<sup>(5)</sup>. 同一の核について, 前述の 5 点で計測した弾性率の平均値をその核の弾性率とした.



**Fig. 1** Typical example of fluorescent image of nucleus of Saos-2 and its locations of indentation by AFM (crosses).



**Fig. 2** Force-cantilever displacement curve of nucleus shown in Fig. 1.

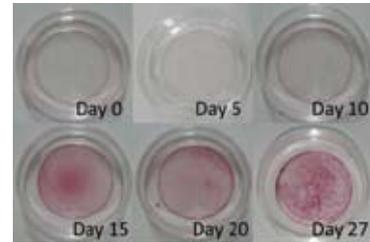
### 3. 結果および考察

骨誘導培地中で培養した Saos-2 について, アリザリンレッド S で石灰化を確認した代表画像を Fig. 3 に示す. 培養 10 日目までは培養ディッシュ内に赤染領域は確認できなかったが, 培養 15 日目以降には顕著に赤染された領域が見られ, 石灰化が進行していることが分かった. 培養中の細胞核の体積 (Fig. 4) と高さ (Fig. 5) の変化を調べた結果, 培養開始から 10 日目までは核の体積, 高さともにほとんど変化が見られなかった. しかし, 培養 15 日目以降はどちらも有意に減少し, 培養 20 日目には培養開始時と比較して体積は約 40%, 高さは約 10% 減少した. すなわち, Saos-2 の石灰化が進行する同時に, 核が縮小する可能性が示唆された. また, 石灰化が進行するに従い, 核の体積や高さのばらつきも比較的減少しているようにも見えた.

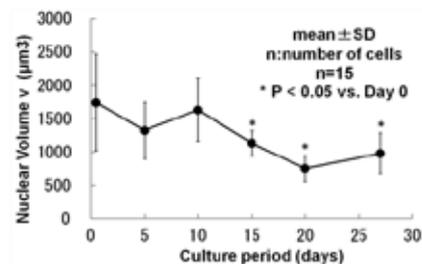
次に, AFM による核の微小押し込み試験から得た未分化群および骨分化群の核の弾性率を Fig. 6 に示す. 本研究では, アクチンフィラメントと微小管を脱重合した状態で, かつ, 微小な押し込み範囲で試験を行っているため, 核膜そのものの力学特性が得られていると考えられる. 未分化群, 骨分化群ともに, 同じ核でも部位によって弾性率が大きくばらつく試料が見られた. 両群において核膜の弾性率の平均値には変化が見られず, 弾性率の変動係数にも有意な差は見られなかった. 骨分化過程で, 核が縮小化しているにもかかわらず, 核膜そのものの力学特性は, あまり変化していないと考えられる. したがって, 先に見られた Saos-2 の石灰化過程における核の縮小化には, 細胞内での核周辺の力学環境の変化, 特に核周辺の細胞骨格が関与している可能性が高い. 特にアクチンフィラメントと微小管は細胞内張力に大きな影響を与えていると考えられ, 血管平滑筋細胞や内皮細胞などでは, これらの有無によって, 細胞核付近の細胞高さ<sup>(4)</sup>や核の面積<sup>(6)</sup>が大きく変化することが報告されている. 本研究で対象とした Saos-2 においても, アクチンフィラメントと微小管の破壊によって, 未分化群の核の投影面積が  $142 \pm 41 \mu\text{m}^2$  (mean  $\pm$  SD,  $n=44$ ) から  $163 \pm 61 \mu\text{m}^2$  ( $n=60$ ) へ有意に増加した. Saos-2 においても核の形態維持には細胞骨格が大きく関与しており, 石灰化を起す際に, これらの細胞骨格の形態や分布が変化し, 核周

辺の力学環境を変化させているかもしれない.

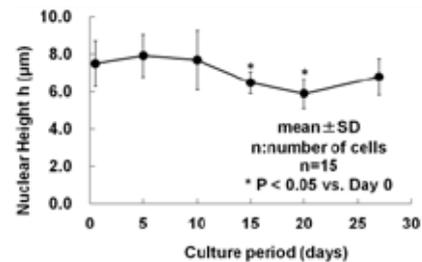
今後は, 未分化群, 骨分化群において, アクチンフィラメントや微小管などの細胞骨格の形態変化を詳細に調べるとともに, これらが, 核周辺の力学環境や, 細胞の骨分化過程にどのような影響を与えるのか, 詳しく調べていく必要がある.



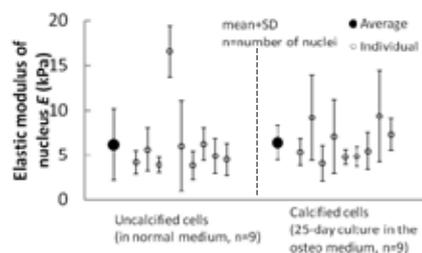
**Fig. 3** Typical examples of alizarin red S staining in mineralized area of Saos-2 cells cultured in the osteoinductive medium.



**Fig. 4** Time-course changes in nuclear volume of Saos-2 cells cultured in the osteoinductive medium.



**Fig. 5** Time-course changes in nuclear height of Saos-2 cells cultured in the osteoinductive medium.



**Fig. 6** Elastic modulus of nucleus of Saos-2 cells following disruption of actin and tubulin.

### 参考文献

- (1) Engler AJ et al, Cell, 126, 677-689, 2006.
- (2) 平岡謙二, 名古屋工業大学工学研究科修士論文, 2009.
- (3) Wang N et al, PNAS, 98, 7765-7770, 2001.
- (4) Nagayama K et al, Am J Physiol Cell Physiol, 295, 1569-1578, 2008.
- (5) McKee CT et al, Biophys J, 101, 2139-2146, 2011.
- (6) Deguchi S et al, J Mech Behav Biomed Mater, 2, 173-185 2009.