

令和元年6月12日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05706

研究課題名(和文) 衝撃波照射が細胞において生理応答を惹起する物理メカニズムの解明

研究課題名(英文) Physical mechanisms under cellular responses induced by shock wave irradiation

研究代表者

塚本 哲 (Tsukamoto, Akira)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・応用科学群・准教授

研究者番号：90511460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：衝撃波を照射して惹起される細胞内Ca²⁺濃度上昇を検討するため、流体せん断力の影響を排除し、衝撃波のピーク圧力ならびに時間幅を変化させることのできる実験系を構築した。細胞内Ca²⁺濃度上昇に関わる細胞内カスケードとしてPLC/IP₃が関与し、アクチン細胞骨格は関与するが、微小管は関与しないことがわかった。また、少なくとも蛍光色素であるCalceinやPIなどを透過させるほどの大きさをもつ細胞膜の破損は関与していないことがわかった。また、細胞内Ca²⁺濃度上昇は少なくともピーク圧力には単純に依存せず、エネルギー流速などの積分値が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

衝撃波による血管新生はすでに臨床応用されていますが、このメカニズムがわかると、別の疾患を非侵襲に治療できる可能性がでてきます。そのなかで、本研究は、細胞のなかに存在する骨組みであるアクチン細胞骨格が衝撃波によって物理的に変化する可能性を示唆しました。今後、アクチン細胞骨格が衝撃波によってどのように物理的に変化するか明らかにすることで、具体的にどのような疾患を治療できる可能性があるのか、具体的に議論できるようになると期待されます。

研究成果の概要(英文)：Intracellular Ca²⁺ increases induced by shock wave irradiation involve PLC/IP₃ cascades and actin cytoskeleton, but do not involve microtubule. Also, they do not involve damage of cellular membrane, which transmit Calcein and PI. Intracellular Ca²⁺ increases do not depend on peak pressure of shock wave. Rather, they depend on integral values such as energy flux.

研究分野：細胞バイオメカニクス

キーワード：衝撃波医療 物理メカニズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、物理メカニズムは不明であるものの、衝撃波医療によって血管新生や骨折治癒、疼痛除去などが促進されたという報告が相次いでいる。この促進に、細胞において生理応答を惹起させる何らかの物理メカニズムが関与すると指摘されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、バイオメカニクスから発展した力学刺激の概念や技術を導入することで、現在は不明である物理メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

衝撃波を照射した細胞が惹起する生理応答を顕微鏡観察できる実験系を高度化させた。いままでもそのような実験系は存在していたが、衝撃波によって生じる流体剪断力が混在している可能性を排除できていなかった。そこで、細胞が存在する空間を直径 6mm 高さ 1mm 程度の小さな空間に限定し、さらにその領域に衝撃波を集束させた。そのような改善によって流体剪断力が排除できたかどうかを確認するため、溶液内にポリスチレン製の微小ビーズを散布させ、衝撃波照射前後で流体が変形を起こしたか測定した。

負圧部分を細胞に照射する方法としては、水面で衝撃波を反射させることで衝撃波を自由反射させ、その結果として衝撃波の位相を反転させることで負圧のピーク圧を持つ膨張波を形成させた。このとき、細胞は正圧のピーク圧を持つ衝撃波ならびに膨張波の両方を負荷されたこととなる。

衝撃波のピーク圧力ならびに時間幅を変えるため、衝撃波を異なる音響インピーダンスをもつ素材が接する界面を近接させることで、衝撃波の多重反射を起こした。素材が接する界面の距離を変化させることで、衝撃波のピーク圧力ならびに時間幅を変化させた。

衝撃波を照射して惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関わる細胞内カスケードを明らかにするため、細胞内カスケードを阻害する阻害剤を使用した。また、細胞膜の破損が関与するか検討するため、蛍光色素である Calcein や PI を使用した。

4. 研究成果

小さな空間においては、衝撃波照射に伴って流体は変形せず、衝撃波によって生じる流体剪断力は排除できることが分かった。そのような小さな空間に細胞を播種させ、細胞が示す生理応答の一つである細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を測定したところ、流体剪断力を排除した状態であっても衝撃波に対して応答を示した。すなわち、衝撃波照射によって細胞が応答するメカニズムには必ずしも流体剪断力は必要でないことが分かった。

続いて、負圧の衝撃波だけでは細胞が応答しない条件であっても、その後膨張波が通過することで細胞が応答することがわかった。この結果は、膨張波による負圧部分によって何らかの物理作用が細胞に与えられたことを示唆する。ただし、このとき細胞は正圧の衝撃波と膨張波が両方とも負荷された状況であって、膨張波による負圧部分だけが負荷される状況でない。そのため、今後は膨張波の負圧部分だけが負荷される状況で同様の結果が得られるか検証する必要がある。

また、ピーク圧力や時間幅を変化させた実験からは、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がそれら衝撃波のピーク圧力や時間幅に影響されることが示唆された。重要な物理パラメータについて検討したところ、少なくとも衝撃波のピーク圧力には依存しないことがわかった。どちらかと言えば、エネルギー流速を含め、なんらかの積分値が関与することが示唆された。

衝撃波を照射して惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に関わる細胞内カスケードとして、PLC/IP₃ が関与し、アクチン細胞骨格は関与するが、微小管は関与しないことがわかった。また、少なくとも蛍光色素である Calcein や PI など透過させるほどの大きさをもつ細胞膜の破損は関与していないことがわかった。つまり、アクチン細胞骨格が関与し、PLC/IP₃ 経路を介することで、衝撃波は細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を惹起することが示唆された。

よって、衝撃波によってアクチン細胞骨格においてなんらかの物理現象が生じる可能性が示唆されたため、具体的にどのような物理現象なのかを追究していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Megumi Baba, Aya Shinmura, Shigeru Tada, Taku Amo, Akira Tsukamoto, Mitochondrial

Remodeling in Endothelial Cells under Cyclic Stretch is Independent of Drp1 Activation, Molecular & Cellular Biomechanics, 査読有, 16, 2019, 1, <https://doi.org/10.32604/mcb.2019.05199>

2. Toru Takahashi, Keiichi Nakagawa, Shigeru Tada, Akira Tsukamoto, Low-energy shock waves evoke intracellular Ca^{2+} increases independently of sonoporation, Scientific Reports, 査読有, 9, 2019, 3218, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39806-x>

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 塚本哲, 中川桂一, 衝撃波照射された細胞における形態の高速度観察, 平成 30 年度衝撃波シンポジウム, 2019
2. 塚本哲, 高橋徹, 中川桂一, 多田茂, 衝撃波による細胞応答の波形依存性, 日本機械学会 2017 年度年次大会, 2017
3. Akira Tsukamoto, Toru Takahashi, Shigeru Tada, Keiichi Nakagawa, Intracellular Ca^{2+} Increase Evoked by Single Acoustic Pulses, 31st International Symposium on Shock Waves, 2017
4. 高橋徹, 塚本哲, 中川桂一, 多田茂, 膨張波に対するバブルを伴う細胞応答の可能性, 平成 27 年度衝撃波シンポジウム, 2017
5. 馬場めぐみ, 塚本哲, 高橋徹, 中川桂一, 多田茂, 衝撃波照射が細胞の形態に与える影響, 平成 28 年度衝撃波シンポジウム, 2017
6. 高橋徹, 塚本哲, 中川桂一, 多田茂, 細胞接着基質の音響インピーダンスが衝撃波照射による細胞内 Ca^{2+} 上昇に与える影響, 平成 27 年度衝撃波シンポジウム, 2016
7. Toru Takahashi, Akira Tsukamoto, Keiichi Nakagawa, Takashi Ushida, Shigeru Tada, Momentum Transfer from Propagating Shock Waves to Single Cells, 8th Asian-Pacific Conference on Biomechanics, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：宮内 良広

ローマ字氏名：Miyachi Yoshihiro

所属研究機関名：防衛大学校

部局名：応用科学群

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70467124

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。