

FP-39 REGULATION OF MORPHOLOGY AND GENE EXPRESSION BY THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE OF TYPE I COLLAGEN FIBRILS IN CULTURED HEPATIC STELLATE CELLS

Mitsuru Sato, Takeya Sato, Naosuke Kojima, Mitsutaka Miura, Katsuyuki Imai, DaRen Wang, Nobuyo Higashi, Shinsuke Suzuki, and Haruki Senoo
Department of Anatomy, Akita University School of Medicine, Akita 010-8543, Japan

Hepatic stellate cells (HSCs), vitamin A-storing cells located in the perisinusoidal spaces between the sinusoidal endothelial cell lining and the parenchymal cell cord, extend long cellular processes and surround hepatic sinusoids *in vivo*. However, when isolated and cultured in polystyrene dishes or in type I collagen-coated dishes, HSCs lost vitamin A-containing lipid droplets and altered to myofibroblast-like phenotype with well-developed stress fibers and without cellular processes.

In this study, we examined a morphological change and a differential gene expression by histological and differential display studies in HSCs cultured using type I collagen gel as a substratum. When cultured on type I collagen gel, HSCs exhibited an *in vivo* morphology with long cellular processes. The results from these studies suggest that HSCs were recognizable two- or three-dimensional structure of extracellular type I collagen fibrils and induced to elongate their processes *via* intracellular signaling and microtubule reorganization. The lability of the processes to cold-treatment at 4 °C suggested that the elongated processes of HSCs were composed of a dendrite-type of microtubules. We demonstrated the involvement of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in process elongation in cultured HSCs by immunofluorescence staining and immunoblotting. MAP2 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR, indicating no increase in MAP2 mRNA level in HSCs cultured using type I collagen gel. Therefore, the MAP2 activity appeared to be posttranscriptionally regulated in cultured HSCs. The results from differential display analysis indicated that several mRNA species including transcription factor SP1, breast cancer resistant protein (BCRP), dystonin, and KIF-associated protein 3 (KAP3) were differentially regulated by extracellular type I collagen. Dystonin and KAP3 are known to be involved in cytoskeleton organization and function. Taken together, cell surface binding to extracellular type I collagen fibrils may trigger an alteration in expression of cytoskeleton-related proteins such as MAP2, dystonin, and KAP3, in association with reorganization of microtubule for process elongation.

FP-40 骨髄ストローマ細胞表面のフィブロネクチンによる破骨細胞分化制御

東京工業大学生命理工学研究科¹、新潟大学歯学部²、帝人(株)医薬開発研究所³、大阪大学蛋白質研究所⁴

新井智¹、網塚憲生²、東由明^{1,3}、関口清俊⁴、工藤明¹

＜目的＞RANKLはpreB細胞上に発現が認められるが、破骨前駆細胞との共存培養で破骨細胞は形成されない。このことは、破骨細胞の分化はRANK-RANKLによってのみ制御されるのではなく、RANKL以外のストローマ細胞上の因子によって、調節を受けている可能性がある。本研究では、破骨細胞の分化を制御するストローマ細胞表面分子を検出することを目的とした。

＜方法と結果＞破骨細胞形成を支持するストローマ細胞株TSB13を抗原とし、モノクローナル抗体を作成した。スクリーニングの結果、TSB13上の表面分子に結合する抗体A15-1を得た。免疫組織染色で抗原は骨表面のストローマ細胞に発現が認められ、活性型ビタミンD₃の投与を続けたマウスの骨髄で抗原の発現上昇が見られた。抗原は、間葉系細胞株のみに広く発現していた。A15-1を破骨前駆細胞とストローマ細胞の共存培養系に加えたところ、破骨前駆細胞から単核破骨細胞への分化がおこる最初の日間のみ加えたとき、破骨細胞分化阻害が認められた。しかし、ストローマ細胞を用いない可溶性RANKLによる破骨細胞分化は阻害しなかった。高カルシウム血症モデルマウスの腹腔内にA15-1を投与したところ、破骨細胞数、骨吸収活性ともに抑制傾向が認められた。大量に蛋白を集め、免疫沈降後CBB染色でone-bandを切り出し、アミノ酸配列を決定したところ、この抗原はフィブロネクチンであった。フィブロネクチンのantisense-oligopeptideをTSB13にtransfectionし、細胞表面での発現を低下させたところ、共存培養系における破骨細胞形成活性は低下した。この結果はフィブロネクチンが破骨細胞分化を制御することを抗体のみならず、遺伝子レベルでも証明できたことを示す。

＜考察＞A15-1の処理により、*in vivo*、*in vitro*で破骨細胞形成が阻害されたことから、細胞表面のフィブロネクチンがストローマ細胞依存性の破骨細胞分化に必須である可能性が示唆された。フィブロネクチンと破骨前駆細胞上のインテグリンと相互作用により生じたシグナルがRANK-RANKLによる破骨細胞形成シグナルを補助したものと考えられる。