

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19760152

研究課題名（和文） 知的構造システムとして捉えた細胞の適応的応答に関する研究

研究課題名（英文） Study on Adaptive Response of a Cell  
Modeled as an Intelligent Structural System

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・講師

研究者番号：30361877

研究成果の概要：本研究では、細胞を知的構造システムとして捉えて、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、機械的刺激が骨芽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ことを目的とした。その結果、細胞の機械的刺激感受システムは振動数依存性を示し、振動数 12.5～1000 Hz、加速度振幅 0.125～0.5 G の実験範囲では、振動数が低いほど細胞増殖が亢進し、50 Hz に骨形成の極大値が存在することを示した。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,300,000 | 0       | 2,300,000 |
| 2008 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 300,000 | 3,600,000 |

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械力学・制御

キーワード：機械力学・制御、モデル化、細胞・組織、シグナル伝達、振動、振動数、骨芽細胞、骨

## 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、力学的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機械的刺激によって、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、細胞レベルでの機械的刺激の影響を検証

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、細胞は力学的環境下に存在し、細胞骨格と呼ばれる骨組み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

部を含む大規模構造物として扱うことができる。また、細胞は力学的構造物としてその形状を維持するだけでなく、周囲の力学的環境を感じし適応的に応答することで、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。

## 2. 研究の目的

本研究では、細胞を知的構造システムとして捉えて、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、機械的刺激が骨芽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ことを目的とする。さらに、その結果を用いて、骨形成に効果的な機械的刺激の振動数、振幅を特定する。センサに関しては、細胞を構成する各器官が変形することで細胞は機械的刺激を感知していると考えられるので、各器官の力学的特性を引張試験やクリープ試験によって測定することで、機械的刺激入力に対する細胞の変形を求める。この変形量が得られれば、機械的刺激センサの特性の理解につながる。

機械的刺激としては、細胞の栄養となる培地中に骨芽細胞をまいて細胞を接着させた培養プレートを接着面に対して垂直に正弦波加振することで細胞に変動する慣性力を与える。この状態は細胞が変動する重力を受けることに相当する。振動数を変化させた場合に、センサ入力としての細胞の変形と、アクチュエータ出力としての細胞の運動・増殖および産生骨量との関係を求める。この関係は細胞のコントローラとしての周波数応答関数に相当すると考えられる。細胞は非線形性の強い構造と考えられるので、加速度振幅を変化させた場合のこのセンサ入力とアクチュエータ出力の関係も同時に求める。

## 3. 研究の方法

研究代表者は現在までに、細胞培養を行うため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細胞培養実験を行っている。細胞加振装置は既に製作済みである。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。加振方向としては、垂直方向と水平方向が考えられるが、予備実験の結果、垂直方向への加振の方がより細胞増殖および産生骨量に対する効果が高いことが確認されている。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、ある振動数域で細胞の増殖速度および産生される骨量が上昇することが確認されている。本研究ではさらに実験数を重ね、生物を用いた実験にみられるデータのばらつきを統計的に考慮した上で、特定の振動数域で他に比べ細胞の形態に変化があるか、細胞の増殖速度および産生骨量に有意差が存在するかを定量的に検証する。

細胞の増殖速度に関しては、血球計算板と呼ばれる細かい格子の切られたガラス板に細胞を載せ、顕微鏡を用いて細胞密度を測定する。細胞の産生骨量に関しては、骨成分を染色し、その面積を測定するが、骨形成までに1ヶ月程度を要し、また染色面積を定量的に算定することが難しい。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、骨形成に影響するタンパク質の遺伝子レベルの測定を短期間で、定量的に行うことが可能である。

細胞内に存在する細胞核や細胞骨格等の各種器官を識別するためには、蛍光染色法と呼ばれる手法で器官を染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察する必要がある。これにより、細胞内で各器官によりどのような構造システムが形成されているかを把握することができる。さらに、細胞の構成要素である各器官を生化学的手法により分離し、それらの力学的特性を測定するので、各器官の質量と粘弾性が測定できればこの概算が可能である。遠心分離器を用いて器官ごとに分離し、その質量を電子天秤を用いて測定すれば、各器官の質量を容易に測定できる。粘弾性は器官ごとに引張試験およびクリープ試験を行うことで求めるが、微小な力の測定が必要になる。そこで、マイクロオーダーの微動が可能なマイクロマンピュレータの先に直径数ミクロンのピペットを取り付け、ピペットの先端を器官に付着させて細胞の引っ張りを行う。ピペットが片持ち梁となるので、ピペットの力とたわみの関係を予め測定しておけば、たわみを顕微鏡で測定することで各器官の張力を算出することが可能となる。以上のようにして得られた各器官の質量、粘弾性、および各器官の細胞内での配置から細胞を振動系として捉え、その固有振動数を算出する。

細胞の動的モデルから、細胞を加振した場合の変形量を算出し、機械的刺激の振動数・

加速度振幅に対する細胞応答の振動数依存性を検証する。

#### 4. 研究成果

細胞増殖に関しては、振幅 0.5 G で一定とし、振動数 12.5~1000 Hz として実験を行った結果、振動数が低いほど細胞増殖が亢進され、12.5 Hz では非振動群の約 2 倍となることを示した (図 1)。また、振動数を 25 Hz で一定とし、振幅を 0.125~0.5 G として実験を行った結果、振幅が大きいほど細胞増殖が亢進されることを示した。この実験は複数回行われ、実験の再現性を確認した。

骨形成能の指標であるアルカリフォスファターゼの遺伝子発現に関しては、振幅 0.5 G で一定とし、振動数 12.5~1000 Hz として実験を行った結果、50 Hz に極大値が存在し、非振動群の約 4.5 倍となることを示した (図 2)。また、振動数を 50 Hz で一定とし、振幅を 0.125~0.5 G として実験を行った結果、振幅が大きいほど骨形成が亢進されること

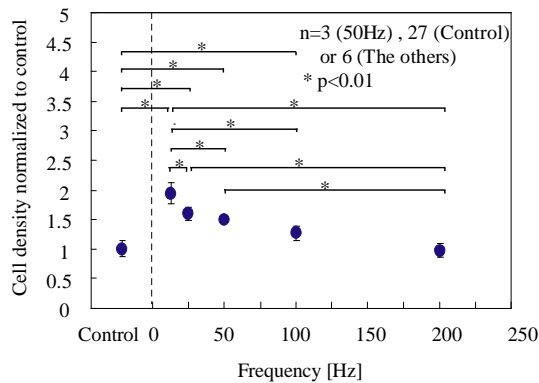


図 1 細胞増殖の振動数依存性

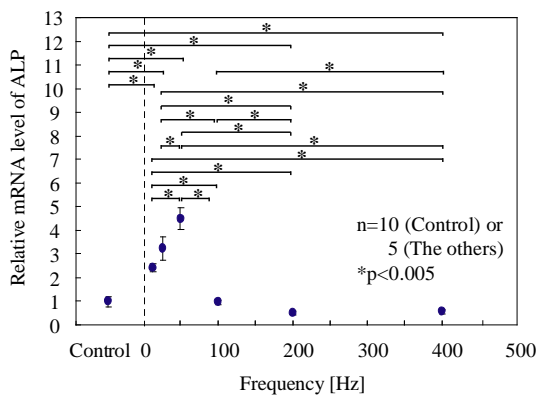


図 2 アルカリフォスファターゼ遺伝子発現の振動数依存性

を示した。これらと同様の結果は、別の骨形成能の指標であるオステオカルシンに関してもみられ、骨形成に対する振動数・加速度振幅の依存性が多面的に示されたことになる。

細胞の動的モデル構築のために、細胞接着という支持条件のもとで細胞全体の動的粘弾性試験を行った。マイクロピペットの先端に試料を付着させて引っ張った際のピペットのたわみから微小な張力を求めた。その結果、ばね要素と粘性減衰要素からなる 3 要素モデルでその特性をモデル化した。また、細胞を含む溶媒の濃度を数種類用意し、細胞が沈殿するか否かで細胞のおおよその密度を推定し、細胞全体の質量を算定した。これらより、細胞全体を 1 自由度振動系としてモデル化した。その結果、細胞では粘性が非常に大きいため、細胞全体としては過減衰となることが推察された。よって、細胞増殖や骨形成の振動数依存性は、細胞全体の振動特性ではなく、細胞の局所的な振動特性に基づく可能性があることを示した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) 白石俊彦, 竹内良平, 森下 信, 松永家朋, 高垣裕子, 齋藤知行, 3 次元軟骨細胞に及ぼす超音波刺激の影響, 運動・物理療法, Vol. 19, No. 3 (2008) pp. 154-161, 査読無.

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 高木裕太, 3 次元培養軟骨細胞の増殖および基質産生に対する機械的振動の影響, 日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009 年 1 月 23 日, 札幌.
- (2) 鈴木圭, 神経幹細胞の増殖および分化に対する機械的振動の影響, 日本機械学会第 21 回バイオエンジニアリング講演会, 2009 年 1 月 23 日, 札幌.
- (3) Yuta Takagi, EFFECTS OF MECHANICAL VIBRATION ON MATRIX PRODUCTION AND PROLIFERATION OF THREE-DIMENSIONAL CULTURED CHONDROCYTES, The ASME 2008 International Design Engineering Technical Conferences & Computers and Information in Engineering Conference, 2008 年 11 月 4 日, 米国・ボストン.
- (4) Kei Suzuki, EFFECTS OF MECHANICAL VIBRATION ON PROLIFERATION AND

DIFFERENTIATION OF NEURAL STEM CELLS , The ASME 2008 International Design Engineering Technical Conferences & Computers and Information in Engineering Conference, 2008年11月4日, 米国・ボストン.

(5) Toshihiko Shiraishi, EFFECTS OF ACCELERATION AMPLITUDE AND FREQUENCY OF MECHANICAL VIBRATION ON CULTURED OSTEOBLASTS , The ASME 2008 International Design Engineering Technical Conferences & Computers and Information in Engineering Conference, 2008年11月4日, 米国・ボストン.

(6) Toshihiko Shiraishi, MEASUREMENT OF DYNAMIC VISCOELASTICITY OF AN OSTEOBLAST UNDER ADHESIVE CONDITION USING A PIEZOELECTRIC VIBRATOR , The ASME 2008 International Design Engineering Technical Conferences & Computers and Information in Engineering Conference, 2008年11月4日, 米国・ボストン.

(7) 白石俊彦, 機械的振動の振幅および振動数が培養骨芽細胞に与える影響, 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008年10月24日, 京都.

(8) 高木裕太, 機械的振動が3次元培養軟骨細胞に及ぼす影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2008年9月3日, 横浜.

(9) 鈴木圭, 機械的振動が神経幹細胞に及ぼす影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2008年9月3日, 横浜.

(10) 高木裕太, 3次元培養軟骨細胞に対する機械的振動の影響, 日本機械学会2008年度年次大会, 2008年8月5日, 横浜.

(11) 鈴木圭, 神経幹細胞に対する機械的振動の影響, 日本機械学会2008年度年次大会, 2008年8月5日, 横浜.

(12) 白石俊彦, 3次元培養軟骨細胞に対する超音波刺激およびヒアルロン酸の影響, 第81回整形外科学会学術総会, 2008年5月25日, 札幌.

[その他]

(1) 白石俊彦, 骨細胞増殖 最適な振動数を特定, 日刊工業新聞, 2009年3月18日1面記事.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白石 俊彦 (SHIRAISHI TOSHIHIKO)

横浜国立大学・大学院環境情報研究院・講

師

研究者番号 : 30361877

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :