

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500416

研究課題名（和文）音響力学によるストレス・プレコンディショニング法の開発

研究課題名（英文）Stress tolerance of the cell induced by a sonochemical preconditioning using ultrasound

研究代表者

久米 真 (KUME MAKOTO)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：00372326

研究成果の概要（和文）：本研究によって、超音波の音響化学効果で細胞環境に活性酸素種を生成しストレスタンパク質hemeoxygenase-1を発現させた細胞には自己防御機転が増強し、細胞が酸化ストレスに対する耐性を獲得することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：This study suggested that sonochemical effect of ultrasound could generate reactive oxygen species in biological milieu and this chain of potential stimuli would induce stress response of the cells to generate stress protein, hemeoxygenase-1. As a result, this artificial treatment, named sonochemical preconditioning, provided the target cells with significant tolerance against a critical state of oxidative stress.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用システム

キーワード：超音波・音響化学・臓器保護・ストレス応答・熱ショックタンパク質・酸化ストレス・環境制御

1. 研究開始当初の背景

高度進行肝癌・胆道癌の根治性は癌の脈管侵襲に規定され、根治手術を行う場合、血管合併切除・再建が必要となる。この技術は手術の可能性を飛躍的に拡大させることに成功したが、必然的に虚血・再灌流によって惹起される臓器障害という問題をもたらす結果ともなった。

我々は heat shock preconditioning によって有効な肝虚血耐性を誘導することに成功した。(Kume M, et al. J Lab Clin Med; 128(3): 251-8, 1996.)。しかし臨床に heat shock preconditioning を応用するとき、HSP を誘導し得る温度まで肝臓を加温するには加温部局所に

痛みや苦痛をうけることが明らかとなった (Yamamoto Y, et al. Recent Results Cancer Res. 147: 157-72, 1998.)。この問題を克服するため、我々は音響エネルギーを用いて肝臓に HSP を誘導し肝保護効果を獲得する新しい音響力学法 sonodynamic preconditioning の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、超音波によって細胞のストレス応答を誘導し酸化ストレスに対する耐性を得る sonochemical preconditioning の効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

3.1 細胞培養

本研究で使用した HuH7 細胞は、独立行政法人理化学研究センターから購入した (RCB1366)。HuH7 細胞は FBS を 10% 含む DMEM を用い、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベータ内で培養した。

3.1.1 解凍

細胞は 37°C 恒温槽内で解凍し懸濁させ、PBS 加遠心分離 (4°C, 1000rpm, 3 min) 後上澄みを吸引し、培養液を加えて懸濁させ、φ100 mm ディッシュに播種した後、37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベータ内 (ヤマト BNA-111) で培養した。

3.1.2 継代培養

対数増殖期にある細胞を PBS で 2 回洗浄後、0.25% Trypsin / EDTA を添加し、ディッシュ底面の細胞を剥離した。0.25% Trypsin / EDTA と同量の DMEM を添加し細胞懸濁液を回収し、4°C、1000 rpm にて 3 分間遠心分離後、上澄みを吸引し、DMEM 培地を加え細胞懸濁液中の細胞数を計数後、細胞を φ100mm ディッシュ に播種した。

3.2 細胞へのストレス負荷

3.2.1 温熱処理

40 ~ 45 °C の恒温槽 (タイテック製

Personal 10) にディッシュを 20 分間浸して熱負荷を与えた後 6 時間培養した。培養後の細胞を回収し、HSP72, H0-1 発現の有無をウェスタンブロット分析した。

3.2.2 H₂O₂ 処理

最終濃度 30 ~ 70 μM となるように H₂O₂ を添加することで酸化ストレスを負荷した後、6 時間培養した。培養後の細胞を回収し、HSP72 ならびに H0-1 の発現の有無をウェスタンブロットによって分析した。

3.3 超音波照射

3.3.1 超音波照射装置

本研究にて使用した超音波照射装置 (本多電子社製 Fig. 1) は、振動子、φ35 mm 細胞培養ディッシュ (BD Falcon™ 製) ならびに超音波ジェネレーターから構成され、ディッシュと振動子はジェルによって密着させた。本装置は、周波数 1 MHz、出力 0.5 ~ 2.3 W の定常波を発生させる事ができる。

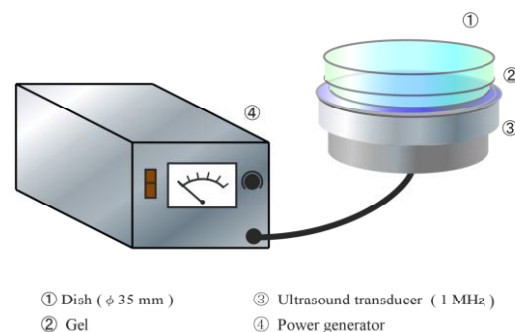


Fig. 1 Sonication system without temperature control.

3.3.2 KI 法による H₂O₂ 濃度測定

H₂O₂ 生成量は、溶存気体、周波数によって異なるため、本実験装置の基礎特性を KI 法で確認した。ディッシュに 30 分間空気バブリングした 0.1 M ヨウ化カリウム (KI) 溶液 2 mL を入れ、出力 0.5 ~ 2.3 W の超音波を所定時間照射し紫外可視分光光度計 (波長 350 nm) を用いて照射後の KI 溶液中の I₃⁻ による吸光度を測定し、照射時間と H₂O₂ の生成量の関係を調べた。

3.4 細胞への超音波照射

溶液に超音波を照射すると、そのエネルギーによって溶液温度が上昇するため、細胞への超音波照射は、培養培地温度を制御しない場合 (Fig. 1) ならびに温度を制御した場合 (Fig. 2) の 2 条件にて行った。超音波照射の際は、超音波の攪拌作用による細胞の剥離を防ぐため、オートクレーブ (株式会社平山製作所製) によって滅菌したポリ塩化ビニリデン製のフィルム (旭化成ライフ&リビング株式会社製) で培地表面を覆った。なお、フィルムは超音波照射直前に設置し、照射後直ちに取り除いた。超音波は、出力を 0.5 ~ 2.3 W に調整し、1 ~ 20 分間照射した。照射後の細胞は、37°C、5 % CO₂ 条件下にて 6 時間インキュベート後 HSP72、H0-1 発現をウエスタンブロットによって分析した。

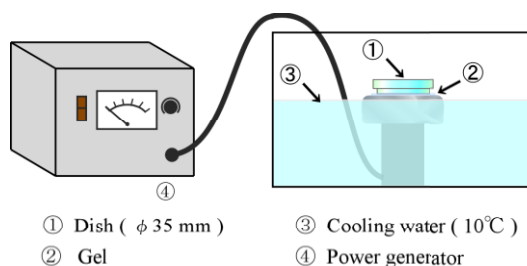


Fig. 2 Sonication system with the temperature control.

3.5 細胞タンパク質抽出ならびに濃度測定

培養液を除去し、細胞を PBS にて 2 回洗浄した。洗浄後、PBS 1 mL を加え、スクレイパーにて細胞を回収した。タンパク質の分解を防ぐため、回収後の細胞は直ちに氷中 (on ice) にて冷却した。回収した細胞は、4°C、5000 rpm にて 5 分間遠心分離し上清み液を除去後、lysis 溶液を加えて懸濁させた。超音波ホモジナイザー (タイテック製) で細胞破壊し、氷中にて 30 分間インキュベートした。その後、4°C、10000 rpm にて 15 分間遠心分離を行い、上

清を回収することによってタンパク質を含む溶液を得た。タンパク質濃度は、BCATM Protein Assay Reagent (Thermo SCIENTIFIC 製) を用いて定量した。

3.6 ウエスタンブロットによる分析

PVDF 膜へ転写後一次抗体 anti - H0-1 polyclonal antibody , anti - HSP70 polyclonal antibody、anti-β-actine を使用し HRP 二次抗体 (anti - HRP mouse IgG) を加え Amersham ECL Western blotting detection reagents and analysis system (GE Healthcare 製) で検出した。

3.7 Nrf 2 免疫染色

固定溶液 (5 % PFA 溶液) , 膜透過性溶液 (0.1 % Triton X 溶液) ならびにブロッキング溶液 (5 % BSA 溶液) の各溶液において、それぞれ、20 分、10 分ならびに 20 分間反応させ、一次抗体 (anti - Nrf 2) を 4°C にて一晩反応させた。反応終了後、Vectastain ABC Rabbit IgG kit (Vector Laboratories 製) を用いて発色基質を反応させ、2 % DAB 溶液によって染色した。

3.8 酸化ストレス耐性の検討

HuH7 細胞に出力 2.3 W の超音波を 20 分間照射した。このとき、ディッシュ内の温度は一定に保った。超音波処理後 6 時間培養した細胞培養液内の H₂O₂ 濃度が 250 μM となるように H₂O₂ を添加し酸化ストレスを負荷した (H₂O₂ 添加後培地体積 3 mL) 。 H₂O₂ 添加後、0 ~ 10 時間培養しトリパンブルー色素排除法で細胞生存率を測定した。

4. 研究成果

4.1 KI 法による H₂O₂ の濃度測定

超音波照射によって生成した H₂O₂ 濃度の時間変化を Fig. 3 に示す。出力 0.5 W の超音波を照射した場合、H₂O₂ の生成は確認されなかった。出力 1.4 もしくは 2.3 W の超音波を照射した場合、H₂O₂ 生成量は出

力、時間と正の相関を示した。

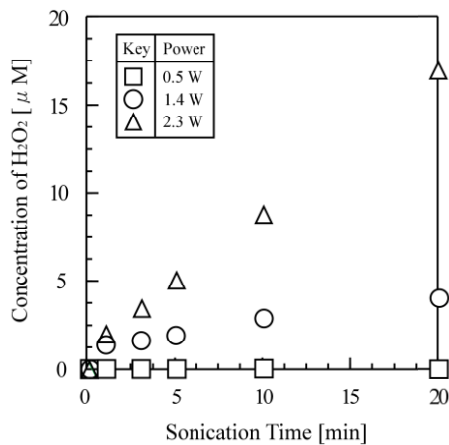


Fig. 3 Change in H₂O₂ concentration in water with sonication time under ultrasound irradiation at 1 MHz.

4.2 細胞へのストレス負荷

4.2.1 温熱処理

HSP72はHuH7細胞を42°C以上に加温した場合に発現が確認され、HO-1については45°Cに加温した場合に発現が確認された。

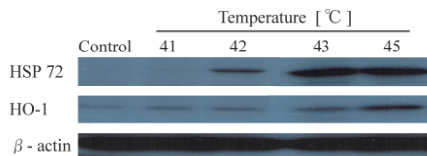


Fig. 4 Effect of heat treatment on the induction of HSP72 and HO-1 in HuH7 cells. Cells were treated heating for 20 min and incubated for 6 h.

4.2.2 H₂O₂ 処理

H₂O₂を添加した場合、いずれの濃度でもHSP72は発現しなかった。HO-1はH₂O₂濃度36 μM以上で誘導された。本研究で使用したHuH7細胞は酸化ストレスを与えることによってHO-1のみが誘導されることが明らかとなった。

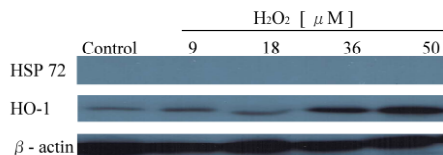


Fig. 5 Effect of H₂O₂ treatment on the induction of HSP72 and HO-1 in HuH7 cells. Cells were exposed to H₂O₂ for 6 h.

4.3 細胞への超音波照射

出力を0.5, 1.4もしくは2.3 Wに調整し、HuH7細胞に超音波を照射した。まず、

振動子の温度を制御することなく細胞への超音波照射を行った。このとき、超音波照射に伴って振動子が発熱し、2.3 Wの超音波を20分間照射後のディッシュ底面温度は52°Cとなった (Fig. 6)。

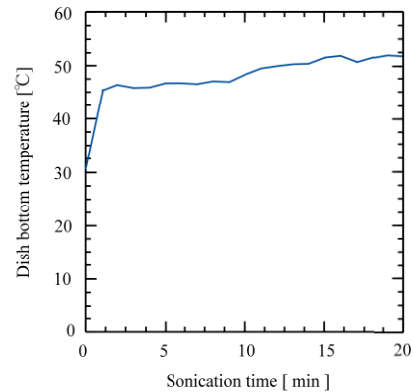


Fig. 6 Change in dish bottom temperature under 1MHz sonication at 2.3 W.

Fig. 7に超音波照射を行った細胞をウェスタンブロットによって分析した結果を示す。出力0.5もしくは1.4 Wの超音波を照射した場合、いずれの照射時間においてもHO-1ならびにHSP72の発現は確認されなかった。

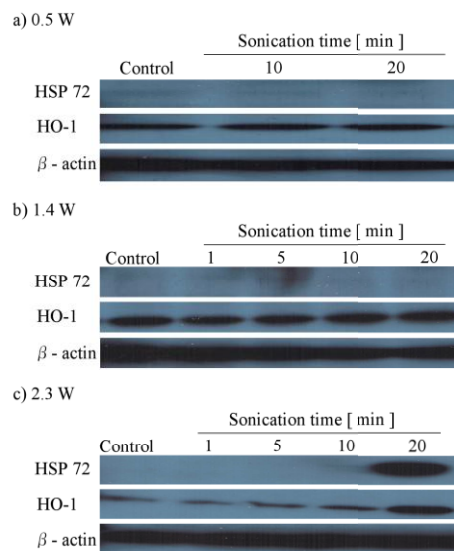


Fig. 7 Effect of sonication (1 MHz) on induction of HSP 72 and HO-1 in HuH 7 cell without the temperature control of the transducer. Cells were incubated 6 h after the sonication.

一方、出力2.3 Wの場合、超音波を10分間照射した場合にHO-1、20分間照射した場合にHSP72ならびにHO-1の発現が確認さ

れた。また、HO-1 の発現量は、照射時間が長くなるにつれて増加した。

次に、振動子を冷却してディッシュ内の温度を 37°C 以下になるように温度制御し、細胞への照射を行った。温度を制御して超音波を照射した場合、出力 2.3 W の超音波を 20 分間照射後のディッシュ底面の温度は 37°C であった (Fig. 8) 。

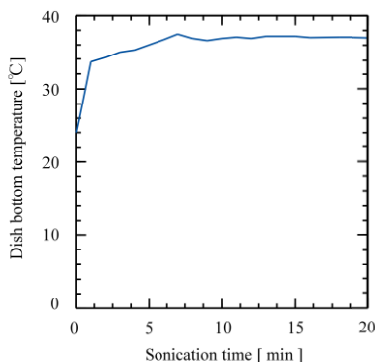


Fig. 8 Change in dish bottom temperature under 1 MHz sonication at 2.3 W with the temperature control of the transducer.

この条件下で得られた細胞のウェスタンブロットによる分析結果を Fig. 9 に示す。

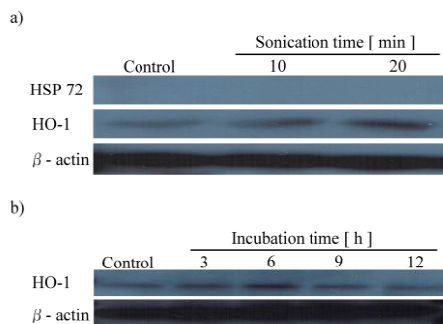


Fig. 9 Effect of sonication (2.3 W, 1 MHz) on induction of HSP 72 and HO-1 in Huh 7 with the temperature control of the transducer. (a) Effect of sonication time on HSP72 and HO-1 induction after incubation for 6 h. (b) Time course of HO-1 expression after the sonication for 20 min.

Fig. 9 (a) において、HSP 72 の発現は確認されず、HO-1 の発現のみ確認された。Fig. 9 (b) HO-1 の発現は超音波照射 3 時間培養後から発現し、6 時間後に発現量が最大になった。その後時間経過とともに発現量は減少していった。この結果から、HSP72 は超音波の熱作用で誘導されたと考えられる。HO-1 は温度制御しても誘導され、

温熱作用によらず化学作用で誘導されたと考えられる。

4.4 HO-1 発現に必要な H₂O₂ 量の考察

H₂O₂ 添加では濃度 36 μM 以上で HO-1 が発現し、超音波の場合はより低濃度の 18 μM の H₂O₂ 生成量で HO-1 が発現した。その理由として、

- 超音波は局所的な反応場を形成するため、実際の細胞は細胞外の培養液より高濃度の H₂O₂ にさらされている。

超音波が局所的な反応場を形成することは、Fig. 10 ルミノールを用いたソノルミネッセンス反応で青く発光しているキャビテーションに分布ムラがあることはこのことを間接的に支持する。

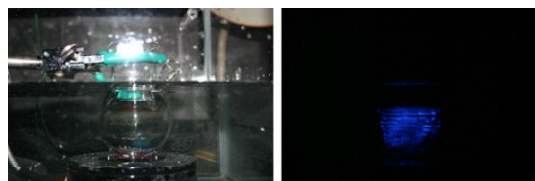


Fig. 10 Sonoluminescence reaction.

- また、培地中には KI 法で測定した H₂O₂ 以外のラジカルが発生している可能性も考えられた。

4.5 Nrf-2 の免疫染色による核移行の検討

φ 35 mm のディッシュ内に φ 15 mm のカバーガラス (MATUNAMI 製, Thickness 0.12 - 0.17 mm) を置き、カバーガラス上に培養した細胞に 2.3W の超音波を 20 分間照射した。そして、1 ~ 3 時間インキュベート後の細胞に免疫染色を行った。

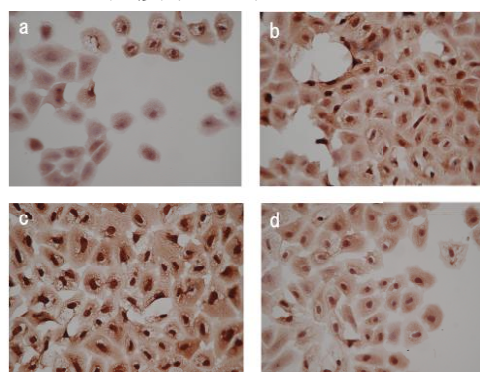


Fig. 12 Immunostaining of Nrf-2 in Huh7 cells. ((a) before the sonication, (b), (c), (d) incubated for 1 h, 2 h and 3 h, respectively, after the sonication for 20 min.)

超音波照射を行っていない細胞は細胞全体が均一に染色され、超音波処理を行った細胞は核が濃く染色され、Nrf-2 核移行が確認された。

4.6 酸化ストレス耐性の検討

20 分間超音波照射を行い、HO-1 発現量が最大となる 6 時間培養後に、 H_2O_2 による酸化ストレスを負荷した。この H_2O_2 による酸化ストレス負荷後さらに培養を続け細胞生存率を超音波照射していない細胞群（コントロール）と比較した。

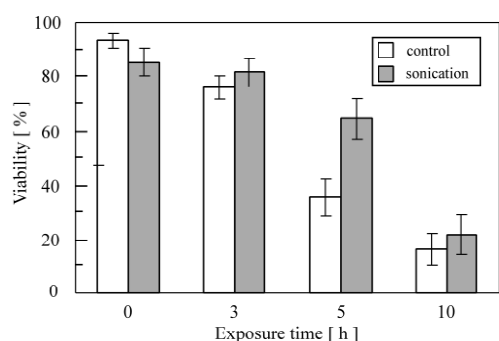


Fig. 13 Change in viability of Huh 7 cell with time under the oxidative stress. Cell was exposed in $250 \mu M H_2O_2$ for 5 h. The sonication pretreatment was carried out at 2.3 W for 20 min, and the incubation time was 6 h. Viability was determined by trypan blue exclusion test (n = 8).

H_2O_2 添加後 3 時間培養では細胞生存率は $76.4 \% \pm 4.3 \%$ ならびに $81.6 \% \pm 5.1 \%$ (mean \pm SD, n = 8) で有意差はなかった。5 時間培養すると生存率に差が見られるようになり生存率 $35.2 \% \pm 6.9 \%$ ならびに $64.5 \% \pm 7.8 \%$ で、超音波照射した細胞の生存率が有意に高くなった。この結果、超音波照射による細胞のストレス耐性獲得が認められ、超音波プレコンディショニング作用が確認された。

結論

- ・ 本実験装置にて 2.3 W の超音波を照射すると、20 分で $18 \mu M$ の H_2O_2 が生成することが明らかとなった (0.5 W : $0 \mu M$, 1.4 W : $4.0 \mu M$) .
- ・ この処置によって細胞の酸化ストレスに対する耐性を誘導できる可能性が確

認できた。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

久米真、佐藤香奈、大川浩一、工藤和大、阿部ゆき、伊藤英晃、菅原勝康、山本雄造
超音波による sonochemical preconditioning によって細胞にもたらされるストレス耐性

日本超音波医学会第 83 回学術集会、京都、5 月 29 日～31 日 2010 年。

(超音波医学 37 増刊号 : S 322、2010)

久米真、佐藤香奈、大川浩一、菅原勝康、山本雄造

Huh7 細胞に酸化ストレス耐性を誘導する超音波・音響化学効果

第 38 回日本肝臓学会東部会、東京、12 月 2-3 日 2010 年。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 超音波照射装置

発明者 : 大川浩一、久米真、山本雄造、菅原勝康、佐藤香奈

権利者 : 国立大学法人 秋田大学

種類 : 特許法第 30 条第 1 項の規定の適用を受けようとする特許出願

番号 : 特願 2010-074014

出願年月日 : 2010 年 3 月 29 日

国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久米真 (KUME MAKOTO)

朝日大学・歯学部附属村上記念病院外科・准教授

研究者番号 : 00372326

(2) 研究分担者

打波宇 (UCHINAMI HIROSHI)

秋田大学・大学院医学研究科消化器外科・助教

研究者番号 : 40400486

(3) 連携研究者

該当なし