

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15072

研究課題名(和文)細胞膜構造の可逆的光応答による興奮性細胞活動の非接触制御

研究課題名(英文)Optical Regulation of exciting cells

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) 2,100,000円

研究成果の概要(和文): 低分子の光感受性物質を用い、興奮性を持つ心筋細胞を始め、いくつかの生物種の細胞の活動を、光照射によって制御する研究を行った。光感受性物質が細胞外液に存在する時、照射する光の波長に依存して、細胞膜構造が可逆的に変化することを電子顕微鏡などを用いて視覚的に確認した。また、その変化に依存して細胞活動が変化することが示唆された。この仕組みを応用することで、アクチュエーターの動力源などへの応用が期待できる。

研究成果の概要(英文): We conducted a study to control the activities of cells of several organisms, such as exciting cardiomyocytes, by light irradiation with simple photo-sensitive molecules. When the photosensitizing substance was present in the extracellular liquid phase, electron-microscopic observation showed that the cell membrane structure reversibly changed depending on the wavelength of the irradiated light. It is suggested that such changes of the cellular activities are modifying by changing property of the membrane by irradiating light. One of the application of the system, micron-scaled power source for microactuators and so one will be realized.

研究分野：生命科学

キーワード：光刺激 光応答 心筋細胞 興奮性 アゾ化合物

1. 研究開始当初の背景

この申請課題においては、光によって構造が変化する光感受性低分子化合物を細胞外液に混在させておき、外部からの光照射によって細胞活動を非接触かつ可逆的に制御することを試みた。

最近、神経細胞等の興奮性を示す細胞において、チャンネル蛋白を部分的に修飾したり、構造を変えたりすることによって、興奮性応答などの細胞活動に対する光応答性を実現し、光照射によって制御しようとする試みがなされている。いくつかの系で光応答を示す事が確認されている。

この一方で、申請者は、これまでに、代表的な光スイッチング分子であるアゾベンゼンの誘導体を培養心筋細胞外液に混入させておき、外部から光を照射することによってアゾベンゼンの構造変化を引き起こし、その結果として心筋細胞の収縮活動を制御できることを見出している。この系では、心筋細胞の収縮挙動は、可視光の照射によって停止し、紫外光照射によって再開する。この系を進展させ、実際の心臓器官の活動制御まで拡張し、心臓の収縮活動そのものを、非接触で停止/開始させることを試みる。

2. 研究の目的

この課題においては、これまでに明らかになっている興奮性細胞活動の光制御の機構を細胞膜の物性変化の面から解明すること、および、光照射による細胞内への物質導入など、新たな方向への発展を目指す。このため、光スイッチング挙動を示す分子を用い、細胞との相互作用を検討することで、(1)光照射による細胞膜の構造変化と細胞活動制御機構の解明、(2)細胞膜透過性の可逆的变化を活用した物質移送の調節、(3)光照射による心臓活動の制御、(4)多様な細胞の光制御、という4テーマについて重点的に研究を進める。

研究代表者らによって開発された方法は、光スイッチング分子を細胞培地に混入させておくという極めて簡便な操作によって、細胞の活動を光で制御できるというものである。この系では、細胞の活動は、光が照射されている領域でのみ、非接触で可逆的に変化させることが可能であることが最大の特徴となる。このことから、照射領域や照射光強度を適切に調節することによって、ミクロスケール(例えば、単一細胞レベル)から、マクロスケール(例えば、器官としての心臓全体)に亘る、様々なレベルで細胞活動の光制御を行なうことも可能であると考えられる。この研究において、生体内で自励発振を示す組織や器官の活動制御を可能とし、化学/生物学/ナノ工学/組織工学/臨床医学など、非常に広範囲に亘る応用に向けた基礎的知見を得たい。

3. 研究の方法

この研究では、光照射による細胞機能制御について、機構の解明と、応用展開を図るため、すで実現している心筋細胞活動の光制御系について、いまだ明確となっていない制御メカニズムを解明し(テーマ1)、その特性を用いることで、細胞内への物質移送を制御することを可能とする(テーマ2)。また、これらの結果から得られた知見を基に、細胞レベルから、より大きな組織について、活動の根源となる部分を制御することによって全体の制御を可能とする系の実現(テーマ3)、心筋細胞以外の細胞での光応答(テーマ4)のそれぞれについて研究を行なった。

(1) 光照射による細胞膜の構造変化と細胞活動制御機構の解明

申請者らのこれまでの研究により、照射する光の波長に応じて、アゾ化合物の心筋細胞表面への吸着量が可逆的に変化する事が示されている。最近、このアゾ化合物を、人工のリン脂質二分子膜の小胞であるリポソームに作用させた時、照射する光によって、イオンの膜透過性が変化する事が分かった。リポソームにはチャンネル蛋白が含まれていないことから、アゾ化合物によって細胞膜の構造が何らかの変化を示すものと考えられる。このため、リポソームならびに実際の心筋細胞において、アゾ化合物存在/非存在条件下で、光照射によって生じる膜構造の変化を、SEMを中心とした顕微鏡観察によって明らかにし、構造の面から機構の解明を試みる。

(2) 細胞膜透過性の可逆的变化を活用した物質移送の調節

アゾ化合物の存在下、無機イオン・低分子化合物・高分子化合物の膜透過が光照射によってどのように変化するかを調べる。実験には、取扱いと解析が簡単なリポソーム系を中心に行ない、後に心筋細胞へと発展させる。リポソーム系では物質の封入も容易であるため、小胞内外で物質の移動が生じた場合に蛍光を発する系(DNAと標識蛍光物質など)や、あるいは消光する系(コバルトイオンとカルセインなど)などについて挙動を確認した後、実際の細胞での挙動についても確かめる。このことで、膜構造が光に応答することで性質が変化し、細胞活動に影響を与えるということについての間接的な証明となる。

(3) 光照射による心臓活動の制御

培養細胞系を拡張し、心臓全体の光制御を試みる。生じる心臓全体の活動の変化を、膜電位感受性蛍光色素によるイメージングを行なうことで定性化する。実際の生体組織の光制御系の構築に向け、アゾ化合物濃度や作用の方法、照射光強度など、膜構造観察結果

も含めて基礎的知見を蓄積し、洞結節活動の調節による心臓拍動制御方法の確立を目指す。

(4) 多様な細胞の光応答

興奮性あるいは振動性を示す細胞は生体内に複数存在する。心筋細胞はその代表的な細胞となる。本光制御系の応用を目指し、様々な種類の細胞について、心筋細胞と同様の光応答性を検証する。同時に、工学的および医学的な応用展開の可能性について探る。

4. 研究成果

本研究では、細胞サイズから細胞集団に亘る様々なレベルにおいて、光照射という、非接触で非侵襲な方法により、細胞機能の制御が可能であることを実験的に示した。また、蛍光観察等の結果から、光制御は、アゾ化合物と細胞膜との相互作用によるものであることが示唆された。これは、これまでの細胞活動の制御に関する実験結果を矛盾なく説明でき、また、原理としては簡単なものであることから、様々な面への発展が可能であると考えられる。例えば、この研究によって得られた知見を基にして研究を進展させることにより、マイクロアクチュエーターの動力源や、薬剤放出性カプセルの構築などが実現可能であると考えられる。

この研究は、将来的な応用を視野に入れた基礎的研究である。研究を進める過程で、様々な問題点や課題も同時に明らかとなった。今後解決しなければならない課題を明確にできたことは、今後研究を進展させていく上で極めて貴重かつ重要な情報であり、これも萌芽研究としての成果と言える。

各項目における主な結果と、課題として挙げられる問題点は下記の通りである。

(1) 膜構造の変化の観察

心筋細胞にアゾ化合物を作用させ、さらに光を照射した場合の表面状態を電子顕微鏡によって観察した。この結果、通常の状態と比較し、アゾ化合物が作用することで細胞膜が脆弱になり、簡単な機械的刺激によって破壊されやすくなるが、特定の波長の光を照射することで、この破壊が回復することを視覚的に確認した。

これまでの研究で、実験に用いているアゾ化合物は細胞膜表面に吸着しやすく、また、適切な照射光によって膜面から脱離することが分光学的濃度測定から明らかになっている。このアゾ化合物は界面活性剤としての性質を有しており、今回の測定結果から、このアゾ化合物が膜表面へ吸着することで細胞膜が脆くなり、わずかな機械的刺激でも破壊が起こりやすくなること考えられる。光のオンオフに対応して細胞活動を制御できる理由としては、この細胞膜の物性変化の寄与が大きいと思われるため、この強度の変化を、

例えば粘弾性測定などにより数値化し、定量的な議論を行なうことが今後の課題となる。

(2) 膜透過性の観察

コバルトイオンによって消光する蛍光色素のカルセインを、リン脂質からなるリポソーム内に封入し、アゾ化合物を作用させた時の、リポソーム外に添加しておいたコバルトの膜透過を蛍光強度測定によって観察した。蛍光色素封入リポソームの作成には、単純水合法を用いた。

測定の結果、紫外線を照射している間はリポソーム内の蛍光色素は蛍光を発するが、照射をやめると消光することを確認した(図1)。これは、上記の膜物性の脆弱化と併せると、アゾ化合物の作用によって細胞膜構造が乱れ、イオンの膜透過性が増大しているものと考えられる(図2)。

同様の実験は、培養した心筋細胞においても行なった。カルセインを細胞内に導入し、アゾ化合物と照射光の組み合わせを複数選択し、細胞内から発せられる蛍光を蛍光顕微鏡によって観察した。

この系においても、アゾ化合物が存在している場合でも、紫外線照射下においては蛍光が見られるが、照射をやめると速やかに消光する事が確認された。この実験結果は、リポソーム系や、これまでの結果と同様、細胞膜の構造変化に起因するものと考えられる。

これらの結果から、細胞膜の物性が可逆的に変化し、それがイオンの膜透過に大きく関与していることが示された。

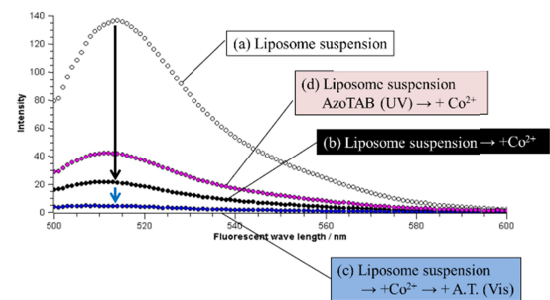


図1 蛍光強度測定の結果

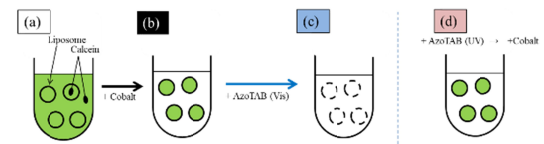


図2 考えられる機構の模式図

(3) 心臓組織の活動制御

最初の試みとして、心臓全体に対してアゾ化合物を作用させた。この場合では、心臓の拍動活動自体が消滅し、光照射を行なった場合、局所的な痙攣様の挙動は見られたものの、培養細胞で見られたような興奮活動が再開

することはなかった。これは、細胞膜に対してアゾ化合物が極めて大きく相互作用してしまい、また、照射光の到達領域が非常に限られたものであり、用いている照射光が組織深部にまで到達できない事に起因するものと考えられる。確認のため、実験終了後、細胞観察を行なったところ、アゾ化合物の吸着に伴ない、細胞が完全に壊死していることが分かった。

このため、心臓を酵素処理して細胞を分散し、得られた心筋細胞や、個々の細胞レベルより大きな領域としての心房部位や心室部位などを取り出して、アゾ化合物との相互作用と、その影響を調べた。その結果、個別の細胞や、器官内の組織切片レベルにおいてまでは、単層培養細胞の場合と同様、明確な光応答性が見られた。

これらの事から、今回用いたアゾ化合物は、細胞膜と強く相互作用し、容易に脱離しない傾向があることが示された。

最適な化合物の探索のため、水溶性を変えた類似物質も数種類合成し、細胞への影響を調べたところ、特に疎水性の大きい物質ほど、細胞へのダメージも大きくなる傾向があった。本研究は、低分子化合物の細胞への吸脱着制御とも言えるが、疎水性が高くなることによって細胞膜との相互作用が大きくなり、脱離しにくくなると推測される。このように、用いている物質の細胞毒性が、より明確になると共に、今後は生体に対して毒性の低く、生体適合性の高い物質の開発が必要である。

(4) 哺乳類以外の細胞の光制御と応用

哺乳類以外の生物細胞として、容易に採取や実験が可能である節足動物や軟体動物の細胞など、何種類かの細胞を用いて、アゾ化合物による光応答性をみた。

これらの細胞においても、心筋細胞と同様、光照射によって例えば細胞の動きに大きな変化を引き起こす光制御系の構築が可能であることを確認した。特に運動系への影響が大きく、筋肉や、その類似組織において、心臓の場合と同様、細胞あるいは細胞集団レベルでの細胞活動をほぼ完全に制御することが可能である。

これらの細胞は、哺乳類の心筋とは異なり、入手や加工が容易であり、耐久性も併せ持つことから、ヒトへの適合性の面で問題があるものの、様々な発展が見込まれる。

5 . 主な発表論文等

海外の研究者との連携により研究を進めたが、論文作成に際して、情報の交換がスムーズに進まなかった面がある。このため、現時点においては、投稿中の論文が1点、投稿準備中の論文が2点という状況である。

また、学会発表や書籍での発表についても、論文発表を優先し、論文掲載後の報告とする

ため、本申請課題に関する発表は控えることとしている。

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