

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350540

研究課題名(和文) ナノ秒電気パルスを利用した低侵襲な癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of low-invasive cancer therapy with nanosecond electric pulses

研究代表者

矢野 憲一 (Yano, Ken-ichi)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授

研究者番号：70311230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ナノ秒電気パルスは、ナノ秒単位の短時間に限局して強い電気的作用をもたらす新技術である。本研究ではナノ秒電気パルスの癌治療への利用のための基礎的研究を行った。まずナノ秒電気パルスがヒト固形癌由来細胞株にカルシウム依存的なネクロシスを誘発することを示した。続いて、パルス幅可変の電気パルス発生装置を組み、細胞死をもたらすパルス幅とエレクトロポレーションとの違いを示した。さらにナノ秒電気パルスが癌細胞の腫瘍形成能と遊走能を抑制することを明らかにした。以上の新知見は癌治療における新しい手段としてのナノ秒電気パルスの有効性を示しており、今後のさらなる発展的研究の基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to provide a basis for therapeutic applications of nanosecond electric pulses (nsEPs) for cancer. First, we showed calcium-dependent induction of necrotic cell death by nsEPs in cell lines derived from human solid tumors. Second, using a novel experimental setup that allows generation of EPs with variable pulse width, we found a clear difference between optimal pulse width for cell death induction and that for electroporation. Finally, we demonstrated that nsEPs suppress tumor formation and migration of several cultured tumor cell lines. These novel findings demonstrate the therapeutic potential of nsEPs and will serve as an important basis for establishing a novel cancer therapy with nsEPs.

研究分野：医工学

キーワード：ナノ秒電気パルス 癌治療 細胞死 カルシウム 腫瘍形成 遊走能

1. 研究開始当初の背景

近年の電気工学の進展により、ナノ秒単位の短時間に限局して強い電氣的な作用をもたらすことが可能となり、ナノ秒電気パルスと呼ばれている。ナノ秒電気パルスは新しいタイプの物理的刺激として生命科学分野への利用が期待されている。

これまでに私達はナノ秒電気パルスの生体作用機構について研究を行い、ナノ秒電気パルスがその作用強度に応じた特徴的な細胞応答を誘導することを明らかにしてきた。ヒト培養細胞に比較的弱いナノ秒電気パルスを作用させた場合、MAPK 経路などの細胞内シグナル伝達が活性化された。中程度の強度のナノ秒電気パルスはタンパク質合成の一過的停止を伴うストレス応答を引き起こした。作用強度をさらに上げると、ナノ秒電気パルスは細胞死を誘発した。また諸外国での研究によりナノ秒電気パルスは人体に痛みとして感知されにくいことが明らかになっていた。これらの知見のもと、私達はナノ秒電気パルスを局所に作用させることで癌治療を行うという研究の着想を得た。

癌は本邦における死因第一位である。現在、癌治療には外科手術に加え、放射線治療や抗癌剤治療が用いられている。この数十年間に癌の治療成績は顕著に上昇してはいるが、いまだ死因第一位であるということは、癌の克服にはより効果的な治療が必要であるといえる。ナノ秒電気パルスが細胞毒性を発揮するメカニズムは、放射線や多くの抗癌剤によるものとは異なることが明らかになってきている。このことはナノ秒電気パルスは従来法とは作用機序の異なる新しい癌治療法となりうる可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究はナノ秒電気パルスを局所に作用させることで低侵襲な癌治療を行うための基盤を確立することを目的とする。そのために癌細胞に効率的に細胞死を誘発するための条件検討、ナノ秒電気パルスの作用時間(パルス幅)と細胞への影響の関連性の検討、ナノ秒電気パルスが癌細胞の腫瘍形成能ならびに遊走能に与える影響の検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ナノ秒電気パルスの生成とヒト培養細胞への印加

ナノ秒電気パルスは通常電源(AC 100V)からパルスパワーモジュレーター(MPC3000、末松電子製作所)を介して生成した。ヒト培養細胞である HeLa S3、HT-1080 は各々 ATCC、JCRB 細胞バンクより購入した。HCT116、Jurkat は理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。細胞培養は定法に従い行った。ナノ秒電気パルス印加のためには、細胞を培地中に懸濁し、これをアルミ電極キューベット(電極間隔 4 mm)内に入れて、ナノ秒電気パルスを作用させた。波形や

電圧は高電圧プローブとオシロスコープを使用することでモニターした。ナノ秒電気パルス処理を行った細胞は、一定時間の培養の後、解析に供した。細胞生存率は MTT 法により測定した。細胞死の様式はアポトーシスやネクローシスのマーカーをウェスタンブロット法で解析することにより明らかにした。

(2) ナノ秒電気パルスに対する細胞応答のライブイメージング解析

細胞応答のパルス幅依存性を解析するための実験装置を新たに設置した。まず、研究協力者(熊本大学 佐久川貴志教授)のご支援のもと、パルスモジュレーターを自作した。これを直流電源(松定プレジジョン社)、パルスジェネレーター(オプトサイエンス社)と組み合わせたシステムを設置した。このシステムにより5ミリ秒から250ナノ秒の間において任意のパルス幅での電気パルス生成を実現した。続いてマイクロマニピュレーターを備えた倒立型蛍光顕微鏡のステージ上で、タングステン製の微小針を介して電気パルスを印加できるように機材を組んだ。細胞はガラスボトムディッシュ上で培養し、顕微鏡ステージ上に置いた。このディッシュ上の細胞に微小針を介して電気パルスの印加を行った。各種の蛍光指示薬の存在下で培養細胞に電気パルスを与え、細胞応答のライブイメージングを行うことで、パルス幅と細胞応答の関連性を解析した。

(3) 癌由来細胞の腫瘍形成能と遊走能に対するナノ秒電気パルスの影響の解析

ナノ秒電気パルスが細胞の腫瘍形成能に与える影響を明らかにするため、ナノ秒電気パルスを HeLa 細胞ならびに HCT116 細胞に印加した。一定数の細胞を低吸着培養容器(住友ベークライト社)で培養し、スフェロイド形成を顕微鏡観察することで、細胞の腫瘍形成能を判定した。

細胞の遊走能解析は Boyden chamber 法を用いた。HT-1080 細胞を低血清培地に懸濁し、ナノ秒電気パルスで処理した。これを、直径 8 μm の小孔を備えたトランスウェル(Corning 社)の上室に加えた。トランスウェルの下室には通常濃度の血清を含む培地を加えた。一定時間内に上室から小孔を通り抜けて下室へと移動した細胞数を顕微鏡観察にて計測した。

4. 研究成果

(1) 細胞外カルシウムがナノ秒電気パルス誘導性細胞死に与える影響の解析

ヒト培養細胞にナノ秒電気パルスを作用させ、細胞死誘導について解析を行ったところ、ナノ秒電気パルスが細胞株依存的にアポトーシスもしくはネクローシスを誘発することを明らかにした。Jurkat 細胞などではアポトーシスが誘発される一方、HeLa S3 をはじ

めとする多くの固形腫瘍由来細胞株ではネクローシスが誘導された。ネクローシス誘導には細胞外カルシウムの存在が必要であり、カルシウムイオノフォアを作用させるとナノ秒電気パルスに対する細胞の感受性が高まること、カルシウム不含培地を用いると細胞がナノ秒電気パルスに耐性になることが観察された。以上の結果は、ナノ秒電気パルスによって引き起こされるカルシウム流入が、固形腫瘍由来細胞株での細胞死誘導の重要な要因であることを示している。

(2) 電気パルスのパルス幅依存的な生体作用の解析

電気パルスは作用時間（パルス幅）に応じて細胞に異なる作用を及ぼすことが知られている。ミリ秒からマイクロ秒の電気パルスは細胞膜に穴を開ける。これはエレクトロポレーションと呼ばれ、DNA などの高分子化合物の細胞への導入に広く利用されている。一方、ナノ秒電気パルスは細胞膜上の微小孔（ナノポア）形成を介したイオン流入と細胞死を誘発する。これまでは単一機材でパルス幅をミリ秒からマイクロ秒にまたがって変えることができなかったことから、エレクトロポレーションとナノポア形成の境界や、パルス幅と生体作用の関連性を同一実験条件下で解析することは不可能であった。

そこで研究協力者（佐久川貴志教授）のご支援の元、自作のパルスモジュレーターを市販の直流電源、パルスジェネレーターと組み合わせた装置を組み、この装置により5マイクロ秒から250ナノ秒にかけて任意のパルス幅の電気パルスを発生させることを実現した。

続いてこのパルス幅の間での細胞への影響をライブイメージング法により検証した。エレクトロポレーションの有無は細胞膜非透過性色素である Propidium Iodide の細胞内取込で判定し、ナノポア形成は細胞内外のイオンバランスの乱れによって生じる膜構造の変化（ブレッピング）や、カルシウム指示薬（Fluo-8）を用いた細胞内カルシウム流入によって判定した。その結果、エレクトロポレーションは1マイクロ秒を切ると顕著に減少し、さらに500ナノ秒以下のパルス幅ではナノポア形成に基づく細胞応答のみが生じるようになった。以上の結果は、物質導入に用いる電気パルスと細胞死誘導に用いる電気パルスの至適パルス幅の違いを同一実験条件下で示したものと見える。

(3) 癌細胞の腫瘍形成能ならびに遊走能に対するナノ秒電気パルスの影響

続いて、癌細胞が持つ腫瘍形成能ならびに遊走能に対するナノ秒電気パルスの効果を解析した。ヒト癌由来細胞である HeLa ならびに HCT116 は低吸着容器で培養することで、腫瘍に類似した構造を持つ細胞塊（スフェロイド）を形成させることができる。そこでこ

れらの細胞をナノ秒電気パルス処理した上で低吸着培養器中で培養したところ、スフェロイド形成能の著しい低下が観察され、ナノ秒電気パルスによって癌細胞の腫瘍形成能が抑制されることが明らかになった。

続いて癌細胞の遊走能に対するナノ秒電気パルスの効果を解析した。HT-1080 は高い遊走能を持つヒト癌由来培養細胞として知られており、培養条件下における癌細胞の浸潤・転移のモデル研究に汎用されている。この HT-1080 細胞をナノ秒電気パルス処理し、Boyden chamber 法により遊走能を解析したところ、ナノ秒電気パルスによって遊走能が著しく低下することが判明した。

(4) まとめ

本研究ではまずナノ秒電気パルスが固形腫瘍由来細胞株に誘発する細胞死のメカニズムを解析した。調べた全ての固形腫瘍由来細胞はナノ秒電気パルスによってネクローシスを生じた。ネクローシス誘導には明瞭なカルシウム依存性が見られた。これの新知見は癌治療時におけるナノ秒電気パルスの効果増強や副作用低減をカルシウムの有無によって行うことができる可能性を示しており、他の治療法には見られないナノ秒電気パルスの特徴であるといえる。

続いてパルス幅可変の電気パルス発生装置を新たに組み、物質導入のための電気パルスと癌治療のための電気パルスでは、それらのパルス幅に明瞭な境界が存在することを示すことができた。この新知見はナノ秒電気パルスの癌治療への利用における重要な基礎的情報と考えられる。

さらに癌細胞が持つ腫瘍形成能ならびに遊走能に対してナノ秒電気パルスは抑制作用を示すことが示され、新しい癌治療法としての有望性がさらに明確化された。

今後の方針として、まずナノ秒電気パルスの作用機序をより詳細に明らかにすることで、細胞死誘導の効率化と副作用低減のための基盤情報を充実することを目指す。また実際の癌治療に使用するためのパルス発生装置や電極のさらなる至適化や改良、そして動物実験等による効果検証へと進む予定である。それによって我が国の死因第一位である癌の克服へ向けて、ナノ秒電気パルスという新しい手法を利用することで貢献することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tomofumi Nakayama, Noriko Saitoh, Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano, Mitsuyoshi Nakao, Hisato Saitoh.

Nuclear extrusion precedes discharge of genomic DNA fibers during tunicamycin-induced neutrophil extracellular trap-osis (NETosis)-like

cell death in cultured human leukemia cells. *Cell Biology International* Vol 40, pp 597-602 (2016). 査読有
DOI: 10.1002/cbin.10594

Keiko Morotomi-Yano, Hidenori Akiyama, Ken-ichi Yano. Different involvement of extracellular calcium in two modes of cell death induced by nanosecond pulsed electric fields. *Archives of Biochemistry and Biophysics* Vol 555-556, pp 47-54 (2014). 査読有
DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.020.

[学会発表](計 10 件)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Molecular mechanisms for cell death induction by nanosecond pulsed electric fields. 13rd International Conference on Flow Dynamics. 2016 年 10 月 11 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Ryo Fukumura, Takashi Sakugawa, Ken-ichi Yano, Hidenori Akiyama, Yusuke Kusaba. Development of compact pulsed power modulator for biological application. 6th Euro-Asian Pulsed Power Conference. 2016 年 9 月 19 日 Lisbon (Portugal)

矢野憲一. ヒト細胞はナノ秒パルス高電界に対してどのように応答するのか -シグナル伝達と細胞死の分子機構-. 第 8 回医用生体電磁気学シンポジウム 2016 年 1 月 25 日 首都大学東京秋葉原サテライトキャンパス(東京都・千代田区)

草場勇介、福村諒、矢野憲一、秋山秀典、佐久川貴志. 顕微鏡に用いる小型パルスパワー電源の開発. 電気・情報関係学会九州支部第 68 回連合大会. 2015 年 9 月 26 日 福岡大学(福岡県・福岡市)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Molecular mechanisms underlying cellular responses to nanosecond pulsed electric fields. 1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies. 2015 年 9 月 7 日 Portoroz (Slovenia)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Physiological significance of calcium in cellular responses to nanosecond pulsed electric fields. Annual Meeting of Bioelectromagnetics Society European Bioelectromagnetics Association. 2015 年 6 月 19 日, Pacific Grove, CA (USA)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Nanosecond pulsed electric fields act as a novel form of cellular stress on human cells: Implications for cancer therapy. 15th International Congress of Radiation Research. 2015 年 5 月 26 日 京都国際会議場(京都府・京都市)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Calcium-dependent cellular responses to nanosecond pulsed electric fields. 11th International Bioelectrics Symposium. 2014 年 10 月 16 日 Columbia, Missouri (USA)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Molecular basis of cellular responses to nanosecond pulsed electric fields -signal transduction, stress response, and cell death-. 11th International Conference on Flow Dynamics. 2014 年 10 月 10 日 仙台国際センター(宮城県・仙台市)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Molecular mechanisms underlying cellular responses to nanosecond pulsed electric fields - Signal transduction, stress response, and cell death-. International Workshop on Diagnostics and Modelling for Plasma Medicine. 2014 年 5 月 23 日 奈良県新公会堂(奈良県・奈良市)

[図書](計 2 件)

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Intracellular signaling pathways activated by nanosecond pulsed electric fields. in "*Bioelectrics*" pp 219-227. Springer International Publishing, Switzerland. (2017)
ISBN 978-4-431-56095-1
DOI: 10.1007/978-4-431-56095-1

Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano. Cellular Stress Responses to Pulsed Electric Fields. in "*Handbook of Electroporation*", in press. Springer International Publishing, Switzerland.
ISBN: 978-3-319-26779-1
DOI 10.1007/978-3-319-26779-1_17-1

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野憲一(YANO, Ken-ichi)
熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授
研究者番号: 70311230

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

秋山秀典 (AKIYAMA, Hidenori)
熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授
研究者番号：50126827

立石智 (TATEISHI, Satoshi)
熊本大学・発生医学研究所・講師
研究者番号：00227109

(4) 研究協力者

佐久川貴志 (SAKUGAWA, Takashi)
熊本大学・パルスパワー科学研究所・教授