



ナノ秒パルス電場による細胞内機能の制御： アポトーシス誘導を蛍光寿命イメージングを用いて観測することに成功

研究成果のポイント

- ・ナノ秒(10^{-9} 秒)のパルス幅を持つパルス電場を用いて細胞の自殺であるアポトーシスの誘導に成功。
- ・試薬を用いることなく短時間でアポトーシスを誘起させることができる。
- ・蛍光寿命イメージング法と組み合わせることにより、細胞内状態の変化を観測することができる。
- ・ナノ秒パルス電場を使った悪性腫瘍細胞の死滅などへの応用が期待される。

研究成果の概要

ナノ秒(10^{-9} 秒)の非常に時間の短いパルス幅を持つ電場を細胞に印加することによって、細胞膜を傷つけることなく細胞内機能を制御することに成功しました。

また、本研究では、ナノ秒パルス電場によって、化学物質を使わずに細胞の自殺であるアポトーシス^{*1}を誘起させることができ、さらに電場による単一細胞内の環境変化を蛍光寿命^{*2}イメージング法を用いて顕微鏡下で観測することに成功しました。癌細胞の増殖はアポトーシスの抑制と関係することが知られており、本研究は、化学物質を用いずに癌細胞へアポトーシスを誘導して死滅させる技術開発へと繋げることができます。

論文発表の概要

研究論文名：Application of Nanosecond Pulsed Electric Fields into HeLa Cells Expressing Enhanced Green Fluorescent Protein and Fluorescence Lifetime Microscopy (増強緑色蛍光タンパク質を発現させたヒーラ細胞へのナノ秒パルス電場の適用と蛍光寿命顕微分光)

著者：氏名(所属) Kamlesh Awasthi, Takakazu Nakabayashi, and Nobuhiro Ohta (北海道大学電子科学研究所)

公表雑誌：The Journal of Physical Chemistry B ※アメリカ化学会(American Chemical Society (ACS))の学術誌

公表日：米国東部時間 2012年8月16日

研究成果の概要

(背景)

細胞の自殺過程であるアポトーシスは、生物が成長していく上で最も重要な過程のひとつになります。生きる上で不要になった細胞をアポトーシスによって除去することによって、個体をより良い状態に保つことができます。しかし、癌化した細胞では有害に変異した細胞を除去するアポトーシスが抑制されるために癌細胞増殖が起こると指摘されています。そのため、癌細胞にアポトーシスを誘導させることができれば、癌細胞の治療および死滅へと繋げることができます。しかし、化学物質や放射線などを用いたアポトーシスの誘導では、正常細胞の損傷および高額な装置などの問題があり、更

なる手法の開発が求められていました。近年、ナノ秒(10^{-9} 秒)の非常に短いパルス幅を持つ電場を細胞に印加することによって、細胞膜を傷つけることなく、細胞内部の状態を変化させられることが提唱されています。特にアポトーシスを誘導させることができれば、癌細胞を死滅させることができ、疾病の治療などへの応用を期待することができます。しかし、ナノ秒パルス電場による細胞内の状態変化の機構には不明な点が多く、十分な応用には至っていません。

(研究手法)

北海道大学電子科学研究所の太田信廣教授のグループは、共焦点蛍光顕微鏡を用いた蛍光強度および蛍光寿命イメージングシステムと金電極システムを組み合わせ、ナノ秒パルス電場による細胞変化を単一細胞レベルで観察するシステムを製作しました(図 1)。電極システムは、カバーガラス上に楕円形金電極をフォトリソグラフィ法によって作成し、金電極の間隙で培養された細胞を、顕微鏡でその場観察しました。さらに、本システムでは蛍光強度のみではなく、蛍光寿命の画像化も行うことができ、光によって蛍光物質が壊れて蛍光強度が減少する光退色現象の影響に関係なく測定することができますため、高感度測定を行うことができます。

(研究成果)

製作したナノ秒パルス電場印加システムを用いて、細胞にアポトーシスを誘起させることに成功しました。図 2 に人由来の培養細胞である HeLa 細胞^{*3}のナノ秒パルス電場効果の一例を示しています。A が電場印加前、B が 4 MV m^{-1} のパルス電場を 1 kHz の繰り返しで 60 秒間印加した後に測定した画像です。左が HeLa 細胞内に発現した増強緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の蛍光強度画像、右が対応する蛍光寿命画像であり、電場印加前と印加後の蛍光寿命の値の分布 (ヒストグラム) が図 2C になります。図 2B の蛍光強度画像において、電場を印加することによって、細胞に複数の突起ができたアポトーシス特有の構造が観測されていることがわかります。さらに電場によって EGFP の蛍光寿命が短くなることがわかります (図 2C 参照)。この結果は、アポトーシスに伴い EGFP の周囲の細胞内環境が変化したことに起因します。

図 3 は EGFP が発現した HeLa 細胞の蛍光強度イメージング、蛍光寿命イメージング、および蛍光寿命ヒストグラムが印加する電場のパルス数にどのように依存するかを示したものです。パルス数が 5 から 20 でも蛍光寿命ヒストグラムに変化が観測されます。アポトーシスによる細胞の形態変化は、20 パルス数程度では観測されないことから、EGFP の蛍光寿命を用いることにより、アポトーシスが起こる初期過程を検出できることを示しています。

(今後への期待)

細胞にアポトーシスを起こすためには、一般にアポトーシス誘導試薬を細胞に導入する方法が用いられていますが、数時間程度の培養時間が必要になります。しかし、本結果は、ナノ秒パルス電場を用いることによって、試薬を必要とせずに、また数 10 秒程度の短い時間でアポトーシスを誘起できることを示しており、迅速に悪性細胞の死滅や疾病の治療ができることを示唆しています。また、蛍光寿命イメージング法と併用することによって、パルス電場による細胞変化の機構を明らかにすることが可能であり、将来的には、ナノ秒パルス電場による細胞診断および治療につながることを期待できます。

お問い合わせ先

所属・職・氏名：北海道大学電子科学研究所 教授 太田 信廣 (おた のぶひろ)

TEL: 011-706-9410 FAX: 011-706-9406 E-mail: nohta@es.hokudai.ac.jp

ホームページ： <http://www.ohta-laboratory.com/>

【用語解説】

1) アポトーシス

アポトーシスは、細胞の自殺すなわち遺伝子により決められたプログラムに従って進行する細胞死のこと。生きる上で不要になった細胞をアポトーシスによって除去し、個体をより良い状態に保つ生体防御機能および恒常性維持としての働きがある。また、生物の発生過程における形態形成としての働きもあり、アポトーシスが特定の場所で起こることによって生物の形態が形成される。

2) 蛍光寿命

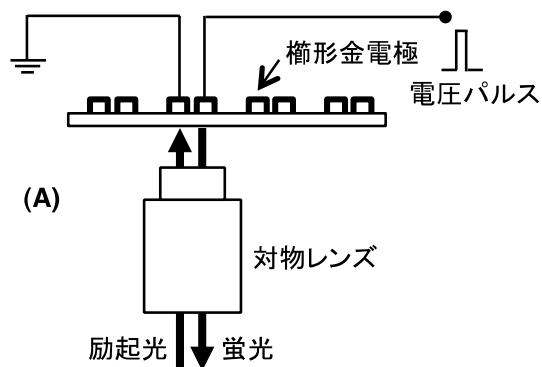
物質が光を吸収して高エネルギー状態が生成し、生じた高エネルギー状態が蛍光を発して元に戻るまでの平均時間。十分に短いパルス幅を持ったパルス状の光で物質を励起したときに、発する蛍光の強度が $1/e$ になるまでの時間として一般的には定義される。

3) HeLa 細胞

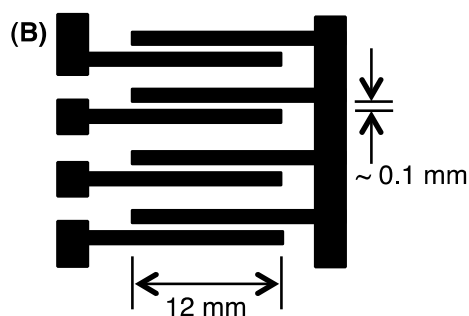
ヒト由来の細胞株。子宮頸ガンから分離され、培養細胞として広く用いられている。

【参考図】

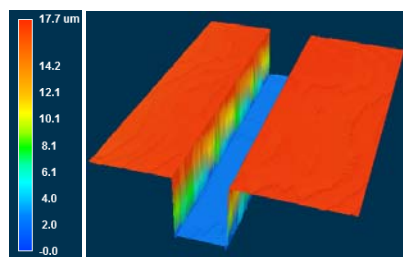
図 1



(A) 電極システムの配置図。試料を励起する光は、対物レンズより試料に集光される。励起光によって生じた蛍光は、同じ対物レンズによって集められ、検出される。

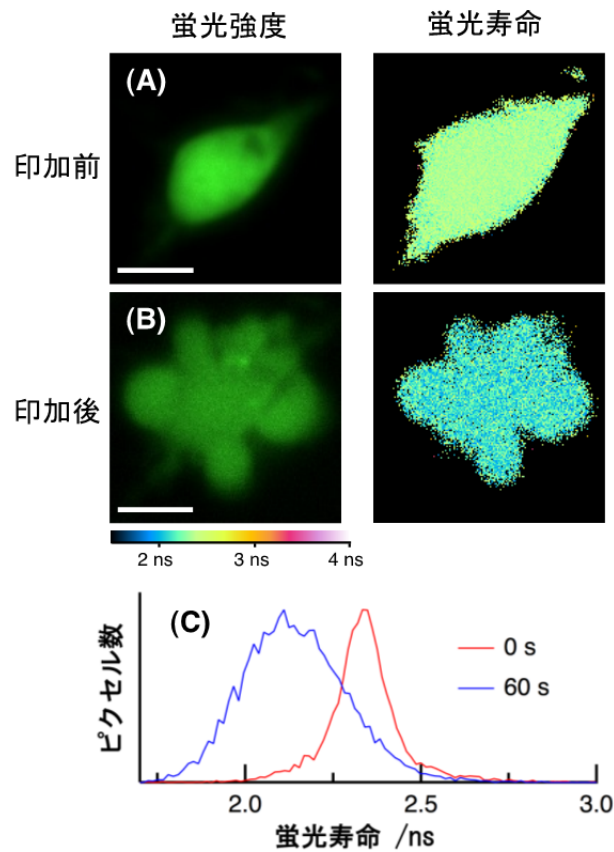


(B) カバーガラス上に製作した楕形金電極の概略図。楕形金電極の間隙で細胞を培養する。



(C) 電極の3Dイメージ。深さを色の違いで示してある。

図 2

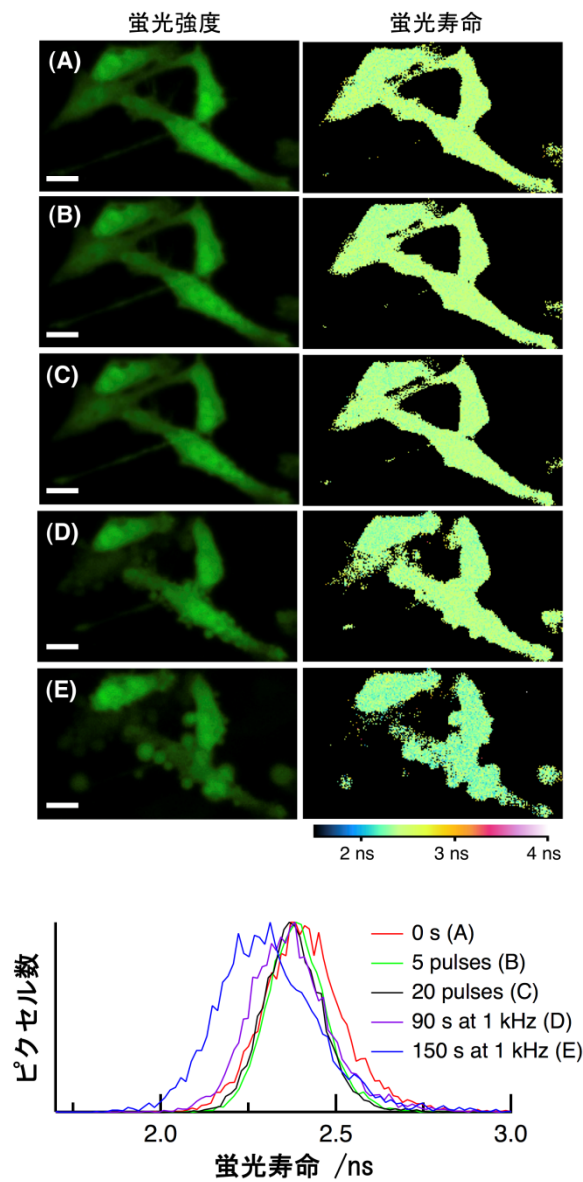


電場印加前(A)と電場印加後(B)の蛍光タンパク質(EGFP)が発現した単一 HeLa 細胞の蛍光強度画像(左)と蛍光寿命画像(右)。スケールバーは $20 \mu\text{m}$ 。

電場は約 50 ns のパルス幅を持つ電場を 1 kHz の繰り返しで 1 分間印加している。電場の大きさは、 4 MVm^{-1} である。

電場印加前と印加後の蛍光寿命の値の分布(ヒストグラム)を比較した結果を(C)に示す。電場の印加によって、アポトーシス特有の形態変化を示し、また蛍光寿命が短くなっていることがわかる。

図 3



蛍光タンパク質 (EGFP) が発現した HeLa 細胞の蛍光寿命ヒストグラムにおける印加電場パルス数依存性。

電場印加前(A), 5 パルス印加後(B), 20 パルス印加後(C), 1 kHz の繰り返しで 90 秒間印加後(D), 1 kHz の繰り返しで 150 秒間印加後(E)。印加した電場は、約 50 ns のパルス幅を持ち、大きさは 4 MVm^{-1} である。5 から 20 パルスの印加でも、ピークの位置は保った状態で蛍光寿命の長い成分が減少していることがわかる。