

【目的】 一般的に中枢神経の再生は困難とされており、その治療法の一つとして培養容器内で細胞を増殖・組織化させ、得られた培養細胞や組織を患者の疾患部に移植する手法が検討されている。これまでに細胞培養環境下において幹細胞から必要な性質を持つ細胞へ分化、誘導する細胞の培養制御技術が検討されており、化学素材や電界を用いた手法が研究されている。これまで我々のグループでは、超音波振動を用いた各種細胞の培養制御技術を検討している。本手法では化学素材などを別途添加することなく、また培養ディッシュに複雑な加工を行うことなく、ディッシュに直接超音波振動を励振することによって、非接触で細胞の培養環境を制御することが可能であり、他手法と比較して低コストかつ簡易なシステムの構築を目指している。本研究では、培養ディッシュ底面に超音波振動を励振可能な超音波培養ディッシュを作製し、神経様細胞を分化させることで、超音波振動が細胞の成長に与える影響について検討した。

【方法】 神経様細胞として褐色種由来の接着細胞である PC12 細胞（理化学研究所）を用いた。PC12 細胞に神経成長因子 (NGF) を添加・培養することで、細胞は神経突起を形成し神経様細胞に分化する。PC12 細胞を 10% FBS、10% HS、1% ペニシリン・ストレプトマイシン混合溶液を添加した D-MEM 培地を用い、37°C、CO₂ 濃度 5% の環境下にて培養を行い、週 1 回の頻度で継代を行った。超音波実験には、リング型超音波圧電振動子 (PZT、内径 10 mm、外径 20 mm、厚さ 1 mm) を接着したガラス円板（直径 35 mm、厚さ 1.1 mm）を下面に接触した直径 35 mm のガラス底面を有する培養ディッシュを用いた。超音波培養ディッシュを温度、湿度、および CO₂ 濃度を制御可能な小型チャンバー内に設置した。ディッシュ内には、NGF を添加して約 20 時間培養した PC12 細胞を D-MEM 培地 2 mL と共に播種した。超音波培養ディッシュに周波数 83 kHz、振幅 10~30 V_{pp} の連続正弦波を連続 72 時間入力し、その後ディッシュ中央部近傍 (10×10 mm²) の細胞の様子を位相差顕微鏡でタイムラプス撮像した。撮像画像より神経突起の配向方向および長さを計測することで、神経突起の成長に対する超音波振動の影響を定量的に評価した。また PC12 細胞の分化に関連した遺伝子 (*synapsin-1* 遺伝子および *adenosine A2A receptor* 遺伝子) 発現に対する超音波振動の影響をリアルタイム PCR 法により評価した。

【結果】 作製した超音波培養ディッシュに周波数 83 kHz の連続正弦波信号を入力すると、ディッシュ底面にはその中心部分 ($r = 0$ mm) で振動振幅が最も大きく、 $r = 4.5$ mm の位置に最も小さい振動節円が存在する同心円状の振動接円を持つ共振たわみ振動が励振された。超音波駆動下において細胞は円周方向 (図 a 中 90° 方向)、すなわち振動振幅が同一の方向に配向する傾向が認められた。また超音波駆動下における神経突起長さは Control と比較してディッシュ全体に渡って有意に長い結果を示し、超音波駆動が神経細胞の成長を促進することが示唆された (図 b)。特に、超音波培養ディッシュへの入力電圧が 20 V_{pp} 以上の場合、PC12 細胞の分化は有意に促進されることが明らかとなった。遺伝子解析結果より、Control と比較して超音波駆動下では、SynI は有意に活性化し、Adora2a は入力電圧の増加に伴い抑制される結果となった。本結果より、遺伝子レベルにおいても PC12 細胞の神経細胞様への分化誘導が超音波振動によって促進されることが証明された。

超音波駆動下における PC12 細胞の配向分布 (a) と神経突起長さの変化 (b)

