

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 10 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

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

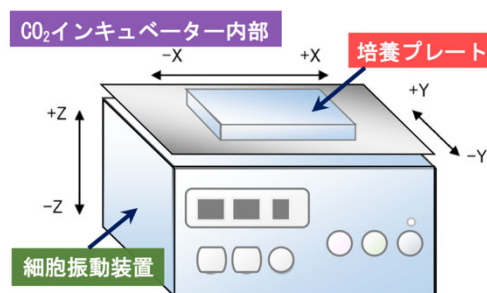


図1. 培養細胞振動装置 (NSSB-300N) の模式図と三軸の振動強度・周波数 (*振動刺激時、培養プレートは装置上面に設置)

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 による神経細胞分化における ERK 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、本年度は、MSMV 研究を効率的に推進するため、MSMV による神経細胞分化誘導機構のさらなる解明を目指した検討と 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、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る点の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 MSMV による神経細胞分

化誘導を可能とする分子機構の解明のための検討と骨芽細胞分化を効率的に誘導する振動条件の検討とを実施した。

具体的には、マウス由来の前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞株並びに申請者の研究グループが近年樹立した PC12 細胞の派生株 (PC12-P1F1: 温度調節式反復性温熱刺激(TRTS)依存性神経細胞分化を起しやすい性質をもつ、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、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) PC12-P1F1 細胞については、昨年度の検討により暫定的にある程度最適化された MSMV を PC12-P1F1 細胞に負荷して神経細胞分化を誘導した。その際、今年度は p38MAPK の低分子シグナル伝達阻害剤 (SB203580) を作用させ、PC12-P1F1 細胞株における MSMV 依存性神経細胞分化誘導機構に p38MAPK 経路が関与する可能性について検討した。神経細胞分化の評価については、昨年度と同様、倒立型位相差顕微鏡を用いて神経突起形成の程度を定量的に評価した。また、MSMV の刺激時間依存性についても検討を実施した。

(2) MC3T3-E1 細胞株を 10cm 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、PC12-P1F1 細胞と同様、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(7日間)が行われた。7日もしくは 14 日後、骨芽細胞分化については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) 本研究において培養細胞振動装置(NSSB-300N)の刺激により、骨芽細胞分化誘導が可能か否かはこれまで不明であったが、本件研究にて 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初めて認められた。今後、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、刺激依存的に活性化する細胞内シグナル経路の特定を進める必要がある。

(2) 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多くが不明であるが、これまでに、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 依存性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。今年度の研究では、同じ MAP キナーゼファミリーに属する p38 の活性を抑制する低分子シグナル阻害剤 SB203580 を用いた実験でも MSMV 依存性神経突起伸長が抑制されることが初めて明らかとなった。このことは、振動刺激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、ERK1/2 経路のみならず p38 経路の活性化をも促進する可能性を示すものであり、今後 p38 経路や 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。また、1 日当たりの MSMV 刺激時間を減少させると有意に神経細胞分化率が低下したことから 1 日当たりの刺激時間の長短が神経細胞分化誘導効率に大きな影響を与える因子の 1 つであることが判明した。

(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) 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.
- (2) 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)
- (3) 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.