

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25707035

研究課題名(和文)細胞熱力学の創成：細胞内熱物性の測定とサーマルシグナルの理解

研究課題名(英文)Start-up of "Cell Thermodynamics": Studies on thermal properties and signaling in single living cells.

研究代表者

大山 廣太郎(Oyama, Kotaro)

東京慈恵会医科大学・医学部・特別研究員

研究者番号：70632131

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の最終目標は、「単一細胞は局所的な温度変化をいかに生み出し、感じ、有効利用しているか」を明らかにする新学問領域「細胞熱力学」を創成することである。本研究では、(1)細胞内熱伝導解析、(2)単一細胞の局所的な温度センシング機構の解明(温度勾配下における極性ブレブ形成、局所加熱による神経突起伸長の誘発など)、という各テーマを遂行し、熱・温度を介した細胞内外シグナル伝達(サーマルシグナル)の理解に役立つ重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：How does single living cell generate, sense, and efficiently use local changes in temperature? To answer the question, here we started the research area on "Cell Thermodynamics". In this study, we analyzed heat transfer in single living cells. We also clarified temperature-sensitivities in various cells, such as directional bleb formation of cancer cells under local temperature gradient and neurite outgrowth triggered by microheating. These results provided us valuable information on thermal signaling at single-cell level.

研究分野：生物物理

キーワード：細胞熱力学 温度測定 蛍光イメージング 熱物性 温度感受性

## 1. 研究開始当初の背景

生命は、温度を感じ、発熱・吸熱しながら活動している。近年、温度感受性や熱産生に関わるタンパク質が特定されたことで、生命システムが温度変化を感じ、順応し、有効活用する過程が理解されつつある。一方、単一細胞スケールの局所的な温度の理解は未だ乏しい。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、「細胞が局所的な温度変化をどのようにして生み出し、感じ、そして有効利用しているか」を明らかにするための新学問領域「細胞熱力学」を創成することである。そこで本研究では、赤外光レーザーによる局所的な加熱法と蛍光温度測定法を駆使することによって、単一細胞が局所的な温度変化をいかに感じているかを観測し、細胞内の熱の流れの生理的意義の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 局所熱パルス法

近赤外レーザー光を金属微粒子や水・細胞に集光することで、細胞内外に局所的な温度勾配を形成させた。赤外光の照射をメカニカルシャッターで制御し、短時間（～2秒）のパルス状の温度上昇を細胞に与えた（局所熱パルス法）。この手法の強みは、加熱時間が短いために、熱変性を起こさずに生体分子の活性上昇を引き起こすことができる点にある（Oyama et al., *Lab Chip* 2012 参照）。

### (2) 蛍光温度測定法

温度計測は、温度が高くなると蛍光色素の明るさが暗くなる（蛍光強度が下がる）性質を持つ蛍光色素を用い、細胞内外の局所の温度イメージングを行った。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞内熱伝導率マッピングの構築

細胞に赤外光レーザーを照射することで形成される温度分布から、細胞内部の不均一な熱伝導率をマッピングする手法を構築した。具体的には、細胞内部に温度感受性の高い蛍光色素を導入し、蛍光顕微鏡観察によって、細胞内部の局所的な温度分布を可視化した。赤外光レーザーによって形成される温度分布は、細胞内の熱伝導率の不均一性を反映したものとなる。本研究によって細胞内部に高い熱遮断性をもつ物質の存在を示唆する結果が得られた（日本生物物理学会で発表）。

### (2) 温度勾配によるブレブ形成の発見

単一細胞スケールの温度勾配によって、HeLa細胞（ヒト子宮頸がん由来）の細胞膜が熱源方向に伸長する現象（極性ブレブ形成）を発見した。このブレブ形成は、単一細胞内の温度勾配がわずか 1.3°Cでも引き起こされた。ブレブ形成メカニズムの解明を進め、温度勾配による非対称なアクトミオシンの力発生が極性ブレブを引き起こすという新たなモデルを提唱した（Oyama et al., *Biophys. J.* 2015）。

### (3) 局所加熱による神経突起伸長の誘発

赤外光レーザーによる局所加熱によって、ラット海馬神経細胞の神経突起を急速に伸長させることに成功した。神経突起は熱源方向に伸長する傾向があり、伸長した神経突起は他の細胞から伸長した神経突起と結合した。この神経突起伸長の温度感受性の機構解明を進め、細胞骨格（微小管やアクチンフィラメント）や分子モーターが加熱中の神経突起伸長に関与していることを明らかにした（Oyama et al., *Sci. Rep.* 2015）。

#### (4) 熱パルスによる細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇

研究代表者はこれまでに、HeLa 細胞が熱パルスに応答し、細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇する現象を報告している(Tseeb et al., *HFSP J.* 2009)。この現象が癌細胞特異的なものであるかを調べるために、正常ヒト細胞株である WI-38 細胞に熱パルスを与えたところ、同様の一過的な細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が起こることを明らかにした。Ca<sup>2+</sup>チャネル等の阻害剤を用いて Ca<sup>2+</sup>濃度上昇のメカニズムを探索し、Ca<sup>2+</sup>チャネル (IP3 受容体) と Ca<sup>2+</sup>ポンプ (SERCA) の活性が熱パルスによって変調されることで Ca<sup>2+</sup>濃度上昇が誘発されるというモデルを提案するに至った (Itoh et al., *BIOPHYSICS* 2014, Editor Choice Award 受賞)。

#### (5) 心筋細胞の高温高速サルコメア振動

研究代表者はこれまでに、成体ラットの単離心筋細胞に熱パルスを与えることで、筋収縮を引き起こすことに成功している(Oyama et al., *BBRC* 2012)。そこで本研究では、新生児ラット心筋細胞のサルコメア構造(筋収縮最小ユニット)を $\alpha$ アクチニン GFP によって可視化し(Shintani et al., *J. Gen. Physiol.* 2014)、局所加熱時のサルコメア動態を nm 精度で計測した。これにより、約 38°C 以上に加熱した際に、5-10Hz の高速サルコメア振動がおこることを発見、Hyperthermal Sarcomeric Oscillations (HSOs) と命名して論文発表を行った(Shintani et al., *BBRC* 2015)。

#### (6) まとめ

本成果により、「単一細胞は局所的な温度勾配をいかに感じ、応答するか」という問いに対する新たな知見を得ることができた。これらの細胞の温度応答性は、細胞内で起きる化学反応に由来した熱が局所的な温度変化を生じさせ、それが自分自身および周囲の分子(タンパク質の ATPase 活性といった化学反応過程や、チャネルタンパク質の開口確率と

いった分子ダイナミクスなど)や細胞の動態(細胞運動や Ca<sup>2+</sup>シグナルなど)を変調する可能性について示唆するものである。即ち、細胞内外でのシグナル伝達において、情報伝達物質を伴うケミカルシグナルや、機械的刺激が伝わるメカニカルシグナルに加えて、サーマルシグナルが存在する可能性を示している。

この他、単一細胞スケールでの蛍光温度測定法を紹介する書籍の出版や、細胞内の熱の流れを解明する重要性に関するコメントを *Nature Methods* 誌に掲載することで、今後の「細胞熱力学」の方向性を明確にした。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

① Suzuki, M., Zeeb, V., Arai, S., Oyama, K. and Ishiwata, S. “The 105 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry”

*Nature Methods* 12, 802-803 (2015). 査読有  
10.1038/nmeth.3551.

② Oyama, K., Zeeb, V., Kawamura, Y., Arai, T., Gotoh, M., Itoh, H., Itabashi, T., Suzuki M. and Ishiwata, S. “Triggering of high-speed neurite outgrowth using an optical microheater.”

*Scientific Reports* 5, 16611 (2015). 査読有  
10.1038/srep16611.

③ Oyama, K., Arai, T., Isaka, A., Sekiguchi, T., Itoh, H., Seto, Y., Miyazaki, M., Itabashi, T., Ohki, T., Suzuki, M. and Ishiwata, S. “Directional bleb formation in spherical cells under temperature gradient.”

*Biophysical Journal* 109(2), 355-364 (2015). 査読有  
10.1016/j.bpj.2015.06.016.

④ Shintani, SA., Oyama, K., Fukuda, N. and Ishiwata, S. "High-frequency sarcomeric auto-oscillations induced by heating in living neonatal cardiomyocytes of the rat"  
**Biochemical and Biophysical Research Communications** 457(2), 165-170 (2015) 査読有  
10.1016/j.bbrc.2014.12.077.

⑤ Itoh, H., Oyama, K., Suzuki, M. and Ishiwata, S. "Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts"  
**BIOPHYSICS** 10, 109-119 (2014). 査読有  
10.2142/biophysics.10.109

⑥ Oyama, K., Arai, A. and Suzuki, M. "Fluorescent Nanothermometers for Local Temperature Measurement Inside Living Cells"  
**The Bulletin of the Society of Nano Science and Technology** 13 (1), 49-56 (2014). 査読無

[学会発表] (計 15 件)

① 大山廣太郎 「In vivo ナノイメージングによる心筋収縮の可視化と熱による制御」  
第 93 回日本生理学会年会 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 2016 年 3 月 24 日

② 大山廣太郎 「局所熱パルス法による単一細胞の機能制御」  
第 53 回日本生物物理学会年会 金沢大学 (石川県金沢市) , 2015 年 9 月 13 日

③ 大山廣太郎 「局所熱パルス法を用いて細胞の温度感受性を解明する」  
第 91 回日本生理学会大会 鹿児島大学 (鹿児島県鹿児島市) , 2014 年 3 月 18 日

他 12 件

[図書] (計 1 件)

① Suzuki, M., Arai, S., Oyama, K. and Ishiwata, S. "Luminescent nanothermometers for biological applications"  
**CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology** (ed. by B.I. Kharisov, O.V. Kharissova and U.O. Mendez, Taylor and Francis/CRC Press, 2015), 851-859 (2015).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大山 廣太郎 (OYAMA, Kotaro)

東京慈恵会医科大学 医学部 細胞生理学講座 特別研究員

研究者番号 : 70632131