

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20137

研究課題名(和文)大気圧プラズマによるEMT制御と腹膜播種抑制の新展開～難治性卵巣癌の予後向上へ～

研究課題名(英文)The novel cancer treatment of non-thermal plasma inhibits EMT and peritoneal metastasis of ovarian cancer

研究代表者

内海 史(UTSUMI, Fumi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10749261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：大気圧プラズマ間接照射の卵巣癌への抗腫瘍効果、腹膜播種制御についての効果、メカニズムについての研究を行った。化学療法抵抗性卵巣癌の抑制効果にも焦点をあてた。大気圧プラズマ照射を行った活性化溶液(PAM)を、卵巣癌細胞株を使ったマウスの腹膜播種モデルに腹腔内投与すると腫瘍の播種が抑制され生存期間の延長がみられた。さらにPAMが特に腸間膜への播種を減少させる可能性が示唆された。またこれは主にPAMが卵巣癌細胞の上皮間葉転換を抑制し腫瘍浸潤・転移能を阻害するためと考えられこれにはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の抑制、JNK1/2やp38のリン酸化の制御が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research we examined the effect and mechanisms of cytotoxicity of plasma-activated medium (PAM) using ovarian cancer cells. Especially we focused on the chemo-resistant ovarian cancer cells. PAM treatment prolongs longevity in an ovarian cancer mouse model. Intraperitoneal PAM injection was applied in a mouse model of intraperitoneally injected with ES2 cells. The survival rates were better in the PAM treatment group than in the control group. Furthermore, using the IVIS imaging system, it was suggested that peritoneal metastatic was significantly inhibited by PAM, although the omentum showed no obvious recovery. PAM inhibited invasion and migration by repressing MMP-9 expression. In this research, PAM exerted the effect by inhibiting the phosphorylation of INK1/2 and p38.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：大気圧プラズマ 卵巣癌 腹膜播種 化学療法耐性 EMT

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科癌のなかで、毎年世界で238,700人が罹患し、151,900人が死亡するもっとも悪性度の高い癌と考えられている。卵巣癌は、早期より急速に腹膜に広がるため、約75%の患者が診断時より進行癌の状態を呈し、現在の治療では予後不良の経過をたどる。5年生存率は50%以下である、現在の進行卵巣癌の治療は腫瘍減量手術に引き続く化学療法の経静脈的、経腹膜的投与である。しかし、この方法は不十分でありしばしば再発する。

非平衡大気圧プラズマを利用したプラズマ医療は近年、滅菌、血液凝固、がん治療などさまざまな分野に医療応用されている。また、直接プラズマを腫瘍に照射する直接プラズマの腫瘍抑制効果はメラノーマ、グリオブラストーマ、卵巣癌において報告されてきている。加えて、プラズマを照射し溶液を活性化して利用する間接プラズマを用いた治療を多数の癌腫で抗腫瘍効果を発揮することが明らかになってきている。しかし、プラズマ治療が癌の転移を抑制するという報告は少ない。PAMの卵巣癌転移への効果が認められればその他の癌種の腹膜播種への効果も期待できる。

これまでのわれわれの研究で、PAMは選択的細胞障害性を癌細胞に対して発揮する一方、正常細胞には影響を与えていない。さらに、PAMは化学療法耐性株に対しても腫瘍抑制効果を示している。マウスの皮下腫瘍モデルにおいても証明されている。

しかしながら、卵巣癌の腹膜への微小播種の臨床的特徴を考慮すると、このモデルは必ずしも病態を模しているとは言えず、更なる検討が必要である。さらに、これまでのわれわれの研究で、PAMはより上皮間葉転換を来した悪性度の高い卵巣癌細胞により効果がある可能性を見出した。多くの癌腫において癌細胞が転移・浸潤を生じる過程から線維芽細胞様形態へ変化する上皮・間葉形態転換現象 (EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition) の関与が考えられている。慢性的な抗腫瘍薬剤への曝露によって腫瘍細胞の大部分はアポトーシスに向かうものの、EMT化し、より悪性化・耐性能を獲得するものが残される。その結果転移能が亢進し腹膜播種や転移が誘導される可能性がある。この再発再燃卵巣癌の治療成績向上に寄与する新たな治療法として我々は高気圧プラズマによる癌治療の開発を目指してきた。

2. 研究の目的

プラズマがアポトーシスを誘導することは種々の癌腫で証明されてきたが、これに加えて癌細胞の転移浸潤能にも影響を与えていることが乳癌、大腸癌において示されてきている。EMTは癌の悪性化に密接に関与しているためこれを抑制すること、また抑制のメカニズムを解明することは癌治療において非常に重要である。卵巣癌においても我々は基礎実験においてプラズマの間接照射により、EMT抑制を示唆する同様の結果を得ているが、そのメカニズムをさらに詳細に解明することでより効果的な治療戦略を立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)卵巣癌細胞株、細胞数、PAM強度による卵巣癌細胞の生存率への影響の評価

ES2とSKOV3の2種の卵巣癌細胞株を用いて、PAMの感受性の評価を行った。PAM強度は希釈を行い1:4から1:512までの間で評価を行った。また、アポトーシスの関与を確認するため、Caspase familyの発現の変化をウェスタンブロッティングを用いて確認した。

(2)PAMの腫瘍の転移・浸潤能へ与える影響の評価

PAMへの曝露が癌細胞の転移、浸潤能を抑制するかどうかを評価するために、ES2細胞にPAMを曝露し、wound healing アッセイを行い24時間後と48時間後に評価を行った。また、Transwell Migration assayを用いてES2細胞の浸潤・転移能を評価した。

(3)人腹膜細胞との共培養下でのPAMの抗腫瘍効果の検証

より生体内の環境に近づけるために、患者からのインフォームドコンセントを得て集めた大網の手術検体より樹立した中皮細胞を用いて実験を行った。中皮細胞をディッシュに培養し、ZsGreenを発現させたES2細胞を中皮細胞の上に蒔き中皮と共培養下にPAMに曝露させ2時間ごと24時間後にそれぞれの生存細胞数によりPAMの細胞選択性障害性を評価した。

(4)PAMが腫瘍浸潤能を抑制するメカニズムの解析

悪性腫瘍において、腫瘍浸潤を促進するとされるMMP-2とMMP-9に着目し、PAM曝露による発現の変化を検討した。PAM曝露の前後でのMMP-2とMMP-9の発現変化をqPCRとウェスタンブロッティングを行い評価した。さらにMMPの上流のシグナル経路としてERK1/2、JNK1/2が主な調節因子として働くAKTやMAPKの経路の活性を検討した。PAMの強度を1:128から1:512まで調整し、JUK、p38、AKTのリン酸化を、ウェスタンブロッティングを用いて評価した。

(5)マウス腹膜播種モデルにおけるPAMの腫瘍播種抑制効果の検討

PAMの投与が腹膜播種を抑制するかどうかを検討した。ヌードマウスにルシフェラーゼ発現ES2細胞 1×10^6 個を腹腔内に投与し引き続きPAMを3日間投与した。

IVIS200imaging systemを用いて腹腔内播種腫瘍の状態もモニターし、マウスの生存と播種腫瘍の量によりPAMの播種抑制効果を評価した。

4. 研究成果

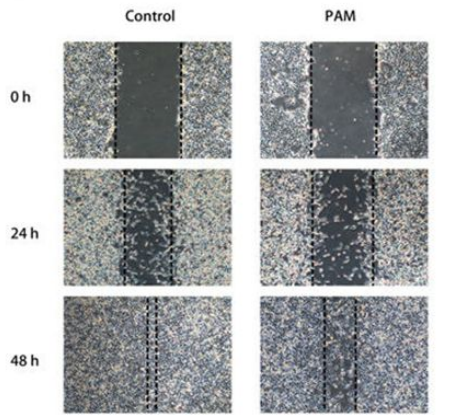
(1)卵巣癌細胞株、細胞数、PAM強度による卵巣癌細胞の生存率への影響の評価

細胞種、細胞数ごとに細胞生存率をMTSアッセイにより評価したところES2細胞のPAM感受性が高く、また全体の欄歳増細胞数が多い場合はPAMの効果は減弱する結果となった。加えて、Caspase familyの発現量はPAMの強度は1:128では変化が見られなかったため、以後の昨日実験ではES2細胞、PAM強度1:128を使用した。

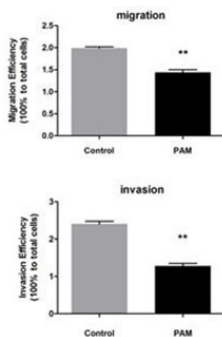
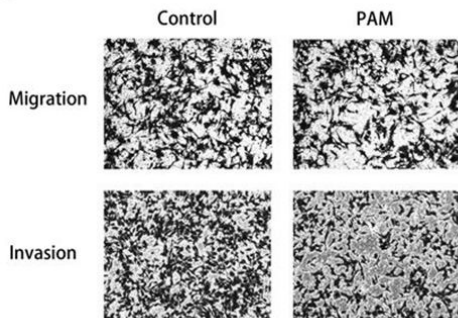
(2) PAM の腫瘍の転移・浸潤能へ与える影響の評価

PAM が ES2 細胞の浸潤能へ与える影響を評価するため、Transwell invasion assay を施行したところ、細胞の生存率は MTS アッセイ、colony formation アッセイでは変化は見られていないにもかかわらず PAM は有意に ES2 の浸潤能を抑制する結果となった。

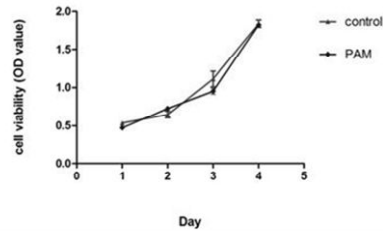
A



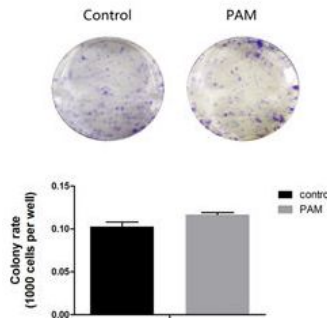
B



C



D



(3) 人腹膜細胞との共培養下での PAM の抗腫瘍効果の検証

PAM が卵巣癌細胞選択的に抗腫瘍効果を発揮することを検証した。

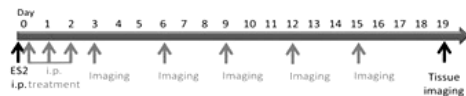
卵巣癌細胞を中皮との共培養下で PAM に曝露させたところ中皮の生存率はほとんど変化が見られなかったのに対し、中皮層に接着した ES2 細胞の数はコントロールと比較し有意に減少がみられた。PAM 曝露が、ES2 細胞が腹膜へ接着、播種することを抑制する可能性が見出された。

(4) PAM が腫瘍浸潤能を抑制するメカニズムの解析

PAM が ES2 細胞の転移を制御するメカニズムを検討するために、転移能に広く関与する matrix metalloproteinase (MMPs) 特に MMP-2 と MMP-9 の発現を調べたところ MMP-2 は mRNA もタンパクレベルでも PAM 治療の前後で変化を認めなかったのに対し、MMP-9 は治療後に有意に発現が低下した。また、MAPK 経路に含まれる JNK1/2 と p38 のリン酸化も PAM 治療後に著明に低下していた。また、これらは PAM の作用に拮抗する N-acetylcystein の投与でキャンセルされた。

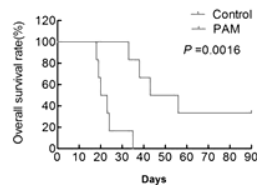
(5) マウス腹膜播種モデルにおける PAM の腫瘍播種抑制効果の検討

PAM の投与が腹膜播種を抑制するかどうかを検討した。ヌードマウスにルシフェラーゼ発現 ES2 細胞 1×10^6 個を腹腔内に投与し引き続いて PAM を 3 日間投与した。

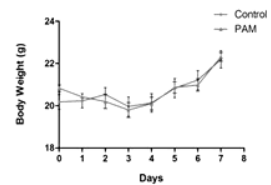


90 日の観察期間において、PAM 投与群はコントロール群と比較し有意にマウスの生存期間を延長した。マウスの体重モニターに 2 群間に差は認めず、特記すべき副作用も認めなかった。

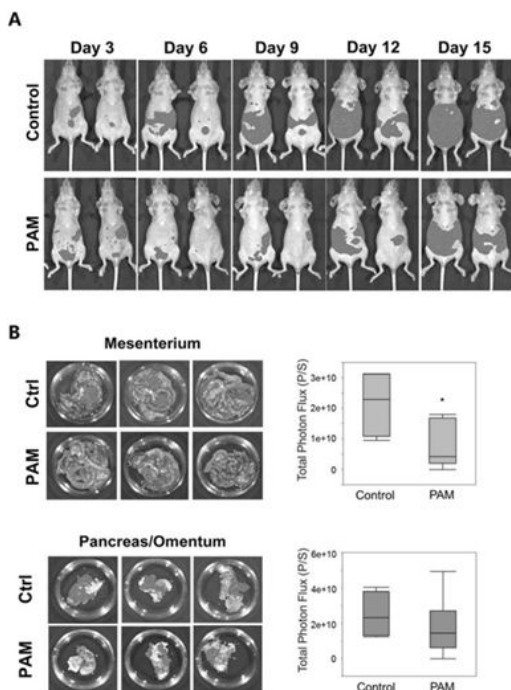
B



C



腹膜播種の状態を観察するため IVIS system を用いて、同条件で治療したマウスを治療 15 日目まで腹腔内腫瘍の状態を観察した結果、PAM はマウスの腹腔内の播種を抑制していた。また、19 日目に腹腔内を直接確認したところ播種の部位としては腸間膜の播種をより抑制しており、大網播種の状態については両群間に有意な差を認めなかった。これにより、PAM 治療は *in vivo* においても卵巣癌細胞株の播種を抑制した。人への治療応用が期待される結果となった。



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5件)

Nakamura K, Peng Y, Utsumi F, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F, Kajiyama H. Novel Intraperitoneal Treatment With Non-Thermal Plasma-Activated Medium Inhibits Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *Sci Rep*. 2017 Jul 20;7(1):6085. 査読有.

doi: 10.1038/s41598-017-05620-6.

Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura K, Tanaka H, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F. Future perspective of strategic non-thermal plasma therapy for cancer treatment. *J Clin Biochem Nutr*. 2017 Jan;60(1):33-38.

doi: 10.3164/jcbn.16-65. Epub 2016 Dec 17. Review.

Utsumi F, Kajiyama H, Niimi K, Sekiya R, Sakata J, Suzuki S, Shibata K, Mizuno M, Kikkawa F. Clinical significance and predicting indicators of post-cancer-treatment survival in terminally ill patients with ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2017 Feb;43(2):365-370. 査読有

doi: 10.1111/jog.13219.

Tanaka H, Nakamura K, Mizuno M, Ishikawa K, Takeda K, Kajiyama H, Utsumi F, Kikkawa F, Hori M. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci Rep*. 2016 Nov 8;6:36282. 査読有 doi: 10.1038/srep36282.

Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F. Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol Rep*. 2016 Jun;35(6):3169-77. 査読有 doi: 10.3892/or.2016.4726. Epub 2016 Apr 1.

[学会発表](計2件)

Yang Peng, Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Tanaka H, Mizuno M, Toyokuni S, Hori M, Kikkawa F. Plasma-activated medium inhibits metastatic activities of ovarian cancer cells *in vitro* via repressing MAPK pathway. The 5th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment (IWPCT5). 2018年3月20日-22日. Greifswald University (Germany)

Yang Peng, Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Shinya Toyokuni, Masaru Hori, Fumitaka Kikkawa. Plasma-activated medium inhibits metastatic tendency of ovarian cancer cells *in vitro*. The 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6). 2016年9月4日-9日. Slovakia

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

内海 史(UTSUMI, Fumi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 10749261

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし