

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K12055

研究課題名（和文）SHG光計測による瞬時大変形した赤血球の膜損傷の可視化と損傷度の定量

研究課題名（英文）Visualization and quantification of cell membrane damages based on the measurement of second harmonic generation light

研究代表者

中村 匡徳（Nakamura, Masanori）

名古屋工業大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20448046

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：SHG（Second Harmonic Generation）は細胞膜の構造変化を反映する。細胞膜にダメージが加われば、細胞膜の構造は変化するはずであるため、細胞膜のダメージを定量化できるはずである。本研究では、SHG光の計測により細胞膜の損傷を可視化するとともに、その定量化を試みた。結果として、SHG光の蛍光色素であるAP3で細胞膜を修飾することにより、細胞膜のSHG光観察が可能となった。細胞膜のモデルとしてリポソームを使用し、電気刺激を繰り返し与えたところ、刺激間隔によりSHG光の低下が認められた。SHG光の低下度を評価することで、細胞の損傷度の定量化に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞膜は、細胞内器官を保護するとともに、細胞内外の物質の移動を管理するため、細胞機能を司る重要な器官の1つである。細胞膜の損傷は細胞死やそれに伴う疾患に直結する可能性がある。しかし、細胞膜の損傷度を可視化・定量化する方法はなく、結果として表出する細胞機能の低下から類推するのみである。本研究で確立した第二高調波発生光（SHG）による細胞膜損傷の可視化は、溶血と呼ばれる赤血球膜の損傷だけではなく、体外受精における採卵等の種々の細胞操作技術に伴う細胞膜の損傷度評価にも適応可能である。

研究成果の概要（英文）：The lipid bilayer is the main component of the cell membrane, and its physical state is directly related to cell functions. The present study aimed to seek for a feasibility of imaging the membrane damage by the second harmonic generation (SHG) signal measurement. Because the SHG signal can hardly be observed from the membrane due to its inverted symmetric structure, we came up with an idea that adding a dye to in one layer of the membrane made it non-inverted asymmetric and thus enabled it to generate SHG signals. The SHG signal of liposomes loaded with the SHG-specific dye, AP3, during electroporation was observed. The results demonstrated that the SHG signal of the membrane decreased with the repetitive application of the electric pulse. An increase in the applied voltage decreased the SHG signal measured after a certain number of the electric pulse was applied. These results suggest that the membrane or damage can be imaged and quantified based on the SHG signal measurement.

研究分野：生体医工学

キーワード：SHG光 膜 損傷

## 1. 研究開始当初の背景

細胞膜は細胞の内外を隔てる重要な構造である。細胞膜の損傷は細胞死やそれに伴う疾患に直結する可能性がある。膜損傷の一例として溶血が挙げられる。溶血とは赤血球からのヘモグロビン漏出である。ヘモグロビンは一酸化窒素 (NO) と結合することで、NO を無能化することから、溶血は血栓症、嚥下障害、肺高血圧症、男性機能不全などを引き起こす。このことから、溶血は長期使用を目的とした医療機器において未だ看過できない問題である。これまで、溶血は、医療機器内部で発生する流体せん断応力が主原因であるとされ、せん断応力やその印加時間に基づいて溶血量予測式の確立が試みられてきた。しかし、従来より提案される予測法は複雑な流れにおいて精度に欠き、2017 年においても実用上使用に耐えないことが、米国食品医薬品局 (FDA) のチームから報告されている。

我々は、“溶血とは赤血球の力学的破壊である”という観点から溶血予測を行う技術を創成してきた。その成果として、せん断応力負荷や衝突により赤血球は溶血してヘモグロビンが漏出するが、漏出量は必ずしも流体側から印加されるせん断応力とは相関しないことを見出した。溶血液は細胞膜の損傷や裂孔と不可分であるが、その膜損傷を可視化・定量する技術がないことから、漏出量がなぜせん断応力と相関しないのかが不明であった。

そこで本研究では、第二高調波発生 (SHG) 顕微鏡を利用して、力学負荷を受けた細胞膜の膜損傷状態を可視化することを着想した。これにより、赤血球の力学的膜破断条件の理解に加え、溶血シミュレータの開発への足掛かりとなると期待した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、第二高調波発生光 (SHG) を計測することにより、細胞膜の損傷を可視化すると共に、損傷度を定量化する技術の開発である。

## 3. 研究の方法

赤血球の細胞膜モデルとしてリポソームを用いた。リポソームは細胞膜の最もシンプルなモデルとして知られ、実験の度に新しく作製することができる、ある程度サイズをコントロールすることができるという利点がある。また、細胞膜内に存在するタンパク質や、コレステロールを排除し、単純化した細胞膜モデルとして考えることができる。以上のことから膜損傷の定量化に適していると考えた。

リポソームの作製には単純水和法と呼ばれる手法を用いた。リポソームの材料には脂質分子 DOPC (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 850375, Avanti) と DOPG (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-1'-rac-glycerol) を用いた。リポソームは SHG イメージング色素 Ap3 を導入することで SHG 観察を可能にした。Poly-L-lysine coating したディッシュを用い、リポソーム内外の溶液密度に差をつけることで、リポソームをディッシュ底面に接着させた。

実験系は電気刺激装置 (SEN-3401, 日本光電)、アイソレータ (SS-104J, 日本光電)、多光子励起レーザ走査型顕微鏡 (FV1200MPE, Olympus) で構成される。電気刺激装置で電気パルスを印加した。電気刺激装置はアイソレータに繋がっており、そこで電圧が増幅される。増幅された電圧は導線を通り、白金電極へと印加される。白金電極は固定用の治具によって固定されており、実験中は動かないようになっている。サンプルの様子は 60 倍水浸対物レンズ (LUMPLFL60XW, Olympus) を用いて観察した。950 nm のレーザを照射し、ダイクロイックミラー (FV10-MT475/IR, Olympus) を用いて  $475 \pm 10$  nm の光を検出した。電気刺激付与前からリポソームの SHG 観察像を経時的に取得した。電気刺激装置の電源をオンにし、電気刺激を開始した。パルス回数 1000 回程度で電気刺激装置を停止したが、それまでに膜の SHG シグナルが確認できなくなった場合は電気刺激装置を停止した。

本実験では、一定のパルス幅、一定のパルス間隔で電気パルスを繰り返し与えた。電圧印加条件はパルス電圧  $E_p = 23.3\text{-}26.7$  V/cm に設定し、パルス幅  $T_i = 0.1$  s, パルス間隔  $T_d$  は 0.9 s, 1.8 s, 4.5 s, 6.9s, 9.9 s の 5 条件を与えた。パルス回数 1000 回程度で電気刺激装置を停止したが、それまでに膜の SHG シグナルが確認できなくなった場合は電気刺激装置を停止した。

## 4. 研究成果

リポソーム膜 SHG 観察結果の 1 例を Fig. 1 に示す。Fig. 1 (a) は電気パルス印加前、Fig. 1 (b) は電気パルス印加後の観察画像である。全てのインターバル条件においてリポソームの膜 SHG 輝度が低下している様子が確認できた。

得られた SHG 観察画像から輝度値の変化を経時的に取得した。SHG 輝度値の時間変化は線形加重移動平均をとることで平滑化した後、電気パルス印加前の輝度値で正規化した。各条件において、電気パルス印加回数に対して正規化 SHG 輝度値をプロットしたグラフの 1 例を Fig. 2 に示す。Fig. 2 より、全ての条件において輝度の低下が見られたものの、それぞれのグラフにおいて輝度の低下傾向に違いがあった。Fig. 2 (D) に代表されるように早い段階で急速に低下しているものが存在する一方で、Fig. 2 (E) のようにパルス数が 1000 回を超えてもあまり低下してい

ないものが見られた。

各インターバル条件のパルス回数 800 回における正規化 SHG 輝度値を比較した。その結果、 $T_i < 4.5$  s において  $T_i$  が大きくなるほど SHG 輝度は小さくなる傾向が見られた。一方で、 $T_i > 4.5$  s において  $T_i$  が大きくなるほど SHG 輝度が大きくなる傾向が見られた。

過去の研究では **electroporation** によって細胞膜に細孔形成が発生することが確認されており、S 先行研究の電圧条件は数百 V/cm～数 kV/cm 程度である。一方で、本実験で与えた電圧条件は 23.3-26.7 V/cm と比較的小さい。そのため、一回の電圧印加で膜に加わるダメージは小さく、小さなダメージの蓄積の結果、細孔形成が起こると考えられる。

繰り返しパルス電圧によって、膜構造が徐々に乱れると考えられるが、その一方で、電気パルスのインターバル  $T_i$  に応じて、膜構造の再整列の時間が与えられ、この時間の間に、乱れた膜構造は回復すると考えられる。その中で膜の回復が間に合わず、膜構造の乱れが一定値を超えた箇所から孔が形成すると予想される。すなわち、インターバル  $T_i$  が長いほど、膜構造の乱れから回復する時間が長く与えられるため、孔形成につながるような膜構造の乱れが発生しづらくなる。孔形成が発生しない時、Ap3 の移動は起こりにくいと考えられるため、SHG 輝度は低下しにくいと考えられる。すなわち、 $T_i > 4.5$  s においてインターバル  $T_i$  が長いほど、SHG 輝度が大きくなるのは、膜の回復の作用を反映した結果であると考えられる。一方で、 $T_i < 4.5$  s において  $T_i$  が小さくなるほど SHG 輝度は大きくなる傾向が見られたことは膜の回復の観点からでは説明がつかない。これについては、Ap3 の拡散の時間の問題であると考えられる。Ap3 分子が膜に対して非反転対称に分布しているほど SHG 輝度は高くなり、反転対称に分布しているほど SHG 輝度は低くなる。すなわち、脂質二重膜（リポソーム）に孔形成が起こり、Ap3 分子が元々分布していなかった内側の層に Ap3 分子が拡散する時間が膜の反転対称性および SHG 輝度に直接結びつくと考えられる (Fig. 2.13)。Fig. 2.10 では 800 パルスを与えた時の SHG 輝度を表しており、実験開始から終了までの経過時間は  $800(T_i+0.1)$  [s] で表される。すなわち、常に同数の孔形成が発生し続けていると仮定した場合、インターバル  $T_i$  が大きくなるほど Ap3 の拡散時間は長くなる。これによって  $T_i < 4.5$  s において  $T_i$  が大きくなるほど SHG 輝度は小さくなったのではないかと考えられる。

以上、本研究により、細胞膜の損傷を SHG 光観察により可視化することに成功した。今後は、細胞にせん断をかけた場合など物理的な損傷に対する SHG 輝度変化の観察を行うことで、溶血発生条件の解明に向けた検討を進めていきたいと考えている。

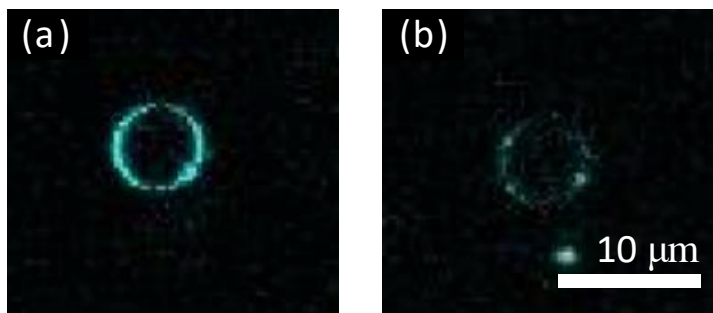


Fig. 1 リポソームの SHG 観察画像. (a)電気パルス印加前, (b)電気パルス印加後

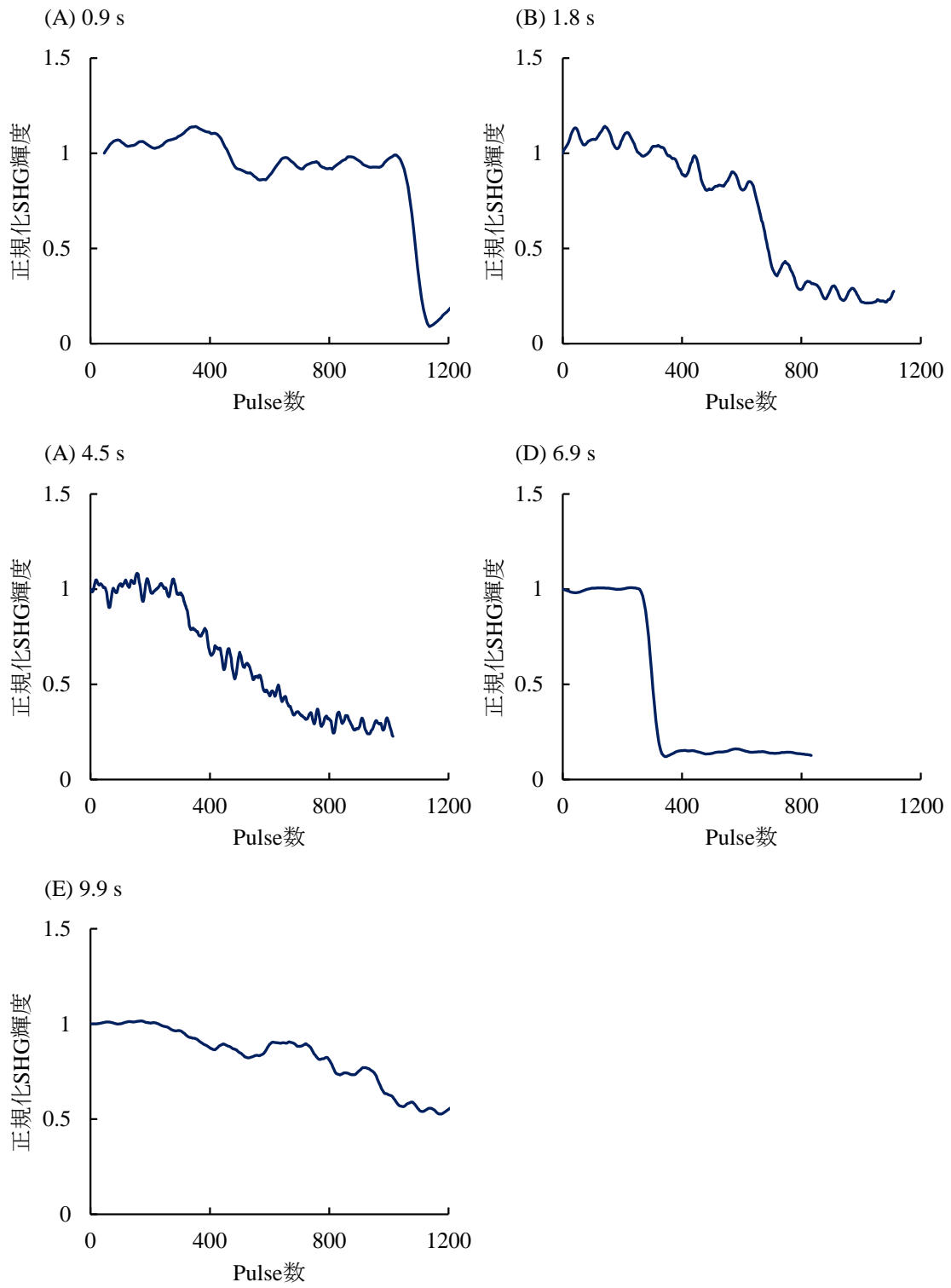


Fig. 2 各電気パルス間隔における SHG 輝度経時変化例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ujihara Y, Ono D, Nishitsuji K, Ito M, Sugita S, Nakamura M	4. 巻 14
2. 論文標題 B16 Melanoma cancer cells with higher metastatic potential are more deformable at a whole-cell level	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Bioengineering	6. 最初と最後の頁 309-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12195-021-00677-w	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takagi R, Wada H, Ujihara Y, Sugita S, and Nakamura M
2. 発表標題 Imaging of the membrane structure based on second harmonic generation signal
3. 学会等名 The 11th Asian-Pacific Conference on Biomechanics（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高木 麗弥, 和田 悠, 氏原 嘉洋, 杉田 修啓, 中村 匡徳
2. 発表標題 電気刺激による細胞膜構造変化のSHG光計測
3. 学会等名 日本機械学会2020年度年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 悠, 杉田 修啓, 氏原 嘉洋, 中村 匡徳
2. 発表標題 SHG計測による細胞膜損傷分析の試み
3. 学会等名 第43回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田悠, 杉田修啓, 中村匡徳
2. 発表標題 衝突流における赤血球の変形とヘモグロビン漏出
3. 学会等名 第41回日本バイオレオロジー学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高木 麗弥, 重松 大輝, 氏原 嘉洋, 杉田 修啓, 中村 匡徳
2. 発表標題 HG輝度計測に基づく細胞膜構造変化の可視化：分子動力学計算による検
3. 学会等名 第31回 ライフサポート学会フロンティア講演会
4. 発表年 2022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 分担者	八木 高伸  (YAGI TAKANOBU)  (00468852)	早稲田大学・理工学術院・主任研究員(研究院准教授)   (32689)	
研究 分担者	杉田 修啓  (SUGITA SHUKEI)  (20532104)	名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授   (13903)	

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