

令和元年6月24日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06150

研究課題名(和文)再生医療のための細胞の動的力学環境の制御

研究課題名(英文)Control of Dynamic Mechanical Environments for Cells for Regenerative Medicine

研究代表者

白石 俊彦 (SHIRAIISHI, Toshihiko)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・准教授

研究者番号：30361877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の振動応答の検討ため、一つの骨芽細胞およびがん細胞の加振実験を行った。12.5～100Hz、0.25～1Gの範囲では明瞭な固有振動数および振動モードが確認されず、測定分解能の向上などが必要である可能性を示唆した。細胞の増殖と分化を共に促進するため、0.5Gの12.5Hzと50Hzの正弦波を重ね合わせた機械的振動を骨芽細胞に与える実験を行った。増殖と分化の両立を示し、線形系に近い細胞のモデルを与えることを示した。再生医療の需要が高い軟骨細胞にて、特殊な足場を必要としない平面培養で、機械的振動の影響を検討した。0.5G、12.5Hzでは組織の厚さが振動なしの約1.5倍に達することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療のさらなる進展のために、従来の化学環境だけでなく、動的力学環境を制御する新しい手法によって、細胞を増殖させる速度を促進させたり、再生医療に必要な目的の細胞に分化させたり、生体内に近い3次元構造を持つ再生組織を得たりすることを細胞培養にて検討した。その結果、骨産生を行う骨芽細胞では、0.5Gの12.5Hzと50Hzの正弦波を重ね合わせた機械的振動を与えることで、細胞の増殖と分化を共に促進することを示した。さらに、再生医療の需要が高い軟骨細胞では、簡易な平面培養においても、0.5G、12.5Hzの機械的振動を与えることにより、再生軟骨組織の厚さが振動なしの約1.5倍に達することを示した。

研究成果の概要(英文)：To investigate the vibration response, excitation experiments were conducted for an osteoblastic cell or a cancer cell. Their natural frequency and mode of vibration were not clearly measured in the range from 12.5 to 100 Hz and from 0.25 to 1 G. It indicates that the improvement of spatial resolution for measurement may be required. To promote both cell proliferation and cell differentiation, excitation experiments were conducted for osteoblastic cells applying the mechanical vibration superposing 0.5 G and 12.5 Hz vibration and 0.5 G and 50 Hz vibration. Both the cell proliferation and the cell differentiation were promoted and the type of cells can be modelled as a linear system. The effect of mechanical vibration on chondrocytes using plane culture without special scaffolds were investigated. The thickness of tissue generated by chondrocytes under the 0.5 G and 12.5 Hz mechanical vibration were approximately 1.5 times as thick as that without vibration.

研究分野：機械力学・制御

キーワード：機械力学・制御 細胞 再生医療 骨 軟骨 振動学 モデル化 力学センサ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体は地上では常に 1G という重力を受けており、力学環境に応じてある平衡状態を維持している。このことは、宇宙飛行士の骨量が無重力下の宇宙滞在中には減少し、帰還一定期間後にはほぼ回復することからも明らかである。また、歩行運動のような周期的な力学刺激によって、生体の骨形成が促進されることもよく知られている。骨形成は骨芽細胞と呼ばれる細胞によって行われるため、細胞レベルでの力学刺激の影響を検証することが必要不可欠である。

細胞に関する研究は主に生化学で扱われてきた対象であり、その機能はタンパク質を基本とした化学反応をもとに記述されてきた。この手法により多くの知見が得られ有効性が示されているが、細胞の有する多様な機能の一部が解明されたに過ぎないという側面もある。機械力学的観点から細胞を捉えると、細胞は力学環境下に存在し、細胞骨格と呼ばれる骨組構造や焦点接着と呼ばれる支持構造をはじめとした多様な器官を内部に含む大規模構造物として扱うことができる。また、細胞は構造物として力学的にその形状を維持するだけでなく、周囲の力学環境を感知して適応的に応答し、細胞骨格が変化して細胞の形状や運動を変化させたり、細胞が産生する物質の量が変化したりするという実験的報告がある。これらのことを考慮すると、細胞を一種の知的構造システムとみなし、センサ、コントローラ、アクチュエータが細胞のどの部分に存在し、それらがどのように関わり合ってシステム全体が構成されているのかといった機械システム的な捉え方ができるのではないかと推察される。このようにして、従来とはまったく別のアプローチによって細胞の機能を説明できる可能性がある。

細胞が力学刺激を受感し、応答するメカニズムに関する研究は、生化学を中心として 1980 年代後半から活発に行われているが、多数存在すると考えられる刺激の伝達経路について化学反応等をもとに部分的に解明されたに過ぎないのが現状である。また、細胞の力学モデルは、バイオメカニクスを研究対象とする機械工学者によって 1970 年代頃から研究されているが、静力学的なモデル化にとどまっており、動力学的な視点に基づいた細胞のモデルの構築に関する研究はあまりみられない。さらに、細胞をモデル化する際にセンサ、コントローラ、アクチュエータという概念を明確に導入し、細胞内においてこれらを実験的に同定し、その関連性を明らかにすることで細胞を知的構造システムとして捉えようとする試みは初めてと考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、次の 2 点を目的とする。

(1) 細胞を知的構造システムとして捉えて、その動的力学刺激感受機構に対する動的モデルを構築すること

細胞がセンサ、コントローラ、アクチュエータを有すると考え、動的力学刺激が細胞に入力された場合の適応的応答を実験的に検証し、その動的モデルを構築する。センサに関しては、細胞が変形することで動的力学刺激を受感していると考えられる。そこで、培養実験結果を用いて細胞をばねと質量からなる振動系でモデル化し、細胞の振動応答に応じて動的力学刺激を受感するものとする。アクチュエータに関しては、動的力学刺激下において、細胞骨格を構成するタンパク質の重合・脱重合により生じる細胞増殖の観察や、細胞が産生する骨などの物質の測定を行った結果を、細胞のアクチュエータとしての応答と考える。センサおよびアクチュエータの振動数特性を比較して、細胞のコントローラとしての特性を求める。

(2) 動的力学環境により細胞の分化および 3 次元組織形成を制御可能なことを実証すること

生体内にわずかに存在する幹細胞や近年開発された iPS 細胞などから、骨、筋、神経など様々な細胞への分化が可能であることが示されているが、これらの細胞から再生組織を作成するためには、多くの課題がある。

まず、目的の細胞へ分化する割合をいかに大きくさせるかである。一般に細胞の分化の促進には化学物質が用いられるが、生体内では細胞は周囲の化学物質の影響とともに、重力や運動などによる力学環境の影響を受け、その環境に適応することで細胞の機能を発現している。例えば、運動をすると大きな力学的負荷を支えるために骨が機能的に必要となり、骨内の骨芽細胞による骨形成が促進され、骨密度は上昇する。そのため、力学刺激により細胞の分化を制御できる可能性がある。

次に、再生組織として移植するためには、必要数まで細胞を増殖させ、細胞からなる組織を所望の 3 次元形状にする必要がある。研究代表者の過去の研究において、機械的振動刺激を与えると、細胞増殖が促進されること、一般的な平面培養下でも細胞が 3 次元的に重なり合って重層化することが示されている。現在の再生医療では、細胞を 2 次元的にシート状に培養し、それらを重ねて 3 次元的な組織構造が作成されている。機械的振動を用いて直接的に 3 次元的な再生組織構造を作成できれば、現在の再生医療に革新をもたらす。

### 3. 研究の方法

研究代表者は現在までに、細胞培養に必要な装置として、クリーンベンチ、細胞培養器、滅菌器、冷凍庫等を用意して実験を行っている。また、細胞加振装置を製作済みである (図 1)。十分な剛性を有するように設計された培養プレートを防磁型電磁加振器に取り付け、培養面に対して垂直方向に細胞を一様加振可能である。現在までに、理化学研究所より購入したマウス由来の骨芽細胞様細胞株を用いた加振実験を行っている。この実験では、加速度振幅を一定と

した場合に、ある振動数域では、細胞の増殖が促進され、骨芽細胞に十分に分化した細胞から産生される骨量が上昇することが確認されている。その一例として、細胞の増殖では 12.5Hz が効果最大であり、分化では 50Hz が効果最大である。12.5Hz の増殖促進時には、細胞が重層化して 3 次元構造を有することが確認されている。

細胞の力学センサについては、細胞をばね・質量系でモデル化する。振動数を変えながら一つの骨芽細胞を強制変位加振し、注目した細胞内小器官の変位応答を測定し、細胞の共振曲線を取得して細胞の固有振動数を求めることで、細胞のモデル化を行う。微小な振動の印加および応答の測定には、研究代表者らにより設計・試作された装置を用いる (図 2)

再生医療への応用を目指して、細胞の増殖と分化を両立するために、12.5Hz と 50Hz の正弦波を重ね合わせた機械的振動を与える実験を行う。この実験により、細胞がセンサで機械的振動を感知し、コントローラを経て、アクチュエータで生化学的応答として細胞の増殖や分化を行う適応的現象をモデル化する。細胞の適応的応答現象が線形系でモデル化可能な場合には、入力としての 2 つの機械的振動の重ね合せに対応して、応答としての増殖や分化が重ね合されたものとなる。この現象が強い非線形性を有する場合には、細胞の増殖と分化を両立する単一振動数の正弦波を見出す最適化問題と捉えて、細胞の増殖および分化の振動数依存性の実験結果から最適な機械的振動を求める。細胞の増殖に関しては、血球計算盤と呼ばれる細かい格子の切られたガラス盤に細胞をのせ、顕微鏡を用いて細胞濃度を測定する。細胞の分化に関しては、分化した細胞から産出される骨関連タンパク質を染色し、その濃度と面積を測定するが、染色濃度および面積からタンパク質の量を定量的に算定することは難しい。そこで、リアルタイム RT-PCR 法と呼ばれる手法を用いることで、タンパク質の遺伝子発現量として定量的測定を行う。

骨芽細胞の研究結果をもとに、再生医療による治療が強く望まれている軟骨について、動的力学環境による細胞の増殖および分化の制御が可能であるか実証する。生体内の正常な軟骨では、関節内での衝撃吸収や摩擦低減のために層状の特異的な組織が形成されている。そのため、軟骨細胞が 3 次元的に重層化した再生組織が得られる機械的振動の振動数を前述のモデルを用いて推定し、その効果を細胞培養実験により検証する。

#### 4. 研究成果

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 およびヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa において、細胞内小器官として細胞骨格の一種のアクチンフィラメントおよび細胞核を発光させ、蛍光顕微鏡ステージ上で加振器を用いて加振し、細胞の共振曲線を測定した。図 3 は実験結果の一例として正弦波加振時の細胞核の蛍光顕微鏡画像を示しており、これにより細胞核の振動状態を可視化可能であることを示した。実験の結果、今回の測定条件では、振動数 12.5~100Hz、加速度振幅 0.25~1G の範囲では明瞭な固有振動数および振動モードが確認されないことを示し、振動系としての細胞のモデルを与えることはできないことを示した。さらに詳細な検討のためには、測定分解能の向上や他の細胞内小器官についての測定が必要である可能性を示唆した。

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、先行研究で増殖促進効果が 12.5Hz で最大、分化促進効果が 50Hz で最大であることが報告されているので、細胞の増殖と分化を両立するために、0.5G の 12.5Hz と 50Hz の正弦波を重ね合わせた機械的振動を与える実験を行った。その結果、飽和細胞密度について振動群の方が非振動群に比べ増大し (図 4)、同時に骨形成に関係する ALP 遺伝子発現量についても振動群の方が非振動群に比べ増大し (図 5)、増殖と分化が両立することを示した。機械的振動に対する細胞の増殖と分化について、重ね合わせが成り立つことから、今回の実験条件では線形系に近い細胞のモデルを与えることを示した。

再生医療による治療が強く望まれる軟骨細胞について、ブタ後足初代培養細胞を用いて、振動数 12.5~50Hz、加速度振幅 0.5G において、特殊な足場を必要としない平面培養を行い、細胞数の測定、組織形成の観察、および軟骨特有の産生物の有無を検証した。その結果、軟骨細胞の数について、いずれの条件でも細胞増殖は確認されたが、振動の有無による違いは確認されなかった (図 6)。そのため、軟骨細胞では機械的振動の重ね合わせを行わず、単一振動数正弦波を対象として、軟骨基質産生に対する機械的振動の影響を検討した。軟骨の組織形成について、いずれの条件でも軟骨特有の産生物が確認された。0.5G、12.5Hz の振動条件では、3 次元軟骨組織の厚さが振動なしのものに比べ約 1.5 倍に達することが確認された (図 7 および 8)。

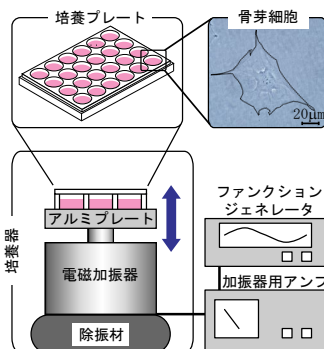


図 1 機械的振動下での細胞培養実験装置。

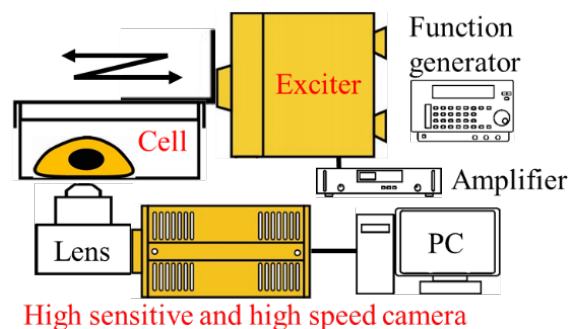


図 2 一つの培養細胞の共振曲線取得実験装置。

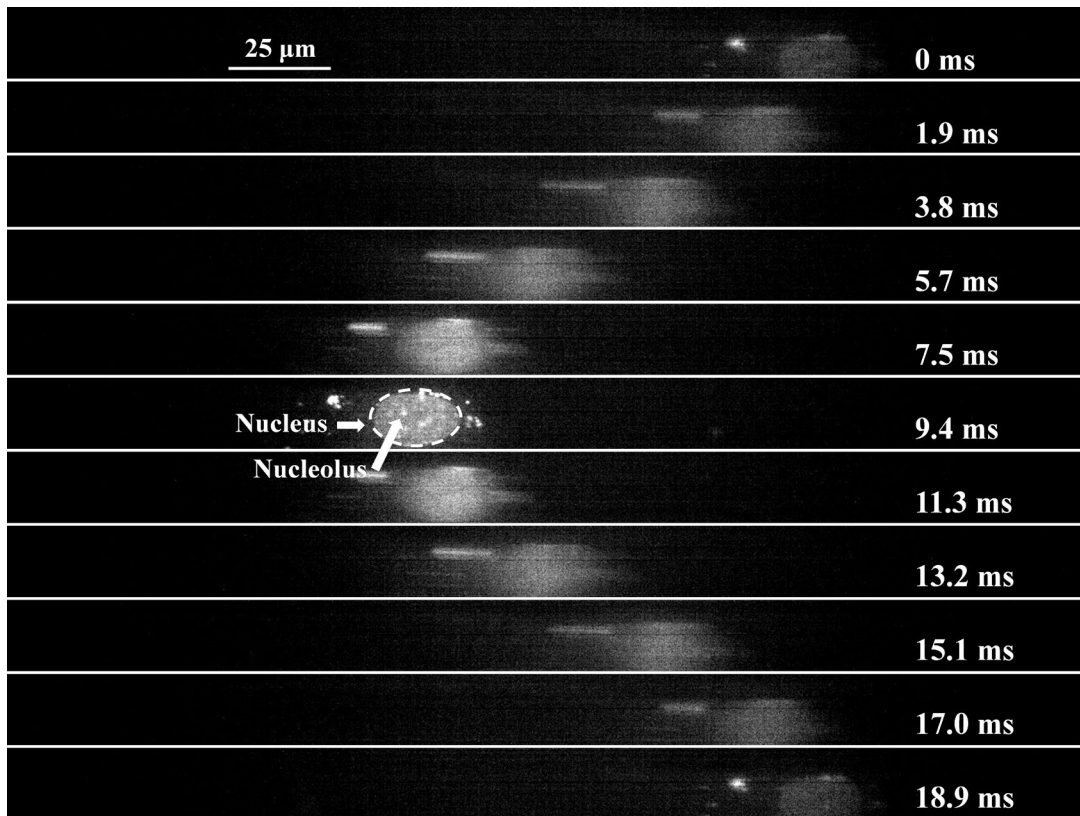


図3 加振時の細胞核の蛍光顕微鏡画像 (50Hz, 0.5G).

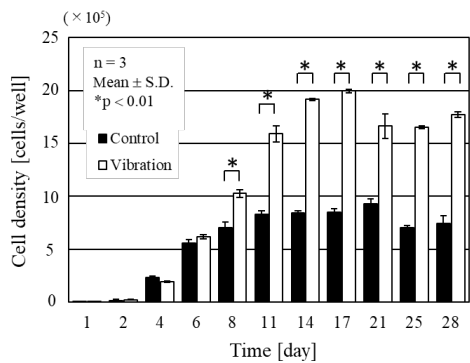


図4 骨芽細胞の細胞密度の経時変化 (12.5Hz・0.5G と 50Hz・0.5G の重畳波).

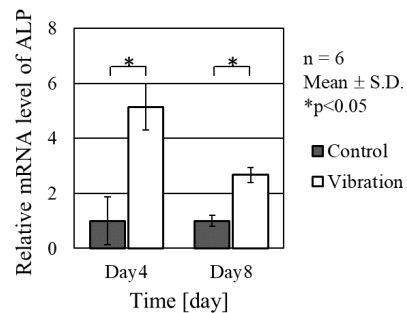


図5 骨芽細胞の ALP 遺伝子発現量の経時変化 (12.5Hz・0.5G と 50Hz・0.5G の重畳波).

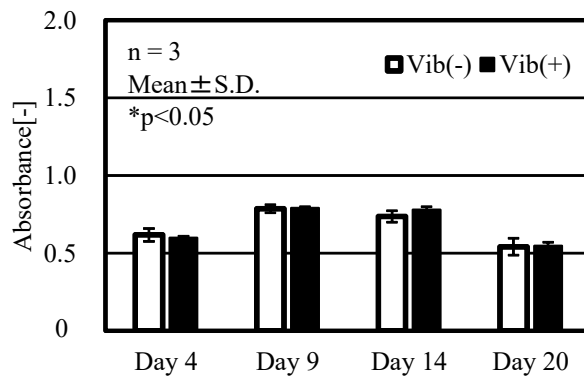


図6 吸光度測定による軟骨細胞の細胞密度の経時変化 (12.5 Hz, 0.5 G).

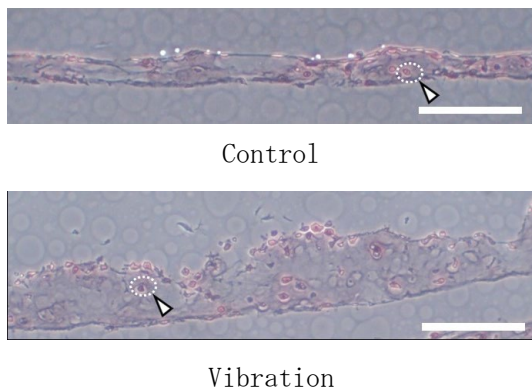


図7 軟骨基質の染色顕微鏡画像 (12.5Hz, 0.5G). スケールバー: 100  $\mu$ m.

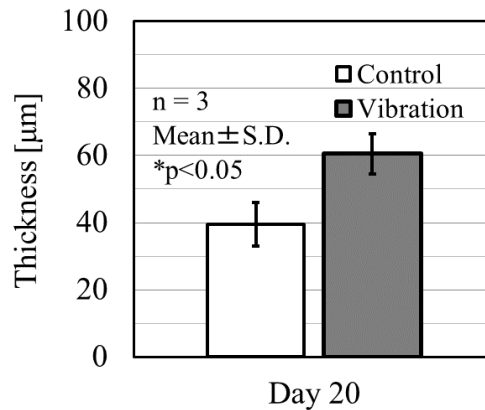


図8 軟骨基質の厚さ (12.5Hz, 0.5G).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- (1) [Toshihiko Shiraishi](#), Akitoshi Nishijima, A Study of a Mechanism of Cell Proliferation Promotion of Cultured Osteoblasts by Mechanical Vibration, Proceedings of the 2018 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2018) #IMECE2018-87364 (査読有) .
- (2) Akitoshi Nishijima and [Toshihiko Shiraishi](#), A Study of a Mechanism of Cell Proliferation Promotion by Mechanical Vibration Considering Chemical Signals, Proceedings of the 17th Asia Pacific Vibration Conference (2017) #201 (査読有) .
- (3) Yuki Nakamura and [Toshihiko Shiraishi](#), A Study of a Cell Mechanosensing System under Mechanical Vibration Considering Its Modes of Vibration and Calcium Ion Response, Proceedings of the 2017 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2017) #2017-71363 (査読有) .
- (4) [Toshihiko Shiraishi](#) and Tomohiro Fukuno, Cell Response to Cyclic Strain at Focal Adhesions, Proceedings of the 2016 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2016) #IMECE2016-66843 (査読有) .

〔学会発表〕 (計 32 件)

- (1) 野澤智晶, 培養軟骨細胞の増殖と基質産生に対する機械的振動の影響, 第 25 回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2018 年 12 月 15 日, 京都.
  - (2) 後藤あゆみ, 重畳した機械的振動が細胞の増殖および分化に及ぼす影響, 第 25 回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2018 年 12 月 15 日, 京都.
  - (3) 野澤智晶, 平面培養した軟骨細胞の組織形成に対する機械的振動の影響, 日本機械学会第 31 回バイオエンジニアリング講演会, 2018 年 12 月 14 日, 郡山.
  - (4) 後藤あゆみ, 重畳した機械的振動が培養骨芽細胞に及ぼす影響, 日本機械学会第 31 回バイオエンジニアリング講演会, 2018 年 12 月 14 日, 郡山.
- 培養骨芽細胞に対する重畳した機械的振動の影響
- (5) [Toshihiko Shiraishi](#), A Study of a Mechanism of Cell Proliferation Promotion of Cultured Osteoblasts by Mechanical Vibration, The 2018 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2018 年 11 月 14 日, 米国・ピッツバーグ.
  - (6) 後藤あゆみ, 培養骨芽細胞に対する重畳した機械的振動の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2018 年 8 月 30 日, 東京.
  - (7) 野澤智晶, 培養軟骨細胞を用いた再生組織形成に対する機械的振動の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2018 年 8 月 30 日, 東京.
  - (8) 星優斗, 培養神経細胞に対するガンマ波領域の機械的振動の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2018 年 8 月 30 日, 東京.
  - (9) 宮本和知, 超音波治療のための音響ホログラフィによる力場制御, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2018 年 8 月 30 日, 東京.
  - (10) Tomoaki Nozawa, Effects of Mechanical Vibration on Cultured Cells to Regenerate Cartilage, The 15th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2018 年 8 月 19 日, 浜松.
  - (11) Kazuaki Miyamoto, Design of a Force Field Control Device by Acoustic Holography, The 15th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2018 年 8 月 19 日, 浜松.

- (12) Yuto Hoshi, Effects of Mechanical Vibration on Cultured Nerve Cells, The 15th Joint Symposium among Sister Universities in Mechanical Engineering, 2018年8月19日, 浜松.
- (13) 中村佑輝, 内部構造の変形と生化学応答を考慮した細胞の機械的振動刺激感受システムの検討, 第24回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2017年12月16日, 京都.
- (14) 西島彰利, 機械的振動による培養骨芽細胞の増殖促進と $\beta$ -カテニンの核内移行との関係, 第24回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2017年12月16日, 京都.
- (15) 野澤智晶, 培養軟骨細胞に対する機械的振動の影響, 第24回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2017年12月16日, 京都.
- (16) 野澤智晶, 機械的振動が培養軟骨細胞に及ぼす影響, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年12月15日, 京都.
- (17) 永井幸汰, 培養骨芽細胞のカルシウム応答に対する焦点接着斑での繰り返しひずみの影響, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年12月15日, 京都.
- (18) 西島彰利,  $\beta$ -カテニンに着目した機械的振動による培養骨芽細胞の増殖促進メカニズムの検討, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年12月15日, 京都.
- (19) 中村佑輝, 細胞の機械的振動刺激感受メカニズム検討のための振動モードおよびカルシウム応答の測定, 日本機械学会第30回バイオエンジニアリング講演会, 2017年12月14日, 京都.
- (20) Akitoshi Nishijima, A Study of a Mechanism of Cell Proliferation Promotion by Mechanical Vibration Considering Chemical Signals, The 17th Asia Pacific Vibration Conference, 2017年11月14日, 中国・南京.
- (21) Yuki Nakamura, A Study of a Cell Mechanosensing System under Mechanical Vibration Considering Its Modes of Vibration and Calcium Ion Response, The 2017 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2017年11月7日, 米国・タンパ.
- (22) 中村佑輝, 細胞内カルシウムイオン濃度に対する機械的振動の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2017年8月31日, 豊橋.
- (23) 永井幸汰, 細胞の移動および生化学応答に対する焦点接着部での繰り返しひずみの影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2017年8月31日, 豊橋.
- (24) 野澤智晶, 再生医療のための培養軟骨細胞に対する機械的振動の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2017年8月31日, 豊橋.
- (25) Akitoshi Nishijima, A Study of a Mechanism of Cell Proliferation Promotion by Mechanical Vibration, The 5th Japan-Korea Joint Symposium on Dynamics & Control, 2017年8月29日, 豊橋.
- (26) 中村佑輝, 振動モードおよび生化学応答を考慮した細胞の機械的振動刺激感受システムの検討, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月19日, 名古屋.
- (27) 西島彰利, 機械的振動下での細胞増殖および移動に対する $\beta$ 1インテグリンの影響, 日本機械学会第29回バイオエンジニアリング講演会, 2017年1月19日, 名古屋.
- (28) Toshihiko Shiraishi, Cell Response to Cyclic Strain at Focal Adhesions, The 2016 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2016年11月17日, 米国・フェニックス.
- (29) 中村佑輝, 内部構造の変形を考慮した細胞の機械的振動刺激感受システムの検討, 第23回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2016年12月10日, 京都.
- (30) 西島彰利, 機械的振動印加時の細胞増殖および移動に対する $\beta$ 1インテグリンの影響, 第23回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス, 2016年12月10日, 京都.
- (31) 中村佑輝, 振動モードを考慮した細胞の機械的振動刺激感受システムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2016年8月26日, 宇部.
- (32) 西島彰利,  $\beta$ 1インテグリンを考慮した機械的振動下での細胞増殖メカニズムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2016年8月26日, 宇部.

[その他]

ホームページ等

[https://er-web.ynu.ac.jp/html/SHIRAISHI\\_Toshihiko/ja.html](https://er-web.ynu.ac.jp/html/SHIRAISHI_Toshihiko/ja.html)

## 6. 研究組織

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。