

周波数制御式反復振動刺激による 骨芽細胞分化誘導機序の解析

[1] 組織

代表者：洪 光

(東北大学大学院歯学研究科)

対応者：林 陽平

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

工藤 忠明 (東北大学大学院歯学研究科)

富並 香菜子 (東北大学大学院歯学研究科)

田中 太邦 (東北大学大学院歯学研究科)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

生体の細胞は様々な物理刺激(機械刺激・温熱刺激・電磁気刺激等)を受ける。骨は外部から機械刺激を常に受ける部位であり、これまで骨芽細胞へ分化する前骨芽細胞への機械刺激負荷による細胞増殖や分化促進等への影響が研究されてきた。最近、上下方向の振動による骨芽細胞分化への影響が示唆されたがその機序の多くは不明である (Ota et al. 2016)。

申請者らのグループはこれまで、培地温度を制御する独自システムとして、ラット神経分化モデル細胞に対し温度制御式反復温熱刺激(temperature-controlled repeated thermal stimulation, TRTS)を負荷し、TRTS 単独で神経細胞分化を誘導する方法やその作用機序を明らかにしてきた(Kudo et al. 2015, Kudo et al. 2020, Luo et al. 2022, Tominami et al. 2024)。さらに最近、前骨芽細胞の TRTS による骨芽細胞分化誘導法の確立やその作用機序についての研究を進めている。本研究では温熱刺激とは異なる物理刺激による分化誘導法を開発するための知見を得ることを目的とし、これをもって再生医療の発展に貢献する。

(2) 研究の概要

本研究計画では、具体的には培養細胞用の微細振動刺激装置 NSSB-300N (ネッパジーン社、図 1) を用い、一定の周波数でかつ反復性の三軸(前後・左右・上下方向)同時振動(周波数制御式反復性微細振動(frequency-regulated repeated micro-vibration: FRMV))が骨芽細胞分化に与える影響やその分子機構の解析を行う。本研究にて得られた知見を基に、FRMV を活用した細胞環境制御による低侵襲かつ安全な細胞分化誘導法を開発し、またその分子機構を解明し、将来的には温熱刺激などをも組合せた、より効果的な細胞分化誘導法の臨床応用を目指す研究の一

強度設定	単位(G)						周波数 Hz
	振動強度(X)		振動強度(Y)		振動強度(Z)		
	+X	-X	+Y	-Y	+Z	-Z	
1	0.20	0.19	0.19	0.19	0.27	0.27	14.3
2	0.44	0.41	0.45	0.47	0.36	0.34	23.7
3	0.50	0.51	0.52	0.51	0.39	0.40	29.4
4	0.86	0.80	0.68	0.70	0.47	0.52	42.2
5	0.66	0.73	1.03	0.98	0.67	0.63	55.0
6	0.92	0.98	1.39	1.43	0.68	0.71	65.2
7	1.29	1.27	1.73	1.73	0.80	0.94	70.1
8	1.82	1.73	2.30	2.15	0.99	0.95	81.9
9	2.34	2.49	2.41	2.44	1.19	1.40	92.1

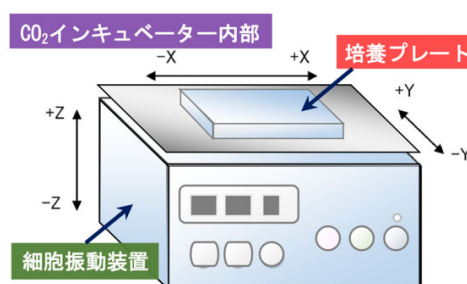


図 1. 培養細胞振動装置(NSSB-300N)の模式図と三軸の振動強度・周波数(※振動刺激時、培養プレートは装置上面に設置)

助とする。

この背景の下、本年度については、FRMV 研究をより推進するため、FRMV を用いた骨芽細胞分化誘導法に関する基本的な技術的検討とその分化誘導の客観的な評価を中心に行った。研究打合せは、研究期間中、毎月(オンライン会議およびメール会議を含む)実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果：

申請者らの研究グループは、既にこれまでの研究で FRMV が骨芽細胞分化誘導モデルの一つである前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化誘導に有効であることを主に細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)の酵素活性を測定する ALP アッセイや石灰化能を評価するアリザリンアッセイなどにより証明した。この分化誘導が BMP シグナル阻害剤である LDN193189 により顕著に抑制されることを明らかにしてきた。また FRMV の刺激条件により当該細胞の骨芽細胞誘導効率にも有意な差が生じることを示してきた(第 100 回日本生理学会大会、京都市)。

今年度は、まず、これまでの申請者らの研究により樹立された標準的な FRMV が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に与える影響、すなわち細胞為害性に関する検討を実施した。次に、特にこれまで不明であった、FRMV 刺激開始直後から 1 週間目までの分化誘導開始直後の ALP 活性の経時的変化や骨芽細胞分化マーカー遺伝子として知られる ALP 遺伝子や Sp7 遺伝子の発現レベルの変動について焦点を当てて検討を行った。これらの検討により、主に以下の成果を得た。

[方法]

MC3T3-E1 細胞株を 10 cm 培養皿に培養し、増殖後、(a) 細胞増殖試験または (b) FRMV を用いた細胞分化誘導試験を行った。まず、(a) の細胞増殖試験では、24 ウェル細胞培養用プレートに規定量播種した細胞に対し、微細振動装置 (図 1) による振動刺激を分化誘導する際と同等の振動強度をもって 3 日間加え、FRMV 刺激を加えなかった場合のコントロールに比べ細胞増殖速度にいかなる影響があるかを検討した。また、(b) の分化誘導試験では、これまでに樹立した設定を用いた細胞分化誘導をするため、24 ウェル細胞培養用プレートに規定量播種した細胞を 100%コンプレントに達するまで増殖させたのち、標準的な FRMV 処理 (50 秒/1 時間毎) を加え、分化誘導開始 0 日目と 7 日目の mRNA を回収し、リアルタイム PCR 法により、分化マーカー遺伝子 (ALP および Sp7 遺伝子) の mRNA 発現レベルの変動を検討した。この (b) の実験では、これまでの検討で、既に FRMV による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化が BMP シグナル阻害剤 LDN193189 で顕著に抑制されることから、同阻害剤による分化マーカー遺伝子発現レベルへの影響も併せて検討した。

[結果]

(1) 上述の (a) の細胞増殖試験を行った結果、分化誘導に使用している条件設定での FRMV 刺激は、FRMV を加えないネガティブコントロール群に比べ、意外にも有意に細胞増殖速度が上昇することが明らかとなった。このことは適切な微細振動刺激が骨芽細胞による局所的な骨形成活性の誘導に有用であることを示唆するものであり、今後さらに様々な条件設定の FRMV を用いて FRMV が細胞増殖速度に与える影響とそのメカニズムについて詳細に検討する必要があると考えられる。

上述の (b) の FRMV による骨芽細胞分化誘導試験では、これまでの解析により、ALP 酵素活性が有意に上昇することが確かめられていたが、7 日目までに ALP が徐々に上昇しその後活性レベルが高いまま維持されることが明らかとなった。このような結果を踏まえ、申請者らはリアルタイム PCR 法を活用した解析では、MC3T3-E1 細胞における FRMV 負荷に伴う

分化マーカー遺伝子発現変動の短期的な影響 (初期応答) の評価を行った。

その結果、今回、骨芽細胞分化マーカー遺伝子である ALP 遺伝子の発現レベルも FRMV により有意に上昇することが明らかとなった。さらに FRMV によるこの ALP 遺伝子発現レベルの上昇も BMP シグナル阻害剤により顕著に抑制された。しかし、興味深いことに Sp7 の遺伝子発現レベルについては有意な変化は認められなかった。今後は他の分化マーカー遺伝子についても同様の解析を詳細に行う予定である。一方で、申請者らは本研究をより効率的に推進するため、これまでに MC3T3-E1 細胞のサブクローンの作成を進め、シングルコロニー法により MC3T3-E1 細胞の亜株を多数樹立した。今後、これらの亜株を用いて FRMV 高感受性 MC3T3-E1 細胞並びに低感受性 MC3T3-E1 細胞の同定を進める予定である。

(3-2) 波及効果や発展性など :

本共同研究における成果は、再生医学・リハビリテーション関連領域の研究者間における融合領域研究を促進すると考えられる。また、MC3T3 細胞の骨芽細胞分化を調節する、FRMV 作用を支える分子的な基盤やその標的となる分子ならびにシグナル伝達経路に関する研究は非常に有意義で、FRMV に準じた非侵襲的なプログラム振動刺激を用いた分化誘導療法や再生医学への今後の応用が期待される。

[4] 成果資料

- (1) Investigation of the frequency-regulated repeated micro-vibration (FRMV)-mediated osteoblast differentiation mechanism in MC3T3-E1 cells. Matsushita A, Kudo T, Hayashi Y, Tominami K, Izumi S, Tanaka T, Luo YR, et al. 第 101 回日本生理学会大会. 北九州, 2024.
- (2) 富並香菜子, 工藤忠明, 林陽平, 泉哲, 松下歩夢, 羅悠然, 田中太邦, 安藤恵子, 野口拓也, 松沢厚ら. 骨粗鬆学会温度制御式反復温熱刺激を用いた骨芽細胞分化誘導法の開発. 第 45 回東北骨代謝・骨粗鬆研究会. 仙台, 2024.
- (3) Tominami K, Kudo T, Noguchi T, Hayashi Y, Luo YR, Tanaka T, Matsushita A, Izumi S, et. al. Physical Stimulation Methods Developed for In Vitro Neuronal Differentiation Studies of PC12 Cells: A Comprehensive Review. Int. J. Mol. Sci., 2024. 25(2) 772-772.
- (4) The effect of frequency-regulated repeated micro-vibration on osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. Kudo T, Guang H, Tominami K, Luo YR, Izumi S, Tanaka T, Hayashi Y, et al. 第 100 回日本生理学会大会. 京都, 2023.