

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350533

研究課題名(和文) ナノ秒電気パルスが癌細胞に誘起する新規ストレス反応を利用した新しい癌治療法の確立

研究課題名(英文) Study for a new cancer therapy using novel stress response evoked in tumor cells by nanosecond 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はナノ秒電気パルスを利用した新しい癌治療法の基盤確立を目的として実施された。まずナノ秒電気パルスによる細胞死誘導の条件検討や細胞死メカニズム解明を行った。その結果、ポリADPリボース化とよばれるタンパク質修飾を伴ったネクローシスが誘発され、それがカルシウムの有無によって増強・減弱できることが判明した。またタンゲステン針を用いた電極作製を行った。さらに腫瘍モデルであるスフェロイドを使用して、ナノ秒電気パルスの細胞死効果を確証した。以上の結果は、ナノ秒電気パルスを利用した新しい癌治療法の基盤確立に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed to establish a new method using nanosecond electric pulses for cancer therapy. First, electrical conditions for efficient cell death induction were optimized. Next, cell death mechanisms were analyzed, and the induction of necrotic cell death and its associating poly ADP-ribose formation on cellular proteins were demonstrated. The presence of calcium augmented the cytotoxic effects of nanosecond electric pulses, and its absence conferred resistance to nanosecond electric pulses. A new electrode using a pair of tungsten carbide needles was manufactured and was examined for cell death induction. Finally, the cytotoxic effects of nanosecond electric pulses were confirmed by using spheroids, which are considered to be a tumor model in vitro. Taken together, these results contribute the development of a novel cancer therapy using nanosecond electric pulses.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ナノ秒電気パルス 癌治療 細胞死 ネクローシス ポリADPリボース

## 1. 研究開始当初の背景

ナノ秒電気パルスは、ナノ秒単位の非常に短い時間に限局して強い電氣的な力かける技術である。近年、欧米の研究グループによってナノ秒電気パルスが癌由来培養細胞に細胞死を引き起こすことが示され、新しい癌治療法となりうるということが明らかとなった。

従来、ナノ秒電気パルスの発生には特殊な装置が必要であったため、その使用は実験室内に限られていたが、熊本大学では通常電源 (AC100V) からナノ秒電気パルスを発生させることができる小型装置の実用化に成功し、汎用化への道を開いた。

私達はこの装置を使い、ナノ秒電気パルスの生体作用機序を明らかにする取り組みを行った。ヒト癌由来細胞にナノ秒電気パルスを作用させ、生じた細胞内反応を詳細に解析した。その結果、ナノ秒電気パルスは新しいタイプのストレスとして作用することを明らかにした。ナノ秒電気パルスはストレス応答性の細胞内シグナル伝達を強く活性化し、タンパク質合成の一過的な抑制を引き起こした。続いてストレス応答性の遺伝子発現を解析したところ、ナノ秒電気パルス処理は、ER ストレスや紫外線といった既知の刺激とはパターンを示した。またナノ秒電気パルス処理した細胞中に顕著な DNA 損傷応答は見られず、DNA 切断が細胞死の主要因ではないことが明らかとなった。以上の結果はナノ秒電気パルスは新しいタイプのストレスとして作用し、癌治療に汎用される放射線等とは異なる作用機序を持つことを示している。

癌は日本とする多くの先進国で死因第一位であり、その治療成績向上が求められている。従来法とは異なる作用機序に基づく新手法を実用化することができれば、治療の選択肢が増えることで治療成績の向上につながると期待される。そこでナノ秒電気パルスが誘起する新規ストレス反応に基づく癌治療法の確立を目指すという研究の着想を得た。

## 2. 研究の目的

本研究はナノ秒電気パルスの生体作用を利用した新しい癌治療法を実用化するための基盤確立を目的とする。そのために細胞死誘導のためのナノ秒電気パルス処理条件を最適化し、その条件で誘導される細胞死のメカニズム解析を行う。次に腫瘍へのナノ秒電気パルス処理に適した針型電極を作製する。さらに腫瘍に対する治療効果を検討するためのモデル実験を実施する。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞のナノ秒電気パルス処理

本研究の多くの実験では HeLa S3 と Jurkat を使用した。一部の実験では HCT116、A549、293、HL60、といった細胞株も使用した。HeLa S3 は米国 ATCC から購入し、それ以外の細胞株は理化学研究所バイオリソースセンターから供与を受けた。細胞は定法に従

いで培養した。

ナノ秒電気パルス処理のためには、まず培養細胞を適当な密度で培地中に懸濁した。カルシウムの効果を検討する実験においては、カルシウム不含培地に透析血清 (カルシウム不含) を加えたもので細胞懸濁液を準備した。400  $\mu$ l の細胞懸濁液をアルミ電極キュベット (電極間隔 4 mm、Thermo Fisher Scientific 製) 中に入れ、ナノ秒電気パルス処理を行った。

ナノ秒電気パルスは熊本大学が開発した装置 (MPC3000) を用いて発生させ、アルミ電極キュベット中の細胞に作用させた。ナノ秒電気パルスの波形と電圧は高電圧プローブとオシロスコープの使用によりモニターした。ほとんどの実験では電界強度を 20 kV/cm に固定し、細胞に与えるナノ秒電気パルスの数を変化させることで処理強度をコントロールした。パルス間隔は全ての実験で 1 Hz とした。

### (2) 生存率解析

様々な条件でナノ秒電気パルスで処理した細胞を 96-well プレートにまき、一定時間の培養を行った。Roche Applied Science 社の MTT 試薬を加えた後にさらに一定時間の培養を行った。MTT 試薬の代謝によって生じた色素を可溶化し、吸光度測定を行った。ナノ秒電気パルス処理を行わなかった細胞との比較により生存率を求めた。

### (3) ウェスタンブロット解析

ナノ秒電気パルス処理した細胞を培地で 5 倍に希釈し、一定時間培養を行った。その後、細胞を回収し、そこに 1% SDS を含む溶液を添加して全タンパク質を抽出した。これを加熱処理と超音波処理により可溶化し、SDS 電気泳動で展開、さらに PVDF 膜に電氣的に転写した。膜に転写されたタンパク質に対して目的タンパク質に対する抗体を反応させ、HRP 化した二次抗体による反応の後、化学発光法により目的タンパク質を検出した。

### (4) 電極の製作

タングステンカーバイド製の針を電極として使用するため、銅製のアームを介してマイクロマニピュレーターに取り付けた。電極間隔はマイクロマニピュレーターによって可変であり、顕微鏡接眼レンズ中のマイクロメーターで測定することで調整した。ナノ秒電気パルスはアームから電極へと伝わるように接続した。アームに小型高電圧プローブを接続し、オシロスコープへと出力することでナノ秒電気パルスのパルス幅と電圧を測定した。

### (5) スフェロイド形成と生存率解析

一定数の HCT116 もしくは HeLa 細胞を低吸着マイクロプレート (住友ベークライト社) 中で培養することでスフェロイドを形成さ

せた。得られたスフェロイドは倒立型共焦点顕微鏡で観察した。スフェロイド中の総 ATP 量の測定にはプロメガ社のキットを利用し、スフェロイド全体を可溶化した後にルシフェラーゼ法で ATP 量を測定した。ナノ秒電気パルス処理をしなかったものとの比較から生存率を推測した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞死を引き起こすナノ秒電気パルス処理条件の検討と、細胞死の様式の解析

Jurkat と HeLa S3 細胞を用いて、ナノ秒電気パルスが生存率低下を引き起こす条件を検討した。その結果、Jurkat 細胞はナノ秒電気パルスに対して比較的高い感受性を持っており、20 kV/cm、20 ショットで生存率の有意な低下が見られた。HeLa S3 細胞で同程度の生存率低下を引き起こすには 40 ショットが必要であった。

続いて Jurkat 細胞における細胞死の様式を解析したところ、DNA ラダー形成やカスパーゼ3切断といった典型的なアポトーシス反応が検出された。一方、HeLa S3 細胞では生存率の有意な低下が生じているにもかかわらず、アポトーシス関連の細胞内反応は全く検出されず、非アポトーシス性細胞死であるネクローシスが生じていると推察された。

(2) ナノ秒電気パルス誘導性ネクローシスにおけるポリ ADP リボース形成

ネクローシス細胞においてポリ ADP リボースと呼ばれる分子によるタンパク質修飾が生じる場合があることが知られていた。そこでウェスタンブロット解析を行ったところ、ナノ秒電気パルス処理した HeLa S3 細胞中でタンパク質のポリ ADP リボース化が生じることが判明した。アポトーシスが起きている Jurkat 細胞中にこの反応は検出されなかった。

ポリ ADP リボース化を触媒する酵素である PARP の阻害剤によってこのポリ ADP リボース化は完全に阻害された。しかし PARP 阻害剤存在下でナノ秒電気パルスによる生存率低下は回復しなかったため、ポリ ADP リボース化はネクローシスの原因というよりも結果として生じていると推察された。

このポリ ADP リボース化の程度は、生存率の低下と良く一致し、ナノ秒電気パルス誘導性ネクローシスを解析する際のマーカーとなりうることがわかった。興味深いことにポリ ADP リボース化はナノ秒電気パルス処理後、4 時間という比較的遅い時間から出現し始め、12 時間から 24 時間で最大に達することが明らかとなった。

(3) ナノ秒電気パルスによって誘導される細胞死様式の細胞タイプ依存性

上記のようにナノ秒電気パルス処理により、Jurkat 細胞ではアポトーシスが、HeLa S3 細胞ではポリ ADP リボース形成を伴うネク

ローシスが生じていた。さらに他の細胞株を解析したところ、HL-60 ではアポトーシスが生じていた。一方、ヒト固形腫瘍由来細胞株である MCF7, HCT116, A549 や 293 ではアポトーシスを示すマーカーの活性化は起こらず、ネクローシスが生じていた。

(4) ナノ秒電気パルス誘導性細胞死におけるカルシウム流入の意義

ナノ秒電気パルス処理で細胞外カルシウムの流入が生じることが知られていたことから、HeLa S3 細胞でのネクローシス誘導におけるカルシウムの意義を検討した。まずカルシウムイオノフォア存在下でナノ秒電気パルス処理を行ったところ、ナノ秒電気パルス誘導性ポリ ADP リボース化と生存率低下が強まった。このことはカルシウムの導入がナノ秒電気パルスの効果を増強することを示している。

続いてカルシウム不含培地を用いて同様の実験を行ったところ、ポリ ADP リボースの生成がほぼ完全に抑制された。生存率を解析したところ、細胞がナノ秒電気パルスに耐性を示すことが判明した。そこでさらにナノ秒電気パルスの処理条件を強めたところ生存率低下が生じるようになったが、その際にネクローシスではなくアポトーシスが誘導されていることが明らかとなった。

以上の結果はカルシウムが細胞のナノ秒電気パルスへの感受性に大きな影響を与えており、さらに細胞死の様式を決定する要因でもあることを示している。

(5) ナノ秒電気パルスによって誘導される細胞内シグナル伝達へのカルシウムの影響

カルシウムがナノ秒電気パルス誘導性細胞応答にどのように影響を与えるかをさらに詳細に検討するため、既にナノ秒電気パルスによって活性化することが知られている MAPK 経路、AMPK 経路、ストレス応答経路について解析を行った。その結果、AMPK 経路はカルシウム依存性を示すが、MAPK 経路やストレス応答の活性化へは影響が小さいことが判明した。

(6) ナノ秒電気パルスの癌治療効果を検証するため、ヒト癌細胞株によるスフェロイドの作製を試みた。ヒト大腸癌由来 HCT116 ならびに子宮頸癌 HeLa を用いることで、培養条件下におけるモデル腫瘍として使用可能な一定サイズのスフェロイドを再現性良く得られるようになった。

続いてナノ秒電気パルスをスフェロイドに印加し顕微鏡観察を行ったところ、細胞死によると推察されるスフェロイド構造の崩壊が観察された。そこでスフェロイド中の総 ATP 量を測定することでスフェロイドを形成する細胞の生存率を解析したところ、ナノ秒電気パルスによる顕著な ATP 量低下が示された。以上の結果は、通常の培養条件下の

みならず、腫瘍を模した構造体であるスフェロイドにおいてもナノ秒電気パルスの細胞死誘導が発揮されることを示している。

#### (7) まとめ

ナノ秒電気パルスが細胞死を誘発することは以前から知られていたが、多くの研究者はアポトーシスのみが生じると想像していた。本研究ではアポトーシス誘導は血球系細胞に主に見られ、それ以外のほとんどの細胞株ではネクローシスが誘導されることを示した。この知見はナノ秒電気パルスによる癌治療の基盤となる細胞死メカニズム解明に関する重要な発見といえる。

ナノ秒電気パルス誘導性ネクローシスはカルシウムの有無に大きく影響されており、カルシウムイオノフォアで増強され、カルシウム不含培地により大きく減弱していた。癌治療に用いられる他の手法においてこのような顕著なカルシウム依存性は見られず、ナノ秒電気パルスの大きな特徴といえる。さらに重要なこととして、カルシウムの添加や除去によって、癌治療におけるナノ秒電気パルスの治療効果増強や副作用軽減ができる可能性が示された。

スフェロイドは培養下での腫瘍モデルとして広く使われているが、ナノ秒電気パルスの効果がスフェロイドでも発揮されることが判明した。今後はマウス皮下移植腫瘍の使用など、より体内での状況に近い実験系で研究を進めることが必要である。それによってナノ秒電気パルスのユニークな特徴を利用した新しい癌治療法に向けたさらなる進展が期待される。

#### 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3件)

Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano.

Extracellular calcium differentially affects intracellular responses to nanosecond pulsed electric fields. *Biochemistry and Biotechnology Research* Vol 3, pp 51-60 (2015). 査読有 [http://www.netjournals.org/z\\_BBR\\_15\\_024.html](http://www.netjournals.org/z_BBR_15_024.html)

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.

Keiko Morotomi-Yano, Hidenori

Akiyama, Ken-ichi Yano.

Nanosecond pulsed electric fields induce poly(ADP-ribose) formation and non-apoptotic cell death in HeLa S3 cells.

*Biochemical and Biophysical Research Communications* Vol 438, pp 557-562

(2013). 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.083.

[学会発表](計3件)

諸富桂子, 矢野憲一

ナノ秒電気パルスによって誘導されるネクローシスはカルシウム依存的な細胞内エネルギーレベルの低下とポリADPリボース形成を伴う

BMB2015 (第38回分子生物学会年会・第88回生化学会大会合同大会)

2015年12月2日

神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

諸富桂子, 矢野憲一

ナノ秒電気パルスによって誘導される細胞死の様式はカルシウム依存的に決定される

第37回日本分子生物学会年会

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2014年11月26日

諸富桂子, 矢野憲一

ナノ秒パルス高電界によって引き起こされるポリADPリボース形成を伴う非アポトーシス性細胞死誘導の分子機構

第36回日本分子生物学会年会

神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

2013年12月5日

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

諸富桂子 (MOROTOMI-YANO, 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

(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

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