

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01361

研究課題名(和文) 動的ストレッチ刺激に対する骨芽細胞カルシウムシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Osteoblastic calcium signaling response to dynamic stretching stimuli

研究代表者

佐藤 克也 (SATO, Katsuya)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・講師

研究者番号：10403651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題により、まず細胞伸展マイクロデバイスの改良を達成した。これまでの一度だけの伸展付与と保持を行う実験系から、1Hzで30分間の持続的・動的伸展刺激を付与する実験系の確立に成功し、骨芽細胞の動的伸展刺激に対するカルシウムシグナル応答を詳細に観察した。一度だけの伸展を付与し、保持した場合には、骨芽細胞のカルシウムシグナル応答は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇量が大きく、かつ持続時間も長かった。それに対して、持続的・動的伸展刺激を付与した場合には、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇量が小さく、また持続時間も短いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、骨芽細胞に対して一度だけの伸展を付与し、保持した場合と動的な繰り返し伸展刺激を付与した場合には、細胞のカルシウムシグナル応答の応答特性が異なることが見いだされた。これは、運動など身体運動による力学的刺激が一般的に骨形成を促進するのに対して、歯科矯正において静的かつ持続的な荷重の付与が骨吸収を引き起こすという、力学的刺激の形態が異なると、それに対する骨代謝活動が正反対となる現象に対する細胞レベルでの応答の違いを示唆するものである。この研究課題をさらに進展させることにより、力学的刺激の形態を適切に選択することで骨代謝活動を人為的に制御する技術への発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have succeeded in improving originally developed cell stretching MEMS device. The improved device can apply cyclic stretching stimuli to the cell with 1Hz frequency and 30mins duration. We have conducted precise observation of osteoblastic calcium signaling response to dynamic and cyclic stretching stimuli. In case of applying static and held stretch to the cell, the magnitude of increase in intracellular calcium ion concentration was higher than that of the response to dynamic and cyclic stretching. And also duration time of calcium signaling response to static and held stretch was longer than that of dynamic and cyclic stretching stimuli.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：細胞バイオメカニクス 力学的刺激 メカノトランスダクション 骨芽細胞 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、周囲の力学環境に応じてその構造・機能が変化することが知られており、遺伝子・生化学物質に加わる第三の細胞制御因子としての力学的刺激利用が注目を集めている。しかしながら、様々な形態の力学的刺激に対する骨組織のリモデリング応答は単純ではなく、例えば歯科矯正のような一方向への持続的な荷重負荷が歯槽骨の吸収を伴う歯の移動をもたらすのに対して、歩行などの動的荷重負荷は骨形成を促進させる。このように、骨組織レベルでは静的荷重と動的荷重では正反対のリモデリング応答が誘起される。したがって、相反する複雑なリモデリング応答を解析し、適切なモデルを構築することがこれからの骨再生エンジニアリングにとって不可欠である。

しかしながら、基質変形すなわちストレッチ刺激に対する細胞応答評価では、ストレッチ刺激付与に対する細胞増殖能や遺伝子発現の変化など、生化学的シグナルカスケードの下流に位置するような、日・時間オーダーでの細胞応答を評価した報告例は多数存在するものの、シグナルカスケードの上流に位置する、刺激負荷から秒オーダーで生起される細胞の最初期応答に関する報告はほとんど存在しない。つまり、動的ストレッチ刺激を骨芽細胞がどのように感知し応答するのか、その最上流部での機構や特性は未解明なままである。したがって、持続的な(静的な)ストレッチ刺激と動的なストレッチ刺激に対する骨芽細胞の応答特性の違いや、その制御機構を明らかにすることが緊急の課題であると考えられる。

本研究課題はこのような背景のもとに遂行されるもので、ここから得られた知見が前述の歯科矯正や歩行運動などの様々な形態の力学的刺激によって誘起される複雑な骨組織リモデリング機構の解明を加速し、骨再生エンジニアリングの臨床応用へ貢献するものと期待できる。

外部から加わる刺激に対する細胞応答の最初期応答の一つがカルシウムシグナル応答である。このカルシウムシグナル応答は刺激付与から msec オーダーの非常に短時間で生起する応答であり、かつ他のシグナル発動のトリガーを引く役割を担いカスケード最上流に位置する。したがって、ある刺激に対する細胞の感知・応答機構を論ずる場合にはその最上流部に位置するカルシウムシグナル機構を解き明かすことが必要不可欠となる。

2. 研究の目的

骨組織では、歯科矯正に見られるような持続的(静的)荷重負荷と歩行のような動的荷重負荷では、骨の吸収あるいは形成促進といった全く正反対の組織リモデリングをもたらす。しかしながら、これらの素過程に位置する骨芽細胞の活動が、荷重負荷の形態によってどのような影響を受けるのか。また骨芽細胞がどのようにして負荷の形態を感知しているのか。その仕組みは明らかにされていない。

本研究では、動的な繰り返しストレッチ刺激を受ける骨芽細胞のカルシウムシグナル応答について、詳細なその場観察に基づきそのダイナミクスを明らかにすることで、静的荷重と動的荷重の違いに対して細胞がどのように感知・応答し、細胞内カルシウムシグナルをどのように制御しているのか。その機構を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

この研究では、動的ストレッチ刺激を受ける細胞の詳細なリアルタイムその場観察を通じて、細胞内カルシウムシグナルのダイナミクスを明らかにし、その制御機構を解明する。

- (1) 細胞伸展 MEMS デバイスの改良により、正確に制御された動的繰り返しストレッチ刺激の付与を実現する。
- (2) 動的繰り返しストレッチ刺激のひずみ振幅、繰り返し周波数などを変化させ、それに対する骨芽細胞カルシウムシグナルの応答特性および動態を明らかにする。
- (3) カルシウムシグナルパスを検討するための各種試薬を用いて、動的ストレッチ刺激に対する骨芽細胞のカルシウムシグナル制御機構およびシグナルパスについて明らかにする。

(1) 細胞伸展 MEMS デバイスの改良

細胞伸展 MEMS デバイスを正確な動的繰り返しストレッチが付与できるように改良再設計する。現状の細胞伸展 MEMS デバイスは、ストレッチを付与後その状態を保持する、いわゆる持続的なストレッチを付与するためのものである。既存のデバイスでは、アームの端部にマイクロマニピュレーターに接続した金属針先端を引っ掛け、操作することでストレッチシートにストレッチを付与する仕組みとなっている。この場合、ストレッチ付与後の戻す動作ではシートの弾性力によりストレッチ前の形状へ戻っていた。

これに対して、本研究課題で取り扱う動的ストレッチ刺激は繰り返し周期 1 Hz ~ 30 Hz 程度を想定しており、ストレッチシート弾性復元力のみでは金属針の繰り返し往復運動に追従できない可能性が高い。そこで、金属針をアームに引っ掛けるのではなく、アームに金属針と接続するためのアダプターとなる構造を新たに設け、金属針の往復運動をストレッチ時・ストレッチ解除時の双方向でアームに伝達できるように再設計を行う。

なお、アーム部分が弾性ヒンジであるため長時間の繰り返し動作によって疲労破壊する可能性がある。その場合には、アーム部全体を対象とし、繰り返し動作を考慮して構造設計をやり直して対応する。

(2) 動的ストレッチ刺激の繰り返し周波数やひずみ振幅を変化させた場合の骨芽細胞カルシウムシグナル応答特性の評価

動的ストレッチ刺激によって生起される骨芽細胞内カルシウムイオン濃度の振動を示唆する現象について、再現性の確認を行う。現在の実験系では、カルシウムイオン蛍光指示薬と細胞質染色薬の二種類の蛍光輝度比を用いてカルシウムイオン濃度変動を計測するレシオメトリー法により、ストレッチに起因するモーションアーチファクトの影響を低減している。より正確にモーションアーチファクトの影響を差し引くために、意図的にフォーカスをずらした場合の蛍光輝度比の変動を定量的に評価することで、カルシウムシグナルによる変動とモーションアーチファクトによる変動とを切り分ける。もし、この切り分けがうまくいかない場合には、実験効率は低下するが、FRET 現象を利用したインジケーターによってより精緻なレシオメトリー観察が可能となる遺伝子導入型の蛍光タンパク質カルシウムイオン濃度計測法の採用を検討する。

次に、動的ストレッチの繰り返し周波数やひずみ振幅を変化させて、カルシウムイオン濃度の振動現象にどのような影響が出るかを明らかにする。具体的には、付与するストレッチのひずみ波形に対して細胞内カルシウムイオン濃度振動の位相遅れはどのように変化するか。また、そもそもどの程度の周波数まで濃度変化が追隨して振動するか。などを明らかにする。

(3) 動的ストレッチ刺激に対する細胞内カルシウムシグナルのダイナミクスを制御するシグナルパス・機構の解明

細胞内カルシウムシグナルについて、イオン濃度上昇では細胞外からの細胞膜上チャネルを介したカルシウムイオンの流入および細胞内カルシウムストアからの放出の経路が一般的に知られている。また、濃度下降では、細胞膜上のカルシウムポンプによる汲み出しおよび細胞内カルシウムストアへの再取り込みの経路が知られている。しかしながら、本研究課題が対象とする動的ストレッチ刺激に生起される骨芽細胞の細胞内カルシウムイオン濃度の振動現象では、これらの機構およびシグナルパスがどのように働き、細胞内のカルシウムイオン濃度を動的に制御しているのか全く明らかになっていない。そこで、これらのシグナルパスを個別に阻害する試薬を用いて、骨芽細胞のカルシウムシグナル応答に与える影響を検討し、その機構を明らかにする。

具体的には、細胞外のカルシウムイオンのキレートや、伸展活性チャネルを阻害するガドリニウム、カルシウムストアの働きを阻害するタブシガルギンなどを組み合わせ、動的ストレッチ刺激に対する骨芽細胞のカルシウムシグナル応答に及ぼす影響について検討する。例えば、ある特定のシグナルパスを阻害した場合に、骨芽細胞内カルシウムイオン濃度の振動現象が消失あるいは減弱することが予想され、主要なシグナルパスを特定することが出来る。また、動的ストレッチのひずみ振動波形に対するカルシウムイオン濃度振動の位相遅れが変化することも予想され、細胞内カルシウムシグナルの動的制御機構に関する知見を得ることが期待できる。

4. 研究成果

本研究課題により、まず細胞伸展マイクロデバイスの改良を達成した。これまでの一度だけの伸展付与と保持を行う実験系から、1Hz で 30 分間の持続的・動的伸展刺激を付与する実験系の確立に成功し、骨芽細胞の動的伸展刺激に対するカルシウムシグナル応答を詳細に観察した。一度だけの伸展を付与し、保持した場合には、骨芽細胞のカルシウムシグナル応答は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇量が大きく、かつ持続時間も長かった。それに対して、持続的・動的伸展刺激を付与した場合には、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇量が小さく、また持続時間も短いことを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Katsuya Sato, Oki Matsubara, Eiji Hase, Takeo Minamikawa, Takeshi Yasui	4. 巻 24
2. 論文標題 Quantitative in situ time-series evaluation of osteoblastic collagen synthesis under cyclic strain using second-harmonic-generation microscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2316607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katsuya SATO, Manabu Katayama, Shoichiro Fujisawa, Tasuku Nakahara and Kazuyuki Minami	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of initiating characteristics of osteoblastic calcium signaling response to stretch by video rate time-course observation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1299/jbse.17-00519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Eiji Hase, Takeo Minamikawa, Takahiko Mizuno, Shuji Miyamoto, Ryuji Ichikawa, Yi-Da Hsieh, Kyuki Shibuya, Katsuya SATO, Yoshiaki Nakajima, Akifumi Asahara, Kaoru Minoshima, Yasuhiro Mizutani, Tetsuo Iwata, Hirotsugu Yamamoto and Takeshi Yasui	4. 巻 5
2. 論文標題 Scan-less confocal phase imaging based on dual-comb microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Optica	6. 最初と最後の頁 634-643
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1364/OPTICA.5.000634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuyuki MINAMI, Tatsuya HAYASHI, Katsuya SATO and Tasuku NAKAHARA	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of micro mechanical device having two-dimensional array of micro chambers for cell stretching	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Microdevices	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10544-017-0256-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuyuki MINAMI, Tatsuya HAYASHI, Katsuya SATO and Tasuku NAKAHARA	4. 巻 20
2. 論文標題 Development of micro mechanical device having two-dimensional array of micro chambers for cell stretching	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Microdevices	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10544-017-0256-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Katsuya SATO, Ryuta YASUI, Tasuku NAKAHARA and Kazuyuki MINAMI
2. 発表標題 Different characteristics of calcium signaling response between needle indentation stimuli and substrate stretching stimuli in osteoblast cell
3. 学会等名 8th World Congress of Biomechanics (WCB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Katsuya SATO, Eiji Hase, Takeo Minamikawa and Takeshi Yasui
2. 発表標題 Quantitative in situ time-series evaluation of osteoblastic collagen synthesis under cyclic strain using second-harmonic-generation microscopy
3. 学会等名 BISC - OPTICS & PHOTONICS International Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大森 大輝, 渡部 雄基, 中原 佐, 南 和幸, 佐藤 克也
2. 発表標題 数十Hz帯域での繰り返しストレッチに対する骨芽細胞のカルシウムシグナル応答
3. 学会等名 日本機械学会中国四国学生会 第49回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今川 尊稔, 須谷 和弘, 峯田 一秀, 橋本 一郎, 中原 佐, 南 和幸, 佐藤 克也
2. 発表標題 持続的な繰り返しストレッチ刺激に対する真皮線維芽細胞のCa ²⁺ シグナル応答
3. 学会等名 第29回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 克也, 山本蒼馬, 中原佐, 南和幸, 藤澤正一郎
2. 発表標題 ストレッチおよびストレッチリリースに伴う骨芽細胞内カルシウム濃度変動の観察
3. 学会等名 第30回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安井龍太, 中原佐, 南和幸, 藤澤正一郎, 佐藤克也
2. 発表標題 伸展保持および繰り返し伸縮に対する骨芽細胞カルシウム応答の違い
3. 学会等名 第30回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

徳島大学 教育研究者総覧
<http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/187661/work-ja.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	南 和幸 (MINAMI Kazuyuki) (00229759)	山口大学・大学院創成科学研究科・教授 (15501)	