

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12632

研究課題名(和文) 脱分化脂肪(DFAT)細胞に対する力学刺激負荷による分化・増殖に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of mechanical stress on growth and differentiation of DFAT cell

研究代表者

片岡 則之(KATAOKA, Noriyuki)

日本大学・工学部・教授

研究者番号：20250681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化脂肪(以下 DFAT)細胞は、成熟脂肪細胞を天井培養法で培養することより間葉系幹細胞に類似した性質を持つ細胞へ誘導したものである。実績報告書本研究ではDFAT細胞に対して力学的刺激を負荷するため、伸展刺激負荷装置を製作し、振とう及び伸展刺激同時負荷システムの開発を行った。本研究の結果、細胞への伸展刺激、流れ刺激の同時負荷システムの開発に成功した。DFAT細胞に伸展刺激のみ負荷した場合は、負荷48時間までは細胞増殖がやや抑制された。一方、伸展と流れの同時負荷を行うと細胞は細長く伸長し、細胞老化の抑制につながった。今後、さらに負荷時間、負荷パターンの検討を実施する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DFAT細胞はiPS細胞やES細胞などの他の多能性細胞と比較して安価、安全、かつ取得が容易な点などから、再生医療への活用が期待されている。現在、DFAT細胞は骨、軟骨、脂肪、平滑筋、血管への分化が確認されているが、機械的刺激負荷によってその増殖や分化を制御出来る可能性があり、再生医療に大きな寄与が可能であると考えられる。本研究の結果は、DFAT細胞の再生医療への応用のみならず、他の幹細胞を用いた再生医療、細胞培養技術全般にも適用可能で大きな学術的・社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：DFAT cells are induced into cells with properties similar to mesenchymal stem cells by culturing mature adipocytes in a ceiling culture method. In this study, we fabricated an apparatus to apply mechanical stimuli to DFAT cells and developed a system to apply shaking and stretching stimuli simultaneously. The results of this study show that we succeeded in developing a system for simultaneous loading of extensional and flow stimuli to cells, and that cell proliferation was slightly suppressed up to 48 hours after applying only extensional stimuli to DFAT cells. On the other hand, when cells were subjected to simultaneous loading of extension and flow stimuli, cells elongated and cellular senescence was suppressed. Further investigation of loading time and loading pattern will be conducted in the future.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：DFAT細胞 再生医療 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

近年、病気や事故などによって失われた体の組織や機能を取り戻すための治療方法「再生医療」が脚光を浴びている。当初は、生体材料や生体分解性ポリマーを利用して体細胞を培養し、組織再生を目指すティッシュエンジニアリング (Tissue Engineering) (R. Langer and J. P. Vacanti, "Tissue engineering", Science, 1993)の研究が盛んに行われ、また、胚性幹細胞 (ES細胞) から各種組織の再生を目指した研究が行われてきた。しかし、ES細胞を用いた組織再生では、患者本人の細胞ではないことから、拒絶反応等の問題が残り、実際の治療には適さないという、大きな壁が立ちはだかった。そのようななか、京都大学 山中教授の人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の発見は(Takahashi K and Yamanaka S, Cell, 2006)、患者本人の体細胞から多分化能を有する細胞を得るという画期的な発見で、再生医療の実用化に向けた大きな前進であった。一方で、体細胞の iPS 細胞化には、遺伝子導入から iPS 細胞の培養、細胞の分化、さらには組織化には、非常に時間と手間がかかる。そのような中、研究分担者の日本大学医学部の松本らは、成熟脂肪細胞を天井培養で体外培養することにより生じてくる線維芽細胞の様な形態をした細胞群が高い増殖能と多分化能を獲得することを明らかにし、この細胞群は脱分化脂肪細胞 (DFAT 細胞) と名付けた(Matsumoto T, et al., J Cell Physiol, 2008)。この脱分化脂肪細胞は、通常の脂肪組織から得られる幹細胞とは全く異なり、以下の大きな利点を有している。

- (1) 数 g 程度の脂肪組織から入手可能であること
- (2) 他の細胞の混入が全く無く、脱分化脂肪細胞のみを入手可能であること
- (3) 骨芽細胞など、多分化能を有していることが確認されており、また、虚血部への投与によって血管新生を促すことも確認されていること

以上のことから、再生医療への大きな貢献も期待されるだけでなく、幹細胞の直接投与という「細胞治療」への応用が期待出来る。

ところで、これまで、生体を構成する非常に多くの細胞が流れによるせん断応力や引っ張りや圧縮、圧力を感知して形態や機能を変化させることが知られ、昨今、メカノバイオロジー (Mechano-biology) と呼ばれる研究領域が確立されてきた。血管内面を一層に覆う血管内皮細胞に対する流れ負荷には、主に平行平板型フローチャンバーが用いられ、血流に対する応答が数多く研究されてきた。細胞に対する伸展刺激負荷 (Stretch) では、シリコン等の柔らかい素材上に培養した細胞を引っ張り、その応答が解析され、さらに、細胞を、硬く変形しない素材上に培養して静水圧などの圧力を負荷する研究も行われてきた。これらの研究により、メカニカルストレスが関与した病変発生のメカニズムのみならず、組織や個体の発生学の分野にまでその研究結果が反映されるようになってきた。

これまで研究代表者は、培養血管内皮細胞への流れ負荷実験により、内皮細胞はせん断応力の大きさのみならず、その方向をも感知していることや、せん断応力負荷によって内皮細胞は弾性率を変化させること、また、その弾性率変化はアテローム性動脈硬化に関わる単球の接着・浸潤に影響を及ぼすことなどを明らかにしてきた。他の組織では、骨芽細胞が流れによるせん断応力を感知することも明らかにした。一方で、生体内では循環器系組織でも骨組織でも、恒常的にせん断応力が生じているが、培養細胞に1週間以上に渡る長期間、平行平板型フローチャンバーでせん断応力を負荷するのは非常に困難である。理由は、フローチャンバーやフロー回路内にカビや細菌が容易に混入してしまい、回路全体を長期間、清潔に保つことが難しいことが挙げられる。そこで研究代表者は、培養ディッシュをインキュベータ内で円運動を元にした振とう培

養を行うことによって、培養細胞にせん断応力を負荷するシステムを構築した。数値シミュレーションによる解析より、ディッシュ底面の培養細胞に 0.2Pa 程度のせん断応力を周期的に負荷出来ることを確認し、このシステムによって骨芽前駆細胞に 2 週間、せん断応力を負荷することによって、その増殖や分化、石灰化が亢進することを見出した。

ES 細胞、iPS 細胞を用いた研究で、細胞を培養する際に添加する因子（増殖因子等） 基質の弾性率、あるいは培養時に負荷する力学的因子によって幹細胞の分化能に大きな影響を与えることはすでに多くの報告がある。幹細胞を一定の力学条件下で培養することによって、増殖や分化が大きく異なることは明らかで、そのコントロールが再生医療や細胞治療に大きく寄与することは明白である。また今後、非常に有望な脱分化脂肪細胞の最適培養力学条件の探索により、患者からの脂肪組織の採取から細胞治療に供するまでの培養期間の短縮や、効果的な治療方法の確立につながるものと期待される。

2．研究の目的

本研究は、研究分担者が発見した脱分化脂肪細胞を用い、研究代表者が独自に構築した培養システムをもとにして DFAT 細胞に、伸展、流れ、またそれらの同時力学刺激負荷を行い、DFAT 細胞の成長、あるいは分化に及ぼす力学培養条件の探索、その分化メカニズムの解明、効果的な「細胞治療」の方法を探ることである。

3．研究の方法

本研究では、まず、伸展培養装置 STB-140（ストレックス株式会社）を用いてマウス DFAT 実験に伸展刺激負荷実験を行った。

実験用シリコンチャンバーを親水化処理し、シリコンチャンバーで培養した DFAT 細胞を一晩培養し、翌日、DFAT 細胞のシリコンチャンバーへの接着状態を確認したのち、伸展培養装置に設置して以下の条件で 24 時間、伸展を負荷した。

(1) コントロール実験(静置培養)

培養条件：37[°C]，CO₂ 濃度 5%；伸展頻度：0 往復/分；伸展率：0%

(2) 伸展刺激負荷実験(10 往復/分)

培養条件：37[°C]，CO₂ 濃度 5%；伸展頻度：10 往復/分；伸展率：5%，10%，15%，20%

(3) 伸展刺激負荷実験(30 往復/分)

培養条件：37[°C]，CO₂ 濃度 5%；伸展頻度：30 往復/分；伸展率：5%，10%，15%，20%

円形シリコンディッシュによる伸展刺激負荷装置の概要を図 1 に示す。本装置はシリコン製のディッシュ、アクリル製の土台、シリンジ及び接続用チューブ、モーターとその制御装置からなる。シリンジの吸引によりディッシュ底部に陰圧を加え、ディッシュにたわみを発生させる。これにより細胞に対して伸展刺激を負荷した状態での培養を行うことができる。培養をする際は、ディッシュと土台をインキュベーター内に設置し、それ以外の部分をインキュベーター外に設置した状態で行う。吸引時の陰圧は最大で底面の直径が 125%程度になる範囲で設定した。刺激はステップモータを用いて連続的に吸引と注入を繰り返す。

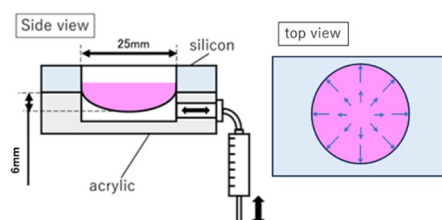


図 1 伸展刺激装置概要

次に、振とうによって細胞に流れを負荷する装置の概要を図2に示す。本装置はディッシュ用の土台、モーターとそのコントローラ、歯車と歯車を連動させるためのゴム製ベルトからなる。下部に設置したモーターで歯車を同時に回転させ、上部の土台を偏心運動させる。これにより、ディッシュ内の細胞に振とうによる流れ刺激を負荷することができる。偏心運動の回転半径は2mmに設定した。回転数は1~300rpmの範囲で設定する。

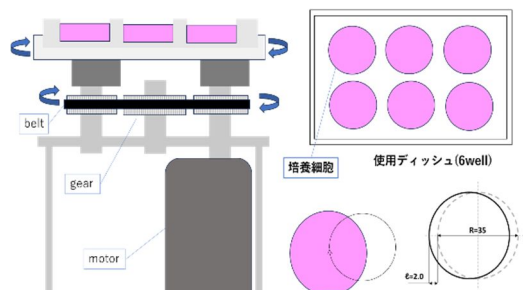


図2 振とう刺激装置概要

振とう及び伸展刺激同時負荷システムの概要を図3に示す。本装置は前述の振とう刺激装置と伸展刺激装置、それらを組み合わせるための固定器具からなる。装置に必要な各種固定器具は3Dプリンターを利用して作製した。本装置では振とうすることにより、培養ディッシュ内の細胞に流れを負荷する。伸展刺激装置に用いるアクリルディッシュ用の固定器具を装置上部に取り付けた。伸展刺激装置に接続したアクリルディッシュを設置し、各装置を稼働させることで振とう刺激と伸展刺激の負荷を同時に行うことができた。

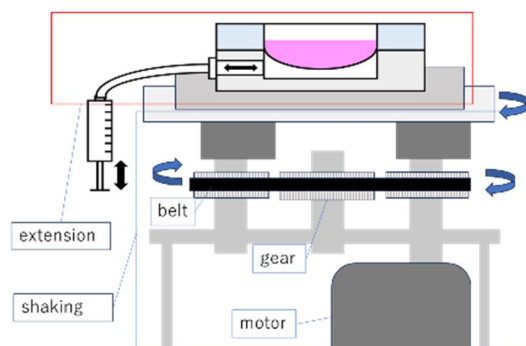


図3 振とう及び伸展刺激同時負荷システム

4. 研究成果

DFAT 細胞に一方向の単純伸展刺激を負荷したとき、細胞の面積は減少し、また、引っ張りと直交方向に配向する傾向が見られた。伸展刺激負荷による顕著な細胞の Shape Index 変化は見られなかったが、比較的低刺激 (10 往復/分の 5% , 10%伸展率 ; 30 往復/分の 5%伸展率)グループは Shape Index 平均値がやや増加した (細胞が丸くなった)。一方、比較的高刺激(10 往復/分の 15%伸展率以上 ; 30 往復/分の 10%伸展率以上)グループでは Shape Index 平均値が減少した。一方向伸展刺激負荷時に、DFAT 細胞の増殖率に変化は見られなかった (図4)。伸展培養による疑似的な DFAT 細胞のスフェロイドが散見された(図5)。スフェロイド周辺は細胞数が減少していたことから、DFAT 細胞が収縮して集まり、スフェロイドを形成した可能性がある。

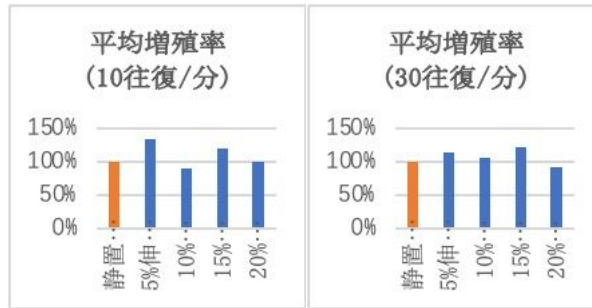


図4 DFAT細胞の平均増殖率[%]

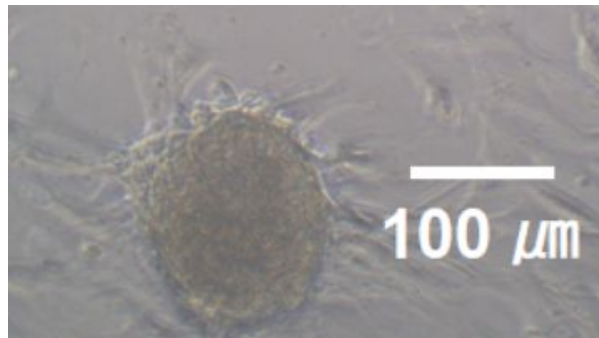


図5 DFAT細胞のスフェロイド(30 往復/分, 10%伸展率)

DFAT細胞に円形ディッシュで伸展刺激を48時間負荷、1Hz負荷した際の細胞の増殖率の変化を図6に示す。実験開始時点での細胞数を100%とし、24h、48hでの細胞の増殖率を算出した。刺激環境下では刺激なしと比較して24hで80%、48hで370%程度の増殖能低下が認められた。



図6 伸展刺激実験での細胞の増殖率

図3に示す振とう及び伸展刺激同時負荷システムは完成したが、DFAT細胞での実験にはいたっていない。

現在のところ、流れ刺激負荷ではDFAT細胞の増殖が促進し、伸展刺激では増殖が低下することが観察されている。今後、力学刺激同時負荷によって細胞増殖がどう変化するか、詳細に観察する計画である。

< 引用文献 >

- 1) Takahashi K and Yamanaka S, Cell, 2006
- 2) Matsumoto T, et al., J Cell Physiol, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomoteru OKA, Yasuyuki OGUMA, Noriyuki KATAOKA	4. 巻 17
2. 論文標題 Real-time analysis of F-actin fluctuation in living cells with quasi super-resolution technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 22-00081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.22-00081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kenta KANNO, Hyu AKABANE, Yuji SHIMOGONYA, Noriyuki KATAOKA	4. 巻 17
2. 論文標題 Response of human endothelial cells to the vortex flow in an immediately expanding flow chamber	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 22-00080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/jbse.22-00080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tomoteru Oka, Kouki Furukawa, Yasuyuki Oguma, Buntara Sthenly Gan, and Noriyuki Kataoka	4. 巻 11
2. 論文標題 Actin Filaments That Form Networks in Living Cells Fluctuate Rapidly and Independently of Each Other	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Biomedical Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 33-43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11648/j.ijbse.20231103.11	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計23件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Noriyuki KATAOKA
2. 発表標題 Flow-Mediated Cellular Biomechanics
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡知輝、ガンブンタラ ステンリー、片岡則之
2. 発表標題 数値モデルを用いた細胞骨格構造体の動的解析
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 武藤大、早野准平、片岡則之
2. 発表標題 血管内皮細胞を使用した医用金属材料の生体適合性評価
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大槻将也、尾川原康輔、古川皓喜、岡知輝、片岡則之
2. 発表標題 流れ負荷時の生細胞内 F-actin の実時間観察方法の確立
3. 学会等名 日本機械学会 第34回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽飛祐、花輪陸人、塚越陸登、今林亘、下権谷祐児、片岡則之
2. 発表標題 急拡大流路における非定常流負荷時の血管内皮細胞の応答
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤淳哉、顧耘嘉、小森元滋、坂口陸、片岡則之
2. 発表標題 脱分化脂肪(DFAT)細胞の伸展刺激負荷に対する応答
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤羽飛祐、花輪陸人、塚越陸登、下權谷祐児、片岡則之
2. 発表標題 血管内皮細胞の非正常渦に対する形態応答
3. 学会等名 第56回日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 片岡 則之、赤羽 飛祐、下權谷 祐児
2. 発表標題 急拡大流路における2次元渦に対する血管内皮細胞の応答解析
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 早野 准平、片岡 則之
2. 発表標題 培養細胞を用いた金属・生体材料の生体適合性試験
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡 知輝、小熊 靖之、ガン ブンタラステンリー、片岡 則之
2. 発表標題 擬似的な超解像度画像解析手法を用い生細胞内F-actinネットワーク構造のゆらぎの実時間解析
3. 学会等名 日本機械学会 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片岡 則之
2. 発表標題 骨芽細胞の分化に及ぼす長期メカニカルストレス負荷の影響
3. 学会等名 第47回日本骨折治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoteru OKA, Yasuyuki OGUMA, Buntara Sthenly GAN, Noriyuki KATAOKA
2. 発表標題 Analysis of F-actin fluctuation in network structure in the cell
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hyu AKABANE, Yuji Shimogonya, Noriyuki Kataoka
2. 発表標題 Response of Vascular Endothelial Cells to Spatial and Temporal Shear Stress Gradients
3. 学会等名 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihisa Kawano, Tomoteru Oka, Noriyuki Kataoka, Buntara Sthenly Gan
2. 発表標題 A cellular Cytoskeleton vibration driven by axial vibration of Microtubules and lateral vibration of Actin filaments
3. 学会等名 The 8th International Conference on Advanced Technology Innovation 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古川皓喜, 岡知輝, 片岡則之
2. 発表標題 生細胞内の複数のアクチンフィラメントのゆらぎの相関関係の解析
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 顧耘嘉, 佐藤淳哉, 小森元滋, 片岡則之
2. 発表標題 脱分化脂肪(DFAT)細胞のメカニカルストレス負荷に対する増殖能の評価
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関根公平, 武藤大, 片岡則之
2. 発表標題 メカニカルストレス負荷下での金属材料の培養血管内皮細胞との生体適合性試験
3. 学会等名 第35回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Noriyuki Kataoka, Junya Sato, Gu Yunjia, Motoshige Komori, Tomohiko Kazama, Taro Matshumoto
2. 発表標題 Responses of dedifferentiated FAT (DFAT) cell to stretching stimulation
3. 学会等名 6th Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大槻 将也, 松本 拓真, 岡 知輝, 片岡 則之
2. 発表標題 流れ負荷時の生細胞内F-actinの実時間観察手法の確立
3. 学会等名 第57回 日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 尾川原 康輔, 増田 翔, 片岡 則之
2. 発表標題 培養細胞の重力に対する応答解析のための重力制御システムの構築
3. 学会等名 第57回 日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 淳哉, 顧 耘嘉, 小森 元滋, 長友 龍之介, 片岡 則之
2. 発表標題 培養細胞に対する流れ及び伸展刺激同時負荷システムの開発
3. 学会等名 第57回 日本生体医工学会東北支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花輪 陸人, 池田 俊輔, 池田 蓮, 下権谷 祐児, 片岡 則之
2. 発表標題 急拡大流路における生理的拍動流の血管内皮細胞に対する応答
3. 学会等名 日本機械学会 東北支部 第59期講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 関根 公平, 武藤 大, 小澤 孝太郎, 田村 桐子, 片岡 則之
2. 発表標題 培養細胞を用いた医用金属材料の生体適合性評価
3. 学会等名 日本機械学会 東北支部 第59期講演会
4. 発表年 2024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	松本 太郎 (Matsumoto Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

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