

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713009

研究課題名(和文)細胞機能および細胞分化制御のための光技術の創製

研究課題名(英文)Modulation of cells function and differentiation by light technology.

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) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：Photodynamic Therapy (PDT) は、光感受性物質を取り込んだ癌細胞などに波長特異的なレーザーを照射し細胞死を誘導する治療法である。PDTによって細胞が死に至る場合、細胞内で炎症やアポトーシスに関するシグナル伝達が亢進する。一方、再生医療や創薬に利用が期待されている幹細胞の研究分野では、幹細胞の分化・増殖はその周囲の微小環境に反応して変化することが知られている。そこで本研究では、骨髄間葉系幹細胞や骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞分化を用いて、細胞死に至らない低レベルレーザーを用いたPDT (Low dose PDT) が細胞の分化促進におよぼす影響を調べた。

研究成果の概要(英文)：In photodynamic therapy (PDT), cells are impregnated with a photosensitizing agent that is activated by light irradiation, thereby photochemically generating reactive oxygen species (ROS). Although high levels of ROS are cytotoxic, at physiological levels they play a key role as second messengers in cellular signaling pathways, pluripotency, and differentiation of stem cells. To investigate further the use of photochemically triggered manipulation of such pathways, we exposed mouse osteoblast precursor cells and rat primary mesenchymal stromal cells to low-dose PDT. Our results demonstrate that low-dose PDT can promote osteoblast differentiation via the activation of activator protein-1 (AP-1). Although PDT has been used primarily as an anti-cancer therapy, the use of light as a photochemical “molecular switch” to promote differentiation should expand the utility of this method in basic research and clinical applications.

研究分野：光生物学

キーワード：光 細胞機能 分化 光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

現在、幹細胞をはじめとした細胞の機能制御や分化誘導方法として、遺伝子工学技術や薬剤添加による方法などが行われている。細胞自身が有する生理機能や分化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制御ツールとなる。そこで、細胞機能や分化誘導を制御する方法として光技術を応用することが本研究の目的である。本研究提案は遺伝子や薬剤を利用しない革新的な方法である。本研究提案では、赤外、可視、紫外光のみならず広範な領域の光を用いた細胞への“指示”とそのメカニズムの解明を行い、細胞機能制御技術のブレークスルーとなる光技術を創製・提案し、新パラダイムを見据えた独創的な研究を行う。

2. 研究の目的

骨髄間葉系幹細胞は再生医療に用いる細胞源として有望であるが、患者さんから細胞を採取後、治療に用いる細胞の増殖と分化に時間を要し、患者さんの待機時間が長いことが課題となっている。本研究では、細胞自身が有する生理機能や分化能を非侵襲的に光技術によって制御することを目的とした。

Photodynamic Therapy (PDT) は、光感受性物質を取り込んだ癌細胞などに波長特異的なレーザーを照射し細胞死を誘導する治療法である。PDTによって細胞が死に至る場合、細胞内で炎症やアポトーシスに関するシグナル伝達が亢進する。一方、再生医療や創薬に利用が期待されている幹細胞の研究分野では、幹細胞の分化・移動・増殖はその周囲の微小環境に反応して変化することが知られている。そこで本研究では、骨髄間葉系幹細胞や骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞分化を用いて、細胞死に至らない低レベルレーザーを用いた PDT (Low dose PDT) が細胞の分化促進におよぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

培養骨髄間葉系幹細胞株およびラットから採取した初代骨髄間葉系幹細胞を培養し、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を種々の濃度で細胞に取り込ませた後、種々のエネルギー量で光照射を行った。骨芽細胞分化誘導培地に交換し、一定期間培養後、カルシウム沈着染色、アルカリフォスファターゼ定量、オステオカルシン定量、Bone Morphogenetic Protein (BMP) -2 定量、Nuclear Factor kappaB (NF-kappaB) Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT 3) および Activator Protein-1 (AP-1) の定量を行った。さらに、レーザー照射直後の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) のイメージングを行った。本研究の概略を図1に示す。(本報告書には培養骨髄間葉系幹細胞株を用いた結果を示す)

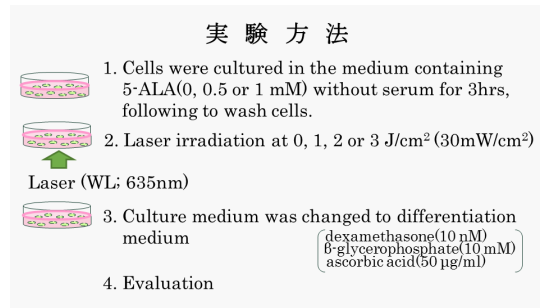


図1. 本研究方法の概略

4. 研究成果

Low dose PDT を施した骨髄間葉系幹細胞は、骨芽細胞に分化促進することが明らかとなった。図2に Low dose PDT 実施7日後のアリザリンレッドS染色画像を示す。5-ALA濃度が0.5および1 mMで、レーザーエネルギー密度が3 J/cm²の時のみ、カルシウム沈着が認められた(これ以上のレーザーエネルギー密度にした場合、細胞死が認められた)。

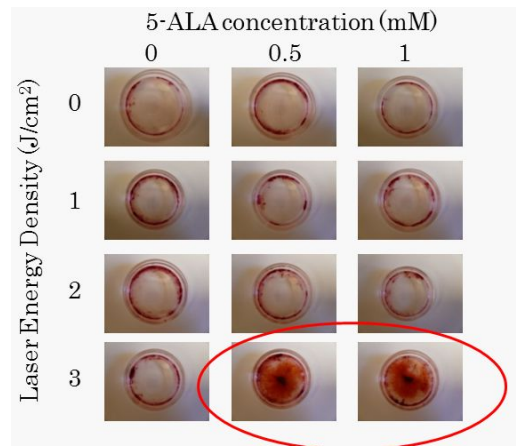


図2. アリザリンレッドS染色画像

さらに、図3に Low dose PDT 実施1日後の培地中アルカリフォスファターゼ活性値を示す。5-ALA濃度が0.5および1 mMで、レーザーエネルギー密度が3 J/cm²の時のみ、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の上昇が認められた。

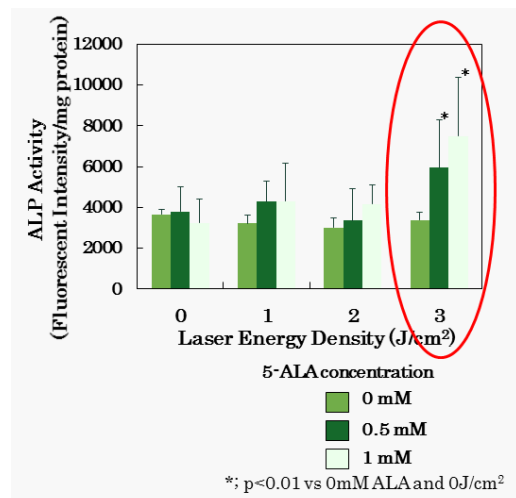


図3. ALP 活性測定結果

図 4 に Low dose PDT 実施 10 日後のオステオカルシン定量結果を示す。5-ALA 濃度が 0.5 および 1 mM で、レーザーエネルギー密度が 3 J/cm² の時のみ、骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシン量の上昇が認められた。

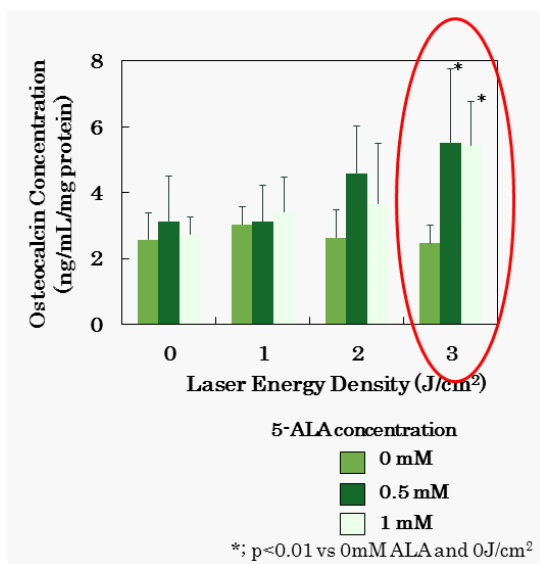


図 4. オステオカルシン測定結果

図 5 に Low dose PDT 実施 7 日後の BMP-2 定量結果を示す。5-ALA 濃度が 0.5 および 1 mM で、レーザーエネルギー密度が 3 J/cm² の時のみ、BMP-2 濃度の上昇が認められた。

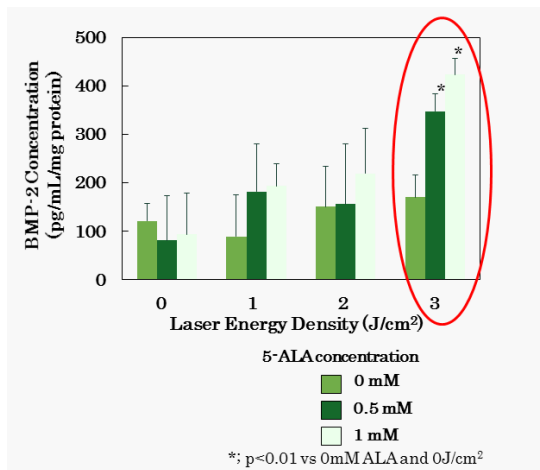


図 5. BMP-2 測定結果

Low dose PDT による骨芽細胞分化促進メカニズム解明のため、PDT による細胞内の炎症性転写因子の発現を調べた。その結果、NF-kappaB、HIF-1 や STAT 3 といった PDT によって誘発される代表的な炎症性転写因子の発現増加は認められなかった。しかしながら、同じく炎症性転写因子である AP-1 の発現が亢進し (図 6)、その構成因子である Fos ファミリー (Fra、c-Fos、FosB) および Jun ファミリー (c-Jun や JunD) の発現量が Low dose PDT 後に増加していることが明らかとなった (図 7)。さらに AP-1 阻害剤を添加して Low dose PDT 実験を行ったところ、

骨芽細胞への分化促進は認められなかった。

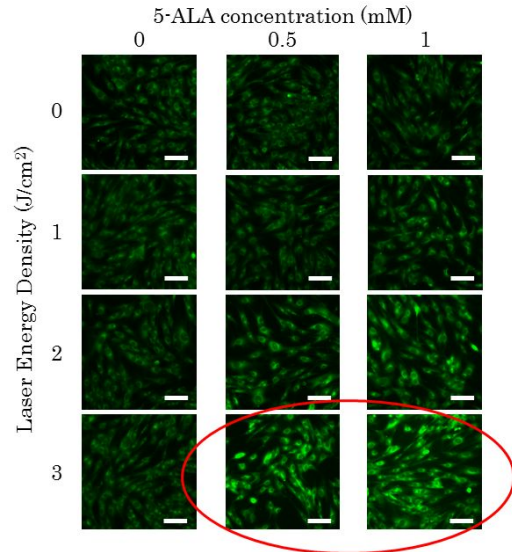


図 6. AP-1 発現染色結果

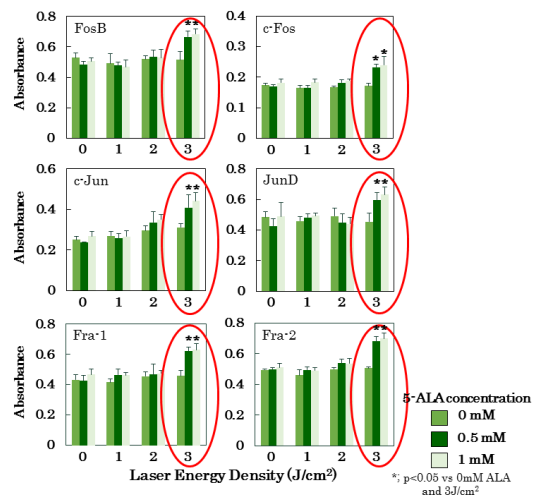


図 7. AP-1 構成因子発現の定量結果

AP-1 はストレス応答性転写因子として知られており、UV 照射、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) や低酸素状態など広範な刺激が AP-1 を活性化し、炎症性サイトカインの産生をはじめとするストレス応答性の遺伝子発現制御を担っている。本研究においても、レーザー照射後に ROS の発現量が増大していることを確認した。さらに、ROS により発現が誘導される AP-1 は、骨芽細胞と破骨細胞の両方の分化制御に中枢的な役割を果たしていることが知られている。そこで、本研究で得られた成果である Low dose PDT が骨芽細胞分化を促進するメカニズムについて図 8 にまとめた。これらの結果は、培養骨髄間葉系幹細胞株を用いた結果であるが、ラットから採取した初代骨髄間葉系幹細胞でも同様の結果が得られた。これらのことから、AP-1 発現亢進を誘導する Low dose PDT は、骨髄間葉系幹細胞および骨芽細胞前駆細胞の骨芽細胞分化を促進することができ、再生医療や創薬における幹細胞の利用に有用なツールとなると考えられた。

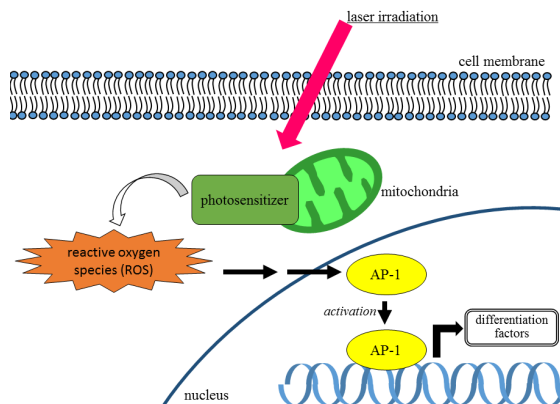


図 8. 本研究より予想されるメカニズム

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5件)

Kushibiki T, Tu Y, Abu-Yousif A, Hasan T. Photodynamic activation as a molecular switch to promote osteoblast cell differentiation via AP-1 activation. *Scientific Reports*, 5, 13114 (2015). (査読有り)

DOI: 10.1038/srep13114

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Low reactive level laser therapy for mesenchymal stromal cells therapies. *Stem Cells International*, Article ID 974864, (2015). (査読有り)

DOI: 10.1155/2015/974864

櫛引俊宏. レーザー光が働きかける細胞機能. *日本 IVF 学会誌*, 18, 16-23 (2015). (査読有り)

櫛引俊宏, 平沢壮, 大川晋平, 石原美弥. 低出力レーザーの生体作用. *日本レーザー医学会誌*, 34, 384-393 (2014). (査読有り)

Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Regulation of miRNA expression by low-level laser therapy (LLLT) and photodynamic therapy (PDT). *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 13542-13558 (2013). (査読有り)

DOI: 10.3390/ijms140713542

[学会発表](計6件)

Kushibiki T.

Controlling cells function by light technology. JSAP-OSA Joint Symposia 2015.

櫛引俊宏.

光技術による細胞機能制御.

第 33 回日本ヒト細胞学会 (2015).

櫛引俊宏.

光が働きかける細胞機能.

第 20 回バイオテンプレート研究会

(2015).

櫛引俊宏.

Photodynamic Therapy による骨芽細胞分化促進作用.

第 26 回日本レーザー治療学会 (2014).

櫛引俊宏.

光が働きかける細胞機能 - 生命科学・医学とのかかわり - .

第 17 回日本 IVF 学会 (2014).

櫛引俊宏.

光を用いた細胞機能制御.

レーザー学会第 446 回研究会 (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