

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 5月17日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22860002

研究課題名（和文） 赤外分光を用いた骨系細胞の力学応答現象計測

研究課題名（英文） Monitoring of cellular response to applied mechanical stimulus in bone cells by infrared spectroscopy

研究代表者

青沼 有紀 (AONUMA YUKI)

東北大学・電気通信研究所・助教

研究者番号：80582262

研究成果の概要（和文）：赤外分光法を用いた生体分子の非標識・経時的観察法を、骨系細胞の力学応答現象の計測手法に適用することを試みた。赤外分光の光路となる半導体プリズムを細胞培養基板として用いることにより、基板上的培養接着細胞の情報が赤外光の吸光度として検出されることを確認した。また、赤外分光装置内に細胞外液の流れ刺激を模す力学実験系への展開が可能な細胞培養観察系を構築するとともに、それらを用いた赤外分光計測による細胞動的過程の検出・評価法に関する知見を得た。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed to apply infrared spectroscopy as a label free and real-time monitoring method for detecting cellular response to applied mechanical stimulus in bone cells. Infrared light penetrated through semiconductor prism was probed activity of adhesive cells on the prism as infrared absorption. In addition, live cell monitoring apparatus was fabricated for detecting kinetic information of target cells, which was applicable to experimental system to apply fluid flow stimulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	850,000	255,000	1,105,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,950,000	585,000	2,535,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：細胞情報・動態，骨芽細胞，赤外分光

1. 研究開始当初の背景

骨は、重力や荷重などの力学的環境に適応する形で自らの構造を変化させることが知られている。このような骨の再構築（リモデリング）現象は、骨組織表面及び内部に存在

する骨系細胞の骨代謝活動の結果として生じる。したがって、力学環境の変化にともなう骨の適応的变化においては、骨への力学的負荷がこれらの骨系細胞群の調節因子として機能するメカニズムが存在すると考えられている。

申請者らは、これまで、骨系細胞のひとつである骨細胞の力学刺激応答メカニズムに関する研究成果を報告している。これらの細胞レベルでの検討結果を踏まえて、骨細胞の力学刺激感知メカニズム、およびその後の骨代謝制御に関与する応答現象を解明するための次なるステップとしては、力学刺激の付与に対する、骨細胞を含む骨系細胞の細胞応答現象を包括的に検討することが望まれる。

一方、骨代謝現象にともなう骨系細胞の生化学的活動の計測は、細胞に対する力学実験後に、培地に含まれる骨代謝調節因子の量を分析する手法や、骨組織または細胞を固定したのち、組織染色や蛍光標識をおこなう手法により検討されている。骨細胞への力学刺激の入力が、骨系細胞群への制御因子などの作用を経て骨代謝現象に至ることを考慮すると、力学刺激の付与に対する細胞の経時的な応答現象をとらえる手法により、骨系細胞への力学刺激情報の入力（初期応答）と、細胞の骨代謝調節因子の産生などの動的過程を直接的に関連付ける研究が望まれる。

2. 研究の目的

本研究は、赤外分光法を用いた生体分子の非標識・経時的観察法を、骨系細胞の力学応答現象の計測手法に適用する。赤外分光法は、試料に赤外光を照射することで分子振動を励起し、それにとまなう光のエネルギーの吸収から、試料の分子結合状態に関する情報を得る手法である。計測にとまなう標識を必要とせず、観察対象の情報を赤外吸収スペクトルとして検出することから、生体分子試料に対する非標識・非破壊の測定が可能である。赤外分光法を用いた骨系細胞の力学応答特性の経時的観察系が確立されれば、力学的環境下における骨系細胞の生化学的応答現象や、細胞動態に関して、さらなる理解が得られると考えられる。

3. 研究の方法

力学刺激の付与条件下における骨系細胞の細胞応答現象を、赤外分光を用いて観察・評価するため、赤外分光装置の試料室内に骨系細胞経時観察系を設計・構築した。

赤外分光法に基づく生体情報の検出には、多重内部反射法を用いた。本手法は、半導体結晶内に入射した赤外光により、結晶表面上に生じるエバネッセント場を利用して結晶表面上の吸着物を検出する。このことから、測定に際して試料に対する赤外光の直接照射がなく、また、結晶表面の液中因子、および、結晶表面に近接する生体分子などの検出が可能である。本研究では、赤外光の光路となる半導体プリズムを組み込んだ細胞培養

セルを設計・構築し、赤外分光装置の光学系内に配することにより、細胞培養セル内の細胞の情報を、赤外吸収スペクトルの経時変化として検出した。

また、細胞の初期応答現象、および、細胞動的過程検出のための因子の検討をおこなうとともに、赤外分光計測に基づく生化学因子投与下における細胞動的過程の評価をおこなった。

4. 研究成果

(1) 赤外分光計測による培養細胞観察系の構築

赤外分光計測において赤外光の光路となる半導体プリズムを組み込んだ細胞培養セルを製作した。これは、テフロン製溶液セルの側面または底面が半導体プリズムで構成されており、生体由来分子を含む懸濁液、ならびに培養細胞などの試料に含まれる分子の結合状態を赤外吸収スペクトルとして検出することを意図している。半導体プリズムを底面、すなわち培養基板とするセルを用いて細胞を培養し、赤外分光装置の光学系内に配することにより、赤外分光装置による培養細胞の観察をおこなった。検出された赤外吸収スペクトルから液体培地由来の赤外吸収スペクトルを差し引いたところ、 1650 cm^{-1} および 1550 cm^{-1} 近傍においてスペクトルピークが検出された。これらのスペクトルピークは、それぞれアミド結合の-CO-結合部位の伸縮振動モード (1650 cm^{-1})、ならびに N-H 部位の偏角振動モードと C-N 部位の振動モードに (1550 cm^{-1}) それぞれ帰属する。これらのスペクトルピークは、プリズムのみの場合や、培養セル内に蒸留水を満たした場合には検出されず、液体培地由来のスペクトルピークに比して高いピーク強度で検出されたことから、溶液中の生体試料のタンパク質に由来するアミド結合のスペクトルピークが検出されているものと考えられる。

細胞培養セル中の試料の検出は、プリズムに対する接着／非接着を問わない結果が得られた。細胞培養セルに浮遊細胞や生体分子を含む懸濁液を添加した場合においても、プリズムに接着した細胞と同様にスペクトルピークが検出された。これにより、多重内部反射法による赤外分光計測が、生体分子や細胞の非侵襲・非標識計測法に適用できることを確認した。

(2) 骨系細胞に対する力学実験系の設計

力学的因子の作用下における骨系細胞の赤外分光計測を実現するため、赤外分光装置内の培養細胞観察系に対する力学実験系の構築を試みた。骨組織中の骨系細胞が感知す

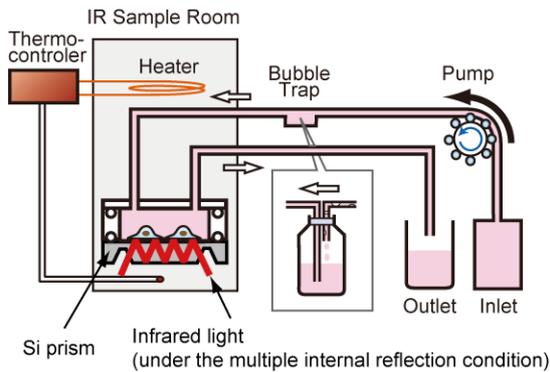


図 赤外分光による培養細胞観察系と灌流路を用いた細胞への力学実験系

る力学刺激の形態のひとつに、骨基質の中で生じるとされる細孔（骨小腔・骨細管）中の細胞外液の流れが挙げられることから、細胞培養セルに灌流路を接続し、培地の灌流にともなう流れ刺激による力学刺激の付与方法を検討した（図）。しかしながら、骨系細胞の力学刺激応答を惹起する生理的レベルの刺激とされる ~ 2.4 Paの付与に耐えうる細胞培養セル設計、ならびに、流れ刺激の付与にともなう培養基板として用いた Si プリズムからの培養細胞の剥離など、力学実験に際しての細胞培養観察系、および、力学実験系の最適化には至らなかった。気密性の高い細胞培養セルの再設計と、Si プリズム表面の改質による細胞接着性の向上が、今後の検討課題として挙げられる。

(3) 細胞分化過程の長期的計測

灌流培養環境下での培養細胞の赤外分光計測系の構築は、赤外分光装置の試料室内での細胞試料の長期間培養（ ~ 7 days）を実現した。この培養細胞観察系を用いて、細胞の長期的な動的過程のひとつである分化過程に着目し、赤外分光計測による細胞分化過程の評価法を検討した。

脂肪前駆細胞 3T3-L1 は、分化誘導剤の添加により、10 days 前後で脂肪細胞に分化する。この分化過程を赤外分光を用いて経時的に観察するため、分化誘導剤の添加後に赤外分光装置内での長期間培養をおこなった。脂肪細胞への分化過程の赤外分光計測においては、時間の経過にともないエステル結合に帰属される 1739 cm^{-1} 周辺の赤外吸収スペクトルピークの増強が認められ、3T3-L1 の分化にともなう脂肪合成を赤外吸収スペクトルピークの経時変化として検出した。

この観察系を用いて、薬剤投与下の脂肪前駆細胞3T3-L1の脂肪細胞への分化過程を経時的に計測した。抗肥満作用として脂肪滴形成を促進する薬剤（Pioglitazone）、ならびに、脂肪生成を阻害する薬剤（Genistein）投与

下において脂肪細胞への分化過程の赤外分光計測を試みたところ、それぞれ赤外吸収スペクトルピーク強度の増加、減少が計測された。これらの赤外吸収スペクトルの経時変化は、それぞれの薬剤投与にともなう脂肪合成促進と脂肪合成阻害に由来すると考えられる。

また、細胞培養セル中の試料に対し、赤外分光計測と並行して光学顕微鏡による観察をおこなった。脂肪細胞分化の経時的計測において、脂肪合成に由来する赤外吸収スペクトルピーク強度の増加が、光学顕微鏡観察により脂肪滴形成が認められるよりも早く検出される様子が観察された。このことは、赤外分光を用いた非標識計測法が、細胞の動的過程にともなう形態変化に先行する細胞内組成の変化を計測しうる手法であることを示している。

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1件）

- ① Ryo-taro Yamaguchi, Ayumi Hirano-Iwata, Yuki Aonuma, Yuya Yoshimura, Yasuo Shinohara, Yasuo Kimura and Michio Niwano, Real-time monitoring of mitochondrial adenosine 5'-triphosphate synthesis and hydrolysis by surface infrared spectroscopy, Applied Physics Letter, 査読有, Vol. 98, No. 13, 2011, pp. 133703

〔学会発表〕（計5件）

- ① 青沼有紀, 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫
表面赤外分光法を用いた脂肪細胞分化過程の非標識計測, 平成23年度日本表面科学会東北・北海道支部学術講演会, 2012年3月9日, 仙台
- ② Yuki Aonuma, Yasuhiko Kondo, Ayumi Hirano-Iwata, Yasuo Kimura, Yasuo Shinohara and Michio Niwano
Long-term Monitoring of Cell Differentiation Using Surface Infrared Spectroscopy, The Sixth International Symposium on Surface Science, Dec 14, 2011, Tokyo
- ③ 青沼有紀, 近藤康彦, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫
表面赤外分光法に基づく細胞分化過程の非標識観測, 第72回応用物理学会学術講演会, 2011年8月31日, 山形

- ④ 青沼有紀, 山口僚太郎, 阿部真帆, 平野愛弓, 木村康男, 篠原康雄, 庭野道夫, 表面赤外分光法を用いたミトコンドリア内 ATP 合成過程のリアルタイム評価, 第30回表面科学学術講演会, 2010年11月4日, 大阪
- ⑤ Yuki Aonuma, Ryo-taro Yamaguchi, Maho Abe, Ayumi Hirano-Iwata, Yasuo Kimura, Yasuo Shinohara and Niwano Michio, Surface Infrared Spectroscopic Study of ATP Synthesis in Mitochondria, 2010 International Conference on Solid State Devices and Materials, Sep 23, 2010, Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青沼 有紀 (AONUMA YUKI)

東北大学・電気通信研究所・助教

研究者番号 : 80582262