

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20940

研究課題名（和文）メカニカルストレス応答調整を介した効率的な腱細胞誘導法の確立

研究課題名（英文）Development of an efficient method for induction of tendon cell by regulation of mechanical stress response

研究代表者

中道 亮（Nakamichi, Ryo）

岡山大学・大学病院・研究准教授

研究者番号：20803167

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：幹細胞の腱分化における機械刺激の影響を、機械応答性カルシウムイオンチャネルレセプターであるPIEZ01に注目して解析を行った。マウス肢芽由来間葉系幹細胞であるC3H10T1/2細胞に細胞伸展培養装置を用いた検討では、高負荷条件では骨分化傾向が、低負荷条件では腱分化傾向が強まることが明らかになった。硬度調整可能な培養ゲルにPIEZ01アゴニストを付加した検討では、高硬度条件では骨分化マーカーが、低硬度条件では腱分化マーカーの発現が上昇することが明らかになった。次に、腱組織由来の幹・前駆細胞を用いた検討では、PIEZ01アゴニスト付加により硬度に依存せず腱分化傾向が高まることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上記の研究成果から、細胞周囲環境と機械刺激応答シグナルの調整により間葉系幹細胞の分化方向を制御できる可能性が見出された。Tissue engineeringの分野では1つの臓器を作成するために複数の器官を同時に生成することの困難さが問題点の1つとなっているが、本研究により筋骨格系分野において、幹細胞と周囲環境、機械刺激応答シグナル調整を制御することで、複合組織を生成することができる可能性が示唆された。この研究結果は将来的な整形外科領域における再生医療促進のための基盤研究として社会的意義の高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the effect of mechanical stimulation on tendon differentiation of stem cells, focusing on PIEZ01, a mechanoresponsive calcium ion channel receptor. With a cell stretching culture system for C3H10T1/2 cells, which are mesenchymal stem cells derived from mouse limb buds, we found that osteogenic differentiation was enhanced under high-load conditions and tenogenic differentiation was enhanced under low-load conditions. Examination of the effect of PIEZ01 agonist stimulation with adjustable firmness gels for cells revealed that osteogenic differentiation markers were upregulated under high firmness conditions and tenogenic differentiation markers were upregulated under low firmness conditions. Second, studies using stem/progenitor cells derived from tendon tissue revealed that the stimulation by PIEZ01 agonists increased the tendency for tenogenic differentiation independent of firmness.

研究分野：整形外科学

キーワード：幹細胞 機械刺激応答

1. 研究開始当初の背景

腱は骨と筋肉を繋ぐ強固な結合組織である。この組織は力のトランスミッターとして、また自身に貯蓄される弾性エネルギーは運動機能への影響を及ぼすことが知られている。このような機能を持つ腱だが、自身の組織修復能は乏しく、一旦損傷すると受傷前の状態には回復しない。この状況を打開するアプローチとして、組織再生能を有する細胞の移植治療が考えられている。その候補となる細胞に、腱組織から抽出した腱幹細胞があるが、しかしこの細胞は採取できる数に限りがあり、さらに性質維持が困難という問題がある。そこで代替として間葉系幹細胞が想定される。しかし間葉系幹細胞を直接移植した場合分化方向を制御することが困難であり、異所性骨化などが生じる。そのため、細胞移植治療の実現のためには分化方向の制御が必須となる。

2. 研究の目的

幹細胞から腱細胞への分化にメカニカルストレスが有用な効果をもたらすことが知られているが、腱細胞の分化段階におけるメカニカルストレス感知機構の詳細はまだ不明である。近年腱におけるメカニカルストレス応答性チャネルとしてPIEZ01が報告された。発生期において、骨原基であるSclerotomeから腱原基であるSyndetomeが形成される過程で、PIEZ01が分化に必須の転写因子たちの発現調節機構として機能しているとすれば、PIEZ01を調整することでより効率的な腱細胞への分化誘導システムを構築できる可能性がある。そこで本研究では、PIEZ01に注目し腱分化への影響を調査し、これを応用することで良好な組織構築能を有する腱様細胞を作成することに挑戦する。

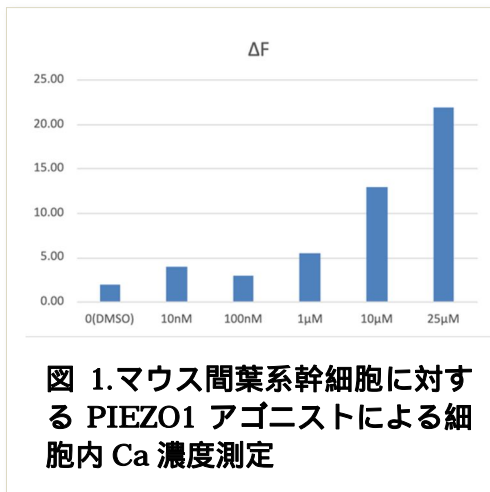
3. 研究の方法

1. 腱分化におけるPIEZ01の役割の検証: *In vitro*において、幹細胞の腱細胞分化モデル(Stem Cells International, 2019)の知見を基に、PIEZ01の機能活性が分化に与える影響を調査する。細胞はマウス胎児由来間葉系幹細胞であるC3H10T1/2を用いる。PIEZ01の活性調整はPIEZ01アゴニスト(=Yoda1)を用いて行う。まず、カルシウム標識薬のfluo-8を用いたカルシウムアッセイを行い、コンパウンド濃度-カルシウム濃度曲線を作成、これに基づき各コンパウンドの使用濃度を決定する。細胞に対する機械刺激はST-140-10 mechanical stretch system (STREX)を用いる。伸長割合、刺激頻度は過去の申請者らの報告を参照し(Mol Cell Biol. 2016, Proc Natl Acad Sci U S A. 2016)複数の条件を設定し、時間軸に沿って、細胞形態の観察、トランスクリプトーム解析を行った。骨、軟骨、脂肪などの他の間葉系分化誘導に与える影響も調査する。

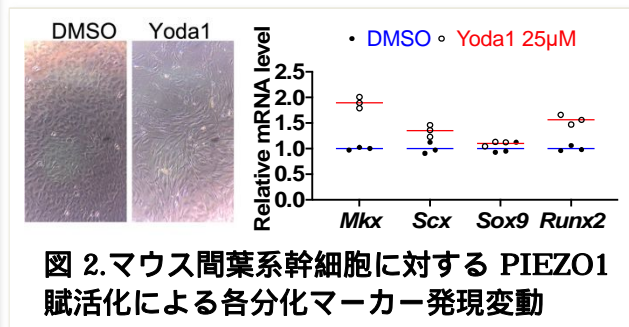
2. PIEZ01活性調整によって作成された腱分化細胞の組織構築能の検証: *In vitro*において、分化細胞のもつ組織生成能を調査する。1.にて検討した至適条件を基に、次に作成した細胞の三次元培養を行い、細胞の細胞外器質生成能について評価する。

4. 研究成果

PIEZ01 のアゴニストである Yoda1 をマウス胎児肢芽由来幹細胞である C3H10T1/2 細胞に投与した Ca assay では、濃度依存的に細胞内への Ca 流入量の増加を認め、PIEZ01 は線維輪細胞においてカルシウムイオンチャンネルとして作用していることを確認した(図 1)。次に Yoda1 を指摘濃度にて C3H10T1/2 細胞に投与すると、細胞形態は紡錘状に変化し、*Mkx* 及び *Scx* の発現が上昇すると共に、*Runx2* の発現も上昇することが確認された(図 2)。さらに、機械刺激条件として細胞伸展刺激培養装置を用いてこれらのマーカー

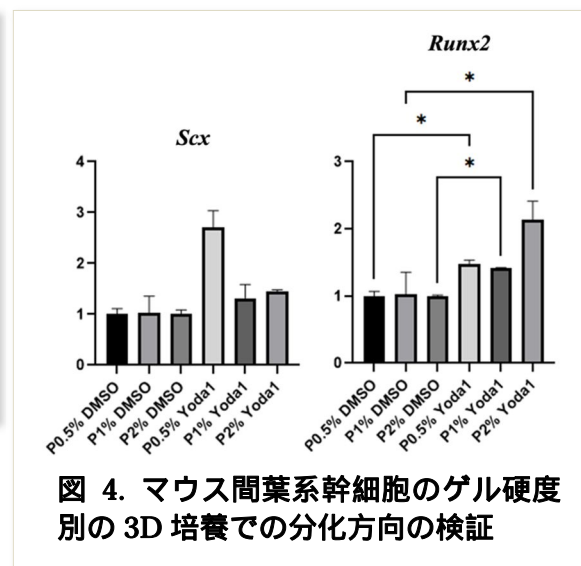
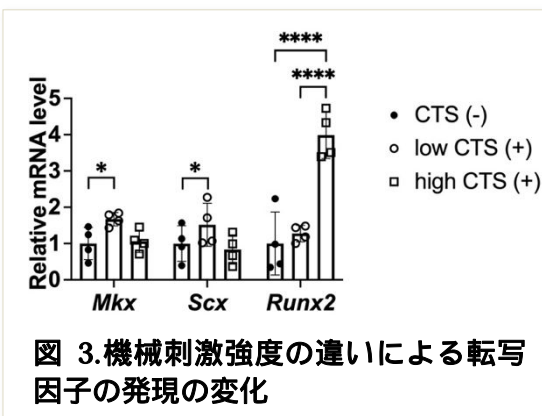


の変化を調査すると、高刺激であるほど *Runx2* の発現が上昇し、低刺激であるほど *Mkx* 及び *Scx* の発現が上昇することが確認された。これらの結果から、PIEZ01 は幹細胞から腱細胞



胞や骨細胞分化に重要なマーカーの発現を調整している可能性と、これは細胞に与えられる機械強度によって調整することができる可能性が明らかになった。

さらに、硬度調整可能な三次元培養用のゲルである Puramatrix 上に C3H10T1/2 細胞を生着させて Yoda1 にて PIEZO1 の賦活化を行うと、特定の機械強度では腱分化へ、別の硬度では骨分化へ促される分化マーカーの変化が生じることが確認された(図 4)。以上から、間葉系幹細胞を細胞周囲の硬度および PIEZO1 の活性調整を行うことで腱および骨の 2 つの方向への分化方向を制御できる可能性が示された。



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------