

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H03520

研究課題名(和文) 時空間変調した電界刺激による細胞分裂の阻害メカニズムの解明とその応用

研究課題名(英文) Inhibitory mechanism of cell division by spatiotemporally modulated electric field and its application

研究代表者

藏田 耕作 (Kurata, Kosaku)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：00368870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では交流電界の印加による細胞分裂の阻害メカニズムを解明するため、アフリカツメガエル受精卵を用いた実験と有限要素電場解析を行った。期待通りに細胞分裂の方向や細胞の致死を肉眼でも容易に観察しながら実験することができ、電界印加の効果として個体の奇形が認められた。解析では、細胞の形態や電気的特性が細胞内で生じる誘電泳動力の強度に与える影響をシミュレーションできることを示した。それにとどまらず、電気的特性や細胞分裂の角度などの不確かな要因が誘電泳動力に与える影響をタグチメソッドによって検討できることを示し、それらの変動の影響を受けにくいロバストな電界印加条件を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

弱い交流電界の印加が細胞分裂に干渉することがアフリカツメガエル受精卵を用いた実験で示されたが、この受精卵をモデル細胞にして研究を進めるにはいくつかの課題があることが分かった。また、電場の数値シミュレーションとタグチメソッドを用いた検討から、生体の電気的特性や電界印加の方向などに変動があっても、その影響を受けにくい電界印加条件を明らかにした。これは、交流電界をがん治療に応用する際、治療効果を向上させるのに有用である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of inhibition of cell division by the application of an alternating electric field, experiments using eggs of *Xenopus laevis* and numerical simulation were conducted. The direction of cell division and cell death could be easily observed as expected. The application of an electric field caused abnormal development of eggs. In the numerical analysis, we were able to predict the effect of cell size and electrical properties on the intensity of the dielectrophoretic force generated in the cell. In addition, we showed that the Taguchi method can be used to study the effects of uncertainties in electrical properties and cell division angles on the strength of the dielectrophoretic force. The optimum condition of the electric field with a high robustness to unpredictable variations in cell size and electrical properties was identified, which would be useful for improving the efficacy of cancer treatment using weak alternating electric fields.

研究分野：生体工学，生体熱工学

キーワード：細胞分裂 電界分布 誘電泳動力 低侵襲がん治療 遺伝子マニピュレーション

1. 研究開始当初の背景

細胞に外部から交流電界を与えると細胞内に一様な電界が形成される (図 1). ところが, 分裂中のゆがんだ細胞の中では電界が不均一になり, この不均一な電界は染色体や微小管など細胞内の物質を動かす力 (誘電泳動力) を生み出す. これを利用すれば, 分裂中の細胞内で染色体の移動に干渉を与え, 細胞増殖を阻害したり細胞を壊死させたりできる.

適切な交流電界を印加して誘電泳動力を発揮させると分裂期の細胞だけが分裂に失敗して壊死することになるので, 増殖の速い, 悪性のがん細胞だけを殺すことができる. つまり, この方法の最大の利点は, 増殖の遅いがん細胞や正常細胞になんら影響を与えないことである. これは, 周囲の組織もともがん細胞をすべて除去するという従来のがん治療の考え方を換え, 増殖するがん細胞だけを殺すという新しい低侵襲がん治療の展開へ繋がる.

しかし, 細胞分裂がきわめて盛んなグリオーマ (脳腫瘍の一種) に対して行われた交流電界 (周波数 100 kHz~1 MHz) による治療では, 患者のわずか 30% に効果が認められただけだった (A. F. Hottinger, et al., 2016). これは, 電界が細胞分裂を阻害する詳細なメカニズム, 電界が効かない理由, 細胞毎・患者毎の反応パターンの違いや予測シミュレーションの方法について, ほとんど分かっていないからだと思われる.

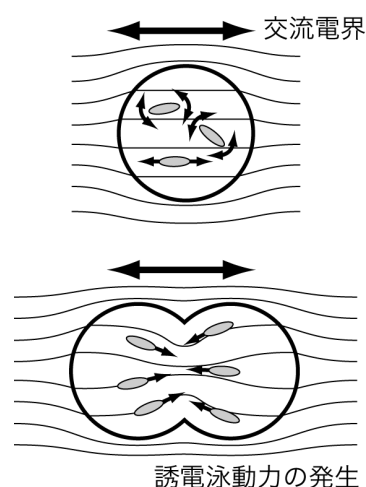


図 1 交流電界にさらされた細胞の中には一様な電界が形成される (上) が, 細胞分裂によってくびれると電界は非一様になり, 誘電泳動力が発生する (下).

2. 研究の目的

本研究では, ①交流電界中で細胞の分裂過程を解析し, 電界による分裂阻害のメカニズムを解明すること, ②分裂の阻害に最も効果的な電極配置と電圧印加条件を予測する数値シミュレーション法を確立すること, の 2 つを目的とした. 「受精卵を用いた生物学的研究」と「シミュレーションによって原理にせまる工学的研究」の両面から研究を進め, 細胞分裂の盛んな増殖性の高いがん細胞だけをターゲットにした新しい低侵襲がん治療の展開を目指した.

3. 研究の方法

本研究では, モデル細胞としてアフリカツメガエル受精卵を用いた. 一般ながん細胞は直径 20 μm 程度で観察するのに小さく, またいつ細胞分裂が起こるか分からない. 一方, アフリカツメガエル受精卵は直径 1 mm 以上もあるので実体顕微鏡で簡単に観察できるだけでなく, 受精して約 90 分後に最初の分裂 (卵割) を生じて二細胞胚になり, さらにその 30 分後, 最初の卵割面に対して垂直な面で分裂を生じて四細胞胚になるので, 電界印加や観察のタイミングを分裂時期に合わせて実験できるという大きなメリットがある.

(1) アフリカツメガエル受精卵の形態計測

アフリカツメガエルの卵を受精させて四細胞胚をブアン固定液で化学固定した. これを 2 wt% アガロースゲルで作成した円錐状の支持台に載せてマイクロ CT (Skyscan 1172, Bruker) にセットし, 管電圧 35 kV, 管電流 100 μA , 空間分解能 7 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ の条件で撮像した. 画像再構築ソフトウェア Simpleware ScanIP (Synopsys, Inc.) を用いて領域抽出とスムージング処理を行い, 受精卵の三次元モデルを作成した (図 2).

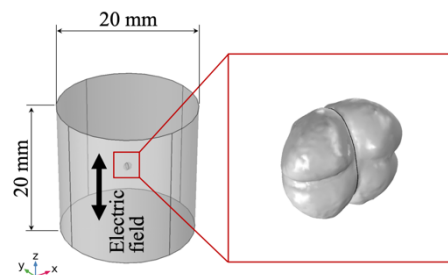


図 2 四細胞胚の三次元モデルと解析領域.

(2) 三次元有限要素電場解析

(1) で得られた受精卵の三次元モデルを COMSOL Multiphysics (v. 5.3a, COMSOL AB) にインポートし, 直径 20 mm, 高さ 20 mm の円柱形状の解析領域の中心に置いた (図 2). この円柱の上下面に周波数 1 kHz~100 kHz で 4 V peak-to-peak の交流電位を与え, 四面体要素に分割した解析領域内の電界の実効値 E_{rms} を求めた. なお, 細胞内液, 細胞膜, 細胞外液の導電率はそれぞれ 0.3, 3×10^{-7} , 0.3 S/m, 比誘電率は 72.3, 5, 72.3 とした.

細胞内液 (導電率 σ_c , 比誘電率 ϵ_c) 中の粒子 (半径 r_p , 比誘電率 ϵ_p) に働く誘電泳動力 F_{dp} は,

$F_{dp} = 2\pi r_p^3 \epsilon_0 \text{Re}(\epsilon_c^*) \text{Re}(K) \nabla E_{rms}^2$ から求めることができる。ここに、*は複素数場を示す。また、 i : 虚数単位、 ω : 角速度[rad/s]を用いると $K = (\epsilon_p^* - \epsilon_c^*) / (\epsilon_p^* + 2\epsilon_c^*)$, $\epsilon^* = \epsilon - i\sigma/\omega$ である。いま、誘電泳動力が生じる対象をチューブリンと考えると、 $2\pi r_p^3 \epsilon_0 \text{Re}(\epsilon_c^*) \text{Re}(K)$ の値は周波数 1 kHz~100 kHz の範囲内においてはほぼ定数と見なせる。すなわち、 $|F_{dp}| \propto |\nabla E_{rms}^2|$ である。そこで、 $|\nabla E_{rms}^2|$ の分布を考えることによって誘電泳動力の大きさを評価した。

(3) タグチメソッドによるロバストな印加条件の検討

染色体分配に干渉して細胞分裂を阻害するには、細胞内にできるだけ大きな電界や誘電泳動力を発生させることが重要である。しかし、これらは電界の印加条件や細胞内外の電気的特性の影響を強く受け、すべての影響因子の変動を組み合わせることは不可能である。そこで、ロバスト設計手法の1つであるタグチメソッドを用いて、ノイズ因子が不確実に変動しても安定した誘電泳動力が得られる条件を、できるだけ少ない試行回数で検討した。

外部電界 (1, 2, 3, 4 V/cm) を電場印加システムの入力 M とした。有限要素電場解析によって $|\nabla E_{rms}^2|$ を計算して、分裂面近傍に設定した領域 (ROI) 内における平均値の平方根を出力 y とした。このように考えると、入出力には線形関係が認められた。この入出力関係に影響し、かつ制御できる因子4つ (電界の周波数, 方向, 細胞外液の導電率と比誘電率) と制御できないノイズ因子6つ (細胞膜厚さ, 細胞直径, 細胞膜と内液の導電率と比誘電率) を抽出し、それぞれ3レベルの変動 (3水準) を検討した。まず、ノイズ因子を L18 直交表に割り当てて 18 通りの組み合わせで有限要素解析を行い、出力 y を最大あるいは最小にするノイズ因子の組み合わせを得た。つぎに、制御因子に対して同様に解析し、ノイズ因子にかかわらず出力 y の安定性が最も高くなる制御因子の組み合わせを求めた。

(4) アフリカツメガエル受精卵を用いた電場の印加実験

分裂過程を明瞭に観察できるアフリカツメガエルの受精卵を用いて電場の印加実験を行った。アフリカツメガエル受精卵のゼリー膜をシステイン溶液で除去した後、3D プリンターで出力した培養容器内に静置してデジタル顕微鏡で経時観察した。最初の卵割の方向を確認し、受精卵が二細胞から四細胞になるまでの間、卵割面と平行または直交する方向に交流電界を印加した。なお、印加する電界の強度と周波数は (2) の数値シミュレーションの結果を踏まえて、強度 1 または 2 V/cm, 周波数 2 kHz に設定した。印加後、受精卵を 96 穴マルチウェルプレートに移し、2% Ficoll を添加した Modified Barth's Saline 溶液中で温度 16°C に保ちながら培養し、卵割と発生の様子を経時観察した。評価には、中期胞胚遷移 (受精後 8 時間) における生存卵数を基準にしたときの原腸胚期 (受精後 24 時間) における生存率、さらに受精後 96 時間の個体における奇形発生率の2つの指標を用いた。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル受精卵に生じる電界と誘電泳動力の解析結果

解析によって得られた電界の実効値の分布を図3に示す。周波数が 2 kHz および 5 kHz の条件で、細胞胚のくびれ部分に電界が強く集中していることが示された。図4は周波数 2 kHz における細胞胚内部の電界分布である。くびれ部分を中心として、電界の高い領域が細胞内部にまで及んでいることが明らかになった。卵割時に染色体が整列する分裂面を中心にして、厚さ 0.1 mm の領域を抽

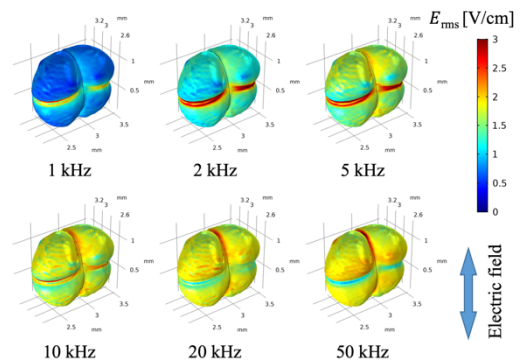


図3 電界の実効値の分布の周波数依存性

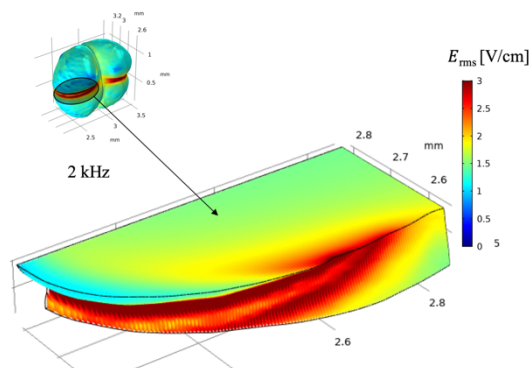


図4 受精卵内部の電界分布 (50 kHz)

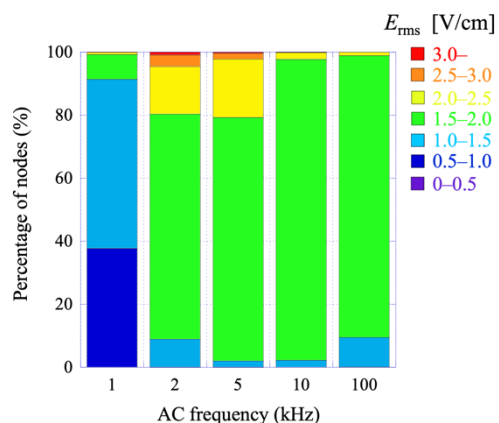


図5 ROI内の各ノードの電界の大きさの分布

出し、各ノードの電界の大きさをまとめた結果を図5に示す。周波数2kHz以上の交流電界を印加すれば、細胞分裂の阻害に必要と言われている1~3 V/cmの電界を分裂面全体に作用させられることが示された。また、高い電界にさらされるノードが最も多いのは、2kHzのときであることが明らかになった。

誘電泳動力の大きさを評価するために計算した $|\nabla E_{rms}^2|$ の分布を図6に示す。局所的に大きな誘電泳動力が表面の凹凸に対応して認められたが、誘電泳動力が最も大きいのは細胞のくびれ部分であった。図7は、卵割面に沿った厚さ0.1mmの領域内を対象として各ノードの $|\nabla E_{rms}^2|$ の値をまとめた結果である。電界と同様に、2kHzの交流を印加するときに誘電泳動力が最も大きくなることが示された。

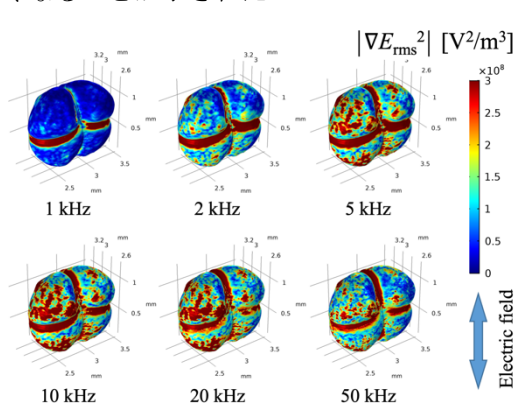


図6 誘電泳動力の分布の周波数依存性

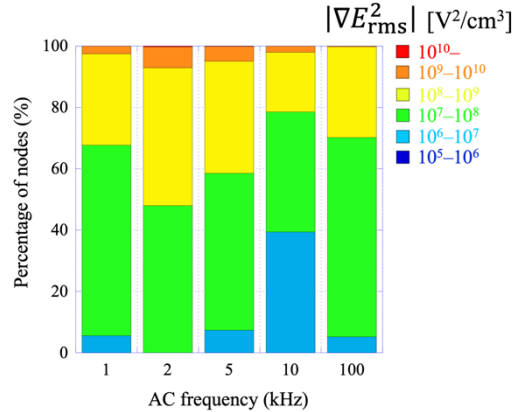


図7 ROI内の各ノードの誘電泳動力の大きさの分布

(2) ノイズに強いロバストな印加条件

6つのノイズ因子（細胞膜厚さ、細胞直径、細胞膜と内液の導電率と比誘電率）にそれぞれ3レベルの変動（3水準）を与えて、印加電界 M (1, 2, 3, 4 V/cm) に対して $|\nabla E_{rms}^2|$ を解析し、ROI内における平均値の平方根（出力 y ）を計算した。このとき $y = \beta M$ の関係が認められた。水準毎に β を平均して得られた要因効果図を参照すると、 β が大きくなるのは、細胞膜厚さ、細胞直径、細胞内導電率、細胞内比誘電率が小さいとき、また細胞膜導電率が大きいときであった。また、細胞膜比誘電率の違いは β にほとんど影響しなかった。 β を小さくする水準の組み合わせと大きくする水準の組み合わせを考えて調合ノイズ N_{min} , N_{max} とした。

次に、L18直交表の内側に4つの制御因子（電界の周波数、方向、細胞外液の導電率と比誘電率）を、外側に入力 M と調合ノイズ N_{min} , N_{max} を割り付けて電場解析を行い、 β と S/N 比を計算した。その要因効果図から、S/N 比を大きくする、つまりシステムのロバストネスを高めるのは、大きな周波数、外部電界の向きが10度、大きな細胞外導電率と細胞外比誘電率という条件であった。特に、周波数は非常に大きな効果を持つことが示され、S/N 比を最大にする制御因子の組み合わせは、周波数400kHz、外部電界の向き10度、細胞外導電率3 S/m、細胞外比誘電率80であった。一方、 β を大きくするのは、小さな周波数、大きな細胞外導電率という条件であった。外部電界の向きと細胞外比誘電率は β の大きさにほとんど影響しなかった。

タグチメソッドでは、最初に S/N 比の最大化、つまり出力のバラツキを最小化した後に、 β の調節が行われる。図8に入力 M と出力 y の関係を示す。第2水準を用いたベースの組み合わせ C_{ref} では、調合ノイズ N_{min} , N_{max} に対する出力は2.5倍以上異なる（図8の2本の黒実線）。つまり、システムにノイズ因子の変動があると出力が2本の直線で挟まれる領域内で大きく変動することになる。一方、最適化された組み合わせ（図8の2本の赤実線）では、出力そのものは下がるものの、 N_{min} , N_{max} に対する出力差は3%以内であり、ノイズに対するロバストネスの大幅な向上が得られた。

S/N 比の最大化が図られたので、次のステップでは S/N 比がひどく悪化しない範囲で β が大きくなる条件をチューニングした。4つの制御因子の中で周波数が S/N 比と β に最も大きな影響を与え、しかもその影響はトレードオフの関係にあったので、周波数をベースの第2水準（200 kHz）にしたとき、さらに第2水準（200 kHz）と第3水準（400 kHz）の間にある300 kHzにしたときの解析を行った。周波数を第2水準（200 Hz）、あるいは300 kHzにすることによる利得はそれぞれ0.2 dBと6.9 dBであり、それに対応する β は1.04倍と0.81倍の変化であっ

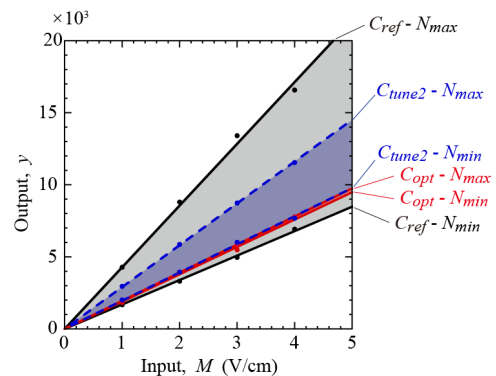


図8 入力 M と出力 y の関係に制御因子の組み合わせが与える影響

た. すなわち, 前者は S/N 比も β も変化がなく, 後者ではバラツキが 1/2 以下となり, 出力は約 20% 低下した (図 8 の 2 本の青破線).

以上の検討より, 現行治療デバイスよりも高い周波数の電界を用いるとノイズ因子の影響を受けないロバストな結果が期待できること, さらにこの他に, ± 20 度の電界の偏位は結果にほとんど影響しないこと, 導電率や誘電率の低い造影剤の残留は電界の効果を低くすることが明らかになった.

(3) アフリカツメガエル受精卵を用いた電場の印加実験結果

アフリカツメガエル受精卵の二細胞が四細胞になるまで, 強度 1 V/cm, 周波数 2 kHz の交流電界を印加したときの原腸胚期 (受精後 24 時間) における生存率を図 9 に示す. 二細胞が接する面に平行 (0 deg; 四細胞分裂面に直交) に印加するとき生存率が下がることを期待していたが, 実験群間に有意差はなかった. 強度を 2 V/cm に増しても有意差は認められなかった. しかしながら, 受精後 96 時間の個体における奇形発生率を比較すると, 電場を印加していない Control 群で 21% だったのに対し, 二細胞が接する面に直交 (90 deg; 四細胞分裂面に平行) に印加すると 41%, さらに 0 deg では 50% に増していた. 電界を印加すると正常な発生では見られない気泡が胴部分に現れたり, 胴部分が小さかったり, 奇形を示す個体が多く発生することが明らかになった. このような個体発生後に認められた奇形は, メカニズムは不明なもの, 電界の印加によって引き起こされた可能性が高い.

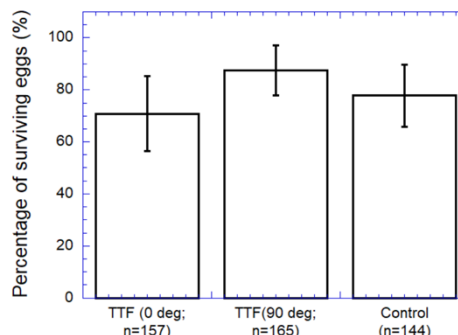


図 9 原腸胚期 (受精後 24 時間) における受精卵生存率の比較 (電界の強度 1 V/cm, 周波数 2 kHz)

アフリカツメガエル受精卵を用いた実験は, 当初の期待通りに細胞分裂の方向や細胞の致死を肉眼でも容易に観察しながら進めることができた. 個体発生後に観察された奇形は電界印加の効果である可能性が高いが, がん治療に活かすという観点からはこのアフリカツメガエル受精卵で得られた成果の応用は難しいと思われる. アフリカツメガエル受精卵をモデル細胞に用いる際の問題が 2 つ明らかになった. 1 つ目は, 電界の影響を分裂初期に観察できないことである. 受精卵では分裂 12 回 (22°C 条件下で受精後 6~7 時間) までは転写が起こらず, DNA 複製や DNA 損傷のチェックポイントは不活性であると言われている. そのため二細胞胚から四細胞胚まで印加した電界でたとえ染色体分配に異常を与えられたとしても, そのまま細胞分裂は進んでしまう. 2 つ目は, 電界を印加していない対照群の生存率の低さである. 対照群のすべての受精卵が分裂を進めて発生に至るわけではなく, 約 20% の受精卵は白化して致死した. これらの問題から, アフリカツメガエル受精卵を本研究のモデル細胞として扱うにはさらに工夫を要することが分かった. 一方, 解析では, 細胞 (受精卵) の形態や電気的特性が細胞内で生じる誘電泳動力の強度に与える影響を有限要素電場解析によってシミュレーションできることを示した. それにとどまらず, 電気的特性や細胞分裂の角度などの不確かさが誘電泳動力に与える影響をタグチメソッドによって検討できることを示し, 不確かなものの変動の影響を受けにくいロバストな電界印加条件を明らかにすることができた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kurata K, Iwata T, Shimada K, Takamatsu H	4. 巻 1096
2. 論文標題 Effects of cell morphology and electrical properties on electric field and dielectrophoretic force generated in cell exposed to tumor-treating field	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IOP Conference Series: Materials Science and Engineering	6. 最初と最後の頁 12003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1757-899X/1096/1/012003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 藏田耕作, 島田一樹, 岩田季久, 高松洋	4. 巻 52(8)
2. 論文標題 弱い交流電界による有糸分裂の阻害とがん治療への応用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 31～34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurata Kosaku, Shimada Kazuki, Takamatsu Hiroshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Application of the Taguchi method to explore a robust condition of tumor-treating field treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藏田耕作, 島田一樹, 船岡佳生, 高松洋
2. 発表標題 交流電界によって細胞内に誘起される誘電泳動力の解析
3. 学会等名 第25回計算工学講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosaku Kurata, Hiroshi Takamatsu
2. 発表標題 Application of Low-intensity Electric Fields to Cancer Treatment
3. 学会等名 The 6th International Conference on Industrial, Mechanical, Electrical and Chemical Engineering (ICIMECE) 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田一樹, 岩田季久, 藏田耕作, 高松洋
2. 発表標題 交流電界中の受精卵に働く誘電泳動力の三次元有限要素解析
3. 学会等名 第30回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田季久, 島田一樹, 藏田耕作, 高松洋
2. 発表標題 交流電界中の分裂細胞に作用する誘電泳動力の分布
3. 学会等名 第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藏田耕作, 島田一樹, 高松洋
2. 発表標題 細胞分裂を阻害する腫瘍治療電場のタグチメソッドによる最適化
3. 学会等名 第33回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中條 信成 (Nakajo Nobushige)	九州大学・理学研究院・講師 (17102)	
連携研究者	吉留 賢 (Yoshitome Satoshi) (30325790)	福岡女子大学・国際文理学部・研究員 (27103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------