

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	局所的力学環境操作による腱由来幹細胞の多分化能制御機構の解明				
研究テーマ (欧文) AZ	Regulation of multipotent differentiation of tendon stem cell by manipulation of local cellular mechanical environment				
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓)マエダ	名)エイジロウ	研究期間 B	2010 ~ 2012 年
	漢字 CB	前田	英次郎	報告年度 YR	2012 年
	ローマ字 CZ	MAEDA	EIJIRO	研究機関名	北海道大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	北海道大学大学院工学研究院人間機械システムデザイン部門・助教				
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>本研究では、多分化能を有し、腱の健全性の維持や炎症発達・鎮静に重要な役割を果たすと考えられている腱幹細胞(Tendon Stem Cell, TSC)の分化能制御を力学的に行うことを目的とした。特に、細胞骨格であるアクチン繊維が発揮する張力(細胞内張力)に着目し、細胞接着基質の剛性に応じて変化する細胞内張力によってTSCの分化能が制御されているとの仮説を立てた。まず、微細加工技術を用いて直径3μm、中心間距離8μm のポリジメチルシロキサン(PDMS)製マイクロピラー基質デバイスを作製した。この基質の剛性を変えるため、ピラー高さが4, 8, 10μm の3種類の基質を準備した(それぞれ33, 18, 6 kPa の有効ヤング率に相当)。この基質に接着した細胞の細胞内張力によってマイクロピラーが変形するので、この変形量から細胞牽引力を算出し、細胞内張力の指標とした。次に、腱細胞の細胞機能と細胞内張力の定量的な関係を検討した。ウシ中手指関節伸筋腱より採取した腱細胞を、3種類のマイクロピラー基質上で培養し、細胞内張力と、腱細胞の同化作用を示すタイプⅠコラーゲンならびに異化作用をしめるコラーゲン分解酵素 MMP-1 の mRNA 発現量を、それぞれ24時間後に測定した。その結果、33kPa の基質で培養された腱細胞は 6kPa の基質で培養された腱細胞と比べて、有意に高い牽引力を発揮し、それに伴って有意に低い MMP-1 発現量を示した。一方、タイプⅠコラーゲン発現量には有意な差はみられなかった。また、Ⅱ型ミオシン阻害剤であるプレビスタチンを投与した実験では、ミオシンの阻害に伴って有意に牽引力が低下し、MMP-1 の発現が有意に上昇した。これらの結果から、腱細胞の細胞内張力はⅡ型ミオシンの活性によって制御され、細胞内張力の変化は腱細胞異化作用に強く影響を及ぼすことがわかった。続いて、TSCの多分化能と細胞内張力の関係を調べることを試みた。しかしながら、研究期間内でTSCを単離することができなかった。幹細胞単離は様々な因子に影響されるため、単離方法の早急な確立が今後の課題である。</p>					
キーワード FA	腱幹細胞	細胞内張力	基質剛性	細胞機能力学制御	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

The present study was performed to regulate differentiation lineages of multipotent tendon stem cells (TSCs), which are thought to involve the maintenance of tissue homeostasis and the development/inhibition of tissue inflammation, from the view point of biomechanics. In particular, we focused on actin filaments in cytoskeletal components, which generate tension within the cell (known as cytoskeletal tension), and hypothesized that the stiffness of cell attaching substrate alter cytoskeletal tension and then regulate differentiation lineages of TSCs. To measure cytoskeletal tension, micropillar substrates were fabricated using MEMS techniques from polydimethylsiloxane (PDMS), which had 3 μm in height and 8 μm in centre-center spacing, whereby we could measure traction forces from the deflection of the pillars made by cytoskeletal tension of the cell attaching to the substrate. To alter the stiffness of the substrate, we prepared three types of micropillars, having the height of 4, 8, and 10 μm , corresponding to 33, 18, and 6 kPa of effective Young's modulus. First, we studied the quantitative relationship between cytoskeletal tension and tenocyte metabolism. Tenocytes harvested from bovine foot extensor tendons were seeded on the three types of micropillar substrates for 24 hours. At the end of the culture period, traction forces were measured on a microscope and mRNA expressions for type I collagen (anabolic marker) and matrix metalloproteinase-1 (MMP-1, catabolic marker) were determined using qPCR. It was demonstrated that tenocytes on 33 kPa substrate generate significantly higher traction forces and lower expression for MMP-1 compared to those on 6 kPa substrates. No significant alteration was observed on type I collagen expression. When myosin II was inhibited with blebbistatin in separate experiments, traction forces were reduced and MMP-1 expression was increased significantly. From these findings, it was revealed that tenocyte cytoskeletal tension was regulated by the activation of myosin II, and the alteration in cytoskeletal tension strongly influences tenocyte catabolism. We then tried to study the relationship between TSC differentiation lineages and cytoskeletal tension. However, within the research period, we could not isolate TSCs successfully. Accordingly, it is the subject of immediate future work to establish the isolation method of TSCs as the isolation can be affected by a number of biological and chemical factors.