

狭帯域強電界パルスを用いた細胞内 Ca イオン濃度制御の試み

山田 亮*、李 玉蘭**、宮川大輝**、大西伸明**、勝木 淳***、秋山秀典***
 (熊本大学 *工学部 **大学院自然科学研究科 ***パルスパワー科学研究所)

1 はじめに

最近、強電界パルス (PEF) を利用したがん治療や創傷治療などの医療応用が注目されている。PEF を細胞に印加すると、細胞内のセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} 濃度が上昇する。そして、活性酸素の発生やブレベリングなどの生体反応が起こり、やがて細胞のプログラム死であるアポトーシスへと進んでいく^[1]。PEF で惹起される生体応答の多くは PEF 印加後の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に起因することが多い。しかし、PEF 印加後の Ca^{2+} 濃度上昇メカニズムはよくわかっていない^[2]。本研究の目的は Ca^{2+} 濃度上昇メカニズムを明らかにし、また、電界因子との関連性を明らかにすることである。

2 実験装置および方法

2.1 パルス発生装置と実験手順

本研究で用いたバースト交流高電界を発生する装置を用いた。正弦波発生器 (E4400B, Agilent, 250 k~1 GHz) はパルス発生器 (565, BNC) で発生する矩形パルスの時間だけ任意周波数の正弦波信号を出力し、その後高周波アンプ (2088 BBS1C3CRR, EMPower, 1~100 MHz, 500 W) を用いてバースト正弦波信号を増幅することによってバースト交流高電界を発生させる。また、同軸ケーブルを介してマイクロギャップ電極へ供給される。周波数 500 Hz、パルス幅 2 μs 、繰り返し周波数 1 pps を固定し、電界強度を 1~10 kV/cm の範囲で変化させた。対象細胞はヒト子宮頸がん細胞 (HaLa-S3) を用いた。電極間隔を調整できるマイクロギャップ電極を細胞培養したガラスシャーレに設置し、同軸ケーブルを介して PEF を電極間の細胞に印加する。細胞の反応は顕微鏡下で、リアルタイム観察した。

2.2 試薬および実験条件

本実験で想定する細胞内への Ca^{2+} の流入経路は、①強電界パルスによって開いたナノポア (ポア) ②特異的に Ca^{2+} を細胞内外へと通過させる TRP チャネル (チャネル) ③細胞内の Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体からの放出の三つがある。これらの電界強度依存性を調査した。細胞内の Ca^{2+} 検出には蛍光分子プローブ Fluo-8 を用いた。流入経路を特定するため、培地に Ca^{2+} を含有するもの、含有しないもの、さらにチャネルの阻害剤である Ruthenium Red (R.R.) を使い分け流入経路を限定し、表 1 の三つの条件で実験を行った。 Ca^{2+} 流入の経路は、条件①ではポア、チャネル、小胞体、②は小胞体のみ、③はポアと小胞体である。すなわち、チャネルを通して流入した Ca^{2+} は Sham と R.R. の差分であ

表 1. 実験条件

条件	Ca ²⁺ 含有培地	TRPチャネル阻害剤	流入経路
① Sham	○	×	ナノポア、チャネル 小胞体
② Ca-Free	×	×	小胞体
③ R.R.	○	○	ナノポア、小胞体

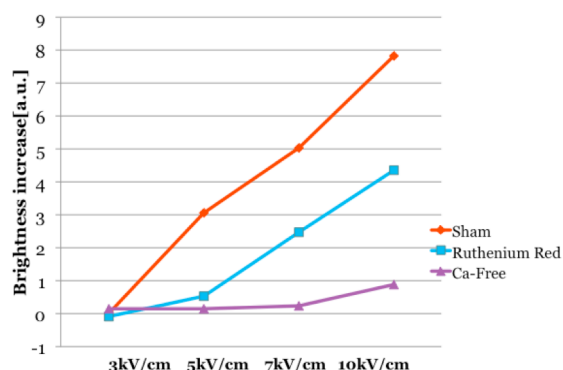


図 1. 各電界強度における細胞内への Ca^{2+} 流入

り、小胞体から放出された Ca^{2+} は Ca-Free で、ポアから流入した Ca^{2+} の増加量は R.R. と Ca-Free の差分である。

3 実験結果および考察

図 1 に各電界強度の PEF 印加後における各条件の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を示す。電界強度を高めるにつれて、各条件が線形的に増加していることがわかる。これから、 Ca^{2+} 流入は電界強度依存があると示唆される。電界強度 3 kV/cm においては、あまり変化が見られなかった。電界強度 5~10 kV/cm に着目すると、チャネルを阻害した R.R. の細胞内 Ca^{2+} 濃度は Sham よりも低くなり、 Ca^{2+} 非含有培地では細胞内 Ca^{2+} が非常に低いことがわかる。これは、細胞外からの Ca^{2+} 流入はポアだけでなく、チャネルも大きく影響していることに加え、小胞体の影響は小さいことも示唆される。電界強度 5 kV/cm では、細胞内への Ca^{2+} 流入経路の主はチャネルであることがわかる。電界強度 7~10 kV/cm へと増加させるにつれて、ポアからの流入が増加することがわかる。これは、電界強度を増加させることで、細胞膜へのストレスが大きくなりポアからの流入が増加したと考えられる。本研究では、10 kV/cm まで電界強度を高めても小胞体からの Ca^{2+} 放出は少なかった。

4 まとめ

本研究では PEF 印加した細胞の Ca^{2+} の流入経路の電界強度依存性を調べた。比較的低い電界強度では Ca^{2+} の流入経路は主にチャネルであり、高い電界ではポアからの流入が主となることが明らかとなった。また、10 kV/cm までは小胞体からの Ca^{2+} 放出は少ないことがわかった。

参考文献

- [1] S.S. Scarlett, J.A. White, P.F. Blackmore, K.H. Schoenbach, J.F. Kolb, *Biochimica et Biophysica Acta*, Vol. 1788, pp. 1168 (2009).
- [2] W. Frey, J.A. White, R.O. Price, P.F. Blackmore, R.P. Joshi, R. Nuccitelli, S.J. Beebe, K.H. Schoenbach, J.F. Kolb, *Biophysics J.*, Vol. 90, pp. 3608 (2006).