

光刺激を用いた細胞挙動の応答性評価に関する研究

Evaluation of responsive cells behavior by using lightings stimulation

○ 野口展士(電機大) 木内裕紀(電機大) 幡多徳彦(電機大)

野中一洋(McGowan Inst. Univ. Pittsburgh) 福井庸裕(電機大) 舟久保昭夫(電機大)

Hiroo NOGUCHI, Hiroki KIUCHI, Norihiko HATA Yasuhiro FUKUI, Akio FUNAKUBO, Tokyo Denki University
Kazuhiro NONAKA, McGowan Institute for Regenerative Medicine, University of Pittsburgh

Abstract: Cultured autologous in regenerative medicine is required a large amount of cell and culture time. Especially, cell proliferation in complicated structure is important to control cell behavior. This study evaluated effect of light irradiation for a responsive of cell proliferation and cell migration in cells population, which was irradiates directly by using LED with different wavelengths. Cells population fabricated by using mouse vascular endothelial cells (UV♀2:RCB1994) and silicone square tube was cultured was captured every 10 minutes for 96 hours. Two kind of LED lighting, including 470 nm and 625 nm LED, was irradiated at any time. Control was irradiated by using a green LED when capturing. Cells proliferation and cells migration rate at 470 nm were found fast as compared to the control and at 625 nm. In conclusions, it was suggested that cells behavior was affected by light energy. Additionally, it was suggested that cell behavior was possible to control cell behavior in cell culture process.

Key Words: LED, Responsive evaluation, Cell behavior

1. 緒言

再生医療における自家細胞医療では、患者自身の細胞を原料として用い培養し増殖させる。しかし、再生医療製品として用いる場合、増殖された細胞が大量に必要な⁽¹⁾。また、生体材料と組み合わせた3次元の人工臓器や人工血管においては複雑な Scaffold 構造を有しているため、大量の細胞が必要になることに加え、培養にかかる時間が比例して増加する⁽²⁻⁴⁾。細胞を培養する際に用いる細胞、組織は細胞組織としての機能を有する状態が望まれており、この機能を維持したまま、構築する構造体によっては早急な細胞の被覆が要求される⁽³⁻⁴⁾。そのため、細胞移動、増殖を制御し、促進させることが必要である。大家らによれば、青色発光ダイオードをラットの背中皮下に埋め込むことで光応答反応により人工血管としてのバイオチューブを作製し、光強度の増大によってコラーゲン形成の促進や、組織の弾性率が増大すると報告した⁽⁵⁾。このことから、細胞挙動の光応用を評価し、規則性を明らかにすることで、細胞挙動を制御し、組織構築を促すことが期待できる。

そこで本研究では基礎検討として、光と接することの内生体内環境の細胞を用い波長の異なる LED からの光を細胞に直接照射することで刺激し、細胞増殖、細胞移動速度などの応答性を検討した。また、照射した光の波長による影響を評価した。

2. 実験方法

2-1 LED による光エネルギー

LED は光エネルギーにより電子が励起および放出する現象が起きている。この光エネルギーを算出する式を(1)式に示す。

$$E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} [\text{eV}] \quad \dots\dots(1)$$

Table 1 Light energy of LED wavelengths

	LED-B	LED-R
LED [nm]	470	625
E [eV]	2.5	1.7

ここで h はプランク定数、 c は光速、 λ は光の波長である。本研究では、上記の式より光エネルギーを算出し、光エネルギーの高い LED-B と光エネルギーの低い LED-R を用いた (Table 1)。

2-2. 培養実験

基礎検討として、マウス血管内被種様細胞 (UV♀2:RCB1994) を用い、培地にはウシ胎児由来の血清 10% (FBS, Gibco 1017, Invitrogen Corp, Carlsbad, CA) を含んだ Dulbecco's Minimum Essential Medium (D-MEM) を用いた。細胞培養手順および細胞観察方法を Fig.1 に示す。

初めに 12well プレーートの中心上に蒸気滅菌済みシリコン製四角筒 (底面積 0.22 cm²) を固定した。このシリコン製四角筒内に RCB1994 細胞を 5.0×10^4 cells/cm² 播種し、温度 37 °C、CO₂ 濃度 5.0% 一定に保ったインキュベータ内で培養を行った。培養 24 時間後、四角筒内の細胞がコンフルエントになったのを確認した後、四角筒を取り外した。また、未接着のまま浮遊している細胞を PBS により、入念に洗浄および除去を行い、シャーレ内に培養液 1.4 mL を注入し、リアルタイム培養細胞観察システム (CCM, (株) アステック) に設置した。LED は well 中心に設置し、細胞集団に対し全体的に照射されるように

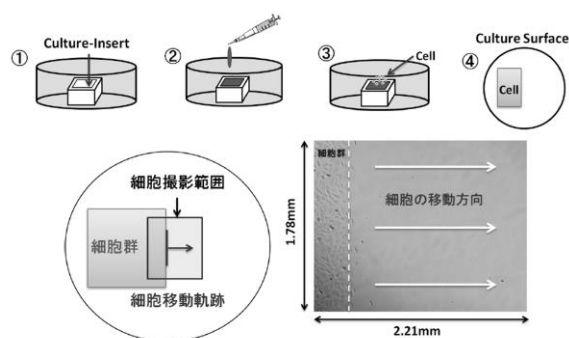


Fig.1 evaluation compendium of cell culture process

固定した。撮影は細胞集団の辺縁部を測定開始地点とし、10分間隔7日間撮影を行った。

2-3. 解析条件

細胞集団の増殖過程における細胞集団の速度ベクトル解析を行うため、撮影した画像に対し、2次元流体解析ソフトウェア FLOW-EXPERT (カトウ光研(株)) を用いた。これを粒子の平均移動量とすることで速度ベクトルを算出した。Table 2 に細胞移動量の解析条件を示す。撮影した細胞画像を速度ベクトルから、X軸方向の各要素の速度平均と速度分布を求めることにより、培養日数における細胞集団の移動推移、細胞集団内の個別細胞全体の平均移動速度と速度分布を算出した。

	X 軸	Y 軸
Frame size [pixel]	13	13
Mesh size [pixel]	10	10
Number of vector [-]	64	51
Analysis region [pixel]	639	511
Calibration [$\mu\text{m}/\text{Pixel}$]	1.28	

3. 実験結果および考察

それぞれ細胞画像についてベクトル解析を行ったものを Fig.2 に示した。Fig.2 より、光を照射することで、細胞集団の辺縁部の伸展増加において早く進展することが確認された。また、LED-R と比較し光エネルギーの高い LED-B では、より早い伸展増加をすることが確認された。そこで次に、伸展距離に対しベクトルの検出頻度を算出し Fig.3

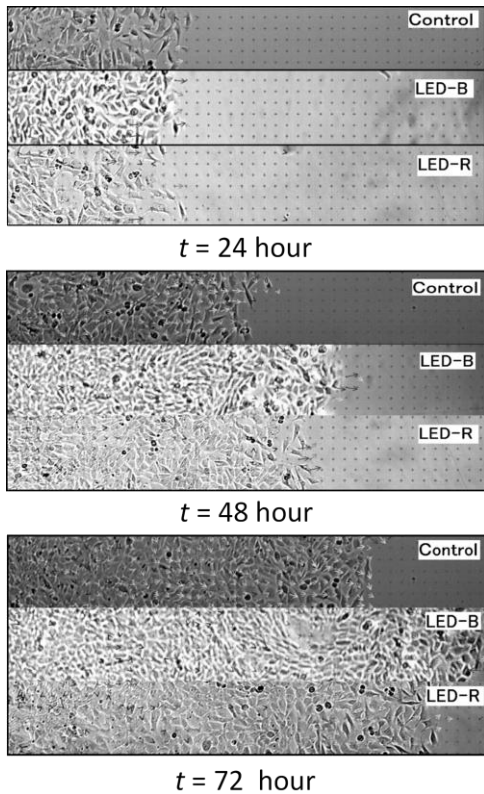


Fig.2 Analysis image of cell population

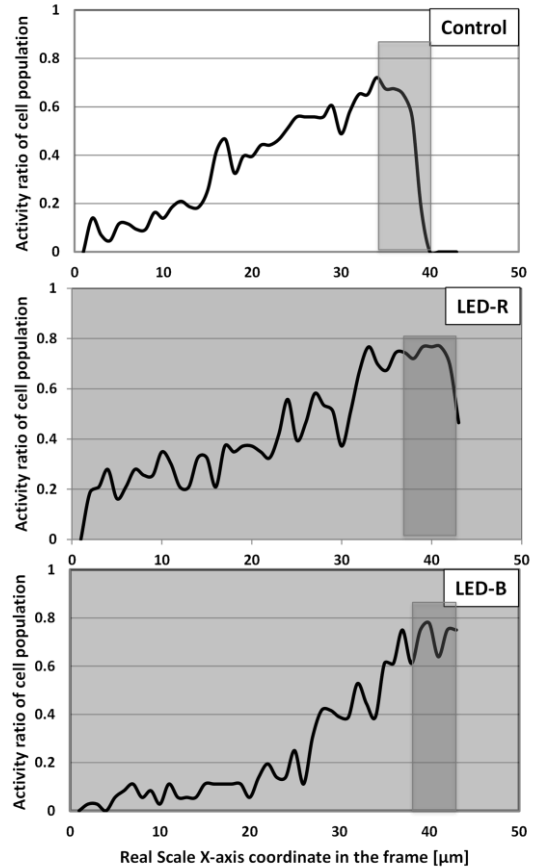


Fig.3 Frequency distribution of detected cell migration

に示した、伸展距離に対しベクトルの検出頻度を算出することで、細胞集団の伸展増加に対し活発な移動をする割合を定量的に明らかにすることが可能である⁽³⁾。その結果、共通して細胞集団の最辺縁部において移動する細胞の割合が多いことが確認された。一方細胞集団の中心部では活発に移動する細胞の割合が少なく、特に光エネルギーの高い LED-B 移動しないことが確認され、LED-B において、より強固な接着性があることが考えられた。この結果において LED-B において Control, LED-R と比較し早い増殖が行われていると考えられた。細胞増殖は低密度での細胞移動が最も速く、細胞密度の増加に対し移動速度が減少傾向にある⁽⁴⁾。このことから、光照射によって細胞の移動速度に関係性があることが考えられた。そこで、細胞集団の最辺縁部を最も伸展した距離から、最も移動頻度の高い伸展距離

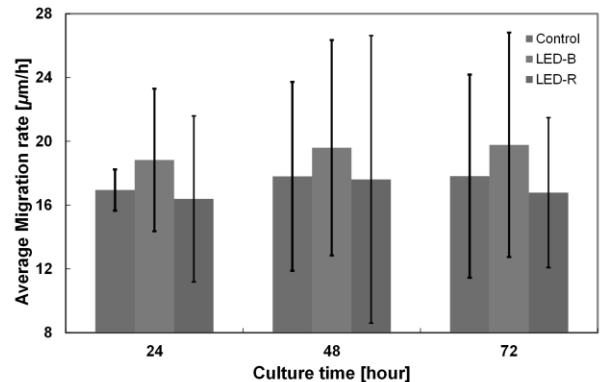


Fig.4 Average migration rate in marginal region of cells population

までと定義し、細胞集団の最辺縁部に対し移動速度を算出した(Fig.4)。Fig.4よりLED-Bにおいて最も速く細胞移動をすることが確認され、細胞集団の伸張が速くなることに起因していることが示唆された。これらの結果から照射された光に応答し細胞集団が移動、増殖することが示唆された。

4. 結言

本研究では光と接することのない生体内環境の細胞を用いて、波長の異なるLEDからの光を細胞に直接照射することで刺激し、細胞の増殖、細胞移動速度などの応答性を評価した。また、照射した光エネルギーにより影響を評価した。光エネルギーの高い470nmを照射し続けることで、細胞移動が速く、被服させることができ、光に応答し、細胞挙動を制御することが可能ではないかと示唆された。

参考文献

- (1) 紀ノ岡正博, 田谷正仁:組織培養における細胞評価”, 最近の化学工学 56—先端医療における化学工学 (化学工学会関東支部編),pp.79-97, 化学工業社, 東京, 2004.
- (2) 田畑泰彦, 岡野光夫 編集:ティッシュエンジニアリング 2006.日本組織工学会 監修 日本医学館 2006: 189-194.
- (3) 野中一洋,野口展士,矢口俊之,幡多徳彦,福井康裕,舟久保昭夫:粒子画像流速測定法を用いた培養面における細胞集団の挙動解析,ライフサポート,2010;22 (3):pp.39-45,2010
- (4) 野口展士,幡多徳彦,野中一洋,福井康裕,舟久保昭夫:速度ベクトル解析を用いた細胞密度変化における細胞移動評価,日本生体医工学会 V1050 (1):pp.149-154, 2012
- (5) 大家智徳, 中山泰秀:体内光照射によるバイオチューブ, 周辺組織の力学的郷土に及ぼす照射強度の影響,日本再生医療,O-07-2,p.169,2010