

令和元年6月20日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01346

研究課題名(和文)炎症反応制御を目指したIL-1 刺激に対する腱細胞応答の細胞力学場依存性の解明

研究課題名(英文) Effects of cellular mechanical environment on response to interleukin-1beta stimulation in isolated tenocytes

研究代表者

前田 英次郎 (Maeda, Eijiro)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：20581614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞張力や細胞膜流動性が炎症性刺激に対する応答に及ぼす影響を検討した。剛性を変えたPDMS製マイクロピラーデバイス上でIL-1b刺激を3日間与えたウサギアキレス腱由来腱細胞についてコラーゲン分解酵素MMP-1の遺伝子発現を調べた。低剛性基板の腱細胞ほど同一濃度のIL-1bに対するMMP-1発現量が高いことがわかり、また、細胞膜流動性は低いことが示された。低剛性基板に播種された腱細胞は細胞張力が低下し細胞膜上のサイトカイン受容体等の膜タンパク質の空間密度が上昇し、膜の流動性が低下する。これによって受容体同士が凝集し、同じ濃度のIL-1b刺激に対しての応答性が上昇した機序が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、細胞周囲の力学環境が細胞の張力のみならず細胞膜の力学特性にも影響を及ぼし、それらは細胞外からの刺激因子に対する応答性に大きな影響を与えることを示した点にある。基板剛性に由来する細胞張力の低下は、過負荷による腱組織内での局所的な破断に伴って腱細胞から力学刺激が失われた状態に近いと考えられることから、本研究で示唆された機序は過負荷が作用した腱組織において組織分解・変性が発症・進行するメカニズムを示唆するものと考えられる。このことから、それらの症状に対して細胞張力や細胞力学環境に焦点を当てた予防法や治療法が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated effects of cellular tension and cell membrane dynamics on responses to IL-1b stimulation in tenocytes isolated from rabbit Achilles tendon. The cells were subjected to IL-1b treatments on substrates with different stiffness, and their MMP-1 expression as well as the fluidity of cell membrane were examined. It has been demonstrated that the cells on substrate with lower stiffness exhibited higher expression of MMP-1 mRNA and lower membrane fluidity. Based on these findings, the following mechanism is suggested. When tenocytes are seeded on a substrate with low stiffness, cellular tension is lowered, which, in turn, decreases the fluidity of cell membrane proteins. This would elevate the special concentration of ligand receptors and these receptors form clusters, which could enhance the responsiveness of the receptors. This hypothetical mechanism indicates the importance of mechanical status of cells in regulating a wide range of cellular functions.

研究分野：バイオメカニクス, メカノバイオロジー

キーワード：腱 腱細胞 炎症応答制御 細胞張力 膜流動性 インターロイキン1ベータ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

筋肉と骨を連結する腱には関節の動きに伴って引張りを主とする力学負荷が作用する。この力学刺激は組織内部の腱細胞へと伝達され、腱細胞の組織産生能と組織分解能を制御する因子として働く。力学負荷の大きさや頻度によって腱細胞機能の方向性が決まり、力学負荷が極端に小さい場合には組織分解能が亢進することが知られている (Maeda et al., J Appl Physiol 2009 他)。腱炎の発症を誘引するような強い負荷の運動が繰り返されると腱組織に過大な変形が生じ、組織内コラーゲン線維の破断が生じる。その結果、破断した線維は負荷支持機能を失い破断部周辺の腱細胞は無負荷状態に陥る (図 1)。この低力学負荷環境では腱細胞の死滅 (アポトーシス) や炎症性反応が惹起されることが報告されている。腱炎を発症している腱組織からはコラーゲン分解酵素 MMP-1, 炎症性サイトカインインターロイキン (interleukin IL) -1 β (IL-1 β) や IL-6 の遺伝子発現が認められている。

細胞周囲の力学環境が腱細胞機能に影響を及ぼすメカニズムの一つとして、アクチン細胞骨格の発揮する細胞張力の調整による細胞周囲環境の剛性への適応能が知られている。申請者は腱細胞を対象として、細胞張力の大きさと細胞機能の関係に着目し、細胞培養基質の剛性を任意に設定し細胞張力計測が可能なデバイスであるシリコンゴム (PDMS) 製マイクロピラー基質を使用した研究を進めている。これまでに、マイクロピラー基質剛性が低く細胞張力も低い状態での MMP-1 遺伝子発現はマイクロピラー基質剛性が高く細胞張力が高い状態と比べて有意に高いことを示した (Maeda et al., J Biomech 2013)。したがって、腱細胞の組織産生・分解能のうち、組織分解能は細胞張力に強く影響を受けることがわかった。これは強い負荷が腱に作用しコラーゲン線維が破断したとき、腱細胞の力学環境が無負荷に近い状態へ変化すると腱細胞張力が低下し MMP-1 発現が上昇するというメカニズムの存在を示唆しており、この一連の過程は腱炎発症へと至る過程の初期応答であると言える。しかしながら、腱細胞が初期応答を示して以降の、組織の炎症や変性が進行するメカニズムについては国内および国外においても研究が進んでいない。その理由の一つとして、発症初期段階では (罹患者の自覚症状が無く) 診断や処置が困難であることが挙げられる。IL-1 β は組織分解 (MMP-1 産生を促進)、組織温度上昇 (視床下部に刺激)、ならびに発痛 (プロスタグランジン産生促進) などの腱炎に関連する様々な生理機能変化に関与していることから、IL-1 β に刺激された腱細胞の振舞いが腱炎進行の鍵を握っていると思われる。そこで申請者は低細胞張力状態で組織分解能が亢進した腱細胞が IL-1 β 刺激に対して炎症反応を過剰に亢進することで腱炎が進行するのではないかと、という考えを着想した。

2. 研究の目的

そこで本研究では、異なる剛性を持つ基板に培養した腱細胞に対して IL-1 β 刺激を行い、基板剛性と IL-1 β 応答の関係の解明と、そのメカニズムの一つとして細胞膜流動性低下による反応の制御機構を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の 3 項目の順で遂行された。

- (1) Fibronectin でコートした PDMS 製マイクロピラー基板を用いた IL-1 β 応答実験
- (2) マイクロピラー基板上で培養した腱細胞の細胞膜流動性測定

4. 研究成果

- (1) Fibronectin 溶液を付着させた PDMS 製マイクロピラー基板を用いた IL-1 β 応答実験

実験方法

日本白色家兔 (オス, 4-6 ヶ月齢) のアキレス腱から採取した腱細胞を培養した。マイクロピラー基板への播種は細胞濃度 8,000 cells/dish とした。これは細胞間接着を形成することなく可能な限り単細胞の状態での応答を観察するための条件とした。

先行研究 (Maeda et al., J Biomech 2013) と同様の手法を用いて高さ 2 μ m, 4 μ m, 8 μ m のマイクロピラー基板を作製し、直径 35 mm の細胞培養ディッシュ底部に取り付け、細胞培養デバイスとした。マイクロピラー頂部に Fibronectin を塗布するため、micro-contact printing 法を用いた (Tan et al., PNAS 2003)。

マイクロピラーに播種した細胞は 24 時間培養し、マイクロピラー頂部に接着させた。次いで、濃度 1, 10, 100 pM の IL-1 β を DMEM+2%FBS に混和した培養液に取り替え、IL-1 β 刺激下で 3 日間培養を継続した。細胞応答の評価として、24 時間培養終了後 (Day 1) と IL-1 β 刺激培養終了後 (Day 4) に細胞周長 P , 細胞面積 A , およびそれらより計算される shape index ($=4\pi A/P^2$) を計測、算出した。遺伝子発現解析においては、個々の細胞の応答により着目

するため、fluorescence in situ hybridization 法 (FISH 法) を用いて MMP-1 遺伝子発現解析を行なった。MMP-1 遺伝子発現が確認された細胞における GAPDH 遺伝子発現量で正規化された発現量、および総解析細胞数に対する MMP-1 遺伝子発現細胞数割合を求めた。IL-1 β 刺激実験では濃度ゼロ群 (0 pM 群) も対照群として含めた。また、基板条件については、ガラス基板で培養した群も含めた 4 つの基板条件で実験を行なった。それぞれの実験群は GSS (ガラス基板培養群), MP2 (2 μ m マイクロピラー培養群), MP4 (4 μ m マイクロピラー培養群), MP8 (8 μ m マイクロピラー培養群) とした。MP4, MP8 は腱細胞が基板を变形させながら剛性を検知できる範囲で剛性を变化させた実験条件であり、MP2 は表面形状はマイクロピラー形状を持ちながら細胞張力では変形しない高い剛性を持つ基板であり、MP4, MP8 に対する実験対照群として設定した。GSS 群は一般的な培養条件であり、実験全体の対照群として設定した。

細胞形態変化

Day 1 (播種後 24 時間培養終了時点) と Day 4 (IL-1 β 刺激実験終了時点) での細胞形態を図 1 に示す。細胞は免疫蛍光染色によってアクチン線維 (赤, Alexa546-phalloidin) と細胞核 (青, Hoechst33342) をそれぞれ標識し、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence, Japan) を用いて観察を行なった。また、これらの画像から形態を定量的に評価した結果を図 2 に示す。これらの結果から、基板剛性と IL-1 β 濃度のいずれも細胞形態に大きな影響を及ぼし、全体の傾向として、低培養基板剛性で培養した場合に腱細胞は小さくなるのがわかった。また、Day 1 から Day 4 にかけて IL-1 β が存在しない場合には腱細胞はさらに伸展し、細胞周長と面積が増加した (MP2 以外)。IL-1 β の添加によって細胞の伸展は抑制され、IL-1 β 濃度依存的に抑制の度合も変化した。GSS 群では細胞面積、周長ともに Day 1 と比べて Day 4 で有意に増加した (図 2(a, b))。また、Day 4 において、0 pM 群では面積は 1, 10, 100 pM 群と比べて有意に大きく、周長も 10, 100 pM 群と比べて有意に大きかった。一方、MP2 群では Day 1 と Day 4 の 1, 10, 100 pM 群との間に面積についての有意差が認められ、周長ではのみで Day 4 において 0 pM 群と 10, 100 pM 群との間に有意差が認められた (図 2(a, b))。MP4 群においては、細胞面積の変化傾向は GSS 群と同様であり、Day 1 と Day 4 の各群の間に細胞面積、周長において有意差が認められた。MP8 群においても MP4 群と同様の变化傾向を得た。Shape index においてはどの培養基板についても Day 4 10, 100 pM 群と 0 pM または Day 1 との間に有意差が認められた。

MMP-1 遺伝子発現解析

MMP-1 遺伝子発現も基板タイプと IL-1 β 濃度に影響を受けて変化することがわかった (図 3)。GSS 群においては MMP-1 発現量、MMP-1 発現細胞割合ともに全ての IL-1 β 濃度において低い値を示した (図 3(a))。MP2 群でも MMP-1 発現量は全ての IL-1 β 濃度で低いものの、発現割合は 10, 100 pM で増加した。MP4 群では、100 pM 刺激によって 0 pM 群と比べて有意に発現量が増加した一方で、発現割合には変化は無かった。対照的に、MP8 群では 10, 100 pM 刺激によって発現量は有意に増加し、発現割合も 100 pM において 0, 1 pM 群と比べて有意に増加した。

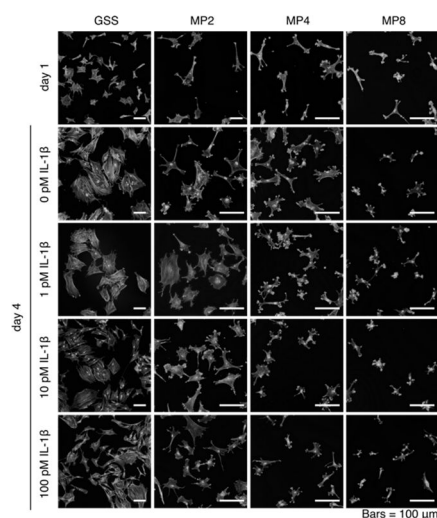


図 1 各実験条件における代表的な細胞形態。GSS, ガラス基板培養群; MP2, 2 μ m マイクロピラー培養群; MP4, 4 μ m マイクロピラー培養群; MP8, 8 μ m マイクロピラー培養群。

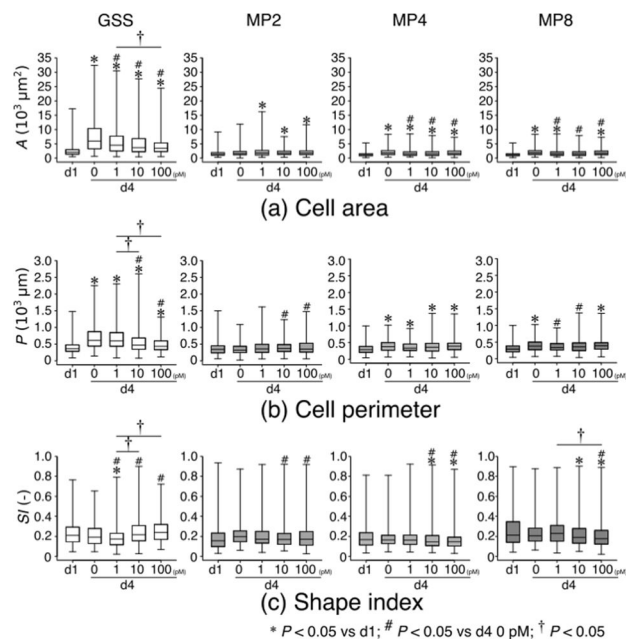


図2 各培養基板における IL-1 β 濃度間の細胞面積 A ，細胞周長 P ，および shape index SI の変化．GSS，ガラス基板培養群；MP2，2 μm マイクロピラー培養群；MP4，4 μm マイクロピラー培養群；MP8，8 μm マイクロピラー培養群．

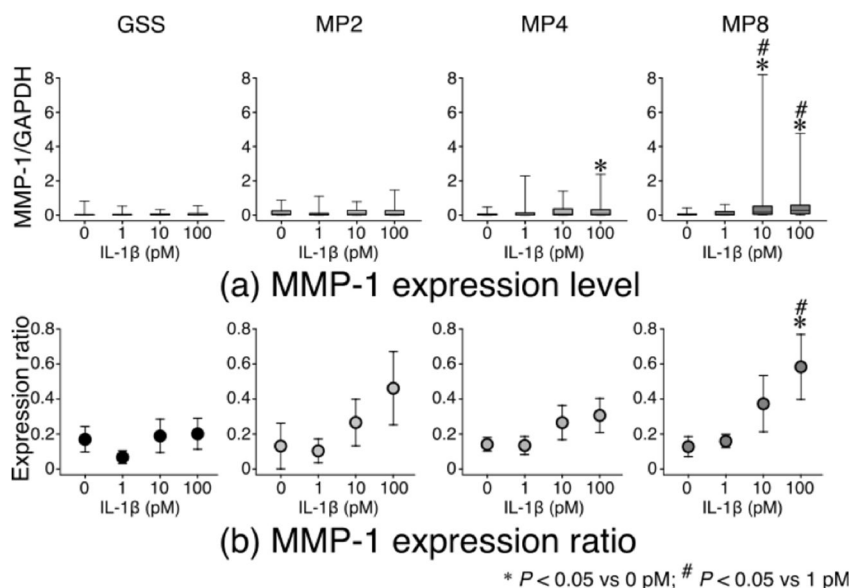


図3 各基板における IL-1 β 濃度による MMP-1 遺伝子発現の変化．(a) MMP-1 遺伝子発現量，(b) MMP-1 遺伝子発現細胞数割合．(b)は mean \pm SD を示す．

(2) マイクロピラー基板上で培養した腱細胞の細胞膜流動性測定

実験方法

Fibronectin コートを施したマイクロピラー基板上に培養した腱細胞に対して，Fluorescence recovery after photobleaching 法 (FRAP 法) 実験を行い，培養基板剛性が細胞膜脂質の流動性に及ぼす影響を検討した．GSS, MP2, MP4, MP8 の各基板に 24 時間培養した腱細胞を Neuro-DiO で染色した．染色した腱細胞は共焦点レーザー顕微鏡を用いて FRAP 実験を行なった．得られたデータについて，拡散理論に基づく数値モデルを用いて膜脂質分子の拡散係数 D と，最終蛍光回復量 I_{final} を求めた．実験には GSS 群にアクチンストレスファイバー形成を阻害する ROCK 阻害剤 Y-27632 を導入した実験群 (Y-27632 群) も設定し，化学的に細胞張力を低下させた場合の膜流動性の計測も行なった．

細胞膜流動性に及ぼす基板剛性の影響

マイクロピラー基板上で培養された細胞の拡散係数は，GSS 群と比べて低く，有意差は GSS 群と MP4 群にあることがわかった (図4)．また，Y-27632 群も GSS 群と比べて有意に低い拡散係数を示

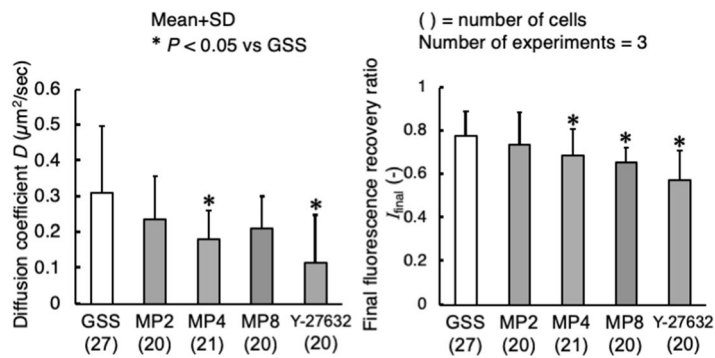


図4 FRAP実験の結果。(a) 拡散係数 D , (b) 最終蛍光回復量 I_{final} . データは mean \pm SD を示す。()=実験にもちいた細胞数.

した. 最終蛍光回復量についても拡散係数と同様の傾向が得られ, MP4, MP8 群の値は GSS 群と比べて有意に低いことがわかった. また Y-27632 群の値も GSS 群と比べて有意に低かった.

(3) まとめ

本研究では腱細胞が示す力学的な特性, 特に主にアクチン骨格に起因する細胞張力と, 特に細胞膜直下に存在するアクチン皮層の力学状態に影響される細胞膜流動性に着目し, これらの特性の細胞機能制御における役割について検討した. 特に本研究では, 腱に過負荷に繰り返し作用する環境で腱に炎症が発生する際の細胞応答を制御する因子として細胞の力学状態に着目し, 培養基板剛性を変化させた場合の腱細胞の炎症性刺激に対する応答の変化を評価した.

その結果, 同一の IL-1 β 濃度では基板剛性が低い基質の腱細胞ほど細胞形態の変化は大きく, MMP-1 発現細胞割合および MMP-1 発現量も高いことがわかり, 特に 10 pM, 100 pM において高剛性基板と低剛性基板の間に統計的有意差が認められた. また, FRAP 実験では低剛性基板上の細胞の膜脂質の流動性は高剛性基板上の細胞より有意に低いことが示された.

このことから, 次のメカニズムが考えられる. 低剛性基板に播種された腱細胞は細胞張力が低下するとともに細胞面積も小さくなる. 細胞膜では細胞膜を構成する脂質分子やサイトカイン受容体などの膜タンパク質の空間密度が上昇し, 膜構成要素の流動性が低下する. これによって受容体同士が近接してクラスターを形成し, 同じ濃度の IL-1 β 刺激に対しての応答性が上昇する. 基板剛性に由来する細胞張力の低下は, 過負荷による腱組織内での局所的な破断に伴って腱細胞から力学刺激が失われた状態に近いと考えられることから, 本研究で示唆された機序は過負荷が作用した腱組織において組織分解・変性が発症・進行するメカニズムを示唆するものと考えられる. そして, 腱炎が進行する過程において細胞張力を正常レベルに戻すことができれば, その進行を抑制できる可能性を示した.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Maeda, E., Kuroyanagi, K., Ando, Y., Matsumoto, T., “Effects of substrate stiffness on morphology and MMP-1 gene expression in tenocytes stimulated with interleukin-1 β ”, *Journal of Orthopaedic Research*, accepted.

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 前田英次郎, 腱の力学負荷応答機序解明を目指した細胞バイオメカニクス解析, 第 46 回日本臨床バイオメカニクス学会, 2019 年 11 月, 久留米市シティプラザ (福岡県久留米市)【招待講演】
- (2) 小澤由佳, 前田英次郎, 松本健郎, レーザ穿孔法を用いた腱組織内コラーゲン線維のクリンプ構造が有する機能の検討, 2019 年度日本機械学会年次大会, 2019 年 9 月, 秋田大学(秋田県秋田市)
- (3) Maeda, E., Kuroyanagi, K., Ando, Y., Matsumoto, T., “Effects of substrate stiffness on morphology and MMP-1 gene expression in tenocytes stimulated with interleukin-1beta”, 2019 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2019 年 2 月, オースチン(アメリカ)

- (4) 前田英次郎, 安東頼子, 松本健郎, 腱細胞への炎症性サイトカイン刺激により惹起される細胞形態変化およびコラーゲン分解酵素MMP-1遺伝子発現に及ぼす培養基質剛性の影響, 第31回バイオエンジニアリング講演会, 2018年12月, 郡山市立中央公民館(茨城県郡山市)
- (5) 黒柳要, 前田英次郎, 村瀬 晃平, 松本健郎, ウサギ腱細胞における細胞膜流動性に及ぼす細胞接着基板剛性の影響, 第29回バイオフィロンティア講演会, 2018年10月, 千葉大学(千葉県千葉市)
- (6) Maeda, E., Kuroyanagi, K., Matsumoto, T., “Regulation of tenocyte response to interleukin-1 beta via controlling intracellular mechanical factors”, 8th World Congress of Biomechanics, 2018年7月, ダブリン(アイルランド)
- (7) 黒柳要, 前田英次郎, 村瀬 晃平, 松本健郎, 細胞膜流動性に及ぼす細胞接着基板剛性の影響, 第41回日本バイオレオロジー学会年会, 2018年6月, 名古屋大学(愛知県名古屋市)
- (8) 前田英次郎, 松本健郎, 腱細胞への炎症性サイトカイン刺激により惹起される基質分解酵素遺伝子発現に及ぼす培養基質剛性の影響, 第57回日本生体医工学会, 2018年5月, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- (9) 黒柳要, 前田英次郎, 村瀬 晃平, 松本健郎, 接着基板剛性がウサギ腱細胞膜流動性に及ぼす影響に関する基礎研究, 日本機械学会東海学生会第49回学生員卒業研究発表講演会, 2018年3月, 名古屋大学(愛知県名古屋市)
- (10) 前田英次郎, 松本健郎, 炎症性刺激に対する腱細胞の遺伝子発現と細胞内張力の関係, 第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年12月, 京都大学(京都府京都市)
- (11) 前田英次郎, 腱のリモデリングメカニズム解明を 目指した組織および細胞レベルでの 腱細胞応答解析, 第28回バイオフィロンティア講演会, 2017年10月, 徳島大学(徳島県徳島市)【キーノート講演】

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名: 木村 俊介

ローマ字氏名: Shunsuke Kimura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。