

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650053

研究課題名(和文)細胞の非侵襲温度マッピングのための2波長蛍光温度計シートの開発

研究課題名(英文)Development of a ratiometric fluorescent thermosensor sheet for non-invasive temperature mapping at single-cell level

研究代表者

大山 廣太郎(OYAMA, Kotaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：70632131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、非侵襲に単一細胞の局所的な温度をマッピングする新たな手法を構築した。具体的には、温度感受性を持つ蛍光分子を薄膜状にした蛍光温度計シートの上に細胞を培養し、蛍光強度の変化からマイクロメートルスケールの局所温度の2次元分布を可視化する技術を開発した。この蛍光温度計シート上にHeLa細胞やHEK293細胞、心筋細胞、神経細胞を培養することに成功した。この温度計シートを用いることで、WI-38細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の熱応答、局所加熱による神経突起伸長の誘発、心筋細胞の高温高速サルコメア振動、といった新しい細胞の温度センシング機構を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We developed fluorescent thermosensor sheets for non-invasive temperature mapping at single-cell level. Thermo-sensitive fluorescent dyes were spin-coated on a culture dish. The fluorescence intensity responded to changes in temperature. Human cells (HeLa, HEK293), rat neonatal cardiomyocytes, or rat hippocampal neurons were cultured on the fluorescent thermosensor sheets. By using the thermosensor sheets, we found novel temperature-sensing systems in living cells: Ca<sup>2+</sup> burst in WI-38 cells induced by a microscopic heat pulse, neurite outgrowth triggered by microheating, and hyperthermal sarcomeric oscillations (HSOs) in cardiomyocytes.

研究分野：生物物理

キーワード：温度計シート 蛍光イメージング 温度測定

### 1. 研究開始当初の背景

生命は、温度を感じ、発熱・吸熱しながら活動している。温度感受性や熱産生に関わるタンパク質が特定されたことで、生命システムが温度変化を感じ、順応し、有効活用する過程が理解されつつある。一方、細胞・タンパク質スケールの局所的な温度の理解は未だ十分ではない。単一細胞スケールの局所的な温度変化を検出し、その生理的意義を追究することは、細胞が局所的な熱・温度をいかに有効利用しているかを明らかにできる。

研究代表者らは、近年では「細胞内を歩くナノ温度計」というユニークな蛍光ナノ粒子の開発、細胞小器官内部の温度変化測定に成功している(Oyama et al., *Lab Chip*, 2012)。これにより、細胞内の局所的な温度変化に関する知見が得られると期待される。このナノ温度計は、ふりかけるだけで HeLa 細胞内に導入される利点を有しているものの、細胞種によっては自発的導入が困難であると予想される。また、細胞内に導入された温度計による機能阻害は明らかではない。特に神経細胞の軸索・樹状突起のような狭い空間の中で、数十から数百 nm の大きさのナノ温度計が細胞機能に与える影響は危惧すべきことである。

### 2. 研究の目的

本研究では、簡易に単一細胞の局所的な温度を非侵襲計測する新たな手法の構築を目指した。具体的には、温度感受性を持つ蛍光分子を薄膜状にした蛍光温度計シートの上に細胞を培養し、蛍光強度の変化から温度の2次元分布を可視化する技術を開発する。神経細胞や心筋細胞など、様々な細胞に応用することで、筋収縮や神経興奮時における温度の時空間パターンを得ることを最終目標とする。

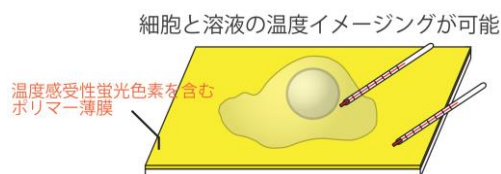


図 1：蛍光温度計シートの模式図

### 3. 研究の方法

蛍光温度計シートの作成方法は 4.研究成果に記載した。作成した蛍光温度計シートは倒立蛍光顕微鏡(オリンパス IX70)により観察した。励起光の光源には水銀ランプのほか、LED 光源(Thorlabs)、SPECTRA Light Engine (Lumencor)を使用した。細胞観察時は顕微鏡用培養システム(東海ヒット)で温度を制御した。詳細は各発表論文に記載してある。

### 4. 研究成果

#### (1) 1波長蛍光温度計シートの開発

培養用ディッシュ上に高分子ポリマー(PMMA)と温度感受性の優れた蛍光色素(Eu-TTA)をスピコートすることで、均一な蛍光薄膜を作成した。この薄膜の蛍光強度は温度上昇に伴い 25°Cから 45°Cの間で線形に減少し、その変化率は-2.8%/°C(25°C基準)であった。波長 1455 nm の赤外レーザー光による局所加熱時の温度の時空間変化を可視化することに成功した(Itoh et al., *BIOPHYSICS*, 2014, Editor Choice Award 受賞、表紙絵に採択)。

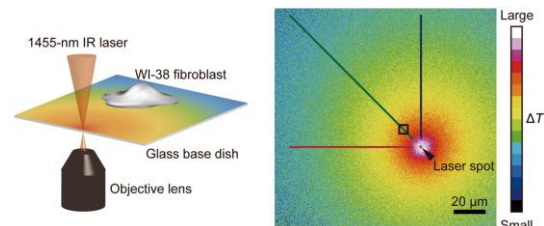


図 2：蛍光温度計シートによる局所温度変化イメージング。(左) 対物レンズで赤外光を集光し、水を局所的に温める実験系の模式図。(右) 蛍光温度計シートの蛍光強度変化によって可視化した局所温度勾配。図は Itoh et al., *BIOPHYSICS*, 2014 より。

#### (2) 2波長蛍光温度計シートの開発

温度感受性の異なる 2 種類の蛍光色素(Eu-TTA と Rhodamine 101)を培養用ディッシュ上にスピコートすることで、2波長計測用温度計シートを作成した。この 2 種類の蛍光色素の蛍光強度比は、温度変化に应答(変化)するのに対し、他の環境感受性(pH やイオン強度)には応答しなかった。したがって、温度変化だけに応答する理想の蛍光温度計シートが完成した。

#### (3) 温度計シート上での細胞培養

これらの蛍光温度計シート上に HeLa 細胞や HEK293 細胞、新生仔ラット由来の心筋細胞、胎児ラット海馬由来の神経細胞を培養することに成功した。HeLa 細胞の数日間培養における毒性を蛍光生死判定で評価したが、培養用ディッシュと蛍光温度計シート間に優れた細胞毒性は見られなかった。蛍光温度計シート上においても、培養用ディッシュと同様の心筋細胞の自発収縮、神経細胞の自発 Ca<sup>2+</sup>発火が見られた。

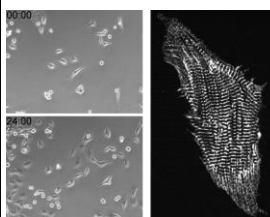


図 3：蛍光温度計シート上に培養した細胞。(左) 同一視野における観察開始直後(上)と1日後(下)の HeLa 細胞。(右) 心筋細胞。横紋構造はαアクチニン-GFP で可視化。

#### (4) 心筋・神経細胞の発熱計測

蛍光温度計シート上に培養した神経細胞の電気的興奮に伴う温度上昇を、繰り返し測定によって高精度計測するシステム構築を構築した。電気刺激時の細胞近傍の温度計シートの蛍光強度変化を 40 ms の時間分解能で計測したが、刺激に伴う顕著な温度変化 (0.1°C 以上) は検出されなかった。同様の計測を新生仔ラット心筋細胞でも行ったが、電気刺激による収縮に伴う顕著な温度変化は検出できなかった。これらの結果から、神経細胞や心筋細胞の生理的な細胞興奮に伴う単一細胞レベルの温度変化は、より高速・微小なものであることが示唆される。

本手法を用いて、単一細胞周囲の局所的な温度変化を高精度計測することができる。この手法を用いることで、(5) ~ (7) の新しい細胞の熱応答機構を発見した。

#### (5) 熱パルスによる細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇

研究代表者らはこれまでに、HeLa 細胞が熱パルスに反応し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する現象を報告している (Tseeb et al., *HFSP J.* 2009)。この現象が癌細胞特異的なものであるかを調べるために、正常ヒト細胞株である WI-38 細胞に熱パルスを与えたところ、同様の一過的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が起こることを明らかにした。Ca<sup>2+</sup>チャネル等の阻害剤を用いて Ca<sup>2+</sup>濃度上昇のメカニズムを探索し、Ca<sup>2+</sup>チャネル (IP<sub>3</sub>受容体) と Ca<sup>2+</sup>ポンプ (SERCA) の活性が熱パルスによって変調されることで Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が誘発されるというモデルを提案するに至った (Itoh et al., *BIOPHYSICS*, 2014)。

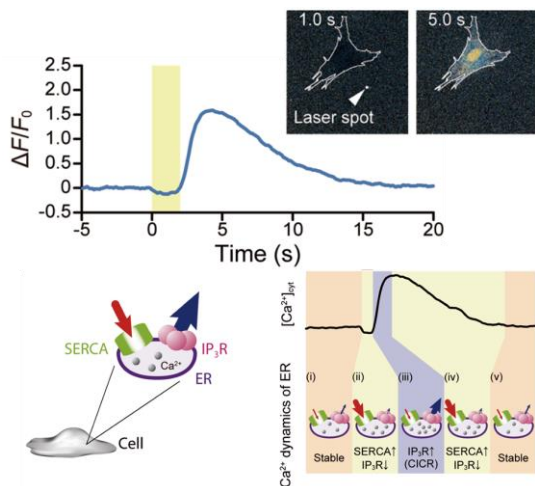


図 4：熱パルスに対する WI-38 細胞内 Ca<sup>2+</sup> 応答。(上) WI-38 細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が熱パルス (黄色帯) 後に上昇した様子を示している。(下) 本研究で明らかとなった熱応答機構のモデル図。図は Itoh et al., *BIOPHYSICS*, 2014 より。

#### (6) 局所加熱による神経突起伸長の誘発

赤外光レーザーによる局所加熱によって、ラット海馬神経細胞の神経突起を急速に伸長させることに成功した。神経突起は熱源方向に伸長する傾向があり、伸長した神経突起は他の細胞から伸長した神経突起と結合した。この神経突起伸長の温度感受性の機構解明を進め、細胞骨格 (微小管やアクチンフィラメント) や分子モーターが加熱中の神経突起伸長に関与していることを明らかにした (Oyama et al., *Sci. Rep.*, 2015)。

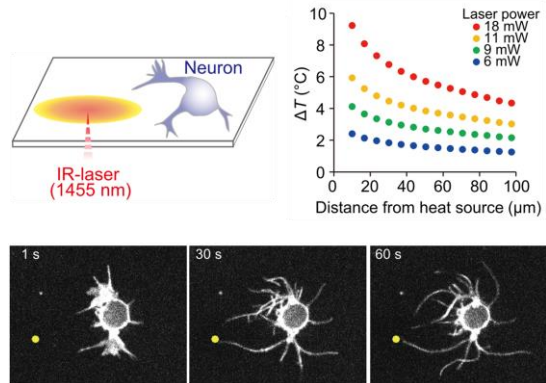


図 5：局所加熱による神経突起伸長の誘発。(左上) 神経細胞に局所温度勾配を与える実験の模式図。(右上) 蛍光温度計シートで計測した温度勾配。(下) 局所加熱によって神経突起の伸張が見られた。黄色丸は熱源の位置を示している。図は Oyama et al., *Sci. Rep.*, 2015 より

#### (7) 心筋細胞の高温高速サルコメア振動

研究代表者らはこれまでに、成体ラット心臓から単離した心筋細胞に熱パルスを与えることで、筋収縮を引き起こすことに成功している (Oyama et al., *BBRC*, 2012)。そこで本研究では、新生仔ラット心筋細胞のサルコメア構造 (筋収縮最小ユニット) を  $\alpha$  アクチニン GFP によって可視化し (Shintani et al., *J. Gen. Physiol.*, 2014)、局所加熱時のサルコメア動態を nm 精度で計測した。これにより、約 38°C 以上に加熱した際に、5–10Hz の高速サルコメア振動が起こることを発見、Hyperthermal Sarcomeric Oscillations (HSOs) と命名して論文発表を行った (Shintani et al., *BBRC*, 2015)。

#### まとめ

蛍光温度計シートにより、単一細胞スケールの局所温度の時空間パターンを計測・可視化することに成功した。様々な細胞を培養可能な本開発技術は、単一細胞レベルにおける発熱・感温機構の解明に大きく貢献することが期待できる。

## 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 3 件)

① Oyama K., Zeeb V., Kawamura Y., Arai T., Gotoh M., Itoh H., Itabashi T., Suzuki M. and Ishiwata S. “Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater.” *Scientific Reports* 5, 16611 (2015). 査読有  
10.1038/srep16611.

② Shintani S.A., Oyama K., Fukuda N. and Ishiwata S. “High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457(2), 165-170 (2015) 査読有  
10.1016/j.bbrc.2014.12.077.

③ Itoh H., Oyama K., Suzuki M. and Ishiwata S. “Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts” *BIOPHYSICS* 10, 109-119 (2014). 査読有  
10.2142/biophysics.10.109

[学会発表] (計 9 件)

① Oyama K., Suzuki M., Ishiwata S. “Regulation of cellular functions by microscopic heat pulse”  
第 53 回日本生物物理学会年会 金沢大学 (石川県金沢市), 2015 年 9 月 13 日

他 8 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]

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大山 廣太郎 (OYAMA, Kotaro)  
東京慈恵会医科大学・医学部・特別研究員  
研究者番号：70632131

### (2) 研究分担者

新谷 正嶺 (SHINTANI, Seine)  
東京大学・大学院理学系研究科 (理学部)・特別研究員  
研究者番号：40650536