

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12601

研究課題名（和文）顕微鏡下 in situ 振動刺激負荷デバイスの開発と骨芽細胞の応答特性評価

研究課題名（英文）Development of vibration loading device for in situ observation of osteoblasts response

研究代表者

佐藤 克也（SATO, Katsuya）

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部（理工学域）・准教授

研究者番号：10403651

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000 円

研究成果の概要（和文）： 微振動刺激に対する骨芽細胞の応答を顕微鏡観察下でその場観察するためのデバイスを開発した。デバイスは、顕微鏡ステージ上に設置可能で、 piezoelectric actuator による駆動で水平方向の振動を発生させ、ガラスボトムディッシュに播種した骨芽細胞に振動刺激を付与する。また、微振動刺激を付与しながらのその場観察を達成した。

開発したデバイスを用いて、微振動刺激を受ける骨芽細胞のカルシウムシグナル応答を観察し、その応答特性を評価した。デバイスは当初の設計通りの性能を発揮し、単一細胞レベルでの蛍光観察が可能であった。実験の結果、骨芽細胞が敏感に反応する振動周波数が60Hz付近に存在する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

微振動刺激を受ける細胞の応答を観察する実験系において、多数の細胞の応答を平均化して評価するのではなく、単一細胞レベルで詳細に観察することを可能にしたことは、本研究課題の最大の成果である。また、振動強度は一定に保ちながら、周波数を変化させた微振動刺激を骨芽細胞に付与し、その応答を評価した結果、骨芽細胞が敏感に感じ取る周波数が60Hz付近に存在する可能性を示したことは、制御された力学的刺激として微振動を付与し、骨形成を活性化させる新規な医療技術への応用が期待される成果である。

研究成果の概要（英文）： We developed a device for in-situ observation of osteoblast response to microvibration stimulation under microscopic observation. The device can be placed on a microscope stage and is driven by a piezoelectric actuator to generate horizontal vibrations to stimulate osteoblasts seeded in a glass bottom dish. In-situ observation of osteoblasts while microvibration is applied is also achieved.

Using the developed device, we observed the calcium signal response of osteoblasts under microvibration stimulation and evaluated the response characteristics. The device performed as originally designed, and fluorescence observation at the single cell level was possible. The experimental results suggested that the vibration frequency to which osteoblasts are sensitive may exist around 60 Hz.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：骨芽細胞 力学的刺激 細胞バイオメカニクス 骨粗しょう症 振動刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、周囲の力学環境に応じてその構造・機能が変化することが知られており、遺伝子・生化学物質に加わる第三の細胞制御因子としての力学的刺激利用が注目を集めている。その中でも、周波数 15Hz~90Hz、加速度振幅 0.3G 程度の微振動刺激は、動物モデル実験において人為的に作成した骨欠損部位での骨形成の促進や、骨粗鬆症マウスでの骨量減少抑制などが報告されている。微振動刺激はその強度が微弱であるため振動による身体への障害などの副次的な悪影響の心配がなく、かつ寝たきりの人や車椅子利用者にも簡単に付与が可能であるため、運動困難者の骨折治癒促進・骨粗鬆症予防などへの応用が期待でき、高齢化社会での QOL 向上につながる。

しかしながら、微振動刺激が骨形成に影響を及ぼす作用機序は未解明なままである。微振動刺激によって生じる骨組織のひずみは数十 $\mu\text{ε}$ であるとの報告がある。これは一般の歩行時に足の骨に生じるひずみ約 1000 $\mu\text{ε}$ と比較すると 2 桁小さい。骨基質に生じるひずみが微小であるということは、それによって生じる骨組織内の組織液流動も微小であると予想され、これまで骨系細胞のメカノトランスダクション機構において提案されてきた「骨基質の変形」や「組織液の流れによるせん断力」では細胞がどのようにして微振動刺激を感知しているのか説明が困難である。つまり、骨芽細胞をはじめとする骨系細胞が微振動刺激をどのように感知し応答するのか。これが本研究課題における核心的「問い」である。また、微振動刺激に対する骨芽細胞の応答特性や、その感知機構を明らかにすることは微振動刺激の本格的な医療応用において必要不可欠であり、緊急の課題であると考えられる。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、細胞内微小器官の一種の共振現象が微振動刺激を細胞のメカノセンサーで感知可能なレベルにまで増幅しているのではないかと仮説を立てた。振動刺激やストレッチ刺激などの動的な力学刺激に対する細胞の応答特性評価や感知機構解明が十分にはなされていない理由の一つとして、刺激付与によって観察対象細胞が「動く」ため視野からの逸脱やピントずれが問題となり、顕微鏡を使用したその場観察が非常に困難であることが挙げられる。本研究課題では、微振動刺激を付与した際の骨芽細胞応答をリアルタイムその場観察するための計測・評価系構築を目指す。

独自開発する振動刺激負荷デバイスを用いる実験を通じて仮説の実証を目指す。具体的には、細胞内微小器官の一種の共振現象が微振動刺激を細胞が感知可能なレベルにまで増幅しているとする仮説を支持する知見を得るために、周波数スイープ負荷に対する骨芽細胞のカルシウムシグナル応答特性を詳細に観察・評価することを目標とする。

3. 研究の方法

図 1 は、本研究課題において開発する顕微鏡 *in situ* 振動刺激負荷デバイスの外観である。このデバイスは、倒立型顕微鏡のステージ上に設置する大きさであり、35mm ガラスボトムディッシュ 1 個に対して水平方向に振動刺激を付与する。ベースプレート上にリニアスライダを介して振動プレートを配置し、 piezoアクチュエーターにより振動プレートを水平方向に往復運動させる。想定する振動の中で最大振幅となる 30Hz、0.3G の条件では振幅が約 160 μm となるため、piezoアクチュエーターには変位拡大機構を内蔵した高ストロークタイプを用いる。以前のストレッチ刺激付与と比較して微振動刺激付与では観察対象細胞に生じる変位も大きくなるため、観察にはドライ対物レンズを用いて長作動距離を確保し、かつピントずれの影響低減をはかる。

細胞の応答評価実験では、微振動刺激に対する細胞の感知・応答特性を評価するために、細胞内カルシウムイオン濃度変化(カルシウムシグナル応答)をモニターする。細胞内カルシウムイオン濃度変化の計測には、カルシウムイオン蛍光指示薬(Fluo 8H)と細胞質蛍光色素(Calcein Red-Orange)の二種類の蛍光色素を組み合わせる Ratiometry 法を用いる。振動付与によるモーションアーチファクトは顕微鏡で計測される蛍光色素の蛍光輝度値を変化させる。そのため Fluo 8H の輝度値は細胞のカルシウムシグナル応答に起因する変動とモーションアーチファクトに起因する変動が重ね合わされた変動を示す。そこでモーションアーチファクトに起因する輝度変動のみを受ける Calcein Red-Orange の蛍光輝度を同時に計測して Ratiometry 法を適用することによりモーションアーチファクトの影響を補正し、カルシウムシグナル応答に起因する変動のみを評価すること

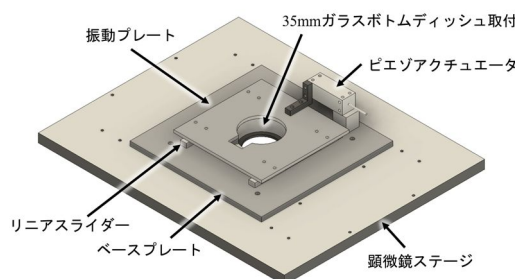


図 1 顕微鏡 *in situ* 振動刺激負荷デバイスの外観

が可能となる。

骨組織にほとんどひずみや組織液流れを生じさせない微振動刺激を骨芽細胞がどのように感知しているのか。その機構を説明する仮説として、申請者は細胞内微小器官（細胞核や細胞骨格など）の僅かな密度の違いによる一種の共振現象が関与していると考えている。細胞内微小器官それぞれの共振周波数が異なっていると、振動を付与し、ある要素が共振を起こした際に他の要素との間に大きな相対運動が生じると考えられる。このような現象が微振動刺激の力学的刺激としての強さを増幅しているのではないだろうか。

本申請課題ではこの仮説を検証するために、微振動刺激を受ける細胞の顕微鏡下でのリアルタイムその場観察を達成した上で、周波数スイープ刺激を付与し細胞の応答特性を評価することを目指す。動物モデル実験において効果が報告されている 30Hz から 90Hz 程度の帯域で、約 30 分間の比較的長時間をかけて周波数をスイープさせる微振動刺激を骨芽細胞に付与し、細胞のカルシウムシグナル応答を観察する。もし骨芽細胞のカルシウムシグナル応答発火の頻度や強度が増強される周波数を発見できれば、申請者の仮説を説明するための力学モデル構築につながる重要な知見を得ることができる。また、実用化の観点からは、より効率的に骨系細胞を刺激するための至適刺激条件の存在を示唆するものであり、微振動刺激による骨形成促進の医療応用への可能性がさらに広がることが期待できる。

4. 研究成果

本研究課題により、顕微鏡ステージ上に設置可能であり、微振動刺激を受ける骨芽細胞のカルシウムシグナル応答を *in situ* でリアルタイムに観察可能な微振動刺激付与デバイスを開発した。その成果を学術論文として発表した。

また、周波数をスイープさせた微振動刺激を骨芽細胞に付与し、応答特性の変化について検討した。その結果、周波数を 45 Hz から 120 Hz まで上昇させていく場合と、120 Hz から 45 Hz まで減少させていく実験系においては、60 Hz を中心とする周波数帯域において細胞の応答率が最も高くなる結果を得た。しかしながら、付与する周波数をランダムとした実験系においては、細胞応答率の周波数依存性は確認できなかった。この実験によって得られた知見は学術論文にまとめて投稿するべく準備中である。また、周波数を連続的に変化させた場合とランダムに変化させた場合で細胞の応答が異なっていた理由について考察し、実験系の改良に反映させる予定である。

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 1件）

1. 著者名 Katsuya SATO, Daiki OOMORI	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of vibration mechanical stimuli loading device for live cell fluorescence microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biomechanical Science and Engineering	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） 10.1299/jbse.21-00294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中晴太郎, 佐藤克也
2. 発表標題 休止期を含む微振動刺激に対する骨芽細胞のカルシウムシグナル応答
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森大輝, 佐藤克也
2. 発表標題 顕微鏡観察下での in situ 振動刺激負荷デバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米原泰良, 田中晴太郎, 大森大輝, 佐藤克也
2. 発表標題 休止期を有する微振動刺激を受ける骨芽細胞のカルシウムシグナル応答
3. 学会等名 日本機械学会中国四国支部第51回学生員卒業研究発表講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Katsuya SATO
2. 発表標題 Calcium signaling response of osteoblasts under microvibration stimuli
3. 学会等名 9th World Congress of Biomechanics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宋原 泰良, 佐藤 克也
2. 発表標題 周波数を変化させた微振動に対する骨芽細胞のカルシウムシグナル応答
3. 学会等名 日本機械学会第33回バイオフロンティア講演会講演論文
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 克也
2. 発表標題 微振動刺激を受ける骨芽細胞のカルシウムシグナル応答特性 -振動強度・休止期挿入の影響-
3. 学会等名 日本機械学会2022年度年次大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>徳島大学バイオメカニクス研究室ホームページ https://bml.me.tokushima-u.ac.jp/ 徳島大学教育研究者総覧 http://pub2.db.tokushima-u.ac.jp/ERD/person/187661/profile-ja.html</p>

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
---------	---------