

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06228

研究課題名(和文)全光学的手法による非接触・非侵襲な生体機能の電場制御技術の開発

研究課題名(英文) Non-contact and non-invasive manipulation of biological functionalities using all-optical method

研究代表者

廣理 英基(Hirori, Hideki)

京都大学・化学研究所・准教授

研究者番号：00512469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：人工多能性幹細胞(hiPSC)に対するテラヘルツ光照射の影響を研究するために利用される新しい実験技術を確立しました。hiPSCを培養するために微細加工されたマイクロウェルディッシュを利用することにより、異常な形態学的変化なしにhiPSCにテラヘルツ光を継続的に照射することができることを確認しました。グローバルな遺伝子発現解析のRNAシーケンスにより、テラヘルツで調節された遺伝子の多くはジンクフィンガータンパク質(ZFN)の転写因子であることがわかりました。これらの結果は、テラヘルツ電場はZn<sup>2+</sup>などの金属イオンの細胞内濃度変化を誘起することを示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにテラヘルツ光パルスが、生細胞の非侵襲的操作の生物医学的応用に利用されています。本研究では、環境に敏感な人工多能性幹細胞(hiPSC)に高強度な電場パルスであるテラヘルツ光パルス励起を適用し、亜鉛フィンガー(ZNF)転写因子に関連する遺伝子発現ネットワークを操作できることを発見しました。ここで構築したテラヘルツ光パルス照射装置による非侵襲的な細胞操作方法は、基本的な幹細胞研究と生物医学的アプリケーションの両方に向けた、細胞の電磁制御の新しいアプローチになることを示しました。

研究成果の概要(英文)：We establish a setup utilized for studying the effects of THz light irradiation on human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). By utilizing a microfabricated micro-well dish for culturing hiPSCs, we are able to continuously irradiate THz light on hiPSCs without their abnormal morphological changes. RNA sequencing for global gene expression analysis reveals that many of THz-regulated genes are transcription factors of zinc finger proteins (ZFNs). These results imply that THz radiation results the intracellular concentration changes of metallic ions, such as Zn<sup>2+</sup>.

研究分野：テラヘルツ非線形分光

キーワード：高強度テラヘルツ 非線形分光 ライブセルイメージング 蛍光プローブ 分化誘導 細胞機能制御

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells; hiPSCs) は、生体外に於いても無限回の自己複製能とあらゆる組織細胞へ成りうる多分化能を有しており、再生医療や創薬への応用が期待されている。また、hiPSCs はヒト胚性幹細胞 (human embryonic stem cells; hESCs) と非常に近い性質を持っており、受精卵を使用せずとも初期発生を研究することができる細胞材料としても、その重要度は高い。つまり、hiPSCs を用いることによって、化学的、または物理的な環境変化による初期発生への影響を、生体外に於いて研究することが可能になる。細胞や微生物等の生命の最小単位は脂質二重膜 (細胞膜) によって外界と個体を区別し、細胞膜内外の電位差を制御して代謝を維持して生きている。このため、細胞膜へ適切に電場を印加することにより細胞を制御できる可能性がある。これまでに電場印加によって幹細胞の分化を促せたとの報告もあり、生命科学においては電場効果を利用することと電場の効果を解き明かすことは重要な研究課題である。

申請者はレーザー光をベースとしたテラヘルツ光パルス発生に関する研究と、これを用いた固体材料の非線形応答に関する研究において実績を積んできた。そして、これまでの研究において 1MV/cm を超える高強度テラヘルツパルスを発生させることに成功している。この電場強度は、10 nm の電極間に 1V の電圧を印加したときに発生する値に対応する。通常、電気回路で電気パルスを発生させた場合よりも 2桁程度短いピコ秒( $10^{-12}$  秒)の時間幅であるため、試料を熱破壊させることなく高電場を印加することが可能である。習熟した高強度テラヘルツパルス発生技術をヒト人工多能性幹細胞などの生細胞へ応用すれば、その強電場で細胞の機能を非接触・非侵襲で制御できる可能性があると考えられる。これまでに、他の研究グループによって、マウス間葉系幹細胞においてテラヘルツが脂肪細胞分化に関連する遺伝子発現の上昇を報告した例がある。また、hESCs に関しては、テラヘルツ光はゲノム DNA に損傷を与えないが、ごく僅かな遺伝子群に関して影響を与えることなどが見出されてきた。しかし、これまでの研究ではテラヘルツ光パルスを集光していないために電場強度は弱い、また実際に細胞に印加される電場強度の値が不明であった。このため、遺伝子発現の変化についても、その理由が熱的な効果なのか、あるいは電場によって引き起こされる効果であるかなど未解明な部分が多かった。

### 2. 研究の目的

hiPSCs を様々な物理的 (力学的、電磁気学的) な刺激を加える方法が提案されている。これまでの研究では、細胞へ電極を穿刺して電場・電流を印加して分化誘導を制御する手法なども行われている。本研究は、高強度テラヘルツパルス発生技術を活かして hiPSCs の持つ機能性の『非破壊・非接触・非侵襲的な電場による制御』を実現する技術の開発を行うことを目的として実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 図1に示すように、瞬間的なテラヘルツ光パルスの照射によって、時々刻々変化する細胞動態を観察するための共焦点蛍光顕微鏡装置を構築した。本装置では、最大電場強度 0.3 MV/cm の高強度テラヘルツパルスを照射可能である。この電場強度は、30 nm の電極間に 1V の電圧を印加したときに発生する電場強度に対応する。幾何学的に制限された光学系であることなどから、小さな値となった。本装置に適合する、生細胞を維持するためのミニインキュベーターを開発した。本インキュベーター内部は温度を $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ 精度で、湿度 95%以上を保てるため、細胞にとって好適な条件を維持できる。一方で、高強度化を目指す予備実験として、金属構造により10倍の高強度化が可能であることを確認した。

(2) インキュベーターに生きた hiPSCs を設置し、テラヘルツ光パルス照射実験を行った。本研究で開発したテラヘルツ光パルス照射装置は、細胞に対して直径 1 mm の範囲で照射することが可能である。しかし、通常の細胞培養ディッシュは、直径 20-30 mm であり、テラヘルツ波が照射された細胞のみを回収することが難しい。そこで、本研究ではテラヘルツ照射実験のために、新しい細胞培養ディッシュを製作した。本ディッシュには、直径 1 mm 程度の穴が 4 つ作製しており、その中においてのみ細胞を培養することができる。

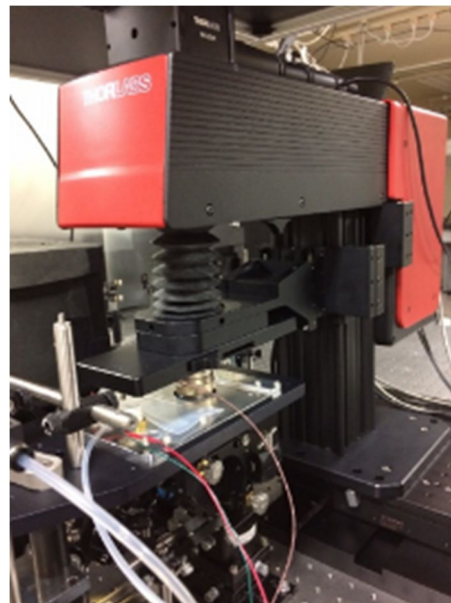


図1 開発した高強度テラヘルツパルスを照射可能な共焦点蛍光顕微鏡装置

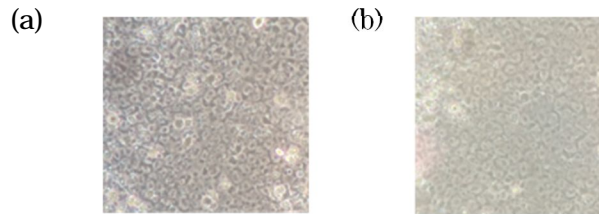


図2 テラヘルツ波照射前後の hiPSCs の光学顕微鏡像 (a)照射前、(b)照射後 共に一辺 200  $\mu\text{m}$  の領域の観察結果である。

(3) 本ディッシュの各穴内に、hiPSCs に最適化された細胞外マトリックスをコーティングし、その後 585A1 hiPSCs 播種した。培養液に mTeSR-1 を使用して 1 日間培養を行い、ディッシュの各穴の底に hiPSCs が成長するまで待った。

テラヘルツ光はディッシュに設けられた穴の一つに集光照射した。照射時間は一時間であり、テラヘルツ光を照射した細胞をサンプルとし、同一ディッシュ内のテラヘルツ光は全く照射されていない別の穴の中の細胞を比較対象サンプル (negative control) とした。

テラヘルツ光照射 1 時間後細胞を光学顕微鏡で観察したところ、細胞の形態に大きな差は確認できず、通常の hiPSCs のコロニーを形成していた (図 2)。また、細胞死による浮遊細胞に関しても大きな差は確認できなかった。これらより、hiPSCs は好適な条件が維持されたままテラヘルツ光電場を印加できたことがわかり、細胞に損傷を与えていないことが確認できた。

(4) RNA 発現解析を行うために、照射した細胞から RNA を精製した。テラヘルツ光照射した穴に生育している細胞のみを回収した後、同一ディッシュ内のテラヘルツ光が照射されていない穴で生育している細胞を回収し、両者を薬剤で細胞破碎した後にスピナラムで精製した。回収した RNA を用いて RNA-seq を行った。RNA-seq において確認された RNA の中で、hiPSCs の未分化・分化に関連する 88 種の遺伝子に関して解析を行った。その結果、テラヘルツ光照射は、これらの遺伝子に関して大きな影響を与えないことが確認できた。次に、それ以外の全ての遺伝子に関して解析を行った。まず、Volcano Plot を用いてテラヘルツ光照射によって発現の増減する遺伝子を同定した。その結果、99 遺伝子の発現が増加し、126 遺伝子が減少していることが確認できた。それらの遺伝子を階層的クラスタリングした。これらの遺伝子を基に、hiPSCs の自己複製時においてテラヘルツ光照射が細胞内遺伝子ネットワークに与える影響について調べるために、Gene Ontology (GO) 解析を行い、関連する遺伝子が最も多いものから 11 個の GO term を抽出した。

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒトの初期発生に関する研究が可能な生きた hiPSCs に高強度テラヘルツ光を照射可能な装置を開発し、非破壊・非接触・非侵襲的に 0.3MV/cm の電場を印加する実験を行った。そして、hiPSCs に対するテラヘルツ光波の効果と作動メカニズムを、遺伝子ネットワークの変動を基に解析した。テラヘルツ光照射によって、hiPSCs コロニーや細胞の形態に変化は生じなかった。細胞においてその形態は表現系を評価するために非常に重要な因子であり、hiPSCs においても同様である。

テラヘルツ光照射を照射して、hiPSCs の多能性に関する遺伝子の変化について評価を行った。その結果、関連する 88 種の遺伝子ではその発現に変化はなかった。これは、1 時間のテラヘルツ光照射が未分化維持環境においては、分化を誘導することはないことを示している。網羅的遺伝子解析の結果、ミトコンドリアのタンパク質翻訳や非コード RNA 代謝に関連する遺伝子発現ネットワークがテラヘルツ光照射によって活性化されることが分かった。中でも、最大の発現上昇を示した遺伝子である *GEMIN7* は、mRNA のスプライシングや運動ニューロンの生存に加えて、筋萎縮性側索硬化症や脊髄性筋萎縮症に関与することが報告されている。このことから、テラヘルツ光照射によって誘起される hiPSC の神経細胞への分化を観察する事は興味深いと考えられる。さらに、ミトコンドリアのタンパク質翻訳に関連するヒスチジル tRNA 合成酵素をコードする遺伝子である *HARS* も顕著な発現上昇が認められ、テラヘルツ光照射によるミトコンドリア機能制御の可能性が示唆された。

また、有糸分裂前中期や、DNA を鋳型にした転写に関するネットワークが抑制されていることが確認できた。興味深いことに、これらの遺伝子は細胞周期の中の有糸分裂に関与しており、テラヘルツ光照射が hiPSCs において、G2/M 期で細胞周期の停止を引き起こす可能性が示唆された。加えて、胎児の心管形成、神経上皮細胞分化、表皮細胞分化の遺伝子発現が減少していることも見出した。この結果は、テラヘルツ光照射が細胞分化を阻害し、hiPSC の分化能を維持する可能性が示唆された。

さらに、発現上昇・発現減少した遺伝子の上流の転写因子を解析したところ、ZFP37, ZNF627, ZNF263 など、 $\text{Zn}^{2+}$  イオンによって制御される転写因子が多数見出された。転写因子を制御する金属イオンは鉄や銀なども知られているが、 $\text{Zn}^{2+}$  は生体内に最も豊富に存在する微量金属の一つであり、最も数多くの転写因子を制御している。現在までに、テラヘルツ光照射によって

誘起される遺伝子の変化として、DNA の構造を緩めて転写を活性化する機構が1つの可能性として提唱されているが、この機構では遺伝子発現の減少は説明できない。一方で、本研究の結果では発現上昇・減少の双方の遺伝子が見出されている。このことから、先に挙げた遺伝子ネットワークは、テラヘルツ光の高電場によって、局所的な  $Zn^{2+}$  が移動し、濃度変化によって制御される可能性が高いと考えられる。

以上のように、高強度テラヘルツ光波の照射実験と遺伝子解析によって、hiPSCs の多能性を損なうことなく機能を制御できる可能性が示された。また、テラヘルツ光波によって誘導された遺伝子変化は熱的効果ではなく電場効果であることを強く示唆する結果を得ることに成功した。今後テラヘルツ光の強度を高強度化することにより、さらに広範な遺伝子種の変化を調べることができる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sanari Yasuyuki, Tachizaki Takehiro, Saito Yuta, Makino Kotaro, Fons Paul, Kolobov Alexander V., Tominaga Junji, Tanaka Koichiro, Kanemitsu Yoshihiko, Hase Muneaki, Hirori Hideki	4. 巻 121
2. 論文標題 Zener Tunneling Breakdown in Phase-Change Materials Revealed by Intense Terahertz Pulses	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physical Review Letters	6. 最初と最後の頁 165702(6 pages)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevLett.121.165702	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 K. Uchida, T. Otobe, T. Mochizuki, C. Kim, M. Yoshita, K. Tanaka, H. Akiyama, L. N. Pfeiffer, K. W. West, and H. Hirori	4. 巻 97
2. 論文標題 Coherent detection of THz-induced sideband emission from excitons in the nonperturbative regime	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PHYSICAL REVIEW B	6. 最初と最後の頁 165122-1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevB.97.165122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Polat Onur K., Uno Masatoshi, Maruyama Terukazu, Tran Ha Nam, Imamura Kayo, Wong Chee Fah, Sakaguchi Reiko, Ariyoshi Mariko, Itsuki Kyohei, Ichikawa Jun, Morii Takashi, Shirakawa Masahiro, Inoue Ryuji, Asanuma Katsuhiko, Reiser Jochen, Tochio Hidehito, Mori Yasuo, Mori Masayuki X.	4. 巻 30
2. 論文標題 Contribution of Coiled-Coil Assembly to Ca <sup>2+</sup> /Calmodulin-Dependent Inactivation of TRPC6 Channel and its Impacts on FSGS-Associated Phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1681/ASN.2018070756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Qian Nianchao, Ichimura Atsuhiko, Takei Daisuke, Sakaguchi Reiko, Kitani Akihiro, Nagaoka Ryohei, Tomizawa Masato, Miyazaki Yuu, Miyachi Hitoshi, Numata Tomohiro, Kakizawa Sho, Nishi Miyuki, Mori Yasuo, Takeshima Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 TRPM7 channels mediate spontaneous Ca <sup>2+</sup> fluctuations in growth plate chondrocytes that promote bone development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaaw4847-4847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1126/scisignal.aaw4847	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi
2. 発表標題 Development of Intracellular Thermosensors for the Understanding of Energy Production in Mitochondria
3. 学会等名 The 9th International Symposium of Advanced Energy Science, (Kihada Hall, Uji Obaku Plaza, Kyoto University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂口 怜子, et al.
2. 発表標題 二光子励起リン光寿命イメージングによる腫瘍深部酸素濃度の非侵襲的定量
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Reiko Sakaguchi, Seiji Tobita, Yasuo Mori
2. 発表標題 Non-invasive, quantitative visualization of oxygen environment deep inside tumor spheroids by 2-photon excitation phosphorescence lifetime imaging.
3. 学会等名 第5回低酸素研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	坂口 怜子  (Sakaguchi Reiko)  (80723197)	京都大学・工学研究科・助教    (14301)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	亀井 謙一郎 (Kenichiro Kamei) (00588262)	京都大学・高等研究院・准教授  (14301)	
研究協力者	立崎 武弘 (Tachizaki Takehiro) (20632590)	東海大学・工学部・講師  (32644)	