

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12863

研究課題名(和文) インスリン標的細胞に対するプラズマ効果とその治療的応用

研究課題名(英文) Effects of Atmospheric-pressure plasma irradiation on insulin-target cells

研究代表者

神崎 展 (Kanzaki, Makoto)

東北大学・医工学研究科・准教授

研究者番号：10272262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧プラズマジェットを生体に照射するとさまざまな生体応答が惹起されるが、その詳細は未解明な点が多い。本研究では、我々が発見した「プラズマ誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ 応答現象」についてより深く探索することにより、生細胞に対するプラズマ作用の分子機構を解明することを目標とした。特に、インスリン反応性を有する細胞を研究対象とした。そして3T3L1細胞が発現するTRPチャンネルがプラズマ作動性カルシウム透過性チャンネルであること、さらに、極めて短寿命のプラズマ生成活性種がTRPチャンネルの直接的な活性化に関わることを見出した。さらに、プラズマによるインスリン標的細胞の機能制御が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Recently, non-equilibrium atmospheric pressure plasma (APP) emerged to exert diverse biological responses, though the underlying mechanisms remained to be determined. This study aimed to explore precise mechanisms underlying of plasma-inducible increases in intracellular Ca^{2+} concentration in insulin-responsive cells, which has been recently discovered by our research group. Our results demonstrated that increases in intracellular Ca^{2+} are induced by continuous low-dose O_2 -/ NO supply, which is mediated through TRP channel activation. Our findings indicate the potential of APP for regulating insulin-responsive cell functions. Moreover, APP showed inhibitory actions on adipogenic differentiation of 3T3L1 cells. Together, these results demonstrate that APP-induced TRP channel activation is intimately involved in various cellular responses triggered by APP exposure.

研究分野：分子糖尿病学

キーワード：大気圧プラズマ 細胞

1. 研究開始当初の背景

プラズマは、固体、液体、気体の3状態とは異なる第4の状態であり、原子が電子とイオンに電離した物理的にも、化学的にも他の物質状態にはみられない特性を持っている。近年開発された「大気圧プラズマジェット」を生体に照射するとさまざまな生体応答が惹起されることが観察されており、さらにこのプラズマの質/量を適切に制御して生体に暴露することで血管新生、慢性外傷の創傷効果、癌細胞のアポトーシスなどを誘導できることが実験的に確認されている。しかしながら、その詳細な作用機序については不明な点が多い。このような大気圧プラズマの医療応用を鑑み、大気圧プラズマがもたらすさまざまな生命応答を探索するとともに、生体に対するそれらのプラズマ作用のメカニズムの解明は極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究課題では、我々が発見した「プラズマ誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ 応答現象」を突破口として、生細胞に対するこのプラズマ作用の分子機構を解明することを目標としている。特に、インスリン標的細胞において顕著なプラズマ応答性を示すことから、インスリン反応性糖代謝機能亢進とインスリン標的細胞の分化/増殖という応用的観点からの研究も推進する。具体的には3T3L1細胞が発現するプラズマ反応性 Ca^{2+} 透過性チャネルの同定し、このプラズマ反応性チャネル分子の生理的役割を調べることを目的とした。さらに「プラズマによるその人為制御の可能性を検証した。

3. 研究の方法

本研究課題では、3T3L1線維芽細胞が示す「プラズマ誘導性の $[Ca^{2+}]_i$ 応答現象」を探求していくことにより、生細胞に対するプラズマ作用の分子機構を解明する。具体的には、図1に示す大気圧プラズマ発生装置を用いて作

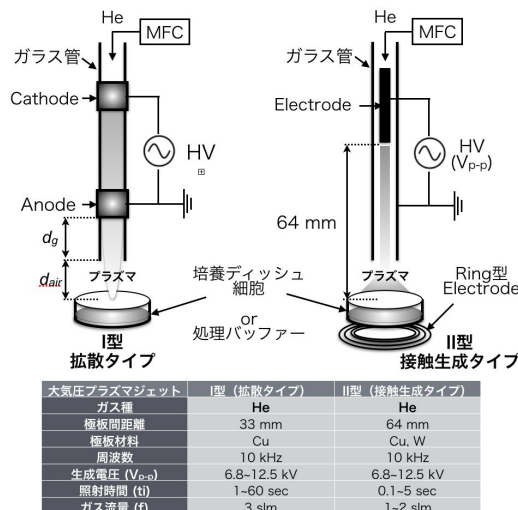


図1 プラズマ発生装置の模式図と各種パラメーター

製したプラズマ照射バッファーを培養細胞

に付与し、細胞応答を観察した。その際、2つの戦略(ロックダウン実験と外来性発現実験)によりプラズマ応答性 Ca^{2+} 透過性チャネルを同定することを試みた。さらにこの Ca^{2+} 透過性チャネルの特性について、生理学/薬理学的・分子生物学的・生化学的な検討を行う。その際、チャネル機能の調節機構およびその生理的役割の両検討においても、「インスリン反応性」という応用的観点から調べた。

4. 研究成果

大気圧プラズマ刺激により細胞質内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の上昇が認められる線維芽細胞(3T3L1細胞)のプラズマ応答性について、各種パラメーターを設定した上で間接照射法を用いた解析を行った。その結果、3T3L1線維芽細胞のプラズマ依存性 $[Ca^{2+}]_i$ 応答はルテニウムレッド(RR)感受性及びSKF96365感受性を示すことを見出し、この特性からTRPチャネルファミリーが関与することを明らかにした(図2)。

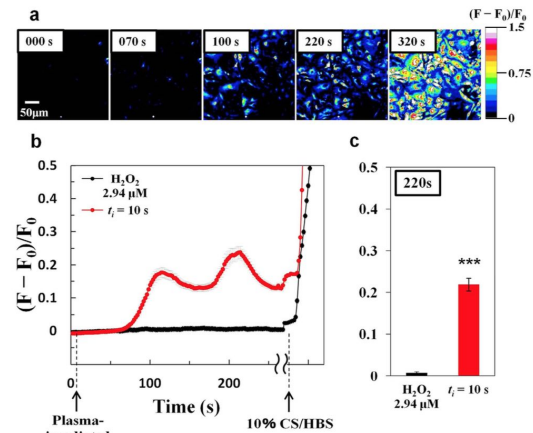


図2 プラズマ照射バッファーによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇応答

さらにプラズマ照射時間・強度・保持時間などを制御した解析より $[Ca^{2+}]_i$ 応答を惹起する物質は、プラズマ照射により溶液中に産生される各種活性種のなかでも比較的短寿命の特殊成分であり、未知のプラズマ生成短寿命活性種の存在が上記の生命応答に関与していることを発見した(Sasaki S., Kanzaki M., Kaneko T, Scientific Reports 2016)。

これらの研究成果に基づき、さらにプラズマ作用による高次の細胞応答について、細胞生物学的解析と、プラズマ応答性カルシウム透過性チャネルの分子生物学的解析を推進した。その結果、3T3L1線維芽細胞は脂肪細胞へと分化することにより、そのインスリン反応性や代謝機能が成熟する特徴があり、未分化細胞と分化した脂肪細胞におけるプラズマ依存性 $[Ca^{2+}]_i$ 応答に大きな差異があることを見出した。また、脂肪細胞の高次機能(インスリン反応性や糖取込)に対するプラズマ作用の

有無について生化学的に解析したところ、プラズマ作用は細胞の分化度により大きく異なった効果を発揮することを観察した。プラズマ作用は細胞分化によりその生物応答の多様性も変化する可能性を示す重要な発見である。

プラズマ依存性 $[Ca^{2+}]_i$ 応答にはTRPチャネルファミリーの関与が示唆されるため、各種TRPチャネル (TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPC4, etc) の発現ベクターを作製して、3T3L1線維芽細胞および筋芽細胞株であるC2C12細胞に外来性に発現させる過剰発現実験を推進した。その結果、全てのTRPチャネルファミリーにプラズマ感受性があるわけではなく、少なくともTRPV1およびTRPA1の2つのチャネル分子にはプラズマ依存性 $[Ca^{2+}]_i$ 応答を惹起する能力があることを確認した。チャネル分子の過剰発現では過剰流入する Ca^{2+} イオンにより細胞機能にダメージが生じる場合があるため、今後さらに詳細な検討を行う必要があると考えている。

プラズマ照射による細胞内シグナル伝達系への影響について生化学的な解析 (western blot 解析) を行った。その結果、大気圧プラズマの直接照射により各種のストレス応答性 MAP キナーゼ系 (Erk1/2, Erk5, p38MAPK, etc) のリン酸化亢進を確認した。

プラズマ医療がドイツをはじめとして現実のものとなってきた。しかし、生細胞に対するプラズマ作用の分子機構はほとんど未解明であり、未だ治療現象的/経験的な側面から医療展開している経緯があることは否めない。比較的高強度の大気圧プラズマ照射による殺菌効果やアポトーシス誘導現象などの理解は深まりつつあるが、我々が観察しているプラズマ応答性は生理的なレベルの繊細な生命応答現象 (細胞質内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の生理的上昇) として惹起されることが極めて興味深い新知見である。未だプラズマ応答性の生体標的分子さえも不明な現状を考慮すると、本研究の遂行により「プラズマ生命科学」の根源的な学理を構築する一つの礎となる大きな貢献となるものである。

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15件)

1. 神崎 展. 自然免疫 DNA センサー (cGAS) による細胞老化の制御. 実験医学 1月号 36(1):60-61, 2018. (査読なし)
2. Hatakeyama, H. and Kanzaki, M. Heterotypic endosomal fusion as an initial trigger for insulin-induced GLUT4 translocation in skeletal muscle. *J. Physiol.* 595(16): 5603-5621, 2017, (査読あり) doi: 10.1113/JP273985.
3. Hatakeyama, H., Nakahata, Y., Yarimizu, H. and Kanzaki, M. Live-cell single molecule labeling and analysis of myosin motors with quantum dots. *Mol. Biol. Cell*, 28(1): 173-181, 2017. (査読あり)
4. Yamamoto J, Imai J, Izumi T, Takahashi H, Kawana Y, Takahashi K, Kodama S, Kaneko K, Gao J, Uno K, Sawada S, Asano T, Kalinichenko VV, Susaki EA, Kanzaki M. Ueda HR, Ishigaki Y, Yamada T, Katagiri H. Neuronal signals regulate obesity induced β -cell proliferation by FoxM1 dependent mechanism. *Nat Commun.* 2017 Dec 5;8(1):1930. (査読あり) doi: 10.1038/s41467-017-01869-7
5. Sasaki, S. Hokari, Y. Kumada, A. Kanzaki M. Kaneko T. Direct plasma stimuli including electrostimulation and OH radical induce transient increase in intracellular Ca^{2+} and uptake of a middle-size membrane-impermeable molecule. *Plasma Processes and Polymers.* E1700077, 2017. (査読あり) DOI: 10.1002/ppap.201700077
6. Takahashi Y, Ida H, Matsumae Y, Komaki H, Zhou Y, Kumatani A, Kanzaki M. Shiku H, Matsue T. 3D electrochemical and ion current imaging using scanning electrochemical-scanning ion conductance microscopy. *Phys Chem Chem Phys.* 19(39):26728-26733. 2017 (査読あり)
7. Kaneko T., Sasaki S, Takashima K, and Kanzaki M. Gas-liquid interfacial plasmas producing reactive species for cell membrane permeabilization. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 60(1): 3-11, 2017. (査読あり)
8. 神崎 展. 蛋白質の品質管理と寿命決定-CHIP によるインスリン受容体の恒常性制御-. 実験医学 7月号 35(11):57-58, 2017. (査読なし)
9. Vázquez CL, Rodgers A, Herbst S, Coade S, Gronow A, Guzman CA, Wilson MS, Kanzaki M. Nykjaer A, Gutierrez MG. The proneurotrophin receptor sortilin is required for Mycobacterium tuberculosis control by macrophages. *Scientific Reports*, 6: 29332, 2016. (査読あり)
10. Sasaki, S. Kanzaki, M. and Kaneko T. Calcium influx through TRP channels induced by short-lived reactive species in plasma-irradiated solution. *Scientific Reports*, 6: 25728-1-11, 2016. (査読あり)
11. Sasaki, S, Honda, R. Hokari, Y. Takashima, K, Kanzaki, M. and Kaneko T. Characterization of plasma-induced cell membrane permeabilization: focus on OH radical distribution. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 49 (30): 334002-1-8, 2016 (査読あり)
12. Sasaki S, Kanzaki M., Hokari Y, Tominami

- K, Mokudai T, Kanetaka H, and Kaneko T. Roles of charged particles and reactive species on cell membrane permeabilization induced by atmospheric-pressure plasma irradiation. *Japanese Journal of Applied Physics*, 55 (7S2): 07LG04-1-5, 2016. (査読あり)
13. 畠山裕康, 神崎 展. インスリンシグナルに関わるメンブレントラフィック, DOJIN BIOSCIENCE SERIES「メンブレントラフィック」170-183, 2016. (査読なし)
 14. 金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎 展. プラズマ刺激による細胞膜輸送制御. *機械の研究* 68 (2) : 151-154, 2016. (査読なし)
 15. 佐藤岳彦, 横山茉代, 城倉浩平, 金子俊郎, 佐々木渉太, 神崎 展, 太田貴之. プラズマ刺激による細胞応答と応用. *機械の研究* 68(2): 147-157, 2016. (査読なし)
- [学会発表](計35件)
1. 鄭悦星, 佐々木渉太, 神崎 展, 金子俊郎. プラズマ分子導入の効率化に向けた短寿命活性種の測定. 第65回応用物理学会春季学術講演会. 2018. 早稲田大学 (東京都, 新宿区).
 2. 本田竜介, 佐々木渉太, 高島圭介, 神崎 展, 佐藤岳彦, 金子俊郎. 薬剤分子導入へ向けた液相中プラズマの電極構造の最適化. 第65回応用物理学会春季学術講演会. 2018. 早稲田大学 (東京都, 新宿区).
 3. T. Kaneko, S. Sasaki, Y. Hokari, Y. Zheng, K. Takashima, and M. Kanzaki. Membrane Permeabilizing Effects of Saline Treated with Different Types of Gas-Liquid Interfacial Plasmas. 34th Symposium on Plasma Processing (SPP34) / The 29th Symposium on Plasma Science for Materials (SPSM29). 2017. 北海道大学 (北海道, 札幌市)
 4. S. Sasaki, Y. Zheng, M. Kanzaki, and T. Kaneko. Activation Mechanism of Cell Membrane Transport by Short-lived Reactive Species in Plasma-irradiated Solution. The 1st International Conference on Plasma Medical Science Innovation. 2017. Nagoya University (Nagoya, Japan)
 5. T. Kaneko, M. Jinno, T. Sato, S. Sasaki, M. Kanzaki, Tachikawa, H. Kanetaka. PLASMA GENE TRANSFECTION: ENHANCEMENT OF CELL MEMBRANE PERMEABILITY WITHOUT DAMAGE USING. The 1st International Conference on Plasma Medical Science Innovation. 2017. Nagoya University (Nagoya, Japan)
 6. 金子俊郎, 佐々木渉太, 保苺雄太郎, 鄭悦星, 高島圭介, 神崎 展. 異種気液界面プラズマによる細胞膜透過性促進の比較. 第64回応用物理学会春季学術講演会. 2017. パシフィコ横浜 (神奈川県, 横浜市)
 7. R. Honda, Y. Hokari, S. Sasaki, M. Kanzaki, T. Sato, and T. Kaneko. Drug introduction by prolonged reactive species production using in-liquid plasmas. The 4th Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology. 2017. 岩手大学 (岩手県, 盛岡市)
 8. 金子俊郎, 佐々木渉太, 立川正憲, 神崎 展. プラズマ生成短寿命活性種によるTRPチャネル活性化と細胞膜輸送促進. 第13回TRPチャネル研究会. 2017. 岡崎カンファレンスセンター (愛知県, 岡崎市).
 9. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, M. Kanzaki, H. Kanetaka, M. Tachikawa. Gas-liquid interfacial plasmas for enhancing gene transfer into living cells. The 44th European Physical Society Conference on Plasma Physics. 2017. Belfast Waterfront Hall (Belfast, UK).
 10. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, M. Kanzaki. Gas-liquid interfacial plasmas for novel gene transfer systems. The International Conference on Phenomena in Ionized Gases (ICPIG) 2017. 2017. Estoril Congress Centre (Estoril, Portugal).
 11. S. Sasaki, Y. Zheng, M. Kanzaki, and T. Kaneko. Investigation of compositions in plasma-irradiated buffer evoking TRP-channel mediated calcium response. The International Conference on Phenomena in Ionized Gases (ICPIG) 2017. 2017. Estoril Congress Centre (Estoril, Portugal).
 12. 本田竜介, 保苺雄太郎, 佐々木渉太, 神崎 展, 佐藤岳彦, 金子俊郎. 液相中プラズマを用いた薬剤導入における短寿命活性種の効果. 第11回プラズマエレクトロニクスインキュベーションホール. 2017. 国立中央青少年交流の家 (静岡県, 御殿場市).
 13. 佐々木渉太, 鄭悦星, 本田竜介, 高島圭介, 神崎 展, 金子俊郎. プラズマ由来複合刺激を用いた細胞膜輸送の能動的制御. 第78回応用物理学会秋季学術講演会. 2017. 福岡国際会議場 (福岡県, 福岡市).
 14. 鄭悦星, 佐々木渉太, 神崎 展, 金子俊郎. 薬剤導入に寄与するプラズマ照射溶液中活性種の探究. 第78回応用物理学会秋季学術講演会. 2017. 福岡国際会議場 (福岡県, 福岡市).
 15. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, and M. Kanzaki. Gas-Liquid Interfacial Plasmas

- Enhancing Gene Transfer by Controlling Behavior of Reactive Species. 1st Asia-Pacific Conference on Plasma Physics. 2017. Jinniu Hotel (Chengdu, China).
16. 本田 竜介, 保苅 雄太郎, 佐々木 渉太, **神崎 展**, 佐藤 岳彦, 金子俊郎. 液相中プラズマ由来短寿命活性種の薬剤導入への効果. Plasma Conference 2017. 2017. 姫路商工会議所 (兵庫県, 姫路市)
 17. 金子俊郎, 佐々木 渉太, 立川 正憲, **神崎 展**. 気液界面プラズマ照射による細胞膜輸送促進の機序解明. Plasma Conference 2017. 2017. 姫路商工会議所 (兵庫県, 姫路市).
 18. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, and **M. Kanzaki**. Multiple Stimuli of Gas-Liquid Interfacial Plasmas Enhancing Drug Transfer into Cells. The 10th EU-Japan Joint Symposium on Plasma Processing. 2017. Bankoku Shinryokan (Okinawa, Japan).
 19. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, and **M. Kanzaki**. Gas-liquid interfacial plasmas for enhancing drug introduction into living cells. The 26th International Toki Conference. 2017. Ceratopia Toki (Toki-city, Japan).
 20. T. Kaneko, S. Sasaki, M. Kawashita, and **M. Kanzaki**. Gas-Liquid Interfacial Plasmas for Structure-Controlled Nano-Material Synthesis and Cellular-Function Control. 10th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology. 2017. Chung Yuan Christian University (Taoyuan, Taiwan).
 21. 立川正憲, 佐野大知, 佐々木渉太, **神崎 展**, 寺崎哲也, 金子俊郎. 大気圧プラズマ照射によるヒト大腸がん細胞の細胞膜輸送変動の解明. 日本薬剤学会 第31年会. 2017. 長良川国際会議場 (岐阜県, 岐阜市)
 22. M. Tachikawa, D. Sano, S. Sasaki, **M. Kanzaki**, T. Terasaki, and T. Kaneko. ATOMOSPHERIC-PRESSURE PLASMA-INDUCED CELLULAR RESPONSES IN HUMAN COLORECTAL ADENOCARCINOMA CACO-2 CELLS: A STUDY OF SWATH-TM-BASED COMPREHENSIVE QUANTITATIVE PROTEOMICS. 43rd IEEE International Conference on Plasma Science. 2016. The Banff Centre (Alberta, Canada)
 23. T. Kaneko, K. Kikuchi, S. Sasaki, and **M. Kanzaki**. PLASMA-IRRADIATED SOLUTION AS DRUG PERMEATION ENHANCER. 43rd IEEE International Conference on Plasma Science. 2016. The Banff Centre (Alberta, Canada)
 24. S. Sasaki, **M. Kanzaki** and T. Kaneko. Activation of Sensory Channels in Cell Membrane Using Plasma-Generated Reactive Species. Gordon Research Seminar on Plasma Processing Science. 2016. Proctor Academy (Andover, New Hampshire, USA).
 25. T. Kaneko, S. Sasaki, R. Honda, Y. Hokari, K. Takashima, and **M. Kanzaki**. Spatial Mapping of Gas and Aqueous Phase OH Radicals and Plasma-Induced Effect on Cell Membrane Permeabilization. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM6). 2016. Slovak University of Technology (Bratislava, Slovakia)
 26. S. Sasaki, K. Kikuchi, **M. Kanzaki** and T. Kaneko. Interaction between Plasma-activated Calcium Ion Channel and Uptake of Drug-simulated Molecule. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM6). 2016. Slovak University of Technology (Bratislava, Slovakia)
 27. Y. Hokari, S. Sasaki, **M. Kanzaki**, T. Sato, and T. Kaneko. Effects of Multi-Stimuli on Cell Membrane Permeability in Micro Solution Plasma. 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM6). 2016. Slovak University of Technology (Bratislava, Slovakia)
 28. 保苅雄太郎, 佐々木渉太, **神崎 展**, 佐藤岳彦, 金子俊郎. 細胞膜輸送に対する液相中プラズマの物理的・化学的刺激の効果. 第77回応用物理学会秋季学術講演会. 2016. 朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)
 29. 佐々木渉太, 保苅雄太郎, 高島圭介, 熊田亜紀子, **神崎 展**, 金子俊郎. 細胞膜輸送制御に向けたプラズマ誘起活性種・電位分布計測. 第77回応用物理学会秋季学術講演会. 2016. 朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)
 30. 佐々木渉太, **神崎 展**, 金子俊郎. プラズマ照射溶液中短寿命活性種に対する TRP チャネル介在細胞内カルシウム応答. 第77回応用物理学会秋季学術講演会. 2016. 朱鷺メッセ (新潟県, 新潟市)
 31. 保苅雄太郎, 佐々木渉太, **神崎 展**, 佐藤岳彦, 金子俊郎. 薬剤導入に寄与する液相中プラズマ由来因子の同定. プラズマ・核融合学会. 第33回年会. 2016. 東北大学 (宮城県, 仙台市)
 32. 鄭悦星, 佐々木渉太, **神崎 展**, 金子俊郎. 接着細胞への薬剤分子導入へ向けた液中微小プラズマの最適化. プラズマ・核融合学会. 第33回年会. 2016. 東北大学 (宮城県, 仙台市)

33. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, H. Kanetaka, M. Tachikawa, and **M. Kanzaki**. Gas-Liquid Interfacial Atmospheric Pressure Plasmas for Medical Applications. The 3rd Japan-Taiwan Workshop on Plasma Life Science and Technology. 2016. Ming Chi University of Technology (New Taipei City, Taiwan)
34. Y. Zheng, S. Sasaki, **M. Kanzaki** and T. Kaneko. Onset Time of Cell-membrane Permeabilization by Plasma-Produced Reactive Species. 第26回日本MRS年次大会. 2016. 横浜市開港記念会館 (神奈川県, 横浜市)
35. T. Kaneko, S. Sasaki, K. Takashima, T. Sato, H. Kanetaka, M. Tachikawa, and **M. Kanzaki**. Plasma Gene Transfection: Effects of Plasma Stimuli on Cell Membrane Permeabilization. 第26回日本MRS年次大会. 2016. 横浜市開港記念会館 (神奈川県, 横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

東北大学大学院医工学研究科・神崎研 HP
<http://www.ecei.tohoku.ac.jp/kanzaki/index.html>

Research Gate (Makoto Kanzaki) HP
https://www.researchgate.net/profile/Makoto_Kanzaki/

Elsevier Pure (Makoto Kanzaki) HP
<https://tohoku.pure.elsevier.com/en/persons/makoto-kanzaki>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神崎 展 (Kanzaki Makoto)

東北大学・大学院医工学研究科・准教授
研究者番号：10272262

(3) 連携研究者

金子 俊郎 (Kaneko Toshiro)

東北大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30312599