

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 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22657041

研究課題名（和文） フェムト秒レーザー誘起衝撃力による単一細胞刺激と活性化機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of single cell activity stimulated by femtosecond laser-induced impulsive force

研究代表者

細川 陽一郎 (HOSOKAWA YOICHIROH)

奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：20448088

研究成果の概要（和文）：高強度の近赤外フェムト秒レーザー光を顕微鏡下で細胞培養液に集光すると、効率的な多光子吸収により集光点で爆発現象が引き起こされる。この爆発現象により発生する衝撃力は、ミクロンオーダーの領域に局在するため、1細胞の局所領域に機械刺激を加えられる。本研究では、筋芽細胞と神経細胞に、このフェムト秒レーザー誘起衝撃力を作用させ、カルシウムインディケーターにより1細胞レベルの細胞活性変化を解析する新手法を開発した。レーザー強度により機械刺激の大きさや作用領域を自在に変えられる特徴を駆使して、1細胞内で刺激が活性化されるメカニズムを検討した。

研究成果の概要（英文）：When an intense infrared femtosecond laser is focused into cell culture medium under microscope, an explosion is induced at the laser focal point through an efficient multi-photon absorption. Since the explosion localizes in the area with order of a few tens micron, a mechanical impulsive force can load on a single cultured animal cell. In this investigation, the femtosecond laser-induced impulsive force was loaded on a single muscle myoblast cells and neurons, and then modulation of the activity was investigated by calcium ion (Ca^{2+}) mobilization. An advantage of this stimulation method is that the force magnitude can flexibly control with the laser intensity and pulse repetition rate. The mechanism of the cell activity modulation by the mechanical stimulation was investigated by this new method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

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：フェムト秒レーザー、衝撃力、細胞、カルシウムイオン、イメージング

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、生体組織内の力学構造により誘導される生体機能創発のメカニズムが注目されており、“メカノバイロジ”という新しい研究分野が注目されている。これまで、機械刺激に対する細胞応答は、培養基板を伸縮させる方法を用いて調べられてきているが、こ

の方法では特定の1細胞だけに力を加えたり、加えた力を定量化したりすることは難しかった。近年我々は、原子間顕微鏡（AFM）を用いて集光フェムト秒レーザーにより引き起こされる衝撃力を定量化することに成功しており、10ミクロン程度の細胞の特定箇所に1 μN 近くの瞬間的な力を付加し、

その力を定量化する技術を確立している。AFM探針により直接的に細胞を刺激する方法も提案されているが、この方法では完全に非接触に特定の細胞に衝撃力を付加することができ、さらには細胞内でも機械的な力を発生させることもでき、レーザー照射領域にある細胞以外にはその影響を一切与えない。(2)さらに、これまで神経細胞にカルシウムインディケーターを導入した系において、このフェムト秒レーザーの衝撃力により、その活性が促されることを示唆する基礎的なデータを得ることに成功している。

2. 研究の目的

(1)フェムト秒レーザーにより誘起される衝撃力を用いることにより、単一の細胞の機械刺激による応答を純粋に抽出できると考えられる。本研究では、細胞接着や細胞の機械的応答を専門とする近畿大学医学部・伊藤彰彦、単一細胞の刺激応答の可視化を専門とする愛知学院大学・古野忠秀らとの共同研究により、機械的刺激に対する1細胞レベルでの応答を細胞生物学的な観点から明らかにしようとした。フェムト秒レーザー誘起衝撃力による細胞の機械刺激方法を、細胞生物学における方法論として確立し、さらには細胞の機械刺激応答に対して新しい知見を得ることに挑んだ。

3. 研究の方法

(1)マウス筋芽細胞(C2C12)もしくは神経細胞を培養したガラスボトムディッシュを用意した。その培養液にレーザー照射30分前にカルシウムインディケーター蛍光試薬 fluo-8 を加え、細胞内に fluo-8 を取りこませた。ガラスボトムディッシュを倒立顕微鏡に配置し、20x 対物レンズ(NA=0.40)により、再生増幅器付フェムト秒チタンサファイアレーザー(波長 800 nm、パルス幅 125 fs)を標的細胞の縁から 10 μm の距離の測定溶液に集光照射し、衝撃力を印加した。レーザー照射のゲート時間を 100 ms に固定し、レーザーの発振繰り返し周波数を 10 Hz から 1 kHz に変化させることで照射回数を制御し、細胞への衝撃力の印加回数を調整した。この時、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を見るため、細胞内で Ca^{2+} と fluo-8 の結合により形成された蛍光分子を蛍光イメージとして検出した。本研究では、既存設備である 473nm レーザー励起の蛍光顕微鏡に加え、新たに 488nm 励起の共焦点蛍光顕微鏡システムを開発し、その観察に用いた。

4. 研究成果

(1)図1にフェムト秒レーザーを導入できるようにした共焦点蛍光顕微鏡システムを示す。検出用のフォトダイオードの手前に、フェムト秒レーザーの透過光や散乱光が入ら

ないように、色ガラスフィルターを組み込んだ。このシステムにより、培養動物細胞の蛍光イメージを秒速1コマ程度の速度で撮影しながら、その中で標的とする細胞にフェムト秒レーザー誘起衝撃力を付加し、その蛍光強度の時間変化を調べることに成功した

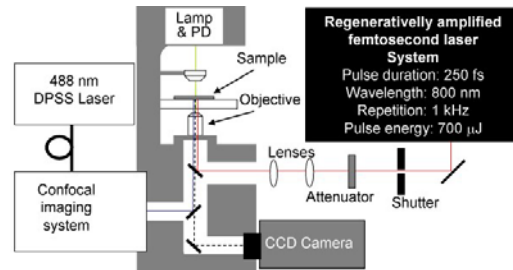


図1 フェムト秒レーザー付き共焦点蛍光顕微鏡システム

(2)C2C12 細胞の活性変化を照射パルス間隔依存性として調べた結果を図2に示す。レーザー照射強度 90 nJ/pulse 以上では、衝撃力の印加回数に依存したが、70 nJ/pulse では、衝撃力の印加回数依存性はみられなかった。90 nJ/pulse 以上にみられる照射回数に依存している成分は、複数回の衝撃力印加により、細胞膜が物理的損傷を受けたことに起因すると考えられる。一方、70 nJ/pulse にみられる衝撃力印加回数に依存しない応答は、細胞が 1 ms (1/1000 Hz) より短い時間を感じ、単発の衝撃力により、 Ca^{2+} 濃度に変化がもたらされたことを示唆する。

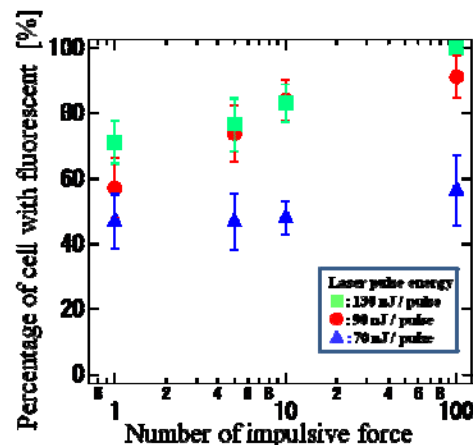


図2 フェムト秒レーザー誘起衝撃力によるC2C12 細胞のカルシウムイオン濃度の上昇確率のレーザー光強度とパルス繰り返し周波数依存性

(3)衝撃力による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の過程として (i) 細胞培養液中の Ca^{2+} が細胞内に流入した可能性、(ii) 細胞内に Ca^{2+} が貯蔵されている小胞体から細胞内に放出した可能性が考えられる。 Ca^{2+} を含まない Ca^{2+} -free 蛍

光測定用緩衝溶液を用いて同様の実験を行ったところ、 Ca^{2+} 濃度が増加する細胞はみられなかった。これは、衝撃力に起因する細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇における Ca^{2+} 濃度の上昇過程は、(i) に起因することを示唆する結果である。

(4)伊藤らにより作製されたマウスから摘出した初代培養神経細胞を培養した系を用いて、実験を実施した。図3に示すように、神経細胞を衝撃力により刺激することにより、その直後に神経細胞のカルシウムイオン濃度が増加する挙動が観察された。さらに、神経細胞とマスト細胞を共培養した系を用いて同様の実験を行った。そのとき、神経細胞からのシグナルがマスト細胞に伝達し、マスト細胞のカルシウムイオン濃度が増加する挙動が観察された。この結果は、培養皿上に無秩序に構成された神経細胞とマスト細胞間のコミュニケーションネットワークにおいて、神経のみを刺激し、神経細胞とのコミュニケーションのみでマスト細胞を1細胞レベルで刺激する新しい解析手法を確立したと位置づけられる。

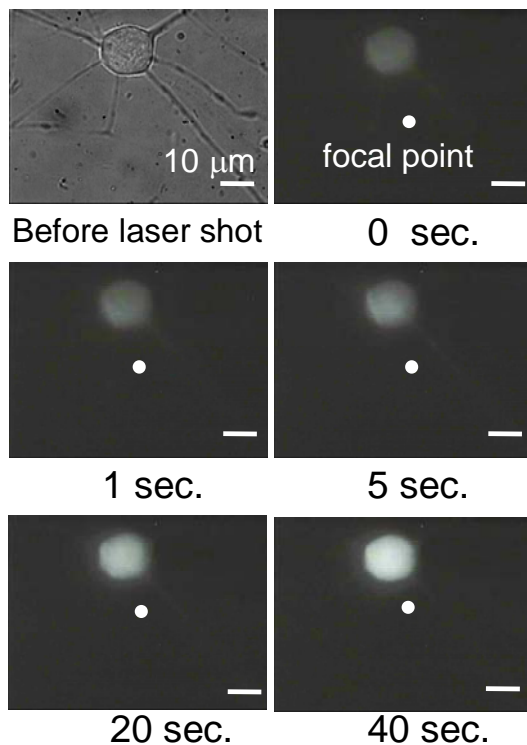


図3 フェムト秒レーザー誘起衝撃力により刺激された神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇

(5) 古野らにより、Transient receptor potential channels (TRP channels)を抑制したマウス筋芽細胞(C2C12)が作製された。TRP channels は、機械刺激により応答し、カルシウムイオンを細胞外から取り込む受容チャネルとして知られている。現在、正常細胞と数種類の TRP channels を抑制した細

胞に Fluo-8 を添加し、上記のレーザー照射・観察システムを用いて、その挙動を明らかにしようとしている。

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6件)

1. Yoichiroh Hosokawa, Hiroshi Masuhara, Takahiro Kaji, Three-dimensional analysis of tightly focused femtosecond laser beam and shockwave propagations in water, Int. J. Optomechatronics, in press (2012), 査読有
2. 細川陽一郎, 飯野敬矩, 萩山満, 伊藤彰彦, 原子間力顕微鏡を用いたフェムト秒レーザー誘起衝撃力の定量化—バイオメカニクスへの新しいアプローチ方法—, バイオイメーキング, Vol. 20, No. 1, pp. 7-12 (2012), 査読有
3. Yoichiroh Hosokawa*, Non-contact quantification of laser micro-impulse in water by atomic force microscopy and its application for bio-mechanics, Proc. SPIE, Vol. 8204, p. 82041D (2011), 査読有
4. Yoichiroh Hosokawa*, Mitsuru Hagiyaama, Takanori Iino, Yoshinori Murakami, and Akihiko Ito*, Non-contact Estimation of Intercellular Breaking Force Using Femtosecond Laser Impulse Quantified by Atomic Force Microscopy, Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 108, No. 5, pp. 1777-1782 (2011), 査読有
5. Man Hagiyaama, Tadahide Furuno, Yoichiroh Hosokawa, Takanori Iino, Takeshi Ito, Takao Inoue, Mamoru Nakanishi, Yoshinori Murakami, and Akihiko Ito*, Enhanced nerve-mast cell interaction by a neuronal short isoform of cell adhesion molecule-1, CADM1, J Immunol., Vol. 186, No. 10, pp. 5983-5992 (2011), 査読有
6. Yung-En Kuo, Cheng-Chi Wu, Yoichiroh Hosokawa*, Yasuyo Maezawa, Kazunori Okano, Hiroshi Masuhara, and Fu-Jen Kao, Local Stimulation of Cultured Myocyte Cells by Femtosecond Laser-Induced Stress Wave, Appl. Phys. A, Vol. 101, No. 4, pp.597-600 (2010), 査読有

[学会発表] (計19件)

1. 竹中将信, 細川陽一郎, AFM 探針に過渡的に誘導されるねじれ運動の解析, 2012 年春季 第 59 回 応用物理学関係連合講演会, 早稲田大学(東京), 2012 年 3 月 16 日, Oral
2. Yoichiroh Hosokawa, Non-contact quantification of laser micro-impulse in water by atomic force microscopy and its application for biomechanics, SPIE Smart

- Nano+Micro Materials and Devices, Melbourne, Australia, December 6, 2011, **招待講演**
3. 細川陽一郎, メカノバイオロジー分野における数値シミュレーションの可能性, COMSOL カンファレンス東京 2011, 秋葉原 UDX (東京), 2011 年 12 月 2 日, **基調講演**
 4. 竹中将信, 細川陽一郎, 微小生物組織と AFM 探針のレーザー 衝撃波の力学応答, COMSOL カンファレンス東京 2011, 秋葉原 UDX (東京), 2011 年 12 月 2 日, Poster
 5. Yoichiroh Hosokawa, Takanori Iino, Man Hagiwara, Mika Ohta, Akihiko Ito, Yutaka Takaoka, Mechanical ablation of biological tissue induced by focused femtosecond laser and its estimation by atomic force microscopy, 11th International Conference On Laser Ablation (COLA 2011), Cancun, Mexico, November 18, 2011, Oral
 6. Takanori Iino, Man Hagiwara, Furuno Tadahide, Akihiko Ito, Yoichiroh Hosokawa, Femtosecond laser estimation of the intercellular adhesion strength between neurite and mast cell part 2, 第 49 回日本生物物理学会年会, 兵庫県立大学(兵庫), 2011 年 9 月 18 日, Oral
 7. 古野忠秀, 柴田麻希, 寫田有希, 伊納義和, 中西 守, 神経刺激に伴うマスト細胞の脱顆粒に及ぼすプロポリスの影響, 日本薬学会第 131 年会, 静岡市で開催予定が中止となり要旨集で発表, 2011 年 3 月 31 日, Poster
 8. 細川陽一郎, フェムト秒レーザー誘起マイクロ津波による細胞操作, レーザー学会学術講演会第 31 回年次大会, 電気通信大学 (大阪), 2011 年 1 月 9 日, **招待講演**
 9. 平岡章宏, 飯野敬矩, 古野忠秀, 岡野和秀, 萩山満, 伊藤彰彦, 増原宏, 細川陽一郎, フェムト秒レーザー誘起衝撃力を用いた培養動物細胞の過渡力学応答の検討, レーザー学会学術講演会第 31 回年次大会, 電気通信大学 (大阪), 2011 年 1 月 9 日, Oral
 10. 飯野敬矩, 細川陽一郎, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 増原宏, フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した神経-マスト細胞間の接着力の時間変化の評価, 第 48 回日本生物物理学会年会, 東北大学(宮城), 2010 年 9 月 20 日, Poster
 11. 細川陽一郎, 飯野敬矩, 平岡章宏, 萩山満, 古野忠秀, 伊藤彰彦, 増原宏, フェムト秒レーザー誘起衝撃力による単一細胞の操作と刺激, 第 48 回日本生物物理学会年会, 東北大学 (宮城), 2010 年 9 月 20 日, Oral
 12. Tadahide Furuno, Relationship between calcium response and adhesion strength in nerve-mast cell Interaction, 第48回日本生物物理学会年会, 東北大学 (宮城), 2010年9月21日, Oral
 13. 細川陽一郎, 越智陽城, 飯野敬矩, 平岡章宏, 田中幹子, フェムト秒レーザー誘起衝撃力によるゼブラフィッシュ胚への生体分子導入(「量子エレクトロニクス分科内招待講演」), 第 71 回応用物理学学会学術講演会, 長崎大学 (長崎), 2010 年 9 月 14 日, **招待講演**
 14. Tadahide Furuno, Involvement of cell adhesion molecule 1 (CADM1) in nerve-mast cell communication, 14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, 2010年8月23日, Oral
 15. 細川陽一郎, 超短パルスレーザー誘起衝撃力による細胞操作とその定量評価, 第73回レーザー加工学会, 大阪大学 (大阪), 2010年5月25日, **招待講演**
- 他 4 件
- 〔図書〕 (計 2 件)
1. 細川陽一郎, 先端固体レーザー」第 8 章 2 章 1 0 項「バイオ応用」(pp.304-306), オーム社(2011)
 2. 細川陽一郎, 「リアルタイム計測による生命現象の解析」第 4 章 フェムト秒レーザー誘起衝撃力を利用した細胞接着力の非接触計測 (pp.33-41), 株式会社シーエムシー出版(2011)
- 他 1 件
- 〔その他〕
ホームページアドレス
<http://hskw.jp>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
細川陽一郎(HOSOKAWA YOICHIROH)
奈良先端大学院大学・物質創成科学研究科・特任准教授
研究者番号：20448088
 - (2) 研究分担者
伊藤彰彦(ITO AKIHIKO)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号：80273647
- 古野忠秀(FURUNO TADAHIDE)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号：80254308