

課題番号 41

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)

田中 太邦 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 13 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, Luo et al. 2022)。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

強度設定	単位 (G)						周波数 Hz
	振動強度 (X)		振動強度 (Y)		振動強度 (Z)		
	+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	0.86	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

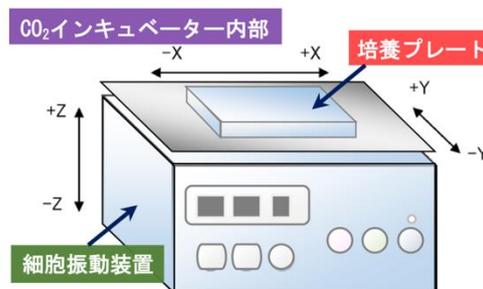


図1. 培養細胞振動装置 (NSSB-300N) の模式図と三軸の振動強度・周波数 (*振動刺激時、培養プレートは装置上面に設置)

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なども組合せた、より効果的な細胞分化誘導法の臨床応用を目指す研究の一助とする。

昨年度の検討では、MSMV による骨芽細胞分化誘導法の樹立や MSMV による神経細胞分化における p38 経路の重要性など、多数の新知見が得られた。この背景の下、本年度については、MSMV 研究を効率的に推進するため、MSMV を用いた骨芽細胞分化誘導法に関する技術的な検討を中心に行った。研究打合せは、研究期間中、毎月 (オンライン会議およびメール会議を含む) 実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本共同研究では、今年度は、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) を用い、骨芽細胞分化をより効率的に誘導する振動条件の検討や

MSMV による骨芽細胞分化誘導の分子機序の検討を実施した。

具体的には、マウス由来の前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞株用い、昨年度に続いて、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、骨芽細胞分化誘導が可能な条件や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) MC3T3-E1 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細胞に、微細振動刺激装置 (図 1) を用いて骨芽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条件の MSMV 処理(最大 21 日間)が行われた。2 日、4 日、7 日、14 日もしくは 21 日後、主にアルカリホスファターゼ(ALP)アッセイを用いて骨芽細胞分化の程度を定量的に評価した。

[結果]

(1) 本研究において採用した培養細胞振動装置(NSSB-300N)による MSMV 刺激により、骨芽細胞分化誘導が可能か否かは不明であったが、昨年度の本研究にて MC3T3-E1 細胞に様々な条件で振動刺激を加えたところ、[周波数 42.2Hz、刺激時間 50 秒、刺激間隔 1 時間]の条件で、7 日間振動刺激を付加することにより骨芽細胞分化マーカーである ALP 活性の有意な上昇が得られることを初めて証明した。我々が確立したこの MSMV 刺激条件における ALP 活性の上昇について、今年度の研究では 3 週間にわたり経時的により詳細な評価を行ったところ、ALP の活性レベルは、MSMV 開始後、最初の 1 週間までの間は徐々に亢進し、その後の 2 週間は、ほぼ同じレベルを維持することが明らかとなった。

(2) この刺激条件による骨芽細胞分化誘導機構を解明するため、BMP シグナルの阻害剤である LDN193189 を併用して MSMV 刺激を MC3T3-E1 細胞に加えたところ、MSMV 依存的な ALP 活性の上昇はほぼ完全に抑制されたことから、MSMV 依存的な骨芽細胞分化には BMP シグナル経路が関与することが示唆された。今後 MSMV 刺激依存的に活性化する細胞内シグナル経路の特定をさらに進める必要がある。

(3) 昨年度の本研究にて確立した MC3T3-E1 細胞に対する MSMV の振動刺激条件についてさらに検討を加えたところ、[周波数 42.2Hz、刺激時間 50 秒、刺激間隔 1 時間]の条件で、2 週間の間毎日刺激を付加するよりも、最初の 4 日間だけ MSMV を負荷し、その後の 3 日間は刺激の休息期間を設けるというプログラムで 2 週間分化誘導を行った方が意外にも ALP 活性の

上昇率が高いことが判明した。

(4) MSMV 刺激による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化機構の研究をさらに強力にかつ効率的に推進するため、MSMV に対するレスポンスの高い MC3T3-E1 細胞のサブクローンを樹立する必要があった。そこで、われわれは今年度、シングルコロニー法により MC3T3-E1 細胞のサブクローンを多数樹立した。今後、得られたサブクローンの中から、MSMV 高感受性 MC3T3-E1 細胞並びに低感受性 MC3T3-E1 細胞の同定を進める予定である。

(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、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硬組織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, Hong G, Tominami K, Luo YR, Izumi S, Tanaka T, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Nakai J. The Effect of Frequency-Regulated Repeated Micro-Vibration on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 cells. 第 100 回日本生理学会大会. 京都 (hybrid meeting), 2023.

(2) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Matsuzawa A, Nakai J, Hong G. SP600125 enhanced neurite outgrowth induced by temperature-controlled repeated thermal stimulation in PC12-P1F1 cells. 第 99 回日本生理学会大会. 仙台 (hybrid meeting), 2022.

(3) Luo YR, Kudo T, Tominami K, Izumi S, Hayashi Y, Noguchi T, Nakai J, Hong G. Induction of neuronal differentiation in PC12-P1F1 cells by frequency-regulated micro-vibration. FJMU-HKU-TU international symposium on oral health science 2021. 仙台(online meeting)

(4) 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.