

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K12819

研究課題名（和文）抗がん剤作用への磁場影響メカニズムの解明

研究課題名（英文）Effect of magnetic field on anticancer drugs in human cancer cells

研究代表者

柿川 真紀子（Kakikawa, Makiko）

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：10359713

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト肺がん細胞株A549、ヒト子宮肉腫細胞株MES-SAおよびMES-SA由来の多剤耐性細胞株MES-SA/Dx5を用いて、細胞膜電位への磁場影響を測定した結果、磁場のみ曝露の場合はどの細胞の膜電位も2.5～3 mV増加、抗がん剤+磁場の併用の場合にはA549とMES-SA細胞では膜電位の増加が見られたのに対し、MES-SA/Dx5細胞では変化が見られなかった。さらにA549細胞から非変性的に抽出した膜タンパク質の立体構造は、磁場曝露により変化することを示す結果が得られた。これらの本研究結果より、磁場は細胞膜電位と一部の膜タンパク質の構造を変化させ、その変化は可逆的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

交流磁場を曝露することで標的部位での薬剤作用を高められれば、投薬量を減らし副作用を抑えられる可能性がある。しかし、抗がん剤の種類によって磁場の作用増強率が異なるデータが得られており、磁場による薬剤作用の増強メカニズムを明らかにする必要がある。

本研究結果により磁場は細胞膜電位や一部の細胞膜タンパク質の構造を変化させること、またその変化は可逆的で磁場曝露後には元に戻ることが示唆された。タンパク質の構造はその機能と密接にかかわるため、さらに研究を進めて磁場による細胞内への薬物輸送への影響を明らかにできれば、磁場により作用を増強しやすい薬剤の同定が可能となり、磁場の医療応用につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that 60 Hz magnetic field (MF) enhances the potency of some anticancer drugs on human cells. The mechanism of this enhancement on drug potency has not yet been clarified. We focused on the cell membrane in this study. The membrane potentials of cancer cell lines, A549, MES-SA, and MES-SA/Dx5, were increased by exposure to MF. When exposed to MF and an anticancer drug, changes in the membrane potentials were detected in A549 and MES-SA cells, but not in the multi drug-resistant cells, MES-SA/Dx5. We examined whether MF has an influence on the membrane proteins extracted from 549 cells, using a fluorescence dye. The increase in fluorescence observed following MF exposure indicated that the structure of the hydrophobic site on the membrane proteins changed. These results indicated that 60 Hz MF causes changes in the membrane potential of cancer cells and the conformation of membrane proteins extracted from cancer cells.

研究分野：生体工学

キーワード：交流磁場 薬剤作用 膜電位 膜タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究の学術的背景として、磁場と変異原性物質による併用曝露の生体影響に関する研究は、国内外のグループからいくつか報告されている。申請者が行ってきた研究はこれらの研究と磁場のみではなく併用曝露の生体影響という点では類似するが、変異原性の有害物質との併用ではなく、医療で用いられる薬剤と磁場との併用曝露による生体影響を測定しており、医療応用を目指す点で異なる。

これまでに申請者は大腸菌やヒトがん細胞において、抗生物質や抗がん剤などの薬剤作用が交流磁場曝露により増強されることを見出してきた。大腸菌ではマイトマイシン C をはじめ 7 種の抗生物質の殺菌作用が 60 Hz 磁場により増強されること、60 Hz の磁束密度が 0~50 mT 間で高いほど薬剤作用を高めることが明らかとなっていた。さらに、大腸菌では交流磁場曝露により、細胞内への薬剤の取り込み量が増加することで薬剤作用が増強することを示唆する結果を得ている。また、ヒト肺がん細胞株 A549 における抗がん剤シスプラチンの殺細胞作用は 60 Hz, 50 mT 曝露により増強され、4 時間曝露時には抗がん剤のみ (非磁場曝露) 群より生細胞数はさらに 40% 減少することが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

大腸菌やヒトがん細胞において抗がん剤などの薬剤が交流磁場曝露により増強することを見出していたことから、これが確実であれば、固形がんの場合に、標的部位に交流磁場を曝露することで薬剤作用を高められ、投薬量を減らし、副作用を抑えることが期待できる。しかし、薬剤の種類によって磁場曝露による作用増強率は異なること、作用が高まる薬剤の中でも効果的な交流磁場の曝露時間が異なるなどのデータがあり、磁場による薬剤作用の増強メカニズムは不明である。一方、申請者は大腸菌では、交流磁場曝露によって細胞内への抗生物質の取り込み量が増加することで、抗生物質作用が増強することを見出している。そこで、本研究では、ヒトがん細胞の細胞膜への交流磁場影響を評価した。

3. 研究の方法

本研究では、細胞にヒト肺がん細胞株 A549、ヒト子宮肉腫細胞株 MES-SA および MES-SA 由来の多剤耐性細胞株 MES-SA/Dx5 を用い、交流磁場の細胞膜電位への影響と、細胞膜タンパク質への影響を測定した。

(1) 細胞膜電位への交流磁場影響の測定

膜電位の測定には、膜電位感受性蛍光色素 DiBAC₄(3) を使用した。この色素は細胞膜が脱分極すると細胞内へ色素がより取り込まれるようになり、取り込まれた色素は細胞内タンパク質や細胞内膜に結合して蛍光強度が増強すること、さらに他の研究グループからは、膜電位 mV あたり約 1% の蛍光強度変化を示すことが報告されている。

交流磁場発生装置は、鉄心に巻いたコイルに電流を流し、実験試料に対して 60 Hz, 50 mT の交流磁場を曝露できるものとなっており、曝露時間の間、実験領域を 37°C に保つよう、磁場発生装置はインキュベータの中に設置した。

膜電位の交流磁場影響については、前述 3 種のヒトがん細胞株を 96 well プレート 2 枚のそれぞれ複数 well に同数ずつ分注し、37°C でインキュベートして well に細胞が接着後に膜電位感受性色素を添加し安定させた後、蛍光強度を測定する (Time 0 の蛍光値)。その後、プレートの 1 枚は磁場曝露群、もう 1 枚は非曝露の対照群プレートとして各時間反応させた後、再度プレートリーダーで測定し、蛍光強度の変化を調べた。

また各 3 種のヒトがん細胞の膜電位への抗がん剤 (シスプラチンあるいはドキソルビシン) のみ添加による影響や抗がん剤 + 交流磁場の影響も、同様に膜電位感受性色素を用いて測定した。

(2) 細胞膜タンパク質の構造への交流磁場影響の測定

膜電位感受性色素 DiBAC₄(3) は、疎水環境で蛍光強度が増す特性を持ち、タンパク質の疎水領域に結合することでも蛍光強度が増すと報告されているため、本研究では細胞膜タンパク質の立体構造への交流磁場影響についても DiBAC₄(3) を用いて測定した。

細胞にはヒト肺がん細胞 A549 を使用して、培養した細胞液から非変性的に細胞膜タンパク質を抽出し、2 枚の 96 well プレートのそれぞれ複数 well に等量ずつ分注した。その後、プレート 1 枚は磁場曝露群、もう 1 枚は非曝露群として一定時間反応させた後、DiBAC₄(3) を添加しプレートリーダーで蛍光強度の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 膜電位への交流磁場影響

ヒト肺がん細胞株 A549、ヒト子宮肉腫細胞株 MES-SA および MES-SA 由来の多剤耐性細胞

株 MES-SA/Dx5 を用いて、細胞膜電位への交流磁場影響を測定した結果をそれぞれ図 1A~C に示す (n=5~6, *P<0.05)。図 1 では磁場曝露群 (MF+)、非曝露群 (MF-) の反応前 (Time 0 min) の膜電位をそれぞれ 1.0 とし、曝露時間 1, 2, 5, 10 分後の蛍光強度の相対変化を縦軸に示す。磁場のみ曝露では、使用した 3 種の細胞株いずれにおいても膜電位 2.5~3 mV の増加が見られ、抗がん剤シスプラチンのみ、あるいはドキシソルビシンのみを反応させた場合は、3 種の細胞株いずれも膜電位に変化は見られなかった。一方、抗がん剤 + 磁場の併用では、抗がん剤にシスプラチンを用いた場合、ドキシソルビシンを用いた場合ともに A549 と MES-SA 細胞では膜電位の増加が見られたのに対し、MES-SA/Dx5 細胞では変化が見られなかった。

(2) 細胞膜タンパク質の構造への交流磁場影響

A549 細胞から非変性的に抽出した膜タンパク質は、10 分間の交流磁場曝露後にインキュベータからプレートを取り出し蛍光色素を添加、その後プレートリーダーで 1 分ごとの蛍光強度変化を測定した。その結果を図 2 に示す。図 2 横軸の時間はプレートリーダーで蛍光測定開始時を 0 分としているため、10 分間の交流磁場曝露とその後蛍光色素添加の処理時間は 0 分の前、図 2 ではマイナス時間に相当し、縦軸は非曝露群に対する磁場曝露群の蛍光強度の相対比を示す。つまり縦軸が 1.0 であれば、磁場曝露群、非曝露群の蛍光強度に差がないことを示す。

結果は蛍光測定開始時、磁場曝露群は非曝露群よりも 8% 高い蛍光強度を示し、その後時間が経つにつれて急速に蛍光強度は減少した。この結果より、磁場曝露直後の膜タンパク質の立体構造が変化し、膜タンパク質の疎水領域へ DiBAC4(3) が結合しやすくなっていること、およびその立体構造の変化は可逆的で磁場曝露から時間が経つと、非曝露群と同程度となることから元の状態に戻ることが示唆された。

これら本研究結果より、交流磁場曝露は細胞膜電位および細胞膜タンパク質の立体構造に変化を与えること、またその変化は可逆的で磁場曝露後には元に戻ることが示唆された。タンパク質の立体構造とその機能は密接に関わることから、磁場によりタンパク質構造が変化し、その機能にも影響を与えることが考えられる。細胞膜タンパク質には薬物の取込・排出に関わるトランスポーターが存在するため、交流磁場による薬物トランスポーターへの交流磁場影響を明らかにすることが今後の課題である。

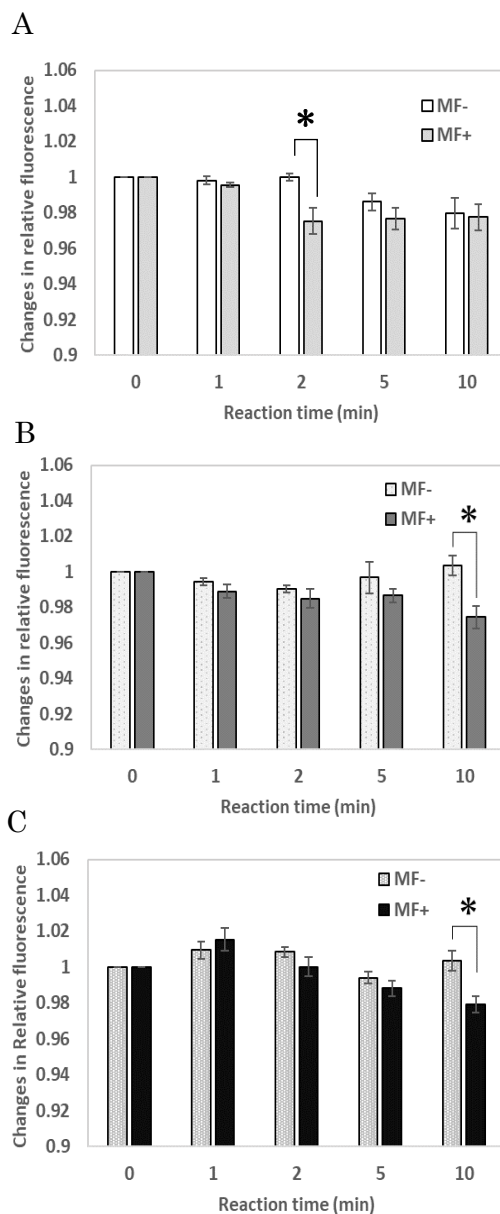


図 1. 細胞膜電位への交流磁場影響 (A) 肺がん細胞 A549, (B) 子宮肉腫細胞 MES-SA, (C) 多剤耐性細胞 MES-SA/Dx5.

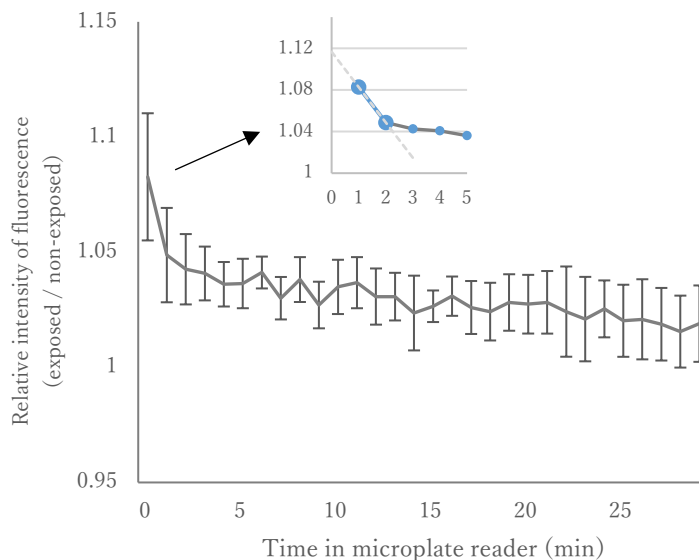


図 2. A549 細胞の膜タンパク質への交流磁場影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hayashi, S., Kakikawa, M.	4. 巻 40
2. 論文標題 Exposure to 60 Hz magnetic field can affect membrane proteins and membrane potential in human cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electromagnetic Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 459-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15368378.2021.1958340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kakikawa M, Maeda T, Yamada S.	4. 巻 3
2. 論文標題 Combined Effect of 60 Hz Magnetic Fields and Anticancer Drugs on Human Hepatoma HepG2 Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1109/JERM.2018.2880341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芝木玲生, 柿川真紀子, 山田外史
2. 発表標題 ヒト子宮肉腫細胞株の多剤耐性の有無において 60 Hz 交流磁界が抗がん剤作用へ与える影響の違い
3. 学会等名 第44回日本磁気学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川島 隆央, 柿川真紀子, 山田 外史
2. 発表標題 交流磁界が大腸菌の細胞膜に与える影響
3. 学会等名 電気学会 マグネティックス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林誠也, 柿川真紀子, 山田外史
2. 発表標題 交流磁界によるヒトがん細胞の膜電位への影響評価
3. 学会等名 第43回日本磁気学会学術講演会
4. 発表年 2019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
研究分担者	山田 外史 (Yamada Sotoshi) (80019786)	公立小松大学・生産システム科学部・教授 (23304)	

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
---------	---------