

令和元年5月21日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01363

研究課題名(和文) ナノ秒高電圧パルスのユニークな作用に基づく新しい癌治療法の確立

研究課題名(英文) Research toward establishing a novel cancer therapy utilizing unique biological actions of nanosecond high-voltage electric pulses

研究代表者

諸富 桂子 (Morotomi, Keiko)

熊本大学・パルスパワー科学研究所・特別研究員

研究者番号：80639435

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)：ナノ秒高電圧パルスは効率的に細胞死を誘導できる新手法として注目されている。本研究ではまずナノ秒高電圧パルスの生体作用メカニズムを解析したところ、ナノ秒高電圧パルスによって細胞内タンパク質の架橋が生じ、これが細胞毒性の一因であることを明らかにした。続いてパルス幅可変の発生装置を使用して、腫瘍を模した細胞凝集体であるスフェロイドに対してナノ秒高電圧パルスを作用させたところ、スフェロイド構造の崩壊と生存率の著しい低下を観察した。以上の結果は新しい癌治療法としてのナノ秒高電圧パルスの作用機序と有用性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本をはじめとする多くの国で癌が死因第一であり、その克服のために従来法とは異なる特徴を持つ新しい治療手段が求められている。ナノ秒高電圧パルスは作用強度に応じて細胞に様々な応答反応を誘発することができる物理的刺激であり、癌治療の新手法として期待されている。本研究ではナノ秒高電圧パルスが、放射線など癌治療に利用されている物理的手法とは大きく異なる作用メカニズムを持つことを明らかにしたことに学術的な意義がある。また癌治療の新手法としての特徴と可能性を明示したことで、癌治療におけるナノ秒高電圧パルスの実用化に向けたさらなる研究の発展につながるものといえる。

研究成果の概要(英文)：Nanosecond high-voltage electric pulses (NHEPs) are recently regarded as a novel physical method for efficient induction of cell death. In this study, mechanistic investigations of the biological actions of NHEPs demonstrated that NHEPs induce gross crosslinking of intracellular proteins, which accounts for a part of the cytotoxicity of NHEPs. Next, cancer cell spheroids were used as an in vitro model for cancer therapy with NHEPs. A novel electric device was employed to generate NHEPs with various pulse widths. NSEP-exposed spheroids were promptly disintegrated and exhibited a significant reduction in viability. Taken together, this study provided mechanistic insights into NHEP actions and indicated the usefulness of NHEPs in cancer treatment.

研究分野：医工学

キーワード：癌治療 ナノ秒高電圧パルス 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 新しい癌治療法の必要性

癌は年齢と共に発生率が著しく上昇する疾患であり、日本をはじめとする平均寿命の長い多くの先進国において主要な死因となっている。その治療には外科手術、抗癌剤、放射線が使用されているが、それらに加えて新たな治療手段の確立が癌治療成績向上のために求められている。

(2) 新しい生体刺激法としてのナノ秒高電圧パルス

ナノ秒高電圧パルスは、熱の発生を伴うことなく強い電気的な作用を与えることができる手法であり、細胞に様々な応答反応を引き起こすことが可能である。私達は高強度のナノ秒高電圧パルスをヒト由来培養細胞に作用させると、細胞タイプ依存的に2種類の細胞死が誘導可能なことを示してきた。血球由来培養細胞株である HL-60 や Jurkat にナノ秒高電圧パルスを作用させた場合には速やかにアポトーシスが誘導される。一方、HeLa をはじめとする多くのヒト固形腫瘍由来細胞株においてはナノ秒高電圧パルス処理した細胞中にアポトーシスマーカーは検出されず、代わりに細胞内タンパク質のポリ ADP リボース化と細胞内 ATP レベルの急激な低下を伴う非アポトーシス性細胞死が生じる。この非アポトーシス性細胞死には細胞外カルシウムの存在が必要であり、カルシウム不含培地中においては細胞はナノ秒高電圧パルスに対して耐性を示す。このようにナノ秒高電圧パルスはカルシウム依存的に効果的に細胞死を誘導できることから、他の癌治療手段とは異なる特徴を持つ新しい癌治療法になりうると期待される。

2. 研究の目的

本研究ではナノ秒高電圧パルスを新しい癌治療法として利用するための基盤を確立することを目的とし、ナノ秒高電圧パルス処理が癌細胞中に誘発する応答反応の解析や、任意のパルス幅のナノ秒高電圧パルスを発生させることができる実験システムのセットアップなどを行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と生存率解析

ヒト子宮頸癌由来 HeLa S3 細胞は American Type Culture Collection から入手した。ヒト HL-60 細胞、オートファジー欠損マウス細胞は理研バイオリソース研究センターから購入した。細胞は 10% 牛胎児血清と抗生物質を含む MEM α 培地 (HeLa S3、マウス細胞) もしくは RPMI 培地 (HL-60) 中で、5% CO₂, 37 度で培養した。カルシウム不含培地は、Thermo Fisher 社のカルシウム不含 DMEM 培地に透析血清 (Sigma-Aldrich) を混和することで調製した。

スフェロイド形成のためには一定数の細胞を低吸着プレート (住友ベークライト) で 24 時間培養し、蛍光実体顕微鏡観察によりスフェロイド形成を確認した。

生存率解析のためにはまず培養液中に 0.5 mg/ml となるように MTT 試薬 (同仁化学) を加え、4 時間の培養後、生成したフォルマザン色素をアルカリ SDS 溶液で溶解し 570 nm の吸収を測定した。ナノ秒高電圧パルス処理なしの細胞から得られた値を生存率 100% とした。

(2) ナノ秒高電圧パルスの発生と細胞処理

HeLa S3 細胞ならびにマウス細胞のナノ秒高電圧パルス処理では、培養中の細胞を EDTA 処理ではがし、遠心分離で回収した後、上清を除き、細胞を培地に懸濁した。HL-60 細胞の場合は細胞を遠心分離で回収し、Hepes-buffered saline に懸濁した。細胞懸濁液は 4 mm 間隔で一組のアルミ電極を備えるエレクトロポレーション用のキューベット (バイオラッド) 中に加え、そこにパルス電源 MPC3000 を使って発生したナノ秒高電圧パルスを印加した。パルス波形は高電圧プローブとオシロスコープを使ってモニターした。一定時間の培養の後、生存率解析やウェスタンブロット解析を行った。

パルス幅可変のナノ秒高電圧パルス発生装置は末松電子製作所に製作を依頼した。これを使って発生したナノ秒高電圧パルスを 2 本のタングステン針を介して、グラスボトムディッシュ上の細胞へ印加した。細胞への影響は顕微鏡観察によって解析した。生存率はプロメガ社のキットを使用してスフェロイドを可溶化し、総 ATP 量を測定することで計測した。

(3) 細胞内タンパク質の架橋の解析

HeLa S3 細胞を 0.2 mM ビオチンカダベリン (AAT Bioquest) を含む培養液中で 20 分間培養した後、上述の方法でナノ秒高電圧パルス処理を行い、さらに一定時間の培養を行った。細胞内タンパク質の架橋をウェスタンブロット法で解析する場合には、定法に従って細胞抽出液の調製、SDS 電気泳動による展開、PVDF 膜への転写を行った。ビオチンカダベリンが取り込まれたタンパク質はストレプトアビジン-HRP (和光純薬) と反応させた後に、そこから生じる化学発光を検出することで解析した。顕微鏡観察で解析する場合には、細胞を固定・透過処理した後、アビジン-FITC (Sigma-Aldrich) と反応させ、蛍光顕微鏡観察を行った。

(4) RNA 干渉法 (RNA interference, RNAi) による遺伝子ノックダウン

遺伝子ノックダウンに必要な siRNA は siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp>) を利用して設計し、ニッポンジーン社に合成を依頼した。HeLa S3 細胞への siRNA の導入は Lipofectamine RNAiMax (ThermoFisher) を利用し、添付のプロトコールに従って行った。

4. 研究成果

(1) ナノ秒高電圧パルスによって誘導される細胞死のメカニズムの解析

本研究ではまずナノ秒高電圧パルスによる細胞死誘導のための処理条件の最適化を実施した。HeLa S3 細胞、HL-60 細胞、マウス細胞に対して異なるショット数のナノ秒高電圧パルスを 20 kV/cm で印加し、一定時間の培養後、生存率を測定することで生存率低下が見られるショット数を細胞タイプごとに決定した。

次に細胞死のメカニズムについて解析を行った。トランスグルタミナーゼ (transglutaminase, TG) はタンパク質の架橋反応を触媒する酵素であるが、これが細胞死の制御に関わることが知られていることから、ナノ秒高電圧パルスによる細胞死と TG の関連について検討を行った。ビオチンカダベリンは TG の基質となる化合物で、活性化した TG によってタンパク質に共有結合してビオチン化タンパク質を生成する。そこで HeLa S3 細胞にビオチンカダベリンを取り込ませた後、ナノ秒高電圧パルス処理を行ったところ、細胞内の様々なタンパク質がビオチン化されていることが判明した。同様に処理した細胞を顕微鏡観察したところ、ビオチン化タンパク質が細胞質をはじめとする細胞内の様々な部位に存在することが明らかになった。以上の結果から、ナノ秒高電圧パルス処理によって TG が活性化されて、細胞内の様々なタンパク質が架橋されると考えられた。ナノ秒高電圧パルスが効率よく細胞死を引き起こすためには細胞外カルシウムの存在が必要であることから、ナノ秒高電圧パルスによるタンパク質架橋とカルシウムの関連を調べた。その結果、この架橋反応はカルシウムイオノフォアで増強され、細胞外カルシウム非存在下では生じないことが判明した。ヒト細胞が持つ TG のうち、カルシウム依存的な酵素活性を持つトランスグルタミナーゼ 2 (TG2) を RNAi により抑制すると、ナノ秒高電圧パルスによるタンパク質架橋反応も抑制された。さらにナノ秒高電圧パルスによる生存率低下も部分的に抑制された。紫外線照射により細胞死を誘導した場合には、TG2 RNAi 処理の有無で生存率への影響は無かった。以上の結果から、ナノ秒高電圧パルスによって誘発されるタンパク質架橋はナノ秒高電圧パルスの細胞毒性の一因であると考えられた。

続いてナノ秒高電圧パルスが示す細胞毒性にオートファジーが関与するかどうかを検討した。オートファジーは細胞成分を分解して再利用するためのメカニズムであり、飢餓などのストレス状態によって活性化される一方で、細胞死の様式でもある。これまでにナノ秒高電圧パルスがオートファジーを活性化することが報告されていたが、ナノ秒高電圧パルスによるオートファジー活性化が細胞死として生じているのか、それともナノ秒高電圧パルスに対する防御的な反応であるかは不明であった。そこでオートファジーのキーとなる遺伝子を欠損したノックアウトマウス細胞と野生型細胞についてナノ秒高電圧パルスに対する感受性を解析した。その結果、オートファジー欠損によって細胞のナノ秒高電圧パルスへの感受性が高まることを見いだした。このことはオートファジーがナノ秒高電圧パルスの示す細胞毒性に対して防御的に作用することを示しており、これを抑制・活性化することでナノ秒高電圧パルスの効果を増強・低減することができる可能性が考えられた。

次に固形腫瘍由来細胞以外のタイプの細胞への作用を検討するため、ヒト白血病細胞に由来する HL-60 を用い、ナノ秒高電圧パルスの効果を検討した。低濃度のジメチルスルホキシド存在下で HL-60 を好中球へと分化させることができることから、未分化 HL-60 細胞と好中球へと分化させた HL-60 細胞の双方について解析を実施した。その結果、好中球へと分化した HL-60 細胞にナノ秒高電圧パルスを作用させると、カルシウム依存的にヒストンタンパク質にシトルリン化と呼ばれる修飾が生じ、細胞外に染色体 DNA が放出されるという興味深い現象が観察された。これらの現象は未分化細胞では観察されなかったことから、好中球細胞外トラップと呼ばれる反応であると考えられた。

以上の新知見は、これまでに癌治療に用いられてきている他の手法とは異なる作用機序をナノ秒高電圧パルスが持つことを示しており、癌の新しい治療手段としてのナノ秒高電圧パルスの特徴がさらに明確になったといえる。

(2) ナノ秒高電圧パルスによる癌治療のモデル実験

高電圧パルスの生体作用はパルス幅によって変わることが知られている。そこで特注品のパルス幅可変ナノ秒高電圧パルス発生装置を入手し、この装置を使用して 100 ナノ秒単位で、100 ナノ秒から 2 ミリ秒までの任意のパルス幅の高電圧パルスを、顕微鏡観察下の細胞に対して作用させることができる実験系を組んだ。この新しい実験系により、これまで使用していた装置よりも高い電圧を達成することができるようになった。

続いてヒト由来培養細胞を低吸着プレート中で培養することで腫瘍を模した細胞凝集体であるスフェロイドを形成させ、これを用いてナノ秒高電圧パルスによる癌治療のモデル実験を行い、ナノ秒高電圧パルスによるスフェロイドの崩壊と細胞の生存率低下を観察した。

上記の細胞死メカニズムの解析とあわせて、ナノ秒高電圧パルスが放射線などの他の手法とは異なる作用機序で効率的に細胞死を誘発することができることを示した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

- Keiko Morotomi-Yano, Shinta Saito, Noritaka Adachi, Ken-ichi Yano
Dynamic behavior of DNA Topoisomerase II beta in response to DNA double-strand breaks.
Scientific Reports Vol 8, Article number 10344 pp 1-14. (2018) 査読有
DOI: 10.1038/s41598-018-28690-6
- Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano
Calcium-dependent activation of transglutaminase 2 by nanosecond pulsed electric fields. FEBS Open Bio Vol 7, pp 934-943. (2017) 査読有 DOI: 10.1002/2211-5463.12227

[学会発表](計9件)

- Tsubasa Koga, Keiko Morotomi-Yano, Takashi Sakugawa, Ken-ichi Yano
Nanosecond pulsed electric fields induce extracellular trap formation as a neutrophil-specific immune response in human HL-60 cells
ISPlasma2018 (2018)
- 古賀飛翔、諸富桂子、佐久川貴志、矢野憲一
ナノ秒パルス高電界に対するヒト好中球の応答反応
放電/プラズマ・パルスパワー合同研究会 (2018)
- Keiko Morotomi-Yano, Shinta Saito, Noritaka Adachi, Ken-ichi Yano.
Dynamic behavior of DNA topoisomerase II beta in response to DNA double-strand breaks
第41回日本分子生物学会年会 (2018)
- Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano
Nanosecond pulsed electric fields induce activation of transglutaminase 2 that causes gross protein crosslinking in a calcium-dependent manner.
2nd World congress on electroporation and pulsed electric fields in biology, medicine and food & environmental technologies. (2017)
- Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Tsubasa Koga
Stimulation of differentiated HL-60 cells by nanosecond pulsed electric fields leads to the formation of extracellular traps, an immune response of neutrophils.
2nd World congress on electroporation and pulsed electric fields in biology, medicine and food & environmental technologies. (2017)
- 古賀飛翔、諸富桂子、佐久川貴志、矢野憲一
ナノ秒パルス高電界によるヒト免疫細胞の活性化
プラズマ・パルスパワー・放電合同研究会 (2017)
- Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano
Nanosecond pulsed electric fields induce activation of transglutaminase 2 that causes gross protein crosslinking.
14rd International Conference on Flow Dynamics (2017)
- 諸富桂子、矢野憲一
ナノ秒電気パルスはトランスグルタミナーゼ2による過剰なタンパク質架橋とネクローシスをカルシウム依存的に引き起こす
2017年度生命科学系学会合同年次大会 (2017)
- 矢野憲一、諸富桂子
ナノ秒パルス高電界によるトランスグルタミナーゼ2のカルシウム依存的な活性化
第39回日本分子生物学会年会 (2016)

[図書](計1件)

- Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano
Phosphorylation-mediated control of stress responses induced by nanosecond pulsed electric fields. in "Protein Phosphorylation" (Editor: Claude Prigent, InTech Open, Croatia) pp 97-114. (2017) DOI: 10.5772/intechopen.69782

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。