

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01398

研究課題名(和文) 軟骨遺伝子転写応答のin-situフィードバックによる最適力学負荷システムの開発

研究課題名(英文) Development of an optimized mechanical stimulation system for cartilage tissue culture using in-situ feedback of the gene transcriptional response

研究代表者

山本 浩司 (Yamamoto, Koji)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：70536565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：再生医療において、目的の組織を生体外でより効率的・効果的に再生できる培養環境の構築は極めて重要な課題である。本研究では培養とともに変化する組織状態に応じて刺激制御可能な新規培養システムの開発を行った。力学刺激の最適化により軟骨組織の基質合成を促進させることを目指し、本研究ではまず力学刺激に対して軟骨内のコラーゲン線維の向きが細胞応答に及ぼす影響を明らかにした。また、力学刺激がコラーゲン構造体の形態形成に及ぼす影響を検討し、コラーゲンの合成に関連した遺伝子の転写応答をライブモニタリングすることで、細胞の代謝活性に応じた外部刺激の最適化を図ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養組織のタンパク質合成を促すために数多くの刺激条件探索が行われているが、装置や培養担体が変わると再度条件を再構成する実験が繰り返されている。本研究で開発したシステムでは遺伝子転写情報を利用することで、細胞の状態に適応した刺激制御を行うため、培養環境の影響が少なく効率的な刺激パターンの生成が可能となる。また、転写応答を利用しているため、力学刺激に対する分子応答が解析可能であり、新規分子経路の同定など、再生医療分野における新たな発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In regenerative medicine, it is required to develop a system enabled to culture tissue effectively in vitro. In this study, we have developed an optimized mechanical stimulation system for cartilage tissue culture using in-situ feedback of the gene transcriptional response. To reveal the relation between mechanical stimulation and production of matrix proteins of chondrocytes, we initially evaluated the effect of an orientation of collagen fibers on cellular response to mechanical stimulation in cartilage tissue. Secondly, we investigated the effect of mechanical stimulation on the formation of collagen constructs. Considering these results, we successfully optimized the mechanical stimulation adapting to cellular metabolism using in-situ monitoring of the collagen-specific gene response.

研究分野：生体医工学

キーワード：軟骨再生 再生医療 in-situフィードバック 力学刺激 転写応答 最適化

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療において、目的の組織を生体外でより効率的・効果的に再生できる培養環境を構築することは極めて重要な課題であり、スキャフォールドや成長因子の創出と並んで、物理刺激を細胞・組織に負荷する装置の開発が進んでいる。例えば軟骨組織培養においてこれまで種々の物理刺激が細胞形質の維持や基質タンパクである型コラーゲン、アグリカンの産生を促すことが報告されてきた。歩行を想定した生理的力学環境としての圧縮刺激や、関節運動を模擬した滑り刺激、あるいは軟骨組織内の静水圧刺激などが例として挙げられる。しかし、装置や培養環境によって効果が認められる実験条件は異なっており、同一力学的条件においても装置間や実験環境で矛盾する結果が報告されている。確かに条件探索の繰り返しによって効果の一端や、機械刺激が分子発現に及ぼす影響に関する知見を得ることは可能である。しかし、フィードフォワードに刺激量や刺激のタイミングを固定すると、軟骨組織の培養に伴う基質量や構造の変化、およびそれらによる細胞の代謝活性の変化により、刺激が常に最適な効果を生み出すとは限らない。そこで力学刺激に伴う細胞の代謝活性の変化に対して、基質産生に関連した遺伝子発現を *in situ* でモニタリングし、それらの情報に基づいて外部刺激を制御することで、刺激効果の最大化や効率化を目指した新たな培養システムの構築を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究では、培養過程で変動する軟骨細胞周辺力学場の情報と細胞個々の代謝活性に関係する遺伝子転写情報をマッピングし、培養中に外部刺激量に対して *in-situ* フィードバックを行うことで、軟骨基質産生に対して最適な力学負荷を可能とする新規培養システムの構築を目的とする。そのために本研究では力学刺激に対する軟骨細胞外基質の構造と細胞応答の関係を明らかにし、力学刺激に対する遺伝子発現のライブモニタリング手法の開発を行う。軟骨細胞はコラーゲン線維や多糖タンパク質が豊富に含まれる細胞外基質に囲まれているため、コラーゲン線維の配向や密度などが外的刺激を細胞に伝達する過程で影響を及ぼす。そのため、まず *ex-vivo* 軟骨組織内において、力学刺激に対する細胞応答を、 $Ca^{2+}$ により検討し、基質構造と細胞応答に関する知見を得ることを目指す。次にコラーゲン線維の配向を考慮した *in-silico* 力学場解析モデルを用いて、細胞応答に影響を及ぼす力学因子の同定、および力学刺激に対する *in-situ* コラーゲン構造変化の解析により、刺激の伝達と基質構造に関する検討を行う。また、各力学場の中で細胞の代謝活性をモニタリングするために、力学刺激に応答する基質関連遺伝子プロモーターの転写領域を同定し、蛍光発現遺伝子を用いて遺伝子発現状態を時間的、空間的に可視化可能とするシステムの開発を行う。これらにより、軟骨基質産生に対する力学場の最適分布を目指した外部刺激制御法を確立し、刺激効果の最大化を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 軟骨組織内の力学刺激に対する刺激応答解析

細胞応答として細胞内カルシウムシグナルに着目し、圧縮過程における軟骨組織の細胞内  $Ca^{2+}$ 変動を経時的に解析した。*Ex vivo* で試験を行うために、試料には生後6か月のブタ膝関節から採取した半月柱型軟骨組織片を使用し、 $Ca^{2+}$ 蛍光プローブには Fluo4 を用いた。ひずみ量 5%、10%、15%、ひずみ速度 0.01/s、0.1/s、1/s の条件で Fluo4 を導入した軟骨試料を圧縮し、組織全体に渡り細胞の蛍光輝度を経時的に計測し画像解析を行った。また、粘・異方性超弾性構成式に基づく軟骨組織モデルを用いて動的陽解法による有限要素解析を行い、 $Ca^{2+}$ 動態に影響を及ぼす力学的要因を検討した。

### (2) 力学刺激が軟骨基質コラーゲン構造に及ぼす影響の評価

刺激負荷培養におけるコラーゲン構造の形成過程や、構造構築に及ぼす力学的影響はほとんど解明されていない。そこで引張刺激を軟骨細胞に負荷可能であり、基質コラーゲン構造の経時変化を *in situ* で解析可能な装置の開発を行い、刺激に対する基質構造変化の検討を行った。ブタの膝関節軟骨から採取した軟骨細胞に対して周期的な引張刺激を3日間負荷し、同一観察点におけるコラーゲン構造の形成過程を多光子励起顕微鏡の画像から経時的に解析した。

### (3) 遺伝子応答に基づく力学刺激制御法の確立

軟骨基質関連遺伝子の転写応答に着目し、細胞周囲の力学場状態に応じてそれらの転写応答が最大化するよう刺激を動的に制御可能な新規培養システムの構築を行った。マウスの遺伝子を利用して、軟骨分化マーカーである *Col2a1* 遺伝子の転写を制御するプロモーター領域下に蛍光タンパク質を接続したレポーターベクターを作製し、*Col2a1* 発現動態を *in situ* で蛍光観察可能とした。次に、軟骨分化モデル細胞にレポーターベクターを導入し、分化に伴う蛍光輝度変化と定量 PCR による *Col2a1* 発現量変化との相関を検証するため、遺伝子導入した細胞に対して周期的な引張ひずみを負荷する培養を6日間行った。刺激に対する蛍光輝度の変化と定量 PCR の結果を比較し、最適なプロモーター領域の同定を行った。

本ベクターを用いて細胞の蛍光輝度値から、刺激によるひずみ量と蛍光輝度の関係性を求め、細胞播種領域の蛍光輝度積算値が最大となるよう引張刺激を制御した。6日間刺激を制御し、定量PCRにより *Col2a1* 発現量を評価し、本システムの妥当性を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 軟骨組織内の力学刺激に対する刺激応答

圧縮に伴い、軟骨組織表層および表面から厚さ 60-80%領域程度の中間層および深層の境界領域で  $Ca^{2+}$  流入量が増加する傾向にあり、特に後者はひずみ速度が速いほど顕著であった。またひずみ速度が速い場合では、表層より先に中間層 - 深層の境界領域で輝度が上昇しており、組織内の刺激伝達に関する新規の知見を得た。また粘・異方性超弾性構成式に基づく軟骨組織モデルを用いて力学状態を解析し、ひずみや応力のプロファイルと、実験による蛍光輝度の組織内プロファイルを比較した結果、表層部位では圧縮ひずみ、中間層 - 深層の境界領域では平均応力との類似性が強く、これらは異方性パラメーターに強く影響を受けていることが解析により明らかになった。以上により、圧縮などの刺激に対して、軟骨組織内では急激な剛性・粘性の変化やコラーゲン配向の変化が細胞応答に影響を及ぼすことが示唆された。

##### (2) 力学刺激が軟骨基質コラーゲン構造に及ぼす影響

周期的な引張ひずみでは、ひずみが小さい時には培養初期に凝集したコラーゲン構造体が培養後期には細分化し、引張方向に伸展する傾向が見られた。一方、引張ひずみが大きくなると培養後期には凝集体の数が減少し、コラーゲン凝集体の平均面積が著しく増加したことから、ひずみの増加に伴いコラーゲン構造体同士の凝集が促進する可能性が示された。定量PCRにより細胞外基質関連の遺伝子発現を評価した結果、ひずみが大きい刺激の場合には、基質構造の安定化に寄与する遺伝子の発現が無刺激群に対して上昇することが明らかとなった。従って、ひずみの増加に伴いコラーゲン構造体の凝集が促進され、構造の質的安定化が進むことで、より大きな組織の形成に繋がったと考えられる。これらの結果から、力学刺激を利用して軟骨培養を行う場合に、組織状態を経時的に評価し刺激を制御することで、より効果的に構造変化や基質産生を促すことに繋がる知見を得た。

##### (3) 遺伝子応答に基づく力学刺激制御の効果

以上、(1)、(2)の研究を通して軟骨組織を効率的に培養することを目指し、細胞に及ぼされる力学場の情報やその力学場内で示す細胞応答を用いて外部刺激を制御することを試みた。力学応答をモニタリングするために、軟骨発生の解析で使用される *Col2a1* プロモーター領域内の配列を使用することで力学刺激に対する応答性の高いプロモーター領域の同定に成功した。また、細胞に及ぼされるひずみ場とレポータータンパク質の輝度情報から刺激の基質産生に及ぼす効果を推定する関数を導出することで、外部刺激を制御する方法を確立した。本システムにより、初期条件のみ設定することで、一日ごとに導出した関数より次なる刺激条件が決定され、それに基づき外部刺激を制御した結果、6日後に無刺激群に比べて優位に *Col2a1* 発現が高くなる結果を得た。本システムではパラメトリックスタディに頼らずとも培養効率を上げる可能性のある刺激の探索に成功しており、再生医療における新規力学刺激培養法として期待できる結果と言える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1 . 発表者名 Yamamoto S, Morita Y, Nakamachi E, Yamamoto K.
2 . 発表標題 Mechano-responsive Ca <sup>2+</sup> influx of chondrocyte increases at the boundary of cartilage zonal collagen structure
3 . 学会等名 25th Congress of European Society of Biomechanics ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Hamada K, Morita Y, Nakamachi E, Yamamoto K.
2 . 発表標題 In-situ analysis of time-dependent formation of cartilage collagen structure under mechanical stimulation
3 . 学会等名 25th Congress of European Society of Biomechanics ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Nakaseko T, Morita Y, Nakamachi E, Yamamoto K.
2 . 発表標題 In-situ evaluation of mechano-responsive Col2a1 expression of chondrocyte by using specific promoter gene
3 . 学会等名 25th Congress of European Society of Biomechanics ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Sato R, Nakaseko T, Morita Y, Nakamachi E, Yamamoto K.
2 . 発表標題 In-situ evaluation for tribological maturation process of tissue-engineered cartilage cultured under shear stimulation
3 . 学会等名 Tissue Engineering & Regenerative Medicine International Society - AP Chapter and the 7th Asian Biomaterials Congress ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Yamamoto K, Sato R, Morita Y, Nakamachi E,
2. 発表標題 Generation of lubrication function on the surface of cartilage tissue
3. 学会等名 The 11th International Biotribology Forum and The 40th Biotribology Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤遼弥, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司
2. 発表標題 軟骨潤滑機能の形成促進を目指したフィードバック制御型刺激負荷培養システムの開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本浩司, 中世古拓己, 森田有亮, 仲町英治
2. 発表標題 軟骨遺伝子転写応答のin-situフィードバックによる動的力学負荷制御法の確立
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中世古拓己, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司
2. 発表標題 力学刺激に対する軟骨基質遺伝子の特異的プロモーターを利用したin-situ発現動態評価
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本智史, 江口剛史, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司
2. 発表標題 細胞内Ca <sup>2+</sup> 変動を利用した圧縮刺激に伴う軟骨組織内刺激伝達プロセスの解析
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱田晃希, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司
2. 発表標題 多光子励起顕微鏡を用いた力学刺激に伴う軟骨基質コラーゲン構造形成の経時的解析
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本浩司, 中世古拓己, 森田有亮, 仲町英治
2. 発表標題 軟骨基質遺伝子特異的プロモーターを利用した力学刺激応答のin-situ発現動態評価システムの構築
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤遼弥, 中世古拓己, 森田有亮, 仲町英治, 山本浩司
2. 発表標題 軟骨潤滑機能形成のin-situ力学・分子変動情報を利用可能な刺激負荷培養システムの開発
3. 学会等名 日本機械学会 関西学生会2018年度学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	森田 有亮  (Morita Yusuke)  (80368141)	同志社大学・生命医科学部・教授    (34310)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------