

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：34310

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12882

研究課題名(和文)超音波の生物学的安全性 世代をまたいだ遺伝学的解析

研究課題名(英文) Biosafety for the ultrasonic wave ---Genetic analysis stepped over the generation ---

研究代表者

渡辺 好章 (Watanabe, Yoshiaki)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：60148377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年多用されている超音波診断について生物学的安全性の観点から量的言及を試みた。生体への超音波照射の影響を「遺伝子発現変化とタンパク質発現変化」に着目して検討した。観測対象種としては、世代交代が3カ月と短いメダカを用いることによって、遺伝的影響についても検討した。メダカ胚への超音波照射を行いプロテオーム解析を行った結果、変動タンパク質としてAHCY酵素を同定した。またこの酵素は超音波の音圧上昇に伴ってその発生量が多くなることも観測された。さらに、MALDIを用いたイメージング質量分析も行った結果、種々の低分子代謝物の可視化にも成功し、2種類のメダカ胆汁酸の局在を明らかにすることもできた。

研究成果の概要(英文)：Quantitative references for the ultrasonic diagnosis were discussed from the viewpoint of biosafety. Experiments were carried out throughout the ultrasonic wave irradiation on living body with paying the attentions to "changes between a gene expression and a protein expression". As a kind target for the observation, Medaka(Japanese killifish) was applied because of the short generation of three months, then the genetic effects were also observed. As a result of performing the ultrasonic wave irradiation to a Medaka embryo, and having performed proteome analysis, AHCY enzyme was identified as a change protein. In addition, as for this enzyme, it was observed the increase of the quantity of outbreak with a rise of ultrasonic sound pressure. Furthermore, we succeeded in the visualization of the various kinds of small molecule metabolism thing as a result that the imaging mass spectrometry using MALDI reached and was able to clarify local existence of two kinds of Medaka bile acid.

研究分野：超音波エレクトロニクス

キーワード：超音波 安全性 遺伝的影響 タンパク質変成 MI値 メダカ

1. 研究開始当初の背景

超音波技術とエレクトロニクスの複合領域である超音波エレクトロニクスの近年の発展は目覚ましく、その成果を応用した革新的な方法や装置が、つぎつぎと臨床の場でも使われ始め、超音波診断・治療分野においては新たな領域が築かれようとしている。例えば、超音波診断においては、臓器の形態、性状、機能の情報を取得するため、装置機能や動作モードの多様化を利用する技術が標準的に実装され、このため生体への音響出力が増加傾向にある。また超音波治療においても、集束超音波を利用した癌治療への応用など、熱的作用、非熱的作用・機械的作用(キャビテーション)を積極的に技術応用していく傾向にあり、この場合にも音響出力はやはり増加傾向にある。しかしながら、その一方で、超音波の生体への安全性に対しては、臨床現場に任されており、その生物学的見地からの検討が遅れている現状がある。これは、超音波の生体への影響が複雑多岐であることに起因し、そのため、これらの新たな技術の影響をも加味した、生体に対する超音波出力の対する安全レベルの具体的な数値は明確には示されていない現状がある。

現在医療現場で用いられている超音波に対する安全指標は、MI (Mechanical Index) や TI (Thermal Index) が挙げられる。MI は、負のピーク音圧を中心周波数の平方根で割った値であり、TI は、超音波が生体に及ぼす発熱作用に対する指標である。このため、MI も TI も音響出力の安全性の目安のひとつとはなり得る。しかしながら、超音波の生体への作用要因は複雑多岐となると考えられることから、これらの基準は生物学的危険性を表す指標としては完結しているとは言いがたい。申請者等は、超音波の生物学的安全性指標を明確にするために、メダカに超音波照射し基礎的な検討を行ったところ、糖代謝に関連する遺伝子 PIK3R4 (Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory Subunit 4)、IGF2R (Insulin-like growth factor 2 receptor)、

KCNB2 (Potassium Channel, Voltage Gated Subfamily B) が発現変動することを見出した。このような生体代謝への超音波の影響までも視野に入れた検討はほとんど行われていない。このような背景から、本課題では通常の超音波に対する安全性の考え方をさらに一歩進めた見地から進める。

2. 研究の目的

(1) 超音波が生体機能へ与える影響

近年臨床現場で多用されている超音波診断について生物学的安全性の観点から量的言及を試みる。本研究課題では、超音波照射が生体機能へ与える影響の観点からの安全性についての評価対象ならびにその手法について基礎的な検討を進める。ここでは、生体への超音波照射の影響を「遺伝子発現変化とタンパク質発現変化」、特に「糖代謝関連遺伝子」について明らかにすることを目的とする。現在、超音波は診断および治療の手段として広く普及しているが、機能や動作モードの多様化により、生体への安全性を超音波の物理側面を含んで総合的に再検証することが必要となってきた。本研究では、超音波照射に伴う生体への影響を、メダカをモデルとして遺伝子・タンパク質発現レベルで解析すると共に遺伝子変化の次世代への影響についても検証する。本研究によって、より安全な超音波診断手法を機器・技術開発・医療現場に提供できる他、機器開発分野における安全基準の提案が可能となる。

本研究では、メダカモデル生物を使用して生物学的危険性を示す指標を明確にするために、臨床現場で使用されている照射条件に対応させて、生物学的安全性を明確にするために、メダカの発生に悪影響が出る超音波照射条件を明確にする。評価方法は、超音波処理後のメダカの遺伝子・タンパク質発現、形態変化である。すでに、糖代謝関連遺伝子に変化がある知見を得ているため、特にこれら遺伝子とタンパク質について解析を行い、次世代への影響も検証する。

(2) 課題の斬新性

超音波による生体への悪影響に関する研究例は報告数が少なく生物学的安全性が確立されていない。超音波診断のエネルギー出力が上がっている現在、超音波診断が胚発生期や生体構成成分、遺伝子発現に与える影響を詳細に調べることは極めて意味がある。本研究により、超音波診断についてMIやTIのような物理学的数値ではなく、生物学的数値の明確化は、今後の超音波診断の機器開発や技術開発の発展に寄与できる。

本研究では、超音波の個体発生への影響はメダカ胚および稚魚を用いる。実験動物としてのメダカは、発生学研究の**脊椎動物モデル**として多く用いられている。大きな卵、透明な胚、ゲノムサイズが小さい、ライフスパンが短い(約3ヶ月)、体外受精で大量に同ステージの胚が集められる、などの利点から古くから研究材料として用いられてきた。このような性質からマウスでは実験困難な、超音波の固体への影響について、第一世代だけでなく第二世代への影響までも遺伝子・タンパク質レベル、個体・組織レベルで簡便に検証できると考えている。超音波利用による生命体への影響に関する研究は極めて少なく、超音波による診断と治療の作用領域について、MIやTIのような物理学的数値ではなく、生物学的数値の明確化が待たれている現状がある。超音波の生体への悪影響に関する研究は少ないながら行なわれているが、糖代謝に関連する遺伝子の変動を生物個体レベルで見出したのは申請者が初めてである。すなわち、超音波照射により発現率が増加、低下する遺伝子をDNAマイクロアレイにて網羅的に解析した。3つの超音波音圧条件(安全域、境界域、危険域)で超音波照射して1時間後のメダカ胚に照射したところ、境界域と危険域で糖代謝関連遺伝子(PIK3R4、IGF2R、KCNB2)のいずれもが発現減少していた(未発表)。このことは、超音波境界域でも使用により、人体の糖代謝を変動させる可能性を

示しており、近年、超音波治療や診断において、超音波出力が上昇されるなか、境界域での超音波使用について非常に重要な知見である。さらに、臨床使用レベルの超音波により、メダカ胚の**卵黄収縮(孔も存在)**と出血、メダカ稚魚の頭部や腹部などが変形することを見出している加これらの結果を踏まえ、超音波による診断と治療の作用領域の明確化を脊椎動物のモデルとしてメダカを用いて解析を行う。さらに、親世代のエピジェネティックな変化が次世代に影響を与えることが言われており、ライフサイクルの短いメダカは遺伝子変異が次世代に与える影響を検証することができる。このような試みは初めてであり、チャレンジングといえる。

近年、細胞に加わる伸展や圧迫などの機械的刺激(メカニカルストレス)は、胎児の発生、老化、メタボリズム、循環器や運動器の維持など、さまざまな局面で重要なパラメーターであることが明らかにされ、分子実体の解明の端緒となる新しい知見がもたらされてきている。生物がメカニカルストレスに応答して情報伝達が起こり恒常性を維持することが知られているが、超音波によるメカトロニクスを含めた物理刺激は、ほとんど明らかになっていない。本研究が成功すれば、遺伝子やタンパク質発現レベル指標にした超音波作用領域の明確化だけでなく、超音波の物理的刺激による恒常性の維持への影響が解明されるだけでなく、エピジェネティクス実験モデルメダカや糖尿病モデルメダカの作成も可能になる。社会的には、将来、超音波機器開発の発展、臨床現場で超音波を使用する医師・技術者への安全確保と、患者の安心安全な治療提供ができると期待される。

3. 研究の方法

本研究では、安全域・境界域・危険域とされている音波、臨床現場で使用されている周波数条件(数10kHz~10MHz)における安全性についてメダカ胚を用いて超音波の生物学的安全性を明確にするために、メダカの発生に悪影響が出る超音波照射条件を解析する。超音波による

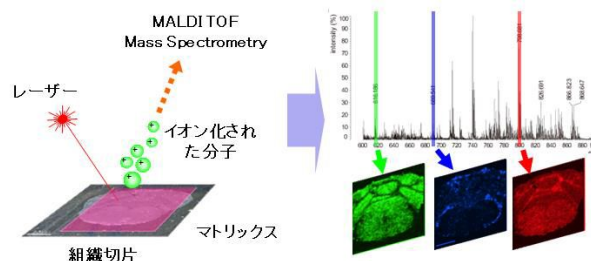
損傷する遺伝子の種類、超音波の影響は遺伝子の損傷だけでタンパク質などには影響が無いのか、信号伝達を阻害する可能性はあるのか、世代をまたいだ遺伝的な影響の検討を行う。これらにより、超音波の安全性と生体への影響が、一世代だけでなく二世代以上に渡って遺伝子・タンパク質レベルで明確になる。

3つの超音波音圧条件(安全域、境界域、危険域)で超音波照射して1時間後のメダカ胚(4週~6週)に照射した24時間後、メダカよりDNAを調整しDNAマイクロアレイによる解析を行う。これは、境界域と危険域で糖代謝関連遺伝子(PIK3R4、IGF2R、KCNB2)のいずれもが発現減少していた既観測結果(未発表)についての再現性を確認するために行い、再度DNAマイクロアレイを行う。また、先行させた観測結果において、超音波照射によりメダカ遺伝子に変化が見られたが、タンパク質レベルでの変化の有無について、すべてのタンパク質の発現を網羅的に調べるためにプロテオーム解析を行う。すなわち、メダカに超音波照射と未照射処理を行い、メダカから抽出したタンパク質をBlue-Native PAGEにて分離し、超音波照射と未照射で差のあったタンパク質スポットについて質量分析を行いタンパク質の同定を行う。さらに、発現変化のあったタンパク質、特に糖代謝関連タンパク質の抗ペプチド抗体(ポリクローナル抗体)を外注しWestern blotting解析にて発現の変化を確認する。また、メダカ胚の形態異常(卵黄収縮、出血)の発生確率の照射音圧に対する依存性についても、安全域・境界域・危険域でのメダカ胚と稚魚の観察および、組織についてHE-Nile Blue染色(ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)と核染色の併用)を行い、組織への影響を観察する。

4. 研究成果

メダカは多産であり、世代交代サイクルが短いことから数を容易に増やすことができ、世代をまたいだ実験のモデル生物として注目されている。

本課題では、超音波照射の生体への影響を明らかにするためメダカを対象としたオミクス解析を試みている。これまでに、メダカ胚を用いて超音波照射刺激前後の遺伝子発現解析(トランスクリプトーム)、タンパク質複合体解析(プロテオミクス)を行い、超音波照射による遺伝子・タンパク質レベルでのメダカ発生期における影響を確認した。本課題では、組織ごとの超音波影響をイメージング質量分析法などの手法を用いメダカ成魚の代謝を明らかにするための基礎実験を行った。その結果、代謝レベルについても超音波照射による影響が表れる可能性が強く示唆された。



イメージング質量分析法(下図)を用いてメダカ成魚体内における組織ごとの代謝物の分布を明らかにすることを試みた。メダカ成魚(上図)を、液体窒素で急速凍結させクリオスタットを用いて12 μm厚組織切片を作製し、伝導性のスライドガラス(ITO)に融解接着させた。メダカの新鮮凍結切片を対象に、エアブラシを用いてマトリックス(9AA:9-アミノアクリジン)を均一に塗布した。質量顕微鏡 iMScope(島津製作所)を用いて、測定領域を指定、照射径・レーザー強度などの分析条件を設定した。また、DHB(2,5-dihydroxybenzoic acid)にてキャリブレーションを行った。メダカ組織中のある物質はレーザーによってイオン化され、生成したイオンを質量と電荷の比(m/z :イオンの質量(m)を電化数(z)

で割った値)として表し、イオンの電磁場中での運動の違いから、マススペクトルと呼ばれるグラフデータを得た。各分子の強度の情報をXY走査画面上の2次元データとして可視化し、ラベルを用いずに一挙に多数の分子の同在情報を得た。これまでのところメダカ成魚を対象としたイメージング質量分析の結果、ヌクレオチド関連代謝物に加えメダカに特異的な胆汁酸のイメージングに成功してる。このような観測例は報告されておらず、生体機能に対する新たな知見へと発展が期待される基礎データであると考えられる。

網羅的タンパク質複合体解析実験:プロテオーム

受精後4日目のメダカ胚を各音圧につき5個ずつ使用した。超音波照射01h後のメダカ胚を液体窒素で凍結させ、-80℃の下で保存した。実験日にメダカ胚からのタンパク質の抽出は、破砕器(MicroSmash)を用いて行った。BN/SDS2DPAGE法を用いてタンパク質の分離を行い、銀染色を行った。音圧に伴い変化の認められたタンパク質スポットを切り出し、ゲル内消化ののち、ペプチドマスフィンガープリンティング(PMF)法を用いてタンパク質の同定を行った。

超音波照射により、変化の見られた約45kDaのタンパク質をAdenosylhomocysteinaseB-like(AHCYB-like)と同定した。抗体を用いた検証によりタンパク質レベルでの発現が確認されている。

まとめ

生体影響を解析するためメダカを対象とした多層的オミクス解析法を確立した。

今後は、メダカ胚初期の超音波照射刺激は成魚にどのような影響を与えるのか検証を行う。また、これらで得られた成果を基盤として、超音波照射が生体機能に与える影響についてさらに詳しく検討を進める予定である。特に、現在注目されている非アルコール性肝炎(NASH)に対する超音波照射の影響についても詳しい検討を進

める。

5. 主な発表論文等

(学会発表)(計5件)

松本恵李那, 吉田憲司, 秋山いわき, 廣瀬まゆみ, 池川雅哉, 渡辺好章

超音波照射されたメダカ胚のプロテオーム解析, 平成29年度第2回アコースティックイメージング研究会, 2017

E. Matsumoto, K. Kawanabe, K. Yoshida, I. Akiyama, M. Hirose, M. Ikegawa, Y. Watanabe

Proteomic analysis of developmental effect on medaka embryo exposed by ultrasound, International Congress on Ultrasonics, 2017

石原和也, 山下悠介, 吉田憲司, 秋山いわき, 剣持貴弘, 吉川裕子, 吉川研一, 渡辺好章

超音波照射によるDNA分子の二重鎖切断, 日本超音波医学会第90回学術集会, 2017

山下悠介, 吉田憲司, 渡辺好章, 秋山いわき, 剣持貴弘, 吉川研一, 吉川祐子

MHz帯超音波照射に伴う巨大DNA分子の二重鎖切断の音圧依存性, 日本音響学会2017年春季研究発表会, 2017

阪口裕暉, 松本恵李那, 辻雄大, 池川雅哉, 秋山いわき, 中邨智之, 廣瀬まゆみ, 渡辺好章

生体影響解析システムとしてのメダカのオミクス解析, 第23回Hindgut Club Japanシンポジウム, 2017

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 好章 (WATANABE Yoshiaki)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号: 60148377

(2)研究分担者

池川 雅哉 (IKEGAWA Masaya)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号: 60381943

吉田 憲司 (YOSHIDA Kenji)

千葉大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 10572985

(3)連携研究者

秋山 いわき (AKIYAMA Iwaki)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号: 80192912

(4)研究協力者

松本 恵季那 (MATSUMOTO Erina)

阪口 裕暉 (SAKAGUTI Hiroki)

山下 悠介 (YAMASHITA Yusuke)

石原 和也 (ISHIHARA Kazuya)

廣瀬 まゆみ (HIROSE Mayumi)