

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21687011

研究課題名（和文）

光技術を用いた細胞機能制御に関する研究

研究課題名（英文）

Regulation of cells function by light technology

研究代表者

櫛引 俊宏（KUSHIBIKI TOSHIHIRO）

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招へい准教授

研究者番号：30403158

研究成果の概要（和文）：

細胞が有する機能を非侵襲的に制御することは疾病の治療・予防にとどまらず、基礎生物学実験などにも有用なツールとなる。そこで、安全に細胞機能を制御する方法として光技術を応用することが本研究の目的である。本研究では波長 405 nm のレーザーを種々の細胞に照射した際に細胞内活性酸素種量が増加することを発見し、またそれに引き続いて NF- κ B および MAPK のリン酸化が亢進されていることを発見した。これらの結果は光技術を用いた細胞機能制御の一つのメカニズムであり、レーザー光を利用することで有用な細胞機能制御を行うことができる。

研究成果の概要（英文）：

The regulations of cells function by using noninvasive methods are the effective tools not only for treatment and prevent diseases but also basic biomedical researches. The objective of this research is the application of laser and light technology for the regulation of cells function. In the results, I found that intracellular reactive oxygen species were increased after laser (wavelength: 405 nm) irradiation, following NF- κ B and MAPK phosphorylation. These results suggest that the laser light is one of the effective tools for the regulation of cells function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
年度			
年度			
総計	19,800,000	5,940,000	25,740,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光、レーザー、細胞、機能制御、光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

現在、細胞機能の制御方法として、トランスジェニックやノックアウトをはじめとした遺伝子工学技術や薬剤添加による方法などが行われている。遺伝子や薬剤を利用した従来の方法に頼らず、再生医療に有望な幹細胞

などが有する機能を非侵襲的に制御することは疾病の治療・予防にとどまらず、基礎生物学実験などにも有用なツールとなる。そこで、安全に細胞機能を制御する方法として光技術を応用することが本研究の目的であ

る。これまでの結果として、骨髄から採取した間葉系幹細胞に 405 nm の GaN 系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、細胞内の光受容体や体内時計関連遺伝子の解析を行っている。本研究提案では、これまでに得られた結果をもとに、広範な領域の光を用いた細胞への“指示”とそのメカニズムの解明を行い、細胞機能制御技術のブレークスルーとなる光技術を創製・提案し、新パラダイムを見据えた独創的な研究を行う。本研究期間内では、上述の幹細胞分化制御の結果を踏まえ、レーザー光照射後の細胞内活性酸素種量の測定とタンパク質リン酸化を網羅的に解析し、細胞機能の制御メカニズムの解明を行う。本研究提案では、光技術を用いた細胞の機能制御を行う。一見、突拍子も無い技術の組み合わせのように見えるが、これまでに既存の分子生物学的手法では得ることのできない新しい知見を得る。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得られている結果を踏まえ、光に関わる新しい生命現象の解明、光の制御や光による物質の制御に関する新しい概念・手法の探求などに関して研究を進め、将来もたらされると期待される新パラダイムを見据えた独創的な発想に基づいた研究を行った。具体的には、本研究期間内に、レーザー光を用いて、細胞機能制御を行った。さらに光照射後のこれら作用メカニズムの解明について研究した。種々の細胞・組織の機能制御を光技術により行うことで疾病の治療・予防、基礎医学生物学実験への応用や幹細胞を用いた再生医療実現化へのブレークスルーとなる光技術を創製、提案する。なお、本研究は、米国ハーバード大学医学部およびマサチューセッツ総合病院内の Wellman Center for Photomedicine と連携して行い、国際的かつ学際的な研究を進めた。

3. 研究の方法

細胞に物理的負荷をかけずに、任意の光強度・波長を照射可能な既存の細胞培養装置は存在しない。そこで、新規ハイスルーポット光照射システムを開発した。図 1 の光照射用自動ステージに 96 well プレート装着させたスクリーニングシステムを用い、各種レーザー・光源を用いた細胞への照射を効率よく、かつ、光照射以外のストレス（液体培地温度

の上昇など）が細胞へ負荷しないシステムを活用した。



図 1. 本研究で使用する細胞への光照射システム。ファイバー導光したレーザー光を細胞培養プレート底面から照射できるように設計した。

本研究ではレーザー光に対する種々の細胞の応答性を解析するために、下記の 10 種類の細胞を用いた。

マウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1)、マウス軟骨前駆細胞 (ATDC5)、マウス筋芽細胞 (C2C12)、マウス骨髄間質細胞 (KUSA-A1)、マウス肺がん細胞 (LLC)、マウス膵β細胞 (MIN6: 大阪大学・宮崎純一先生より供与)、マウス線維芽細胞 (NIH-3T3)、ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa)、ヒト単球細胞 (THP-1) より分化させたマクロファージ様細胞、ラット好塩基性白血病細胞 (RBL-2H3) それぞれの細胞はこれまでの報告に従い、それぞれ適切な培地で継代培養を行った。

各々の細胞は、クリアボトム黑色 96 ウェルプレート (Microtest™ Optilux™ Plate, BD bioscience Inc.) を用いてウェル中に分散させた状態でレーザー照射を行った。本研究では、波長 405、664 および 808 nm (連続波) の半導体レーザーを用いた。照射パワー密度は 100 mW/cm^2 とし、60 または 120 秒間、細胞へ照射を行った。なお、レーザー照射中に培地の温度変化は観察されなかった。

レーザー光照射後の細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の測定は次のように行った。レーザー照射前に ROS プロブである CM-H₂DCFDA を $8.65 \mu\text{M}$ の濃度で 30 分間培地中に混合し、細胞内へ取り込ませた。リン酸緩衝液で洗浄後、クリアボトム黑色 96 ウェルプレートへ細胞分散液を添加し、上述と同様にレーザー照射を行った。レーザー照射直後に細胞を回収し、フローサイトメーターで細胞内の ROS 測定を行った。

レーザー照射後の種々のタンパク質リン酸化

化測定はパーキンエルマー社の AlphaScreen SureFire を用いて行った。すなわち、レーザー照射直後の細胞を回収し、細胞を溶解させた後、AlphaScreen SureFire 試薬を用いて種々のタンパク質のリン酸化に由来する蛍光を測定した。本研究で測定対象としたリン酸化タンパク質は、IKK α 、IKK β 、JNK、NF- κ B、MAPK とした。

4. 研究成果

波長 405、664 および 808 nm のレーザーを、60 または 120 秒間、種々の細胞に照射直後の細胞内 ROS 測定結果を示す。図 2 はマウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1)、図 3 はマウス軟骨前駆細胞 (ATDC5)、図 4 はマウス筋芽細胞 (C2C12)、図 5 はマウス骨髄間質細胞 (KUSA-A1)、図 6 はマウス肺がん細胞 (LLC)、図 7 はマウス膵 β 細胞 (MIN6)、図 8 はマウス線維芽細胞 (NIH-3T3)、図 9 はヒト子宮頸がん細胞 (HeLa)、図 10 はヒト単球細胞 (THP-1) より分化させたマクロファージ様細胞、図 11 はラット好塩基球性白血球細胞 (RBL-2H3) を用いた場合の結果である。各グラフの Y 軸は ROS プローブである CM-H₂DCFDA の蛍光強度を示し、X 軸は細胞の Electronic Volume (EV) を示している。

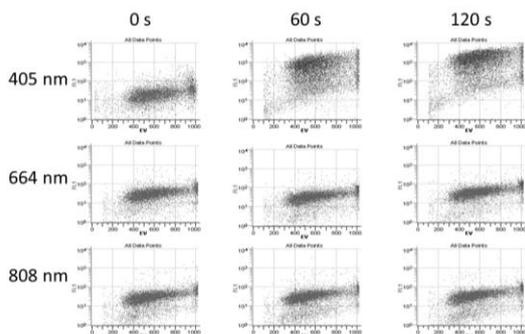


図 2. マウス脂肪前駆細胞 (3T3-L1) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

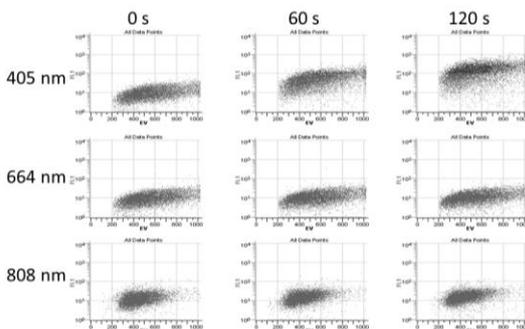


図 3. マウス軟骨前駆細胞 (ATDC5) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

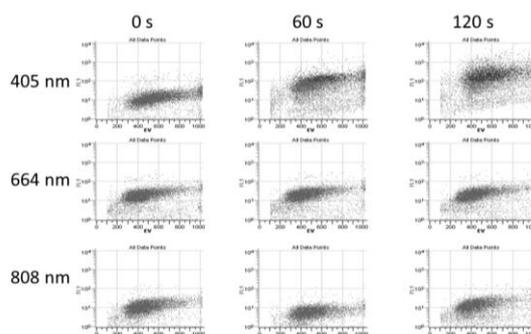


図 4. マウス筋芽細胞 (C2C12) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

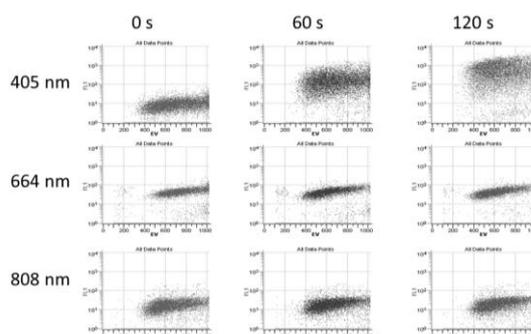


図 5. マウス骨髄間質細胞 (KUSA-A1) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

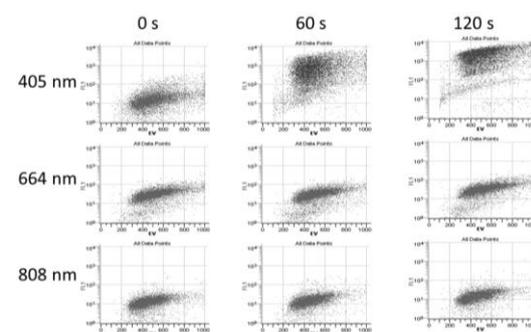


図 6. マウス肺がん細胞 (LLC) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

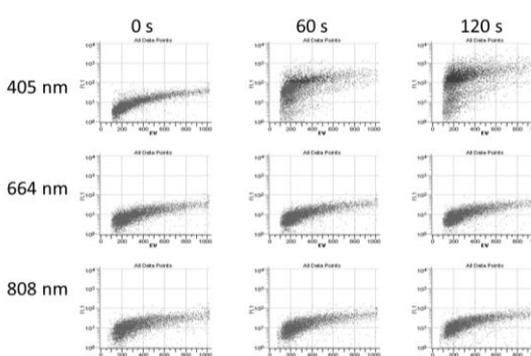


図 7. マウス膵 β 細胞 (MIN6) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

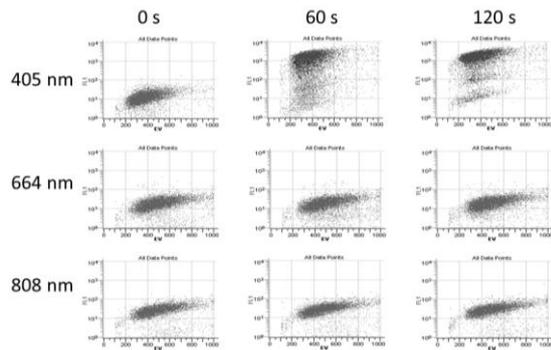


図 8. マウス線維芽細胞 (NIH-3T3) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

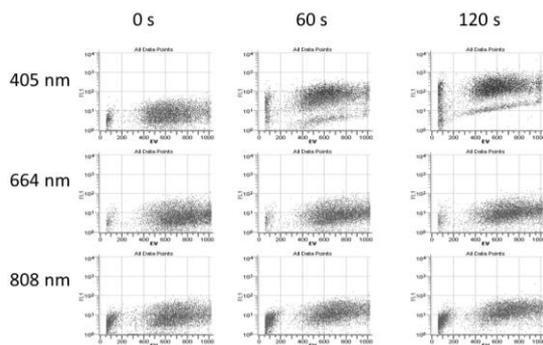


図 9. ヒト子宮頸がん細胞 (HeLa) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

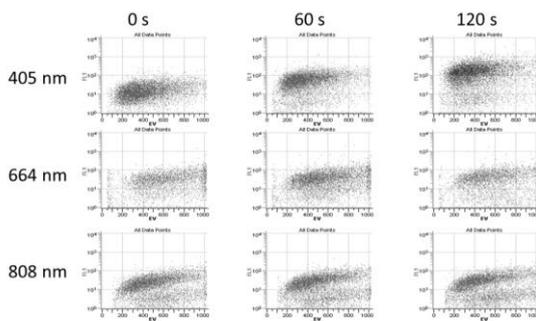


図 10. ヒト単球細胞 (THP-1) より分化させたマクロファージ様細胞にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

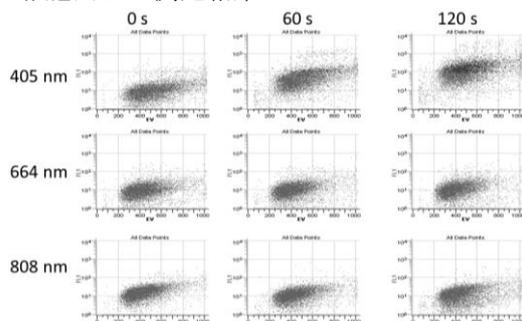


図 11. ラット好塩基球性白血病細胞 (RBL-2H3) にレーザー照射後の細胞内 ROS 測定結果

これらの結果、波長 405 nm のレーザーを細胞に照射した場合、全ての細胞種において細胞内の活性酸素種量が増加していることが明らかとなった。一方、波長 664 および 808 nm のレーザーを細胞に照射した場合、本研究の検出系では活性酸素種を検出することができなかった。

これまでにいくつかの活性酸素種または活性窒素種がミトコンドリアから核へのシグナル伝達に関与していると報告されている。それらは細胞内において、NAD または NADH、NADP または NADPH、グルタチオンまたは硫化グルタチオン、チオレドキシンまたは硫化チオレドキシンといった化合物と反応する。また、これらの活性種に対するいくつかのセンサー（代表的なものとしてスーパーオキシドジスムターゼ；SOD）が細胞内に存在している。細胞内で活性酸素種が発現すると、細胞は自身を防御するために種々の遺伝子発現制御を行う（それでも解決できない場合はアポトーシスを起こす）。特に細胞自身の増殖活性をコントロールするタンパク質が発現し、活性酸素種の有無やその量によって遺伝子発現が厳密に制御されており、活性酸素種がまるで細胞内のセカンドメッセンジャーとして振舞っている。また、活性酸素種が細胞機能を変化させることも報告されている。光照射によって細胞内で活性酸素種が発生する過程は未解明であるが、細胞内に存在する PPIX などの光受容体からのエネルギー遷移の関与も考えられる。

次に本研究では、細胞へレーザー照射後の各種タンパク質のリン酸化について検証を行った。その結果、波長 405 nm のレーザーを細胞に照射した後、NF- κ B および MAPK のリン酸化が亢進されていることが明らかとなった。この結果は本研究で用いたすべての細胞種で同様の結果となった。一方、波長 664 および 808 nm のレーザーを細胞に照射した場合、今回測定対象としたいずれのタンパク質もリン酸化していることが確認できなかった。

これらの結果から、波長 405 nm のレーザーを細胞に照射することで、細胞内の活性酸素種量が増大し、活性酸素が引き金となって NF- κ B および MAPK のリン酸化が亢進されていることが明らかとなった。NF- κ B および MAPK 自体も、多くのタンパク質発現を制御する因子であることから、これらの下流に存在するタンパク質発現をさらに詳細に解析することで、有効なレーザー光技術による細胞機能制御が可能であると考えられた。

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2件)

- ① Kushibiki T, Tajiri T, Tomioka Y, Awazu K. Photodynamic therapy induces interleukin secretion from dendritic cells. Int J Clin Exp Med. 査読有り, 3巻 p110-114, 2010年
<http://www.ijcem.com/files/IJCEM1002002.pdf>
- ② Kushibiki T. Photodynamic therapy induces microRNA-210 and -296 expression in HeLa cells. J Biophotonics. 査読有り, 3巻 p368-372, 2010年
DOI: [10.1002/jbio.200900082](https://doi.org/10.1002/jbio.200900082)

[学会発表] (計3件)

- ① 榎引俊宏、光技術を用いた新しい細胞機能制御法、第178回バイオを論じる会、2011年12月8日、防衛医科大学校
- ② 榎引俊宏、波長405nm光がおよぼす生物作用、第22回日本レーザー治療学会、2010年6月26、27日、神奈川県横浜市
- ③ 榎引俊宏、光がおよぼす生物作用、第20回日本光線力学学会、2010年6月11日-13日、福井県福井市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎引 俊宏 (KUSHIBIKI TOSHIHIRO)
大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招へい准教授
研究者番号：30403158

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：