

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02099

研究課題名(和文)革新的再生医療のための細胞の動力学モデルに基づく力学環境の制御

研究課題名(英文)Control of mechanical environments based on a dynamic cell model for innovative regenerative medicine

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・准教授

研究者番号：30361877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞とがん細胞で、水平に機械的振動を与え、細胞の変位を測定した。その結果、細胞核と細胞骨格の変形を実証した。細胞骨格の変形は、一部条件で振幅依存性を示し、扁平な骨芽細胞より厚みのあるがん細胞で変形が大きいことを示した。再生医療が望まれる軟骨細胞で、垂直に機械的振動を与え、その影響を検証した。その結果、0.5G・12.5Hzで軟骨組織の厚さが振動なしの約1.8倍に達することを示した。音響ホログラフィを利用して、超音波振動子アレイの位相制御可能な装置により、圧力分布形成能を検討した。その結果、IASAとAdamを組み合わせた手法で、2次元・3次元空間で所望の変動圧力分布が得られることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機械的振動によって細胞核や細胞骨格が変形することを示唆し、機械的振動による細胞の増殖・分化促進機構の一端を解明し、これらがモデル化で重要なことを示した。また、再生医療の需要が高い軟骨細胞で、0.5G・12.5Hzの機械的振動を与えることで、再生軟骨組織の厚さが振動なしの約1.8倍に達することを示し、機械的振動が再生医療へ大きく寄与し得ることを示した。さらに、音響ホログラフィを利用して、超音波振動子アレイの位相制御可能な装置により、2次元・3次元空間で所望の変動圧力分布が得られることを示し、生体・再生組織の所望部に力学刺激印加可能で、超音波による治療・再生医療へ大きく寄与し得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：The displacement of osteoblastic and cancer cells under mechanical vibration in the horizontal direction was measured. The results indicate that nuclei and cytoskeletons are deformed under vibration, and that the cytoskeleton deformation depends on amplitudes under a condition and that of thick cancer cells is larger than that of flatty osteoblastic cells. The effects of mechanical vibration in the vertical direction on chondrocytes for regenerative medicine were investigated. The results indicate that the tissue thickness under the 0.5 G and 12.5 Hz vibration is approximately 1.8 times as large as that without vibration. The fluctuated pressure distribution formation ability by phase control of an ultrasound transducer array using acoustic holography was investigated. The results indicate that the desired fluctuated pressure distribution is obtained in two and three dimensions using IASA combined with Adam.

研究分野：機械力学・制御

キーワード：機械力学・制御 振動学 細胞のダイナミクス 再生医療

## 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。生化学的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細胞小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のではないかと考えられる。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、細胞が産生する骨などの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。

細胞が力学刺激を感受し、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専門とする機械工学の研究者によって 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であると考えられる。

## 2. 研究の目的

### (1) 細胞を知的構造システムと捉えその動力学刺激感受機構に対する動力学モデルを構築する

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、その動力学モデルを構築する。センサに関しては、細胞が変形することで動力学刺激を感受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力学刺激を感受するものとする。アクチュエータに関しては、動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の増殖の観察や、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) 動力学環境により細胞の増殖・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

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するかである。一般に細胞の分化の促進には化学物質が用いられるが、細胞は周囲の化学物質の影響とともに、重力や運動などの力学環境の影響を受け、その環境に適応するように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る。よって、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細胞の分化と増殖の両方を制御し、直接的に 3 次元的な再生組織構造を作製できれば、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、細胞培養装置、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。十分な剛性を有するように設計された培養プレートを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 12.5 ~ 100Hz、加速度振幅 0.25 ~ 2G の範囲において、一つの骨芽細胞を水平方向に強制変位加振し、注目した細胞小器官の応答変位を測定し、細胞の固有振動数および振動モードを求めることで、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・改良された装置を用いる。この装置を用いて、細胞内小器官を蛍光標識し、蛍光顕微鏡用高速度カメラで撮影された画像を解析して、機械的振動下における細胞内小器官の応答変位を求める。

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推定し、その効果を細胞培養実験により検証する。

さらに、より大きな再生軟骨組織を得ようとする、層構造の表面付近では衝撃吸収や摩擦低減のためコラーゲンを豊富にし、下部では軟骨を支える骨と同化するためカルシウム塩を多くするようにして、空間的な位置によって力学刺激を変え、発現させる細胞の機能を制御する必要がある。そこで、音響ホログラフィと呼ばれる手法を利用して、超音波振動子を多数アレイ状に並べた装置を設計・試作し、各振動子の位相を制御することにより、空間に所望の変動する圧力分布を形成して、細胞機能の制御を実現する。

#### 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核を蛍光させ、蛍光顕微鏡ステージ上で加振器を用いて水平方向に加振し、細胞核の応答変位を測定した(図 1)。実験結果の一例として、50Hz で 2.0 G の正弦波加振時の細胞核の蛍光顕微鏡画像と、そのときに細胞核を振動と垂直方向に 5 等分したときの各部の変位振幅を示し(図 2)、細胞核が変形をしていること、その変形形状は振動モードのように複数存在することを実験的に確認した。また、機械的振動下で細胞核全体の重心が培養容器底面に対して相対変位を有することを示すことで、細胞核を支持するアクチンフィラメントなどの細胞骨格が変形することを、装置の繰り返し精度を考慮した上で実験的に確認した。一部の振動条件においては、加速度振幅の増大とともに細胞骨格の変形が増大する振幅依存性がみられることを示した。細胞骨格の変形の振動数依存性は明瞭でなく、細胞の固有振動数は特定されなかったため、今後はさら測定方法を改良するとともに、サンプル数を増やす必要があると推察される。さらに、扁平な骨芽細胞より、厚みのあるがん細胞の方が細胞核の変形や細胞骨格の変形が大きいことを実験的に示し、これは力学的に妥当であることを確認した。これらより、細胞の動力学モデルにおいて、細胞核が重要な役割を担うことを示した。

再生医療による治療が強く望まれる軟骨細胞について、ブタ後足初代培養軟骨細胞を垂直方向に加振し(図 3)、振動数 12.5Hz、加速度振幅 0.5G と 1.0G 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。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厚くなり、約 1.8 倍に達することが確認された(図 4)。

生体組織および再生組織の各場所に適切な動力学環境を実現するために、音響ホログラフィと呼ばれる手法を利用して、超音波振動子を多数アレイ状に並べて各振動子の位相を制御可能な装置により(図 5)、空間に所望の変動する圧力分布を形成可能か検討した。その結果、反復角スペクトル法(IASA)と Adam による最適化法を組み合わせることで、2 次元平面および 2 次元平面を重ね合わせた 3 次元空間において、医療応用を考えた多数の制御点にて、所望の変動圧力分布が与えられることを数値シミュレーションにより示した(図 6 は骨折線に対応した変動圧力分布の例)。また、超音波振動子を多数アレイ状に並べた装置を試作し、臨床の骨折線などに対応した変動圧力分布が実現可能なことを実験的に示した。

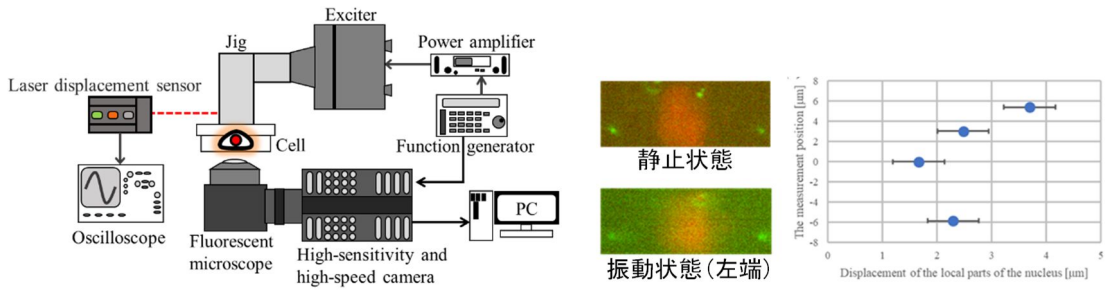


図1 振動下の細胞核の変位測定装置(水平方向) 図2 振動下の細胞核(赤)の変形(50Hz 2G)

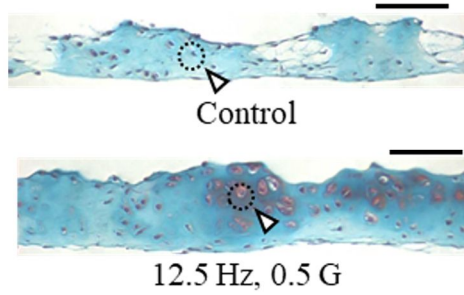
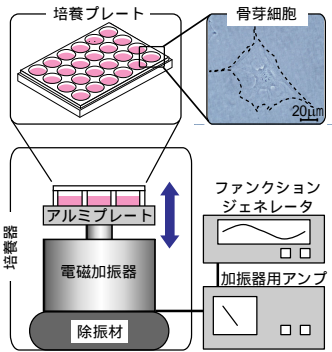


図3 細胞の加振装置(垂直方向) 図4 サフラニンOによる軟骨基質の染色(白矢頭:細胞)

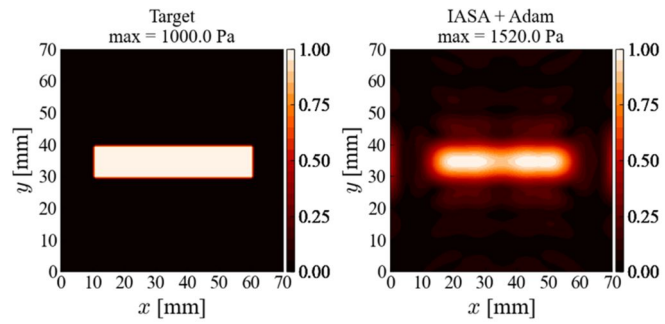
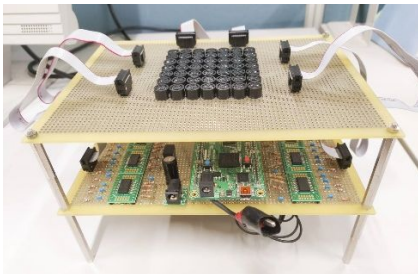


図5 変動圧力分布生成用超音波振動子アレイ 図6 変動圧力分布(振動子直上55 mm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tomoya Shinato, Toshihiko Shiraishi	4. 巻 -
2. 論文標題 An Algorithm for Rendering Force Fields at Many and Close Control Points Using Acoustic Holography for Ultrasound Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ASME Journal of Engineering and Science in Medical Diagnostics and Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 階戸智也
2. 発表標題 超音波治療のための音響ホログラフィによる力場制御手法の検討
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木優介
2. 発表標題 超音波治療のための音響ホログラフィによる水中での力場制御に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田昂大
2. 発表標題 培養骨芽細胞内のCa <sup>2+</sup> 濃度変化に対する局所的動力学刺激の影響
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 階戸智也
2. 発表標題 超音波治療のための音響ホログラフィによる力場制御手法
3. 学会等名 第27回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木優介
2. 発表標題 超音波治療のための音響ホログラフィによる力場制御の水中での実験的検討
3. 学会等名 第27回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒木優里
2. 発表標題 培養細胞の機械的振動刺激感受メカニズム解明のための細胞核の振動モード測定
3. 学会等名 第27回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺悠良
2. 発表標題 再生軟骨組織作製に対する機械的振動の影響
3. 学会等名 第27回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田昂大
2. 発表標題 焦点接着斑に与える局所的動力学刺激が培養骨芽細胞のカルシウム応答に与える影響
3. 学会等名 第27回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田昂大
2. 発表標題 焦点接着斑での繰り返しひずみが培養骨芽細胞内カルシウム応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会第32回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤克哉
2. 発表標題 培養細胞の機械的振動刺激感受メカニズム解明のための細胞変形の振動数依存性の検討
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤克哉
2. 発表標題 MEASUREMENT OF MODES OF VIBRATION OF A CULTURED CELL FOR ITS MECHANOSENSING MECHANISMS
3. 学会等名 2020 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤克哉
2. 発表標題 細胞への機械的振動印加時の細胞核の変位測定
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 和田昂大
2. 発表標題 繰り返しひずみが培養骨芽細胞のカルシウム応答に及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会 第31回バイオフィロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺悠良
2. 発表標題 再生軟骨組織作製のための単層培養した軟骨細胞に対する機械的振動の影響
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木優里
2. 発表標題 培養細胞の機械的振動刺激感受メカニズム解明のための振動モードの測定
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2022
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 階戸智也
2. 発表標題 超音波治療のための音響ホログラフィによる高い空間分解能を有する力場制御手法の検討
3. 学会等名 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺悠良
2. 発表標題 厚みのある再生軟骨組織作製のための軟骨細胞に対する機械的振動の影響
3. 学会等名 第28回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江藤凧
2. 発表標題 機械的振動が培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第28回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒木優里
2. 発表標題 機械的振動下における培養細胞の細胞核の変位測定
3. 学会等名 第28回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野瀬加奈子
2. 発表標題 培養骨芽細胞の焦点接着斑における動力学刺激感受機構の検討
3. 学会等名 第28回奈良・横浜・京都バイオメカニクスカンファレンス
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 江藤凧
2. 発表標題 機械的振動が培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本機械学会関東学生会第62回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

横浜国立大学研究者総覧 <a href="https://er-web.ynu.ac.jp/html/SHIRAIISHI_Toshihiko/ja.html">https://er-web.ynu.ac.jp/html/SHIRAIISHI_Toshihiko/ja.html</a>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------