

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870336

研究課題名(和文)細胞内イオン動態の光操作による細胞応答機構の理解

研究課題名(英文)Cell responses induced by optical control of intracellular ion

研究代表者

浅野 豪文(ASANO, Toshifumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：30552476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞の活動依存的な分化、成熟過程について検討を行った。光応答性イオンチャンネルを筋芽細胞に発現させて筋線維に分化させると、青色光に同期した活動電位の発生と収縮活動が誘発された。未熟な筋細胞に対する光刺激は筋収縮構造の構築を促進し、収縮応答能を獲得することを見出した。分化誘導初期の筋芽細胞への刺激は細胞融合を制御する遺伝子の発現を亢進させ、筋管細胞の成長、肥大化を引き起こした。本研究で確立された骨格筋細胞の光制御は運動神経の主要な機能を光で代替できることを示し、筋組織の発生や再生のメカニズム研究への応用や筋疾患治療技術の創出に寄与するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that an optogenetic stimulation promoted morphological maturation and functional development of skeletal muscle cells in vitro. Optical stimulation with a rhythmical frequency facilitates gene expression and specific structural alignment of sarcomeric proteins. Optical stimulation also depolarizes the membrane potential, and induces contractile responses in synchrony with the given pattern of light pulses. These results suggest that optogenetic techniques can be employed to manipulate activity-dependent processes during myogenic development and control muscle contraction with high temporal and special precision.

研究分野：細胞工学

キーワード：分化 細胞内イオン 光刺激

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖や分化について、分子生物学やバイオインフォマティクス的手法を用いて関与する遺伝子や誘導因子の同定が行われている。しかし、その機序については未だ不明な点が多く、効率的に特定の細胞を誘導することや機能的な組織を作製する技術は十分に確立していない。未分化な細胞が活動依存的に分化・成熟することが哺乳類視覚系や体性感覚系などで知られている。従来、神経や筋肉などの細胞を刺激するには電気的な方法が主に用いられてきた。しかし電気刺激法には空間分解能が低い点や電場が不均一である点、侵襲的な金属電極を用いる点などの欠点が挙げられる。これらの問題点を解決すべく、細胞活動を引き起こす方法として光を用いた刺激法の開発が進められてきた。代表的なものにグルタミン酸のケージド物質を用いた方法がある。ケージド物質に強い光を照射すると、グルタミン酸が解離して局所的な濃度上昇が起こり、グルタミン酸受容体を介して細胞が興奮する。この方法は2光子レーザー顕微鏡を用いることにより、時間・空間分解能の高い刺激を行うことができる。しかし、高い技術力が要求され、その適用が制限される。

2. 研究の目的

本研究では細胞活動を規定する細胞膜内外を介したイオン輸送に着目し、それを直接的に操作して細胞内イオン動態と細胞機能発現の連関を理解することを目的としている。具体的には以下の課題について取り組む。未分化な細胞に対して光遺伝学的刺激を加え、活動依存的な細胞の分化の亢進または成熟を検証する。様々な周波数や持続時間、強度のパラメータを持った光照射による律動性/非律動性の生理的刺激を与え、形態的、機能的な側面から細胞応答機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 光に応答する細胞を作製するために一過的もしくは恒常的に光受容イオンチャネル(channelrhodopsin: ChR) 遺伝子を発現する筋芽細胞を作製する。ChRは緑藻類クラミドモナスに由来し、青色光(470 nm)に応答して陽イオンを非選択的に透過させるセンサーとイオンチャネルの機能を併せ持った光受容体である。同時に薬剤耐性遺伝子(neomycin)を導入することで陽性細胞の選抜を行い、安定発現株を作製する。ChRに融合させた蛍光タンパク質(VenusやmCherryなど)の蛍光を指標に発現量の異なるいくつかのクローンを作製し、応答性や収縮能を評価して最適なものを選択する。コンフルエントに達したC2C12細胞を分化誘導培地に置き換えることで、多核の筋管細胞を形成させる。

(2) 光応答性を付加した細胞が筋特異的なタンパク質の発現や収縮単位構造サルコメアの構築をしているかを免疫染色で確認する。光照射による光電流や活動電位の発生はパッチクランプ法により測定する。顕微鏡下で光刺激を行い、筋収縮活動を誘起できるか、その応答性、制御性を検証する。

(3) 分化培養中の未分化な筋細胞に対して、様々な周波数や持続時間、強度の光を照射し、細胞形態や遺伝子発現、タンパク質量、電気生理的特性について解析する。

4. 研究成果

(1) ChRを導入したC2C12細胞を分化誘導培地に置き換えると細胞同士が融合し、形成された多核の筋管細胞からChRの発現を確認した。共焦点レーザー顕微鏡により筋管細胞を観察すると、細胞の長軸方向に沿った形質膜上へのChRの分布が認められた。融合させた蛍光タンパク質を手掛かりにChRを発現している細胞を同定し、パッチクランプ法によりホールセルモードにて電気生理測定を行った。ホールセル電位固定下に形成させた筋管細胞に対して光を照射すると、強度依存的に細胞外から細胞内へ向かう電流の発生が観察された。光電流にはピーク成分と定常成分の2成分が存在し、ピーク成分の大きさは光の強さにほぼ比例して増大した。光照射により誘発される電流は、光照射とともにミリ秒オーダーで最大になり、終了とともに速やか

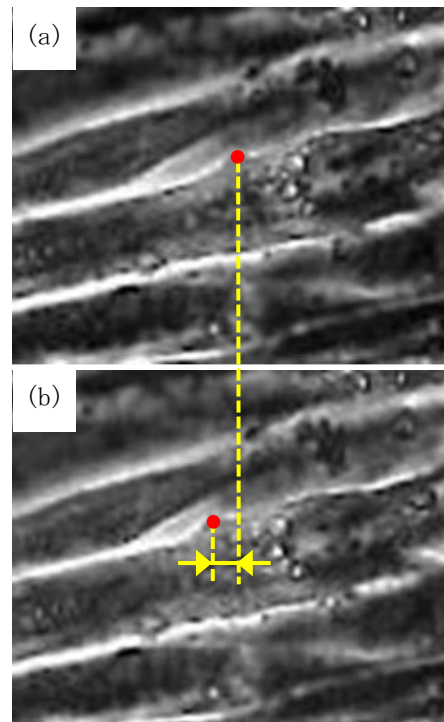


図1 光で誘発された筋収縮
ChRを発現する細胞の光照射前(a)と照射後(b)の細胞応答。光刺激に同期した筋収縮が観察された。

に減衰した。電流固定下に膜電位変化を記録すると、光の照射とともに素早く脱分極が引き起こされた。脱分極の大きさは光強度に依存しており、ある一定の強度以上の光パルス刺激により活動電位が誘発された。さらに光刺激を繰返し与えたところ、完全に光パルスに同期した活動電位を発生させることができた。光電流および活動電位は照射する光の強度や持続時間で正確に制御することができ、刺激と反応の同期性が取れていることから、ChR による光刺激によって十分に筋細胞の活動を制御できることを確認した。

収縮運動を観察すると、1-10 Hz の光パルスに同期した単収縮または強縮の発生が認められた (図 1)。光を用いる利点として、照射する範囲を限定することで、特定の場所で特定の時間に光を照射することができ、容易に時間・空間分解能を向上できる。光を照射する範囲を絞って局所刺激したところ、照射した細胞のみで収縮が引き起こされた。細胞集団の特定の細胞の筋活動を個別に制御することができ、単一細胞レベルでの観察が可能となった。

(2) 骨格筋においても収縮能を獲得するには電気刺激や張力などの外部からの刺激が必要であることが知られている。従来の誘導法を用いて形成される筋管細胞は刺激に対する応答性が低い。そこで分化誘導中の未熟な筋管細胞に対して光刺激を与えた時の効果を検討した。免疫染色によりサルコメアを構成するタンパク質の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、光刺激トレーニングを与えた細胞にはサルコメア構造が明瞭に観察され、その割合はトレーニングを与えていないコントロール群に対して有意に増加していた (図 2)。

刺激に対する応答を観察すると、収縮する細胞が有意に増大していた。ChR を活性化しない赤色光 (605 nm) での刺激では変化は認められなかった。また、本実験で用いた条件下では青色光照射による細胞毒性についても認められなかった。光パルスの間隔、持続時間を変化させて様々な刺激条件を検討したところ、一定のリズムを持った刺激が効率的に収縮能を獲得させた。カルシウムイメージングを行ったところ、光照射により細胞内カルシウム濃度上昇が引き起こされることを確認した。各種阻害剤を用いた検討を進めると、カルシウムチャネル阻害剤により促進効果が顕著に抑制されることが分かった。以上から細胞内カルシウム濃度の周期的な変動を繰り返すことが筋管細胞の成長を促すことが示唆された。

(3) 筋芽細胞の分化誘導初期における光刺激について検討を進めた。光を照射する時期や周期、持続時間、強度など分化培養中に様々な条件を検討できるシステムの構築を行った。刺激を与えた細胞の遺伝子発現を確認し

たところ、細胞融合を制御することが報告されている ERK5 経路の下流の転写調節因子の発現亢進が認められた。単核の筋芽細胞は筋分化を開始すると、互いに融合することで多核の合胞体である筋管細胞を形成する。刺激を与えて培養 5 日目の筋管細胞をコントロール群と比較したところ、太さや長さに差異が認められた。光刺激が筋芽細胞の融合を促進させることで筋管細胞の成長、肥大化を引き起こしたと考えられる。

本研究で確立した技術は、光を照射するだけで特定の時間に、特定の細胞または細胞群を活性化させて細胞の成長・成熟を促進させることができた。さらに刺激にตอบสนองして収縮する能力を持った骨格筋細胞を効率的に光で創り出すことに成功した。本技術は運動神経の主要な機能を光で代替できることを示し、新たな筋疾患治療技術の創出や創薬技術基盤の構築に寄与するものと期待される。

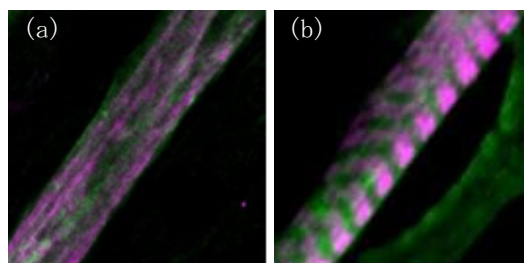


図 2 光遺伝学刺激による筋細胞の成長 (a) 刺激前の未熟な細胞、(b) 収縮構造 (サルコメア) が構築された刺激後の細胞 (緑: ChR、マゼンタ: ミオシン)

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 4 件)

- ① T. Asano, T. Ishizuka, K. Morishima and H. Yawo, “Optogenetic induction of contractile ability in immature C2C12 myotubes”, *Scientific Reports*, 5, 8317 (2015). DOI: 10.1038/srep08317 (査読有り)
- ② T. Asano, T. Ishizuka, H. Yawo and K. Morishima, “Development of biotransducers driven by photostimulation”, *Proceedings of the 18th International Conference Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2015)*, 1605-1608 (2015). DOI: 10.1109/TRANSDUCERS.2015.7181247 (査読有り)
- ③ T. Asano, T. Ishizuka, H. Yawo and K. Morishima, “Optically controllable muscle for cell-based microdevice”,

Proceedings of the 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014), 1-3 (2014). DOI: 10.1109/MHS.2014.7006150 (査読無し)

- ④ M. Hirooka, S. P. Beh, T. Asano, Y. Akiyama, T. Hoshino, K. Hoshino, H. Tsujimura, K. Iwabuchi and K. Morishima, “Evaluation and optical control of somatic muscle micro bioactuator of channelrhodopsin transgenic drosophila melano-gaster”, Proceedings of the IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), 196-199 (2014). DOI: 10.1109/MEMSYS.2014.6765608 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 浅野豪文, 中田隆夫, “細胞活動の動的 光制御による筋分化調節”, 第 16 回日本再生医療学会総会, 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2017 年 3 月 7 日.
- ② T. Asano, T. Ishizuka, H. Yawo and K. Morishima, “Development of biotransducers driven by photostimulation”, 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Transducers 2015, Alaska (USA), June 21-25 (2015).
- ③ 浅野豪文, 石塚 徹, 八尾 寛, 森島圭祐, “骨格筋細胞の光分化誘導”, 第 14 回日本再生医療学会総会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2015 年 3 月 19-21 日.
- ④ 浅野豪文, 石塚 徹, 八尾 寛, “光遺伝学刺激による筋細胞機能操作”, 第 7 回 CBIR+ONSA 共催 若手インスパイアシンポジウム, 東京医科歯科大学(東京都・文京区), 2015 年 2 月 21 日.
- ⑤ 浅野豪文, 石塚 徹, 八尾 寛, 森島圭祐, “光遺伝学刺激によって誘導された筋成熟”, 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014 年 11 月 25-27 日.
- ⑥ T. Asano, T. Ishizuka, H. Yawo and K. Morishima, “Optically controllable muscle for cell-based microdevice”, 2014 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2014), Nagoya University

(Aichi・Nagoya), November 9-12 (2014).

* Best Poster Award 受賞

- ⑦ 浅野豪文, 石塚 徹, 八尾 寛, 森島圭祐, “ソフトアクチュエータとしての光応答性筋肉”, 第 32 回日本ロボット学会学術講演会, 九州産業大学(福岡県・福岡市), 2014 年 9 月 4-6 日.
- ⑧ 浅野豪文, 石塚 徹, 八尾 寛, 森島圭祐, “In vitro 筋モデルとしての光応答性筋肉の創製”, ROBOMECH2014, 富山国際会議場(富山県・富山市), 2014 年 5 月 25-29 日.

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/cbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅野 豪文 (ASANO, Toshifumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 30552476