

研究課題別評価書

1. 研究課題名

「光技術による生体幹細胞の分化制御 ―再生医療実現化にむけた光技術の創成―」

2. 氏名

櫛引 俊宏

3. 研究のねらい

再生医療で話題となる幹細胞は、生体組織や臓器に成長する元となる細胞であり、幹細胞を利用した再生医療の実現化は21世紀の臨床医学における悲願の一つである。幹細胞は、ある細胞に変化するようにという“指示”を受けると特定の細胞に変身、すなわち分化する能力を持っている。また、変化を遂げる前の未分化の状態で長期間にわたって自らを複製、再生する能力も備えている。胚からは胚性幹細胞(ES細胞)、成人からは成体幹細胞を採り出すことができ、最近ではiPS細胞が話題となっている。幹細胞は様々な細胞へ分化する能力と高い増殖能力を持つため、失われた細胞を再生して補うという治療法(再生医療)への応用が期待されている。パーキンソン病、心筋梗塞、脊椎損傷、白血病、糖尿病、肝臓病など様々な病気の治療への応用が期待され、一部は既に臨床治験が始まっている。しかしながら、再生医療があと一歩で現実的なものにならない理由の一つとして、幹細胞をそのまま患者に移植してもほとんど効果が無いことがあげられる。治療効果が無いだけでなく、移植前に長期間培養した幹細胞が癌細胞化したという報告もある。現在、細胞機能の制御方法として、トランスジェニックやノックアウトをはじめとした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。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、この幹細胞に安全に“指示”を与え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。本研究では、これまでに得られている結果をもとに、赤外、可視光、紫外のみならず広範な領域の光を用いた幹細胞への“指示”とそのメカニズムの解明を行い、再生医療実現化へブレークスルーとなる光技術を創成し提案する。

4. 研究成果

波長 405 nmの半導体レーザーを用い、培養骨髄間葉系幹細胞株へレーザー照射を行った。プレート底面に接着している細胞へ直接レーザーを照射するため、本実験ではプレート底面からレーザーを照射する光学系を作製した。培養骨髄間葉系幹細胞に0、100、200、300 mW/cm²で3分間、波長 405 nm半導体レーザー(連続波)を照射した後、培地を骨分化培地(10 nMデキサメタゾン、2 mM α -グリセロリン酸、50 μ g/mLアスコルビン酸および10 %FCSを含む)に交換し、5日間培養した。Fig. 1 に種々のエネルギーで骨髄間葉系幹細胞に照射した後の骨芽細胞への分化を確認した結果を示した。波長 405 nmレーザーを培養骨髄間葉系幹細胞へ照射した結果、レーザー未照射群と比較してレーザー照射群の骨芽細胞への分化が促進された。すなわち、アリザリンレッドS染色によりカルシウムの沈着が認められた。またリン酸カルシウムの染色方法であるvon Kossa染色を行なった結果についても同様に、レーザー照射群にリン酸カルシウムの沈着が認められた。さらに骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼおよびオステオカルシンの免疫染色においても同様の結果を得た。また、各培養ウェル中のカルシウム濃度を定量した結果を示した結果、照射するレーザーエネルギーに依存してカルシウム量が増加した(Fig.2)。

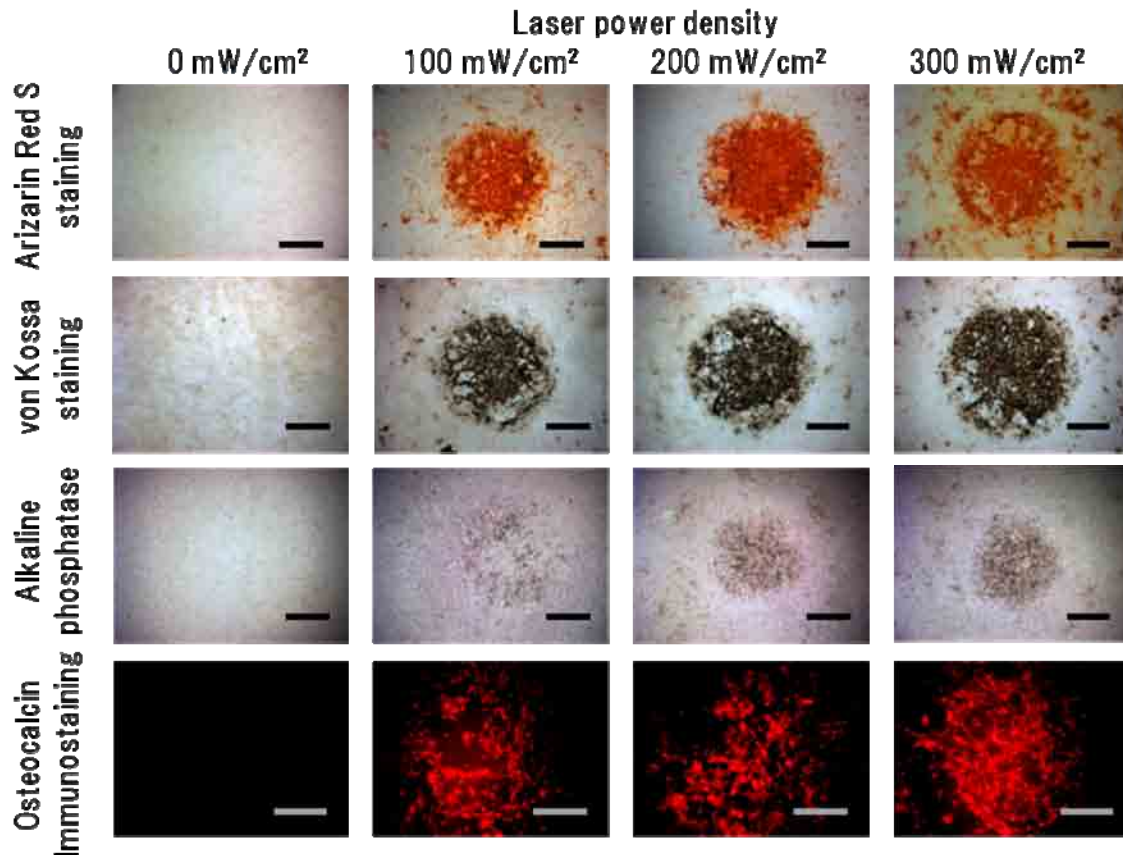


Fig.1 Histochemical analysis of laser irradiated mesenchymal stem cells (MSCs). Calcium deposition was evaluated by alizarin red-S staining (magnification: x50) at 5 days post-irradiation. Calcium deposition had increased around the cells in a dose-dependent manner. Calcium phosphate deposition was evaluated by von Kossa staining (magnification: x50). At 5 days after treatment, staining increased with increased laser energy. The area expressing alkaline phosphatase (ALP) activity was stained (magnification: x50). Laser irradiated samples displayed immunopositive staining for osteocalcin, a marker of osteoblast differentiation (magnification: x100). Scale bars = 200 (for Alizarin red-S, von Kossa, and ALP staining) and 100 μ m (for osteocalcin immunostaining).

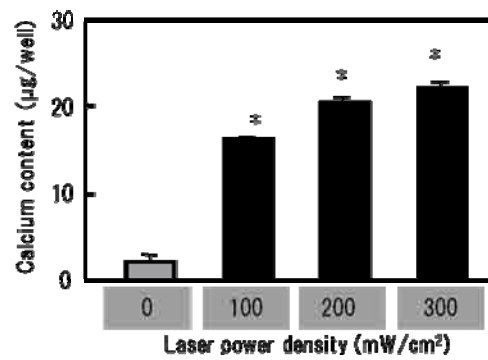


Fig.2 The quantitative calcium content increased after laser irradiation relative to non-irradiated cells. Calcium content increases varied with laser energy. *, $p < 0.01$: significant difference between the calcium content of laser-irradiated MSCs and controls.

さらにレーザーを用いた幹細胞分化の促進効果として、軟骨細胞への分化促進効果についても確認した(Fig.3)。すなわち、軟骨前駆細胞へレーザー照射後、軟骨分化に伴い増加するコラーゲン量の増加が認められ(Fig.3a)、軟骨分化に関与する各種 mRNA の発現増加が観察された(Figs.3b-e)。一方、脂肪細胞への分化はレーザー照射により抑制されるという結果を得た(Fig.4)。

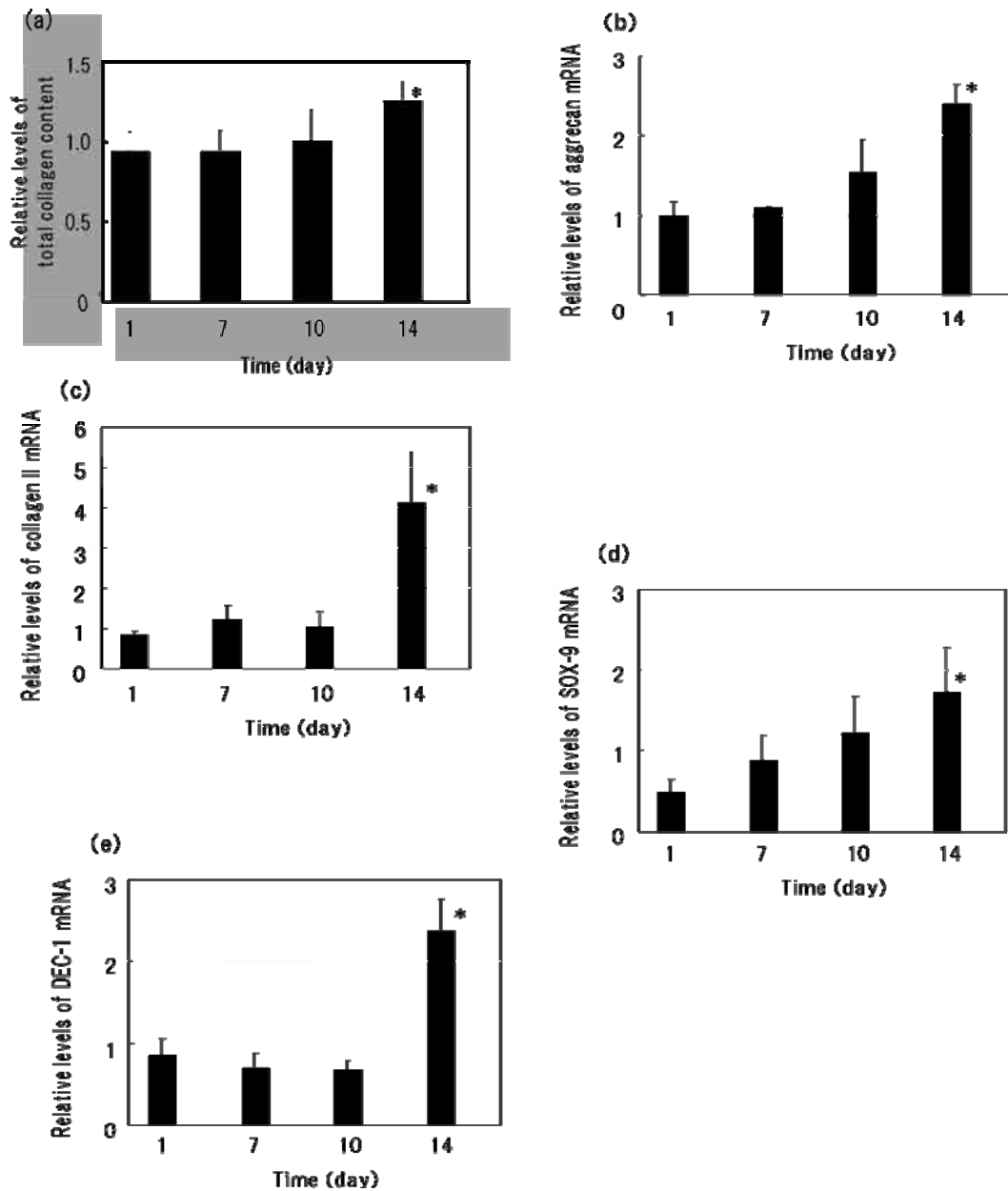


Fig. 3 (a) Laser irradiation enhanced the total collagen contents in ATDC5 cells 14 day after laser irradiation. *, $p < 0.01$: significant difference between the total collagen contents of laser irradiated cells and non-laser irradiated cells. (b-e) Increased mRNA expression of early and mature chondrocyte matrix gene [aggrecan (b) and collagen type II (c)] and positive transcription factors for chondrogenesis [SOX-9 (d) and DEC-1 (e)] by laser irradiation on chondrogenesis. *, $p < 0.01$: significant difference between the relative mRNA levels of laser irradiated cells and non-laser irradiated cells.

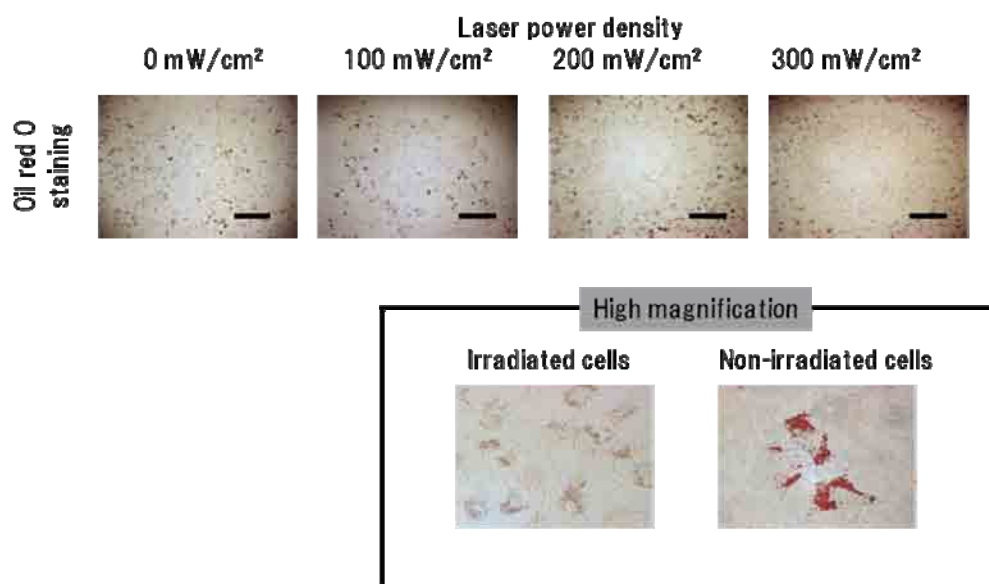


Fig. 4 Staining with oil red O demonstrates that laser irradiation decreased adipogenesis relative to non-irradiated areas (magnification: x50). Higher magnification (x400) is shown in frame. Scale bars = 200 μ m.

現在、そのメカニズムを司る因子として、青色光を受容することが知られている細胞内体内時計タンパク質・クリプトクロムについて着目し詳細な解析を進めている。さらに、レーザー照射による細胞内活性酸素種の発生がクリプトクロムなどの細胞内生理活性タンパク質を制御していることも明らかにしつつある。

幹細胞以外へのレーザー照射による細胞機能制御

上述の幹細胞だけではなく、種々の細胞種に対してレーザー照射を行い、その機能制御を試みた。ヒスタミンは生体内で過剰分泌されるとアレルギー反応を引き起こす一方で、血管透過性亢進作用や血管拡張作用などの薬理作用も有する。そこで、波長 405 nm のレーザー照射後の肥満細胞からのヒスタミン分泌促進作用について研究を行った。その結果、レーザー照射 30 分後の上清中のヒスタミン濃度は照射パワー密度及び照射時間依存的に上昇することが分かった (Fig.5)。そこで肥満細胞のヒスタミン分泌に関わる細胞内カルシウムイオン濃度を測定したところ、レーザー照射群は非照射群と比較して細胞内カルシウム濃度が有意に増加していた (Fig.6)。カルシウムイオンの細胞内流入を促進する因子の一つとして活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が関わっていることから、細胞外に発生している ROS の発生量を測定した結果、レーザーを照射すると非照射群と比較して有意に ROS 発生量が増加していることが明らかになった (Fig.7)。これらの結果から、レーザー照射により発生した ROS がカルシウムイオンチャネルに酸化作用を及ぼし、カルシウムイオンの流入促進と脱顆粒によりヒスタミン分泌が促進されている可能性が考えられた。

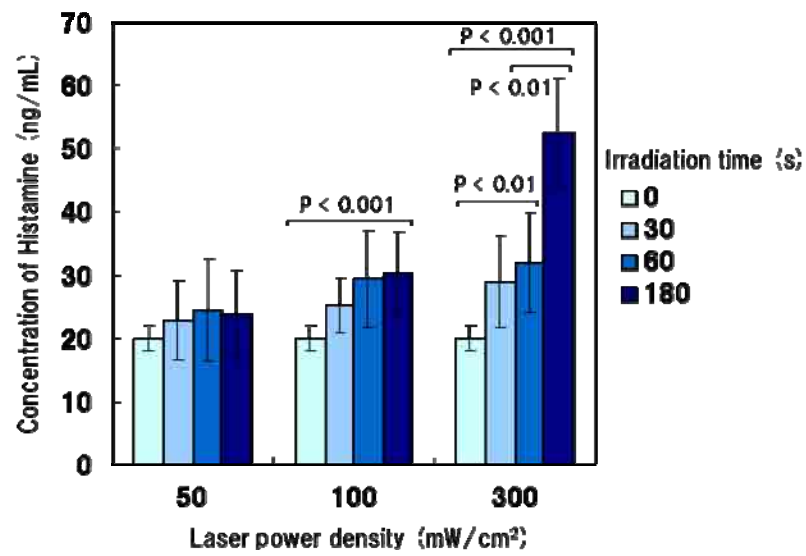


Fig. 5 The histamine secretion from mast cells were increased after laser irradiation.

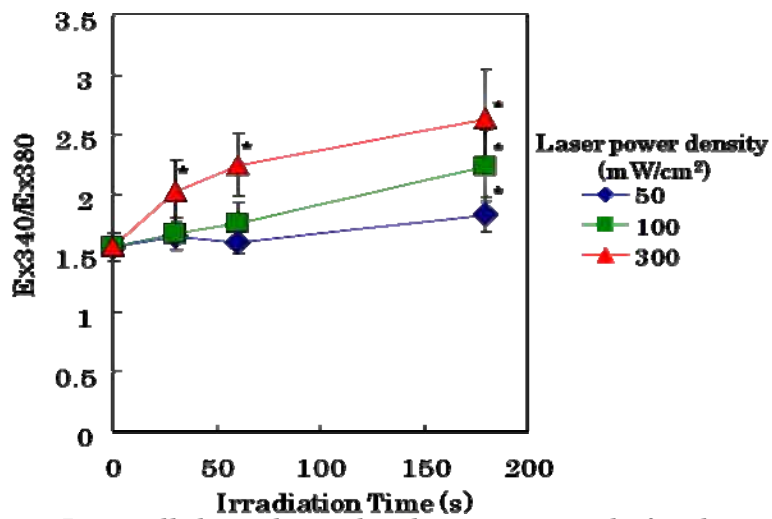


Fig. 6 Intracellular calcium level was increased after laser irradiation.

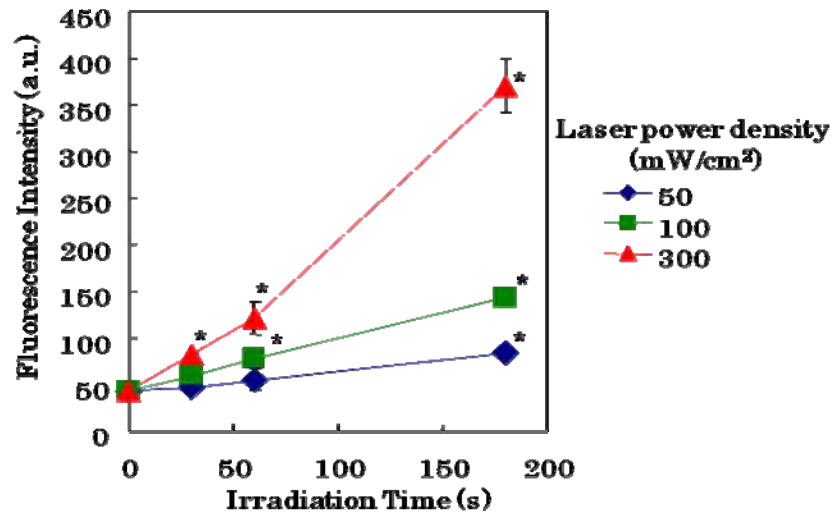


Fig. 7 Reactive oxygen species were generated after laser irradiation.

一方、膵 β 細胞からのインスリン分泌量低下によるⅡ型糖尿病に対して食事・運動療法や薬剤またはインスリン投与による治療が行われているが、本研究では、培養膵 β 細胞に、波長の異なる可視域波長のレーザーを照射し、レーザー照射後のインスリン分泌量を測定した。レーザー光は波長 405 nm、664 nm、808 nm の 3 種類を用いた。グルコース濃度応答性を示すマウスインスリン分泌性膵 β 細胞株にレーザー照射 1 時間後に上清を回収し、インスリン濃度を ELISA 法により測定した。その結果、波長 405 nm のレーザーを照射した場合、レーザー未照射群に対して、照射パワー密度の増加に伴い上清のインスリン濃度は減少した。一方、波長 664 nm 及び 808 nm レーザーを照射した場合、レーザー未照射群に対して、上清中のインスリン濃度は増加した(Fig.8)。

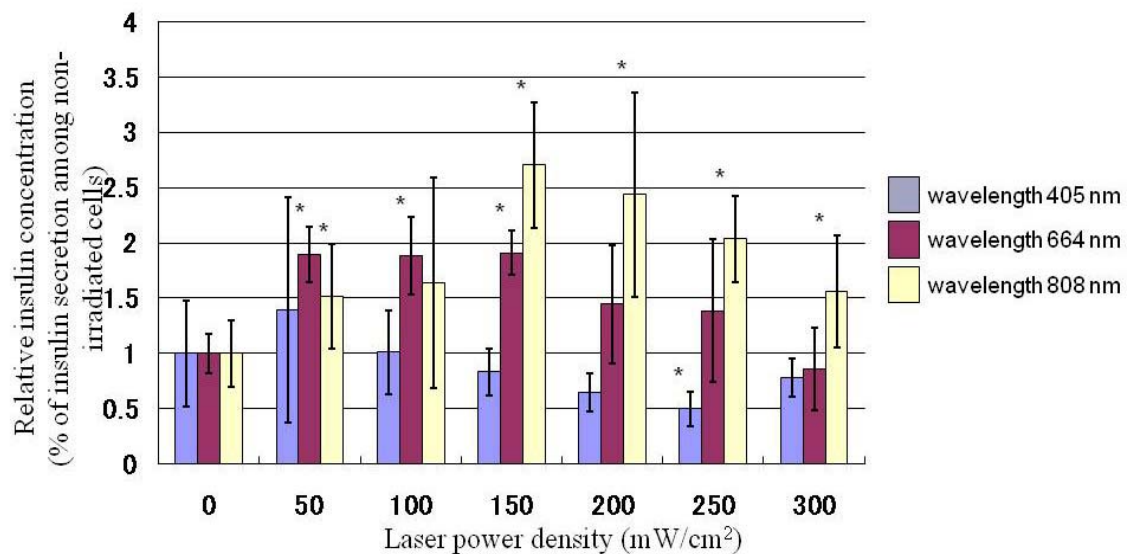


Fig. 8 Insulin secretion was enhanced when the laser (wavelength; 664 and 808 nm) was irradiated. On the other hand, insulin secretion was inhibited when the laser (wavelength; 405 nm) was irradiated to mouse islet of Langerhans β cells.

さきがけ研究期間ではレーザー照射による細胞機能変化について幾つかの結果を得ることが

できたが、その詳細なメカニズムは現在も解析中である。本研究ではレーザーを用いた細胞の分化制御(促進)またはサイトカインや生理活性物質の発現制御という新しい細胞機能制御プロセスを提案することができている。これら細胞生理機能をレーザー照射により制御することができれば、疾病の新しい治療方法としてだけではなく、細胞機能の役割解明にレーザーが有用なツールとなると考えている。

5. 自己評価

本研究期間においては、幹細胞だけではなく、肥満細胞や膵・細胞といった幅広い細胞種を取り扱い、その機能変化の研究を行うことができた。本研究期間中にできなかったことは光側の条件を多く用いることである。光照射後の生理活性解析量が莫大であったため、主に波長 405nm の連続波レーザーを用いた研究を行ってきたが、今後は、幅広い波長の光だけではなく、レーザーのパルス幅や照射タイミングについての検討も行いたい。本研究期間中ではヒトへの応用に向けた研究を行うことができ、研究開始当初の予想よりも早いスピードで研究が進んだ。このことは、研究総括・アドバイザーの先生方からの的確なご指導や JST の強力なバックアップとご支援があって達成できていることは疑いない。本研究において強く感じたことは、細胞は必ず光に反応する(遺伝子またはタンパク質の発現レベルで変化が起きる)ということである。勿論、光照射条件や解析方法により得られる結果や解釈は異なるが、生命誕生当初より生物が利用してきた光エネルギーを人類の疾病診断・治療に用いることを今後の目標として研究を進めたい。

6. 研究総括の見解

再生医療において、幹細胞などが有する機能を非侵襲的に制御し安全に“指示”を与える方法として光技術を応用する事を目標に研究を行った。

本研究では、これまでに得られている結果をもとに、赤外、可視光、紫外のみならず広範な領域の光を用いた幹細胞への“指示”とそのメカニズムの解明を行い、再生医療実現化へブレークスルーとなる光技術を創成し提案している。理論的で緻密な研究手法により、研究成果としてレーザーを用いた細胞の分化制御(促進)、生理活性物質の発現制御という新しい細胞機能制御プロセスを提案することができている。中でも、軟骨細胞への分化促進効果確認、骨髄間葉系幹細胞にレーザー照射した後の骨芽細胞への分化確認など、レーザーを用いた幹細胞分化の促進効果の確認と光条件の抽出は特筆すべき成果である。

研究成果は主要論文5件に纏められており、「文部科学大臣表彰 若手科学者賞」、「日本レーザー医学会総会賞」などを受賞している。また、成果への注目度も高く、招待講演、解説論文も多数に上り、*Marquis Who's Who in the World*にも選ばれている。

細胞は光に反応し、光照射により遺伝子またはタンパク質の発現レベルで変化が起きることが本研究で確認されたが、細胞生理機能のレーザー照射制御は新しい疾病治療方法であると共に、細胞機能の役割解明ツールとしても期待できる。光技術を安全に生体に適応できることを目標に、細胞内に存在する光受容体に適応した光技術応用開発を期待する。

7. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

- ・ **Kushibiki, T.**, Tajiri, T., Ninomiya, Y., Awazu, K.: Chondrogenic mRNA expression in prechondrogenic cells after blue laser irradiation. J Photochem Photobiol. In press (2010)
- ・ **Kushibiki, T.**: Photodynamic therapy induces microRNA-210 and -296 expression in Hela cells. J Biophotonics. In press (2010).
- ・ **Kushibiki, T.**, Awazu, K.: A blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. Photomed Laser Surg. **27**: 493-498 (2009).
- ・ **Kushibiki, T.**, Awazu, K. Controlling osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stromal cells by regulating a circadian clock protein with laser irradiation. Int J Med Sci. **5**:319-326 (2008).
- ・ **Kushibiki, T.**, Awazu, K.: Enhancement of osteoblast differentiation by regulating circadian clock protein, Cryptochrome, with blue-violet laser irradiation to mesenchymal stromal cells. Jpn J Laser Surg Med. **28**: 91-96 (2007).

(2) 総説・解説論文

- ・ **櫛引俊宏**. 光が働きかける細胞機能. レーザー治療学会誌 **8**: 10-14 (2010).
- ・ **櫛引俊宏**. 生体への低出力レーザー光照射がおよぼす作用. オプトニュース **3**: 26-31 (2009).
- ・ **櫛引俊宏**, 栗津邦男. レーザーによる生体細胞・組織の再生と制御. 光アライアンス(日本工業出版): 19-4 (2007).
- ・ **櫛引俊宏**, 栗津邦男. レーザーによる骨髄幹細胞の分化促進とそのメカニズム. 日本レーザー医学会誌 **28**: 117-121 (2007).
- ・ **櫛引俊宏**, 栗津邦男. レーザーによる骨分化促進作用とそのメカニズム解明へのアプローチ. 医学のあゆみ **227**: 602-603 (2007).

(3) 受賞

- ・ 2008 年 4 月 平成 20 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞
表彰業績名; ドラッグデリバリーシステムと光技術による生体幹細胞の分化制御に関する研究
表彰主催団体名; 文部科学省
- ・ 2007 年 5 月 第 31 回レーザー学会奨励賞
表彰業績名; 「レーザーによる生体幹細胞の分化制御とそのメカニズム」
表彰主催団体名; (社)レーザー学会
- ・ 2006 年 11 月 平成 18 年度日本レーザー医学会総会賞
表彰業績名; 「レーザーによる生体幹細胞の分化制御とそのメカニズム」
表彰主催団体名; 日本レーザー医学会

(4) 新聞・広報誌

- ・ *Marquis Who's Who in the World* 27th Edition
- ・ *Marquis Who's Who in Medicine and Healthcare* 2009-2010 Edition
- ・ *Marquis Who's Who in the World* 26th Edition

(5) 招待講演

- ・ 櫛引俊宏: 光が働きかける細胞機能ー生命科学・医学とのかかわりー. 第 21 回日本レーザー治療学会 (2009.7.4-5 神戸).

- ・櫛引俊宏：光技術を用いた細胞機能制御．第 29 回日本レーザー医学会総会（2008.11.15-16 東京）．
- ・櫛引俊宏：レーザーによる生体細胞・組織の再生と制御．Laser EXPO 2007（2007.4 横浜）
- ・櫛引俊宏：光技術による生体幹細胞の分化制御．第 3 回次世代バイオマテリアル若手研究会（2007. 2.2 京都）．
- ・櫛引俊宏：生体幹細胞分化制御のための光技術の創成．レーザー学会学術講演会第 27 回年次大会（2007.1.17-18 宮崎）．