

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700524
 研究課題名（和文） 臍細胞力学応答における細胞間ギャップ結合コミュニケーションの制御機構解明
 研究課題名（英文） Regulation of intercellular gap junction communication in tenocytes in response to mechanical stimulations
 研究代表者
 前田 英次郎 (MAEDA EIJIRO)
 北海道大学・大学院工学研究院・助教
 研究者番号：20581614

研究成果の概要(和文)：MEMS 技術を用いて、臍細胞生体内環境を模擬した微小溝実装 PDMS 製薄膜を組み込んだ実験デバイスを開発し、臍細胞のカルシウムイオン応答を観察した。生理的レベル（引張ひずみ 4%，せん断応力 0.1mPa）の力学負荷に対して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる細胞が観察され、特に同時引張りひずみ・せん断同時負荷の場合は反応を示す細胞の割合が有意に増加した。またギャップ結合を介した細胞間物質輸送を FLIP 実験によって定量的に評価することにも成功した。

研究成果の概要(英文)：A cell culture device mimicking *in vivo* environment of tenocytes has been developed, using MEMS fabrication techniques and PDMS. It was demonstrated using the device that intracellular calcium ion concentration was elevated in response to physiological mechanical stimulation (4% tensile strain or 0.1 mPa fluid shear stress), in particular that a significantly greater number of tenocytes increased the ion level when subjected to a combined stimulation of such tensile strain and fluid shear stress, compared to a control level. In addition, a quantitative evaluation of intercellular gap communication was succeeded using the current experimental model using a FLIP protocol.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス，メカノバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 生体組織内で細胞は多細胞ネットワークを形成し、ギャップ結合を介して相互に低分子化合物やイオンを輸送してシグナル伝達している (Gap Junction Intercellular Communication, GJIC)。関節軟組織である臍についても、臍組織の長軸方向に走行するコラーゲン線維間に沿って配向・存在している臍細胞が外因性力学刺激に反応する際、GJIC の存在が必須であることが示されている。そこで、どのように細胞が力学刺激に反応してギャップ結合 turnover を制御し、それに伴う GJIC の変化（輸送されるイオンや

低分子化合物の量的変化）が細胞機能に影響を及ぼすのかを調べることは、単に単離細胞の力覚機構の解明というこれまでの研究モデルにはない、細胞の力覚機構を多細胞ネットワークレベルで捉える新しい視点からのメカノバイオロジー研究となる。

(2) 組織内の臍細胞にはコラーゲン線維の伸長による引張ひずみと、それに伴う間質液流れに起因する流れせん断応力が作用していると考えられている。これまで、臍細胞の引張ひずみに対する応答については多くの研究が為されているものの、流れせん断応力に対する応答について検討した例は非常に少

なく、特に流れせん断応力と繰返し引張りひずみの複合力学刺激に対する応答についての理解は進んでいない。

(3) これまでの実験モデルには様々な制約があり、複合力学刺激を正確に負荷し腱細胞の細胞間 GJIC を詳しく調べるためには、新たな実験モデルの創出が急務である。

2. 研究の目的

(1) MEMS 技術を用いて作製した微小溝薄膜と微小流路系を組み合わせ、生体内力学環境を模擬した伸展と流れ負荷を同時に加えることのできるデバイスを作製し、その機能を検証する。

(2) 腱細胞の引張刺激と流れせん断刺激の単独または複合刺激に対する細胞内カルシウムイオン濃度の変化を調べる。

(3) 腱細胞間 GJIC を分子レベルとイオンレベルで調べ、その制御機構および機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験に用いる腱細胞は、生後 24~36 ヶ月の雄牛の中手指関節から伸筋腱組織片を採取し、これを酵素分解することで、組織内から単離した。10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ の環境下で腱細胞の継代培養を行った。実験には継代数 1~5 の細胞を用いた。

(2) 実験に用いたデバイスの概要を図 1 に示す。このデバイスは腱組織内のコラーゲン線維の配向を模擬した微小溝基質 (microgroove membrane) と流れせん断応力を負荷するための流路を搭載した微小流路系 (Flow cell) からなる。微小溝のパターンは長方形の領域 (10 mm × 15 mm) に、幅 10 μm、間隔 10 μm、深さ 10 μm の寸法で作製した。ネガレジスト SU-8 3010 をシリコンウェハ上にスピニングし、そこへフォトリソグラフィの微小溝パターンを紫外線露光することで描画した。その後現像を経て鋳型を完成させた。この鋳型にポリジメチルシロキサン (PDMS) を流し込み 90°C で 50 分間加熱硬化させることで微小溝基質を作製した。微小溝基質の表面をプラズマアッシャーを用いて表面改質することで別途作製した PDMS 製微小流路系と接合し実験デバイスを完成させた。

(3) 微小溝内の流れ場の実証実験として microPTV を行った。培養液に攪拌した蛍光ビーズ (直径 2.6 μm, Bnags Laboratories) をシリジポンプによって inlet から流入流速 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 ml/min で流路内に導入した。微小溝底面を流れる蛍光ビーズを経時観察し、微小溝内の流れ場を実験的に解析した。また、数値流体力学解析 (CFD) ソフト (ANSYS CFX, Cybernet) を用いて微小溝内の流れを解析し、実験結果と比較した。

次に細胞表面のせん断応力を求めるため細胞解析モデルの構築を行った。微小溝内の腱細胞を Calcein-AM (Dojindo) で染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞 z 方向の断面画像をステップサイズ 1.0 μm で取得した。この画像を画像解析ソフト V-Cat (理化学研究所)、3D モデリングソフト Rhinoceros (Aplicraft) を用いて ANSYS に組み込み細胞モデルを作製した。この細胞モデルに前述の流れ場を負荷し細胞表面のせん断応力を推定した。

さらに、デバイス伸展時に微小溝内の腱細胞にかかる引張りひずみを計測した。腱細胞を Calcein-AM (Dojindo) で染色し、デバイスに 1~8% まで 1% ごとに引張りひずみを加えた。このときの腱細胞の形態を蛍光顕微鏡を用いて撮影した画像データから、ImageJ を用いて長軸および短軸方向の腱細胞の変形量を求めた。

(4) 微小溝表面を Pronectin F (PF1001, Sanyo chemical industries) でコーティングし、腱細胞を播種した。実験の直前にカルシウムイオン指示薬 Fluo-4 AM (invitrogen) を EBSS で 5 μM に希釈した溶液をデバイスに注入し、37°C の温度下で 60 分間腱細胞にローディングした。

デバイスに周波数 0.5 Hz の振動流をシリジポンプ (Legato 210P, KD Scientific) を用いて送液することで流れせん断応力を負荷し、それに対するカルシウムイオン応答の様子を共焦点レーザー顕微鏡システムを用いて観察した。振動流流速は、生体内で腱細胞に負荷されるせん断応力に相当すると予想されている 0.4 mPa のせん断応力を負荷できるように、数値計算を通して決定した。実験ではそれぞれ 10 cycles, 100 cycles 負荷した後、細胞内のカルシウムイオン濃度の変化を 2fps で 5 分間観察した。取得した経時画像データを、ImageJ を用いて解析し、検査領域内の全ての腱細胞のカルシウムイオン濃度の経時変化を調べた。なお無負荷対照群として、流れ負荷前に 5 分間、同様の手順で腱細胞の Fluo-4 シグナルを記録した。

(5) デバイス内に導入した腱細胞にギャップ結合透過性蛍光分子 Calcein を導入するため、Calcein-AM で細胞をインキュベートした。その後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて FLIP 実験を行い、GJIC を観察した。その後、数値モデルに当てはめることで、ギャップ結合透過率を算出した。

4. 研究成果

(1) 実験系の構築

単離した腱細胞をデバイスには導入し、微小溝内で培養している様子を図 1(c) に示す。微小溝に沿って腱細胞が配列されている様子がわかる。

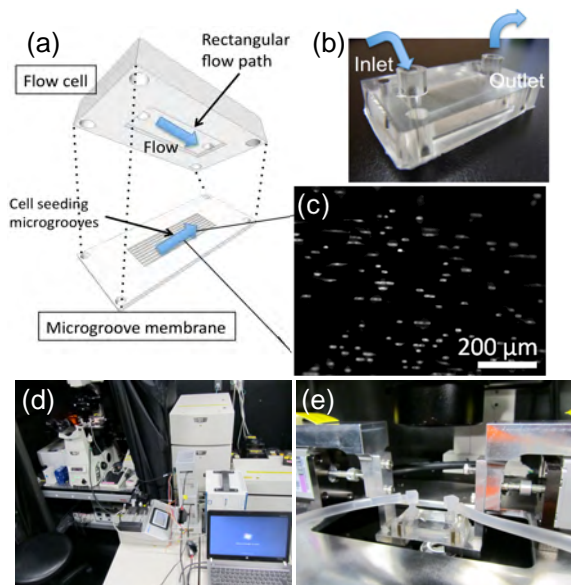


図 1 本研究で開発した腱細胞培養デバイスの (a)概略図および(b)外観図. (c)デバイス内微小溝に培養された腱細胞 (Calcein で蛍光標識). (d)顕微鏡上で細胞培養デバイスに伸展および流れ刺激を負荷する装置. (e)アクチュエータおよびシリンジポンプからの送液系に接続されたデバイス.

培養デバイスは図 1(d)および 1(e)に示すように、別途組み上げた伸展・流れ刺激同時負荷装置に接続し、顕微鏡観察下での細胞刺激を可能とした。

続いて、微小溝内の流れ場の PTV および CFD による解析結果を図 2 に示す。PTV によって微小溝内流れ場を測定した結果、流入流量 0.05-1.0 ml/min の範囲において、微小溝底面近傍では速度毎秒 0.6-17 μm/sec の流れが生成されることがわかった。この結果は有限要素法解析の結果と良く一致した。単一細胞に負荷されるせん断応力を計算したところ、流入流量 0.1 μl/min を細胞モデルに与えた場合、細胞表面のせん断応力は生理的とされる 0.1 mPa オーダーに近いせん断応力の負荷が可能であることが計算上確認された (図 3)。

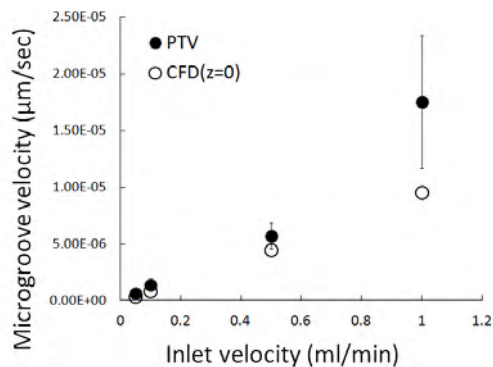


図 2 (a)PTV および CFD で求めた微小溝内流れの流速の比較.

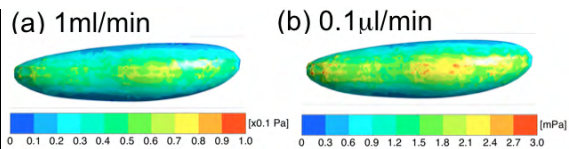


図 3 CFD により求めた、流量(a)1 ml/min および(b)0.1 μl/min で微小溝内単一腱細胞に作用する流れせん断応力の分布.

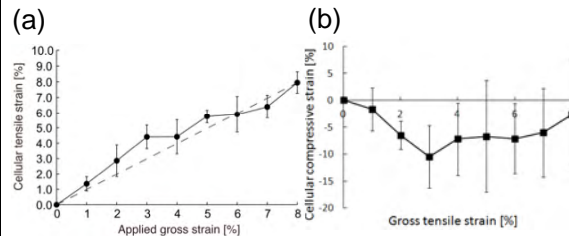


図 4 デバイスに引張りひずみを作用させた際に微小溝内腱細胞に作用する(a)引張および(b)圧縮ひずみ.

デバイスへの引張りひずみ負荷時の微小溝内の腱細胞に作用するひずみ量を図 4 に示す。腱細胞は微小溝内で伸展と水平な方向には引張りひずみ、垂直な方向には圧縮ひずみが負荷されていることがわかった。また、伸展方向の引張りひずみはデバイスの引張り量にほぼ比例する傾向が観察された。

これらの結果から、本デバイスを用いて任意に局所的細胞力学環境を構築することが可能であること、特に生理的な力学刺激 (4% ひずみ, 0.1mPa せん断応力) を培養細胞に負荷できることを確認した。

(2)カルシウムイオン応答実験

力学刺激負荷前に設定した無負荷観察時では、ほぼ全ての細胞でカルシウムイオン濃度に変化が見られなかった (図 5(a)). その一方、引張りひずみ、流れせん断応力の単独刺激ならびに伸展・せん断複合刺激に対して、カルシウムイオン濃度を上昇させる細胞が複数認められた (図 5(b)). 反応を示した細胞は、5 分間の観察時間の中で 1 回のカルシウムイオン濃度上昇を示したが、中には複数回イオン濃度を上昇させる細胞も認められた。このことから、腱細胞のカルシウム応答には細胞によりその感知能や応答能に差があることが示唆された。なお、過去に平面培養下で腱細胞の流れせん断応力に対するカルシウムイオン応答を検討した研究では応答は観察されなかった。本研究では微小溝基質上に腱細胞を播種することで形態的により生体内環境に近く、かつ力学刺激も生理的な条件下で実験を行っているため応答が観察されたと推察される。

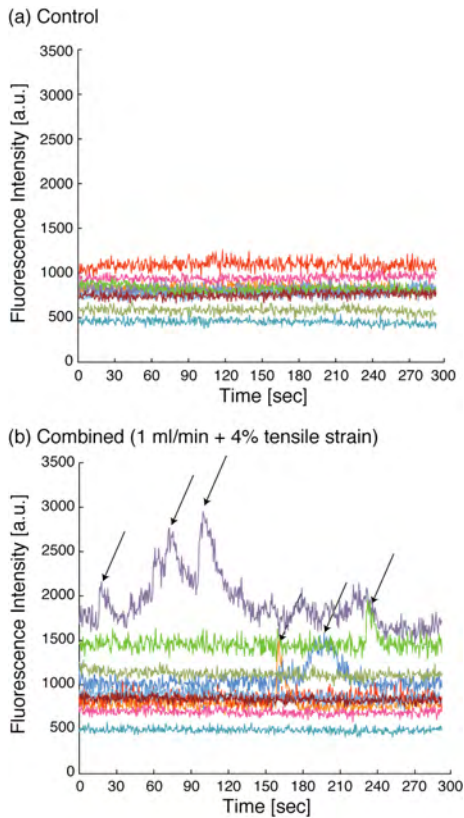


図 5 (a)無負荷状態ならびに(b)流量 1ml/min (せん断応力 0.1Pa オーダー)と 4%引張ひずみを作らせた場合の腱細胞内カルシウムイオン濃度変化. (b)に置ける矢印は濃度上昇ピークを示す.

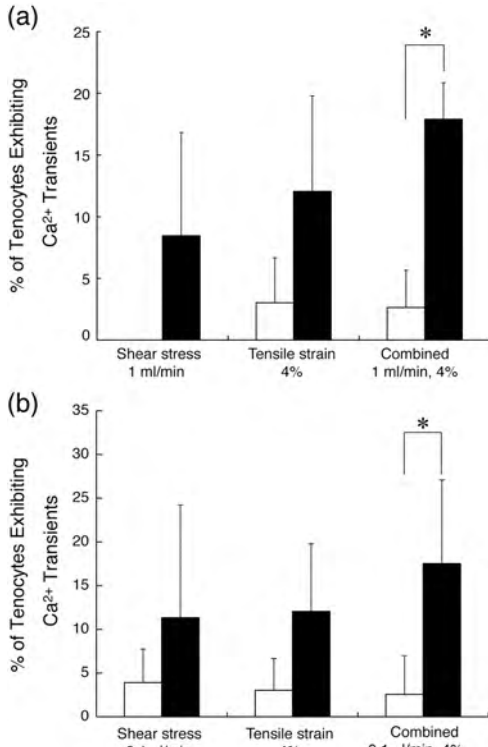


図 6 (a) 流量 1 ml/min と 4%引張ひずみの単独・複合刺激ならびに(b) 流量 0.1 μl/min と 4%引張ひずみの単独・複合刺激に対してカルシウムイオン濃度を上昇させた腱細胞の割合.
* p < 0.05.

単独あるいは複合刺激に応答した腱細胞の割合を調べたところ、引張・流れせん断の単独刺激によって応答した細胞の割合は、無負荷状態での応答細胞数の割合に比べて高いものの、統計的に有意な上昇ではなかった。一方、複合刺激に対して応答を示した細胞の割合は、無負荷状態での割合に対して有意に高かった。これは、1 ml/min, 0.1 μl/min のどちらの流量によるせん断応力の場合でも同じ傾向であった。

これらのことから、腱細胞は従来から調べられている引張ひずみに対する応答を示すのみならず、組織内間質液流れによるせん断応力を模擬した流れ刺激に対してもカルシウムイオン濃度を上昇させる応答を示すことが初めて発見された。さらに、これらの力学刺激を合わせた、複合刺激が負荷されると一段高い応答性を示すことも、世界で初めて明らかにされた。

(3) FLIP 実験

研究代表者前田が開発した FLIP 実験 (Maeda et al., Biomech Model Mechanobiol 2012) を用いて、デバイス微小溝内に配列培養された腱細胞間のシグナル伝達 (物質輸送) を可視化し、力学刺激負荷前後でのギャップ結合透過率の値を算出した (図 7)。その結果、振幅 4%の引張ひずみを周波数 1Hz で 1 時間作用させる前後では、腱細胞間ギャップ結合の透過率はいずれも 0.001[-/sec]となり、顕著な差はみられなかった。

前田が開発した FLIP 法においてギャップ結合透過率を算出する数理モデルはフィックの拡散理論を基に、細胞内拡散速度は細胞間拡散速度よりも著しく速いとしている (したがって、細胞内拡散を考慮に入れない)。今回、開発した培養デバイスで実験を行い、その数理モデルを適用したところ、あまり良いフィッティングが得られなかった。原因としては、上述の細胞内拡散の取扱いが不適切である可能性があることに加え、実験モデルの違い (生体組織と培養デバイス内での細胞の接続状態) があったためと考えられる。

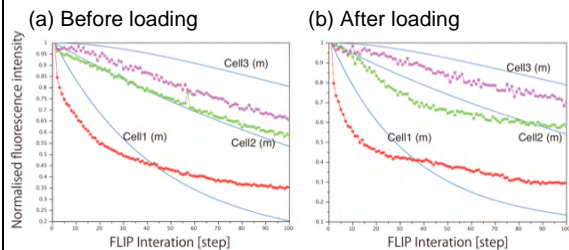


図 7 FLIP 法を用いて計測した、消光蛍光分子の拡散による隣接細胞の蛍光輝度変化 (赤, 緑, 紫のプロット), ならびにギャップ結合透過率を算出するためにそれぞれのプロットに対して数値計算で得られた輝度変化プロファイル (青の実線)。

(4) その他の関連実験

その他に行った関連実験として、腱細胞の力学刺激感知機構に密接な関連のある細胞骨格張力が細胞の生理的機能に及ぼす影響について、マイクロピラー基質というカンチレバー型基質を用いて実験を行い、腱細胞内張力と機能の関係を明らかにすると共に、力学刺激に対する応答機構の一端を明らかにした。

(5) 本研究のインパクトならびに今後の展望

本研究では、世界に先駆けて腱細胞研究を生体外で、かつ生理的に行う実験モデルを先端加工技術を用いて開発した。得られた結果から、世界で初めて腱細胞が流れせん断刺激に対して応答を示すことを実験的に示すとともに、引張・流れ複合刺激に対してより高い応答を示すことも観察した。

今後は単一細胞応答であるカルシウムイオン応答のみならず、FLIP 実験を用いた腱細胞間での応答についても研究を進める所存である。今回の研究から、これまで研究代表者が確立した細胞間物質輸送の数理モデルに修正を加えなければならないことが示唆された。この点について実験法の改善を行うと共に、様々な物理的な刺激に対する細胞応答を検討し、腱の炎症抑制や組織再生医療に役立つ知見を得ることを目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

E. Maeda, M. Sugimoto, T. Ohashi, Cytoskeletal tension modulates MMP-1 gene expression from tenocytes on micropillar substrates, *Journal of Biomechanics*, 査読有, 46(5), 2013, 991-997. DOI:doi.org/10.1016/j.jbiomech.2012.11.056

〔学会発表〕(計6件)

①前田英次郎, 萩原康文, James HC Wang, 大橋俊朗, 腱組織内環境を模擬した微小溝付き薄膜細胞培養デバイスの開発, 第34回日本バイオレオロジー学会年会, 2011/6/3, 関西大学, 大阪府。

②萩原康史, 前田英次郎, James HC Wang, 大橋俊朗, 微小溝付き新規細胞培養デバイスを用いた 腱細胞の力学応答解析, 第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012/1/7, 大阪大学, 大阪府。

③Eijiro Maeda, Yasuhumi Hagiwara, James H-C Wang, Toshiro Ohashi, A New Experimental System for the Study of Tenocyte Mechanobiology, 58th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2012/2/4-7, Moscone West Convention Center, San Francisco,

USA.

④ M. Sugimoto, E. Maeda, T. Ohashi, Elasticity-dependent regulation of traction forces and MMP-1 gene expression from tenocytes. 18th Congress of the European Society of Biomechanics, 2012/7/1-4, Instituto Superior Tecnico, Technical University of Lisbon, Lisbon, Portugal.

⑤杉本恵, 前田英次郎, 大橋俊朗, 細胞骨格張力が単離腱細胞の代謝能に与える影響. 日本機械学会 2012 年度年次大会, 2012/9/9-12, 金沢大学, 石川県。

⑥前田英次郎, 細胞内外にある流れ: メカノバイオロジーの観点から. 日本混相流学会オーガナイズド混相流フォーラム 2013「血液・細胞と混相流」(招待講演), 2013/12/5-6, 国民宿舎サンライズ九十九里, 千葉県。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 英次郎 (MAEDA EIJIRO)

北海道大学・大学院工学研究院・助教

研究者番号: 20581614