

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月24日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22760170

研究課題名（和文） 知的構造システムとして捉えた細胞の動力学モデルの構築

研究課題名（英文） Dynamic Modeling of a Cell as an Intelligent Structural System

研究代表者

白石 俊彦（SHIRAISHI TOSHIHIKO）

横浜国立大学・環境情報研究院・准教授

研究者番号：30361877

研究成果の概要（和文）：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、骨芽細胞の力学刺激感受機構に対する動的モデルを構築し、骨形成に効果的な力学刺激の振動数、振幅を特定することを目的とした。その結果、力学刺激による細胞の内部構造の変化と生化学的応答との対応関係を得ることができる実験手法を開発し、それにより細胞の力学刺激センサのモデル化が可能となることを示した。さらに、振動数が低いほど細胞増殖が亢進し、骨形成については 50 Hz の振動数が効果的であることを示した。

研究成果の概要（英文）：This report describes that a dynamic model of mechanical sensing system of an osteoblast is constructed by considering a cell as an intelligent structural system with sensors, controllers, and actuators, and that the effective frequency and amplitude of mechanical vibration on bone formation is identified. As a result, we have developed an experimental method to obtain the relationship between mechanical deformation and biochemical response of a cell and have shown that the mechanical sensing system of a cell can be modeled. Furthermore, we have shown that the cell proliferation is promoted with decreasing the vibration frequency and that 50 Hz is the effective frequency of bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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ようと、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知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。

細胞が機械的刺激を感受し、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、細胞の力学特性は、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年代頃から測定されているが、静力学的な特性測定および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ほとんどみられない。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

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、その機械的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、機械的刺激が骨形成を担う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。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、機械的刺激入力に対する細胞の変形を求める。この変形量と細胞内のカルシウムイオンのような刺激感知に関わるとされる生化学的な信号との対応関係を測定すれば、細胞の有する機械的刺激センサを較正したことになる。アクチュエータに関しては、機械的刺激下において、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運動・増殖の観察や、産生される骨量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出力と考える。センサおよびアクチュエータの振動数特性を比較することにより、細胞のコントローラとしての特性を検討する。

(2) 骨形成に効果的な機械的刺激の振動数、振幅を特定すること

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、細胞の運動・増殖および産生骨量を求める。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にも同様の測定を行う。このようにして、骨形成に効果的な機械的刺激の振動数、振幅を特定する。

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。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、血球計算盤と呼ばれる細かい格子の切られたガラス盤に細胞を載せ、顕微鏡を用いて細胞濃度を測定する。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。そこで、細胞の力学刺激センサ同定のために、骨芽細胞において細胞核およびアクチンを生きた状態で蛍光標識し、細胞内の構造システムを把握する。マイクロピペットを用いて細胞に力学刺激としてせん断変形を与えた場合において、細胞の蛍光顕微鏡画像と Kanade-Lucas-Tomasi 法 (KLT 法) と呼ばれる画像処理手法を用いることにより、細胞の内部構造の局所的な変化を測定し、細胞の力学特性を把握する。さらに、細胞にせん断変形を与えた場合の生化学的応答としてカルシウムイオン濃度の空間的・時間的変化を測定する。この手法により力学刺激による細胞の内部構造の変化と生化学的応答との対応関係が得られるため、力学信号-生化学信号の変換を行う力学刺激センサのモデル化が可能となる。

4. 研究成果

骨芽細胞の増殖曲線の一例として、加速度振幅 0.5 G、振動数 12.5 Hz の場合の結果を図 1 に示す。培養 11 日目以降では振動群の細胞密度は非振動群の約 2 倍となることを示した。細胞増殖メカニズムを解明するために、細胞を蛍光染色し、培養 11 日目における細胞培養箇所の 3 次元顕微鏡画像を取得した。細胞接着面に垂直な断面の細胞核の蛍光顕微鏡画像を図 2 に示す。図 2 より、振動群では細胞が重層化しており、これが細胞密度増加の原因となることを示した。さらに、本研究の実験条件の範囲では、振動数が低く、加速度振幅が大きく、振動時間が長いほど細胞増殖が亢進されることを示した。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。

細胞に局所的なせん断変形を与えた場合に、細胞内のアクチンフィラメントの変形の顕微鏡画像を取得し、変形前後の画像から KLT 法によりアクチンフィラメントの特徴点の変位ベクトルを求めた (図 3)。同様のせん断変形を細胞に与えた場合に、その力学刺激に応答したカルシウムイオン濃度を可視化した (図 4)。図 3 および図 4 の結果より、細

胞内の変形の大きい箇所ではカルシウムイオン濃度が大きくなる傾向にあることを示した。本提案手法を用いることで、力学刺激による細胞の内部構造の変化と生化学的応答との対応関係を得ることができ、力学信号-生化学信号の変換を行う細胞の力学刺激センサのモデル化が可能となることを示した。

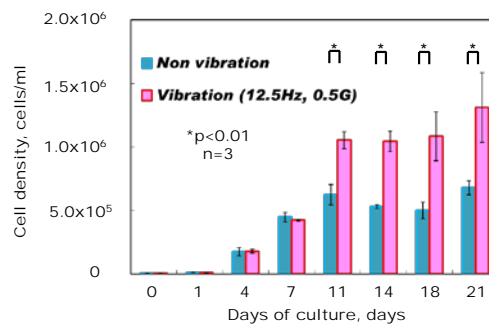


図 1 細胞増殖曲線

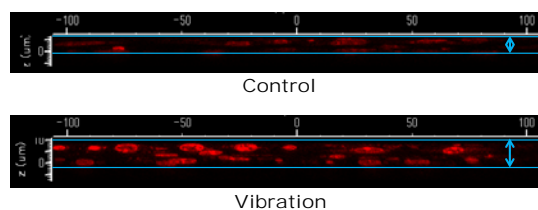


図 2 細胞の重層化

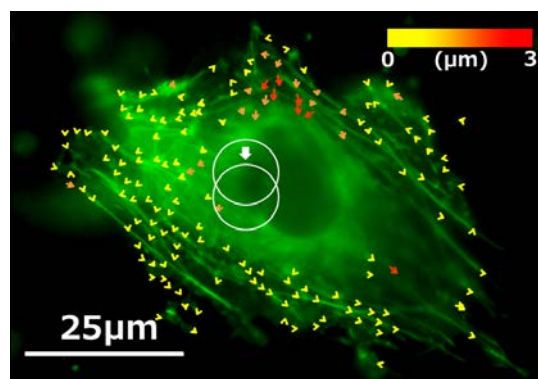


図 3 細胞内アクチンフィラメントの変形

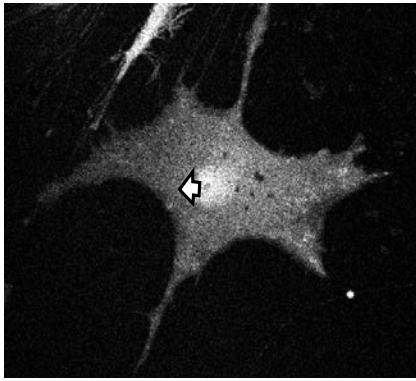


図4 細胞内カルシウムイオン濃度

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3件)

- (1) Toshihiko Shiraishi, Kazuhiro Sakata, Shin Morishita, and Ryohei Takeuchi, Investigation Of a Cell Mechanosensing System by Measuring Cytoskeletal Deformation And Intracellular Calcium Ion Concentration, Proceedings of the 2011 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2011) #IMECE2011-64843 (査読有) .
- (2) Toshihiko Shiraishi, Kazutaka Ohashi, Shin Morishita, and Ryohei Takeuchi, Investigation of Mechanism of Proliferation Promotion of Cultured Osteoblasts by Mechanical Vibration, Proceedings of the 2011 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2011) #IMECE2011-64845 (査読有) .
- (3) Toshihiko Shiraishi, Kazuhiro Sakata, Shin Morishita, and Ryohei Takeuchi, Visualization of Actin Fibers in a Living Osteoblast under Shear Deformation, Proceedings of the 2010 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition (2010) #IMECE2010-39810 (査読有) .

[学会発表] (計13件)

- (1) 高橋拓也, 培養骨芽細胞に対する機械的振動の印加時間の影響, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月8日, 大阪.
- (2) 坂田和夫, 力学刺激に対する骨芽細胞の細胞骨格の変形と生化学的応答の測定, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012年1月7日, 大阪.
- (3) Kazuhiro Sakata, Investigation Of a

Cell Mechanosensing System by Measuring Cytoskeletal Deformation And Intracellular Calcium Ion Concentration, The 2011 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2011年11月16日, 米国・デンバー.

- (4) Toshihiko Shiraishi, Investigation of Mechanism of Proliferation Promotion of Cultured Osteoblasts by Mechanical Vibration, The 2011 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2011年11月16日, 米国・デンバー.
- (5) 坂田和夫, 細胞骨格変形と細胞内カルシウムイオン濃度の測定による細胞力覚システムの検討, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2011年9月5日, 高知.
- (6) 兪 アラ, 培養骨芽細胞に及ぼす機械的振動の印加時間の影響, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2011年9月5日, 高知.
- (7) 小原拓也, 磁性マイクロピラーによる細胞焦点接着部への振動刺激の印加手法の開発, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2011年9月5日, 高知.
- (8) 江口弘晃, 神経幹細胞に対する機械的振動の振幅および振動数の影響, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会 2011年1月8日, 熊本.
- (9) 坂田和夫, 力学刺激による骨芽細胞内骨格構造の局所的な変化の測定, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本.
- (10) Toshihiko Shiraishi, Suppression of Apoptosis of Cultured Osteoblasts by Mechanical Vibration, The 2010 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2010年11月16日, カナダ・バンクーバー.
- (11) Toshihiko Shiraishi, Visualization of Actin Fibers in a Living Osteoblast under Shear Deformation, The 2010 ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, 2010年11月15日, カナダ・バンクーバー.
- (12) 大箸一貴, 機械的振動刺激による骨芽細胞の増殖促進メカニズムに関する研究, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2010年9月15日, 京都.
- (13) 坂田和夫, 力学刺激下における生細胞の変形形状の可視化, 日本機械学会機械力学・計測制御部門講演会, 2010年9月15日, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 俊彦 (SHIRAIISHI TOSHIHIKO)
横浜国立大学・環境情報研究院・准教授
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：