

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25702022

研究課題名(和文)力学・熱複合刺激による腱由来細胞炎症反応におけるギャップ結合シグナル伝達の寄与

研究課題名(英文)Gap junction intercellular communications in tenocyte inflammatory responses to mechanical and thermal stimuli

研究代表者

前田 英次郎(Maeda, Eijiro)

北海道大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20581614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,500,000円

研究成果の概要(和文)：過負荷が腱組織に繰り返し作用すると、組織温度は43度まで上昇する。この高温状態が腱細胞機能に変化を及ぼし炎症反応に繋がると考え、その過程におけるギャップ結合シグナル伝達(GJIC)の役割を明らかにすることを目的とした。43度30分間の温熱刺激によって腱細胞の炎症応答関連遺伝子の発現が上昇したがGJICには影響は見られなかった。GJICを阻害するとこれらの応答が更に亢進したことから、GJICの存在は抗炎症作用があることが明らかになった。また、引張りひずみ刺激に対して振幅に応じた応答を示し、生理的的刺激ではGJICが安定的に増強された一方で非生理的的刺激によってGJICは不安定になることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed to investigate tenocyte responses to severe mechanical and thermal stimuli and the contributions of gap junction intercellular communications (GJIC) to these responses. When tenocytes were subjected to heat stimulus at 43 °C for 30 minutes, there were significant increases in the expressions of genes related to inflammatory responses. In addition, these responses were further upregulated by the chemical inhibition of GJIC. Accordingly, the presence of GJIC may have an anti-inflammatory effect on tenocyte functions. In the case of the application of static tensile strain to tenocytes, there was an amplitude-dependent regulation of GJIC. The level of GJIC, evaluated as diffusion coefficient, was stably enhanced when tenocytes were subjected to physiological 4% static strain, whereas it became unstable when subjected to non-physiological 8% static strain.

研究分野：バイオメカニクス, メカノバイオロジー, 機械工学

キーワード：腱 炎症 ギャップ結合 温度 拡散係数 物質輸送

1. 研究開始当初の背景

生体結合組織には、四肢の動作に伴って力学刺激が作用し、その応答には物質輸送を介した細胞間ギャップ結合シグナル伝達 (Gap Junction Intercellular Communication, GJIC) が必須であるとされ、GJIC そのものも力学刺激によって変化することが示されている (Maeda et al., Biomech Model Mechanobiol, 2012a). 腱組織は生体内で引張力を主成分とする繰返し力学刺激に晒され、生理的なひずみ量を超える刺激が負荷されると細胞異化作用 (Catabolism) が亢進することが示唆されている (e.g. Maeda et al., J Appl Physiol, 2009). 非生理的環境が持続すると腱細胞は慢性的に catabolism が亢進する炎症反応を示し、組織の変性や異常形成が認められる炎症状態となる。この非生理的環境による腱炎発症プロセスに加え、組織内温度上昇が腱炎発症に深く関与していると推察されている。実際、繰返し力学負荷により組織に与えられたひずみエネルギーの一部が熱エネルギーに変換され、腱中心部温度が運動中に約 43°C まで上昇することが、ヒトアキレス腱 (Farris et al., J Biomech, 2011) などについて報告されている。しかしながら、腱細胞の高温環境下における応答については、高温下での生存率 (Birch et al., J Exp Biol, 1997) に焦点が当てられたのみである。過負荷や高温環境下における細胞機能変化の詳細や、その細胞機能変化と GJIC との関連などは明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、腱炎の発症や慢性化に関わるメカニズムとして、過負荷と高温環境が作用する環境において GJIC と腱細胞機能がどのように変化するかを調べることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の 4 項目の順で遂行された。

- (1)細胞培養環境温度調節装置の開発
- (2)細胞間・細胞内物質輸送数理モデルの確立
- (3)腱細胞における引張りひずみ量と GJIC の定量的関係
- (4)腱細胞における細胞環境温度と GJIC の定量的関係

4. 研究成果

- (1)細胞培養環境温度調節装置の開発

腱細胞の生体内形態および配列を生体外

培養環境で模倣するため、代表者はこれまでに微小溝 (microgroove) を搭載した PDMS 弾性薄膜を細胞培養基盤とした培養デバイスを開発した。本研究では、デバイス内で培養された細胞周囲の温度を操作するため、デバイス中に温水を還流する水路を備える改善を施した (図 1 赤矢印)。また、循環機能付き恒温槽を使用することで、細胞周囲温度の操作を還流させる温水の温度の調節で行うこととした (図 2)。細胞培養領域での温度分布の均一性はサーモカメラで確認した。実際の実験中の細胞周囲温度は、極細熱電対を用いて温度モニタリングを行った。

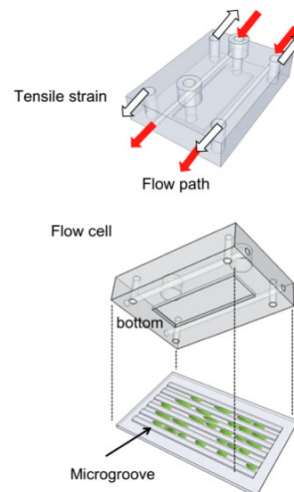


図 1 温水還流路を設けた細胞培養デバイス

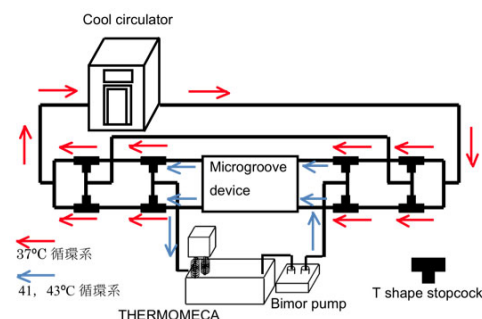


図 2 デバイス内温度制御のための温水循環流路

- (2)細胞間・細胞内物質輸送数理モデルの確立

腱細胞は生体内において、コラーゲン線維間に沿って隣接細胞間で直列に接続した配列を示す。また、同様の配列は microgroove 培養基板においても再現できる。したがって、腱細胞間のギャップ結合を介した物質輸送は一次元の拡散現象に近似してモデル化することが可能である。実際、代表者はこれまでに、組織内の腱細胞間物質輸送現象を可視化すると共に、可視化データからギャップ結合を介した物質の移動度を透過率として算

出する数理モデルを開発した。しかし、このモデルでは細胞間輸送のみがモデル化されており、細胞内の輸送現象については触れられていない。本研究の遂行にあたり、細胞内と細胞間の輸送現象を同時にモデル化し、また現象の数式化にあたって物質拡散理論を適用することで、ギャップ結合を介した物質の移動度を拡散係数として評価するモデルを確立した。

細胞内・細胞間物質輸送を可視化する FLIP (Fluorescence Loss in Photobleaching) 法は以下の手順で行い、物質輸送についての定量データを取得した。まず腱細胞を培養したデバイス内に 5 μM calcein-AM 溶液を導入してインキュベートし、デバイス内の細胞にギャップ結合透過性蛍光物質 calcein を導入した。デバイスを共焦点レーザー顕微鏡ステージに設置した伸展装置にマウントし、3細胞以上が直列に接続している腱細胞群を視野内に収めた。次に、群のいずれかの端に位置する細胞を target 細胞として ROI の設定を行った (図 3(a))。この target 細胞に対し 100%パワーのレーザー (488 nm) を 2 fps の frame rate で照射し、続いて 1%パワーレーザーで細胞群全体および視野内の腱細胞の画像を取得した。これを約 3 秒毎に 99 回繰り返した。得られた画像シリーズから、target 細胞を含む細胞群内の各細胞内の平均輝度の変化を求めた。

次に、実験データからギャップ結合拡散係数を以下の数理モデリングを用いて求めた。各細胞の蛍光輝度のプロファイル、それぞれの細胞の FLIP 実験前の輝度値で正規化した。さらに、どの細胞内にも 5 μM の calcein が導入されていると仮定し、推定細胞体積 (投影面積 \times グループ高さ 10 μm) から求めた calcein 分子数を正規化したプロファイルに乗ずることで、蛍光輝度の変化プロファイルを変換した (図 3(b))。

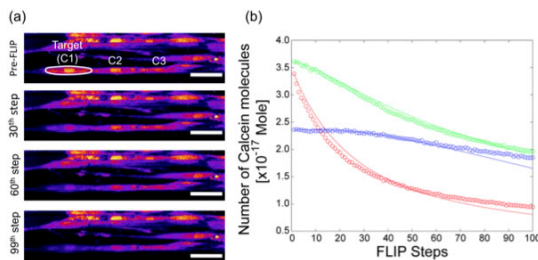


図 3 (a)FLIP 実験中の腱細胞蛍光退色の様子。(b)得られた蛍光輝度データから推定された蛍光 calcein 分子数変化プロファイル。

次に、各 FLIP ステップ間の消光 calcein 分子 (トレーサー) の細胞内および細胞間移動を以下に述べる数理モデルを用いて数値的に求めた。モデルは 1 次元非定常拡散方程式を用い、陰解法による差分方程式

$$C_i^{t+\Delta t} - C_i^t = \frac{D\Delta t}{\Delta x^2} (C_{i-1}^{t+\Delta t} - C_i^{t+\Delta t}) + \frac{D\Delta t}{\Delta x^2} (C_{i+1}^{t+\Delta t} - C_i^{t+\Delta t}) \quad (1)$$

を基礎式とした。ここで、 C_i^t は i 番目要素の時刻 t における消光 calcein 分子数を表し、 D には細胞内 (D_C) またはギャップ結合の透過性に相当する細胞間 (D_{GJ}) の拡散係数 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$] を境界条件に応じて設定した。また、細胞とギャップ結合の界面においては、等価拡散係数を算出して用いた。なお、target 細胞では各 FLIP ステップにおけるレーザー照射によって、target 細胞内蛍光 calcein 分子数の $\alpha\%$ が消光されるとした。さらに、 $\Delta t=0.1$ 秒、 $\Delta x=1$ μm (細胞内要素) または 5 nm (ギャップ結合要素) として式(1)からモデル全域に亘る消光 calcein 分子数分布を求める計算を 99 回繰り返した。各細胞内の総 calcein 分子数は不変であるとし、各 FLIP ステップ終了時の細胞内消光 calcein 分子数分布から各細胞の蛍光 calcein 分子数を算出した。続いて、数理モデルから得られた蛍光分子数変化プロファイルについて D_C 、 D_{GJ} および α を未定係数として実験結果とのフィッティングを行い、これらのパラメータの値を求めた。フィッティングには数値計算ソフト MATLAB を使用した。

(3) 腱細胞における引張りひずみ量と GJIC の定量的関係

腱細胞間の GJIC が細胞に負荷される引張りひずみ量とどのような関係を示すかを調べるため、引張り負荷下の腱細胞間 GJIC を 24 時間に亘って経時的に調べた。デバイスに培養された腱細胞には、生理的なひずみ量である 4%引張りひずみと、非生理的で過負荷に相当する 8%引張りひずみの何れかを作用させ、負荷開始 1, 2, 4, 6, 24 時間で FLIP 実験を行った。得られたデータから D_C および D_{GJ} を求め、細胞内および細胞間拡散係数の経時変化を調べた。なお、当初は繰返し (動的) 引張りひずみを作用させる実験を行ったが問題が発生したため、静的引張りひずみを作用させる実験を行った。

図 4(a)に細胞間拡散係数 D_{GJ} の経時変化を、図 4(b)に細胞内拡散係数 D_C の経時変化をそれぞれ示す。データ分布を考慮し、以下に述べる代表値は Median 値とする。引張りひずみ負荷前 (0h) の細胞間拡散係数は 1.31 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] であった。4%ひずみを負荷すると、負荷 1 時間後で 4.59 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] まで上昇した。その後、負荷時間の経過と共に 3.3~3.9 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] を示し、持続的に高い拡散係数を示し続けた。なお、0h との比較において 1h の拡散係数は統計的に有意に高い値であった。一方、8%負荷の場合、負荷 1 時間後で 0.006 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] まで低下した。負荷 2 時間から 4 時間にかけて 3.0~3.4 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] まで回復したものの、6 時間で再び 0.40 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] まで低下した。その後負荷 24 時間では再び 3.67 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] まで上昇した。0h との比較において、24h の拡散係数は統計的に有意に高い値であった。

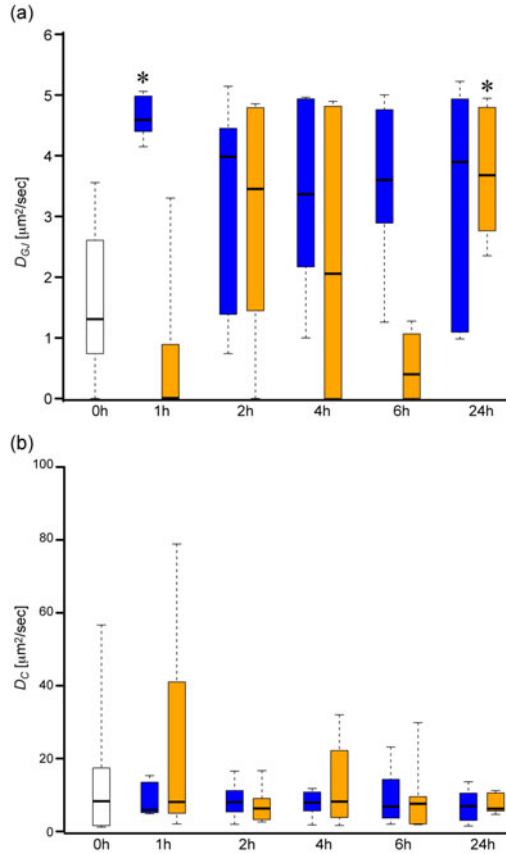


図 4 引張りひずみ負荷下の(a)細胞間拡散係数と(b)細胞内拡散係数の経時変化. 青:4%ひずみ, 橙:8%ひずみ. * $p < 0.05$ vs 0h.

細胞内拡散係数については, 0h で 8.28 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$]であった. 4%ひずみ負荷下では, 負荷 24 時間に渡って 5.8~8.0 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$]で推移し, 大きな変化はみられなかった. 0h との比較においても統計的有意差は認められなかった. 8%ひずみ負荷の場合も負荷 24 時間に渡って 5.2~7.5 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$]で推移した. 4%ひずみ負荷と同様, 0h との比較で統計的有意差は認められなかった.

生体内での生理学的なひずみ量である 4%ひずみを負荷することで GJIC の指標である細胞間拡散係数は上昇し, 負荷時間に渡って上昇レベルを安定して維持した一方で, 非生理学的なひずみ量である 8%ひずみを負荷すると細胞間拡散係数は低下と上昇を繰り返す, 不安定な経時変化を示した. これは, 適度な力学負荷が作用することによって細胞の同化作用が亢進するように細胞内の構造的, 力学的環境が再構築され, それに伴って細胞間物質輸送の活性化されたものと考えられる. 非生理学的な力学負荷が作用すると細胞内の構造的, 力学的環境の再構築が収束せず不安定な状態となり, 細胞間物質輸送も増減を繰り返したと考えられ, その結果は異化作用の亢進へとつながるものと考えられる.

(4)膵細胞における細胞環境温度と GJIC の定量的関係

上述の通り, 膵に繰り返し過負荷が作用する時, 膵組織内部温度は 43°C まで上昇することが知られている. このことは, 繰り返し負荷によって膵組織に炎症(膵炎)が発症する一つの要因と考えられる. そこで, ここでは膵細胞が温熱刺激に曝される際に示す応答と, その細胞応答に及ぼす細胞間物質輸送の影響について調べた.

実験では, 培養デバイスに膵細胞を播種し, 37°C で 24 時間培養することで実験サンプルとした. まず, サンプルを温水循環路に接続し, 温水の温度を制御することで細胞周囲環境温度を 37°C, 41°C または 43°C に操作して所定の温度で 30 分間保持し, 温熱刺激を与えた. 続いて, サンプルを 37°C 環境(CO₂ インキュベーター)に戻し, 24 時間のポストインキュベーションを行った. 細胞の生死判定をポストインキュベーション後に行った. 細胞内拡散係数と細胞間拡散係数の測定, および細胞機能の解析としての遺伝子発現解析を温熱刺激負荷直後とポストインキュベーション後に行った.

37°C, 41°C, 43°C の温熱刺激 24 時間後の平均細胞生存率は 94.2%, 85.1%, 55.8%であった. 37°C 刺激と 41°C 刺激の間に有意差は認められなかった一方で, 37°C 刺激と 43°C 刺激, および 41°C 刺激と 43°C 刺激の間にそ

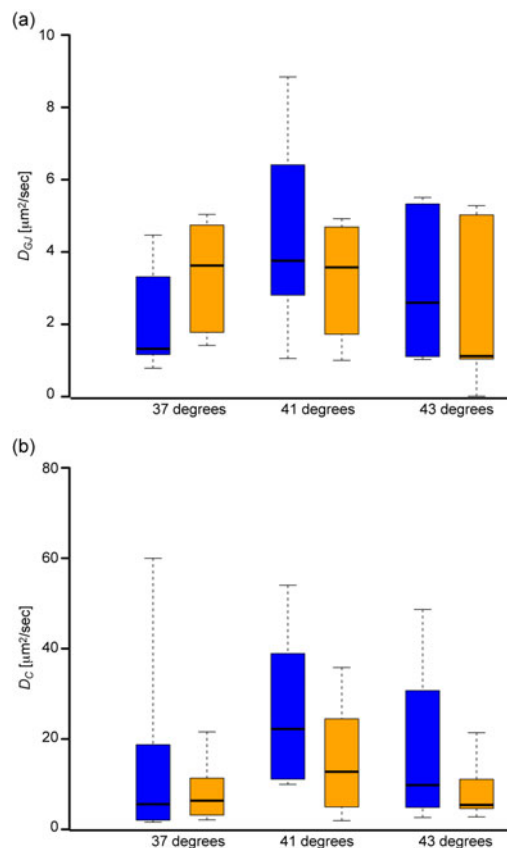


図 5 温熱刺激後の(a)細胞間拡散係数と(b)細胞内拡散係数. 青:刺激直後, 橙:刺激 24 時間後.

それぞれ統計的有意差が認められた。

温熱刺激直後および 24 時間後の細胞間拡散係数は 37°C 刺激でそれぞれ 1.32 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 3.63 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$], 41°C 刺激でそれぞれ 3.75 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 3.57 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$], 43°C 刺激でそれぞれ 3.56 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 1.11 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] であった (図 5(a)).

また, 細胞内拡散係数は刺激直後と 24 時間後において, 37°C 刺激でそれぞれ 5.58 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 6.37 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$], 41°C 刺激でそれぞれ 22.21 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 12.75 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$], 43°C 刺激でそれぞれ 9.78 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] および 5.42 [$\mu\text{m}^2/\text{sec}$] であった (図 5(b)).

細胞内拡散係数, 細胞間拡散係数においてはそれぞれ温度間での有意差ならびに刺激直後と刺激 24 時間との間での有意差は認められなかった。

遺伝子発現解析の結果, 温熱刺激直後では 41°C 刺激によってコラーゲン分解酵素 MMP-1 遺伝子およびギャップ結合蛋白質 CX43 遺伝子の発現量が, 他の 2 刺激と比べて有意に高い値を示した (図 6(a)). また, 熱刺激への反応を示す熱ショック蛋白質 HSP47 遺伝子の発現は刺激温度の上昇と共に増加する傾向を示した. 刺激 24 時間では 43°C 刺激による MMP-1 遺伝子および炎症性サイトカイン IL-1 β 遺伝子の発現量が他の 2 刺激と比べて顕著かつ有意に高い値を示した (図

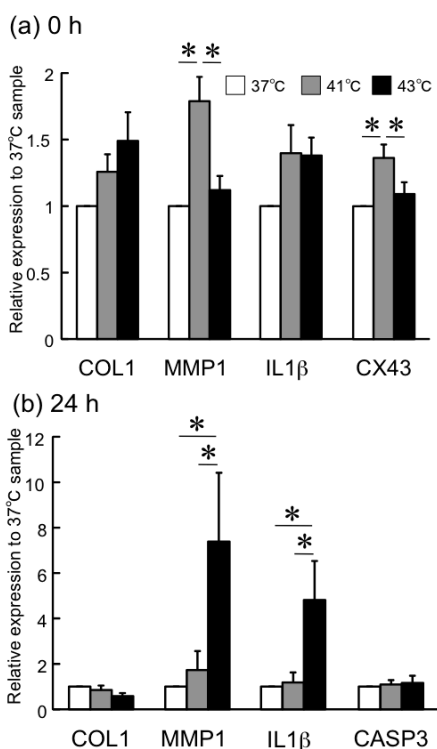


図 6 温熱刺激後の遺伝子発現量. (a) 刺激直後, (b) 刺激 24 時間後. * $p < 0.05$.

6(b)).

次に, 臍細胞が示すこれらの温熱刺激に対する応答における GJIC の影響を調べるため, ギャップ結合阻害剤 18 α グリチルリチン酸

(18 α GA) を用いた温熱刺激実験を行った. 上述の温熱刺激実験において刺激 1 時間前に 50 nM の 18 α GA を培養液に添加し, 37°C または 43°C の温熱刺激を負荷した. 温熱刺激直前と刺激 24 時間後に細胞間拡散係数の計測を, 遺伝子発現解析を刺激 24 時間後にそれぞれ行った.

18 α GA の添加によってギャップ結合を介した物質輸送が阻害され, 細胞間拡散係数は温熱刺激前でも刺激 24 時間後においても無添加対照群と比べて有意に低い値を示した.

遺伝子発現解析の結果, MMP-1 遺伝子および IL-1 β 遺伝子の発現において, 18 α GA 添加 43°C 刺激による発現量上昇は無添加 43°C 刺激による上昇と比べて統計的有意に大きく

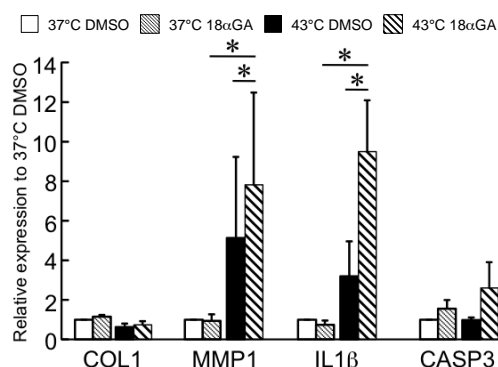


図 7 ギャップ結合阻害剤 18 α GA 導入時の温熱刺激による遺伝子発現量. * $p < 0.05$.

なることが分かった (図 7).

これらの結果から, 臍細胞は温熱刺激に対して細胞機能を変化させる応答を示すことがわかった. 特に, 刺激直後より刺激 24 時間後で異化作用を亢進する大きな変化を示すことがわかった. しかし, これらの変化において GJIC はほとんど変化しないことがわかった. 一方で, GJIC を化学的に阻害すると温熱刺激に起因する異化作用の亢進は更に増長されることがわかった. このことから, GJIC は異化作用の亢進をある程度は抑制する効果があることが示唆された.

本研究では臍細胞の温熱刺激応答メカニズムについても検討するため, 多くの哺乳細胞で温度受容体として知られている TRPV1 チャンネルに着目し, TRPV1 チャンネル阻害剤であるカプサゼピンを添加した温熱刺激実験を行った. その結果, カプサゼピンによって TRPV1 チャンネルを阻害しても臍細胞は MMP-1 遺伝子と IL-1 β 遺伝子の発現量に変化はなかった. この結果と上述の HSP47 遺伝子発現上昇から, 臍細胞は温度受容体を介した温熱刺激応答を示すのではなく, 熱ショック蛋白質を介した経路で応答を示すことが示唆された.

(5) まとめ

本研究では臍細胞に過負荷や高温といっ

た、腱組織に炎症が生じる過程で負荷される刺激に対する応答において、細胞間コミュニケーションの一形態であるギャップ結合シグナル伝達 (GJIC) の寄与を明らかにすることを目的に行った。その結果、引張りひずみに対する応答では、生理学的な引張りひずみ量に対して腱細胞は GJIC を安定的に増加させる一方で、過負荷なひずみ量に対して GJIC を安定させられず増減を繰り返した。温熱刺激に対しては、特に 43°C 刺激に対して大きく異化作用を亢進させ、GJIC を阻害するとその変化は更に増長された。

実際の腱組織では、過負荷と高温が同時に作用することとなる。本研究ではその点を調べるには至らなかったものの、上記の結果から次のように推察される。腱組織に過負荷が作用すると細胞間 GJIC は不安定な挙動を示す。腱細胞は同時に高温にも曝される為、特に GJIC が低下する局面においては高温によって惹起される異化作用の亢進が更に増強されることになる。これらが持続的、かつ繰り返し行われることで腱組織の分解や変性が進み、腱炎の発症につながるものと考えられる。したがって、腱細胞にとって過酷な環境においても GJIC を維持、あるいは積極的に増強することができれば、腱細胞の異化作用亢進を妨げることが出来ることが示唆される。

以上の知見は国内および国外において本研究で初めて明らかになったものであり、専門分野において国際的に強いインパクトを与え得るものと考えられる。今後は GJIC を積極的に維持、あるいは増強させた際の細胞応答や、他の組織の健全性維持へ応用されることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Eijiro Maeda and Toshiro Ohashi, “Mechano-regulation of gap junction communications between tendon cells is dependent on the magnitude of tensile strain”, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 465 (2015), pp.281-286. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.08.021

[学会発表] (計 14 件)

① 前田英次郎, 田代真啓, 大橋俊朗, 腱細胞への温熱刺激による炎症性応答における細胞間物質輸送の寄与. 第 28 回バイオエンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 10 日, 東京工業大学 (東京都目黒区)

② 片海丞, 前田英次郎, 大橋俊朗, 引張り負荷下の腱細胞間ギャップ結合コミュニケーションの経時変化の解析. 第 28 回バイオ

エンジニアリング講演会, 2016 年 1 月 9 日, 東京工業大学 (東京都目黒区)

③ H.C. Pian, N. Kurihara, E. Maeda, T. Ohashi, “Cyclic tensile strain regulates gap junction intercellular communication between tenocytes in vitro in a strain magnitude-dependent manner.” 8th Asian Pacific Conference on Biomechanics, 2015 年 9 月 16 日, 北海道大学 (北海道札幌市)

④ M. Tashiro, E. Maeda, T. Ohashi, “Temperature rise causes upregulation of tenocyte catabolism and enhances gap junctional intercellular communications.” 2015 Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference, 2015 年 6 月 20 日, スノーバード (アメリカ)

⑤ 田代真啓, 前田英次郎, 大橋俊朗, 腱炎発症メカニズムの解明に向けた腱細胞の熱応答解析. 第 27 回バイオエンジニアリング講演会, 2015 年 1 月 10 日, 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

⑥ M. Tashiro, E. Maeda, T. Ohashi, “Effect of hyperthermia on tenocyte physiological function.” 3rd International Scientific Tendinopathy Symposium, 2014 年 9 月 5 日, オックスフォード (イギリス)

⑦ E. Maeda, and T. Ohashi, “Evaluation of intra- and inter-cellular diffusivity in tenocytes cultured in series subjected to application of mechanical stretching.” 4th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics, 2014 年 9 月 3 日, 志摩観光ホテル (三重県志摩市) 【Poster Award 受賞】

⑧ E. Maeda, T. Ohashi, “Evaluation of intra- and inter-cellular diffusivity in tenocytes cultured in row subjected to application of mechanical stretching.” International Symposium on Mechanobiology, 2014 年 5 月 21 日, 岡山大学 (岡山県岡山市)

⑨ 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」, 2013 年 12 月 6 日, サンライズ九十九里 (千葉県山武群)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 英次郎 (Maeda Eijiro)

北海道大学・工学研究院・助教

研究者番号: 20581614