

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15257

研究課題名(和文)カーボンナノチューブと低温プラズマの融合による新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of combinational therapy of non-thermal plasma and carbon nanotubes

研究代表者

豊國 伸哉 (Toyokuni, Shinya)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90252460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：カーボンナノチューブと低温プラズマを融合させた治療法の開発のため基盤データを取得した。多層カーボンナノチューブが特異的に吸着するタンパク質を網羅的に同定し、ヘモグロビン、ヒストン、トランスフェリンを得た。低温プラズマの作用は、鉄を付加した処理で感受性が増加し、鉄除去性キレート剤の処理により感受性が減少することが判明し、細胞内鉄濃度が低温プラズマへの細胞の感受性を決定する因子であることを見いだした。その過程でエンドサイトーシス活発化とオートファジーの関与ならびに細胞内の触媒性Fe(II)が増加することがわかり、中皮腫細胞では低温プラズマ処理はフェロトーシスを起こすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We obtained fundamental data for the use of combinational therapy of non-thermal plasma (NTP) and carbon nanotubes. We identified hemoglobin, histones and transferrin as specifically adsorbed proteins on carbon nanotube surface with mass spectrometry. Biological effects of NTP exposure were recognized as oxidative stress with biochemical, FACS and immunostaining studies, which was promoted with preincubation with ferric ammonium citrate and repressed by preincubation with redox-inactive iron chelator, desferal. NTP exposure to mesothelioma cells caused an increase in intracellular catalytic Fe(II), lipid peroxidation with increased ferritin/decreased transferrin receptor, which was accompanied by promoted endocytosis and autophagy (ferritinophagy). These data suggest that NTP can cause ferroptosis in mesothelioma cells. As in vitro experiments we also observed that NTP exposure can directly destroy the ferritin core protein and reduce Fe(III) to Fe(II).

研究分野：実験病理学

キーワード：低温プラズマ カーボンナノチューブ フェロトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) カーボンナノチューブ(CNT)は、1991年に飯島が発見した炭素原子のみからなる合成されたナノスケール筒状の化合物である。剛性が高いが柔軟性にも富み、電子や熱伝導性が高く、半導体にもなることから、日本の産業を推進すると大いに期待された。しかし、今世紀になり、一部のCNTの物理的性状がアスベスト繊維と類似していることが指摘され、応用にブレーキがかかった。実際、ラット・マウスなど齧歯類実験等物で中皮腫をおこすことが明らかとなった。しかし、この10年で研究が進展し、CNTにおいて中皮腫を引き起こしやすい因子が明らかにされ(Nagai et al. PNAS 2011)、2014年IARCは直径~50 nmの多層CNTをGroup 2B (possible carcinogen)としたことで一定の決着がついた。その過程で表層に修飾を施していないCNTの吸着性や標的細胞内外の鉄の増加(過剰鉄)が発がんに関係していることが明らかとなりつつある。同時に、多層・単層にかかわらず、その太さにより種々の細胞に取り込まれるあるいは突き刺さることも観察されている。

(2) 一方、プラズマは宇宙空間に溢れており、中でも太陽はプラズマそのものであり、地球や生命の起源に関係するとされている。プラズマは、電子・ガス・紫外線・活性種・陽イオン・陰イオンなどよりなり、固体・液体・気体を超えたエネルギーの高い第4の物理状態と定義される。数千度にもなるためこれまでは基盤の作成など surface engineering として工業用途に主に使用されてきたが1990年代後半より新たな電極の開発により、50度以下の大気圧でプラズマを作ることが可能となった。今世紀になり全世界的に低温プラズマの医療応用に関する研究が開始され、現在では殺菌や創傷治癒促進、美容目的への治療や保険外診療がドイツなどで始まったところである。日本では、2012年に新領域「プラズマ医療科学の創生」が堀勝教授を中心に立ち上り、成果を見せつつある。その成果として、既存の学問領域としては酸化ストレスと密接な関係があり、酸化ストレスを制御したかたちで局所的に投与する技術であるということが認識されるようになった。

(3) 医工連携が大きな特色であり、しかもCNTと低温プラズマの組み合わせは、日本発の素材を使用しておりユニークである。何らかの相乗効果あるいは全く異なる作用を起こす可能性があるが、いずれにしてもCNTの付加価値を著しく高める可能性がある。学術的には、異物反応や酸化ストレスが関与するが、CNTは生体の骨格分子である炭素であるため、他の異物とは異なる反応があることが判明している。また、CNTは電子や熱の伝導性が高いマテリアルでありその点からも

興味が持たれる。

2. 研究の目的

(1) CNTならびに低温プラズマともにホットな領域であるが、まだその融合に関する研究は始まっていない。本研究では、この2つの領域の最先端のデータを熟知する申請者がこの2つの融合を考慮しながら、最適条件で基盤となるデータを取得するのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 細胞株へのCNTの投与実験

CNTは単層CNT3種類と多層CNT3種類をすでに入手し準備している。これらを均一に分散することが重要であり、生物学的な影響も考慮し、超音波を使用してウシ血清アルブミンにこれらを分散する。可及的に多くの細胞株に種々の濃度に曝露し、変化を観察する。まず、MTTアッセイを1つの指標として、96穴ウェルプレートで細胞毒性のスクリーニングを行う。さらに、光学顕微鏡レベルで興味あるデータが得られた場合には、電子顕微鏡による観察も行う。

(2) 動物へのCNT投与実験

これまでのデータと時間と予算の関係で、単層CNTの経口、腹腔内あるいは静脈投与に絞って実験を行う。どの臓器に集積しやすいかをウイスターラットなどを使用して光学顕微鏡レベルあるいは電子顕微鏡による観察で明らかにする。

(3) 細胞株への低温プラズマ曝露実験

低温プラズマ照射24時間あるいは48時間後に、MTTアッセイを1つの指標としてスクリーニングする。研究室は、細胞照射用と動物照射用の2台のプラズマ照射装置を保有している。動物は集積しやすい臓器に絞って、表面から照射を行い、その影響を評価する。通常的光学顕微鏡による形態学的変化のみならず、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine や4-hydroxy-2-nonenal 修飾タンパク質に対する抗体を使用して酸化ストレスを評価し、また凍結切片で触媒性2価鉄の評価も行う。

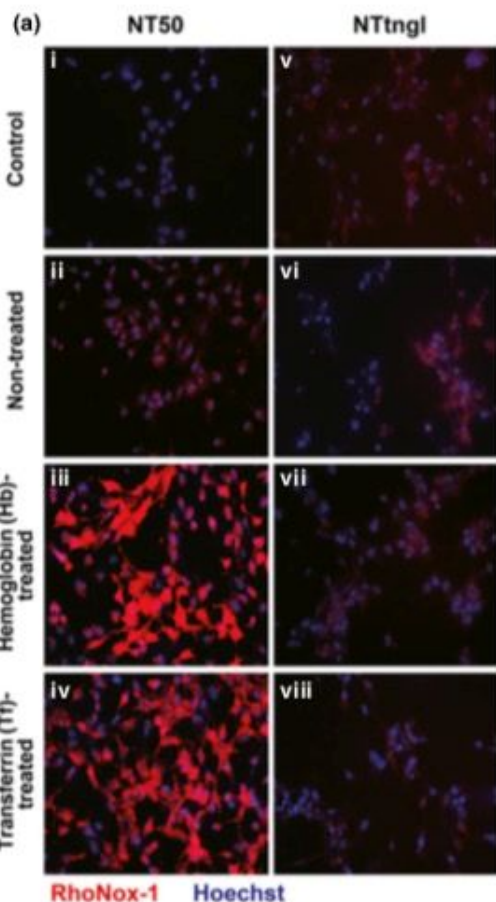
(4) タンパク質でコーティングしたCNTの曝露実験

これまでの実験で、CNTにはトランスフェリンやヘモグロビンなどが吸着しやすいことが判明してきている。今回マスペクトメトリーにより網羅的な同定を実施する。またトランスフェリンでコートしたCNTを使用し曝露実験から施行し、次にヘムや吸着することが判明したタンパク質を使用して生物効果の増強を検討する。

4. 研究成果

(1) CNTと低温プラズマを融合させた新規治療法の開発を目的として、培養細胞レベルの

実験を施行した。Met5A 中皮細胞株の可溶化物を使用して、中皮腫発がん性の証明された多層 CNT(NT50)と発がん性のないことを証明された多層 CNT(NTtngl)がそれぞれ特異的に吸着するタンパク質を、マススペクトロメリーにより網羅的に同定した。2 種類の CNT に特異的に吸着するタンパク質を多数同定したが、両者に共通するタンパク質としてヘモグロビン、ヒストン、トランスフェリンが得られた。このうち、ヘモグロビンとヒストンはアスベスト繊維に特異的に吸着するタンパク質としてすでに知られていた。Met5A 中皮細胞の CNT 取り込みの解析においては NT50 のみ効率的に取り込まれ、しかもヘモグロビンあるいはトランスフェリンで前処理をした繊維が有意に多く取り込まれ、同時に細胞内の触媒性 2 価鉄量も有意に増加した。この現象は、コメットアッセイによる DNA 傷



害と比例関係を示した。
 図 1: ヘモグロビンまたはトランスフェリンでコートされた NT50 のみが中皮細胞に取り込まれ、細胞内触媒性 Fe(II)を増加させる

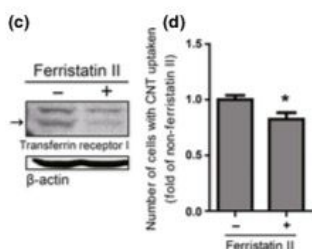
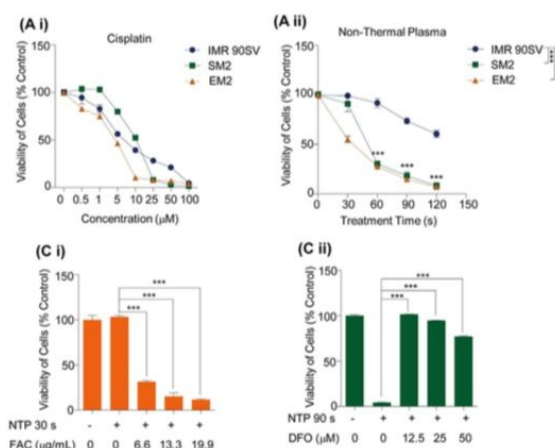


図 2: トランスフェリン受容体をフェリスチン II で阻害すると NT50 の取り込みは有意に低下す

る

(2) 線維芽細胞と悪性中皮腫細胞を比較すると抗がん剤シスプラチンへの感受性に有意差はないにもかかわらず、低温プラズマ照射への感受性は悪性中皮腫細胞において有意に高いことが判明した。低温プラズマの作用は、クエン酸アンモニウム鉄処理で感受性が増加し、鉄除去性キレート剤デスフェラルの処理により感受性が減少した。従って、細胞内鉄濃度が低温プラズマへの細胞の感受性を決定する重要因子であり、細胞死に脂質過酸化を伴うことからフェロトシスであることが判明した。低温プラズマ照射に伴い IRP1/2 や トランスフェリン受容体タンパク質の有意な減少を認め、フェリチンタンパク質の有意な増加を認めたため、細胞内の触媒性 Fe(II)が増加していると考えられた。その機構解明のため電子顕微鏡による解析を実施すると、細胞死に至る過程で、エンドサイトーシスの活性化とオートファジーの関与が明らかとなった。同時に LAMP1 の増加も認めたため、ライソゾーム形成あるいはフェリチノファジーの関与が示唆された。さらに、invitro の実験でフェリチンに低温プラズマを照射すると、フェリチン殻の破壊と同時に保管されていた Fe(III)が Fe(II)に還元されリリースされることも明らかになった。次に、CNT が中皮細胞 に作用するとき分泌されるタンパク質を網羅的に同定した。興味あるものとして CSF-1 が同定された。このタンパク質は CNT の曝露でマクロファージ細胞からも分泌され、その M2 分化を誘導することが判明した。これらの結果から、低温プラズマも CNT もその細胞傷害性には細胞内の鉄が主



要な決定因子となっており、少なくとも中皮腫細胞においてはフェロトシスを起こすことが明らかとなった。

図 3: 抗がん剤シスプラチンは線維芽細胞 (IMR905V) と中皮腫細胞 (SM2, EM2) の区別なく細胞死を誘発するが、低温プラズマ照射ではがん細胞特異的な細胞死が惹起され、この効果はあらかじめ細胞にクエン酸アンモニウム鉄を負荷することによって促進され、鉄

を除くキレート剤であるデスフェラルと培養することによって抑制される

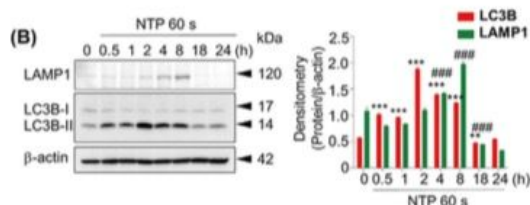


図 4: 中皮腫細胞に低温プラズマを 60 秒照射することにより、その後オートファジーが誘発され、ライソゾーム形成も観察される

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Furuta T, Shi L, Toyokuni S. Non-thermal plasma as a simple ferroptosis inducer in cancer cells: A possible role of ferritin. *Pathol Int* 査読有 2018 (in press) DOI: 10.1111/pin.12665.

Shi L, Ito F, Wang Y, Okazaki Y, Tanaka H, Mizuno M, Hori M, Hirayama T, Nagasawa H, Richardson DR, Toyokuni S. Non-thermal plasma induces a stress response in mesothelioma cells resulting in increased endocytosis, lysosome biogenesis and autophagy. *Free Radic Biol Med* 査読有 108: 904-917, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.368.

Chew SH, Okazaki Y, Akatsuka S, Wang S, Jiang L, Ohara Y, Ito F, Saya H, Sekido Y and Toyokuni S. Rheostatic CD44 isoform expression and its association with oxidative stress in human malignant mesothelioma. *Free Radic Biol Med* 査読有 106: 91-99, 2017. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.011.

Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, Bush AI, Conrad M, Dixon S, Fulda S, Gascon S, Hatzios SK, Kagan V, Noel K, Jiang X, Linkermann A, Murphy ME, Overholtzer M, Oyagi A, Pagnussat G, Park J, Ran Q, Rosenfeld CS, Salnikow K, Tang D, Torti F, Torti S, Toyokuni S, Woerpel KA, Zhang DD. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease. *Cell* 査読有 171:273-285, 2017. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.021.

Toyokuni S, Ito F, Yamashita K, Okazaki Y, Akatsuka S. Iron and thiol redox signaling in cancer. *Free Radic*

Biol Med 査読有 108: 610-626, 2017. DOI:

10.1016/j.freeradbiomed.2017.04.024.

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* 査読有 20:6085,2017 DOI:

10.1038/s41598-017-05620-6.

Wang Y, Okazaki Y, Shi L, Kohda H, Tanaka M, Taki K, Nishioka T, Hirayama T, Nagasawa H, Yamashita Y, Toyokuni S. Role of hemoglobin and transferrin in multi-wall carbon nanotube-induced mesothelial injury and carcinogenesis. *Cancer Sci* 査読有 107:250-257, 2016. DOI: 10.1111/cas.12865.

Ito F, Nishiyama T, Shi L, Mori M, Hirayama T, Nagasawa H, Yasui H and Toyokuni S. Contrasting intra- and extracellular distribution of catalytic ferrous iron in ovalbumin-induced peritonitis. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 476: 600-606, 2016. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.06.003.

〔学会発表〕(計 14 件)

Toyokuni S. Cancer as iron addiction with ferroptosis-resistance. Gordon Research Conference: Oxygen Radicals (February 5-9, 2018; Ventura Beach Marriott, Ventura, CA, USA; invited speaker).

Toyokuni S. Role of ferroptosis in carcinogenesis and cancer therapy. 8th Joint meeting of the Society for Free Radical Research Australasia and Japan (December 9-12, 2017; Tokyo Engineering University, Hachioji, Tokyo and Fujikyū Highland Resort Hotel, Fuji, Yamanashi, Japan; Invited speaker).

Toyokuni S. Chemical reaction in non-thermal plasma from the viewpoint of oxidative stress toward medical applications. 7th Sungkyunkwan University-Nagoya University Joint Symposium 2017 (December 7-8, 2017; Noyori Conference Hall 2F, Nagoya University, Nagoya, Japan; invited speaker).

Toyokuni S, Shi L and Okazaki Y. Chemical reaction in non-thermal plasma from the viewpoint of oxidative stress toward medical applications. The 8th Biennial Meeting of the Society

for Free Radical Research Asia; the 14th Conference of the Asian Society of Mitochondrial Research & Medicine; Chinese Mit 2017 (September 8-11, 2017; Nanyang Hotel, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, China; invited plenary speaker).

Toyokuni S. Ferroptosis: A Critical Review. Session VI: Ferroptosis and cancer. Role of iron in carcinogenesis and tumor biology. (April 2-5, 2017; The Banbury Center, Cold Spring Harbor Laboratory, Lloyd Harbor, New York; invited speaker).

Kajiyama H, Utsumi F, Nakamura K, Yang P, Tanaka H, Toyokuni S, Horii M and Kikkawa F. The effect of aqueous plasma therapy targeting for occult peritoneal metastasis of ovarian cancer. The 1st International Conference on Plasma Medical Science Innovation. (Feb 27-28, 2017; Nagoya University, Noyori Conference Hall, Nagoya, Japan).

Toyokuni S. Plenary Lecture: Chemical reaction mechanism in non-thermal plasma from the viewpoint of oxidative stress toward biological applications. XVth Annual Meeting of SFRR-India 2017: Advanced oxidative stress research for health benefits and well-beings (Jan 9 - 12, 2017; Multipurpose Hall, Training School Hostel, Bhabha Atomic Research Institute, Mumbai, India; invited speaker).

Toyokuni S, Shi L, Ito F, Okazaki Y, Toyokuni S. Chemical reaction mechanism in non-thermal plasma from the viewpoint of oxidative stress toward clinical cancer applications. SFRBM/SFRRI 2016; SFRRI's 18th Biennial Meeting (Nov 16-19, 2016; Hyatt Regency San Francisco, San Francisco, CA, USA).

Toyokuni S. Plenary lecture 1: Insights into chemical reaction mechanism in plasma medicine from the viewpoint of oxidative stress. 6th International Conference on Plasma Medicine. (Sep 4-9, 2016; Bratislava, Slovakia; invited speaker).

豊國伸哉 特別講演：がんの起源をフェロトーシスとレドックス制御から考える 平成 29 年度文部科学省私立大学研究ブランディング事業 研究成果報告会・シンポジウム (2018 年 3 月 25 日、昭和大学旗の台キャンパス 1 号館 7 階講堂、招待演者

豊國伸哉 低温プラズマの生物学的作用

第 8 回 JAAS 東京 Live Forum (2017 年 11 月 11 日 ~ 12 日、TKP 品川カンファレンスセンターAnnex、招待演者)

豊國伸哉 低温プラズマ技術の医療・生物応用 第 14 回日本病理学会カンファレンス (2017 年 7 月 28 日 ~ 29 日、犬山観光ホテル、愛知県犬山市、招待演者) 石川健治、田中宏昌、橋爪博司、竹田圭吾、太田貴之、伊藤昌文、中村香江、梶山広明、吉川史隆、豊國伸哉、水野正明、堀 勝 プラズマ活性培養液処理した細胞内酸化窒素活性種(RONS)の解析 第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会 (2017 年 6 月 28 日 ~ 29 日、つくば国際会議場、茨城県つくば市)

丹下 恵里花、石 蕾、豊國伸哉 悪性中皮腫細胞への低温プラズマ照射による鉄の代謝 第 106 回日本病理学会総会 (2017 年 4 月 27 日 ~ 29 日、京王プラザホテル、東京都新宿区)

〔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

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/pathology/pathology/

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

豊國伸哉 (TOYOKUNI, Shinya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90252460

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

吉川 史隆(KIKKAWA, Fumitaka)

梶山 広明(KAJIYAMA, Hiroaki)

堀 勝 (HORI, Masaru)

田中 宏昌 (TANAKA, Hiromasa)