

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15176

研究課題名(和文) テラヘルツ波照射による細胞機能制御技術の開発

研究課題名(英文) Development of cell function control technology by terahertz wave irradiation

研究代表者

櫛引 俊宏 (Kushibiki, Toshihiro)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：30403158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、細胞にテラヘルツ波を照射して細胞の増殖能や分化能を人為的に制御する新しい技術・システムを開発することである。本研究成果として、テラヘルツ波増強基板材料(非線形結晶)の1つであるテルル化亜鉛(ZnTe)の細胞適合性試験を実施し、iPS細胞や骨髄間葉系幹細胞に対する細胞毒性が0.25mg/mLまでは認められないことを明らかにした。また、1細胞に対してテラヘルツ波を照射するための1細胞光照射顕微鏡を構築し、1細胞レベルまたは2-3 μ mまでの大きさでピンポイントで光照射を行えるシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research is to develop a new technology/system that controls cell proliferation and differentiation potential by irradiating cells with terahertz waves. As a result of this research, cytocompatibility test of zinc telluride (ZnTe) which is one of terahertz wave enhancement substrate materials (nonlinear crystals) was carried out and cytotoxicity of iPS cells and bone marrow mesenchymal cells was not observed when the ZnTe concentration was below 0.25 mg/mL. In addition, a light irradiation microscope for irradiating terahertz waves to one cell was constructed, and a system capable of performing light irradiation with pinpoint at 1 cell level or up to 2-3 μ m size was constructed.

研究分野：光生物学

キーワード：細胞機能制御 テラヘルツ波 光照射

1. 研究開始当初の背景

テラヘルツ波は電波と光波の間の周波数帯に位置し、電波の良好な透過性と光波の持つ制御性の良さを兼ね備えており、1990年代になってようやく光学研究者による本格的な取り組みが始まった電磁波である。自然界ではこの波長帯に固有の吸収スペクトルをもつ物質が多いことから、従来のバイオロジーでは実現できなかった様々な新用途が期待されている。しかし、テラヘルツ波をバイオテクノロジーツールとして用いる際の最大の弱点は、水分子にほとんどのエネルギーが吸収されてしまうことである。現状では、テラヘルツ波を試料物質に照射し、その透過光・反射光・散乱光等を検出して試料のイメージングもしくは光学スペクトルを検出する計測技術が提案されているが、その対象はほとんど水を含まない物質もしくは極度に乾燥させた生物試料がターゲットとなっている。

研究代表者・櫛引は、これまで光技術を用いた細胞機能制御や幹細胞分化制御に関する研究を行ってきた。代表的な成果として、骨髄から採取した間葉系幹細胞にレーザー光を照射することにより、幹細胞が骨芽細胞または軟骨細胞に分化促進し、脂肪細胞への分化が抑制される現象を発見している。そのメカニズムとして、細胞内で光エネルギーを受容するタンパク質の発現解析や細胞内局在の解析を行っている (J. Photochem. Photobiol. (2010), J. Biophotonics (2010) など多数報告し、文部科学大臣若手科学者賞を受賞)。これらの成果は光技術により幹細胞分化を制御させた世界でも初めての報告である。これらの成果から、テラヘルツ帯域に固有の吸収スペクトルをもつ物質が多く存在する細胞にテラヘルツ波を照射した場合、その細胞機能 (増殖や分化) が変化すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、iPS細胞および骨髄間葉系細胞にテラヘルツ波を照射できるシステムを構築し、分化能や増殖能といった細胞機能を人為的に制御する技術・システムを開発する。単にテラヘルツ波を細胞に照射すると細胞近傍の水分子にテラヘルツ波のエネルギーが吸収され、効率よく照射することができないため、細胞近傍にテラヘルツ波増強基板材料 (非線形結晶) を配置し、その結晶に向けてピンポイントで光照射を行うことのできるシステムを構築する (分担研究者・田中と共同)。国内外を問わず、このような学際的な研究を行っている例はなく、両領域の研究を行うことのできる研究者は極めて少数である。分子生物学・基礎医学実験と光技術を組み合わせる本テラヘルツバイオロジー研究は、再生医療だけではなく基礎医学生物学研究や医療をはじめとしたライフサイエンス分野へ革新的な技術を提供できる。

本研究では、幹細胞にテラヘルツ波を照射し、細胞の分化能や増殖能といった機能を人為的に制御する新しい照射システムを開発する。さらに、システムを開発後には、研究期間後も継続して細胞の機能変化をタンパク質発現レベルで明らかにし、全く新しいテラヘルツバイオロジー技術の確立を目指す。生体にテラヘルツ波を照射して組織レベルでイメージングを行う研究は最近数年の間に世界中で熾烈な競争が繰り広げられるようになってきた。しかし、幹細胞にテラヘルツ波を照射し、細胞内光受容体を刺激して細胞の増殖・分化を制御するというアイデアは世界的にも全く例が無い。本研究が成功した場合は、生命科学研究の進展、我が国における光学と生物学の融合研究の促進、さらには製薬企業や再生医療産業を主とするバイオベンチャーの創薬力強化など極めて大きな意味を持つ。

3. 研究の方法

本研究では、水分子に吸収されることなくテラヘルツ波を直接細胞に照射するために、メタマテリアルによる表面プラズモン共鳴を利用したテラヘルツ波増強基板の応用を考慮したシステムを構築する。すなわち、倒立顕微鏡の背面からレーザー光を入射し、自動ターゲットに装着したダイクロイックミラー (Dichroic mirror: DM) でステージ上のサンプルに向けてレーザー光を直角に屈折させ、テラヘルツ波増強基板上に播種した細胞に効率よくレーザー光を照射できるシステムとする (図1)。

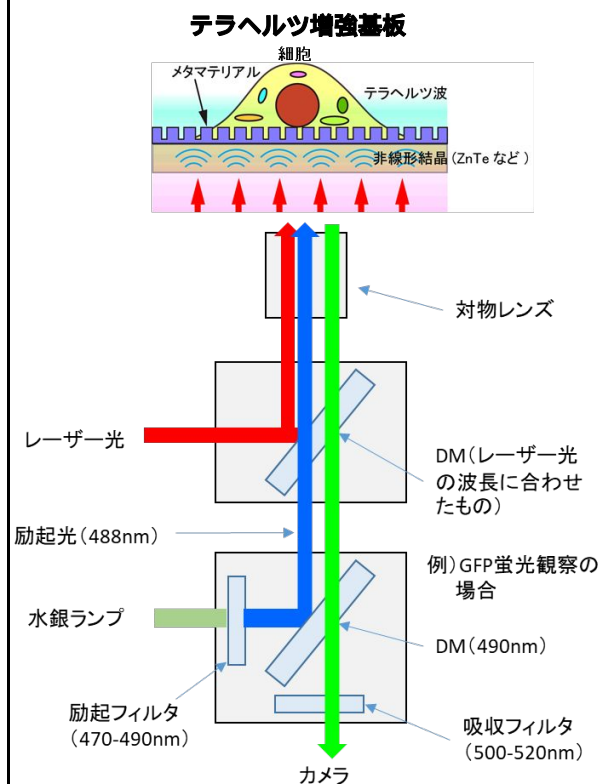


図 1. 本研究で開発するテラヘルツ波照射システム

金や銀のような金属の表面に可視～近赤外の光を照射すると、金属表面の自由電子が集団的な縦波振動を起こす。これが表面プラズモン共鳴現象で、表面プラズモンが励起されると金属表面の近傍には極めて強く増強された電場が生成される。この現象を用いると、光電場を入射光の強度よりも数百から数万倍高める事ができる。しかし、一般にテラヘルツ波領域では、金属の分散特性のため表面プラズモンを励起することができず、その電場増強効果も利用できなかった。この問題を解決する手段として、金属の表面に波長より細かくてアスペクト比の大きい凹凸構造を作製すると、実効的な金属の誘電分散特性が変化し、テラヘルツ波領域においても表面プラズモンを励起できるという研究結果が報告されている。研究分担者・田中はこれまでこのプラズモンを効率良く励起・保持できる金属微細構造の設計とその加工法の開発を行ってきた。本研究では、この技術を細胞の培養基板に適用し、テラヘルツ波を効率良くかつ高い強度で発生できるテラヘルツ波増強基板の応用を視野に入れたシステムを開発する。

また、本研究ではテラヘルツ波を発生させるためにテルル化亜鉛 (ZnTe) や 4-dimethylamino-N-methyl-4-stilbazolium tosylate (DAST)、N-benzyl-2-methyl-4-nitroaniline (BNA) などの非線形結晶をメタマテリアル材料として用いるが、これらの結晶の細胞適合性は不明である。そこで本研究では、これらの結晶を種々の濃度で iPS 細胞や骨髄間葉系細胞と共培養し、細胞毒性評価を行う。

4. 研究成果

37・5%CO₂環境下で培養中の1細胞に対してテラヘルツ波を照射するための光照射システムを構築し、1細胞レベルまたは2-3μmまでの大きさで、テラヘルツ波増強基板材料(非線形結晶)に対してピンポイントで光照射を行えるシステムを構築した。さらに、このシステムはタイムラプス測定および蛍光観察が測定できる仕様とした(図2)。

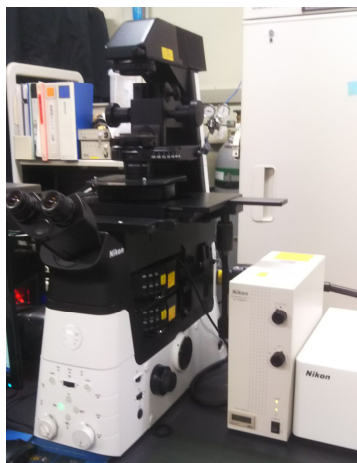
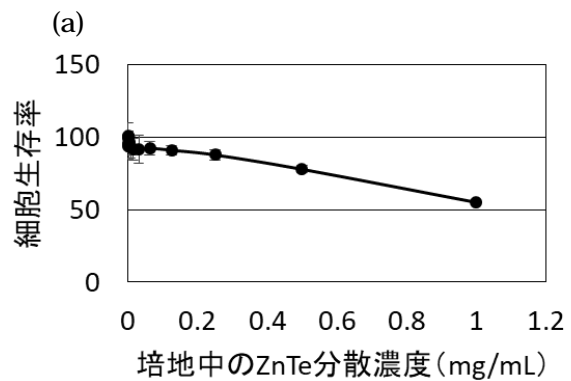
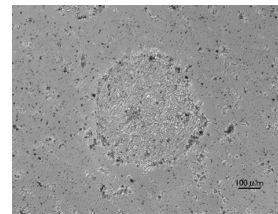


図2. 本研究で開発した照射システム

さらに、テラヘルツ波増強基板材料(非線形結晶)の1つであるテルル化亜鉛 (ZnTe) の細胞適合性試験を実施した。対象としてヒト iPS細胞を用い、種々の濃度でZnTeを細胞培養用培地に分散させ、24時間培養を行った。その結果、ZnTeが0.25mg/mLまでは細胞毒性は認められなかったが、それ以上の濃度になると細胞生存率が減少した(図3(a)(b))。また、ZnTeが0.25mg/mLの時は、iPS細胞の未分化マーカーであるOct3/4やNanogも発現していた(図3(c))。骨髄間葉系細胞でも0.25mg/mLまではZnTeの細胞毒性は認められなかった。現在、非線形結晶存在下でも長時間に細胞が生存できることを確認するため、CytoSMART 2 Systemを購入し、タイムラプス撮影を試みている。



(b)



(c)

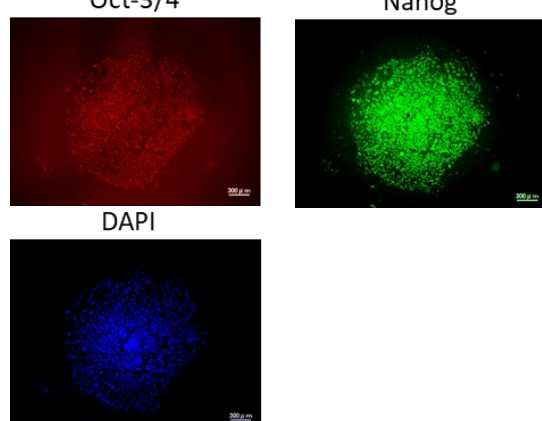


図3. (a) テルル化亜鉛 (ZnTe) を種々の濃度で培地中に分散させた場合のヒト iPS 細胞の生存率
(b) 0.25mg/mL の ZnTe(写真中の黒い点)を分散させた培地中でのヒト iPS 細胞の培養写真
(c) 0.25mg/mL の ZnTe を分散させた培地中でのヒト iPS 細胞の未分化マーカー染色写真

本研究期間はわずか2年間であったが、これらの研究成果が示すようにテラヘルツ波照射システムの構築とテラヘルツ波増強基板材料（非線形結晶）の細胞毒性評価を行うことができた。今後は、本研究で開発したテラヘルツ波照射システムを用いて、細胞培養液中に存在するテラヘルツ波増強基板材料（非線形結晶）に対して近赤外光を照射し、細胞近傍でテラヘルツ波を発生させることを試みる。本研究内容はこれまでに類を見ない挑戦的研究内容であり、本研究成果のような萌芽が見られたことは、今後のテラヘルツバイオロジ技術の確立にむけて大きな前進であると考えている。

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1件)

Toshihiro Kushibiki, Miya Ishihara.
Biological function of Low reactive Level Laser Therapy (LLLT).
Photomedicine. Chapter 11:197-213, 2017.

〔学会発表〕(計3件)

櫛引俊宏. Low dose Photodynamic Therapy による骨芽細胞分化促進作用. 第37回日本レーザー医学会総会. 2016
櫛引俊宏. 光医療の普及を目指した医療機器開発. 第5回医師主導による医療機器開発のためのニーズ創出・事業化支援セミナー(招待講演). 2017
櫛引俊宏. 光医学の現状と未来. 第59回比較統合医療学会大会(招待講演). 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫛引 俊宏 (KUSHIBIKI, Toshihiro)
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授
研究者番号：30403158

(2)研究分担者

田中 拓男 (TANAKA, Takuo)
理化学研究所・光量子工学研究センター・チームリーダー
研究者番号：40283733