

課題番号 30

## 多軸同時振動刺激による骨芽細胞および神経細胞の 分化誘導法の解析

## [1] 組織

代表者：洪 光

(東北大学大学院歯学研究科)

対応者：林 陽平

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

工藤 忠明 (東北大学大学院歯学研究科)

富並 香菜子 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 15 万円

## [2] 研究経過

## (1) 研究目的

生体の細胞は様々な物理刺激（機械刺激・温熱刺激・電磁気刺激等）を受ける。骨は外部から機械刺激を常に受ける部位であり、これまで骨芽細胞へ分化する前骨芽細胞への機械刺激負荷による細胞増殖や分化促進等への影響が研究されてきた。最近、上下方向の振動による骨芽細胞分化への影響が示唆されたがその機序の多くは不明である (Ota et al. 2016)。

申請者らのグループはこれまで、培地温度を制御する独自システムとして、ラット神経分化モデル細胞に対し温度制御式反復温熱刺激 (**temperature-controlled repeated thermal stimulation, TRTS**) を負荷し、TRTS 単独で神経細胞分化を誘導する方法やその作用機序を明らかにしてきた (Kudo et al. 2015, Kudo et al. 2020)。さらに最近、前骨芽細胞の TRTS による骨芽細胞分化誘導法の確立やその作用機序についての研究を進めている。本研究では特殊ガラスプレートヒーターによる温熱刺激とは異なる物理刺激による分化誘導法を開発するための知見を得ることを目的とし、これをもって再生医療の発展に貢献する。

## (2) 研究の概要

本研究計画では、具体的には培養細胞用の微細振動刺激装置 NSSB-300N (ネッパジーン社、図 1) を用い、機械的な多軸 (前後・左右・上下方向) 同時微細振動刺激 (**multi-axis simultaneous micro vibration, 略称 MSMV**) による①骨芽細胞分化及び②神経細胞

単位 (G)

強度設定	振動強度 (X)		振動強度 (Y)		振動強度 (Z)		周波数 Hz
	+X	-X	+Y	-Y	+Z	-Z	
1	0.20	0.19	0.19	0.19	0.27	0.27	14.3
2	0.44	0.41	0.45	0.47	0.36	0.34	23.7
3	0.50	0.51	0.52	0.51	0.39	0.40	29.4
4	0.86	0.80	0.68	0.70	0.47	0.52	42.2
5	0.66	0.73	1.03	0.98	0.67	0.63	55.0
6	0.92	0.98	1.39	1.43	0.68	0.71	65.2
7	1.29	1.27	1.73	1.73	0.80	0.94	70.1
8	1.82	1.73	2.30	2.15	0.99	0.95	81.9
9	2.34	2.49	2.41	2.44	1.19	1.40	92.1

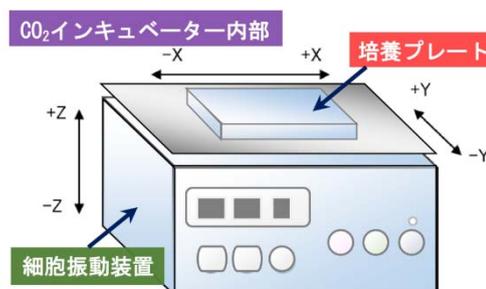


図1. 培養細胞振動装置 (NSSB-300N) の模式図と三軸の振動強度・周波数 (※振動刺激時、培養プレートは装置上面に設置)

分化に与える影響やその分子機構の解析を実施する。本研究にて得られた知見を基に、MSMV を活用した細胞環境制御による低侵襲かつ安全な細胞分化誘導法を開発し、またその分子機構を解明し、将来的には温熱刺激やその他の細胞分化誘導法とも組合せた、より効果的な臨床応用を目指す研究の一助とする。

この背景の下、本年度は、MSMV 研究を効率的に推進するため、MSMV を用いた神経細胞分化誘導法に関する技術的な最適化と MSMV による神経細胞分化誘導機構の解明を中心とした検討を行った。研究打合せは、研究期間中、計 15 回以上 (メール会議を含む) 実施した。

## [3] 成果

## (3-1) 研究成果

本共同研究では、湿度の高い培養用インキュベーター内での使用が可能な点をひとつの特徴とする微細振動刺激装置 NSSB-300N を用いた、精密な振動強度

制御下での多軸（前後・左右・上下方向）同時微細振動刺激（即ち MSMV）が神経細胞分化を効率的に誘導する振動条件の検討と、MSMV による神経分化誘導を可能とする分子機構の解明のための検討を実施した。

具体的には、PC12 細胞株や申請者らの研究グループが近年樹立した PC12 細胞の派生株（PC12-P1F1 および PC12-P1D10：それぞれ、温度調節式反復性温熱刺激(TRTS)依存性神経細胞分化を起こしやすい（P1F1）、もしくは起こしにくい（P1D10）性質をもつ、PC12 細胞株のサブクローン）を用い、細胞外部環境として振動装置により生ずる MSMV とそれに付随して生ずる様々な機械的刺激を可能な範囲で最適化し、また神経突起伸長過程に与える影響やそのシグナル経路に及ぼす影響を検討したところ、主に以下の成果を得た。

#### [方法]

(1) 上記の 3 つの細胞株を 10 cm 培養皿にて各々培養し、増殖後、分化誘導プレートに播種した PC12-P1F1 細胞等には、微細振動刺激装置（図 1）を用いた神経細胞分化を誘導するため、装置として設定可能な範囲で種々の強度の MSMV 処理（18 時間/日、7 日間）が行われた。7 日後、倒立型位相差顕微鏡を用いて神経突起形成の程度を評価し、分化誘導プロトコールの最適化を試みた。

(2) (1) の検討により暫定的に最適化された MSMV を PC12 細胞に負荷する際、各種の低分子シグナル伝達阻害剤（ERK1/2 阻害剤の U0126 等）を作用させ、①PC12 親細胞株において MSMV 依存的な神経細胞分化機構に関与するシグナル経路や②親株とサブクローン細胞株との間における細胞応答の違いを検討した。

#### [成果]

(1) 本研究において培養細胞振動装置(NSSB-300N)の刺激条件を検討したところ、暫定的に最適化した設定よりも弱すぎる振動刺激条件では PC12 細胞の分化誘導が誘導されないことが明らかとなった。一方で、強すぎる振動条件では、PC12 細胞が死滅してしまうことが判明した。

(2) (1) に関連し、強すぎる振動刺激では、測定したところ、MSMV 負荷中の培地温度が 40°C 以上に上昇したことから、細胞が死滅した原因の 1 つに培地温度の過剰な上昇が考えられる。このことは、振動刺激に伴う培地温度変化の制御の重要性を示唆する。

(3) (2) に関連し、PC12 親細胞株の代わりに PC12-P1F1 (TRTS 高感受性サブクローン) を用いると、本研究における微細振動刺激により神経細胞分化が PC12

親細胞株よりも有意に誘導されることが判明した。このことは、振動刺激に伴う培地温度の上昇が、温熱刺激となって間接的に PC12 細胞の神経細胞分化を促進させている可能性も考えられるため、この点については、実験系を更に工夫して今後さらに慎重に検討を進める必要がある。

(4) 本研究における培養細胞振動装置(NSSB-300N)を用いた微細振動刺激(MSMV)が PC12 細胞の神経突起を誘導する細胞内シグナル伝達経路は不明であったが、MAP キナーゼファミリーについては、ERK1/2 の活性を抑制する低分子シグナル阻害剤 U0126 を用いた実験により MSMV 依存的な神経突起伸長が抑制されることから、少なくとも ERK1/2 経路が必須の役割を担うことが示唆された。このことは、振動装置により細胞に加わった刺激が、何らかの刺激受容体の活性化により、一般に PC12 細胞の神経細胞分化調節機構に関与する ERK1/2 経路の活性化を促進した可能性を示すものであり、今後 ERK 経路上流の活性化因子を検討することが作用機序の解明に有用である。

(5) また、JNK の活性を抑制する低分子シグナル阻害剤 SP600125 では反対に MSMV 依存的な神経突起伸長が促進されたことから、MSMV もしくはそれにより生じた副次的な物理刺激（温度刺激等）による神経分化誘導効果が JNK シグナル伝達経路の抑制により何らかの理由で増強されたことが示唆された。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究における成果は、関連領域の研究者間における融合領域研究を促進すると思われる。また、PC12 細胞の神経細胞分化や MC3T3 細胞の骨芽細胞分化を調節する、MSMV 作用を支える分子メカニズムやそのターゲットとなる分子に対する研究は非常に有益で、MSMV に準じた非侵襲的な微細振動刺激やそれに付随して生ずる物理的効果を用いた分化誘導療法や再生医学への今後の応用に道を開くものと考えられる。

#### [4] 成果資料

(1) Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Hong G, Nakai J. Characterization of PC12 cell subclones with different sensitivities to programmed thermal stimulation. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. **21**(21): 8356.