

# 人体に痛みとして感知されない超短パルス高電界を利用した無痛癌治療法の開発

所属：熊本大学 パルスパワー科学研究所

助成対象者：矢野憲一

## 概要

ナノ秒オーダーの短時間に限局して強い電気的作用をもたらす技術である超短パルス高電界は、人体に痛みとして感知されにくい一方で、細胞レベルでは効率的に細胞死を誘発するという特徴を持つ。本研究は超短パルス高電界を用いた新しい癌治療法の基盤確立を目的として実施された。従来、パルス高電界はエレクトロポレーションによる物質導入に汎用されてきたが、細胞死誘導のためのパルス高電界は物質導入に用いられるものとパルス幅に明確な違いがあることを示した。続いて超短パルス高電界がトランスグルタミナーゼ 2 と呼ばれる細胞内酵素を活性化して過剰なタンパク質架橋を誘発すること、癌細胞の腫瘍形成能と遊走能を抑制することを示した。さらに非腫瘍細胞を用いた解析により、超短パルス高電界の医療利用が癌治療にのみならず広い応用の可能性があることを示した。

## abstract

Ultrashort pulsed electric fields in the range of nanoseconds are recently considered to be a novel therapeutic method that can induce cell death with little physical pain. This study was aimed to establish a basis for a novel cancer therapy using ultrashort pulsed electric fields. First, we demonstrated that pulse width suitable for cell death induction is different from that for electroporation. Next, we showed that ultrashort pulsed electric fields induce gross protein crosslinking mediated by transglutaminase 2 and inhibit tumorigenesis and tumor cell migration. Furthermore, we demonstrated possible applications of ultrashort pulsed electric fields in a wide range of medicine in addition to cancer therapy.

## 研究内容

### [研究の背景と目的]

パルス高電界は生命科学の幅広い分野で利用されており、特にミリ秒からマイクロ秒のパルス幅の高電界はエレクトロポレーションと呼ばれる細胞膜の穿孔を引き起こすことから、細胞への DNA 導入に汎用されている。近年、ナノ秒オーダーのきわめて短い時間に局限してパルス高電界を作用させることが可能となっており、針型の電極を使用することで人体の局所に限定して作用させることができるために安全性が高く、その極端に短い作用時間のため人体に痛みとして感知されにくいという特徴を持つ。一方、細胞レベルで見ると、ナノ秒オーダーの超短パルス高電界は新しいタイプの生体ストレスとして作用し [1]、カルシウム依存的に癌細胞に細胞死を効率よく引き起こすことが明らかとなっている [2, 3]。本研究はこういったナノ秒オーダーの超短パルス高電界のユニークな特徴を利用した新しい癌治療法のための基盤を確立することを目的として実施された。

### [結果]

#### (1) パルス幅がパルス高電界の生体作用に与える影響

パルス高電界はパルス幅（作用時間）に応じて異なる生体作用を示す。例えば細胞膜の穿孔現象であるエレクトロポレーションにはミリ秒からマイクロ秒のパルス高電界の使用が有効とされている。一方、ナノ秒オーダーの超短パルス高電界はナノポアと呼ばれる微小な穿孔を細胞膜に生成し、イオン流入と細胞死を引き起こすことが知られている。しかしながら、これまではマイクロ秒パルス高電界によるエレクトロポレーションとナノ秒パルス高電界によるナノポア形成を同一環境下で実施し、その効果を比較することはできなかった。そこで私たちは新規パルス高電界発生装置を使用して 2 マイクロ秒から 100 ナノ秒にかけて 100 ナノ秒毎の任意のパルス幅の超短パルス高電界を発生させる実験装置を組み、これを用いてパルス幅と細胞への作用の関連性を解析した。ガラスボトムディッシュに培養した細胞を倒立型蛍光顕微鏡のステージ上に置き、顕微鏡観察下において微小針を介して超短パルス高電界を印加した。細胞膜非透過性色素である Propidium Iodide (PI) の細胞内取込が見られた場合にエレクトロポレーションが生じたと判定した。PI 取込が起これずに細胞内カルシウム流入が見られた場合にナノポア形成が起こったと判定した。その結果、効率的なエレクトロポレーションにはマイクロ秒オーダーのパルス高電界が必要であ

り、500 ナノ秒以下のパルス幅ではナノポア形成のみが生じるようになった。以上の結果は、エレクトロポレーションによる物質導入に用いるパルス高電界と、細胞死誘導に有効なパルス高電界では、パルス幅に大きな違いがあることを示している。

## (2) 超短パルス高電界の細胞死誘導機序の解析

これまでに私たちは超短パルス高電界が多くの固形腫瘍由来細胞株にネクローシスを誘発することを示してきた [2, 3]。また細胞膜上のナノポアを介したカルシウム流入が超短パルス高電界の腫瘍壊死効果に重要であることを明らかにしてきた [3]。そこでカルシウム流入と細胞内応答反応の関連を解析したところ、トランスグルタミナーゼ 2 (TG2) と呼ばれる酵素が超短パルス高電界によってカルシウム依存的に強く活性化されることを見出した。TG2 はタンパク質の架橋を触媒する酵素であり、その酵素活性にはカルシウムを必要とする。ウェスタンブロット法ならびに免疫染色法による解析の結果、超短パルス高電界処理によって細胞内の様々なタンパク質がカルシウム依存的に強く架橋されることが判明した。RNA 干渉法 (RNAi) によって TG2 を抑制したところ、架橋反応も抑制されたことから、超短パルス高電界処理が TG2 を活性化し、細胞内タンパク質の架橋が生じたと考えられた (図 1)。また TG2 RNAi によって超短パルス高電界の腫瘍壊死作用が有意に減弱したことから、TG2 活性化による過剰なタンパク質架橋がナノ秒パルス高電界の腫瘍壊死作用の一因であることが明らかとなった。以上の新知見は、癌治療に汎用される放射線や抗癌剤などとは異なる作用機序を超短パルス高電界が持つことを示している。

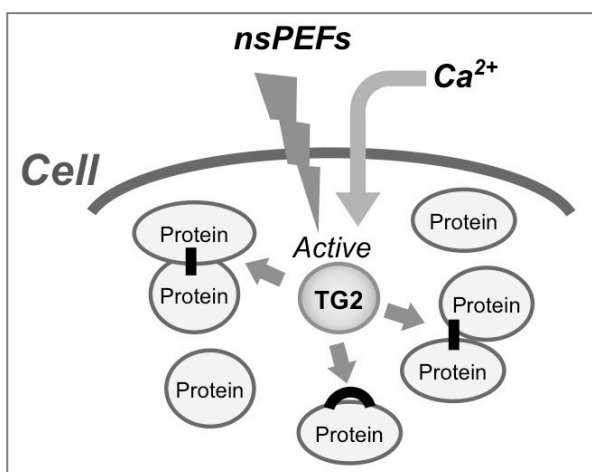


図 1. 超短パルス高電界による TG2 活性化モデル. ナノ秒オーダーの超短パルス高電界 (nsPEF) は細胞外からのカルシウムイオン流入を引き起こすと同時に、細胞内部に強い電氣的な作用をもたらす。その結果、タンパク質架橋酵素である TG2 が活性化され、細胞内の様々なタンパク質が架橋される。

## (3) 癌細胞の腫瘍形成能ならびに遊走能に対する超短パルス高電界の影響

続いて超短パルス高電界が癌細胞の腫瘍形成能に与える影響を解析した。まずヒト癌由来

細胞である HeLa ならびに HCT116 を低吸着培養容器（住友ベークライト社）で培養することで、腫瘍に類似した構造を持つ細胞塊（スフェロイド）を形成させることができることを確認した。次にこれらの細胞を超短パルス高電界処理した上で低吸着培養器中で培養したところ、スフェロイド形成の著しい低下が観察され、超短パルス高電界によって癌細胞の腫瘍形成能が抑制されることが判明した。続いて癌細胞の遊走能に対する超短パルス高電界の影響を解析した。HT-1080 は高い遊走能を持つヒト癌由来細胞であり、癌の浸潤・転移のモデル研究に汎用されている。この HT-1080 細胞を超短パルス高電界処理し、Boyden chamber 法により遊走能を解析したところ、超短パルス高電界によって HT-1080 細胞の遊走が著しく低下することが判明した。以上の結果は、超短パルス高電界が腫瘍壊死作用に加えて、癌細胞の腫瘍形成や遊走に抑制的な作用を持つことを示している。

#### (4) 非腫瘍細胞に対する超短パルス高電界の作用

超短パルス高電界の医療応用への可能性をさらに深めるため、非固形腫瘍細胞への影響を検討した。ヒト HL-60 細胞は DMSO 存在下で好中球に分化させることが可能である。そこで未分化 HL-60 と分化 HL-60 細胞を準備し、これらに超短パルス高電界処理を行った。その結果、超短パルス高電界は好中球の免疫反応である好中球細胞外トラップ（Neutrophil extracellular trap, NET）を誘導することができることが明らかとなった。NET は超短パルス高電界処理した分化細胞でのみ誘導可能で、未分化細胞では NET 誘導は生じなかった。以上の結果は超短パルス高電界が好中球に対する刺激として作用していることを示している。

#### [まとめと今後の展望]

本研究ではまずエレクトロポレーションを介した物質導入に用いられるパルス高電界と、細胞死誘導のためのパルス高電界では、最適なパルス幅に明確な違いあることを示した。続いて超短パルス高電界が TG2 を介した細胞内タンパク質の過剰な架橋反応を誘発することを明らかにし、既存の癌治療法とは異なる新しい作用機序によって細胞毒性をもたらすことを明らかにした。また腫瘍壊死作用のみならず、腫瘍形成や遊走に対する抑制作用も持つことが判明した。以上の結果は、従来法とは異なる機序と特徴を持つ新しい癌治療法としての超短パルス高電界の可能性を強く示している。さらに超短パルス高電界が好中球への刺激として作用するという新知見は、超短パルス高電界の医療利用が癌治療のみに留まるものではなく、さらに広い可能性があることを示している。

今後の展望としては、超短パルス高電界の作用機序をより詳細に明らかにすることで治療の効率化と副作用低減のための基盤情報を充実させることが求められる。また実際の癌治療に至適化した超短パルス高電界発生装置や電極の開発、動物実験等による効果検証が必要と考えられる。癌は本邦をはじめとする多くの先進国における死因第一位であり、その克服には新しい作用機序を持つ新治療が必要である。超短パルス高電界は従来法にない作用機序と治療法としての特徴を持つことから、本研究をさらに発展させることで新しい癌治療法を確立し、癌克服に貢献することが期待される。

#### 引用文献

- [1] Morotomi-Yano K, et al. Nanosecond pulsed electric fields act as a novel cellular stress that induces translational suppression accompanied by eIF2alpha phosphorylation and 4E-BP1 dephosphorylation. *Exp. Cell Res.* 318:1733-1744.
- [2] Morotomi-Yano K, et al. (2013) Nanosecond pulsed electric fields induce poly(ADP-ribose) formation and non-apoptotic cell death in HeLa S3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 438:557-562.
- [3] Morotomi-Yano K, Akiyama H, Yano K (2014) Different involvement of extracellular calcium in two modes of cell death induced by nanosecond pulsed electric fields. *Arch. Biochem. Biophys.* 555:47-54.

#### 本助成に関わる成果物

##### [論文発表]

1. Keiko Morotomi-Yano, Ken-ichi Yano (2017) Calcium-dependent activation of transglutaminase 2 by nanosecond pulsed electric fields. *FEBS Open Bio* Vol 7, pp 934-943.
2. Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano (2017) Phosphorylation-mediated control of stress responses induced by nanosecond pulsed electric fields. in *"Protein Phosphorylation"* (InTech Open, Croatia) pp 97 - 114. DOI: 10.5772/intechopen.69782

##### [口頭発表]

1. Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano (2017) 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 (Norfolk, VA, USA).

2. Ken-ichi Yano and Keiko Morotomi-Yano (2017) Nanosecond Pulsed Electric Fields Induce Activation of Transglutaminase 2 that Causes Gross Protein Crosslinking 14rd International Conference on Flow Dynamics (Sendai, Japan).
3. 古賀飛翔、諸富桂子、佐久川貴志、矢野憲一 (2017) 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、熊本

[ポスター発表]

1. Ken-ichi Yano, Keiko Morotomi-Yano, Tsubasa Koga (2017) 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 (Norfolk, VA, USA).