

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25年4月9日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659345

研究課題名（和文）生理活性物質の細胞内移行及び細胞・核内分布動態のナノイメージング解析

研究課題名（英文）Nano-imaging analyses of intracellular transportation, and intracellular and intranuclear distributions of bioactive material

研究代表者

林 善彦 (HAYASHI YOSHIHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：20150477

研究成果の概要（和文）：

D-グルコサミンの細胞への取り込み状況を可視化するためカルボキシル化量子ドットと D-グルコサミンをアミド結合させ、培養骨芽細胞へ取り込ませた。3 時間程度で細胞膜への付着及び細胞質内への移行が観察された。その後、核内への移行はなく 7 日程度で細胞外への排出によると考えられる細胞内量子ドットの減少が観察された。

研究成果の概要（英文）：

The uptake of D-glucosamine hydrochloride into cultured osteoblasts was directly observed using D-glucosamine-conjugated carboxylated quantum dots for efficient labeling of cells. Quantum dots attached at cell surface and were transported into cytoplasm at approximately 3 hours of culture. Furthermore, although the intranuclear distribution was not confirmed, the decrease of quantum dots was recognized in cytoplasm at approximately 7 days of culture.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	0	1,700,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,000,000	390,000	3,390,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：ナノテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1)量子ドットは直径数 nm の半導体素材（主にセレン化カドミウム）からなるナノクリスタルで、粒径サイズに応じて異なる蛍光波長を放出する特徴がある。生物領域への応用は新しく、1998 年 Chan ら Science に発表したのが初めてである。

(2)我が国では、本プロジェクトの共同研究者である産総研の大庭英樹主任研究員は 2005-2006 年に 2-5 nm の量子ドットを開発

している。したがって、天然有機生理活性物質の細胞内動態のイメージング化への応用が可能である。

(3) 教室では D-グルコサミンの薬理効果として、培養骨芽細胞のシグナル伝達系カスケードを刺激し、細胞増殖・分化関連タンパク質のリン酸化を促進することを実証した。

(4)さらに、最近では下顎-神経標本を使い、歯髄刺激に対して D-グルコサミンの鎮静効

果発現を証明し、膜の安定作用を有する可能性が明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) 目的の生理活性物質が細胞膜と接触、細胞内への取り込み、細胞内動態ならびに核内動態を可視化することは、生理活性物質の細胞内局材と機能との関連を解明するうえで重要である。

(2) 本研究は、細胞内に取り込まれると予想される低分子量の生理活性物質の細胞内動態を量子ドットイメージングというナノテクノロジーを使って解明する。

(3) イメージングという応用面のみならず、量子ドットの細胞毒性についても検討する。

3. 研究の方法

(1) D-グルコサミンと量子ドットの結合
0.2 g の D-グルコサミン塩酸塩を 1 ml の生理食塩水に溶解し、4℃で一晩静置する。量子ドット(コロイド法によって約 3 nm セレン化カドミウム CdSe に ZnS を被覆)のカルボキシル化はジメルカプトコハク酸で量子ドット表面を修飾してカルボキシル基を付加した。カルボキシル化量子ドット 50 μl を加えて攪拌し、さらに 0.1 M 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 100 μl を加えて静かに混ぜ、脱水縮合反応により量子ドットのカルボキシル基に D-グルコサミンのアミノ基と化学的結合させた。修飾最終産物の径は約 15 nm である。

(2) 培養細胞の調整
NOS-1 細胞(ヒト骨肉腫由来の株化骨芽細胞)をガラスボトムカルチャーディッシュ(FluoroDish™, Dish φ 35 mm, Glass φ 35 mm, Glass Thickness 0.17 mm, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA)に 2×10⁵あるいは 6×10⁵個となるよう播種した。培地は 10%FBS 添加 α-MEM を使用し、細胞は 5%CO₂ 培養器内で培養した。

(3) D-グルコサミン結合量子ドットの取り込み
初期の観察では、D-グルコサミン濃度を低く(0.05%)、1日以降7日までの観察では高く(0.2%)設定した。量子ドットは継代直後から培地に添加し、3日ごとの培地交換時には量子ドットを含まない通常の培地を用いた。

(4) 細胞膜と細胞内小器官の蛍光染色
量子ドットの取り込み開始後、培養器内で 3 時間、6 時間、1 日、2 日間培養ののち、細胞膜の染色には CellMask™ Plasma Membrane

Stain (C10045) (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA)にて細胞膜を染色した。量子ドットの取り込み開始後、培養器内で 1 日、2 日、3 日、5 日、7 日間培養ののち、細胞内小器官は Organelle-ID™ RGB reagent I (EMZ-53007) (ENZO Life Sciences Int., Inc., Plymouth Meeting, PA, USA)にてリソゾーム、ミトコンドリアを生体染色した。

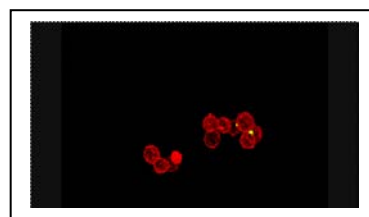
(5) 量子ドットの観察

量子ドットの観察は、細胞の入った培養皿を顕微鏡ステージ用 5%CO₂ 培養器 (Model: H301-TC1-HMTC, okolab S.r.l., Ottaviano, NA, Italy)に装着し培養下で、共焦点レーザー顕微鏡(Leica TCS SL, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)を使って行った。レーザー顕微鏡の観察には、教室の井川一成博士の多大な協力によって可能となった。

量子ドット、細胞膜の蛍光観察は、それぞれ励起波長(Excitation)は 385, 554 nm, 蛍光波長(Emission)は 525, 567 nm の波長で行った。細胞内小器官の蛍光観察は、ミトコンドリア及びリソゾームについて、それぞれ Excitation: 488, 543 nm; Emission: 560, 667 nm の波長で行った。

4. 研究成果

(1) 量子ドットは緑色(FITC に近似)の輝度の高い、2 時間後においても退色のない蛍光として、培地に添加後 3 時間で細胞膜に付着、一部細胞内へ取り込まれていた。また、顕微鏡ステージ用 5%CO₂ 培養器内に培養皿入れて観察する方法は、2 時間以上にわたって生細胞の状態を保って観察することがかろうであった。

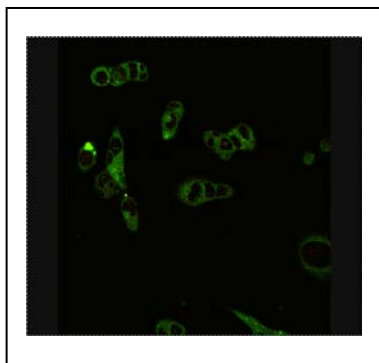


0.05% D-グルコサミン-量子ドット複合体。培養 3 時間後。細胞膜上、細胞膜内の膜近傍に量子ドットが認められる。

量子ドット単独では、細胞内への取り込みは 1 日後でも極めて少なかった。

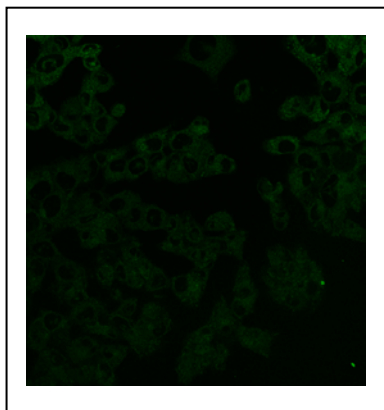
(2) 共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元観察は、量子ドットの細胞内外の位置関係、細胞への取り込みを観察する上で、極めて有益な方法であることが確認できた。

(3)量子ドットの細胞内分布は、ほぼリソゾームの分布に一致した像も認めたので、この系を介した細胞外への排出が考えられる。



0.2%D-グルコサミン-量子ドット複合体。培養5日後、リソゾーム(赤色蛍光)の分布に一致した部位が認められる。

(4)7日目には細胞内の量子ドットが著明に減少したので、この頃を目途に細胞外へ排泄されるものと考えられる。



0.2%D-グルコサミン-量子ドット複合体。培養7日後、細胞質内にほとんど蛍光量子ドットが認められない。

(4)培養5, 7日目においても量子ドットの核内への移行は観察されなかった。また、アミド結合は細胞内においても解離することはないので、今回の観察結果はD-グルコサミンの細胞内及び細胞小器官への移行することを実証したこととなる。

(5)今回、量子ドットのみコントロール条件下での観察の結果、培養細胞への為害性は認められなかった。むしろ、D-グルコサミン自体のpHが3.5~5と酸性であるため、高濃度では細胞発育を抑制する傾向にあった。

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5件)

① Kawakubo A, Matsunaga T, Ishizaki H, Yamada S, Hayashi Y. Zinc as an essential trace element in the acceleration of matrix vesicles-mediated mineral deposition. *Microscopy research and techniques* 74, 1161-1165, 2011.

② Kawasaki A, Hayashi Y, Yanagiguchi K, Yamada S, Syudo M, Igawa K, Ikeda T, Kubo S, Fujiwara M. Effects of eluted components from 4-META/MMA-TBB adhesive resin sealer on osteoblastic cell proliferation. *Journal of dental Sciences* 7, 94-98, 2012.

③ Kaida K, Yamashita H, Toda K, Hayashi Y. Effects of glucosamine on the tooth pulpal nociceptive responses in the rat. *Journal of Dental Sciences* 8, 68-73, 2013.

④ Yamada S, Nagaoka H, Terajima M, Tsuda N, Hayashi Y, Yamauchi M. Effects of fish collagen peptides on collagen post-translational modifications and mineralization in an osteoblastic cell culture system. *Dental Materials Journal* 32, 1-8, 2013.

⑤ Yamada S, Yoshizawa Y, Kawakubo A, Ikeda T, Yanagiguchi K, Hayashi Y. Early gene and protein expression associated with osteoblast proliferation and differentiation in response to fish collagen peptides. *Dental Materials Journal* 32, 233-240, 2013.

〔学会発表〕(計2件)

① 川久保 敦, 藤原 守, 井川一成, 林 善彦, 謝 明芳, 大庭英樹: 量子ドットを使ったD-グルコサミンの細胞移行のナノイメージング解析、第135回日本歯科保存学会秋季学術大会、平成23年10月、大阪市

② 井川一成, 林 善彦, 謝 明芳, 大庭英樹: 量子ドットを使ったD-グルコサミンの細胞内移行のナノイメージング解析 第2報 細胞内小器官への分布状況、第136回日本歯科保存学会春季学術大会、平成24年6月、宜野湾市

〔図書〕(計4件)

① Hayashi Y. Application of chiosan oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, ed.

Se-Kwon Kim, CRC Press-Taylor & Francis Group, pp. 447-460, 2010.

② Hayashi Y, Yamada S, Ikeda T, Yanagiguchi K. Fish collagen and tissue repair. In “Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects”, ed. S-K. Kim, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 133-141, 2011.

③ Hayashi Y, Yamada S, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T. Chapter 6 Chitosan and fish collagen as biomaterials for regenerative medicine. In Marine Medical Food, Volume 65, AFNR, ed. Se-Kwon Kim, UK: Academic Press, pp. 107-120, 2012.

④ Hayashi Y, Yanagiguchi K, Koyama Z, Ikeda T, Yamada S. Chapter 16 Chitosan Application in Dentistry. In *Marine Nutraceuticals: Prospects and perspective*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press-Taylor & Francis group, pp. 233-242, 2013.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 善彦 (HAYASHI YOSHIHIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：20150477

(2) 研究分担者

山田志津香 (YAMADA SHIZUKA)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：00363458

藤原 守 (FUJIWARA MAMORU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助授
研究者番号：40336178