

## 高温環境が腱細胞に及ぼす影響の検討

## Effect of hyperthermia on tenocyte physiological functions.

○ 田代真啓 (北大院) 前田英次郎 (北大工) 大橋俊朗 (北大工)

Masataka TASHIRO, Graduate School of Engineering, Hokkaido University

Eijiro MAEDA, Faculty of Engineering, Hokkaido University

Toshiro OHASHI, Faculty of Engineering, Hokkaido University

**Abstract:** It is known that chronically injured tendon demonstrates inflammation responses and an increase in temperature in tendon core. Therefore, the present study was performed to investigate the relationship between thermal stimulation and tenocyte metabolic and inflammation responses. Tenocytes were seeded on a custom-made microgroove device. Thermal stimulation at 41 or 43°C was applied to the cells within the device for 30 minutes. The treatment at 37°C was also performed as a control. Cell viability as well as mRNA expression analysis for type I collagen, MMP-1, IL-1b and Caspase-3 were performed following a 24 hours incubation at 37°C after the stimulation. It was demonstrated that cell viability decreased from 95.5 % at 37°C to 60.5% at 43°C. This was associated with decreases in type I collagen and Caspase-3 gene expression and increases in MMP-1 and IL-1b gene expressions. These results suggest that hyperthermia may have an enhancing effect on tenocyte matrix catabolism.

**Key Words:** Tenocytes, chronic injury, inflammation, catabolism, hyperthermia

## 1. 緒言

腱は主にコラーゲン線維で構成される関節軟組織であり骨と筋肉を結び付け、力を伝達している。腱は長軸方向に沿って配向しており、階層構造を示している。コラーゲン線維間には線維の走行方向に沿って腱細胞が存在しており、腱細胞は紡錘型を示しながら互いに結合している。腱はその構造、および力学特性を変化させることで力学環境の変化に適応している。その過程において、腱細胞は生理的な負荷が作用することで同化作用（コラーゲンの産生）を亢進させ、過負荷が作用することおよび無負荷状態で異化作用（MMP-1の発現）を亢進させることが知られている。また、腱は過剰な負荷に繰り返しさらされることで腱炎を発症し、その発症においては、腱細胞の異化作用が亢進すること、および組織内温度が上昇することが知られている。しかしながら、温度上昇と異化作用の亢進の関連については詳しく知られていない。そこで本研究では、腱炎発症メカニズムの解明を目的とし、腱細胞機能に及ぼす高温環境の影響を検討した。

腱には関節の動きに伴い繰り返し引張り負荷が作用することから、腱細胞についての多くの研究は引張り負荷に対する応答を調べたものがある一方で<sup>(1)</sup>、温度変化が腱細胞に与える影響についての研究は多くない。Birchらは高温環境下においてディッシュ上で腱細胞の培養を行い、腱細胞の生存率を検討した<sup>(2)</sup>。しかし、ディッシュ上での平面培養は腱細胞にとって生理的環境に近いとは言えない。そこで本研究ではより生体内環境に近い環境で温度環境の変化が腱細胞に与える影響の検討を行うため、マイクログループ上に腱細胞を培養し実験を行った。マイクログループ実装実験デバイスは腱組織環境を模擬し、腱細胞を配列培養することができる<sup>(3)</sup>。これまでマイクログループ実装実験デバイスを用いた研究では、繰り返し引張り刺激に対する応答についての研究が行われてきた。本研究では、マイクログループ実装実験デバイスに異なる温度の温水を循環させることで多様な培養環境の設定を可能とした。腱細胞に温度刺激を与えた後、腱細胞の生死判定、ならびに同化作用を示すI型コラーゲン、異化作用を示すMMP-1 (Matrix metalloproteinase-1)、IL-1β (Interleukin-1) および CASP3

(Caspase-3)の遺伝子発現を定量リアルタイムPCRを用いて測定した。

## 2. 実験方法

## 2-1 実験デバイス

微細加工技術 (MEMS 技術) を用いて高さ・幅・間隔が 10μm の PDMS (Sylgard 184, Dow corning) 製マイクログループ基盤を作製した (図 1 (A))。さらに、同じく PDMS で作製した流路パーツを接合することでマイクログループ実装実験デバイスを作製した。実験デバイスの温度調整には、2つの循環装置を用いることで、実験前後に培養温度を 37°C に保持できるようにした (図 1 (B))。また、マイクログループ表面には細胞培養に先立ちプロネクチンをコーティングし、細胞接着を促した。

## 2-2 細胞実験

試料にはウサギアキレス腱から単離した腱細胞を用いた。本実験には継代数が 2~4 の細胞を用い、細胞播種密度は 2000 cells/cm<sup>2</sup> とした。マイクログループ実装実験デバイス内で腱細胞を 24 時間培養し、腱細胞を十分に接着させた。図 1 に示した実験系を用いてマイクログループ実装実験デバイスに温水を循環させ、腱細胞を 37, 41, 43°C のいずれかの温度で 30 分間保持した。その後、再び 37°C で 24 時間培養し、Calcein-AM および Ethidium homodimer-1 溶液をデバイス内にローディングし、光学顕微鏡 (IX81, Olympus)

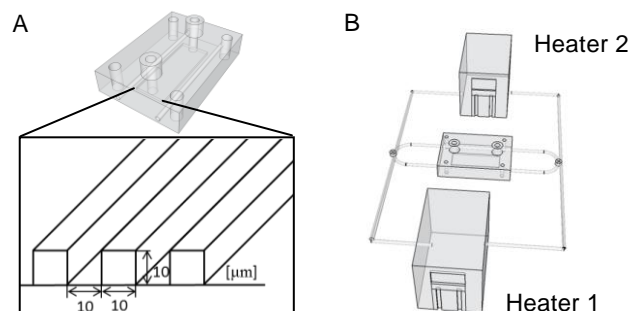


Fig. 1 (A) Microgroove structure. (B) Experiment system for hyperthermia.

を用いてグループ上の腱細胞を蛍光観察して、生死判定を行った。

次に生死判定と同様に 37, 41, 43°C の温度環境下で腱細胞を 30 分間保持した後、24 時間 37°C で培養し、腱細胞を回収して RNA を抽出した。これを基として cDNA を作製し、I 型コラーゲン、MMP-1、IL-1 $\beta$  および CASP3 についてリアルタイム qPCR を用いた遺伝子発現解析を行った。GAPDH 遺伝子を reference 遺伝子として用い、37°C での発現量に対する相対発現量を算出した。

### 3. 結果および考察

高温環境で培養後、生死判定を行った際に取得した細胞の蛍光染色画像および細胞の生存率を図 2 に示す。37, 41, 43°C における腱細胞の生存率はそれぞれ 95.5, 76.0, 60.5% であった。これらの変化には統計的有意性は認められなかったものの、高温になるにつれ、腱細胞の生存率が低下していくことがわかった。この傾向は Birch らの実験結果と同様の傾向であった。また、高温下での死腱細胞の形状が球形へと変化した様子が見られた。

各培養温度の腱細胞の遺伝子発現量を図 3 に示す。培養温度の上昇とともに I 型コラーゲンの発現量が減少していく傾向が見られた。特に 43°C において I 型コラーゲンの発現量が著しく低下した。培養温度の上昇とともに MMP-1、IL-1 $\beta$  の遺伝子発現量が増加する傾向が得られた。これにより培養温度の上昇により、腱細胞の同化作用は低下する一方で、異化作用が亢進していることが確認された。MMP-1 や IL-1 $\beta$  は炎症反応のマーカーであり、これらの発現量が増加したことから温度環境の変化が腱細胞の炎症の発症に影響を及ぼすことが示唆される。Hosaka らはウマ浅指屈筋腱から取得した腱細胞に、37~45°C の温度刺激を与え、腱細胞の生死判定および MMP-2、MMP-9 および IL-1 $\beta$  の発現量解析を行った<sup>(4)</sup>。その結果、40, 42°C の温度環境で 60 分間腱細胞を培養した場合、生存率はそれぞれ 62.5, 5.3% となった。IL-1 $\beta$  と MMP-9 の発現量は 40°C の温度環境下で増加する傾向となった。本研究での腱細胞の生存率は Hosaka らの実験結果と異なる結果となったが、IL-1 $\beta$  と MMP-9 の発現量が増加するという結果は本研究と同様の傾向となった。これらの結果から腱細胞の異化作用は高温環境下で、促進されることが示唆される。

CASP3 は、MMP-1、IL-1 $\beta$  と比べて温度刺激によって発現量が低下した。CASP3 は細胞死のうち、アポトーシス時に発現する遺伝子であることから、生死判定実験で確認された死細胞はアポトーシスによって細胞死したのではなく、壊死（ネクローシス）であることが示唆される。

### 4. 結言

本研究から以下の結論を得た。

細胞培養環境の温度上昇は、腱細胞の MMP-1 や IL-1 $\beta$  の発現上昇に示されるように異化作用の亢進に強く影響を与えており、炎症発症との関連が強く示唆される。

### 5. 謝辞

本研究の一部は JSPS 科学研究費 (No. 25702022) の助成を受けて実施された。MEMS 加工は北海道大学創成科学研究棟オープンファシリティを使用した。

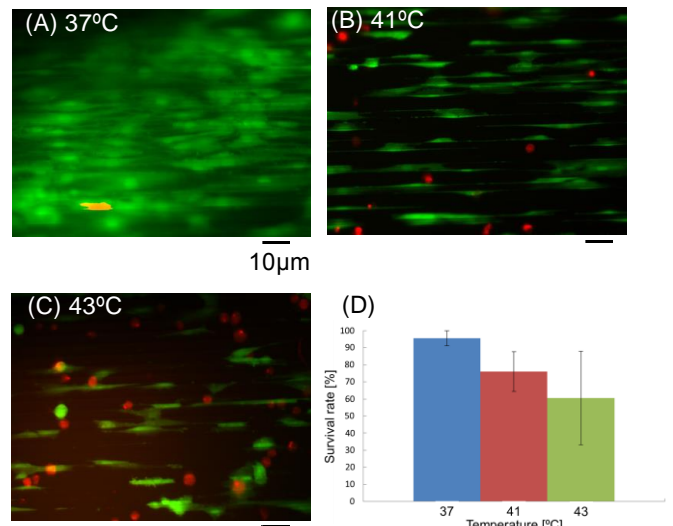


Fig. 2 Fluorescence images (A-C) and result of survival rate of heat treatment (D). Green and red fluorescence indicates viable and dead cells, respectively.

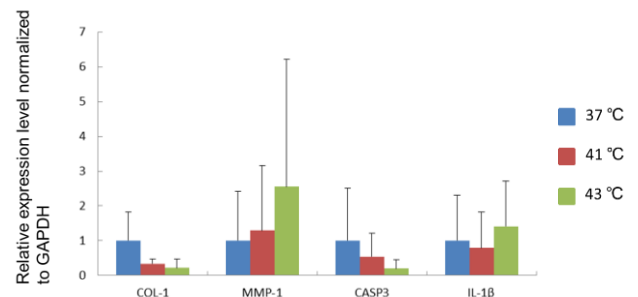


Fig. 3 Relative expression ratio of COL-1, MMP-1, CASP3 and IL-1 $\beta$  mRNA from tenocytes with heat treatment at 37, 41 and 43 °C

### 参考文献

- (1) Maeda, E., Shelton, J. C., Time dependence of cyclic tensile strain on collagen production in tendon fascicles, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 362, pp. 392-404, 2007.
- (2) Birch, H. L., Wilson, A. M., The effect of exercise-induced localized hyperthermia on tendon cell survival, *The Journal of Experimental Biology*, vol. 200, pp. 1703-1708, 1997.
- (3) Maeda, E., Hagiwara, Y., A new experimental system for simultaneous application of cyclic tensile strain and fluid shear stress to tenocytes in vitro, *Biomedical Microdevices*, vol. 15, pp. 1067-1075, 2013.
- (4) Hosaka, Y., Ymaguchi, M., Effect of heat on synthesis of gelatinases and pro-inflammatory cytokines in equine tendinocytes, *Biomedical Research*, vol. 27, pp. 233-241, 2006.