

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21389

研究課題名（和文）ソノジェネティクスの実用化に向けた生命科学・音響科学融合アプローチ

研究課題名（英文）Integrated acoustics and cell biology approach to develop sonogenetics

研究代表者

桑田 昌宏（Kumeta, Masahiro）

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00582181

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、音波刺激に対する細胞応答を探究すべく、様々な取り組みを行った。まず、次世代シーケンサーを用いて音波刺激に対する遺伝子応答を網羅的に解析し、約200の音波応答遺伝子を得た。また、様々な細胞状態および音波条件により異なる応答が起きることも明らかにした。次に、より高次の細胞応答に着目し、音波に応じた生理活性脂質の合成活性化や、細胞接着を起点としたシグナル伝達の活性化を、その分子メカニズムとともに明らかにした。更に、音波刺激により骨細胞や脂質細胞の分化が制御されることを見出した。これにより、音波に対する細胞応答を多角的に明らかにする画期的な成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、生命は単一細胞レベルで音波を認識し応答することが明らかとなり、生命と音の根源的関係を解き明かす成果が得られた。また、遺伝子応答に至る細胞内シグナル伝達経路や、細胞分化に与える影響なども併せて明らかになったことで、「音」を細胞レベルで作用する因子として捉える新たな生命科学分野の開拓へとつながる、高い学術的意義をもつ成果が得られたとい考えている。今後、音波を用いて細胞のはたらきをコントロールする技術の開発などへとつなげることで、新たなバイオテクノロジーの創出など社会的意義の高い研究へと発展していくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study I aimed to reveal cell-level responses against acoustic stimulation, and planned a set of researches focusing on genetic, metabolic, and differentiation activities of cells. To understand gene responses against sound, genome-wide analyses were performed using next generation sequencing and identified ~200 sound-responsive genes. Cellular and acoustic factors affecting the response were also revealed. The effects of sound on metabolic and cell morphological activities were then investigated, including sound-dependent production of bioactive lipids and signal transduction through focal adhesion structure. Effects on cell differentiation for osteocyte and adipocyte were also revealed. These findings characterize sound as an environmental factor directly sensed at cell-level, and uncover fundamental relationships between life and sound.

研究分野：生命科学

キーワード：細胞工学 細胞分化 音波 音響

1. 研究開始当初の背景

近年の多角的な生命科学アプローチにより、細胞は物質（イオン・ホルモン・栄養素など生理活性物質）のみならず、温度・重力・圧力・光などさまざまな非物質に対しても認識・応答する機構を備えていることが明らかになってきた。しかし、我々個体にとっては重要な情報源である「音」が細胞レベルで認識されるかどうか、科学的追究はほとんどなされていない状態であった。

「音（音波）」は媒質中を伝播する疎密波であり、環境に遍在する微弱な物理エネルギーである。その伝播は物質と比べて非常に高速である（常温空気中で約 340m/s）一方、異なる密度の媒質への透過性は非常に低いため、生体や水（培地）中の細胞に音波を伝播する手法は慎重に検討しなければならない。我々は、音響工学と連携しながら培養細胞に音波を印加する実験系を構築し、独自に音波に対する細胞応答を探索する取り組みを始めた。これまでに、物理刺激応答性を示す遺伝子のいくつかが音波に対しても応答することを見出し、音波によって遺伝子応答が起きることを明らかにした。この成果は細胞が音波を認識する可能性を示す画期的なものである。今後、さまざまな細胞活動に対する音波の影響を多角的に明らかにすることで、音と生命の根源的な関係を解き明かす新たな生命科学へとつながると考え、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、音波に対する遺伝子応答とそれに関連した細胞応答を明らかにすることにより、細胞に対する音波の作用を明らかにするとともに、音波を用いた細胞操作技術の開発へとつながる基盤的成果を得ることを目的としている。具体的には、音波による遺伝子応答の全容の解明、音波応答性遺伝子領域の抽出と遺伝子操作技術への応用の検討、音波がもたらすその他の細胞応答の探索、を目的として研究を遂行する。

3. 研究の方法

(1) 音波に対する遺伝子応答を全ゲノムに渡って網羅的に明らかにするため、様々な条件での音波照射後の細胞試料に対して次世代シーケンサーによる RNA-seq 法を用い、遺伝子発現プロファイルを比較解析する。得られた音波応答性遺伝子を基に、アノテーション解析などにより音波応答経路を推定して実験的に検証する。

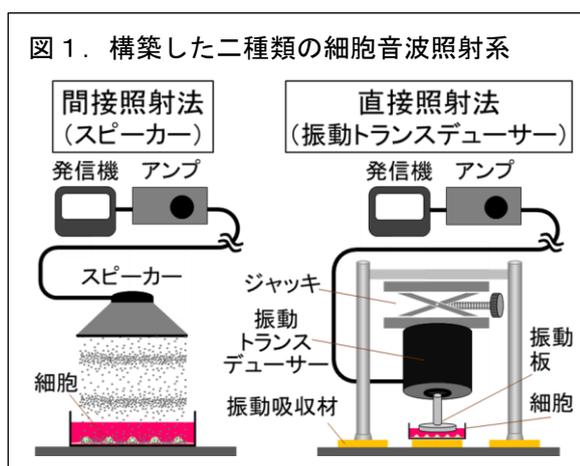
(2) 上記で得られた音波応答性遺伝子から制御領域（プロモーター）の配列を抽出し、レポーターアッセイにより音波応答性を定量評価する。

(3) 応答に関わる細胞要因や音波要因を明らかにするため、リアルタイム PCR 法により定量する代表的な音波応答性遺伝子の活性を指標として、さまざまな薬剤や音波条件を比較解析する。

(4) 上記の遺伝子を対象とした追究に加え、音波刺激が代謝や細胞分化などさまざまな細胞活動に与える影響を探索する。

4. 研究成果

(1) まず、培養細胞に対する音波印加装置の最適化を行い、システムを改良した。特に水中音波照射の鍵となる振動板について、さまざまな材質のものを作成して比較検討した結果、強度・硬度に加えて細胞安全性と低い熱伝導性を持つスーパーエンジニアリングプラスチックである PEEK（ポリエーテルエーテルケトン）によるものが最適と判断し、実験系に組み込んだ。水中音波測定系により、水中に照射される音波を定量評価する系も確立した。また、無限に存在する音波パターンのうち、研究に用いる基準音として、低周波（440Hz）、高周波（14kHz）、ホワイトノイズ、を選定した。これにより、特定の音波パターンを最大 250Pa (N/m²) の強度で培養ディッシュ内に照射することが可能となった（図 1）。



これらを用いて培養細胞に音波印加を行い、RNA-seq 法による網羅的遺伝子解析を行った。その結果、音波刺激に対する早期（2 時間）応答遺伝子約 45 種と、中・後期（24 時間）応答遺伝子約 150 種を同定した（図 2）。各種音波の比較解析から、音波パターンに関わらず高い応答性を示す遺伝子を、汎用的な音波応答の指標遺伝子として選定した。また、音波の種類に依存的な応答遺伝子を、それぞれの音波に特異的な遺伝子群として特定した。異なる音波に対する応答は、2 時間では高い相関を持つのに対し、24 時間後には各音波に特定の応答が顕著に表れてく

ることが明らかになった。また、遺伝子機能のアノテーション解析から、音波応答異性遺伝子には細胞接着や細胞移動に関するものが多く含まれていることが明らかとなり、これらの細胞機能が音波刺激の影響を強く受けることが示唆された。

(2) 約 20 種類の音波応答性遺伝子から、その制御領域（プロモーター）に当たる上流領域を抽出・増幅し、その音波応答性を検証した。増幅したプロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んで細胞に導入し、音波刺激の有無でルシフェラーゼ合成量が変化するかをルシフェラーゼ蛍光測定により定量評価した。さまざまな音波条件や細胞状態を検討したが、元々の転写活性がかなり低いものや、音波に対する有意な応答性が見られないものが多く、現在までに実用的に有効な音波制御プロモーターは得られていない。実用的に有用な音波制御プロモーターを得るためには、①エンハンサーなど他の遺伝子制御領域と併用する、②関与する転写因子などを特定し、配列の最適化を行う、③より多くの他の音波応答性遺伝子を試す、といった取り組みが必要になると考えられ、現在も取り組みを進めている。

(3) さまざまな薬剤や細胞状態の比較解析により、音波刺激がどのような細胞内メカニズムを介して遺伝子応答に至るかを追究した。その結果、音波に対する遺伝子応答にはまず接着班（Focal adhesion）による音波刺激の受容と、Focal adhesion kinase によるシグナル伝達が必要であることが明らかになった。接着班は細胞と細胞外マトリクスをつなぐ役割を果たしており、さまざまな物理刺激に対する応答にも関与することが知られている。本研究により、音波刺激に対する応答性も示すことが明らかとなったことで、この構造体の生理的機能を新たな側面から明らかにすることができたと考えられる。また、顕微鏡により音波刺激中の細胞をリアルタイムに観察した結果から、音波刺激による接着班の活性化は細胞の伸展を引き起こすことが明らかとなった。音波刺激後数分以内に、細胞は活発に葉状仮足を形成して伸展を始め、1 時間で約 20% 程度の細胞面積の増加が見られた。この応答は Focal adhesion kinase の阻害剤の存在下では見られなかったことから、この活性を介して引き起こされたものであることが分かった。細胞接着が音波刺激受容に関与することは、(1) に上述の遺伝子アノテーション解析の知見とも一致する結果である。

(4) 早期応答遺伝子の一つである *Ptgs2* が、生理活性脂質プロスタグランジン E2 の合成の律速酵素であることに着目し、その影響を更に探索した。培地中に分泌されるプロスタグランジン E2 を定量したところ、音波刺激に伴って 1.5-1.8 倍のプロスタグランジン E2 が合成されていることが明らかになり、この効果は音波刺激を継続する限り少なくとも 4 日間に渡って継続することが分かった。プロスタグランジン E2 はさまざまな細胞分化に影響することが知られている。そこで、音波刺激により細胞分化を操作できるかを、筋・骨・脂肪細胞系を用いて検討した。培養細胞を用いたそれぞれの細胞分化モデル系を用いて、音波刺激が分化の時間やクオリティに与える影響を調べたところ、少なくとも脂肪細胞において有意な抑制効果が見られた。マウス 3T3-L1 細胞をインシュリンなどを含む分化誘導培地で培養し、音波刺激を行ったところ、誘導 3 日後における分化指標遺伝子 *CEBPA* と *PPAR α* の活性はおよそ 20% となり、分化を抑制していることが示唆された。その後分化促進培地に移して脂肪細胞分化を進めたところ、音波刺激した細胞は細胞内油滴の形成が有意に抑制されており、その効果が確認された。これらの成果から、音波刺激により細胞分化を制御することの実現可能性が示された。

図 2. 音波応答性遺伝子群の同定

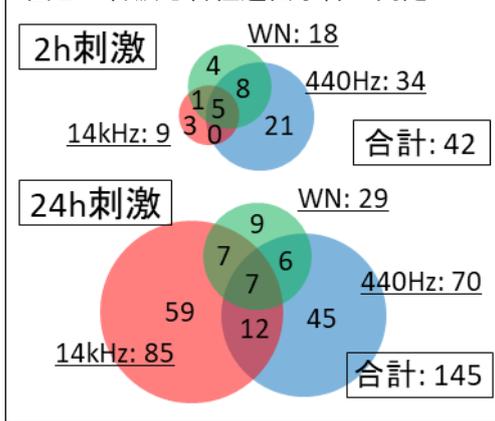
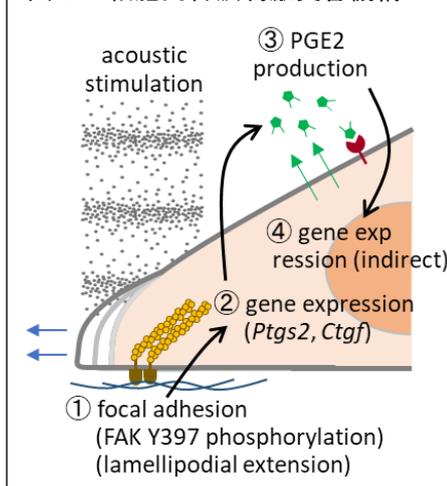


図 3. 細胞内音波刺激受容機構



本研究を通して、音波刺激が細胞に与える影響をより広く、深く探索することができた。特に遺伝子応答に関しては、網羅的な解析に加えて音波が作用するメカニズムの理解も飛躍的に進み (図 3)、多くの画期的な知見が得られた。他方、音波制御遺伝子システムを人工的に構築する取り組みにおいては、実用的に有用なレベルの応答を示すものは得られなかった。今後、(2) に上述したような改善点を考慮した継続的な取り組みを進めていきたい。また、遺伝子応答以外にも、細胞の状態制御や分化制御における音波の有用性を示すさまざまな成果が得られた。特に脂肪細胞分化に与える抑制的効果は、基礎・応用研究の双方に非常に有用な画期的な知見であり、今後も発展的な研究を進めていきたい。本研究で得られたこれらの成果に立脚し、生命にとって音波とは何であるか、今後更に試行と思索を深め、独自の研究領域を展開していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Haruki Maruyama, Koji Fujiwara, Masahiro Kumeta & Daisuke Koyama	4. 巻 -
2. 論文標題 Ultrasonic control of neurite outgrowth direction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-99711-0	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 Zhang Wanzhen, Watanabe Ryuji, Konishi Hide A., Fujiwara Takahiro, Yoshimura Shige H., Kumeta Masahiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Redox-Sensitive Cysteines Confer Proximal Control of the Molecular Crowding Barrier in the Nuclear Pore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108484 ~ 108484
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108484	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------