

令和元年5月8日現在

機関番号：23701
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K08914
 研究課題名(和文) プラズマ誘起活性粒子による細胞機能制御 - 安全なプラズマ医療を目指した学術基盤 -
 研究課題名(英文) Cell function control by plasma induced active particles -Academic foundation for safe plasma medicine-
 研究代表者
 足立 哲夫 (ADACHI, tetsuo)
 岐阜薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：40137063
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ照射の医療への応用を進めるべく、本課題ではplasma-activated medium (PAM) 負荷に対する細胞応答ダイナミクスの解明を目的とした。A549がん細胞へのPAM負荷により細胞内で鉄イオンが遊離し、発生する・OHラジカルにより細胞死が増幅された。一方、緩和なプラズマ照射条件にて調製したmild PAMを正常細胞に負荷した場合、Keap1-Nrf2系の活性化を介し酸化ストレス抵抗性が誘導された。ヒトへの投与を想定しPAMに替わって調製したplasma-activated lactated Ringer's solution (PAL) はより強いA549細胞傷害作用を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 近年、プラズマ照射の医療への応用が急速に進み、有意な効果が示されているものの、その効果を証明するメカニズムについては未解明な部分が多い。本研究の成果は、人体にプラズマを直接的に照射する必要がない「より安心で安全なプラズマ医療」の確立、それに対する社会や国民の理解に繋がると思われる。また、プラズマ照射物質(培地や輸液など)を事前に製造保管し必要時に医療施設に普遍的に供給できる可能性を示すもので、臨床現場のみならず、医薬品産業界への波及効果は計りし得ない。さらに、臨床使用に向けての展開研究は、プラズマ発生装置や関連機器の機能向上、低コスト化などにも繋がり関連の理工学産業界にも効果が波及する。

研究成果の概要(英文)：In order to advance the application of plasma irradiation to medicine, this study aimed to elucidate the dynamics of cellular response to plasma-activated medium (PAM) load and to provide information that serves as a bridge to the clinical application of PAM. It was found that the OH radical generated intracellularly by PAM loading to A549 cancer cells destroyed ferritin and released the stored iron ion to further induce cell death. On the other hand, when mild PAM prepared under mild plasma irradiation conditions is loaded on normal cells, resistance against oxidative stress is obtained by the enhanced expression of the antioxidant enzyme HO-1 through activation of the Keap1-Nrf2 system. I clarified plasma-activated lactated Ringer's solution (PAL) prepared in place of PAM for administration to humans showed stronger A549 cytotoxicity than PAM.

研究分野：病態生化学

キーワード：プラズマ ストレス 細胞内シグナル伝達 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

オーロラや雷といった自然現象を発生させるプラズマは、気体をさらに高温にしたり、気体に電界をかけることで原子や分子が電離してできる電荷を帯びた粒子からなる「物質の第4状態」であり、アーク放電、超大規模半導体集積回路製造(情報通信機器、家電)、薄膜合成、光源、空気清浄など主に理工学の分野に応用されてきた。しかし、近年、大気圧下で非平衡低温プラズマを発生させ、生体組織や細胞に照射することが可能になり、止血、皮膚・創傷治療、がん治療など「プラズマの医療への応用」が一気に拡大してきた。これらの臨床応用を支える基礎研究の中で、比較的低エネルギーのプラズマ照射は細胞増殖を、高エネルギーのプラズマ照射は細胞死を誘導することも報告され、治療目的に合わせて照射エネルギーを調節することの有効性が示唆された。また、プラズマの細胞への適用方法として、細胞培養系に直にプラズマを照射する直接法と、予めプラズマを照射して調製した液体(細胞培養用培地など)を細胞や組織に負荷する間接法が開発された。プラズマを照射した際に発生する活性粒子として活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)が知られているが、これらの分子種の多くは寿命が短く、上記の間接法の有効性を完全には説明できず、未だ明らかになっていない活性粒子の関与が考えられている。また、プラズマの刺激に対する応答タンパクの発現調節についてはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

近年、プラズマ照射の医療への応用が急速に進み、有意な治療効果が示されているものの、効果を証明するメカニズムについては未解明な部分が多い。申請者は「プラズマ医療科学の創成」に参画し、「より安心・安全なプラズマ医療」を目指しプラズマ照射培地(plasma-activated medium、PAM)の有用性を報告してきたが、一方でPAM中の活性粒子がもつ細胞傷害増幅活性や細胞増殖・創傷治癒活性など解明すべき項目も明らかになってきた。本研究では、これらの課題を解決することでPAMの本質を明らかにするとともに、PAMによるストレス抵抗性獲得メカニズムの解明を目標とした。具体的には、(1) PAM負荷によるがん細胞傷害増幅メカニズムの解明、(2) PAMによる正常細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの解明、(3) 臨床への応用を目指した plasma-activated lactated Ringer's solution (PAL)の有効性の解明を目的とした。本研究の成果は「プラズマ医療」に対する社会や国民の理解獲得に繋がり、PAMの有効性の証明やプラズマ照射装置の機能向上は臨床現場や関連の医薬品・理工学産業界の発展に寄与する。

3. 研究の方法

(1) PAM負荷によるがん細胞傷害増幅メカニズムの解明

PAMは35 mm dishに6 mLの無血清DMEM培地を入れArプラズマを3分間照射することにより調製した。ヒト肺胞基底上皮腺癌A549細胞の細胞傷害はMTT法あるいはLDH細胞毒性測定法にて、細胞内の鉄イオンは二価鉄特異的プローブRhoNox-1にて検出した。細胞内フェリチン量はWestern blot法にて測定した。

(2) PAMによる正常細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの解明

Mild PAMは60 mm dishに4 mLのDMEM培地を入れArプラズマを2分間照射することにより調製した。細胞に対する傷害はLDH細胞毒性測定法にて検出した。Nrf2-ARE経路における転写因子Nrf2の核移行はWestern blot法にて、hemeoxygenase (HO) mRNA発現はRT-PCR法により測定した。

(3) 臨床への応用を目指したPALの有効性の解明

A549がん細胞は常法により培養した。PAM、PALはそれぞれ無血清DMEM培地、乳酸リンゲル液(6 mL/35 mm dish)にArプラズマを3分間照射し調製した。細胞傷害はMTT法並びにフローサイトメトリーにて測定した。Catalase活性は過酸化水素濃度の測定により評価した。チロシンニトロ化は免疫染色法により検出し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) PAM負荷によるがん細胞傷害増幅メカニズムの解明

肺胞基底上皮がん細胞A549細胞にPAMを負荷した場合、細胞内での・OHラジカルの発生、2価鉄レベルの上昇が認められた。また、DNA分断(TUNEL法)とその修復酵素であるPARP-1の活性化、それに誘引される反応として、NAD⁺の枯渇、ATPの枯渇、カルシウムイオンの細胞内流入も観察された。細胞内のフェリチンタンパクの減少が認められたが、catalase、BP(2価鉄キレーター)、DMTU(・OHスカベンジャー)の他にMG132(プロテアソーム阻害剤)やleupeptin(リソソームプロテアーゼ阻害剤)によっても抑制された。以上の結果より、PAMの負荷により細胞内で発生した・OHラジカルによりフェリチンが破壊され、フェリチン内に貯蔵されていた鉄イオンが遊離することで、さらに・OHラジカルが増加する連鎖反応でDNA分断やエネルギー枯渇が引き起こされ細胞死が増幅される可能性が示唆された。

(2) PAM負荷による正常細胞の酸化ストレス抵抗性獲得メカニズムの解明

緩和なプラズマ照射条件にて調製した mild PAM 負荷による正常細胞のストレス抵抗性獲得メカニズムについて、Keap1-Nrf2 系の活性化を介する抗酸化酵素 HO-1 の発現亢進によることを示した。さらに、Nrf2 をノックダウンした場合に HO-1 発現の亢進や酸化ストレスに対する抵抗性がみられなくなることを明らかにすることで、Keap1-Nrf2 系の関与を確認した。

(3) 臨床への応用を目指した PAL の有効性の解明

PAM は、細胞培養に用いる DMEM 培地にプラズマを照射して調製しているが、ヒトへの投与を想定した場合、細胞培養用培地はヒトに投与することがないため、それから調製した PAM では不適切になる可能性がある。そこで、DMEM の代わりに臨床現場で用いられている乳酸リンゲル液 (Lac-R) にプラズマを照射して調製した plasma-activated lactated Ringer's solution (PAL) のがん細胞アポトーシス誘導作用について明らかにした。PAL は PAM よりも強く A549 細胞傷害を誘導した。PAM は catalase にて前処理することにより、その細胞傷害活性は大きく低下したが、PAL の場合、同様に catalase 処理してもその細胞傷害活性の低下はみられなかった。これは PAL 調製の過程で Lac-R へのプラズマ照射により pH が低下したこと、また nitrite が生成されたことにより加えた catalase の活性が低下し、PAL 中の H₂O₂ の分解が阻害されたことによると考えられた。また、PAL 負荷によりチロシンニトロ化が亢進したが、これは nitrite の生成を阻害することで抑制された。さらに、PAL による A549 細胞傷害 (ATP 産生の低下、Ca²⁺流入の亢進) はミトコンドリア機能低下 (ミトコンドリア膜電位の低下、Bcl₂/BAX 比の低下) を伴っていた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

1. [Hara H](#), Kobayashi M, Shiiba M, [Kamiya T](#), [Adachi T](#): Sublethal treatment with plasma-activated medium induces senescence-like growth arrest of A549 cells: Involvement of intracellular mobile zinc. *J. Clin. Biochem. Nutr.* in press, 2019. 査読有
2. Matsuzaki T, Kano A, [Kamiya T](#), [Hara H](#), [Adachi T](#): Enhanced ability of plasma-activated lactated Ringer's solution to induce A549 cell injury. *Arch. Biochem. Biophys.*, 656, 19-30, 2018. 査読有, Doi: 10.1016/j.abb.2018.08.011
3. Hotta E, [Hara H](#), [Kamiya T](#), [Adachi T](#): Non-thermal atmospheric pressure plasma-induced IL-8 expression is regulated via intracellular K⁺ loss and subsequent ERK activation in human keratinocyte HaCaT cells. *Arch. Biochem. Biophys.*, 644, 64-71, 2018. 査読有, Doi: 10.1016/j.abb.2018.03.005
4. [Hara H](#), Sueyoshi S, Taniguchi M, [Kamiya T](#), [Adachi T](#): Differences in intracellular mobile zinc levels affect susceptibility to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Rad. Res.*, 51(3), 306-315, 2017. 査読有, Doi: 10.1080/10715762.2017.1309527
5. Horiba M, [Kamiya T](#), [Hara H](#), [Adachi T](#): Cytoprotective effects of mild plasma-activated medium against oxidative stress in human skin fibroblasts. *Sci. Rep.*, 7, 42208, 2017. 査読有, Doi: 10.1038/srep42208
6. [Adachi T](#): Introduction to serial reviews: Biomedical application of non-thermal atmospheric pressure plasma and its usefulness. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 60(1), 1-2, 2017. 査読有, Doi: 10.3164/jcfn.16-78.
7. [Adachi T](#), Kano A, Nonomura S, [Kamiya T](#), [Hara H](#): Histone deacetylase inhibitors stimulate the susceptibility of A549 cells to a plasma-activated medium treatment. *Arch. Biochem. Biophys.*, 606, 120-127, 2016. 査読有, Doi: 10.1016/j.abb.2016.07.019.
8. [Adachi T](#), Nonomura S, Horiba M, Hirayama T, [Kamiya T](#), Nagasawa H, [Hara H](#): Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury. *Sci. Rep.*, 6, 20928, 2016. 査読有, Doi: 10.1038/srep20928

[学会発表](計 24 件)

1. 長屋実咲, [原 宏和](#), [神谷哲朗](#), [足立哲夫](#): プラズマ照射培地と NAMPT 阻害剤の併用によるがん細胞死増強作用, 日本薬学会第 139 年会, 千葉 (2019, 3/20-23)
2. [原 宏和](#), 椎葉 萌, 小林真理, [神谷哲朗](#), [足立哲夫](#): プラズマ照射培地による A549 細胞の細胞増殖抑制機構. 名大医薬系 3 部局交流シンポジウム ~ 岐阜薬科大学・岐阜大学 G-Chain・ラクオリア創薬合同シンポジウム ~, 名古屋大学 (2018, 11/30)
3. 椎葉 萌, 小林真理, [原 宏和](#), [神谷哲朗](#), [足立哲夫](#): プラズマ照射培地による細胞増殖抑制機構 - 亜鉛依存性 p53 シグナルの関与 -, 第 64 回日本薬学会東海支部大会, 名古屋・金城学院大学 (2018, 6/30)
4. [足立哲夫](#): 大気圧低温プラズマのがん治療への応用, Biotech 2018, 東京・東京ビッグサイト (2018, 6/27-29)
5. [原 宏和](#), 椎葉 萌, 小林真理, [神谷哲朗](#), [足立哲夫](#): プラズマ照射培地による A549 細胞の細胞増殖抑制作用, 第 71 回日本酸化ストレス学会 第 18 回日本 NO 学会合同学術集会, 京都 (2018, 5/17-18)

6. Hirokazu H, Tetsuo A, Contribution of Intracellular Mobile Zinc to Anti-Cancer Effects of Plasma-Activated Medium, 5th International Workshop on Plasma for Cancer Treatment (IWPCT 2018), Greifswald, Germany (2018, 3/20-21)
7. 松崎 樹, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: プラズマ照射乳酸リンゲル液負荷による A549 細胞の細胞傷害, 日本酸化ストレス学会東海支部第 6 回学術集会, 静岡 (2018, 2/10)
8. 原 宏和, 堀田英美里, 神谷哲朗, 足立哲夫: 低温大気圧プラズマ照射による IL-8 発現誘導における細胞内 K⁺の関与, 日本酸化ストレス学会東海支部第 6 回学術集会, 静岡 (2018, 2/10)
9. 堀田英美里, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫: ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞における大気圧低温プラズマ照射による IL-8 発現誘導, 生命科学系学会合同年次大会 2017, 神戸 (2017, 12/6-9)
10. 國吉真子, 福留早貴, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: プラズマ照射培地による IL-1β 発現制御機構, 第 63 回日本薬学会東海支部大会, 岐阜・岐阜薬科大学 (2017, 7/8)
11. 原 宏和, 末吉紗也子, 谷口美紘, 神谷哲朗, 足立哲夫: プラズマ照射培地に対する細胞感受性に及ぼす細胞内亜鉛の影響. 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 筑波・筑波国際会議場 (2017, 6/28-29)
12. 足立哲夫, 堀場美の里, 神谷哲朗, 原 宏和: マイルドプラズマ照射培地を負荷したヒト線維芽細胞の酸化ストレス抵抗性の獲得. 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会, 筑波・筑波国際会議場 (2017, 6/28-29)
13. 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫: 大気圧プラズマを利用したがん治療の分子基盤の確立. 名古屋大学 3 部局シンポジウム, 名古屋・名古屋大学 (2017, 6/16)
14. 原 宏和, 足立哲夫: 大気圧プラズマ負荷に対するがん細胞応答機構 (シンポジウム), 日本薬学会第 137 年会, 仙台・仙台国際センター (2017, 3/25-28)
15. Hirokazu H, Tetsuo A, Intracellular Free Zinc Mediates Cellular Responses to PAM, The 1st International conference on plasma medical science innovation (ICPMSI2017), Nagoya (2017, 2/27-28)
16. 堀場美の里, 加納綾女, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: プラズマ照射に対する細胞応答の分子機構, 新学術領域「プラズマ医療科学の創成」全体会議, 大宰府 (2016, 12/23,24)
17. 堀田英美里, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫: ヒト表皮角化細胞 HaCaT におけるプラズマ照射による IL-8 発現誘導機構, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 岐阜・長良川国際会議場 (2016, 10/30)
18. 加納綾女, 野々村早帆, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: プラズマ照射培地負荷によるがん細胞死に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の増強効果, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 岐阜・長良川国際会議場 (2016, 10/30)
19. Hara H, Taniguchi M, Kobayashi K, Sueyoshi S, Kamiya T, Adachi T: Intracellular Free Zinc Plays an Important Role in Plasma-Activated Medium-Induced Cell Death, 6th International Conference on Plasma Medicine (ICPM-6) ,Bratislava (Slovakia) (2016, 9/4-9)
20. 足立哲夫, 加納綾女, 野々村早帆, 神谷哲朗, 原 宏和: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はがん細胞のプラズマ照射培地に対する感受性を増強する, 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台・仙台国際センター (2016, 8/30-31)
21. 福留早貴, 國吉真子, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: ホルボールエステル誘導性の炎症反応に対するプラズマ照射培地の影響. 第 62 回日本薬学会東海支部大会, 名古屋・愛知学院大学 (2016, 7/2)
22. 小林真理, 原 宏和, 末吉紗也子, 神谷哲朗, 足立哲夫: プラズマ照射培地より惹起される A549 細胞増殖抑制における細胞内亜鉛の関与. 第 62 回日本薬学会東海支部大会, 名古屋・愛知学院大学 (2016, 7/2)
23. 末吉紗也子, 原 宏和, 谷口美紘, 神谷哲朗, 足立哲夫: プラズマ照射培地による細胞傷害と細胞内亜鉛動態の関連性, 日本生化学会中部支部例会・シンポジウム 津・三重大学 (2016, 5/21)
24. 足立哲夫, 野々村早帆, 堀場美の里, 神谷哲朗, 原 宏和: プラズマ照射に対する細胞応答ダイナミクス, 名古屋大学「プラズマ科学プラットフォーム」開所記念講演会・見学会, 名古屋 (2016, 4/26)

[図書] (計 1 件)

1. Adachi T: Molecular Mechanism of Cellular Responses to Nonthermal Plasma, Plasma Medical Science, Chapter 3-5, 145-156, 2018, Academic Press, ISBN:978-0-12-815004-7

[その他]

ホームページ等

<http://www.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：原 宏和
ローマ字氏名：HARA, hirokazu
所属研究機関名：岐阜薬科大学
部局名：薬学部
職名：准教授
研究者番号(8桁)：30305495

研究分担者氏名：神谷 哲朗
ローマ字氏名：KAMIYA, tetsuro
所属研究機関名：岐阜薬科大学
部局名：薬学部
職名：講師
研究者番号(8桁)：60453057

(2)連携研究者

研究協力者氏名：石川 健治
ローマ字氏名：ISHIKAWA, kenji

研究協力者氏名：田中 宏昌
ローマ字氏名：TANAKA, hiromasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。