

“An extremely weak electric current system induces anti-apoptotic effects and anti-necrotic effects in a living cell” 和文要約

『生細胞の微弱電流印加による細胞死抑制効果の検討』

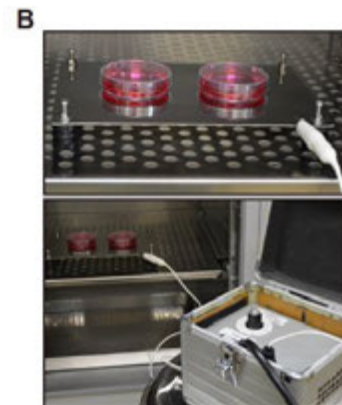
福岡大学医学部再生・移植医学講座
小島大望、西中村瞳、伊東 威、小玉正太

緒言

種々の疾患に対して細胞治療が行われているが、その治療効果は治療に用いる細胞の状態に左右されることは明白である。治療前に細胞の細胞死を制御する方法が開発されたならば、更なる細胞治療の成績向上が期待される。本研究では、既に野菜や食肉の保存時に電流を印可することにより保存状態が改善する技術に着目し、生細胞培養時に微弱電流を印可することによる細胞に与える影響を解析した。

方法

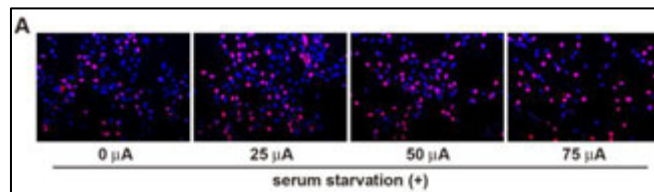
NIH3T3 細胞を細胞培養用皿で培養し、微弱電流印加（右図）の有無により、低濃度（1%）ウシ血清培養加培地で培養し、細胞増殖に与える影響、ネクロシス、アポトーシス、オートファジーを含む細胞死抑制効果を検討した。



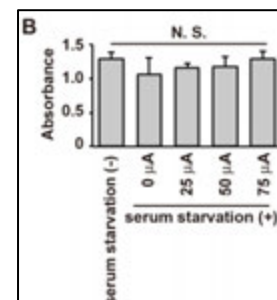
結果

微弱電流印加による細胞増殖に対する効果の検討

微弱電流印加による細胞増

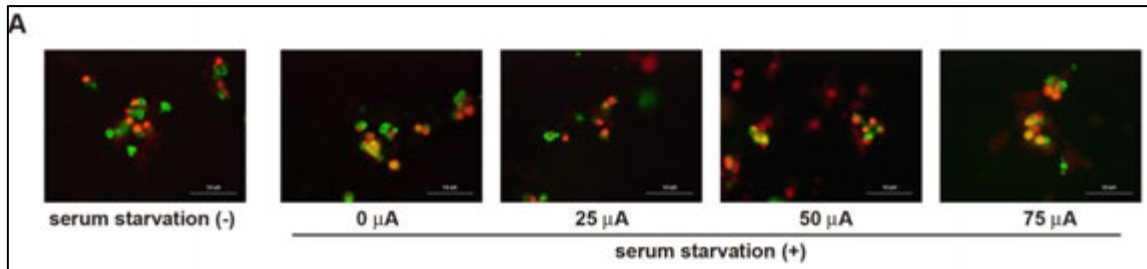


殖への影響を検討するために、NIH3T3 細胞を低濃度（1%）ウシ血清加培地で培養し、0 μ A、25 μ A、50 μ A、75 μ A の印可による影響を BrdU 取り込み能（右図 A）および cell counting assay（右図 B）で解析した。細胞増殖能は 0 μ A、25 μ A、50 μ A、75 μ A の 4 群間で有意差を認めず、細胞増殖に対する影響は認めなかった。



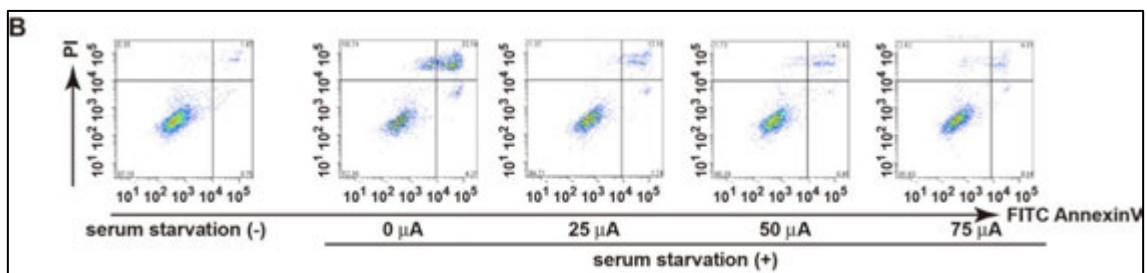
微弱電流印加による細胞死抑制効果の検討

次に、微弱電流印加による細胞死抑制効果を検討するために、NIH3T3 細胞を低濃度（1%）ウシ血清加培地で培養し、0 μ A、25 μ A、50 μ A、75 μ A の印可によりネクローシスおよびアポトーシスが抑制されるか PI(Red)/AnnexinV(Green)の免疫染色およびフローサイトメトリー法で解析し



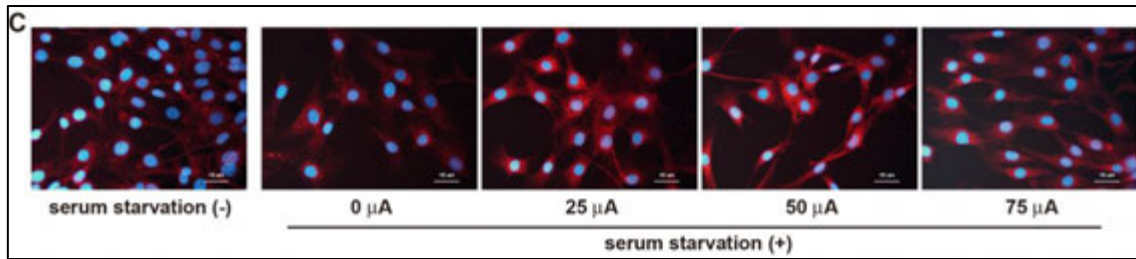
た。

低濃度ウシ血清加培地で NIH3T3 細胞を培養し微弱電流印加を加えないと（0 μ A）PI 陽性細胞は増加し、ネクローシスが増加するが、25 μ A、50 μ A、75 μ A の印可により PI 陽性細胞が減少した。さらにフローサイトメトリーの手法を用いて PI と AnnexinV を染色しネクローシス（PI 陽性 AnnexinV 陰性）細胞、早期アポトーシス（PI 陰性 AnnexinV 陽性）細胞、後期アポトーシス（PI 陽性 AnnexinV 陽性）細胞の割合を解析した。

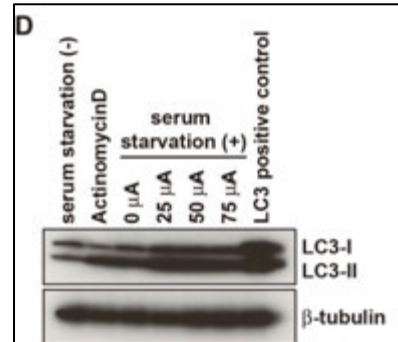


微弱電流印加をかけない場合には、低濃度ウシ血清加培地での培養（上図 0 μ A）ではネクローシス（4分割図左上）、早期アポトーシス（4分割図右下）、後期アポトーシス（4分割図右上）の割合はコントロール（左）で増加したが、25 μ A、50 μ A、75 μ A の印可によりネクローシス、早期アポトーシス、後期アポトーシスともに減少した。以上より、微弱電流印加によりネクローシスおよびアポトーシス抑制効果があることが明らかとなった。

次に、もう一つの細胞死であるオートファジーについて解析した。細胞の自食作用による細胞死であるオートファジーは LC3 蛋白の発現で確認した。



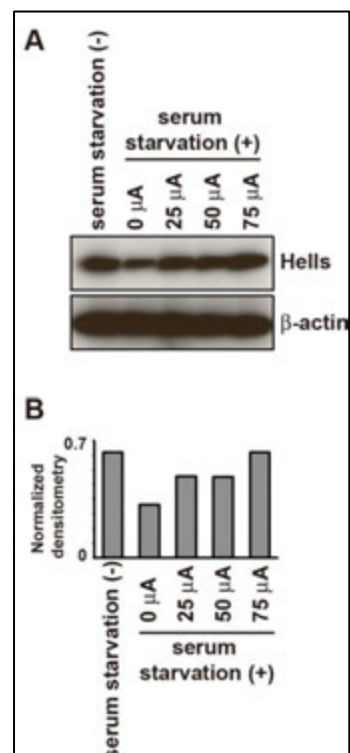
LC3 の免疫染色像(Nodular Red の細胞質内染色) (上図 C) およびウエスタンブロットティング (右図 D) の解析により、低濃度ウシ血清加培地による培養による LC3 の発現は微弱電流印加群でもコントロールと同等に発現しており、微弱電流印可でオートファジーは抑制されないことが明らかとなった。



以上の結果より、微弱電流印加は低濃度ウシ血清加培地の培養によるネクロシスおよびアポトーシスを抑制し、オートファジーは抑制しないことが明らかとなった。

抗アポトーシス関連遺伝子の解析

微弱電流印加による抗アポトーシス関連遺伝子の発現を PCR アレイで解析した。添付書類①にあるように Bcl10 遺伝子、Hells 遺伝子、Lxh4 遺伝子、Nme5 遺伝子の発現が増加していた。これらの遺伝子は発現が増加することによって抗アポトーシス効果を発現する遺伝子である。なかでも Hells 遺伝子の発現がコントロールと比較して 400 倍以上と顕著に増加していた。さらに、Hells の蛋白レベルをウエスタンブロットティングで解析すると、微弱電流印加により Hells 蛋白の発現が増加していた。これらの結果により、微弱電流印加により Hells 遺伝子の発現が増加し、抗アポトーシス効果をもたらしていると示唆された。



まとめ

微弱電流印加により低能度ウシ血清加培地によるネクローシスおよびアポトーシスの抑制効果が明らかになった。微弱電流印可により抗アポトーシス遺伝子である **Hells** の発現が増強することにより、細胞の抗アポトーシス効果が誘導されることが明らかになった。

本研究の成果により、細胞治療の更なる治療成績向上が期待される。

