

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500402

研究課題名（和文） 低電圧パルス電流による癌細胞増殖抑制メカニズムの研究

研究課題名（英文） Mechanism of the inhibition of cancer cell growth using low voltage electric pulses

研究代表者

松木 範明（MATSUKI NORIAKI）

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：90284520

研究成果の概要（和文）：我々は、低電圧パルス電流を癌細胞に与えると、癌細胞の細胞膜に穴が開き、その後、癌細胞がアポトーシスと呼ばれる細胞死に至ることを発見した。今回の研究では、そのメカニズムとして、細胞内カルシウム濃度が上昇し、カスパーゼ酵素系が活性化することにより癌細胞がアポトーシスに至ることをつきとめた。一連の研究の過程より、現在、欧米などで試験的に行われている高電圧電気刺激（数百ボルト）に抗がん剤を組み合わせた治療法が、より安全な低電圧電気刺激（十数ボルト）で出来る可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that cancer cell apoptosis was induced through electroporation (membrane pore formation) with the application of low voltage electric pulses (LVEPs). In this study, we reported about the apoptosis mechanism of cancer cells that LVEPs impose cell stress and induce apoptosis through caspases activation of both cell death receptor and mitochondrial pathways following intracellular  $Ca^{++}$  elevation. A series of our studies suggest that LVEPs which might be mild damage to the patients could take place of high voltage electrochemotherapy which is studied as a new anti-cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学／生体材料学

キーワード：エレクトロポレーション、アポトーシス、低電圧電気パルス、カスパーゼ、膜透過性

## 1. 研究開始当初の背景

エレクトロポレーション法は生体および細胞実験系において、主に遺伝子や薬剤などの細胞内導入法として広く普及している。とこ

ろが 1997 年に Hofmann らにより高電圧短時間電気パルス自体が細胞のアポトーシスを誘導することが報告された。その後、2003 年に Vernier らが超高電圧（数十万ボルト）

超短時間（ナノ秒）電気パルス発生装置を開発し、細胞膜を損傷せずに細胞内カルシウムの上昇を誘発し、細胞にアポトーシスを誘導することに成功した。しかしながら、そのメカニズムについては、細胞内カルシウムなどの細胞内情報伝達機構の関与が示唆されるものの、未だその機序は不明のままである。また、これらの報告は超高電圧超短時間電気パルスを用いており、特別な大掛かりな装置を必要とすることや、生体への応用の際の安全性に問題が残る。

一方、細胞へのアポトーシスの誘導に関しては、強い刺激よりもむしろ弱い刺激によるものの方が有効であるという様々な物理的・化学的実験報告がある。

そこで我々は、がん治療への臨床応用という点も踏まえ、低エネルギーの低電圧長時間電気パルスを用いることにより、より低細胞障害性（細胞壊死の抑制）で、より有効にがん細胞にアポトーシスを誘導させることができるのではないかと考えた。

我々がこれまでに口腔扁平上皮癌細胞（SCC-9）を対象に行った実験結果としては、15ボルト100ミリ秒の低電圧長時間電気パルスの反復刺激は、1500ボルト0.05ミリ秒の高電圧短時間電気パルス刺激よりもより有効に細胞のアポトーシスを誘導することを世界で初めて示した（Matsuki, et al., *Cancer Letters*, 269(1):93-100(2008)）。また、それらのアポトーシスの過程でカスパーゼ3の酵素活性の上昇が認められた。従って、低電圧長時間電気パルスによる細胞アポトーシスの誘導においては、カスパーゼ系酵素が関与している可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨床応用を想定し、より低エネルギーで安全な電気パルスの閾値の探索およびカスパーゼ系酵素・細胞内カルシウム変化を中心としたがん細胞アポトーシスの誘導メカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

実験はマウス悪性黒色腫細胞株（B16）を用いて、以下の項目について行った。

### (1) 低電圧パルスエレクトロポレーションによる癌細胞アポトーシス誘導実験

低電圧電気パルス刺激（15V単極方形波）のpulse duration変化に対するアポトーシス誘導への影響を、個々の細胞レベルで蛍光試薬（アネキシン V、7AAD）を用いてフローサイトメトリーで詳細な検出を行った。

### (2) 低電圧パルスエレクトロポレーションによるアポトーシス誘導メカニズムの解析として、各カスパーゼ活性化経路と細胞内カ

ルシウム変化の測定を行った。

### ①カスパーゼ系を中心としたがん細胞アポトーシスの酵素活性経路の同定を行った。

カスパーゼ 3,7,9 の酵素活性を、フローサイトメトリーで測定し、アポトーシスにおける詳細なカスパーゼ活性経路の測定を行った。

### ②癌細胞アポトーシスの誘因のひとつである細胞内カルシウム濃度の変化を、蛍光色素 Fura2 を用いて測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 低電圧パルスエレクトロポレーションによる癌細胞アポトーシス誘導実験

低電圧電気パルス刺激（15V単極方形波）のアポトーシス誘導におけるpulse durationの影響を調べたところ、図1に示すように、pulse durationが長くなる程細胞死（アポトーシスとネクローシス）を高率に誘導した。

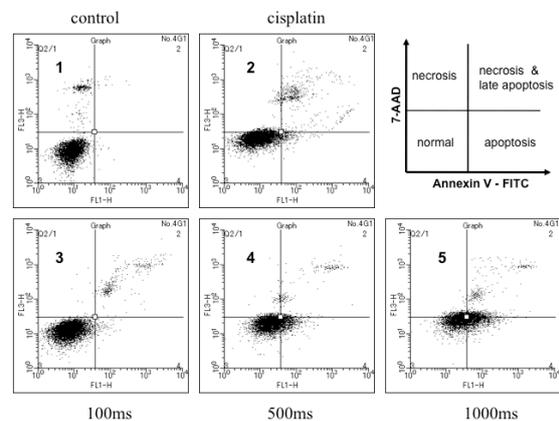


図1. 低電圧電気刺激によるアポトーシス誘導における pulse duration の影響

また、図2に示すように、1000ms低電圧電気刺激により、シスプラチンよりもより高率にアポトーシスを誘導することが分かった。

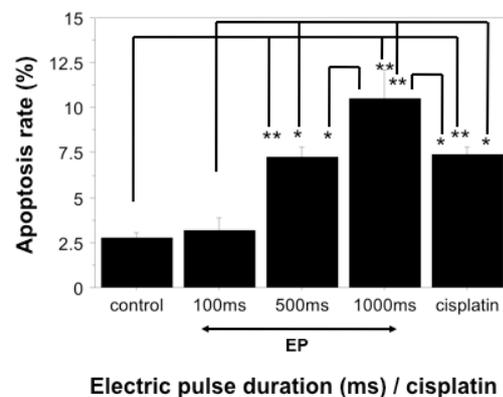


図2. アポトーシスの割合

そこで、図 3 に示すように、全細胞死に対するアポトーシスの割合を調べたところ、1000ms の電気刺激がより高率にアポトーシスを誘導することが分かった。これより、アポトーシス誘導に関しては、低電圧長時間作用電気パルスがより効率良く作用することが示された。また、同時にシスプラチンなどの抗がん剤も高率に効率良くアポトーシスを誘導出来ることが分かった。以上の結果より、現在、欧米などで試験的に行われている高電圧電気パルス刺激（数百ボルト）に抗がん剤を組み合わせた Electrochemotherapy が、より安全な低電圧電気パルス刺激（十数ボルト）に取って代わる可能性が示された。

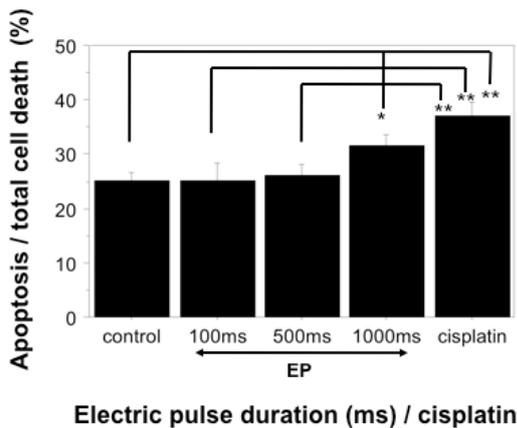


図 3. 全細胞死に対するアポトーシスの割合

## (2) 低電圧パルスエレクトロポレーションによるアポトーシス誘導メカニズムの解析

### ①カスパーゼ系を中心としたがん細胞アポトーシスの酵素活性経路の同定

アポトーシスに至る酵素活性化経路のうち、最も一般的な経路はカスパーゼ系であり、最終的にカスパーゼ 3 の活性化に収束することが分かっている。そこで、低電圧電気パルス刺激によるアポトーシスが、カスパーゼ系に依存しているかどうかを調べた。

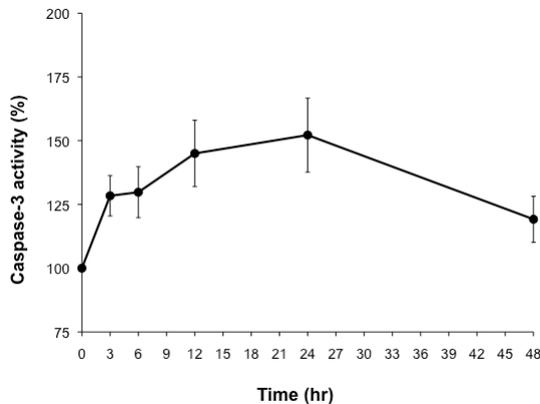


図 4. カスパーゼ 3 の経時的活性変化

図 4 に示すように、低電圧電気パルス刺激直後よりカスパーゼ 3 の活性化が認められ、24 時間後にピークを形成して、以後徐々に低下した。これより、低電圧電気パルス刺激によるアポトーシス誘導には、カスパーゼ系酵素が関与していることが分かった。また、低電圧電気刺激が短時間にも関わらず、カスパーゼ 3 の反応が長期に持続していることも分かった。

次に、カスパーゼ 3 に収束するより詳細なカスパーゼ経路を解明するために、細胞膜上に発現している cell death receptor 経路が関与するカスパーゼ 8 とミトコンドリア経路によるカスパーゼ 9 の活性化の度合いを測定した。図 5 に示すように、カスパーゼ 8、9 共に酵素活性が上昇しており、低電圧電気パルス刺激によるアポトーシス誘導には、cell death receptor 経路とミトコンドリア経路の両方が関与していることが分かった。即ち、低電圧電気パルス刺激は細胞に対し、非特異的に作用していると考えられ、今後、小胞体経路を含め、より詳細な経路の確定が必要である。

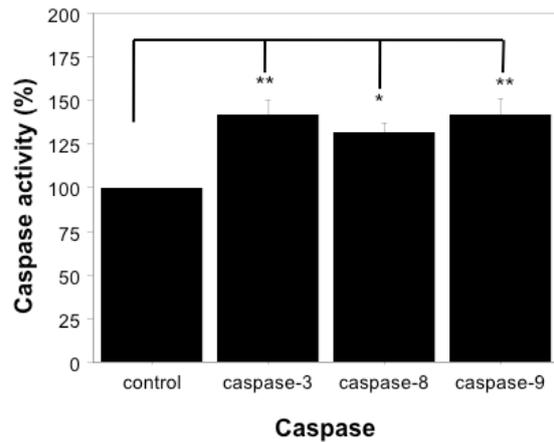


図 5. カスパーゼ 3, 8, 9 の活性変化

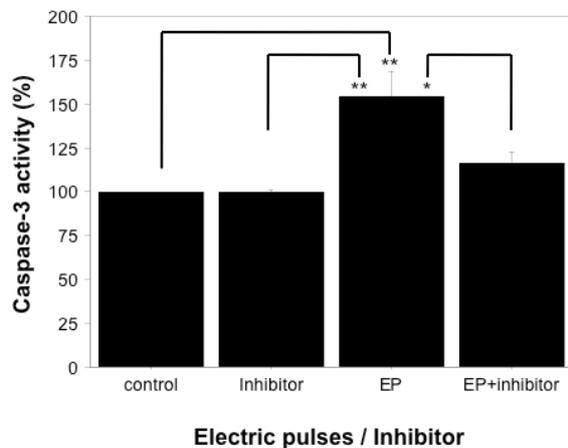


図 6. Z-VAD-FMK によるカスパーゼ 3 の抑制

さらに、カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) を用い、電気刺激を加えてみたところ、図 6 に示すように、カスパーゼ 3 が抑制され、その結果アポトーシスの大部分が抑制された (図 7, 8)。このことから、低電圧電気パルス刺激によるアポトーシス誘導には、カスパーゼ経路の活性化が強く関与していることが示された。

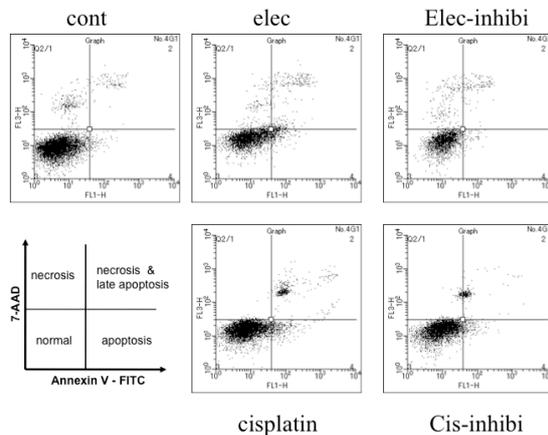


図 7. カスパーゼ阻害剤によるアポトーシス抑制

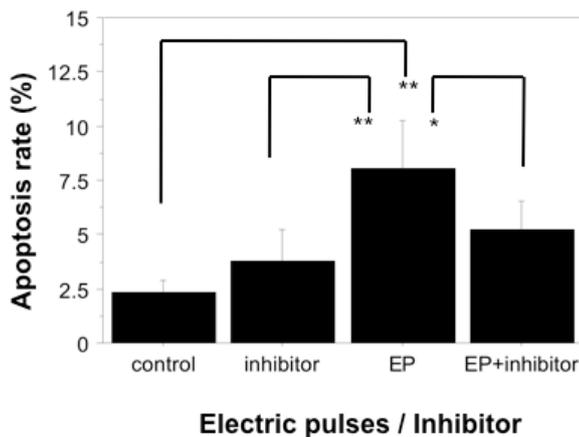


図 8. カスパーゼ阻害剤によるアポトーシス抑制

②低電圧パルスエレクトロポレーションによる細胞内カルシウム濃度の変化

アポトーシスに至る酵素活性化経路のトリガーのひとつとして、細胞内カルシウム濃度の上昇が報告されており、低電圧電気刺激により、細胞内カルシウム濃度にどのような変化が起るのかを測定した。図 9 に示すように、低電圧電気パルス刺激により、細胞内カルシウム濃度の上昇が認められた。これらについての詳細な報告はほとんどなく、今後、細胞内カルシウム濃度の上昇が、何に由来するのか、あるいは小胞体への関与が如何なる物であるのかの検討が必要である。

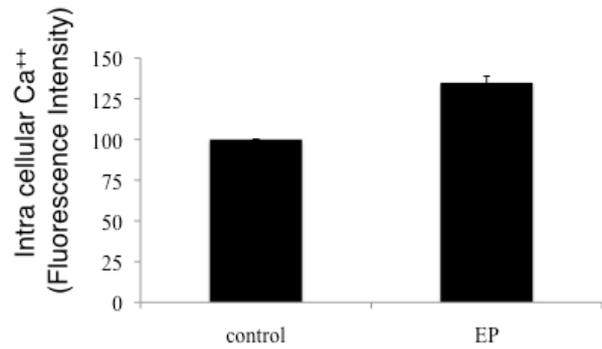


図 9. 低電圧パルスによる細胞内カルシウム濃度変化

(3) 低電圧パルスエレクトロポレーションによる癌細胞増殖に対する影響

低電圧電気パルスが癌細胞増殖にどのような影響を及ぼすのかを調べたところ、図 10 に示すように、アポトーシス誘導により、癌細胞の増殖抑制が起っていることが確認された。

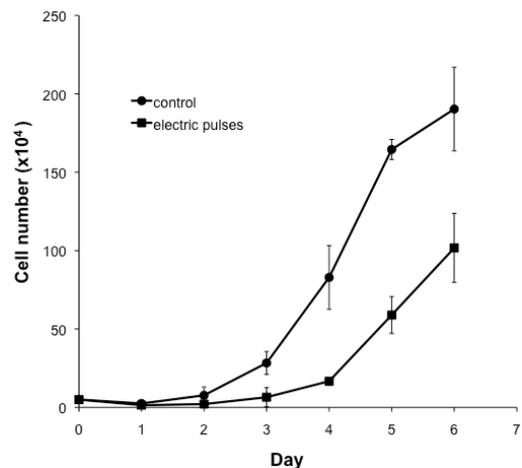


図 10. 低電圧パルスによる癌細胞増殖抑制

以上より、低電圧電気パルスが新たな癌治療法のひとつになる可能性が示された。

## 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 4 件)

- ① Blood flow and cancer cell adhesion in a microchannel with bifurcation and confluence.  
T. Ishikawa, H. Fujiwara, N. Matsuki, Y. Imai, H. Ueno and T. Yamaguchi.  
Biomedical Microdevices, 13, 159-167 (2011).  
(査読有り)
- ② Fluid particle diffusion through high-hematocrit blood flow within a capillary tube.  
M. Saadatmand, T. Ishikawa, N. Matsuki, M.J. Abdekhodaie, Y. Imai, H.Ueno, T. Yamaguchi.  
Journal of Biomechanics, 44, 170-175 (2011).  
(査読有り)
- ③ Activation of caspases and apoptosis in response to low-voltage electric pulses.  
N. Matsuki, M. Takeda, T. Ishikawa, T. Hayasaka, Y. Imai, and T. Yamaguchi.  
Oncology Reports, 23, 1425-1433 (2010).  
(査読有り)
- ④ Red blood cell motions in high-hematocrit blood flowing through a stenosed microchannel.  
H. Fujiwara, T. Ishikawa, R. Lima, N. Matsuki, Y. Imai, H. Kaji, M. Nishizawa and T. Yamaguchi.  
Journal of Biomechanics, 42, 7, 838-843 (2009).  
(査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

- ① N. MATSUKI, S. ICHIBA, K. MATSUMIYA, Y. UJIKE. Apoptosis Induction by Low Voltage Electric Pulses., 2011 European Multidisciplinary Cancer Congress, 23-27. Sep. 2011. Stockholm., E16-0392.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松木 範明 (MATSUKI NORIAKI)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：90284520