

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670573

研究課題名(和文) 光による細胞機能制御による新規細胞療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new cell therapy system by optic control of cellular functions

研究代表者

芳賀 早苗 (Haga, Sanae)

北海道大学・保健科学研究所・特任講師

研究者番号：60706505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞内の分子機能・細胞内環境を制御する新しいシステムを構築し、「移植細胞の保存時の生存能の維持と向上」、そして「移植後の細胞生存率の向上と機能維持」を目指すことを目的とした。細胞内分子機能を制御するために、光感受性タンパク質を利用して、機能制御を行うべくデザインしたプローブを作製した。これをもちいて細胞内分子の活性化制御を試みた結果、光による細胞内分子の活性化制御に成功し、さらに外的ストレスに対する細胞傷害抑制効果を確認することができた。本研究成果は今後新しい疾患治療技術として、細胞移植などの分野において重要な役割を果たすことが期待される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we tried to develop a new cell therapy system by using light-sensitive proteins to control cellular functions especially for cell survival. Akt is a key molecule for cell survival and protection against various stresses in many types of cells. Therefore, we developed the newly designed photo-activatable probe to control positively cellular Akt function (PA-Akt probe). PA-Akt which we made enabled cytosolic Akt to move to cell membrane by light illumination. With illumination blue light, PA-Akt successfully induced the activation (phosphorylation) of Akt and the downstream signals including GSK-3 β in hepatocytes. As a result, it conferred resistance hepatocytes against various stresses including oxidative stress and malnutrition. Our cellular control system utilizing light-sensitive protein may provide a unique tool for the development of new therapies especially in the field of cell/organ transplantation.

研究分野：分子生物学、肝臓病態学、ストレス応答、臓器・細胞移植

キーワード：光イメージング 細胞生存 細胞療法 移植

1. 研究開始当初の背景

近年、様々な疾患に対してES細胞/iPS細胞等を用いた再生医療の研究開発が盛んに行われるようになり、これまでの移植治療に向けた研究だけでなく、それを支えるための関連技術の研究開発の必要性が増してきている。

糖尿病に対する細胞療法(膵島移植)などでは、死体ドナーから膵臓を摘出し膵島を分離・培養した後に門脈を経由して移植することで行われている。移植直後にはIBMIR(immediate blood-mediated inflammatory response)と呼ばれる急性炎症により、多くの移植細胞が失われ、その後も移植細胞の定着のための足場、低酸素状態などの周囲環境、そして持続する拒絶反応等により移植細胞数および細胞機能は失われていく。また、移植細胞のリソースを数少ない死体ドナーに依存しているため、治療のタイミングを決定することが困難で再移植のチャンスも低い。このような状況下では、採取した細胞を可能な限り生存能と機能を維持した状態で移植し、移植後も同様に細胞の生存能・細胞機能を維持させることが必要かつ克服すべき重要な課題と考えられる。

こういった背景により、移植細胞の移植後のviability(生存能)、機能の維持あるいは向上を非侵襲的、経済的かつ長期的にコントロールできるシステムの構築が必要であると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

上記を達成するために、細胞内の分子機能・細胞内環境を制御する新しいシステムを構築し、「移植細胞の保存時の生存能の維持と向上」、さらには「移植後生体内における細胞生存率の向上と機能維持」を目指すことを目的とした。特に今回、光感受性蛋白質の利用を考案し、細胞に対して光を用いることで物理的ストレスを与えることなく、移植細胞の機能を光照射により随時コントロールし、移植細胞を出来るだけ長期間有効に生存・機能させるために必要な基礎的技術開発を行った。

3. 研究の方法

本研究に着手するに際して、ターゲット分子として「Akt」を設定した。Aktは“生存シグナル”として知られており、細胞増殖・細胞成長・タンパク合成など細胞生存機能を担う非常に重要な分子である。また、その活性化機序が十分に研究されている。成長因子等の刺激によりPI3-Kが細胞膜に移動することにより、Aktも細胞膜へ移動する。これにより、PDK1分子がAktをリン酸化し活性化する。つまり、Aktは細胞膜へ移動することによって活性化する。実際に、Aktを膜移動させるためにミリスチル化(myr;細胞膜への親和性を向上させるシグナル)したAkt1変異体は、Aktの恒常的に活性化することが可能である

ことが知られている。

以上の理由からAktをターゲットとし、この分子を光照射により膜移動させ、光によりAkt機能を制御するシステム確立を目指した。本研究では、(1)Akt分子機能を光により制御するためのプローブのデザインおよび作製、(2)同分子機能を細胞内でモニタリングするためのプローブのデザインおよび作製、(1)および(2)各プローブの細胞レベルでの機能評価、(3)光刺激によるAkt活性化条件の検討および下流シグナルの活性化の検討、(4)光によるAkt分子活性化による細胞ストレス抑制効果の検討、以上の段階に分けて研究を進めた。

(1)①Akt分子機能を光により制御するためのプローブ:光感受性蛋白質(植物由来)を利用して、青色光の照射によってAktを細胞膜に移動させ、強制的に活性化させるデザインを採用し、プローブを作製した(Photo-activatable (PA)-Aktプローブ)。

(2)①Akt分子機能モニタリングするためのプローブ:本研究は分子機能を光で制御する試みの一方、細胞・臓器の生存能を直接示すプローブの開発も必要ではないかと考えた。そこで、Aktの活性化によって発光を示すプローブの開発を試みた。

(1)および(2)②各プローブの細胞レベルでの基本的な機能評価:(1),(2)各プローブが前述のデザインのもと作製された段階で、肝細胞株に一過性導入を行い、基本的なプローブ機能の確認を行った。十分な機能が得られない場合には、(1),(2)①の段階に戻り、構造・作製段階を再検討した。また、細胞へのプローブ導入方法についても最適化を試みた。

(3)光刺激によるAkt活性化条件の検討および下流シグナルの活性化の検討:特に(1)プローブについて、Aktが最もよく活性化する光条件を照射する光の強度、時間・間隔等、様々な条件を検討した。また、このAkt活性化制御によるAkt下流シグナルへの影響についても検討した。

(4)光によるAkt分子制御による細胞ストレス抑制効果の検討:移植細胞の生存能・機能維持に向けた新しいシステムとしての可能性を検討するため、細胞における外的ストレスを与え、光刺激でそのストレス障害が軽減されるか(抵抗性を示すかどうか)についての解析を行った。

4. 研究成果

研究方法に記述した各段階について、下記の通りの成果が得られた。

(1)Akt分子機能を光により制御するプローブ

①PA-AktプローブはAktのPH(Pleckstrin homology)ドメインをミリスチル化シグナル遺伝子:myrに置き換え、さらにmyrとAktを分割した。myrは植物由来の光感受

らかとなった。

次にこのプローブの活性化が、Akt の下流シグナルにも影響を与えているかどうかを検討するために、Akt の下流に位置する GSK-3beta のリン酸化を調べた。先に示した PA-Akt プローブのリン酸化が効率的に誘導された光条件において、GSK-3beta も同様にリン酸化されていることが示された。これらの結果から、PA-Akt プローブは光刺激によって細胞膜近傍にその局在を移動させ、活性化し、下流シグナルの活性化を引き起こすことが確認できた。

(4) 光による Akt 分子制御による細胞ストレス抑制効果の検討

細胞が外的ストレスに曝された際の傷害に対して、光により活性化した PA-Akt が細胞保護効果を示すか検討を行った。検討には肝細胞における①低栄養状態および②酸化ストレスによる細胞傷害誘導刺激系を用いて検討した。

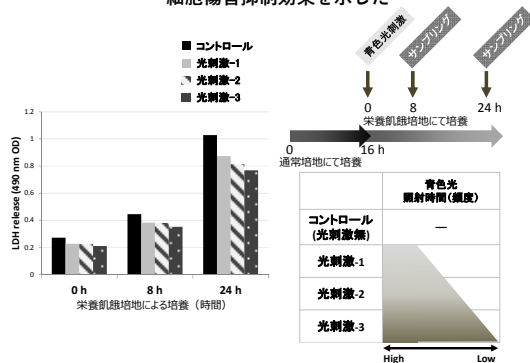
①細胞・臓器移植などにて不可避である細胞ストレスとして、細胞を低栄養状態に曝した際の細胞保護効果を評価した。細胞は栄養飢餓培地で培養すると、時間推移とともに傷害を受けた。これに対して栄養飢餓培地に変更直後光刺激を施した群では、細胞傷害が有意に抑制された。またこの細胞傷害抑制効果は、光刺激を伸ばすと（頻度を増やすと）効果が増加することも確認された(図3)。

②同様に、移植により惹起される酸化ストレスによる細胞傷害に対する評価も検討した。酸化ストレス(H₂O₂)によって刺激すると、刺激後約8時間から肝細胞は顕著に傷害されたが、光刺激により細胞傷害は同様に抑制されることが分かった。

以上の結果から、光刺激によって活性化制御された PA-Akt プローブは、移植に関連するストレスから細胞傷害を抑制することが確認できた。今後、さらに効果的な細胞保護効果を得るために、光刺激の頻度と強度を検討する必要がある。

本研究は、光によって細胞内分子を制御しようとする新しい分子制御技術の開発に挑んだものであり、成果として、細胞生存に重要

図3 光によるPA-Akt probeの活性化は、低栄養による細胞傷害抑制効果を示した



な Akt 分子の活性化を制御することに成功し、それによる細胞保護効果が誘導されることを確認することができた。また、Akt 分子自体の活性化状態を生きた細胞でモニタリングする新しいプローブツールの開発を進めることもできた。

本研究成果は、今後、新しい疾患治療技術として、特に細胞療法、細胞移植などの分野において重要な役割を果たすことが期待される。この技術は、保存や移植した細胞の傷害軽減、生存能や機能維持を非侵襲的に、また、経済的に行える可能性を持っている。あるいは、光によるタンパク質分泌機能コントロールが可能となれば、生体内局所において必要とされる生理活性物質の分泌させることも可能と考えられる。このように、本技術は、細胞・臓器移植にとどまらず、様々な細胞療法への応用可能性を有している。

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 3 件)

1. Sanae Haga, Yimin, Michitaka Ozaki. Relevance of FXR-p62/SQSTM1 pathway for survival and protection of mouse hepatocytes and liver, especially with steatosis. BMC Gastroenterol. 2017 Jan 13;17:9. doi: 10.1186/s12876-016-0568-3. 査読有
2. Naoki Morita, Sanae Haga, Yoshihiro Ohmiya, Michitaka Ozaki. Long-term ex vivo and in vivo monitoring of tumor progression by using dual luciferases. Anal Biochem. 2016 Mar 15;497:24-6. doi: 10.1016/j.ab.2015.12.007. 査読有
3. Sanae Haga, Takeaki Ozawa, Yuma Yamada, Naoki Morita, Izuru Nagashima, Hiroshi Inoue, Yuka Inaba, Natsumi Noda, Riichiro Abe, Kazuo Umezawa, Michitaka Ozaki. p62/SQSTM1 plays a protective role in oxidative injury of steatotic liver in a mouse hepatectomy model. Antioxid Redox Signal 2014 21:2515-2530. DOI: 10.1089/ars.2013.5391 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 尾崎 倫孝、小澤 岳昌、芳賀 早苗、森田 直樹、浜田 俊幸 光技術を用いた臓器・細胞機能評価と制御、第 43 回日本臓器保存生物医学会学術集会、2016 年 11 月 27 日、東京薬科大学 (八王子市)
2. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、小澤 岳昌、山田 勇磨 光プローブをもちいた時空間的病態解析と積極的病態制御の試み、第 71 回日本消化器外科学会総会、2016 年 7 月 15 日、あわぎんホール (徳島)

3. 芳賀 早苗、菅野 憲、小澤 岳昌、尾崎 倫孝 Evaluation of necroptotic cell death by monitoring RIP1/RIP3 interaction in hepatocytes. BMB2015、2015年12月2日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）
4. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、森田 直樹、伊 敏 p62/SQSTM1 を基軸とした新たな肝臓・肝細胞保護・機能維持法の探索、第42回日本臓器保存生物医学会学術集会、2015年11月13日、いわて県民情報交流センター（岩手県・盛岡市）
5. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝 “光”を利用した肝細胞機能制御技術の開発、第22回肝細胞研究会、2015年6月5日、米子コンベンションセンター（鳥取県・米子市）
6. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝 “光”を利用した新たな細胞・臓器保存法の開発、第41回日本臓器保存生物医学会学術集会、2014年11月28日、千里ライフサイエンスセンター（大阪）
7. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝 高血糖および脂肪化状態が肝虚血/再灌流傷害に及ぼす影響 Impact of high glucose and steatosis upon ischemia/reperfusion-induced liver injury in mouse. 第87回日本生化学会、2014年10月16日、京都国際会議場（京都）
8. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、野田 なつみ、森田 直樹、小澤 岳昌 光イメージング技術を用いた肝病態の解析、第21回肝細胞研究会、2014年6月27日、東京医科歯科大学（東京）
9. 芳賀 早苗、小澤 岳昌、山田 勇磨、森田 直樹、野田 なつみ、尾崎 倫孝 p62/SQSTM1 が制御する肝細胞障害機序の解析、第21回肝細胞研究会、2014年6月27日、東京医科歯科大学（東京）
10. 尾崎 倫孝、芳賀 早苗、野田 なつみ、森田 直樹、服部 満、小澤 岳昌 光を応用した移植細胞機能・細胞環境のモニタリングと制御の試み 第114回日本外科学会定期学術集会、2014年4月3日、京都国際会議場（京都）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芳賀 早苗 (HAGA, Sanae)
北海道大学・大学院保健科学研究院・特任講師
研究者番号：60706505

(2) 研究分担者

小澤 岳昌 (OZAWA, Takeaki)
東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・教授

研究者番号：4030280

(4) 研究協力者

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)
森田 直樹 (MORITA, Naoki)