

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500524

研究課題名(和文)低電圧パルス刺激による癌細胞アポトーシス誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanism of cancer cell apoptosis under 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在癌臨床に用いられている電気化学療法は高電圧下で行うため、全身麻酔が必要となり火傷のリスクなど患者の負担が大きい。一方、低電圧下で抗癌剤などを効率的に癌細胞に取り込むことが出来れば、患者負担の少ない新たな癌治療法として期待出来る。

そこで、低電圧刺激による癌細胞増殖への影響や細胞内シグナル伝達を調べた。結果としてカスパーゼの活性化や細胞内カルシウムの上昇が認められ、細胞増殖も抑制されたことから新たな低電圧化学療法の可能性を示すことが出来た。また、酸素マイクロバブル輸液剤についての基礎的検討を行った。今後は酸素マイクロバブル輸液剤と低電圧化学療法を組み合わせた新たな癌治療法の開発へと研究を進める。

研究成果の概要(英文)：High-intensity electrochemotherapy has been investigated as a novel anticancer therapy. However, the application of high-intensity electric fields puts great stress on patients. Therefore, cell death induced by a milder electric field would be a favorable alternative to high-voltage electrochemotherapy. In general, mild electric fields appear to induce less cell damage and greater cell survival than high-intensity fields. Research into the cellular effects of exposure to Low voltage electric pulses (LVEPs) is useful for cancer research.

We examined the role of caspases activities and intracellular Ca²⁺ in the subsequent cellular response. As a result, we showed that a mild electric field could be a favorable alternative to high-voltage electrochemotherapy. Chemotherapy is generally effective in aerobic condition. Therefore, we studied oxygen micro bubble technique to make cancer tissue aerobic condition. We propose new mild electrochemotherapy under aerobic condition.

研究分野：医工学

キーワード：低電圧パルス カスパーゼ 細胞内カルシウム アポトーシス

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、低エネルギーの低電圧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示した。また、その後の研究では、低電圧電気パルスの反復刺激によりカスパーゼ系酵素の活性化が誘導され、アポトーシスに至ることを示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、低電圧電気パルス刺激による癌細胞アポトーシス誘導における細胞応答機序を解明すること、さらに低電圧電気パルスを用いた新規がん治療法の可能性を探ることである。具体的には、低電圧電気パルス刺激に対するカスパーゼ (caspase-3, -8, -9) 活性および細胞内カルシウム変化について調べ、どのような機序でアポトーシスに至っているのかを探索した。さらに、低電圧電気パルス刺激が電気化学療法として応用できる可能性を示すとともに、酸素マイクロバブル溶液を組み合わせた新たな治療法開発への基礎的検討を行った。

3. 研究の方法

培養細胞

MDA-MB-231 (ヒト乳癌)、B16 (マウス悪性黒色腫) のふたつのがん細胞株を実験に用いた。

培養は RPMI-1640 培地 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) に 10% 加熱ウシ胎児血清

(FBS; Gibco, Grand Island, NY, USA) および抗生剤 50 U/ml ペニシリン (Gibco) と抗生剤 50 µg/ml ストレプトマイシン (Gibco) を混合したものをを用い 37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

低電圧電気パルス刺激

トリプシン処理を行った細胞を遠心して回収した後、リン酸バッファー (PBS) もしくは RPMI-1640 培地を加え 2-3×10⁶ 個/ml の濃度になるよう調整した。そのうちの 400 µl を 2 mm ギャップエレクトロポレーションチャンバー (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に採取し、ファンクションジェネレーター (FG-273; Kenwood, Tokyo, Japan) にて低電圧方形波 (7.5 V/mm, 100-500 ms, 1-100 pulses; duty ratio = 0.5) 刺激を行った。

アポトーシスアッセイ

アポトーシスの判定には蛍光試薬 (Annexin V-FITC/7-AAD kit; Beckman Coulter) を用い卓上型セルソーター (JSAN; Bay Bioscience, Kobe, Japan) にて蛍光強度を測定した。試薬のプロトコルに従い、2-3 × 10⁶ cells/ml 程度の細胞に対し 10 µl の FITC ラベル annexin V と 10 µl の 7-AAD の二重染色を行い、その蛍光強度によりアポトーシスとネクローシスの判定を行った。アポトーシスの早期には細胞膜 (脂質二重膜) 内外側のフォスファチジルセリンの分布に変化が生じ、外側に分布したフォスファチジルセリンに annexin V は結合するため、早期のアポトーシスを検知する事が出来る。一方、7-AAD は破綻した細胞膜の隙間から細胞内に侵入し核に到達して DNA と結合するため、ネクローシスの指標として用いられる。すなわち annexin V 単独陽性細胞はアポトーシス、7-AAD 単独陽性細胞はネクローシス、両蛍光色素陽性細胞はネクローシスおよび後期アポトーシスとして分類される。

カスパーゼ活性

一般的に細胞がアポトーシスに陥るとカスパーゼが活性化される。Caspase-3, -8 and -9 の活性度合いを蛍光色素試薬 caspase-3, -8 and -9 activity detection kit (APO LOGIXTM Carboxyfluorescein Caspase Detection Kit, FAM-DEVD-FMK for caspase-3 detection, FAM-LETD-FMK for caspase-8 detection, FAM-LEHD-FMK for caspase-9 detection; Cell Technology, Inc., Mountain View, CA, USA) を用いて測定した。電気刺激後 24 穴プレートに 1 × 10⁶ cells/ml の密度で総量 300 µl の 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地に播種し 37°C 5% CO₂ の環境下で 12 時間培養した。酵素活性測定 1 時間前に培地を PBS に交換し、10 µl のカスパーゼ基質 (FAM-DEVD-FMK) を加え再培養し、FITC 蛍光を測定した。

細胞内カルシウム

MDA-MB-231 細胞を RPMI 1640 培地の 35

mm ガラスボトムディッシュに播種し、細胞内カルシウム測定試薬 Fluo-4AM (Dojindo Lab, Kumamoto, Japan) を加え 37°C 5% CO₂ の環境下で 30 分培養した。培地を PBS. に交換した後、電極を挿入して低電圧電気パルス刺激を行った。その間 Fluo-4AM の蛍光量の変化を calcium imaging CCD camera system (CoolSNAP, Photometrics; Tucson, AZ) を用いて測定した。

低電圧電気パルス刺激による細胞増殖抑制

MDA-MB-231 細胞株の増殖について、電気刺激 cisplatin (10 µg/mL) とともに無し、電気刺激有り cisplatin 無し、電気刺激無し cisplatin 有り、電気刺激 cisplatin とともに有りの 4 通りの場合について調べた。5 × 10⁴ 個の細胞をそれぞれ処理し、6 穴プレート 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地に播種し 37°C 5% CO₂ の環境下で 3 日間培養した後、セルカウンター (TC10™, Bio-Rad) で細胞数を測定した。

4. 研究成果

アポトーシスと細胞死の誘導

低電圧電気パルス刺激によりアポトーシスが誘導されることを示すために、15-V (7.5 V/mm) の電気刺激を加え 24 時間後にアポトーシスの測定を行った。陽性コントロールとして cisplatin (10.0 µg/ml) を添加培養したものを用いた。

Fig. 1 は annexin V-FITC と 7-AAD の二重染色によるドットプロット図である。電気刺激後の細胞群は右方、上方へとシフトし、cisplatin でも同様の変化が認められた。従って電気刺激はネクローシス同様アポトーシスを誘導していることが示された。アポトーシスはコントロール細胞群では 2.8 %、100-ms の低電圧刺激細胞群では 3.2 %、シスプラチン処理細胞では 7.4 % に認められた。すなわち、低電圧刺激はアポトーシスを誘導することが示された。

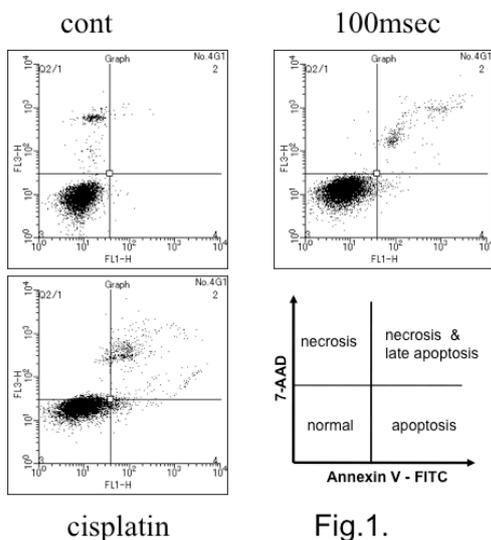


Fig.1.

カスパーゼ活性

低電圧電気パルス刺激によるアポトーシス誘導に関し、各種カスパーゼの活性化が関与している事を示すために、15-V (7.5 V/mm) の電気刺激を加え 6 時間後に caspase-8 と-9 の酵素活性を、また 12 時間後に caspase-3 の酵素活性を測定した。Caspase-8、-9 はイニシエーターカスパーゼとして知られており、それぞれ、細胞膜にある cell death receptor 活性経路とミトコンドリア活性経路の始発酵素であり、caspase-3 はカスパーゼ活性化経路の最終エフェクター酵素である。Fig. 2 は caspase-3, -8, and -9 酵素活性を示している。酵素活性はコントロール細胞群の蛍光強度 (酵素活性) を 100% として表記している。caspase-3 は 145.0 %、caspase-8 は 131.4 %、caspase-9 は 141.5% とそれぞれ酵素活性が上昇していた。低電圧電気パルス刺激により細胞膜の cell death receptor 経路とミトコンドリア経路の両方を活性化させていることが示された。

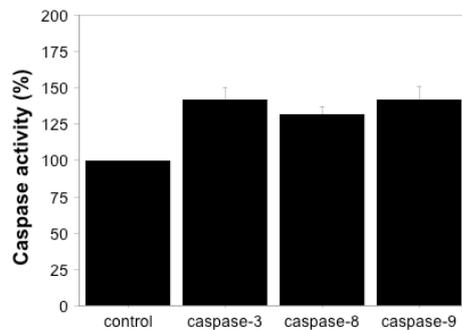


Fig.2

細胞内カルシウム濃度変化

Fig.3 は細胞内カルシウム濃度変化の度合いを示している。細胞内カルシウム濃度はコントロール細胞群の蛍光強度を 100% として表記している。細胞内カルシウム濃度は低電圧刺激により 148.7 ± 7.0% ほどの上昇を示した。一般に細胞内の主なカルシウムストックは小胞体であり、低電圧刺激が小胞体に作用し細胞内カルシウム濃度を上昇させた可能性が高い。

以上の実験結果より、低電圧刺激は細胞膜をはじめミトコンドリア、小胞体などの広く細胞内小器官全体に影響を与えている可能性が示唆された。

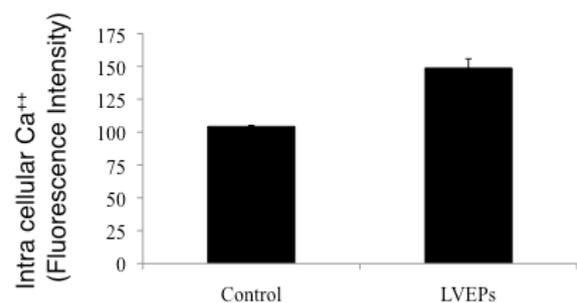


Fig.3

低電圧刺激による細胞増殖抑制（低電圧電気化学療法）

低電圧刺激により細胞周囲にある抗がん剤が細胞膜を通過して細胞内に導入出来るかどうかを調べた。このために電気刺激の有無と抗がん剤 cisplatin の有無による MDA-MB231 の増殖に対する影響を調べた。Fig.4 はそれぞれの刺激処理に対する3日目の生細胞の割合を示したものである。コントロール細胞群の生細胞数を 100%として表記している。低電圧刺激と cisplatin 両処理群では 48.3%、cisplatin 単独処理群では 62.1%、低電圧刺激単独処理群では 83%と、両方の処理をすることにより、より強く癌細胞増殖の抑制が出来る事が示された。現在電気刺激は電気化学療法としてがん患者の姑息療法として応用されている。しかしながら特殊な装置による数百ボルトの高電圧を用いるため、組織侵襲が強く火傷などの危険や全身麻酔が必要となるなど患者への負担が大きい。それ故、我々の低電圧電気化学療法は患者組織侵襲の少ない新たな治療法となる可能性を秘めている。

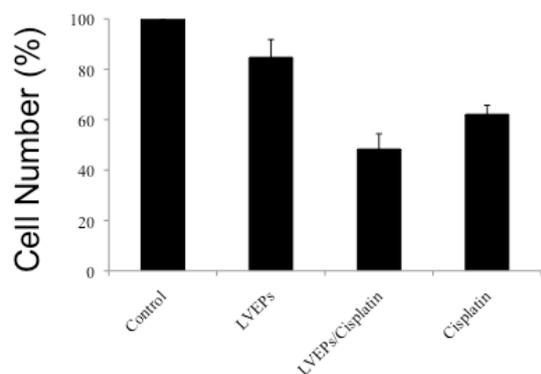


Fig.4

一方、がん組織は低酸素(嫌気)状態に有る事が知られており、化学療法や放射線療法が効きにくい原因のひとつとなっている。逆に現在癌治療の基本である抗がん剤を用いた化学療法や放射線療法は酸素が多い好気状態においてより抗腫瘍効果が増すことが過去に多く示されてきた。そこで我々は、低電圧電気化学療法をより効果的にするために、組織の酸素化を促す方法の基礎的実験に着手した。

Basic study for novel electrochemotherapy (preparing aerobic condition to tissue/cancer)

マイクロバブルは直径 50 μ m 以下の気泡で多くのユニークな特徴を持っている。液中での寿命が長く、通常の気泡（液中で上昇し気泡が大きくなり液面で破裂する）と違い圧壊現象と呼ばれる液中で収縮しやがて消滅する。この際気泡中の内圧が無限大になるため気泡中の気体が周囲液中に溶解して気体の過飽和溶液が出来上がる。また、-OH フリ

ーラジカルの産生も認められる。医療現場では超音波診断下で用いられている程度でその応用は少ない。現在のところ薬物や遺伝子の導入法としての研究が中心となっている。それ故、酸素過飽和マイクロバブル溶液が組織酸素化を促進できればがん治療において非常に有益なものとなる。

そこで我々は、マイクロバブルが酸素過飽和溶液を作る事が出来るかどうか、一般的に輸液剤に含まれる塩化ナトリウムやグルコースが溶存酸素量にどのような影響を及ぼすのかを調べた。

マイクロバブルは micro-nanobubble aerator (AS-MA II; ASUPU, Shizuoka, Japan) を用い 1 L/min 酸素付加の状態に 15 分間液体を循環させた。また、比較的大きな気泡の除去のために得られた過飽和溶液を超音波洗浄機で数秒間処理した。この処理により得られた溶液中のマイクロバブルは直径 10 μ m 以下で 1 から 6 μ m 程度に分布していた。また、顕微鏡下での観察では圧壊現象が観察された。マイクロバブルによる溶存酸素の定量のために、溶液中の酸素分圧を血液ガス分析装置で測定した。コントロールは超純水で、マクロバブル（エアーストーンで作製）とマイクロバブル処理の比較を行った (Fig. 5)。超純水中の酸素分圧は 170 mmHg で、マクロバブル処理は 776.8 mmHg、マイクロバブル処理では 1003.2 mmHg と有為の高い酸素分圧溶液が得られた。このことから、酸素マイクロバブルは酸素過飽和溶液を作る有力な方法である事が示された。

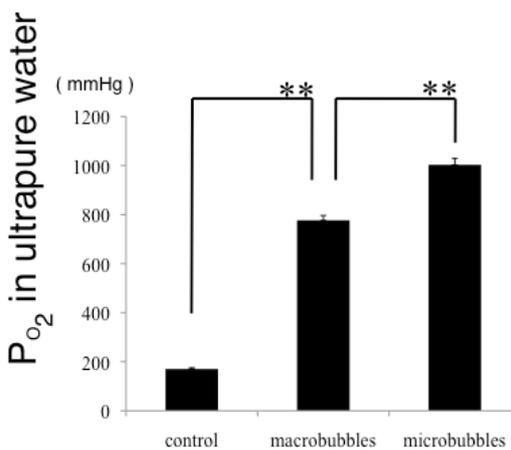


Fig.5

一般的な輸液剤に含まれる電解質である塩化ナトリウムやエネルギー源としてのグルコースが溶存酸素量にどのような影響を及ぼすのかを調べた。

Fig. 6 はマイクロバブル処理における塩化ナトリウムの溶存酸素に及ぼす影響である。コントロールの超純水では 1003.2mmHg、1% NaCl 溶液では 985.6mmHg、5% NaCl 溶液では 829.5mmHg、10% NaCl 溶液では 745.8mmHg と濃くなるにつれ溶存酸素の低下が認められた。一般的に使用頻度の高い生

理食塩水 (0.9% NaCl 溶液) は コントロール群と有為差はなかったことから、十分に活用可能であると考えられる。

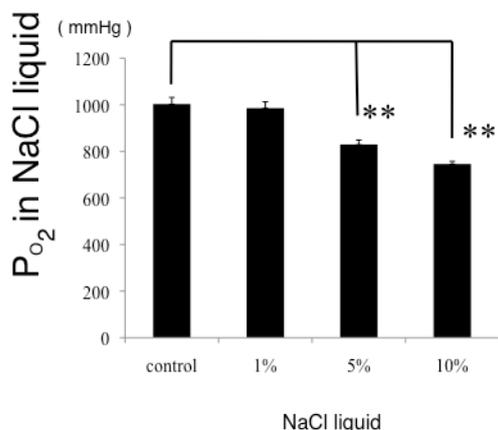


Fig.6

Fig. 7 はマイクロバブル処理におけるグルコースの溶存酸素に及ぼす影響である。コントロールの超純水では 1003.2mmHg、5%グルコース溶液では 866.3mmHg、10%グルコース溶液では 828.3mmHg、20%グルコース溶液では 763.8mmHg と NaCl 溶液同様、濃くなるにつれ溶存酸素の低下が認められた。また、5%のグルコース溶液はコントロールに比べ有為に低い溶存酸素りようであった。しかしながら、一般的に輸液剤に用いられるグルコースの濃度は 5%であるため、グルコース溶液は酸素マイクロバブル溶液の基剤としては不適であると考えられる。

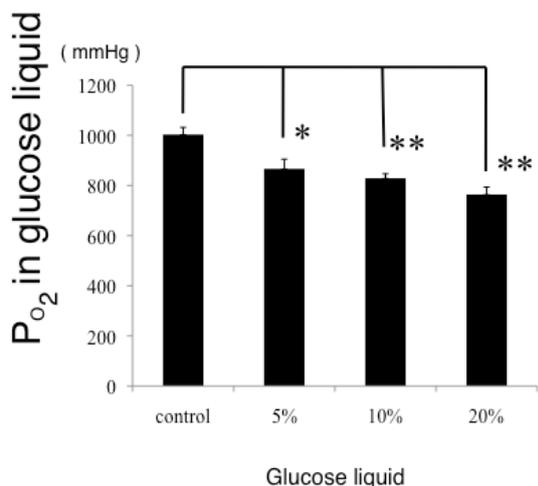


Fig.7

結果として、マイクロバブルを用いた過飽和輸液剤の作製には生理食塩水を主体とした輸液剤が候補のひとつになる可能性が示された。

以上、低電圧刺激を用いた低電圧化学療法

にマイクロバブル輸液剤を組み合わせた新たながん治療法の可能性を示す事ができた。

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)

全て査読あり (Impact Factor 付き)

① Matsuki, N., et al. : “Oxygen supersaturated fluid using fine micro/nanobubbles”

Int J Nanomedicine, 9(1):4495-4505. (2014).

② Tanaka, T., et al. : “Separation of cancer cells from a red blood cell suspension using inertial force”

Lab on a Chip, 12, 4336-4343. (2012).

③ Matsuki, N., et al. : “Blood oxygenation using microbubble suspensions”

European Biophysics J, 41, 571-578. (2012).

④ Tanaka, T., et al. : “Inertial migration of cancer cells in blood flow in microchannels”

Biomedical Microdevices, 14, 25-33. (2012).

[学会発表] (計 1 件)

① Matsuki, N., Apoptosis induction and caspases activation by low voltage electric pulses., 17thECCO-38thESMO-32thESTRO European Cancer Congress, 27.Sep. - 1.Oct.2013., Amsterdam.

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