

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年10月3日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18879

研究課題名(和文)超狭帯域発光ダイオードによる細胞光エンジニアリング

研究課題名(英文)Cell-photon engineering with ultra-narrow-band LEDs

研究代表者

藤田 静雄(Fujita, Shizuo)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：20135536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞に光を照射することで、細胞の働きを活性化また抑制することを目指した研究を行った。本研究では、ヒト線維芽細胞からコラーゲンが生成される過程に着目し、光照射によりそれが活性化されることを仮定してその実証実験を行った。光源として発光スペクトルの半値幅が異なる各種の赤色発光ダイオードを用い、光照射後にコラーゲン生成をもたらすmRNAおよび蛋白質の量を分析した。その結果、半値幅を20nm以下に狭帯域化した光照射によってコラーゲン生成が活性化されることを見出した。あわせて、今後の応用につながる狭帯域光源の技術について提言した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の活動が光照射により直接的な影響を受けることが示唆され、今後様々な細胞活動に対してそれを光照射によって制御する「細胞光工学(エンジニアリング)」の萌芽につながると考えられる。細胞と光のかかわりは、視神経のように光受容性を目的とする細胞に特有な減少と考えられてきたが、線維芽細胞のようにもともと光受容性を目的としない細胞にあっても光照射効果があることは学術的に新規性の高い知見である。細胞活動の制御というと、薬品や遺伝子の導入などが手段として行われているが、光照射というより自然な手法を用いることで、薬剤を使わない治療や細胞増殖などに社会的な貢献をなすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This research aimed at enhancing or suppressing cell activity by light irradiation. The interest was focused on generation processes of collagen in human fibroblasts, and the experiments have been conducted to prove the enhanced generation by light irradiation. Red light emitting diodes with different half-widths of the emission spectra were used as an irradiation source, and the amount of mRNAs and proteins which leads the collagen-generation was analyzed. The results indicated the enhanced generation of collagen under the light irradiation at the narrowed spectra having the half-widths of smaller than 20 nm. In addition, we proposed promising technology for narrow-band light sources contributing to future extension of this research.

研究分野：半導体工学、光応用工学、光デバイス

キーワード：超狭帯域光 発光ダイオード 細胞 蛋白質

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の活動、例えば分裂、分化、蛋白質の合成・分泌といった過程は生命活動における基本である。身近なところでは、毛母細胞の分裂は毛髪成長を促し、表皮細胞の増殖が創傷治癒につながり、線維芽細胞からのコラーゲン生成が皮膚の浸潤を与える、といったことが医学の専門家でない者にも実感できる点である。しかし仮にこれら細胞の活動が抑制されると、脱毛、創傷治癒の長期化、皮膚の乾燥、といった現象につながる。ヒトの老齢化につれてこのような細胞活動の劣化につながるもので、それを防ぎ細胞の活動を活性化させるために薬を用いるということは、これも身近に経験するところである。細胞の活動を制御する（活性化する、抑制する）ために薬や遺伝子導入を行うことは通常化しているが、細胞に刺激を与えるより自然な方法はないものかというのが、本研究の着想に至った動機である。その方法として光照射を考えた。

細胞と光との関りは、視神経のように光受容性を目的とする細胞に特有な現象と考えられてきたほか、紫外線のようにエネルギーの高い光による細胞の変性（日焼けや癌化など）が知られている。しかし、可視光のように比較的エネルギーが低く、強度も弱い光に対する反応はあまり注目されてこなかった。一方で、2010年前後から、半値幅の狭い可視光の皮膚への照射が毛髪再生や創傷治癒に効果があることが報告され、細胞から特定の蛋白質分泌が増すことも示された。これは、光照射による細胞活動の制御を示唆するが、工学的な観点から光源の設計や最適化を含めた研究が望まれていた。

### 2. 研究の目的

細胞への光照射により、細胞の活動がどのように影響を受けるのかを、mRNA および分泌される蛋白質の変化から調べる。従来の研究において報告されている、半値幅が 20 nm 以下の光が望ましいという知見をもとに、照射する光の波長や半値幅の影響に着目する。この結果から、光照射を細胞工学における「人工的操作」とする「細胞光エンジニアリング」の萌芽を図ることを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) いうまでもなく細胞活動にはさまざまなものがあることから、光照射により細胞活動に効果的に寄与すると期待される研究対象について、文献調査や研究調査を行い本研究で対象とする細胞活動について検討した。その結果、ヒト線維芽細胞に赤色光を照射し、ヒアルロン酸およびコラーゲンが生成するという活動に注目することにした。この活動は、加齢とともに衰え、治療薬も多くある。しかし、線維芽細胞は表皮の内側にある真皮に存在するため、治療薬を皮膚に塗布しても表皮を浸透して真皮に達することが限定されているという問題がある。しかし、赤色光は皮膚の表面から 3mm 程度浸透するため、真皮に達して線維芽細胞を刺激することができる。よって、これを研究の対象とすることは、皮膚医学的な観点で価値のあることだと考えた。

(2) 照射する光源の基本的な特性とそれを得るための光学系の設計、それに基づく光源の試作を行った。本研究の展開を考えるとヒトへの照射となるため、照射光強度については、普段の活動において経験している強度が望ましいと考え、おおむね  $0.2\sim 0.3 \text{ mW/cm}^2$  とすることを考えた。表 1 に実験に用いる光源のスペックを示す。

光源のソースには市販の LED を選び、中心波長が同一のものを選択した。LED からの照射光を干渉フィルタを用いて半値幅を 3 または 20 nm とする。単純には半

表 1 光源のスペック。

	中心波長	半値幅	強度
LED1	634.6 nm	3 nm	0.2~0.3 mW/cm <sup>2</sup>
LED2		20 nm	

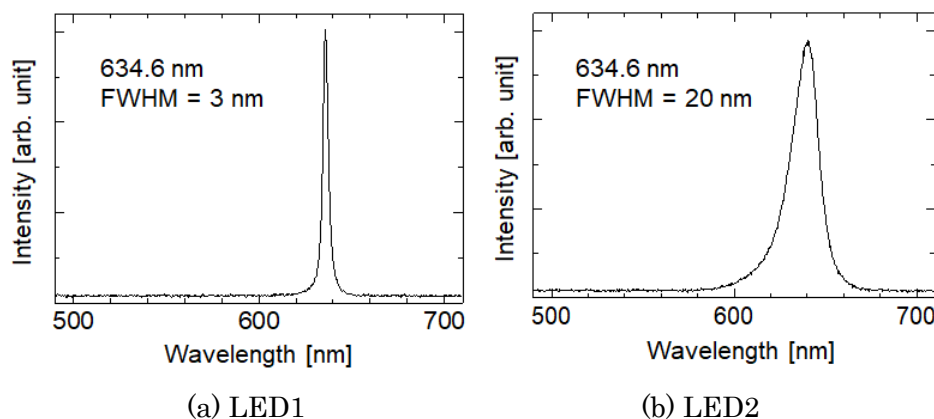


図 1 実験に用いた光源のスペクトル。

値幅が狭くなるほど光強度が減少するため、光学系を工夫して半値幅によらずほぼ同一の強度が得られるようにした。図 1 に光源のスペクトルを示す。

(3) 市販の正常ヒト成人由来皮膚線維芽細胞を培地中で拡大培養し、凍結細胞をストックした後、35mm シャーレで培養して、シャーレの底面から LED 光を照射した。照射後、シャーレはホットプレートを用いて 37°C に保ち、定めた時間後に培養上清をサンプリングし、ELISA でヒアルロン酸、Pro-collagen 量を定量的に測定した。さらに、コラーゲン生成に着目し、光照射を終えたヒト成人由来皮膚線維芽細胞から RNA を抽出し、cDNA を合成した。そして、Real-time PCR により、9 遺伝子 (ACTB、COL1A1、COL1A2、TGFB1、TGFB1、TGFB2、IL4R、IL13RA1、IL13RA2) の mRNA (cDNA) を測定した。光照射と細胞サンプル回収のタイミングを図 2 に示す。

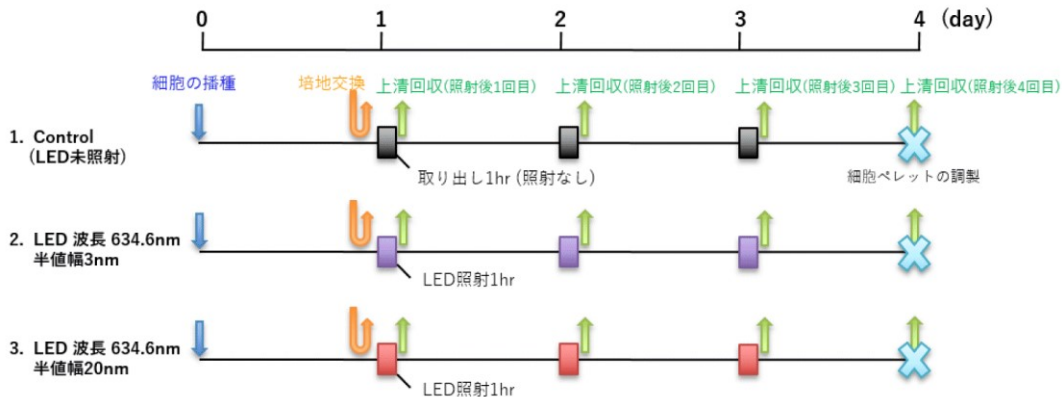


図 2 光照射と細胞サンプル回収のタイミング。

#### 4. 研究成果

(1) 図 3 に、光照射後 ELISA 測定によって得られたヒアルロン酸濃度を示す。照射後、1~4 日後にわたり測定を行った。図に示すように、ヒアルロン酸の生成については、control (光照射なし) の場合と LED 光照射を行った場合とに顕著な差は見られなかった。つまり、正常ヒト成人由来皮膚線維芽細胞からヒアルロン酸の生成に関しては、LED 光照射の効果は認められなかった。

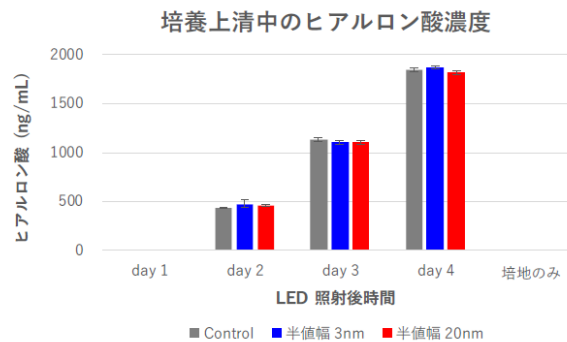


図 3 ELISA 測定により得られたヒアルロン酸濃度。

(2) 図 4 に、光照射後 ELISA 測定によって得られた Pro-collagen (PIP)濃度を示す。培養に使用した培地 (細胞の培養を行っていないもの) 中に、PIP は検出されなかった。Control、LED 半値幅 3nm、LED 半値幅 20nm のものともに、培養期間が長くなるとともに PIP 濃度が上昇した。Control においてもその上昇が見られたことから、時間経過とともに細胞から産生され蓄積した PIP を示すと考えられた。この結果から、時間とともに線維芽細胞の Pro-collagen 産生が促進されていることが示唆された。

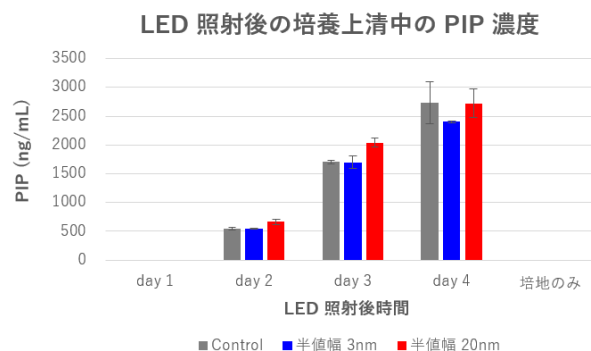


図 4 ELISA 測定により得られた Pro-collagen 濃度。

LED 照射を行ったものでは、半値幅 20nm のもので、照射 2 日後 (day 2)、照射 3 日後 (day 3) において Control に比べて PIP

濃度が高かった（ともに 1.2 倍）。ただし、day 4 においては、Control の間で明確な PIP 濃度の違いは見られなかった。一方、半値幅 3nm のものでは、基本的には Control に比べて、PIP 濃度の顕著な変化は認められず、照射 4 日後（day 4）においてが control に比べて低かった。

表 2 プライマリーリスト。

物品名	フォワードプライマー配列 (5'→3')	リバースプライマー配列 (5'→3')
<i>ACTB</i>	GATGATGATATCGCCGCGCTC	CACCATCACGCCCTGGTGC
<i>COL1A1</i>	CAGGCTGGTGTGATGGGATT	GGGCCTTGTTACCTCTCTC
<i>COL1A2</i>	GGAAGAAGGGCTTCGTGGT	GCCAGGGAGACCCAGAATAC
<i>TGFB1</i>	TCCTGGCGATACCTCAGCAA	CGGTAGTGAACCCGTTGATGT
<i>TGFBR1</i>	CGGGGAGAAGAAGTTGCTGT	CACCAACCAGAGCTGAGTCC
<i>TGFBR2</i>	TCGCTGTAATGCAGTGGGAG	GTCCAGCACTCAGTCAACG
<i>IL4R</i>	TGGCACAACCTCTACAGGGA	CACTGTGACCCCTGAGCATC
<i>IL13RA1</i>	GACCAAAGTGAAGGATTCCAGT	TGTGGATTCTCCCATTGCACA
<i>IL13RA2</i>	AATGCTGGGAAGGTGAAGACC	GCTTACGCAAAAGCAGACCC

(3) LED 照射を終えた細胞ペレットから、FastGene RNA Premium Kit を用い、total RNA を抽出した。抽出は、キット記載のスタンダード・プロトコールに従って行った。100ngRNA を鋳型とし、Oligo (dT) プライマー、ReverTra Ace を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とし、SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix、標的遺伝子に対し、表 2 に示す特異的なプライマーを用い、real-time PCR を行った。並行して、濃度（分子数）既知の PCR 産物の希釈系列についても real-time PCR を行い、検量線を作成した。その検量線に基づき、各遺伝子 mRNA (cDNA) の分子数を測定し、ACTB に対する相対分子数 (ACTB 比) を算出した。

図 5 は、COL1A2、IL13RA2 の mRNA 発現量 (ACTB 比) である。半値幅 3nm の LED 照射により、これら mRNA の発現量が増加していることが分かる。また、図 5 は、TGFB1 (TGF-β)、TGFBR1、TGFBR2 の mRNA 発現量 (ACTB 比) である。これらについても、半値幅 3nm の LED 照射により上昇する可能性が示された。

(4) 以上の結果、赤色 LED 光の照射により、正常ヒト成人由来皮膚線維芽細胞の活動が影響を受けていることがわかった。ヒアルロン酸の産生については顕著な効果が見られなかった一方で、コラーゲンの生成に影響をもちることが示唆された。他方、光照射後の mRNA 測定において、半値幅 3 nm の狭帯域赤色光により PIP の産生を示唆する mRNA が著しく増加することが見いだされた。

しかしながら、ELISA 測定と mRNA 測定の相関を得ることはできなかった。また、ELISA 測定によると、一過的 (day 2~3) に PIP の産生が上昇する傾向が示されたものの、day 4 では Control と同程度の値となった。今後、LED 照射条件を変える、試行回数を増す、培地を選定 (培地に血清を含まないものを用いる) する、といった実験上の工夫が必要である。

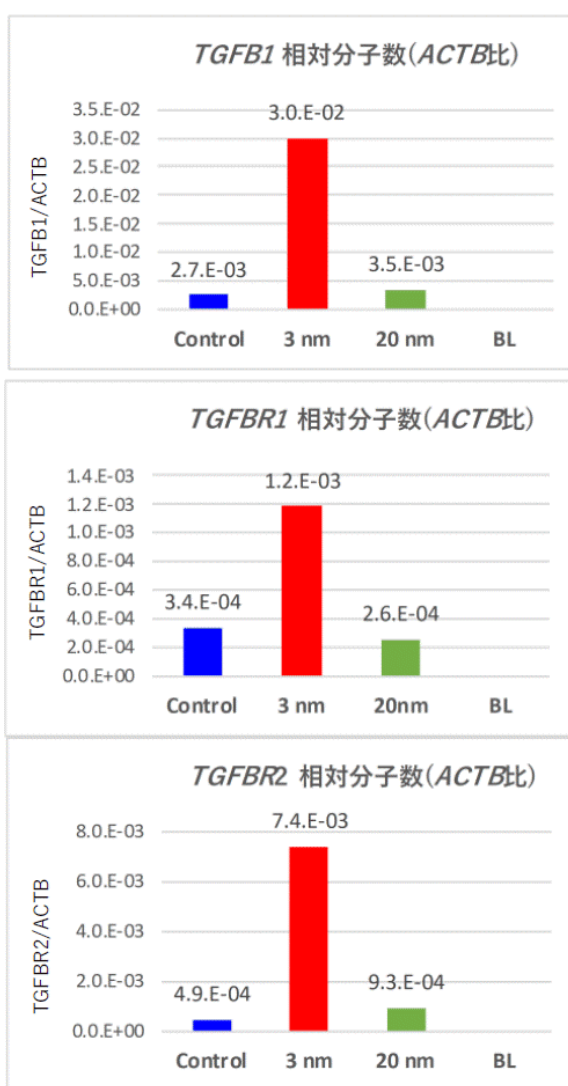


図 5 TGFB1 (TGF-β)、TGFBR1、TGFBR2 の mRNA 発現量 (ACTB に対する相対分子数 (ACTB 比))。

(5) 本研究では、赤色 LED を光源にして干渉フィルタにより狭帯域化した。しかし、応用の観点で皮膚の広い面積にわたり照射を行おうとすると、多数の光源が必要である。ところが、発光ピークが同一で半値幅を 3 nm 程度に狭帯域化した多数の光源を揃えることには困難さがある。発光ピークは素子により微妙なばらつきがあり、また温度によっても変化するためである。一方、大阪大学の藤原教授のグループでは、Eu 添加 GaN をベースとした LED により、Eu からの半値幅の狭い発光を得ている。これは、Eu 原子 (Eu<sup>3+</sup>イオン) からの発光であるので、発光波長は Eu 原子のエネルギー準位により決まり、干渉フィルタを用いることなく単一波長で半値幅の狭い発光が得られる。例えば MRS Advances DOI: 10.1557/adv.2017.67 では、発光ピーク 622 nm、半値幅数 nm、出力 0.375 mW の狭帯域赤色光を直接 LED から得ている。この光を 1 cm<sup>2</sup> に集光すれば、本研究で用いた光強度を実現できる。また研究の進展により出力が増加している。このことから、Eu 添加 GaN をベースとした LED は細胞活動に効果を与える医療用 LED としての進展が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

本研究は萌芽段階であるため、雑誌論文、学会発表ともに 0 件である。本研究成果を踏まえた研究の推進により、発表論文、特許等につながると考えられる。

ホームページ等

<http://pesec.t.kyoto-u.ac.jp/ematerial/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：藤原 康文

ローマ字氏名：Yasufumi Fujiwara

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。