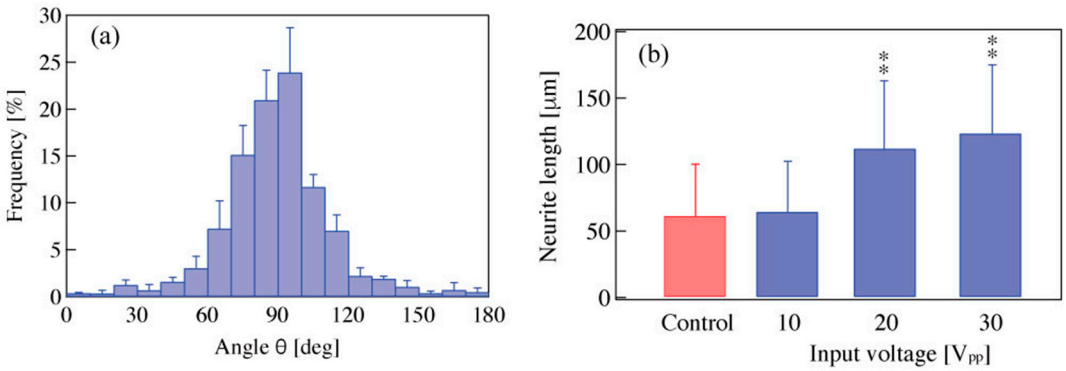
80　超音波による細胞コーティングの医用展開	小山　大介

【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℃、CO_2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 CO_2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 mm^2）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-I* 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）



80. 超音波による細胞コーティングの医用展開

小山　大介

同志社大学 理工学部 電気工学科 超音波エレクトロニクス・応用計測研究室

Key words：細胞培養，超音波振動，PC12 細胞，神経突起，PCR 法

緒　言

ヒトの神経系は中枢神経系と末梢神経系に分類され、中枢神経系は脳と脊髄で、末梢神経系は神経線維や神経節で構成される。中枢神経に疾患が生じると運動障害や感覚障害を引き起こしてしまうが、その再生は非常に困難とされている。中枢神経疾患における神経機能の回復には、神経軸索の再生、疾患により失われた細胞の補充、機能回復という要素が重要となり、これらのいずれにおいても発生現象の再現が必要となる。この取り組みとして、培養容器内で細胞を培養・増殖・組織化させ、得られた細胞や組織を患者の疾患部に移植し治癒を行うケースが報告されている。これに関して、細胞を培養し、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として、化学素材や外部からの電界を用いた手法が報告されている［1，2］。しかし、化学素材を用いた手法では、培養細胞が接着する細胞培養ディッシュに加工を施すため、培養時におけるコンタミネーションのリスクを伴う。また外部電界を用いた手法では、細胞に磁性体ビーズ等の異物を付与することにより細胞に極性を持たせるため細胞毒性の懸念がある。一方、これまでに著者らのグループでは、超音波振動を用いた培養制御技術について検討を行ってきた。その一例として、超音波振動を用いた HeLa 細胞の様な接着細胞のセルパターニング技術について報告した［3］。本技術では、ディスポーザビリティとコンタミネーションのリスクを考慮し、一般的な培養ディッシュの外部から培養細胞に対して超音波振動を与えることで、細胞に対して非接触で培養環境を制御することができる。また、その装置が超音波振動の発生源である圧電振動子のみで構成されるため、今後装置の低コスト化や小型化が期待できる。そこで本研究では、超音波による細胞培養制御技術と将来的な医用展開を考慮し、超音波振動が培養細胞に与える影響を定量的に検討すると共に、培養細胞の配向制御技術について検討を行った。具体的には、神経細胞のモデルとして広く用いられる PC12 細胞について、超音波振動が細胞の分化および成長に与える影響について検討を行った［4］。

方　法

1. 細胞培養

本研究では、接着細胞としてラット褐色種由来の神経様細胞である PC12 細胞（理化学研究所より購入）を用いた。PC12 細胞は、通常培養環境下における接着時においては扁平形状であるが、神経成長因子（NGF）を添加し、培養することで神経突起を形成し神経細胞の様に分化する。購入した 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℃、CO_2濃度 5%の環境下で培養を行い、週 1 回の頻度で継代を行った。

2. 超音波実験

超音波振動下における細胞成長を定量的に評価するため、汎用培養ディッシュを組み合わせた超音波培養ディッシュを設計、開発した（図 1a）。厚み方向に分極された内径 10 mm、外径 20 mm、厚さ 1 mm のリング型超音波圧電振動子（PZT、C-213、富士セラミックス）を直径 35 mm、厚さ 1.1 mm のガラス円板にエポキシ樹脂で接着した。これを底面が直径 35 mm のガラス製の培養ディッシュ底面に同心円状となるように設置した。装置のディスポーザビリティを考慮し、ガラス円板と培養ディッシュ底面の間には、界面における音波の反射・減衰を抑制するための整合材として

シリコンオイルを注入した。作製した超音波培養ディッシュを温度、湿度、および CO_2 濃度を制御可能な小型チャンバー内に設置し、ディッシュ底面上の細胞成長の様子を位相差顕微鏡で観察した。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。超音波振動子への入力信号として、周波数 83 kHz、電圧振幅 10～30 V_{pp} の連続正弦波を用いた。駆動周波数は、ディッシュ上に形成される超音波振動の波長と顕微鏡観測範囲の関係から決定した。各電圧振幅条件で超音波駆動時間を 72 時間とし、超音波非駆動条件である Control と比較した。連続 72 時間の超音波駆動後に、ディッシュ中央部近傍（10×10 mm^2）の細胞の様子を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評価した。神経突起の配向方向 θ はディッシュ中心、細胞の中心位置、最も長い突起の先端が成す角度と定義し、θ =90°はディッシュの径方向を表す（図 1b、NGF 添加から 72 時間後の細胞の様子）。細胞の中心位置は細胞中で最も輝度値が小さい（暗い）位置とし、神経突起長さは細胞中心から最も長い突起の先端までの距離とした。

3. 遺伝子解析

細胞外部から与える物理的振動が細胞の遺伝子発現に影響を与えることは既に知られている［5］。本研究では、PC12 細胞の分化に関連した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。遺伝子解析のため、RNeasy Kit（74104、Qiagen）を用いて PC12 細胞からトータル RNA を抽出した。また逆転写 PCR 法には One-step SYBR PrimeScript Plus RT-PCR kit（RR096B、タカラバイオ）および LightCycler 480 システム（Roche Diagnostics）を使用した。定量的評価を行うため、PC12 細胞が神経様細胞に分化誘導される際に活性化する *synapsin-I* 遺伝子（*Syn1*）および不活性化する *adenosine A2A receptor* 遺伝子（*Adora2a*）のそれぞれの発現レベルを測定した［6］。これらの遺伝子を、PC12 細胞の分化誘導時にも発現量が安定しているリボソームタンパク質 L29 遺伝子（*RPL29*）を基準として相対化し、評価した［7］。

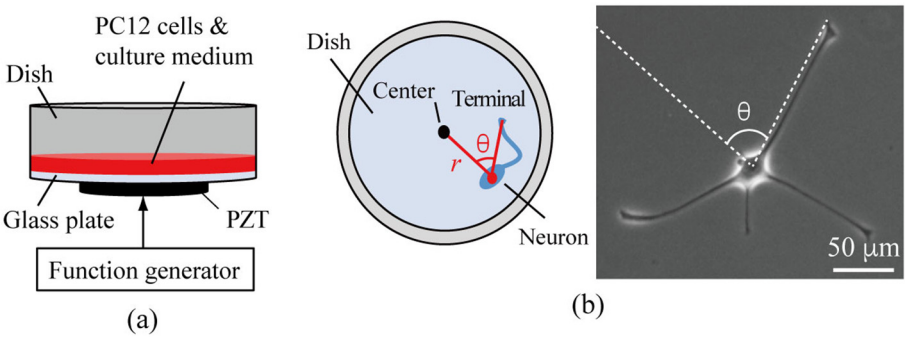


図 1. 超音波培養ディッシュと細胞配向および長さ評価

a) 実験セットアップ。発振器からの電気信号を超音波振動子（PZT）に入力し、培養ディッシュ底面に超音波振動を励振した。

b) PC12 細胞の配向および長さ評価。ディッシュ中心から細胞中心の距離 r とディッシュ中心、細胞中心、および最も長い神経突起先端の成す角 θ によって細胞配向を評価した。神経突起長さは最も長い突起長さとした。

結果および考察

1. 外見的影響

超音波振動子に連続正弦波信号を入力すると、培養ディッシュ底面には共振たわみ振動が励振された。図 2 は駆動周波数 83 kHz 時におけるレーザドップラ振動計を用いて測定したディッシュ底面の面外振動分布である。ただしこれに細胞および培地を加えた場合、同共振モードの周波数は 78 kHz にシフトした。ディッシュ中心部分（r =0 mm）で振動振幅が最も大きく、半径方向 r =4.5 mm の位置に最も小さい振動節円が存在する共振たわみモードが励振さ

れた。超音波振動と細胞成長の関係性を調査するため、顕微鏡による観測範囲をこの振動節円を含む範囲であるディッシュ中心からの距離が r =1.6～4.6 mm の円環内を 5 つの領域に分割した（ディッシュ中心近傍の r =0～1.6 mm の範囲では細胞同士の密集度が高く神経突起の計測が困難であったため観測範囲外とした）。観測範囲の神経突起の配向および長さ分布を計測した（各条件 n＝500）。

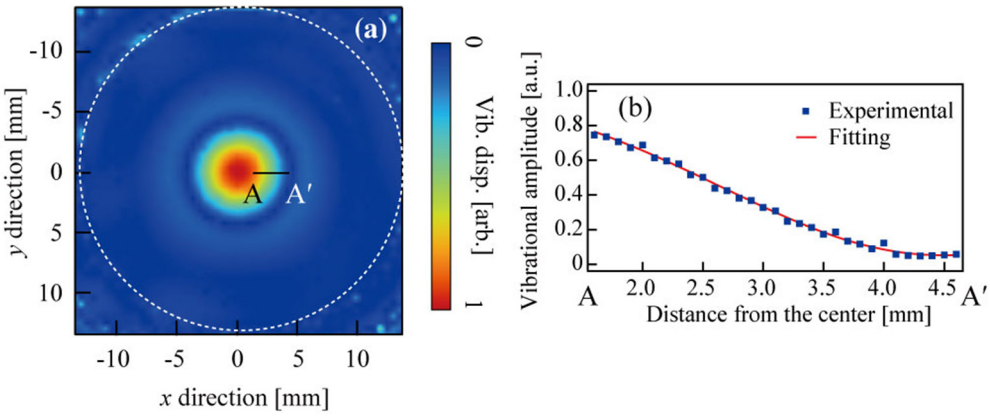


図 2. 超音波ディッシュ底面（ガラスボトム部分）の超音波振動分布

a） 周波数 83 kHz で半径約 4.5 mm の振動節円を伴う共振たわみ振動が発生した。最大値（中央部）で規格化している。

b） 同図（a）中 A–A′部分の振動分布。実験値と理論値よるフィッティング結果。

図 3 は Control および超音波駆動時（10～30 V_{pp}）の 72 時間後の神経突起配向分布を表しており、棒長さとエラーバーはそれぞれ平均値と標準偏差を表している。超音波非駆動時（Control）は神経突起はランダムに配向するが、超音波駆動時はディッシュ円周方向（90°方向）に有意に配向した。この傾向は入力電力の増加と共に顕著となった。すなわち本結果は、細胞は神経突起を形成する際に足場環境として一定の場所（超音波振動振幅が一定の場所）を選択する傾向があることを示唆している。図 4 は超音波駆動 72 時間後の各条件における神経突起長さの計測結果である。分散分析後の Tukey 法による検定より、入力電圧が 20 V_{pp} および 30 V_{pp} の場合、超音波駆動下における神経突起長さは Control と比較し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確認された。またディッシュの振動振幅分布（図 2）との比較より、神経突起の長さは超音波振動振幅振動分布には直接依存せず、ディッシュ全体に渡って成長が促進されることがわかった。

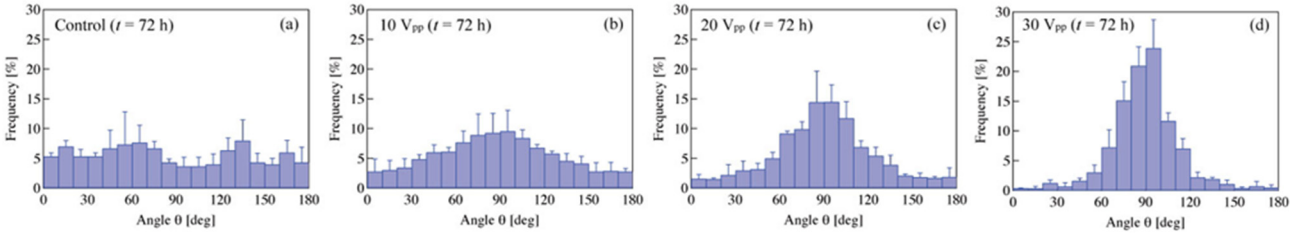


図 3. 電圧変化時の細胞の配向分布

周波数 78 kHz、72 時間後の結果であり、θ =90° は接線方向の意。N＝500、エラーバーは標準偏差を表す。

a）コントロール条件（超音波非駆動時）下における分布。細胞はランダムに配向した。

b）入力電圧 10V_{pp} 時の分布。コントロールと比較し、接線方向（θ=90°）にわずかに集中した。

c）入力電圧 20V_{pp} 時の分布。

d）入力電圧 30V_{pp} 時の分布。電圧増加に伴い、円周方向への配向傾向が顕著となった。

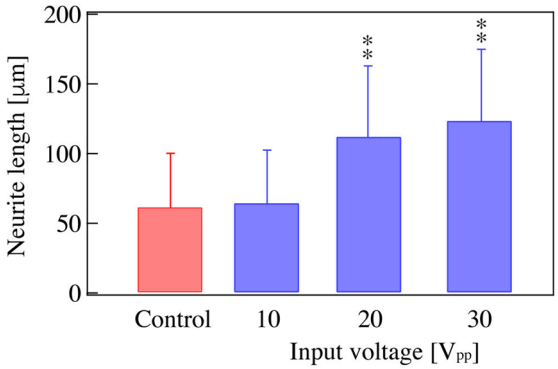


図 4. 電圧変化時の細胞長さの変化

周波数 78 kHz、72 時間後の結果。N＝500、エラーバーは標準偏差を表す。**はコントロール比較時の p＜0.01 の意（one-way ANOVA 後の Tukey の HSD 検定、F＝225）。

2. 遺伝子への影響

Control および入力電圧変化時の 72 時間後の各遺伝子（*SynI* および *Adora2a*）の発現レベルを図 5 に示す（各条件における *RPL29* の発現レベルを基準として規格化している）。同図より、Control と比較して超音波駆動下では、*SynI* は有意に活性化しており、*Adora2a* は入力電圧の増加に伴い抑制されることがわかった。本結果より、遺伝子レベルにおいても PC12 細胞の神経様細胞への分化誘導が超音波振動によって促進されることが明らかとなった。

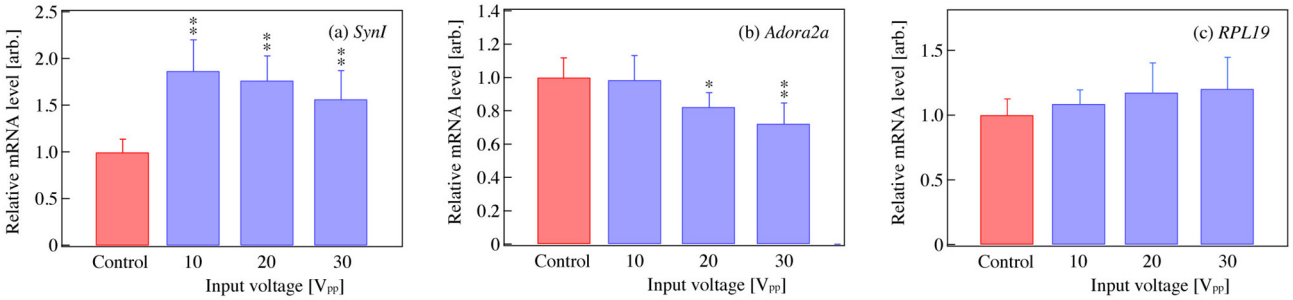


図 5. 電圧変化時の細胞の遺伝子発現レベル

周波数 78 kHz、72 時間後の結果であり、エラーバーは測定 3 回の標準偏差。*、**は コントロール比較時の p＜0.05、p＜0.01 の意（one-way ANOVA 後の Tukey の HSD 検定）。

a）超音波駆動による活性化が確認された（F＝16.37）。

b）超音波駆動による不活性化が確認された（F＝9.60）。

c）超音波駆動下においても発現レベルは一定であった（F＝1.93）。

a）および b）はこれを基に規格化を行った。

共同研究者

遺伝子解析は共同研究者の京都大学大学院生命科学研究科分子情報解析学研究室の粂田昌宏先生に実施頂いた。

文　献

1) Graves M, Hassell T, Beier B, Albors G, Irazoqui P. Electrically mediated neuronal guidance with applied alternating current electric fields. Ann Biomed Eng. 2011 Jun;39(6):1759-67. Epub 2011 Feb 5. PMID: 21298344 DOI: 10.1007/s10439-011-0259-8

2) Tang-Schomer M. 3D axon growth by exogenous electrical stimulus and soluble factors. Brain Res. 2018 Jan 1;1678:288-296. Epub 2017 Oct 31. PMID: 29097106 DOI: 10.1016/j.brainres.2017.10.032

3) Tani K, Fujiwara K, Koyama D. Adhesive cell patterning technique using ultrasound vibrations. Ultrasonics. 2019 Jul;96:18-23. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30939389 DOI: 10.1016/j.ultras.2019.03.018

4) Maruyama H, Fujiwara K, Kumeta M, Koyama D. Ultrasonic control of neurite outgrowth direction. Sci Rep. 2021 Oct 11;11(1):20099. PMID: 34635756 DOI: 10.1038/s41598-021-99711-0

5) Ito Y, Kimura T, Nam K, Katoh A, Masuzawa T, Kishida A. Effects of vibration on differentiation of cultured PC12 cells. Biotechnol Bioeng. 2011 Mar;108(3):592-9. Epub 2010 Oct 26. PMID: 20939009 DOI: 10.1002/bit.22961.

6) Pokharel S, Lee CH, Gilyazova N, Ibeanu G. Analysis of Gene Expression and Neuronal Phenotype in Neuroscreen-1 (NS-1) Cells. Int J Biomed Investig. Sep-Dec 2018;1(3):115. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30687846 DOI 10.31531/2581-4745.1000115.

7) Zhou L, Lim QE, Wan G, Too HP. Normalization with genes encoding ribosomal proteins but not GAPDH provides an accurate quantification of gene expressions in neuronal differentiation of PC12 cells. BMC Genomics. 2010 Jan 29;11:75. PMID: 20113474 DOI: 10.1186/1471-2164-11-75.