

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82406

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23657102

研究課題名(和文)レーザー光照射が細胞に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文)The Influences of Laser Irradiation on Cells

研究代表者

櫛引 俊宏(Kushibiki, Toshihiro)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・准教授)

研究者番号：30403158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多くの種類の細胞へ、種々の波長のレーザー光を照射した後の細胞の反応を研究した。本研究は、レーザー光がおよぼす生体作用の解明だけでなく、レーザー光による細胞機能制御のために必要な研究である。

細胞内で発生する活性酸素種(Reactive Oxygen Species: ROS)は多くのタンパク質の発現の引き金となっていることが知られており、ROS量が多いと細胞死に至るが、細胞死に至らない量のROSは細胞内でセカンドメッセンジャーのような振る舞いを見せる。本研究では種々のレーザー光を多種の細胞へ照射後の細胞内ROS発生量に着目して研究を行った。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) production after laser irradiation in various types of cells. ROS are considered to be the key secondary messengers produced by low-level laser therapy (LLLT). Although various mechanisms for the effects of LLLT have been proposed, and intracellular ROS were indicated as the one of the key factors, direct measurement of intracellular ROS of several types of cells after different wavelength lasers irradiation has not been reported.

After a blue laser irradiation, intracellular ROS levels were increased in all types of cells. In contrast, intracellular ROS generation was not observed after irradiation with a red laser or near-infrared laser. Potential sources of intracellular ROS were excited by blue laser irradiation, resulting in ROS production within cells.

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：レーザー 細胞 機能制御 光

1. 研究開始当初の背景

再生医療に有望な幹細胞などが有する機能を非侵襲的に制御することは、疾病の治療・予防にとどまらず、基礎生物医学実験などにも有用なツールとなる。そこで、これまでの研究では安全に細胞機能を制御する方法として光技術を応用してきている。この研究は遺伝子改変や薬剤を利用しない革新的かつ挑戦的な手法である。これまでの結果として、骨髄から採取した間葉系幹細胞に 405 nm のレーザー光を照射することにより、幹細胞が骨芽細胞または軟骨細胞に分化促進し、脂肪細胞への分化が抑制される現象を発見している。そのメカニズムとして、細胞内の光受容体や体内時計関連遺伝子の解析を行っている。しかしながら、レーザー光照射が及ぼす細胞への影響について、レーザーの波長や細胞種を網羅的に解析した研究報告はない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、多くの種類の細胞へ、種々の波長のレーザー光を照射した後の細胞の反応を研究した。本研究は、レーザー光がおよぼす生体作用の解明だけでなく、レーザー治療やレーザー光による細胞機能制御のために必要な研究である。

一方、細胞内で発生する活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は多くのタンパク質の発現の引き金となっていることが知られており、ROS 量が多いと細胞死に至るが、細胞死に至らない量の ROS は細胞内でセカンドメッセンジャーのような振る舞いを見せる。レーザー光照射後に細胞内で ROS が発生するという報告があることから、本研究では種々のレーザー光を多種の細胞へ照射後の細胞内 ROS 発生量に着目して研究を行った。

3. 研究の方法

細胞に物理的負荷をかけずに、任意の光強度・波長を照射可能な既存の細胞培養装置は存在しない。そこで、新規ハイスループット光照射システムを開発・改良した。光照射用自動ステージに 96 well プレート装着させたスクリーニングシステムを用い、各種レーザー光源を用いた細胞への照射を効率よく、光照射以外のストレス (温度上昇など) が細胞へ負荷しないシステムを構築した。本研究では、波長 405 nm、664 nm、808 nm の半導体レーザーを使用した。細胞へのレーザー照射条件は 100 mW/cm² で 60 秒または 120 秒とした。使用した細胞は mouse preadipocytes (3T3-L1), prechondrocytes (ATDC5), myoblasts (C2C12), mesenchymal stromal cells (KUSA-A1), lung cancer cells (LLC), insulinoma cells (MIN6), fibroblasts (NIH-3T3), human cervix adenocarcinoma cells (HeLa), macrophages differentiated from lymphocytes (THP-1) after treatment

with phorbol ester および rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3) を用いた。

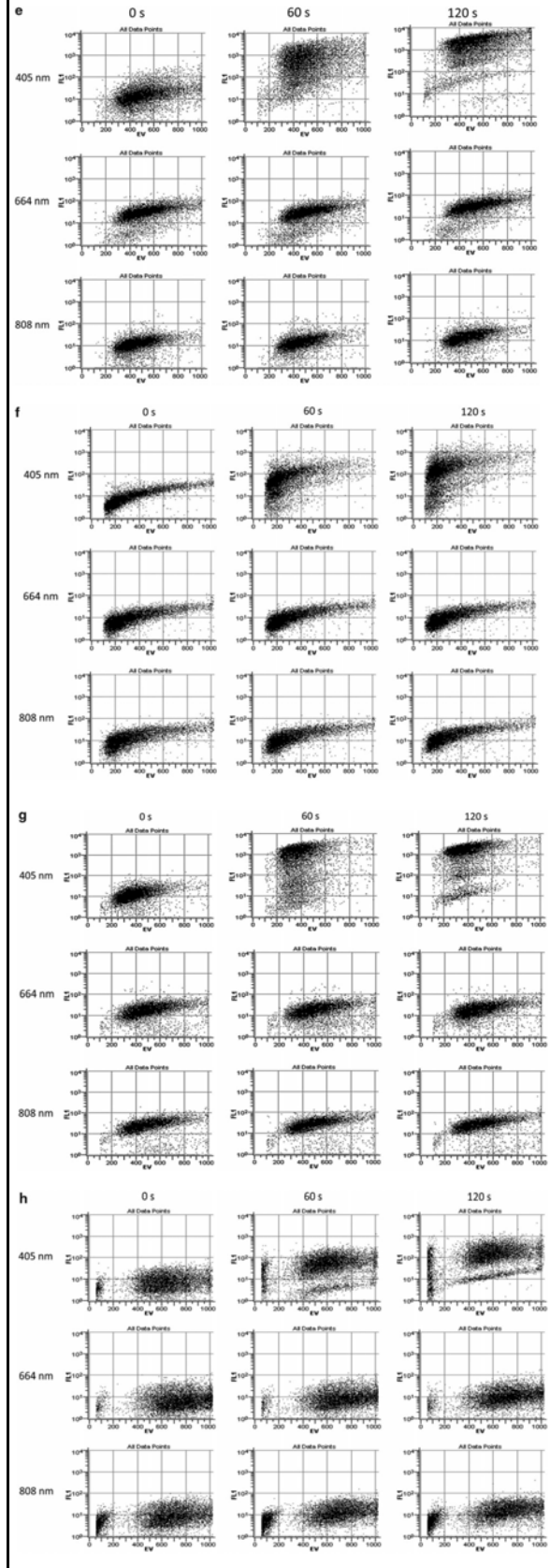
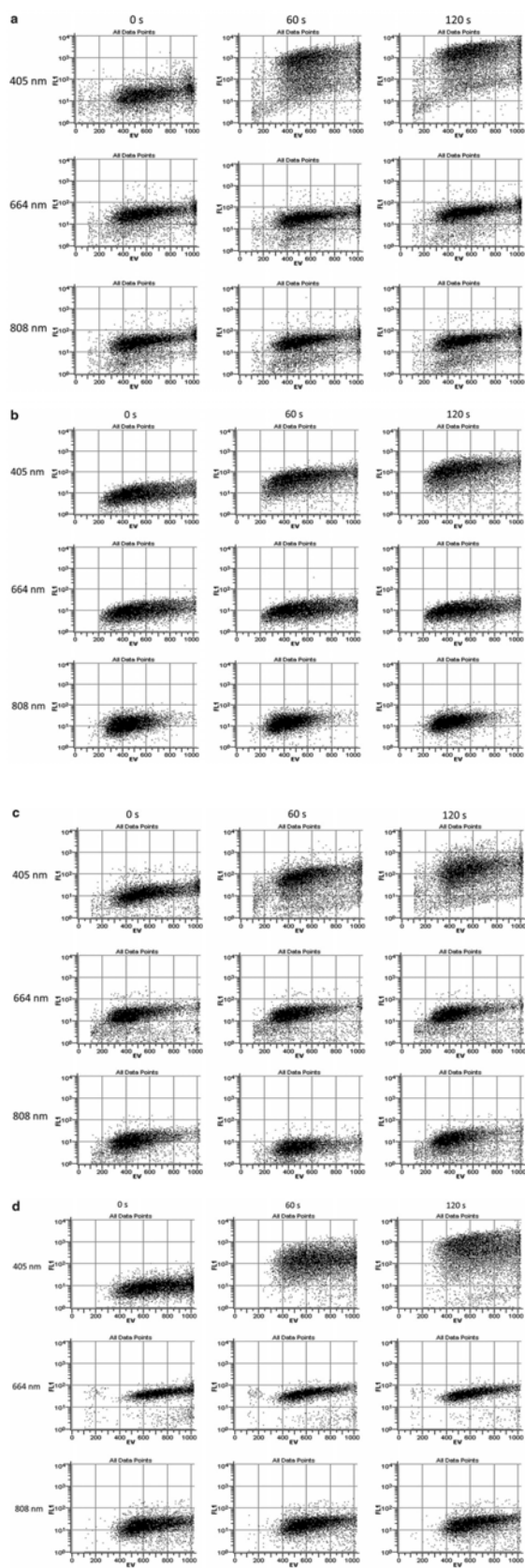
細胞内の ROS の定量は CM-H₂DCFDA を用いた。細胞内に CM-H₂DCFDA が存在する状態で ROS が生成すると、蛍光強度が増加する蛍光指示薬である。8.65 μM の CM-H₂DCFDA 水溶液中で種々の細胞を遮光下 30 分間 incubate し、CM-H₂DCFDA を細胞へ取り込ませた。その後、種々のレーザーを 100 mW/cm² で 60 秒または 120 秒間照射した。レーザー照射後ただちに細胞を回収し、flow cytometer (Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter K.K.) により細胞 1 つ 1 つの蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

Figure に flow cytometer の結果を示す。すべてのグラフで縦軸は ROS と反応した CM-H₂DCFDA の蛍光強度、横軸は細胞の大きさの指標となる数値を示した。いずれの細胞を用いた場合においても、今回の実験でのレーザー照射条件においては、波長 405 nm のレーザーを照射した場合のみ細胞内で ROS が検出された。しかしながら、その ROS 量は細胞種によって異なることが明らかとなった (Table)。細胞内で発生する ROS は多くのタンパク質の発現の引き金となっていることが知られており、NF-κB を中心とした転写因子が重要な役割を担っている。本研究では、比較的波長の長いレーザーよりも波長の短いレーザーのほうが細胞内 ROS 産生量を増加させることを明らかにした。この結果は、今後、レーザーと生体 (細胞) の相互作用解明やレーザー治療に用いるレーザーの選択に有用な情報を提供するものである。

Figure

Several cell types were subjected to laser (wavelength: 405, 664 or 808 nm) irradiation for 0, 60, or 120 sec: (a) mouse preadipocytes (3T3-L1), (b) prechondrocytes (ATDC5), (c) myoblasts (C2C12), (d) mesenchymal stromal cells (KUSA-A1), (e) lung cancer cells (LLC), (f) insulinoma cells (MIN6), (g) fibroblasts (NIH-3T3), (h) human cervix adenocarcinoma cells (HeLa), (i) macrophages differentiated from lymphocytes (THP-1) after treatment with phorbol ester, and (j) rat basophilic leukemia cells (RBL-2H3). Following irradiation, intracellular ROS levels were measured by flow cytometer. The y-axis indicates the fluorescent intensity of the ROS indicator, CM-H₂DCFDA. The x-axis indicates the electronic volume (EV), which reflects cell size.



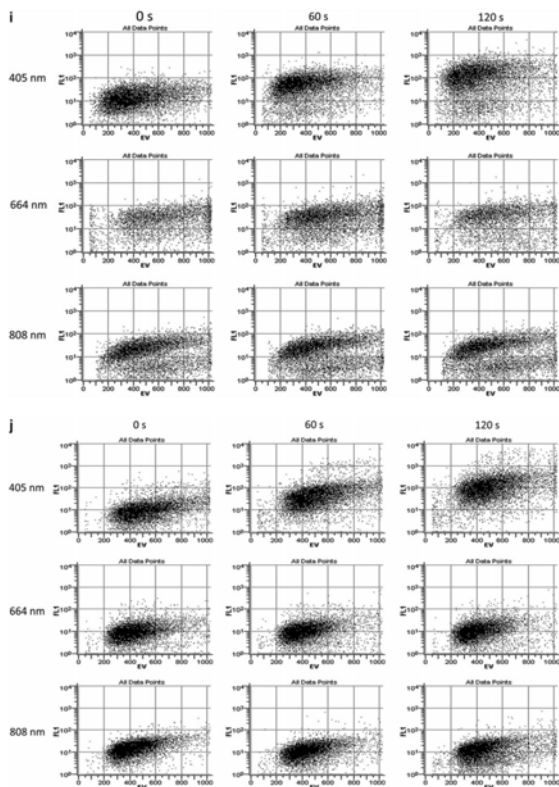


Table
The observed percentages of intracellular ROS: Produced by each cell line after blue laser irradiation.

Cell line	Irradiation time	
	60 sec	120 sec
3T3-L1	70.8±7.3	82.9±10.3
ATDC5	29.0±6.8	52.0±6.9
C2C12	27.2±5.4	58.1±8.6
KUSA-A1	58.9±6.5	80.7±8.5
LLC	51.6±6.4	70.8±11.1
MIN6	24.1±4.1	56.8±8.1
NIH-3T3	48.6±6.0	72.1±8.9
HeLa	27.4±4.9	75.5±5.3
Macrophages differentiated from THP-1	16.6±3.9	44.5±8.4
RBL-2H3	12.0±3.7	44.3±5.7

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計3件)

1. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M.: Blue laser irradiation generates intracellular reactive oxygen species in various types of cells. Photomed Laser Surg. 31(3):95-104(2013).
2. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M.: Responses of cancer cells induced by photodynamic therapy. J Healthc Eng. 4(1):87-108 (2013).

3. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M.: Immunological aspects of photodynamic therapy. Trends Photochem Photobiol. 15: 1-16 (2013).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛引 俊宏 (KUSHIBIKI, Toshihiro)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授

研究者番号: 30403158