

インターセルを用いた NHEK (NB) との共培養による NHDF (NB) の増殖への影響

1. 目的

ファイibroプラストをケラチノサイトと共培養することによってファイibroプラストの増殖性および遺伝子発現の変化を調べる。インターセル TP を使用することで両細胞は非接触状態で培養することが可能となり、両細胞における液性因子のみの影響を調べることができる。

2. 材料と方法

細胞 : NHDF (NB) (新生児包皮由来) (Cat No. KF-4009、Strain No. 05882)
NHEK (NB) (新生児包皮由来) (Cat No. KK-4009、Strain No. 09186)

培地 : ①ファイibroプラスト培養用無血清増殖培地: FibroLife Comp kit (Cat No. LL-0001)
②ケラチノサイト培養用無血清増殖培地: Humedia-KG2 (Cat No. KK-2150S)

共培養用培養器

: インターセル TP (透視タイプ、24 穴マルチプレート用、膜孔径 0.45 μ m)



培地①および②を使ってファイibroプラストおよびケラチノサイトをそれぞれ前培養し、各細胞をトリプシン処理によって回収した。回収したファイibroプラストは 24 穴マルチプレートに 4,000 個 (700 μ l) / ウェルで播種、ケラチノサイトはコラーゲン I-A をコートしたインターセル TP に 15,000 個 (200 μ l) / インターセルで播種した。播種翌日にファイibroプラストが播種された 24 穴マルチプレートにケラチノサイトを播種したインターセル TP を配置し (Fig.1)、ウェルおよびインターセルの培地を培地①および②の各培地で培地交換した。その後培地交換は 1 または 2 日おきに行い、3 日目および 6 日目にファイibroプラストの様子を写真撮影するとともに、細胞の増殖性を確認した。

細胞の増殖性の確認には、Cell Counting Kit-8 (CCK-8、同仁化学) を使用した。マルチプレート内の培地を除き、CCK-8 原液を培地①で 10 倍に希釈した溶液を 700 μ l / ウェルで添加、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベート後、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定し、各条件での増殖性を比較した。

遺伝子発現解析に使用した total RNA は QuickGene Auto12S システム (クラボウ) と RNA 抽出プロトコールによって分離した。定量と純度検査は吸光度測定により行い、品質検査はキャピラリー電気泳動システム (アジレントテクノロジー、Bioanalyzer2100) を使用した。発現解析には DNA マイクロアレイ (サーモフィッシュアサイエンティフィック、Clariom S Human Array, cat. 902927) を使用し、トータル RNA 100ng を開始サンプルとしてメーカーのプロトコールに従って実施した。SST-RMA アルゴリズムにより算出したシグナルの比率を算出しサンプル間の発現量の相対比較を行った。

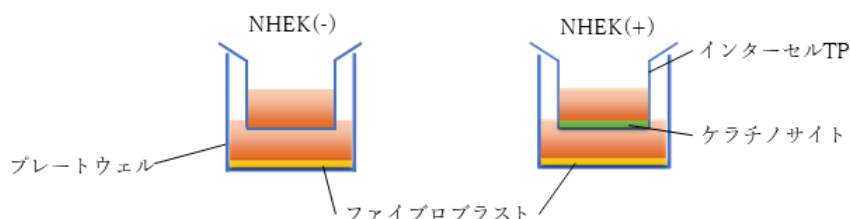


Fig. 1 共培養の模式図

プレートウェル内にファイibroプラスト (黄色) を播種し、インターセル TP 内にケラチノサイト (緑色) を播種して共培養した。

3. 結果

3-1. 増殖性の変化

ファイibroプラストとケラチノサイトを共培養して 3 日目および 6 日目のいずれにおいても、ファイibroプラストはケラチノサイトと共培養することでその増殖が促進されることが確認された (Fig.2)。6 日目では単独の場合と比較してケラチノサイト共存の場合にファイibroプラストは約 5 倍の細胞数となった。顕微鏡像でも細胞が非常に密な状態が観察された。

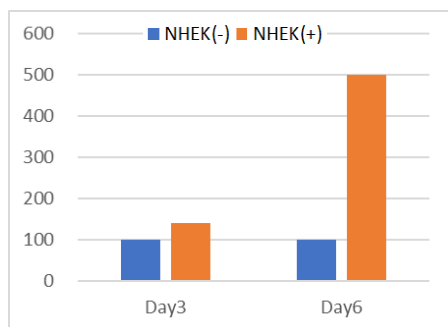


Fig. 2 ファイibroプラストの増殖性

培養 3 日目および 6 日目の生細胞数を CCK-8 アッセイで評価した。各培養日数でファイibroプラスト単独培養の場合を 100 とした。

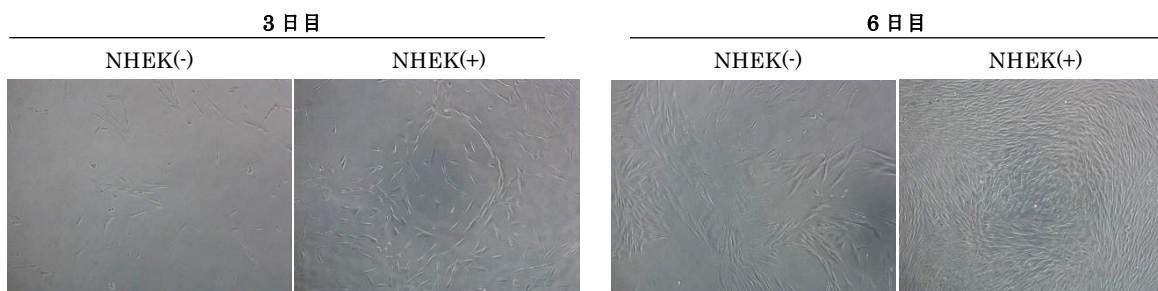


Fig. 3 ファイibroプラストの顕微鏡画像

ケラチノサイトと共培養せず単独で培養した場合は 3 日目から 6 日目までの増殖が緩やかであるのに対して、インターセル TP を介してケラチノサイトと共培養を行うと増殖が促進された。

3-2. 遺伝子発現の変化

培養 3 日と 6 日のケラチノサイトとの共培養なし(-)または、あり(+)のファイibroプラストから total RNA を抽出した。それらの収量と純度、品質は下表の通りで、DNA マイクロアレイ解析を行うために十分なものが得られた。

表1. ファイibroプラストから抽出した total RNA の定量および品質検査の結果

サンプル	収量(μg)	純度 A260/A280	純度 A260/A230	品質(RIN)	チャート
Day3 (-)	1.4	2.13	1.11	10.0	
Day3 (+)	4.5	2.17	1.53	10.0	
Day6 (-)	3.6	2.10	1.68	8.0	
Day6 (+)	9.3	2.10	2.03	10.0	

上記 4 つの total RNA に関してマイクロアレイ解析を実施し、各サンプルで約 2 万の遺伝子発現シグナルのデータを取得した。Fig.4 に 3 日目と 6 日目のシグナル散布図を示した。いずれの培養日数においても、著しく発現量が上昇または減少している遺伝子が認められた。

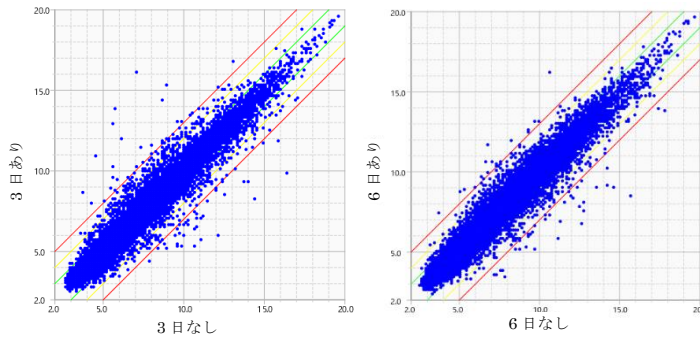


Fig. 4 マイクロアレイのシグナル散布図
ケラチノサイトとの共培養 3 日および 6 日のファイブプロラスト由来 total RNA に関する Clariom S アレイ解析を行い、共培養がない場合の蛍光シグナルを横軸、ある場合を縦軸にプロットした。シグナル値は Log_2 換算値であり、図中の緑、黄、赤の実線はそれぞれ発現量が 2 倍、4 倍、8 倍の境界を示す。

各日で発現変動が大きかった上位 20 個の遺伝子リストを表 2 に記した。培養 3 日では多様なケモカインリガンドの遺伝子発現が上昇していた。さらにインターロイキン 6 の上昇が見られ、これらの事象は既報と ([Front. Immunol., Volume 11, 06 May 2020](#)) 合致する。

表 2. 発現変動の大きかった上位 20 遺伝子

●3日目にケラチノサイト共存下で発現上昇したファイブプロラスト遺伝子上位20個

遺伝子名	倍率 (Log_2)
chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5), mRNA.	9.1
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), transcript variant 1, mRNA.	8.1
chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA.	7.3
matrix metalloproteinase 3 (MMP3), mRNA.	6.4
colony stimulating factor 3 (granulocyte) (CSF3), transcript variant 1, mRNA.	6.4
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (CXCL6), mRNA.	6.0
chemokine (C-X-C motif) ligand 8 (CXCL8), mRNA.	5.8
interleukin 1, beta (IL1B), mRNA.	4.9
serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 2 (SERPINB2), transcript variant 1, mRNA.	4.7
chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (CXCL3), mRNA.	4.1
chemokine (C-C motif) ligand 20 (CCL20), transcript variant 2, mRNA.	4.0
zinc finger CCH-type containing 12A (ZC3H12A), mRNA.	3.7
interleukin 6 (IL6), mRNA.	3.7
complement component 3 (C3), mRNA.	3.7
superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), transcript variant 1, mRNA.	3.6
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), transcript variant 2, mRNA.	3.5
SCL/TAL1 interrupting locus (STIL), transcript variant 1, mRNA.	3.5
transmembrane protein 154 (TMEM154), mRNA.	3.2
ribonucleotide reductase M2 (RRM2), transcript variant 2, mRNA.	3.2
neuregulin 1 (NRG1), transcript variant HRG-beta1c, mRNA.	3.1

●3日目にケラチノサイト共存下で発現低下したファイブプロラスト遺伝子上位20個

遺伝子名	倍率 (Log_2)
microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4), transcript variant 1, mRNA.	-6.6
insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.	-6.1
collagen, type XIV, alpha 1 (COL14A1), mRNA.	-6.1
early growth response 2 (EGR2), transcript variant 1, mRNA.	-5.3
elastin (ELN), transcript variant 1, mRNA.	-5.3
transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1), mRNA.	-4.7
sulfotransferase family 1E, estrogen-preferring, member 1 (SULT1E1), mRNA.	-4.5
osteolectin (OGN), transcript variant 3, mRNA.	-4.3
sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 (SPOCK1), mRNA.	-4.3
corin, serine peptidase (CORIN), transcript variant 2, mRNA.	-4.3
dermatopontin (DPT), mRNA.	-4.3
activating transcription factor 3 (ATF3), transcript variant 3, mRNA.	-4.2
heme oxygenase 1 (HMOX1), mRNA.	-4.0
periostin, osteoblast specific factor (POSTN), transcript variant 2, mRNA.	-4.0
sushi domain containing 2 (SUSD2), mRNA.	-4.0
sushi, nidogen and EGF-like domains 1 (SNED1), mRNA.	-4.0
regulator of G-protein signaling 4 (RGS4), transcript variant 1, mRNA.	-4.0
neurofilament, medium polypeptide (NEFM), transcript variant 2, mRNA.	-3.8
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa (IGFBP2), transcript variant 1, mRNA.	-3.7
platelet derived growth factor D (PDGFD), transcript variant 1, mRNA.	-3.7

●6日目にケラチノサイト共存下で発現上昇したファイブプロラスト遺伝子上位20個

遺伝子名	倍率 (Log_2)
superoxide dismutase 2, mitochondrial (SOD2), transcript variant 1, mRNA.	5.6
chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5), mRNA.	4.9
chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha) (CXCL1), transcript variant 1, mRNA.	3.9
tetratricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1 (TRANK1), mRNA.	3.8
complement component 3 (C3), mRNA.	3.7
prostaglandin F receptor (FP) (PTGFR), transcript variant 1, mRNA.	3.7
prolyl 3-hydroxylase 2 (P3H2), transcript variant 2, mRNA.	3.6
collagen and calcium binding EGF domains 1 (CCBE1), mRNA.	3.5
anillin actin binding protein (ANLN), transcript variant 2, mRNA.	3.5
tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 (TNFAIP3), transcript variant 2, mRNA.	3.4
mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor) (MASP1), transcript variant 3, mRNA.	3.3
histone cluster 1, H2bm (HIST1H2BM), mRNA.	3.3
interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (IRAK3), transcript variant 2, mRNA.	3.2
phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific (PLD1), transcript variant 2, mRNA.	3.2
chemokine (C-X-C motif) ligand 6 (CXCL6), mRNA.	3.2
ring finger protein 144B (RNF144B), mRNA.	3.1
chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2), mRNA.	3.1
centrosomal protein 128kDa (CEP128), mRNA.	3.1
cytochrome P450, family 7, subfamily B, polypeptide 1 (CYP7B1), mRNA.	3.0
solute carrier family 9, subfamily A (NHE9, cation proton antiporter 9), member 9 (SLC9A9), mRNA.	3.0

●6日目にケラチノサイト共存下で発現低下したファイブプロラスト遺伝子上位20個

遺伝子名	倍率 (Log_2)
insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3), transcript variant 2, mRNA.	-7.2
proenkephalin (PENK), mRNA.	-5.8
transforming growth factor, beta-induced, 68kDa (TGFB1), mRNA.	-5.6
early growth response 2 (EGR2), transcript variant 1, mRNA.	-5.3
elastin (ELN), transcript variant 1, mRNA.	-5.2
sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 1 (SPOCK1), mRNA.	-5.1
LON peptidase N-terminal domain and ring finger 2 (LONRF2), mRNA.	-4.7
sushi domain containing 2 (SUSD2), mRNA.	-4.7
cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle) (CHRNA1), transcript variant 2, mRNA.	-4.6
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa (IGFBP2), transcript variant 1, mRNA.	-4.5
peptidase inhibitor 15 (PI15), mRNA.	-4.5
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, rho 1 (GABRR1), transcript variant 2, mRNA.	-4.4
collagen, type XIV, alpha 1 (COL14A1), mRNA.	-4.0
microfibrillar-associated protein 4 (MFAP4), transcript variant 1, mRNA.	-4.0
uridine phosphorylase 1 (UPP1), transcript variant 3, mRNA.	-3.8
egl-9 family hypoxia-inducible factor 3 (EGLN3), transcript variant 2, mRNA.	-3.8
proteoglycan 4 (PRG4), transcript variant B, mRNA.	-3.7
solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3 (SLC5A3), mRNA.	-3.7
ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9 (ADAMTS9), mRNA.	-3.7
matrix Gla protein (MGP), transcript variant 2, mRNA.	-3.7

3日および6日の発現変動遺伝子群の機能分類を Gene Ontology Biological process のエンリッチメント解析により行った。ケラチノサイトとの共培養の有無によりファイibroプラストで4倍以上の発現上昇あるいは低下のあった遺伝子数は、3日上昇189/低下132、6日上昇111/低下140であった。エンリッチメント解析の結果を表3に示した。

培養3日目の発現上昇遺伝子には細胞分裂や細胞周期、DNA複製に関連するものが、また発現が低下した遺伝子には接着や細胞外マトリクス形成に関連するものが有意に含まれていた。

一方、培養6日目では「微小管」や「有糸分裂紡錘体」に関連する遺伝子が上昇し、亜鉛や銅イオンへの応答遺伝子の低下が見られた。

表3. 発現変動遺伝子群の機能分類エンリッチメント解析

培養3日および6日にケラチノサイトとの共培養によって発現量が変動したファイibroプラストの遺伝子群を Gene Ontology によって機能分類した。データ分析は David Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>) で実施した。

●3日目にケラチノサイト共存下で発現上昇したファイibroプラスト遺伝子群の機能分類

Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GO:0051301~cell division	37	12	1.7E-25
GO:0007052~mitotic spindle organization	14	31	2.9E-13
GO:0007049~cell cycle	23	8	4.5E-11
GO:0006270~DNA replication initiation	10	45	1.7E-10
GO:0000278~mitotic cell cycle	16	13	3.2E-10
GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	10	36	1.1E-09
GO:0007059~chromosome segregation	12	20	3.2E-09
GO:0007094~mitotic spindle assembly checkpoint	9	35	1.6E-08
GO:0071222~cellular response to lipopolysaccharide	15	10	5.4E-08
GO:0051310~metaphase plate congression	7	63	7.2E-08

●6日目にケラチノサイト共存下で発現上昇したファイibroプラスト遺伝子群の機能分類

Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GO:0007018~microtubule-based movement	7	16	1.9E-03
GO:0006954~inflammatory response	12	6	1.9E-03
GO:0007052~mitotic spindle organization	6	21	2.1E-03
GO:0000281~mitotic cytokinesis	6	18	3.4E-03
GO:0071222~cellular response to lipopolysaccharide	8	8	6.4E-03
GO:0051301~cell division	10	5	1.3E-02
GO:0006935~chemotaxis	6	10	3.5E-02
GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway	5	15	3.5E-02
GO:0000070~mitotic sister chromatid segregation	4	23	5.1E-02

●3日目にケラチノサイト共存下で発現低下したファイibroプラスト遺伝子群の機能分類

Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GO:0007155~cell adhesion	20	6	2.2E-06
GO:0030198~extracellular matrix organization	10	9	3.9E-04
GO:0032870~cellular response to hormone stimulus	6	31	3.9E-04
GO:0043065~positive regulation of apoptotic process	12	6	2.2E-03
GO:0035914~skeletal muscle cell differentiation	6	19	2.5E-03
GO:0030199~collagen fibril organization	6	16	6.4E-03
GO:0097435~supramolecular fiber organization	4	42	1.5E-02
GO:0032868~response to insulin	6	11	2.5E-02
GO:0071456~cellular response to hypoxia	7	8	3.3E-02
GO:0045600~positive regulation of fat cell differentiation	5	14	4.3E-02

●6日目にケラチノサイト共存下で発現低下したファイibroプラスト遺伝子群の機能分類

Term	Count	Fold Enrichment	FDR
GO:0071294~cellular response to zinc ion	7	43	1.1E-05
GO:0010273~detoxification of copper ion	6	57	2.3E-05
GO:0045926~negative regulation of growth	6	48	3.4E-05
GO:0006882~cellular zinc ion homeostasis	7	29	3.4E-05
GO:0071280~cellular response to copper ion	6	31	2.3E-04
GO:0071276~cellular response to cadmium ion	6	22	1.1E-03
GO:0030198~extracellular matrix organization	9	8	1.8E-03
GO:0007165~signal transduction	23	3	2.8E-03
GO:0097435~supramolecular fiber organization	4	41	1.3E-02

製品情報

自動核酸分離システム QuickGene-Auto12S <https://www.kurabo.co.jp/bio/nucleic/product/qg/a12s/>

■対応サンプル

DNA: 全血、動物組織、植物組織、培養細胞、大腸菌(プラスミド DNA)、FFPE

RNA: 血球細胞、動物組織、植物組織、培養細胞、ウイルス

