

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K18732

研究課題名（和文）ナノ秒パルス高電界による白血球の活性化現象を利用した献血成分の有効活用

研究課題名（英文）Activation of white blood cells by nanosecond pulsed electric fields and its application to the effective utilization of donated blood

研究代表者

矢野 憲一（Yano, Ken-ichi）

熊本大学・産業ナノマテリアル研究所・教授

研究者番号：70311230

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：白血球は人体防御の主役であり、好中球は最も主要な白血球である。好中球をナノ秒パルス高電界で刺激すると、細胞内部からDNAと生理活性分子が細胞外へと放出される。これは好中球細胞外トラップ（NET）と呼ばれる免疫反応である。本研究ではナノ秒パルス高電界によるNET誘導のメカニズムを解析し、NETの誘発に必要な電界強度には閾値があること、細胞外のカルシウムイオンの流入と電気的な作用が同時に作用する必要があることを明らかにした。ナノ秒パルス高電界はガン治療の新しい手段と広く認められているが、ガン細胞に死を誘導する場合とNETを誘導する場合ではメカニズムが異なると推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではナノ秒パルス高電界によるNET誘導にはカルシウム流入の誘発と電気的作用が同時に必要であること、ナノ秒パルス高電界による細胞死誘導とNET誘導では異なるメカニズムが働いていることを示し、ナノ秒パルス高電界の生体作用メカニズムについて新たな理解を得た。近年、献血は成分ごとに使われることが多いが、白血球は輸血にも製剤にも使われていない。本研究は、ナノ秒パルス高電界というクリーンな刺激により、好中球内部から生理活性物質を放出させ、これを有効利用することへ向けたさらなる研究開発の基盤となりうる。

研究成果の概要（英文）：White blood cells play a vital role in the defence of the human body from infection, and neutrophils are the most abundant type of white blood cells. Stimulation of neutrophils with nanosecond pulsed electric fields (nsPEFs) can induce neutrophil extracellular trap (NET) formation, which is extrusion of chromosomal DNA and various intracellular bioactive molecules and serves as a defence mechanism against infection. In this study, we analyzed the mechanism for the nsPEF-induced NET formation and identified the threshold of electric fields and the requirement of both calcium influx and electrical actions for NET induction. Because neutrophils and other types of white blood cells in donated blood are not effectively utilized, our results pave the way for the release of bioactive molecules from neutrophils in unused donated blood samples.

研究分野：分子生物学

キーワード：ナノ秒パルス高電界 白血球 好中球 好中球細胞外トラップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノ秒パルス高電界は、ナノ秒オーダーの超短時間に局限して対象に強い電気的な作用を与える手法であり、有意な熱の発生を伴わずに高エネルギー状態を達成することができるというユニークな特徴を持つ。ナノ秒パルス高電界は医療をはじめとする様々な分野での利用が期待されている。高い強度のナノ秒パルス高電界はガン細胞に効率よく細胞死を引き起こすことから、ガン治療において有望とされてきた。私たちはナノ秒パルス高電界のヒト細胞への作用機序について研究を行い、ナノ秒パルス高電界による刺激が細胞死のみならず様々な細胞応答を誘起できることを示してきた。

白血球は人体防御の主役であり、その内部に様々な生理活性物質を保持している。好中球は最も主要な白血球であり、体内に侵入した細菌などに遭遇することで活性化し、染色体 DNA を細胞外へと放出する。好中球から放出された DNA は好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular trap, NET) と呼ばれる。NET が生じる際、細胞内部に貯蔵されていた生理活性物質が共に細胞外へと放出されるため、NET 形成は病原菌からの防御反応として機能する。ヒト HL-60 細胞は実験室内で好中球に分化させて NET 形成を誘導することができる。私たちは好中球に分化した HL60 細胞をナノ秒パルス高電界で刺激すると NET 形成が誘発されることを示した。一般に白血球は体内では細菌感染により活性化され、実験的には各種の薬物によっても活性化が可能である。しかしこういった物質による刺激では、放出された生理活性物質に刺激物質が必然的に混在することとなる。ナノ秒パルス高電界で好中球を活性化することが可能であるという私たちの発見は、物質による刺激とは違い、混在物を伴わないクリーンな刺激によって好中球からの生理活性物質の放出を誘導することが可能なことを示したことになる。

2. 研究の目的

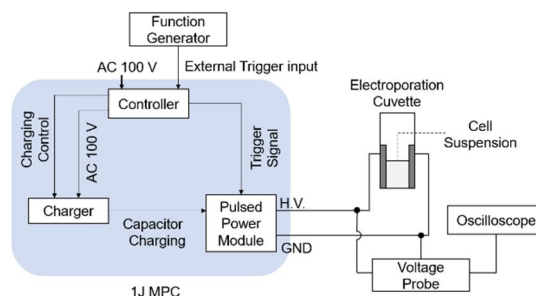
近年、献血は赤血球や血小板など成分ごとに使用されるが、白血球は輸血にも製剤にも使われていない。そこで本研究では、好中球を主とする白血球から生理活性物質をクリーンな状態で調製するための基盤を確立することを目的とした。本研究では好中球へと分化させたヒト HL-60 細胞を研究のモデル系として用い、これをナノ秒パルス高電界で刺激して NET 形成を効率よく誘発するための電気的条件を検討した。ナノ秒パルス高電界による NET 形成の誘導には細胞外カルシウムの存在が必須であることから、カルシウム濃度と電界強度の関連について解析した。さらに、生存率低下との関連や、より多くの白血球サンプルの処理を試みた。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養：ヒト HL-60 細胞は理化学研究所細胞材料開発室から入手した。HL-60 細胞は牛胎児血清と抗生物質を加えた RPMI-1640 培地中で培養した。HL-60 細胞を好中球へと分化させるためには、上記培地に DMSO を 1.3% となるように加え、そこに培地 1 ml あたり 1×10^5 個となるように細胞を懸濁し、3 日間培養した。好中球への分化は核の変形 (核の分葉化) を顕微鏡観察することにより確認した。

(2) ナノ秒パルス高電界の生成：最大出力 1 J のナノ秒パルス高電界発生装置 (MPC-3000) を使用してナノ秒パルス高電界を生成した。電圧はオシロスコープと高電圧プローブでモニターした。ナノ秒パルス高電界処理の回数と処理間隔を制御するためにファンクションジェネレーター (NF 回路ブロック設計社 WF1973) を使用した。

(3) 細胞のナノ秒パルス高電界処理：HL-60 細胞を遠心分離で回収し、 1×10^6 /ml となるように HEPES-buffered saline (HBS) に懸濁した。主な実験では HBS 中のカルシウムイオン濃度を 2 mM とした。この細胞懸濁液 0.4 ml を一対のアルミ電極を 4 mm 間隔で持つキューベット中に加え、上記(2)の装置にセットし (右図参照)、細胞をナノ秒パルス高電界処理した。



(4) ナノ秒パルス高電界のエネルギー量・処理回数の算出：1 回のナノ秒パルス高電界処理で消費されるエネルギー量 U_{pulse} は以下のように求めた。

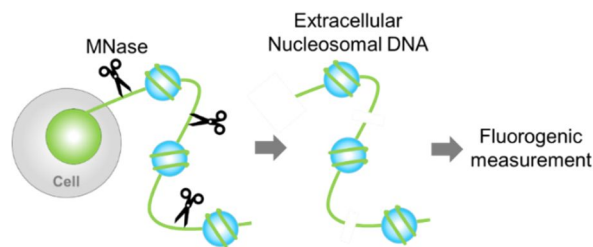
$$P(t) = V(t) \times I(t)$$
$$U_{pulse} = \int P(t) dt$$

ナノ秒パルス高電界の電界強度をを変化させた時に、消費される総エネルギー量が同等になるようなナノ秒パルス高電界の処理回数 N は以下の式で求めた。

$$U_{total} = N \times U_{pulse} \quad (U_{total}: \text{総エネルギー量})$$

(5) NET 形成の解析

NET 形成を定量的に解析するため、細胞外 DNA の蛍光測定を行った。まずナノ秒パルス高電界処理した細胞懸濁液を一定時間培養し、これを micrococcal nuclease (MNase) でごく軽く処理することで細胞から細胞外 DNA を切り離した。細胞を遠心分離で除いた後、上清中の細胞外 DNA を SYTOX Green で染色し、535 nm の蛍光強度を測定した。



これとは別に細胞懸濁液から全 DNA を抽出し、同様に蛍光染色と測定を行った。NET 形成は細胞外 DNA と全 DNA の比として求めた。同一条件で実験を 5 回繰り返し、t 検定により統計的有意差を検証した。

ナノ秒パルス高電界による NET 形成は上記の手法に加えて、細胞懸濁液を SYTOX Green 染色して蛍光顕微鏡観察を行うことでも確認した。さらに NET 形成に伴い生じるヒストンタンパク質のシトルリン化について、抗ヒストン H3 シトルリン抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。生存率測定は WST-8 試薬 (同仁化学) を用いた方法で行った。

4. 研究成果

(1) ナノ秒パルス高電界の電界強度が NET 形成に与える影響

NET 形成の誘導とナノ秒パルス高電界の電界強度の関連を解析した。まず電界強度が 2.5, 5, 10, 15, 20 kV/cm で同じエネルギー量となるような処理回数を計算し、この異なる処理回数を同一時間内で終了するための処理間隔を計算した。この計算結果に基づき、好中球へと分化した HL-60 細胞を、電界強度が異なるが総エネルギー量が同じであるナノ秒パルス高電界で処理し、NET 形成を定量解析した。その結果、10 kV/cm と 5 kV/cm の間に NET 形成誘導の閾値があることを見出した。未分化の HL-60 細胞では電界強度が高くても NET 形成は全く検出されず、ナノ秒パルス高電界による NET 形成誘導は好中球特有の反応であることを確認した。続いてナノ秒パルス高電界処理した細胞の蛍光顕微鏡解析を行い、DNA の凝集体と考えられる蛍光染色が電界強度依存性かつカルシウム依存性に細胞外に出現することを観察した。さらに DNA の細胞外放出に促進的な反応と考えられているヒストン H3 のシトルリン化の誘導について、ナノ秒パルス高電界の電界強度に同様の閾値が見られることをウェスタンブロット解析で確認した。

(2) カルシウムイオン濃度がナノ秒パルス高電界による NET 形成に与える影響

ナノ秒パルス高電界による NET 形成には、細胞外カルシウムの存在が必要である。カルシウムイオン濃度がナノ秒パルス高電界による NET 形成に与える影響を解析するため、0, 2, 5 mM 塩化カルシウムを含む HBS を用いてナノ秒パルス高電界による NET 形成を解析した。その結果、カルシウムイオン濃度を生理的濃度である 2 mM から 5 mM に挙げて NET 形成に有意な差は生じなかった。カルシウムイオンがない場合には NET 形成は起こらず、カルシウム依存性が確認された。続いて異なるカルシウム濃度で、電界強度を変化させた時の NET 形成誘導を解析した結果、生理的濃度である 2 mM から 5 mM にカルシウムイオン濃度を上げて NET 形成に必要な電界強度の閾値は変化しなかった。

ナノ秒パルス高電界は細胞表面に微細な穴 (ナノポア) を生成し、ナノポアを經由して細胞外カルシウムが細胞内へと流入することが知られている。ナノ秒パルス高電界による NET 形成はカルシウムイオンの流入が主要因なのか、それともカルシウムイオンの流入に加えて電気的な作用が必要なのかはこれまで不明であった。カルシウムイオン濃度を上げて NET 形成の程度や電界強度の閾値に有意な影響がないという今回の観察は、カルシウムイオン流入と電気的作用はそれぞれ独立した要因であることを示しており、ナノ秒パルス高電界による NET 形成メカニズムを理解する上で重要な新知見といえる。

(3) ナノ秒パルス高電界の電界強度が生存率に与える影響と NET 形成との関連

上述のように NET 形成には電界強度の閾値が存在し、エネルギー量が十分であっても低い電界強度では NET 形成誘導は著しく低かった。そこで同様のことがナノ秒パルス高電界で引き起こされる生存率低下にも成り立つかを調べた。電界強度が異なるが総エネルギー量は同じであるナノ秒パルス高電界で処理した細胞の生存率を測定したところ、NET 形成誘導には有効でない低強度のナノ秒パルス高電界であっても有意な生存率低下がみられた。この結果はナノ秒パルス高電界による NET 形成と生存率低下は異なるメカニズムによる可能性を示唆している。

(4) 大容量サンプル処理に向けた今後の展望

最後に、より多くの細胞をナノ秒パルス高電界処理するための条件を検討し、高い細胞密度でナノ秒パルス高電界処理した場合においても効率的に NET 形成が誘導されることを見出した。本研究ではナノ秒パルス高電界による NET 形成誘導には電界強度の閾値が存在し、カルシウムイオンの存在は必須であるが生理的濃度以上にしても効果の増強がないことを明らかにした。より大容量の試料のナノ秒パルス高電界処理には、電界強度・処理回数・処理間隔を容量に応じて至適化することによって効果的な NET 形成誘導が達成可能であると見込まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Koki Mochizuki, Tsubasa Koga, Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano
2. 発表標題 Activation of neutrophils by nanosecond pulsed electric fields
3. 学会等名 19th International Conference on Flow Dynamics (ICFD2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chia-Hsing Chang, Honoka Taguchi, Ken-ichi Yano, Takehiko Sato
2. 発表標題 Investigation of chemical and electrical factors induced by double plasmas on cancer cells
3. 学会等名 8th International Conference on Plasma Medicine (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 張家興、矢野憲一、奥村賢直、佐藤岳彦
2. 発表標題 プラズマを模擬した電気刺激に対する細胞応答
3. 学会等名 第38回プラズマ・核融合学会 年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------