

令和 3 年 4 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08563

研究課題名(和文) 微小磁場環境下における細胞酸化ストレス抑制と細胞骨格縮小のメカニズム解明

研究課題名(英文) Suppression of oxidative stress and diminution of cytoskeleton in macrophage under hypomagnetic field

研究代表者

宮田 英威 (Miyata, Hidetake)

東北大学・理学研究科・准教授

研究者番号：90229865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙空間や月面上では直流磁場の大きさが1マイクロテスラ未満である。このような微弱磁場(hypomagnetic field; HMF)下では細胞内ATP産生の減少やミトコンドリア膜電位減少などの細胞生理学的応答が示されており、近年急速に増加している宇宙空間での人間の活動にも影響があるのではないかという観点から興味もたれている。本研究ではHMF下で培養したマクロファージのミトコンドリア膜電位や細胞増殖、ATPレベルを調べ、地磁気(~50マイクロテスラ)下で培養したマクロファージと比較した。その結果、ミトコンドリア膜電位の有意な低下と細胞増殖の低下傾向が見られたがATPレベルには差がなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の重要な成果として、HMF下で培養されたマクロファージにおいて、ミトコンドリアの膜電位が低下することが挙げられる。宇宙への人間の進出と共に、HMF環境下での長期にわたる活動が不可避になっている。この影響は決して強いものではなかったが、24時間より48時間曝露の方が効果は強かった。われわれは通常地磁気(GMF)下で生活しているため、HMF下での活動が健康影響をもたらすかどうかは不明である。しかし、細胞における呼吸を司るミトコンドリアに影響する以上、HMFの影響はたとえそれが弱くても長期的には深刻なものになるかもしれない。本研究は、HMFの健康影響を研究・解明する手掛かりを与えるといえる。

研究成果の概要(英文)：Magnetic fields in space or on the moon (termed HMF) are considerably weaker than the earth geomagnetic field. Since HMF is not experienced on earth, the prolonged activities of men in space have raised concern about human health in space. Previous studies on cells have reported that mitochondrial membrane potential, ATP level and cell proliferation were altered under HMF condition. We have compared mitochondrial membrane potential, cell proliferation and ATP level in mouse macrophage cultured in HMF with those in macrophage cultured in geomagnetic field. The membrane potential significantly decreased and cell proliferation tended to decrease after 48-h culturing. The ATP level was not affected, which was different from a previous study and our anticipation, because the decline of the membrane potential would lead to the decrease in ATP production. Our result suggests that prolonged exposure of men to the HMF may affect their health through the alteration of mitochondrial function.

研究分野：細胞生物物理

キーワード：微小磁場 マクロファージ ミトコンドリア スーパーオキシドアニオン 細胞内ATP ネクローシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

地磁気 (GMF) が減弱して生じる磁場を微小磁場 (Hypo-Magnetic Field ; HMF) と呼ぶ。減弱は鉄筋建造物内部や、宇宙空間、月面などで見られる。HMF が細胞生理に影響することを示す研究はここ 10 年くらいで増加しているが、これは宇宙空間に滞在する人間の健康に HMF が与える影響に関心もたれているためである。本研究開始までに HMF の生体への影響を理解する手掛かりとして、培養細胞を用いた研究が盛んに行われていた。たとえば酸化ストレス源分子 (スーパーオキシドアニオンや H₂O₂) の産生低下 (Martino ら, Plos One, 2011; Roman ら, Bioelectromagnetics, 2009)、細胞増殖能低下 (Martino ら, Bioelectromagnetics, 2010)、Mg、Zn、Ca 等金属イオンの血液中濃度減少 (Jia ら, Plos One, 2014) またアクチン細胞骨格や細胞接着の縮小 (Mo ら, Scientific Reports, 2016) などが示されている。これらの現象は、GMF が存在する通常的环境に細胞が最適化されていることの裏返しと解釈できるだろう。

私は本研究申請以前に、強度 0.5 ミリテスラの 50 ヘルツサイン波磁場 (50 ヘルツ磁場) がマウスマクロファージにおいて DNA 鎖切断確率を上昇させること、スーパーオキシドアニオン産生並びに熱ショック蛋白質を増加させること、ミトコンドリア膜電位を低下させることなどを示してきた。

2. 研究の目的

私は、HMF が細胞生理学的な種々の指標に影響を与えるという上述の先行研究に興味を持ち、もし私の研究室において HMF 条件が実現できれば、50 ヘルツ磁場の細胞への影響を研究した手法を応用することにより HMF が細胞生理に与える影響の解明に貢献できると考えた (後述のように思いがけないところから HMF 条件が実現できることとなった)。そこで (1) 実験室における HMF 条件を確立し、(2) HMF が免疫細胞であるマクロファージの生理学的指標、すなわちミトコンドリア膜電位、ミトコンドリア内ならびに原形質内スーパーオキシドアニオン産生、細胞内 ATP レベル、細胞増殖、ネクローシスに与える影響を検討する実験を計画した。ミトコンドリア膜電位は 50 ヘルツ磁場のマクロファージへの影響が現れる指標であり、スーパーオキシドアニオン産生と ATP レベルはミトコンドリア膜電位の変化を反映する指標と考えられたためである。またネクローシスは ATP レベルの変化を反映することが磁場作用とは無関係に以前から知られており、磁場により膜電位に変化が起きた場合にもそのようなことが成り立つかどうかに興味があった。

さて、研究申請の前年に仙台市営地下鉄東西線が私の研究室の 200 m 付近を通ることがわかり、さらに 1 マイクロテスラ程度の変動磁場が列車の通過時に研究室内で観測されることが明らかとなった。この変動は地磁気 (50 マクロテスラ) に比べれば小さいものの、私の研究には何らかの影響があるかもしれないと危惧された。その後仙台市交通局との話し合いを通じてパーマロイ製の磁場遮蔽ケースを寄贈していただくことになった。この思いがけないできごとは HMF の生理学的影響を研究する貴重な機会を与えてくれることとなった。

3. 研究の方法 (以下において、磁場遮蔽ケースとメリットコイルは連携研究者本堂が中心となって設計を担当した。また細胞を用いた実験は宮田が担当した。)

下図 1A ~ C に示すようにパーマロイ製の磁場遮蔽ケース内に細胞培養のための CO₂ インキュベーターを設置し、さらにインキュベーター内に磁場発生用メリットコイルを設置した。同一の実験装置を 2 組構築した。コイルにはファンクションジェネレータを用いて直流電流を流した。コイルはいわゆる 2 重巻きである。曝露用コイルにおいては 2 本の導線の内一方の電流の向きをもう一方と同じにして磁場を発生させることができ、偽曝露用コイルにおいては電流を逆向きに流すことによって磁場はキャンセルし、ジュール熱だけが曝露コイルと同量発生する。つまり 2 つのコイルで生じるジュール熱の細胞への効果は同じであると考えられる。曝露用コイルには、地磁気 (GMF) に近い大きさの鉛直下向きの直流磁場 (磁束密度は 46 マイクロテスラ) が得られるように電流を流し、偽曝露用コイルにも同じ大きさの電流を流した。偽曝露用コイル内の直流磁場は鉛直上向き 7.4 マイクロテスラであった。

あらかじめ磁場遮蔽条件で 24 時間細胞を培養後、培養用ディッシュをメリットコイル内に移し、そののち 24 時間または 48 時間培養を続けてから以下の生理学的指標を測定した: (1) ミトコンドリア膜電位 (蛍光色素 JC-1 による); (2) ミトコンドリア内並びに原形質内の O₂⁻ (それぞれ蛍光色素 MitoSoxRed と発色試薬 Nitro-TB による); (3) ATP レベル (ルシフェリン-ルシフェラーゼによる発光測定); (4) 細胞増殖 (細胞を計数); (5) ネクローシス細胞 (蛍光色素 PI を用いた)。

蛍光強度と吸光度測定はマイクロプレートリーダーで行った。

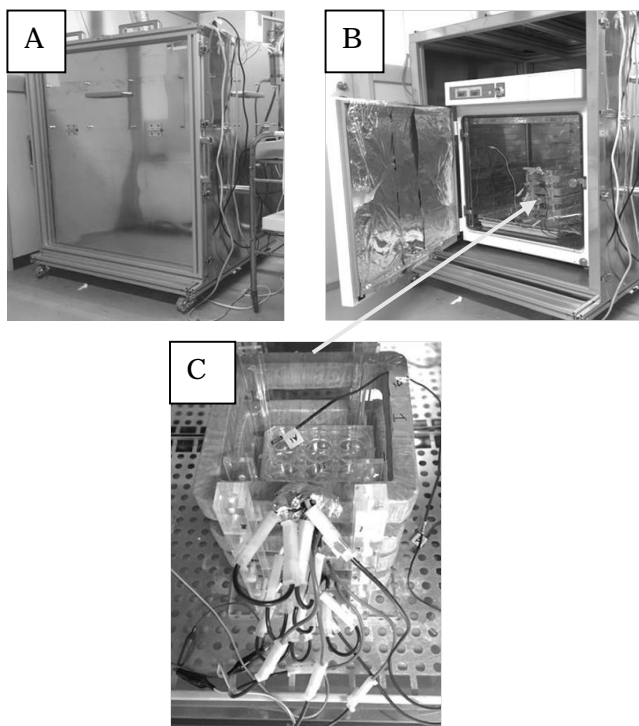


図 1 . A 磁気シールド用ケース (約 1 m 立方); B ケース内の細胞培養用 CO₂ インキュベーター (メリットコイルが見える); C メリットコイル (約 20 cm 角, 高さ約 30 cm) とその中に置かれた培養用ディッシュ

4 . 研究成果

4-1 結果

ミトコンドリア膜電位は図 2A に示すように HMF 条件下で, 24 時間曝露において対照の GMF 条件にくらべて低下傾向 ($0.1 > p > 0.05$) を, 48 時間曝露において有意な低下 ($0.05 > p$) を示した. 細胞密度は, 図 2B に示すように HMF への 48 時間曝露において対照の GMF 条件にくらべて低下傾向 ($0.1 > p > 0.05$) を示した.

その他の指標 (ミトコンドリア内並びに原形質内におけるスーパーオキシドアニオン産生, 細胞内 ATP レベル, ネクローシス) については差が見られなかった ($p > 0.1$).

4-2 考察

ミトコンドリア膜電位の HMF 条件下での低下はミトコンドリア内膜にある電子伝達系の機能の HMF 下での低下を示唆すると私は当初考えた. 電子伝達系は ATP 産生の上流にあり, また電子が伝達されるとき副産物としてスーパーオキシドアニオンが不可避免的に生成する. そこでスーパーオキシドアニオンを調べたが, HMF による変化は見られなかった. 同様に, ATP レベルについても HMF 下で差はなかった. 従って私の当初の予想は正しくなかった. 一方, 細胞密度の HMF による低下傾向は HMF 下でネクローシスが上昇するためであり, さらにそれをさかのぼると ATP レベルの低下が原因だと予想したが, これも正しくなかった. 私が当初予想したモデルでは HMF 下で変化の起きる指標は細胞生理学的に関連のあるもの同士であると仮定していたが, 本研究で得られた結果を見る限り, その仮定は正しいとはいえない.

HMF 下でマウス骨格筋細胞においてミトコンドリア機能, 細胞内 O₂-産生, また細胞増殖が低下することが先行研究で示されている (Fu et al., 2016). これらの結果はお互いに関係があると説明されている点は本研究とは異なる. 一方別の先行研究 (Martino et al., 2010) においては HMF 下でがん細胞の増殖が抑制されるという結果が得られている. 興味深いのは細胞増殖に関してはいずれの研究においても細胞の違いがあるものの本研究と類似の結果が得られていることである. 1. で触れたように, GMF に適応した細胞にとっては HMF 下に置かれることによって, 細胞はこの, いわば環境の変化に対処するために増殖を抑制するようになるのかもしれない.

本研究の主な結論は GMF と HMF 下で細胞生理学的指標に差が出ることだが, それとともにこのような微弱な背景直流磁場の違いが, 0.5 ミリテスラの 50 ヘルツ磁場に対するマクロファージの O₂-産生において我々が得ていた一貫性のない結果の説明も可能にするかもしれない. すなわち, 以前我々は 50 ヘルツ磁場に曝露した細胞と偽曝露した細胞の間で O₂-産生に差が見られないことを報告した (報告は Nishigaki et al., 2020). これは CO₂ インキュベーターが磁場シールドケースに入っていない状態での測定で, 曝露と偽曝露の背景磁場として直流磁場がそれぞれ 35 マイクロテスラと 3 マイクロテスラにおける測定の結果に基づいたものだった. ところがその後インキュベーターを磁場シールドケースに収めた状態での測定においては O₂-産生は曝露した方が低くなった (高橋哲郎: 東北大学理学部物理学科修士論文, 平成 31 年度).

この食い違いは背景の直流磁場の有無と関係している可能性がある。これを検討するためには、50 ヘルツ磁場に直流磁場を重ね合わせた波形をファンクションジェネレータでつくってコイルに与える必要があるが、私が退職することに伴い、実験装置を廃棄しなければならず、この点を詰めることができなかった。

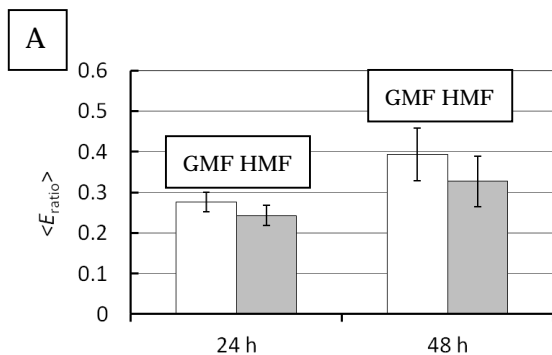


図 2 (A) GMF と HMF (対照とした磁場条件) 中で得られたミトコンドリア膜電位 (図中では膜電位と相関する E_{ratio} という量で表す). 24 時間培養後, 48 時間培養後いずれも HMF 条件の方が E_{ratio} は低い.

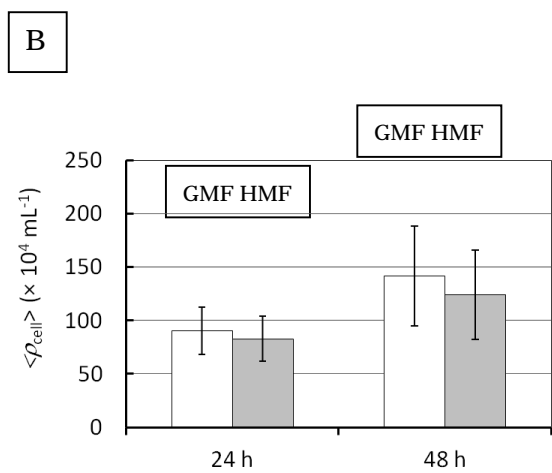


図 2 (B) 培養用後の細胞密度 (ρ_{cell}) を GMF と HMF で比較した結果
24 時間培養後, 48 時間培養後いずれも HMF 条件の方が E_{ratio} は低い.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Srimai Nipitpon, Kiatarkom Wasawat, Miyata Hidetake	4. 巻 13
2. 論文標題 Evaluation of the Effects of Hypo-Magnetic Fields on Mouse Macrophage RAW264 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 12～20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5539/ijc.v13n1p12	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 該当する
1. 著者名 Nishigaki Chihiro, Nakayama Maresuke, Miyata Hidetake	4. 巻 96
2. 論文標題 Cell physiological responses of RAW264 macrophage cells to a 50-Hz magnetic field	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Radiation Biology	6. 最初と最後の頁 1628～1632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09553002.2020.1837983	査読の有無 有
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 宮田英威	4. 巻 22
2. 論文標題 生物の磁場感受性と電磁過敏症	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 室内環境	6. 最初と最後の頁 209-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7879/siej.22.209	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 Pooam Marootpong, Nakayama Maresuke, Nishigaki Chihiro, Miyata Hidetake	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of 50-Hz Sinusoidal Magnetic Field on the Production of Superoxide Anion and the Expression of Heat-shock Protein 70 in RAW264 Cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 23～36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5539/ijc.v9n2p23	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kawashima Yuuichi, Fujii Honoka, Nakayama Maresuke, Hasegawa Masahiko, Shimanuki Satoru, Miyata Hidetake	4. 巻 9
2. 論文標題 Effect of a 50-Hz Magnetic Field on the Degradation of Plasmid in the Presence of Cu(II) Ions and Hydrogen Peroxide	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 40～40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5539/ijc.v9n4p40	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 宮田英威、ニピボン スリマイ
2. 発表標題 微弱磁場が細胞に与える影響の研究
3. 学会等名 第27回日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marootpong Pooam, 中山希祐, 西垣千尋, 宮田英威
2. 発表標題 低周波磁場がマクロファージRAW264に及ぼす細胞生物学的影響の検討
3. 学会等名 日本臨床環境医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Kazuo Ohki, Hidetake Miyata	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Japan, KK	5. 総ページ数 170
3. 書名 Physical principles of biomembranes and cells	

〔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
連携研究者	本堂 毅 (Tuyoshi Hondou) (60261575)	東北大学・理学系研究科・准教授 (11301)	

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