

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650259

研究課題名(和文)光スイッチング分子のナノカプセル化と細胞導入による細胞活動の光制御系の実現

研究課題名(英文)Optical control of cell activity by introduction of photo-switching compound

研究代表者

馬籠 信之(Magome, Nobuyuki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70390052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題においては、脂質-タンパク質-光スイッチング分子の複合体を作り、細胞内に導入することを試みた。この複合体は、細胞内に容易に取り込まれ、さらに細胞内で分解された。この結果、光スイッチング分子が細胞内に広がり、細胞活動を制御する可能性が示された。また、研究の過程で、光感受性物質が細胞膜の構造を可逆的に変化させていることが示された。この膜構造の変化によって、物質の透過性も変化していると推測される。

研究成果の概要(英文)：In this research subject, we made nano-sized complex, consisting of lipid, protein, and photo-switching molecules, and then the complex were introduced into cultivated cardiomyocyte in order to realize optical control of excitation of the cells. We found that the complexes were easily taken in to the cells, and also were disassembled within the cell. As a result, the photo-switching molecules diffuse inside the cell, and then interact with cell membrane. In the research process, it was observed that structure of cell membrane was reversibly modified by the photo-sensitive substance. According to this result, it is assumed that the change of structure causes to increase membrane permeability of ions and other substances.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 ・ 医用生体工学・生体材料学

キーワード：光スイッチング 心筋細胞 興奮性 光制御 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

光照射による細胞活動制御に関しては、例えば、神経細胞において、光スイッチングを示す代表的な物質であるアゾ化合物によってチャンネル蛋白を修飾することにより、外部からの光照射でその活動を制御しようとする試みが行われていた (Nature Method 2007, Angew. Chem. Int. Ed. 2009 等)。

この一方で、申請者は、アゾベンゼンを有するカチオン性界面活性剤分子を、細胞培養用の培地に混在させておくことにより、外部から光を照射することによって心筋細胞の収縮活動を制御できることを見出した (Physica D, 2010)。この系では、細胞の収縮挙動は、可視光照射によって停止し、紫外線照射によって復活する。この応答は可逆的であり、また、細胞を洗浄することによって光応答性物質を除去することも可能である。

当該申請課題においては、このような【細胞活動の光制御手法の確立】を目指し、細胞活動の制御を細胞内部から非接触で行うことを試みた。細胞の活動制御は、光が照射されている領域でのみ変化させることが可能であることから、照射領域や光強度を適切に調節することによって、マクロスケール (例えば、器官としての心臓全体) から、ミクロスケール (例えば、単一細胞レベル) まで、様々なレベルで細胞活動の制御が可能となる。

実験に用いる試薬は、電荷を持たせて水溶性を高めたアゾ化合物である。このため、この化合物は細胞膜あるいは細胞内に取り込まれることなく、細胞外に存在したままで、効果的な細胞活動の光制御を可能としている。従って、細胞外液を洗浄することによって、化合物を細胞から除去することも容易であるが、これは逆に、例えば数日間に亘って細胞の光応答性を維持しようとするならば、その間連続的に化合物を供給し続けなければならないことを意味している。このため、細胞にダメージを与えることなく、効果的に化合物を細胞内に導入することが可能となるならば、この化合物は細胞内に留まるため、長期間におよぶ光制御が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本申請課題においては、光スイッチング機能を有するアゾ化合物を内包するナノサイズの微粒子を作製し、細胞内に取り込ませた後に、外部からの光照射によって細胞機能を制御することを試みる。光スイッチング化合物は、すでに効果が明らかとなっているものを用い、細胞内に導入後、光照射などによって化合物を細胞内に放出させるなどして、細胞の内側からの光感受性機能の発現を目指した。

細胞内への物質取り込みについては、DDS 関連を中心とし、様々な手法が知られている。それら過去の知見や技法を活用し、本申請課題においては、特に、(1)光スイッチング分子を内包した微粒子作成、(2)細胞内への微粒子の取り込み、(3)細胞内での物質放出と細胞機能制御、である。それぞれの過程において効率的な手法を確立し、総合的に効果の高い系の実現を目指した。

また、この『細胞の光制御』機構は、いまだに詳細が明らかでない。今回に示す細胞の光制御が実現することにより、これまでとは違った方向からの機構解明につながるものである。

3. 研究の方法

本申請課題は、主として、それぞれの分野で研究実績がある、同研究室に所属する3名を中心として行なった。各人と、その役割は下記の通りである。

代表者:馬籠信之 実験系のデザイン、細胞培養、興奮波の観察
分担1:Konstantin AGLADZE 興奮波の解析
分担2:Yuliya ORLOVA ナノ粒子作成と評価

この他、必要に応じて、国内外の研究者の意見を聞き、研究の質的な向上に努めた。特に、実験的な面では、下記に挙げる研究グループから支援をいただいた。

京都大学 iCeMS, Hauser グループ:
細胞表面の電子顕微鏡観察
京都大学 iCeMS, 村上グループ:
脂質 - タンパク質複合体の作成
京都大学 CeMI, 藤原・石館他:
細胞膜ならびに細胞内の蛍光観察

本研究では、主として、新生児ラットの心筋細胞を用いた。ラット個体より摘出した心臓をコラゲナーゼ処理することによって心筋細胞を回収した後、フィブロネクチンでコートしたガラス基板上に播種して培養した。通常は、3~5日間程度培養することで、ガラス基板上で等方的な心筋細胞層が得られる。

この心筋細胞の培養過程において、光スイッチング分子を細胞内に安定に取り込ませるのであるが、その光スイッチング分子の担体として、申請段階においては、炭酸系の無機ナノ粒子や、layer-by-layer 法などを利用することを想定していた。しかしながら、細胞質内での再結晶化などの問題が生じ、さらにいくつかの手法の検討が必要となった。ここで、薬剤の取り込みと細胞導入、および、細胞内への薬物放出が効率よく行えることが近年明らかとなった「脂質 タンパク質複

合体 (high-density lipoprotein, HDL)」を利用することとした。

(1)光スイッチング分子を内包した微粒子の作成

まず、物性の異なる光スイッチング分子を数種類用意した。これは、炭素鎖の長さを変えることによって親水性・疎水性のバランスを変え、脂質内への保持されやすさを調節するためである。また、光スイッチング分子の荷電部分を変えることで、同様に、HDL への保持のされやすさについても検討した。

HDL は、リン脂質 POPC から作成されたリン脂質小胞を用いた。

上記のように用意した HDL の懸濁液に、光スイッチング分子を混入して、HDL との複合体を形成させた。その後、ゲル濾過などを行なって、HDL と、溶液中に残存する光スイッチング分子を分離した。光スイッチング分子は特有の黄色を呈していることから、複合体形成の確認には、分離後の懸濁液を分光学的に測定することで行った。

(2)細胞内への微粒子の取り込み

HDL - 光スイッチング分子複合体の細胞内への取り込みを確認するため、脂溶性の高い蛍光色素を HDL に混合させた。この後、培養した心筋細胞と共存させ、数日間培養を続けた。このことにより、通常、HDL は細胞内に取り込まれることが分かっている。HDL の細胞内への移行の確認には、蛍光顕微鏡を用い、HDL 複合体が細胞内に取り込まれていることの確認を行なった。

(3)細胞内での物質放出と細胞機能制御

通常、HDL は細胞内に取り込まれたのちに分解される。この過程において、HDL と共存していた光スイッチング分子も、細胞内に放出されることが期待される。

細胞機能の制御には、これまでと同様、紫外線や可視光線を照射することによる自発的な収縮活動の変化などについて行った。

(4)細胞膜構造変化による物質透過

光スイッチング分子は、細胞膜と電気的に相互作用し、その結果として、照射光による細胞機能の変化が生じると考えられる。このため、光スイッチング分子の吸着によって、細胞膜構造がそのように変化するのか、また、その変化に伴って物質の膜透過性がどのように変化するのか、主として電子顕微鏡や蛍光顕微鏡によって観察を行なった。

4. 研究成果

細胞内に取り込まれた HDL 複合体の蛍光画像を図 1 に示す。

図 1 では、白色部分が蛍光色素によって蛍光を発している部分を示している。細胞内に、

蛍光染色された HDL が輝点として存在していることが分かる。この画像は、培養した心筋細胞の外液に HDL 複合体を混在させてから 3 時間後の蛍光画像であり、HDL が容易に細胞内に取り込まれていることが分かる。また、輝点で示される HDL の他、同時に、細胞内のアクチンフィラメントと思われる構造体も蛍光染色されていることから、細胞内で HDL が分解し、蛍光色素が細胞内に拡散して染色されたと推測される。従って、HDL と複合体を形成している光スイッチング分子も同様に、細胞内に放出されていることと考えられる。なお、左上は、同領域の位相差顕微鏡観察の画像である。

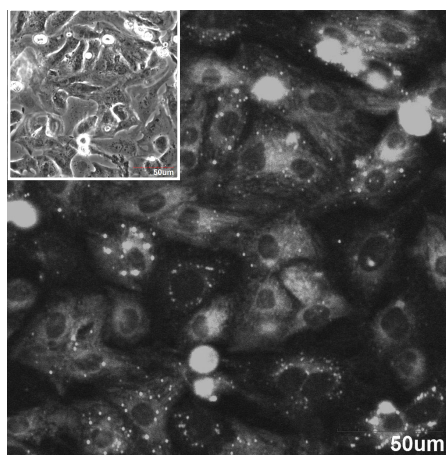


図 1 細胞内に取り込まれた HDL

このように、HDL - 光スイッチング分子は、細胞と混在しておくだけで簡単に細胞内に取り込まれた。この複合体は、時間と共に徐々に消えていき、その結果として、細胞活動も変化していった。

しかし、光スイッチング分子の長時間暴露によって、細胞そのものへのダメージも大きいことが分かった。

光スイッチング分子は、低濃度では効果を発揮せず、高濃度では細胞活動を停止させ、細胞は死滅する。このことから、ある特定の濃度領域において細胞機能制御が実現できることになるが、細胞内への取り込み量の制御が極めて困難であることから、何らかの刺激によって、特定量の物質が放出されるシステムの設計が重要である。

これまでの研究により、今回用いている光スイッチング分子は、紫外線照射下においては、細胞との相互作用が小さいことが分かっている。このため、培養の過程で、紫外線を照射し続けることも試みたが、紫外線によるダメージも大きく、長期間の培養が非常に困難であることも確認できた。このことから、より生体適合性の高い物質の開発ならびに使用する必要性が極めて高いことが明らかとなった。

また、論文未発表のため、本報告書においては図を含めた詳細な内容は示さないが、この研究の過程において、光スイッチング分子が細胞膜の構造を可逆的に変化させていることを電子顕微鏡から示された。また、この膜構造変化と同時に、細胞膜のイオン透過性も大きく変化することも確認した。これらの結果は、現在、追加データを揃えて、論文として投稿する準備を進めている。

これらは、細胞膜に吸着した光スイッチング分子が細胞膜に軽微なダメージを与え、さらに、照射する光によって細胞膜の復元も可逆的に可能であることを示唆するものである。このことで、光スイッチング分子の構造変化に伴って細胞活動が変化するというこれまでの研究結果だけでなく、光スイッチング分子の長時間暴露や、高濃度存在下での細胞死を説明できるものであり、機構が徐々に明確になりつつあると言える。

このような細胞膜構造の変化、特に、物質透過性の可逆的变化については、研究申請段階では想定していなかったことである。得られた結果を基に、研究の方向性を比較的自由に発展させることができた萌芽研究だからこそと考えている。

物質の細胞膜透過性を可逆的に変化させることが可能となれば、その応用範囲は多方面に及ぶ。今後は、安全性の高い物質の再検討を含み、本申請課題で得られた結果を踏まえて、培養心筋細胞だけでなく、心臓洞結節部位の光制御による心臓全体の拍動制御や、神経細胞などの他の興奮性細胞の光制御に向けて研究を進めることを考えている。

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5件)

- 1) L. Wang, L. Liu, X. Li, N. Magome, K. Agladze, and Y. Chen, "Multi-electrode monitoring of guided excitation in patterned cardiomyocytes" [査読有], *Micro-electron. Eng.*, 111, 267-271 (2014).
- 2) S. Kadota, M. W. Kay, N. Magome, and K. Agladze, "Curvature-dependent excitation propagation in cultured cardiac tissue" [査読有], *J. Exp. Theor. Phys. Lett.*, 94, 838-844 (2011).
- 3) I.S.Erofeev, N. Magome, and K. Agladze, "Digital photo-control of the network of live excitable cells" [査読有], *J. Exp. Theor. Phys. Lett.*, 94, 513-516 (2011).

4) N. Magome, G. Kanaporis, N. Moisan, K. Tanaka, and K. Agladze, "Photo-Control of Excitation Waves in Cardiomyocyte Tissue Culture" [査読有], *Tissue Engineering part A*, 17, 2703-2711 (2011).

5) Y. Orlova, N. Magome, L. Liu, Y. Chen, and K. Agladze, "Electronspun nanofibers as a tool for architecture control in engineered cardiac tissue" [査読有], *Biomaterials*, 32, 5615-5624 (2011).

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬籠 信之

(MAGOME, Nobuyuki)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70390052

(2)研究分担者

アグラゼ コンスタンチン

(AGLADZE Konstantin)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号：30503651

オルロバ ユリヤ

(ORLOVA Yuliya)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：90571901

(3)連携研究者

なし