

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 17 日現在

機関番号：83903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700499

研究課題名(和文)高周波高電界パルスがん治療に関する基礎・臨床研究

研究課題名(英文)The foundation and clinical study about high frequency and pulsed high electric field cancer treatment

研究代表者

安部 恵祐(Keisuke, Abe)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・再生再建医学研究部・流動研究員

研究者番号：10535652

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、ナノ秒パルス高電界(nsPEF)によるがん細胞へのアポトーシス誘導機構が詳細に解明された。p53不活性のHeLaS3細胞では、nsPEF刺激でCa²⁺流入が起き、細胞膜周辺部にCERAMIDEが形成される。このことにより、ROSが細胞内部に産生され、小胞体ストレス性のアポトーシス経路が誘導されアポトーシスを引き起こす。さらに、p53活性型の細胞、MCF7やA549では、nsPEFによりBaxが誘導され、ミトコンドリア経路のアポトーシスが引き起こされる。結果、nsPEFはがん細胞もアポトーシスさせることができる。現在、この特性を生かし、動物実験や遺伝子導入実験を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this research, the apoptosis induction mechanism to the cancer cell by a nanosecond pulse electric field (nsPEF) was clarified in detail. In HeLaS3 cell of p53 inactivity, Ca²⁺ inflow occurs by nsPEF stimulus, and CERAMIDE is formed in a cell membrane neighboring part. And ROS is produced inside a cell, the apoptosis pathway of endoplasmic-reticulum-stress is caused, and initiate apoptosis. Furthermore, in cell and MCF7 and A549 of p53 activated form, nsPEF activates Bax and the apoptosis of a mitochondrial pathway is caused. As a result, nsPEF could induced apoptosis in all cancer cells. Now, I am developing the low-stress transgenics experiment and try the animal experiment.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用システム

キーワード：nsPEF apoptosis ceramide p53 ROS

1. 研究開始当初の背景

日本では、熊本大学を中心にナノ秒パルス高電界 (nsPEF: 直流電界) の研究が行われていた。nsPEF は細胞に印加すると細胞死を誘導することが知られていたが、詳しいメカニズムはわかっていなかった。また、細胞死を引き起こす以外の有用性もあるのではないかとということも予見されていた。また、交流高周波電界 (IBSEF) を用いて、周波数による影響を調べていた。

2. 研究の目的

nsPEF 誘導性細胞死に関するメカニズムと細胞死誘導以外の生体応用についての研究を行った。同様に周波数の影響が細胞へどのような影響を与えるかなどを検討した。加えて、他の物理作用による影響も注目した。

3. 研究の方法

nsPEF・IBSEF・他の物理作用原をがん細胞 (HeLaS3, MCF7, A549, melanoma B16) に作用させ、realtimePCR, FACS, 2D-PAGE, 顕微鏡下イメージング観察などで解析を行った。

4. 研究成果

nsPEF について、nsPEF 誘導性細胞死については、HeLaS3 細胞を中心に行った。HeLaS3 細胞において、120ns 幅パルスでは、Ca イオン流入により、細胞膜上の酵素から一過性の一次 ROS が産生し、細胞膜に Blebbing を引き起こすと同時に Ceramide を産生させる。その結果、持続性の二次 ROS 産生が誘導され、ROS 性の ER ストレスが優位に働き、ER ストレス性アポトーシスを引き起こす。同時にミトコンドリア性アポトーシスも引き起こすが、研究の結果、ER ストレス性の方が早く起きることが示唆された。UV イルミネーターを用いたアポトーシス誘導では HeLaS3 細胞は、異なるアポトーシス経路を示唆したため、物理ストレスの違いでシグナル経路は異なると示唆された。

一方、MCF7 や A549 では、p53 の働きを介し、Bax が細胞質中で増加し、ミトコンドリア経由のアポトーシスを誘導する。HeLaS3 では、Bax の核内移行が見られ、p53 不活性により ku70 が働き、Bax の機能が抑制されていると考えられた。そのため、p53 の有無もシグナル経路の選択に大きく左右されると考えられるが、どちらにせよ細胞死を誘導するので、がんタイプにおける薬との併用の際に気にすれば良いと考えている。現在、5ns 幅パルスで同条件を調べている。また、これら in vitro の結果を用いて、低刺激性遺伝子導入法の検証や動物実験に移行している。

IBSEF の研究では 300kHz-3MHz で細胞死を誘導、10MHz 近辺で細胞を活性化することが示唆された。細胞死誘導メカニズムは細胞膜へ影響し、nsPEF と同じ現象であると考えられている。10MHz では電界エネルギーが細胞膜へ印加せずに細胞質のオルガネラを刺激

し、ミトコンドリアや糖代謝を活性化させていた。同様に、他の物理原として、非平衡熱プラズマでも、細胞の活性化が見られた。

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 1 件)

P. Lu, D. Obata, T. Watanabe, K. Mitsutake, K. Abe, S. Katsuki, H. Akiyama and C. H. Zhang, Influence of Intense Pulsed UV Irradiation on the Viability and Proliferation of HeLa Cells, IEEE Transactions on Plasma Science, Vol. 40, No. 8, 2020-2027, 査読有

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 和田敏明, 安部恵祐, 安達隆太, 勝木淳, 秋山秀典: “ナノ秒パルス高電界によるヒトがん細胞への細胞死誘導とシグナル伝達解析” 第 66 回電気関係学会九州支部連合大会.(20130924).熊本大学(熊本県) 優秀論文発表賞受賞

2. 南阪拓紀, 安部恵祐, 勝木淳, 秋山秀典: “パルス高電界に対する動物細胞応答の生化学解析” 第 66 回電気関係学会九州支部連合大会.(20130924).熊本大学(熊本県)

3. 光武和典, 安部恵祐, 勝木淳, 秋山秀典: “パルス高電界の生体作用と二次的生体応答制御” パルスパワー研究会. (20130808). 公益財団法人 計算科学振興財団セミナー室(兵庫県)

4. Toshiaki Wada, Keisuke Abe, Masaya Morodomi, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama: “Apoptosis Pathway in Hela Cells Subjected to 5-ns and 120-ns Electrical Pulses” Pulsed power and plasma science 2013. (20130616). Hyatt Regency San Francisco (California USA)

5. 安部 恵祐: “ナノ秒パルス電界 (nsPEF) を用いた細胞死誘導機構の解析” 第 8 回トランスポーター研究会年会. (20130615). 熊本大学薬学部(熊本県)

6. 安部 恵祐: “ナノ秒パルス電界 (nanosecond Pulsed Electric Field: nsPEF) を用いた新規がん治療方法の開発を目指した基礎研究” 第 1 回熊本大学医工連携フォーラム. (20130529). 熊本大学医学部(熊本県)

7. 矢野美沙子, 諸富仁哉, 和田敏明, 安部恵祐, 勝木淳, 秋山秀典: “ナノ秒パルス高電界で誘導されるアポトーシスのメカニズム解析” パルスパワー放電合同研究会. (20121022). 佐賀大学(佐賀県) 電気学会優秀論文発表賞 A 賞

8. 森山新哉, 南阪拓紀, 安部恵祐, 勝木淳,

秋山秀典: “パルス高電界に対する動物細胞応答のリアルタイム観察” パルスパワー放電合同研究会. (20121022). 佐賀大学(佐賀県)

9. 諸富仁哉, 矢野美沙子, 安部恵祐, 勝木淳, 秋山秀典: “ナノ秒パルス電界を印加した子宮頸がん細胞の遺伝子発現解析” 第 65 回連合大会電気関係学会九州支部連合大会. (20120924). 長崎大学(長崎)平成 24 年度電気学会論文発表賞 B 賞

10. S. Katsuki, M. Yano, N. Tanaka, K. Mitsutake, M. Morodomi, K. Abe, T. Sakugawa, H. Akiyama: “Primary and Secondary Effects of Non-thermal and Thermal Electrical Pulses” 9th International Bioelectrics Symposium. (20120905). KKR Hotel Kumamoto(熊本県)

11. N. Tanaka, K. Sakabe, K. Abe, S. Katsuki, H. Akiyama:” Gene Expression Associated with Proliferation of HeLa S3 Cells Subjected to Intense Burst Sinusoidal Electric Fields” 9th International Bioelectrics Symposium. (20120905). KKR Hotel Kumamoto(熊本県)

12. M. Yano, M. Morodomi, T. Wada, K. Abe, S. Katsuki, H. Akiyama: “Gene Expression Analysis of Apoptosis Pathway in HeLa S3 Cells Subjected to 5 ns and 120 ns-long Electrical Pulses” 9th International Bioelectrics Symposium. (20120905). KKR Hotel Kumamoto(熊本県)

13. K. Abe, M. Yano, M. Morodomi, S. Katsuki, H. Akiyama, S. Abe: “Analysis of Ion Influx and Expression of CERAMIDE in Human Cancer Cells Subjected to Nanosecond Pulsed Electric Fields” 9th International Bioelectrics Symposium. (20120905). KKR Hotel Kumamoto(熊本県)

14. Keisuke Abe, Misako Yano, Masaya Morodomi, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama and Shin-ichi Abe: “Analysis of Ion Influx and Expression of CERAMIDE in Human cancer Cells Subjected to Nanosecond Pulsed Electric Field” Kumamoto University Global COE Program “Global Initiative Center for Pulsed Power Engineering” International COE Forum on Pulsed Power Engineering and Young Researcher Training Camp.(20120901). HOTEL GREENPIA MINAMIASO(熊本県)

15. Nobuko Tanaka, Masahiko Yano, Chiharu Matsumoto, Keisuke Abe, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama: “Enhanced Proliferation of HeLa S3 Cells Subjected to Narrowband Pulsed Electric Fields and Expression of Related Genes” 34th Annual Conference of The Bioelectromagnetics Society. (20120617). Brisbane Convention & Exhibition Centre(Brisbane, Australia)

16. Misako Yano, Masaya Morodomi, Keisuke Abe, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama: “Gene Expression Analysis of Apoptosis Pathway in HeLa S3 Cells Subjected to 5 ns and 120 ns-long Electrical Pulses” 34th Annual Conference of The Bioelectromagnetics Society. (20120617). Brisbane Convention & Exhibition Centre(Brisbane, Australia)

17. Keisuke Abe, Masahiko Yano, Kazunori Mitsutake, Misako Yano, Masaya Morodomi, Sunao Katsuki, Hidenori Akiyama: “Analysis of Ion Influx and Expression of CERAMIDE in HeLa S3 Cells Subjected to Nanosecond Pulsed Electric Fields” 34th Annual Conference of The Bioelectromagnetics Society. (20120617). Brisbane Convention & Exhibition Centre(Brisbane, Australia)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称: レーザー光を用いた浮遊物回収方法および器官および臓器創生装置

発明者: 安部 恵祐, 秋山 秀典

権利者: 熊本大学

種類: 特許

番号: 2013-020983

出願年月日: 2013 年 02 月 06 日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

熊本大学パルスパワー科学研究所

<http://www.ipps.kumamoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

安部 恵祐(独立行政法人国立長寿医療研究センター)

研究者番号: 10535652

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号：