

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656128

研究課題名（和文） 遺伝子群発現プラズマ流による細胞反応誘導法の開発

研究課題名（英文） Development of method of inducing cell response by gene expression plasma flow

研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO TAKEHIKO)

東北大学・流体科学研究所・教授

研究者番号：10302225

研究成果の概要（和文）：

プラズマ流の物理刺激が細胞界面に輸送される機構について、水中に発生する1次ストリーマが1A以下の比較的小さな電流で放電し荷電粒子を輸送するのに適していることを示した。遺伝子群の発現解析については、プラズマ処理した培地の刺激の強さにより細胞に与える刺激の支配因子が過酸化水素からそれ以外の化学種になることを明らかにした。細胞表面の観察をAFMにより行い、プラズマ処理培地への暴露により細胞の形態が変化することを示した。

研究成果の概要（英文）：

To transport of plasma stimuli to cell membrane, we found following results: 1. a primary streamer under water is much suitable to apply charged particles due to its low discharge current. 2. Hydrogen peroxide in the plasma-treated culture medium is not the inactivation factor of cell viability among chemical species when the plasma stimulus is weak though H₂O₂ is the main in activation factor in the strong plasma stimuli case. 3. Analysis using AFM revealed morphologically the cell membrane surface and the plasma effect on the surface shape.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：バイオ流体力学，プラズマ細胞応答誘導

1. 研究開始当初の背景

「プラズマ医療」は、大気圧低温プラズマ流と生体の相互作用を利用した新しい医療分野であり、滅菌作用や血液凝固作用などによる、皮膚病治療や術後の止血、ガン治療への応用が進められている。2009年に「プラズマ医療国際学会」が設立されるなど未だ黎明期分野であるが、従来の医療法にない効果を有していることから次世代医療技術として注目されている。申請者は、2003年よりプラズマ流による滅菌機構の解明や滅菌方法を開発し、2009年からは生体反応プラズマ流によるヒト細胞の活性化・不活化機構

の解明を目指すなど、一貫してプラズマ流による生体への干渉機構に関する研究を進めてきた。しかしながらプラズマ流により、細胞にどのような遺伝子群が発現するのかについて、網羅的に解明を試みた例は無く、未解明の状況であった。また、再生医療などにおいて重要な要素技術となりうる、細胞の遺伝子群の発現応答を誘導するための取り組みについても、ほとんど成されていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究は、プラズマ流の細胞への干渉作用

を利用して、標的とした遺伝子群を選択的に発現させ、細胞反応を誘導する手法を開発する。研究課題として、プラズマ輸送解析、遺伝子群の発現解析、細胞界面構造の解析を遂行し、これらの成果を統合することで、細胞反応誘導法を開発する。これにより、流体工学を基盤にしたプラズマ、化学、電気、バイオ、医療を融合する、日本発の独創的な次世代医療基盤技術となる「プラズマ医療」を創出し、次世代がん治療の開発や再生医療の飛躍的發展に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

研究体制は、研究代表者（佐藤）：研究統括と実験解析，連携研究者（城倉）：遺伝子群発現解析，海外研究協力者（G. Morfill, T. Shimizu）：実用化に向けた観点からの情報交換，からなる。

研究は、①プラズマ流が生成する流動場、温度場、化学種、圧力による刺激の細胞界面への輸送機構の解明（図1）、②プラズマ流が細胞に与える影響を網羅的遺伝子発現解析遺伝子により、遺伝子群の発現と経路の解明、③原子間力顕微鏡による細胞界面の構造変化の解析、④細胞反応誘導法の開発の各項目について行った。

①においては、図1、図2に示すように、高時空間分解能のシュリーレン法を用いた可視化システムを構築した。

②は、図3に示すプロトコルにより網羅的遺伝子解析を行った。

③は、図4に示すように、細胞を培養した

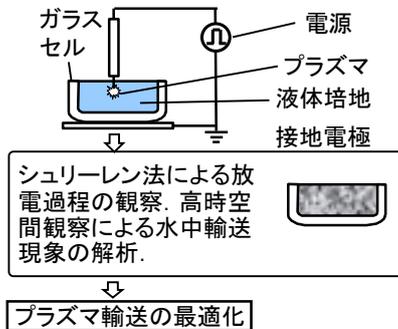


図1 プラズマ輸送解析方法

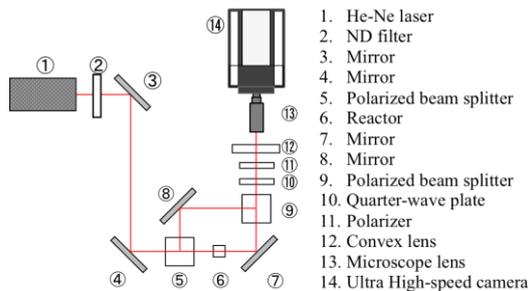


図2 高時空分解による可視化装置

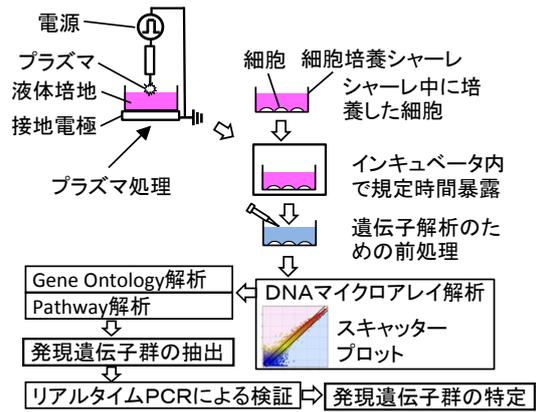


図3 網羅的遺伝子解析のプロトコル

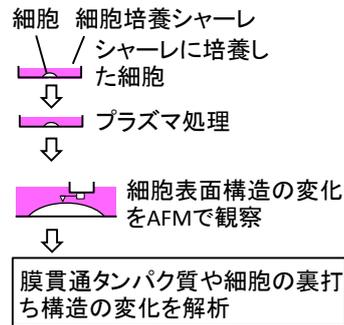


図4 AFMによる細胞表面構造の観察

シャーレの中を直接AFMで観察を行った。

4. 研究成果

(1) プラズマ流の物理刺激が細胞界面に輸送される機構

プラズマ流を水中に生成し、ストリーマの生成過程を詳細に検証した。また、ストリーマ生成に伴う気泡の生成消滅についても高時空間分解能で可視化を行い、その過程を観察した。図5に1次ストリーマの進展の様子を、図6に2次ストリーマ進展の様子を示す。これにより、水中で発生するストリーマは1次ストリーマと2次ストリーマに分類でき、1次ストリーマでは1A以下の比較的小さな電流で収まるのに対し、2次ストリーマでは1A以上の大きな電流が発生することを明らかにした。この際、1次ストリーマは半径0.5mm程度の領域内に形成されるが、2次ストリーマは1mm以上の長さに至り、広範囲に影響を与えることが明らかになった。これにより、1次ストリーマの方が荷電粒子を輸送するのに適していることを示した。

(2) 遺伝子群の発現解析

プラズマにより生成された化学種などの輸送による抗酸化遺伝子の発現についてリアルタイムPCRを利用して検証を行った。さらに、プライマーアレイやDNAマイクロアレイの結果についてGene Ontology解析を進めた。HeLa細胞の抗酸化遺伝子の発現傾向は、

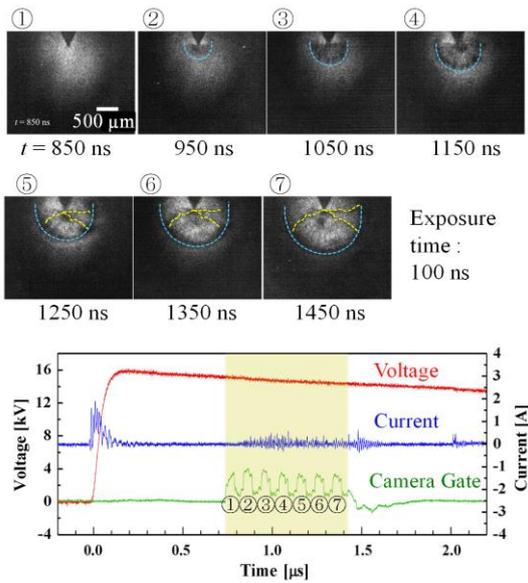


図5 1次ストリーマの進展の様子

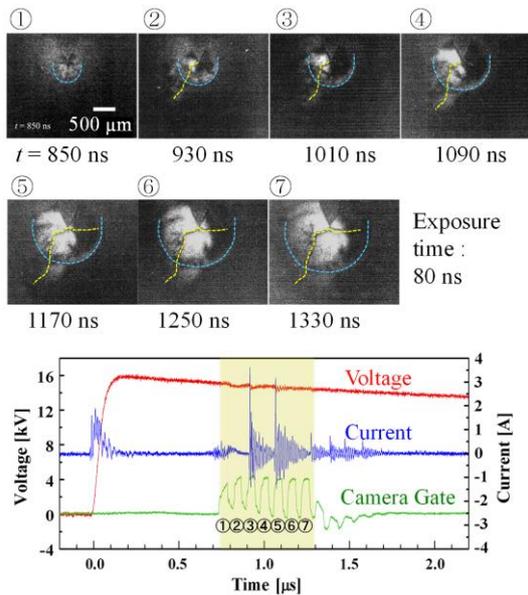


図6 2次ストリーマ進展の様子

図7に示すように、プラズマ照射培地と過酸化水素培地と比較すると、プラズマ照射培地の方が有意に大きいことが明らかになった。遺伝子群の発現解析について、再現性と定量評価の検証を行った。再現性については、網羅的遺伝子解析法の1条件当たり4サンプルの解析を行い、データの信頼性について検証した。また、定量評価については、リアルタイムPCRにより抗酸化遺伝子発現について検証した。網羅的遺伝子解析については、解析ソフトGene Springを導入して、クラスター解析、GO解析などを行い、過酸化水素との違いが有意に存在することを示した。

(3) 細胞界面構造の変化の解析

プラズマ処理した培地に細胞を暴露した

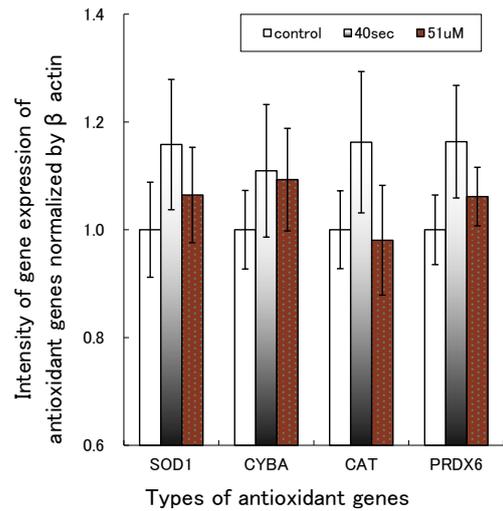


図7 抗酸化酵素遺伝子の発現強度 (β-actinで標準化)

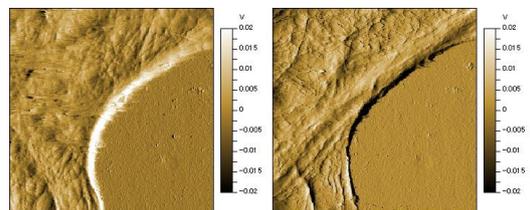


図8 AFMによる細胞表面観察 (画角一辺は8 μm)

ときの細胞表面の変形についてAFMにより解析を行った。暴露22分後と45分後の表面高さの結果を図4に示す。これより、時間の経過と共に細胞骨格が判別しやすくなってきている。細胞膜の一部が収縮するもしくは細胞質が移動して偏在する可能性を示唆している。

(4) 細胞反応誘導法の開発

(1), (2), (3)の成果をもとに細胞反応誘導法について検討を行った。プラズマ処理培地に含まれる過酸化水素濃度の影響については、強い刺激の場合はプラズマ刺激による細胞の不活性化は過酸化水素の影響が支配的であるが、プラズマによる処理を少なくしていくと、プラズマの影響は過酸化水素が支配因子ではなくなることを突き止めた。細胞の機能に致命的な影響を与えない程度であれば、細胞へのプラズマ照射により不活性化や活性化できる可能性があることを明らかにした。

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4件）

1. 佐藤岳彦, 大気圧プラズマ流処理培地への暴露による HeLa 細胞の機能応答, 日本機械学会第 25 回バイオエンジニアリング部門講演会, 2013 年 1 月 9 日, つくば.
2. 佐藤岳彦, 大気圧プラズマ流の照射による HeLa 細胞の生体応答, 第 28 回九州・山口プラズマ研究会, 2012 年 11 月 11 日, 大分. (招待講演)
3. 藤田英理, 金澤誠司, 大谷清伸, 小宮敦樹, 佐藤岳彦, 水中プラズマのストリーマ形成過程, 第 22 回環境工学総合シンポジウム 2012, 2012 年 7 月 6 日, 仙台.
4. Hidemasa Fujita, Seiji Kanazawa, Kiyonobu Ohtani, Atsuki Komiya, Takehiko Sato, Streamer Propagation Mechanism in Water, 11th International Symposium on Advanced Fluid Information and Transdisciplinary Fluid Integration, 2011 年 11 月 10 日, 仙台.

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 岳彦 (SATO TAKEHIKO)
東北大学・流体科学研究所・教授
研究者番号：10302225

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

城倉 浩平 (JOHKURA KOHEI)
信州大学・医学部・准教授
研究者番号：30303473