2S01 培養骨芽細胞の増殖・分化に対するランダムパルス列電磁場の刺激効果

The effect of proliferation and differentiation of osteoblastic induced by random pulse-train electromagnetic fields.

学 ○松村 啓之 (金沢大院)

正 田中 茂雄 (金沢大)

Hiroyuki Matsumura, Graduate School of Nature Science and Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa 920-1192, Ishikawa

Shigeo TANAKA, Nature and Environmental Technology, Kanazawa University

Key words : Random pulse train, Electromagnetic fields, Osteoblast, Proliferation, Alkaline phosphatase activity.

1. 緒言

近年、様々な組織の細胞へ分化可能な幹細胞や iPS 細胞が注目されている。そして、これらの細胞から作製した再生培養組織を再び患者に移植する再生医療技術が期待されている。自身の細胞から作製された再生培養組織は、移植患者に対する生体適合性が良いだけでなく、臓器移植に伴う倫理・法的諸問題を克服できる可能性がある。硬組織において、石灰化促成因子として力学的刺激などの物理的刺激を与えることで再生培養骨の石灰化を促進する試みも行われているものの⁽¹⁾、物理的刺激による石灰化促進メカニズムは十分に解明されてない。一方、我々は、神経系で観察されるランダム性や揺らぎを有する伝達信号の形態⁽²⁾や中枢神経系の活動が骨代謝に関与していること⁽³⁾に着目した。そしてこれまでに、ランダム性を有するパルス列波形電磁場刺激が培養骨芽細胞の石灰化応答の促進に有効であることを明らかにしてきた⁽⁴⁾。しかしながら、ランダムパルス列電磁場刺激が石灰化促進効果を決定しているメカニズムは不明である。本研究では、骨芽細胞が石灰化へ向かうどの段階に対しランダムパルス列電磁場刺激が作用しているかを明らかにするために、細胞増殖段階と骨芽細胞分化の初期に生じるアルカリ性フォスファターゼ (ALP ; Alkaline phosphatase) 活性段階に着目し、これらの段階に与えるランダムパルス列電磁場刺激の影響を調べることを目的とした。

2. 実験方法

2. 1 骨芽細胞への電磁場刺激

本実験では、マウス頭蓋冠由来樹立系骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1 細胞, 理化学研究所 RIKEN Cell Bank, No.RCB1126, LOT No.038) を ϕ 35 mm の培養ディッシュに約 100 cells / mm² で播種したものをサンプルとし実験に用いた。サンプルはソレノイドコイル上に設置され、培養ディッシュ中心から半径 9 mm の範囲を暴露した (図 1)。電磁場パルスの波形は、振幅 1 mT, 周期 1 ms の 1 周期正弦波である。実験グループは、①Control 群, ②ランダムパルス列 (RdPT, パルス繰り返し周波数 50 Hz~500 Hz), ③周期的パルス列 (PrPT, パルス繰り返し周波数 500 Hz), および④静的 (CC, 磁束密度 1 mT) 電磁場刺激群の 4 群とした (図 2)。Control 群では他の群と同様に電磁場刺激装置に設置し、電磁場刺激を与えずに培養した。いずれの刺激群においても刺激の最大磁束密度は 1 mT とし、各群のサンプル数 4 とした。

Fig.1 (a) Electromagnetic fields stimulation system. Four samples (A~D) can be simultaneously stimulated. (b) Electromagnetic fields stimulation to osteoblasts in a culture dish by using a solenoid coil. EMF: Electromagnetic fields. Arrows represent the direction of EMF.

Fig.2 Electromagnetic fields (EMF) waveforms. (a) One EMF pulse. (b) Random EMF pulse train. Pulses appear randomly at repetitive frequencies from 50Hz to 500Hz. (c) Periodic EMF pulse train. Pulses appear periodically at repetitive frequencies from 500Hz. (d) Continuous constant EMF.

2. 2 細胞増殖評価

細胞播種翌日から 1 日 3 分間の電磁場刺激を毎日与えた。刺激を与えた領域の細胞を、位相差顕微鏡 (Nicon, DIAPHO300), 10 倍の対物レンズ, 顕微鏡用デジタルカメラ

(OLYMPUS, DP2-BSW) を用いて毎日撮影し、撮影画像 (H 520 μ m $\times$ W 680 μ m) 上で細胞数をカウントした。なお、細胞数のカウントは刺激範囲内の重複しない 4 つの領域で行い、その平均値をデータとして採用した。いずれの群においても、4 日間の培養によりコンフルエントに達したため、この時点で実験終了とした。

2. 3 ALP 活性評価

刺激を与えずコンフルエントに達したサンプルを用意し、これらのサンプルに対しコンフルエント翌日から 1 日 3 分間の刺激を 2 日間与えた。ALP 活性の評価はクエン酸鉛染色法により行った。デジタルカメラ (Canon, Power Shot A95) により培養ディッシュのカラー接写像を撮影し、画像解析ソフト (Adobe Photoshop 6.0) を用いて画像を 256 階調のグレースケールに変換した。輝度 0~100 の範囲を示す領域を ALP 活性領域とみなし、その面積から ALP 活性を評価した。

3. 結果

図 3 に各培養日における代表的な MC3T3-E1 細胞の顕微鏡画像を示す。また、図 4 は、MC3T3-E1 細胞の培養期間に伴う細胞数の変化の群間比較である。すべての群において培養 1 日目における細胞数はほぼ等しく、このことから均一に細胞が播種されたことが確認できる。培養 2 日目以降では、ほぼ線形に増加する様子が観察された。培養 4 日目には、各群の細胞数に違いが見られたが、統計的有意差は確認できなかった。また、各群の細胞数は Control 群と比べ、RdPT 電磁場刺激群では 0.91 倍、PrPT 電磁場刺激群では 0.84 倍、CC 電磁場刺激群では 0.88 倍となった。図 5 に各群における代表的な ALP 染色画像および ALP 活性染色領域の群間比較を示す。RdPT 群と PrPT 群において Control 群よりも有意に高い値が確認できた。なお、RdPT 群の値は、PrPT 群や CC 群に対しても有意に高かった。各群の ALP 活性染色領域は Control 群と比べ、RdPT 群では 13.4 倍、PrPT 群では 5.70 倍、CC 群では 3.94 倍となった。

4. 考察

骨芽細胞では、細胞増殖、コラーゲン産生、ALP 活性化、そしてオステオカルシンなどの骨形成関連タンパクの発現の段階を経て石灰化が実現される。特に ALP の活性化は、分化マーカーの発現や基質小胞内でのハイドロキシアパタイト結晶核の生成を促すことから、骨芽細胞の石灰化において重要な役割を果たしている。本実験結果より、RdPT 電磁場刺激は骨芽細胞の増殖を促進しないものの、ALP の活性化を他の刺激パターンよりも効果的に促進することが示された。本実験結果、RdPT 電磁場刺激による石灰化促進効果は、骨芽細胞の分化段階に依存することを示しており、この知見は、同刺激の効果のメカニズムを解明する上で有益な情報と言える。今後は他の分化段階に対する RdPT 電磁場刺激の効果を明らかにするとともに、ランダム刺激波形の持つ高い刺激効果のメカニズムについて細胞レベルで明らかにする予定である。

5. 結 言

本研究では、骨芽細胞のどの分化段階に対しランダムパルス列電磁場刺激が作用しているかを明らかにするために、細胞増殖と ALP 活性の段階に着目し、同刺激の影響を調べた。その結果、ランダムパルス列電磁場刺激は、細胞増殖に影響を与えず、アルカリ性フォスファターゼの活性化に対し刺激効果を示すことがわかった。

Fig.3 Typical microscopic images of MC3T3-E1 cells on day 1, 2, 3 and 4.

Fig.4 Changes in number of cells with culture period. Data shows the average $\pm$ SD of four samples.

Fig.5 (a) Comparison of ALP staining areas among all the groups on the day 2. Data shows the average $\pm$ SD of four samples. *** $p < 0.001$ vs. Control. ** $p < 0.05$ vs. PrPT. * $p < 0.01$ vs. CC. † $p < 0.01$ vs. Control. (b) Close-up pictures of ALP stained samples.

参考文献

- (1) Tanaka SM, J. Biomech Sci & Eng. 5(5), 635-645, 2010.
- (2) Cordo P, Timothy J et al. Nature 383(31): 769-770, 1996.
- (3) Ducky P, Amling M. Cell 100: 197-207, 2000.
- (4) 松村啓之, 田中茂雄, 臨床バイオメカニクス, Vol.33, 2012, in press