

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10988

研究課題名(和文) PASS/Salinomycinによる骨肉腫の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new remedy of osteosarcoma by Salinomycin/PASS

研究代表者

吉田 行弘 (YOSHIDA, Yukihiro)

日本大学・医学部・講師

研究者番号：20201022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「低温大気圧プラズマ輸液剤(PASS)およびサリノマイシン(Sal)によって誘発される骨肉腫の細胞死のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともにその抗腫瘍効果を確認することによって、PASS/Salを用いた新規な骨肉腫の治療法の基盤を確立する」ことであった。結論としてPASSおよびSalは、細胞保護的なオートファジーを抑制して非アポト-シス型細胞死を誘発することにより、骨肉腫に対して高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、本研究成果は、アポト-シス誘導に抵抗性を示す骨肉腫に対するPASSおよびSalの併用投与に基づいた有効かつ安全な治療法の開発に道を拓くものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移や再発を来した骨肉腫には有効な化学療法がないのが現状である。われわれは、低温大気圧プラズマ(Cold atmospheric plasma, CAP)に注目し、低温大気圧プラズマ輸液剤(PASS: Plasma-activated salt solution)およびサリノマイシン(Sal)によって誘発される細胞死のメカニズムを分子レベルで明らかにし、PASSおよびSalは、細胞保護的なオートファジーを抑制して非アポト-シス型細胞死を誘発することにより、骨肉腫に対して高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。本研究成果は骨肉腫に対する有効かつ安全な治療法の開発として期待される。

研究成果の概要(英文)：Results of our study

The present study examined the molecular cell death mechanism of osteosarcoma, induced with non-thermal atmospheric pressure plasma-activated saline solution (PASS) and salinomycin (Sal), and confirmed their antitumor effects, thereby establishing a foundation for a novel osteosarcoma treatment using PASS and Sal. In conclusion, PASS and Sal were demonstrated to have potent antitumor effects on osteosarcoma by suppressing cytoprotective autophagy and inducing non-apoptotic cell death. Our results may lead to the development of an effective and safe treatment for apoptosis-resistant osteosarcoma by the combined administration of PASS and Sal.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：プラズマ 骨肉腫

1. 研究開始当初の背景

低温大気圧プラズマ(Cold atmospheric plasma, CAP)は室温、大気圧下で作成されるプラズマで、正常細胞にはほとんど毒性を示さずに種々の腫瘍細胞を傷害することから、副作用の少ない新規な抗がんツールとして注目されている。CAP を照射された培養培地(プラズマ活性化培地 Plasma-activated medium, PAM)は、CAP 直接照射と同様な腫瘍選択的な毒性を持つためにより簡便な手段として期待されている。しかし、培養培地は、多くの化学物質を含むため、生成した PAM は、臨床使用には好ましくない。共同研究者らは、CAP を臨床で使用されている輸液剤に照射してプラズマ活性化塩溶液(Plasma-activated salt solution, PASS)を作成した。PASS は、PAM よりも効率的にヒト、マウスの骨肉腫細胞株に細胞死を誘発することを見出した。サリノマイシン(Sal)は、抗コクシジウム抗生物質であるが、近年、がん幹細胞に対して抗がん活性を示すことから注目を集めている。我々は、Sal も骨肉腫に細胞死を誘発し、PASS と Sal の併用投与は相乗効果を示すことを発見した。

2. 研究の目的

PASS および Sal によって誘発される骨肉腫の細胞死のメカニズムを分子レベルで明らかにするとともにその抗腫瘍効果を確認することによって、PASS/Sal を用いた新規な骨肉腫の治療法の基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)細胞：骨肉腫細胞として、ヒト骨肉腫細胞株 HOS、MG63、SaOS-2、143B、マウス骨肉腫細胞株 LM8、正常細胞として、ヒト骨芽細胞 hFOB、ヒト肺維芽細胞 WI-38、マウス骨芽細胞 MC3T3 をそれぞれ用いた。

(2) PASS の作成：ヘリウムプラズマは、容量結合プラズマ生成型ダメージフリーマルチガスプラズマジェット(PCT-DFJIM-02 モデル、プラズマコンセプト東京)を用いて周波数 20 kHz、ピーク電圧 1 kV、電流値 30 mA、ヘリウム流量 毎分 3 L で作製した。PASS (1 mL)を、プラズマを液面 20 mm からソルデム 3A (テルモ) (1 mL) に 1 分照射して調製した。この PASS 原液を 10% FBS/DMEM (細胞実験用) または HBSS (生化学実験用) で終濃度 6.3-50% の各濃度に希釈したものを PASS (6.3-50%) と表した。

(3) PASS 中の活性酸素・窒素種 (RONS) の測定： H_2O_2 濃度は Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で測定した。20 倍希釈した試料(50 μ L/ウエル)を 96-ウエルプレートに入れ、100 μ M Amplex Red と horseradish peroxidase (0.2 U/mL) からなる working solution (50 μ L) を添加し、室温で 30 分間インキュベーションした。 NO_2^-/NO_3^- 濃度は、Griess assay Kit (NO_2^-/NO_3^- Assay Kit C11, Colorimetric Kit, Dojindo Molecular Technologies)を用いて、540 nm の吸光度を Nivo 3F マルチモードプレートリーダー(Perkin-Elmer)で測定した。 H_2O_2 ならびに NO_2^-/NO_3^- 濃度は、標準の H_2O_2 および $NaNO_2/NaNO_3$ による検量線を用いて、算出した。

(4)細胞内 ROS の産生：LM8 細胞を 6 ウエルプレートで 24 時間培養後、PASS(50%)または H_2O_2 (100 μ M) で 1 時間処理した。細胞を ROS Detection Assay Kit (Biovision)を用いて DCFH-DA FITC でラベルし、蛍光 FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン)で測定し、CellQuest Pro でデータを解析した。生細胞における ROS 産生のイメージングは FLUOVIEW FV10i (オリンパス)を用いて励起 495 nm、発光 529 nm で行った。

(5)細胞生存率、細胞膜統合性、細胞死測定：細胞生存率は、WST-8 アッセイにより既報 のように行った。細胞を 96 穴マイクロプレートに播き、PASS、Sal 単独または両者を添加し、72 時間後に Cell Counting Kit (Dojindo)を添加し 1 時間インキュベートして 450 nm の吸光度をプレートリーダーで測定した。アポトーシスは、Annexin-FITC で細胞膜統合性は 7-Amino-actinomycin D(7-AAD)でそれぞれ染色して FACSCalibur で測定し、CellQuest Pro ならびに Flowjo で定量化した。これにより、細胞は次の 4 つのポピュレーションに分類された：生細胞、Annexin⁻/7-AAD⁻; 前期アポトーシス細胞、Annexin⁺/7-AAD⁻; 後期アポトーシス細胞/死細胞、Annexin⁺/7-AAD⁺; ネクローシス細胞、Annexin⁻/7-AAD⁺。Live/Dead Viability/Cell Cytotoxicity Kit (Invitrogen)を用いて、細胞を Calcein-AM と EthD-1 で染色し、細胞の生死を判定した。

(6)オートファジー測定：細胞を 6 ウエルプレートで 24 時間培養後、種々の濃度の PASS で 24 から 48 時間処理した。細胞を Cyto-ID Autophagy Detection Kit を用いて、cyto-ID で染色し、FACSCalibur で測定し、データを CellQuest Pro ならびに Flowjo で解析した。

(7)ミトコンドリアネットワークの生細胞イメージング：細胞を 8 穴イメージングチェンバーに播き、接着後に 24 時間薬剤で処理した。FluoBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific) 中でミトコンドリアを MitoTracker CMXRos、細胞核を Hoechst33342 でそれぞれ染色して、100 x, 1.40 n.a. (UPlanSApo Super-Apochromat) 油浸レンズを用いて、生物顕微鏡(BzX-710, Keyence)で観察し、BZ-H3A ソフトウエアで解析した。

(8)ウエスタンブロッティング：ネクロトーシスに必要な RIP1 および RIP3 のリン酸化ならびにオートファジー調節に關与する mTOR 複合体キナーゼ活性化とその下流シグナル分子 Raptor (Ser792)、Rictor (Thr1135)、P70-S6 (Thr389)のリン酸化、オートファジー関連分子の LC3 I/II 発現と P62 のリン酸化(Ser351) について特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法で解析した。ロードコントロールとしては GAPDH を用いた。

(9) *In vivo* 抗腫瘍効果の検討：すべての実験は、日本学術会議動物実験の適切な実施に關するガイドラインに準じ、実験実施施設である山梨大学の動物実験倫理委員会の承認(No. 17-11)を得て行った。ホモ接合野生型 C3H/HeJcI マウス(日本クレア)は 22-24 °C、12 時間明暗サイクル下で標準飼料と自由摂水で飼育した。第 0 日に、イソフラン(ISOFLU®) (アボットジャパン)で麻酔したマウス(8 週齢)に、DMEM 0.1 mL にサスペンドした LM8 2×10^6 個を背部皮下に注入した。マウス各群 6 匹に、7 日後から、PASS または 担体(輸液剤)を週 3 回投与静注して、マウスの体重ならびに腫瘍の大きさを 1 週間に 1 回測定し、第 28 日に病理検査に供した。

(10)統計：実験は 3 回以上行い、データは平均値 \pm 標準偏差で表し、一元配置分散分析と Tukey 法で分析した。 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

(1) PASS は H_2O_2 ならびに NO_2^-/NO_3^- を含み、細胞内に ROS を産生させる：PASS の抗がん活性は、CAP の照射時間に比例し、照射対象の体積に反比例した。 H_2O_2 ならびに NO_2^-/NO_3^- の濃度も同様に CAP の照射時間に比例して増加した。 H_2O_2 の濃度は、CAP の照射時間が 0.2 分/mL ならびに 1 分/mL では、それぞれ 8.37 ± 0.29 and 124.6 ± 27.1 (μM) ($n = 3$)であった。同条件下で、 NO_2^- 濃度はそれぞれ 81.4 ± 0.21 および 1253.1 ± 12.5 (μM) ($n = 3$)であった。一方、 NO_3^- 濃度は検出限界(20 μM 未満) および 461.5 ± 76.8 (μM) ($n = 3$)であった。さらに、PASS は、LM8 細胞の細胞内 ROS レベルを増加させた。

(2) PASS は ROS 依存性に骨肉腫細胞の生存率を低下させる：PASS($\geq 12.5\%$)の 72 時間処理は、同濃度の輸液剤で処理した細胞に比較して有意にヒト HOS、MG63、143B、および SaOS-2 細胞ならびにマウス LM8 細胞の生存率を濃度依存的に抑制した。抗酸化剤 MnTBaP は、この効果を有意に抑制したが、オートファジー阻害剤 3-メチルアデニン(3-MA)は抑制しなかった。

(3) PASS はネクロトーシスを含むカスパーゼ非依存性細胞死を誘発する：PASS による細胞死を解析するために、PASS 処理した細胞の形態を観察した。PASS の濃度に依存して、接着性で紡錘形の細胞が、接着しにくくなり、縮小し円形を呈した。PASS は、濃度ならびに時間依存的に Annexin V 陰性 7-AAD 陽性細胞を増加させ、その効果はカスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK によって抑制されなかった。さらに、PASS は、RIP1 ならびに RIP3 のリン酸化を一過性に増加させた。

(4)PASS は LM8 同種移植癌の増殖を副作用なく抑制する：マウスの皮下に同種移植された LM8 細胞は急速に増殖して 4 週間後には約 400 mm^3 の大きさまで成長した。PASS の週 3 回投与は、この増殖を有意 ($*P < 0.05$) に抑制する一方で、体重減少や他の副作用を起こさなかった(図 1a)。

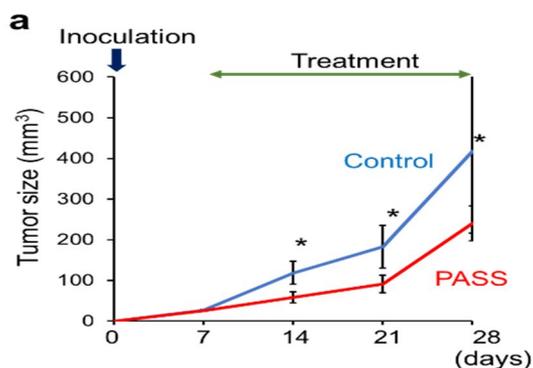


図 1a

(5)PASS は mTOR 複合体活性化を介してオートファジーを抑制する：PASS が骨肉腫細胞の保護的オートファジーに影響するかどうかを調べるために、オートファジーフラックスに対する作用を検討した。PASS 処理は、オートファゴソーム形成の特異的マーカーである Cyto-ID シグナルを抑制した。そこで、オートファジー抑制系である mTOR 複合体の活性化に対する作用をウエスタンブロッティングにより解析したところ、PASS は、mTOR キナーゼ 1 および 2 の基質である p70 S6 キナーゼおよび mTOR キナーゼ 1 および 2 の構成分子である Raptor と Rictor のリン酸化を増

加させた。一方、PASS は、オートファゴソーム形成に必須な LC3-II の発現を時間とともに低下させた。

(6)PASS と Sal は相互にアジュバント剤として作用する：Sal ($\geq 3 \mu\text{M}$)は単独で、細胞生存率を濃度依存的に減少させた。さらに、Sal 処理による細胞の形態変化は、PASS 処理で見られる変化と類似していた。PASS と Sal を併用投与すると、どちらかが効果を示さない濃度でも著しい相乗的な効果が見られた (図 2a,b)。

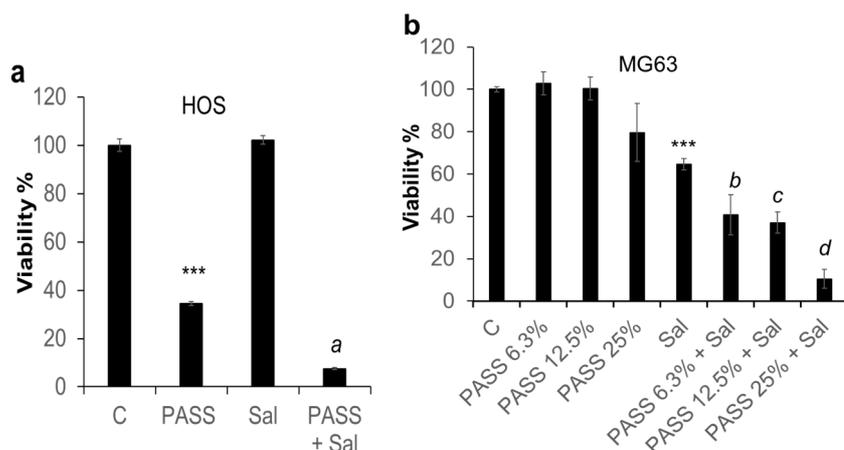


図 2 a, b

a: ***P < 0.001 vs. control; a, P < 0.001 vs. PASS or Sal alone

b: b, *P < 0.05; c, **P < 0.01; d, ***P < 0.001; vs. Sal alone. e, *P < 0.05; f, g, ***P < 0.001; vs. Sal alone. 一方、PASS(12.5 to 50%)による 72 時間処理はヒト正常肺繊維芽細胞(WI-38)や骨芽細胞の増殖をほとんど抑制しなかった (PASS 50%で最大 24%抑制)。

(7)PASS と Sal は協調的にミトコンドリアネットワークを攪乱する：次に、PASS のミトコンドリアネットワークに対する作用を検討した。そのために、PASS で 18 時間処理した細胞のミトコンドリアを MitoTracker Red CMXRos で、核を Hoechst33342 でそれぞれ染色後、顕微鏡観察した。コントロール細胞では、ミトコンドリアは傷害のない核の周囲に網状構造を作って分布した。PASS はこのネットワークを濃度依存的に攪乱した。細胞傷害性を示さない PASS (12.5%) は、低度なミトコンドリアの融合または分裂を起こした。これに対して、細胞傷害を起こす PASS (25%) は、著しいミトコンドリアの断片化、膨化ならびにクラスター形成を引き起こした。これらの変性ミトコンドリアは、縮小または断片化した核の一方の極に偏在した。PASS (50%) では、細胞、ミトコンドリア、核の構造が破壊された。これに対して、WI-38 細胞では、PASS (50%) でも低度なミトコンドリアの融合と最小限の核の変化しか認められなかった。さらに、Sal も同様なミトコンドリアネットワークの変化を起こし、併用投与するとその効果が増強された。

(8)研究の主な成果・国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究は、PASS が骨肉腫に対して、*in vitro*, *in vivo* の両方で、強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。さらに、PASS は *in vivo* でも高い腫瘍選択性を持ち、体重減少等の副作用を起こさないことがわかった。これらの知見は、PASS が安全な抗がん剤の候補となることを示した。PASS による細胞死は、カスパーゼ活性化に依存しない非カノニカルな反応で、ネクロトーシスが関与することが示唆された。また、PASS は、オートファジー抑制系である mTOR 複合体を活性化してオートファジーを抑制することが明らかとなった。最近我々は、骨肉腫では、栄養が十分でストレスのない条件下でも構造的にオートファジーフラックスが生じており、細胞死から保護することを明らかにしている (引用文献 1)。この知見を考慮すると、PASS の強力な抗腫瘍活性には、オートファジー抑制が寄与していると考えられる。近年、オートファジー阻害によって、種々の抗がん剤に対する耐性が低下することが報告され、オートファジーを標的とする抗がん剤やアジュバント剤の開発が盛んになっている。本研究の知見は、PASS が、このような薬剤の候補としても有力であることを示し、この分野に大きなインパクトを与えると考えられる。我々は、これまで PAM がミトコンドリアネットワーク異常を腫瘍選択的に誘発して、その抗腫瘍活性に深く関与することを報告してきた (引用文献 1,2) が、PASS も同様な作用を示すことが明らかとなった。ミトコンドリアネットワーク異常は刺激の程度、時間に応じて初期の融合、短縮化から後期の断片化、膨化、ならびにクラスター形成と段階的に起り、後期の反応が細胞死に必要であることが示唆された。ミトコンドリアネットワーク動態の細胞死制御における役割は、基礎生物学の最近のトピックスとなっているだけでなく、神経変性疾患、心臓病、糖尿病等の多種多様な疾患に関連することが明らかになり、医学的にも重要な分野になっている。PAM を含む

種々のプラズマ照射液の細胞死誘発のメカニズムは国内外で精力的に研究されているが、ミトコンドリアネットワークに対する作用は我々が世界に先駆けて見出したもので、そのメカニズムにおける活性酸素の役割や、腫瘍選択的毒性との関連の発見等によって、この分野を先導している。本研究の成果は、ミトコンドリアのネットワーク異常は、腫瘍特異的に惹起され細胞選択的毒性に必須であるというシナリオの一般性を強化するものである。この異常には、ROS によるミトコンドリアネットワーク調節遺伝子の修飾が関与することを見出しているため今後、このメカニズムについてさらに解析したい。

本研究から、Sal の骨肉腫に対する抗腫瘍活性が明らかとなった。PubMed での調査によれば、現在のところ、Sal の骨肉腫に対する抗腫瘍効果についての報告は世界全体でわずかに 6 例だけである。しかし、より重要な成果は、PASS と Sal の抗腫瘍効果における相乗的作用の発見である。細胞の PASS ならびに Sal に対する感受性は、細胞の状態（おそらくは環境的なオートファジーの程度）に応じて、変動すると見られる。両者を併用することで、この変動を最小限にして、安定な抗がん効果を得ることができる。現在、*in vivo* における両者の併用投与の抗腫瘍効果を検討中である。Sal 自体が、骨肉腫を含むがん幹細胞に抗腫瘍効果を示すことが報告されているので、この併用投与は、薬剤耐性細胞の治療にも有効となることが期待される。さらに、特筆すべき成果は、Sal が、PASS と同様のミトコンドリアのネットワーク異常を誘発し、この作用においても相乗効果が認められたことである。この結果は、両者の作用機序が類似していることを示唆する。興味あることに、Sal が、オートファジーを抑制することが他の腫瘍細胞系で報告されている。また、異なるオートファジー阻害剤が、共通して、PASS および Sal と同様のミトコンドリアのネットワーク異常を誘発することが報告されている（引用文献 3）。これらの知見を考え合わせると、Sal も PASS と同様にオートファジーを抑制することが期待されるが、他方で、Sal がオートファジーを活性化することも報告されており、その検証は今後の課題である。

<引用文献>

Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL. Ito T et al. *Int. J. Oncol.* 53, 503-514, 2018. doi: 10.3892/ijo.2018.4413.

Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. Saito K et al. *Oncotarget* 2016 7, 19910-19927. doi: 10.18632/oncotarget.7889.

Autophagy inhibitors regulate TRAIL sensitivity in human malignant cells by targeting the mitochondrial network and calcium dynamics. Onoe-Takahashi A et al. *Int. J. Oncol.* 54, 1736-1746, 2019. doi: 10.3892/ijo.2019.4760.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tomohisa Ito,1 Takashi Ando,2 Miki Suzuki-Karasaki,1,3 Tomohiko Tokunaga,4 Yukihiro Yoshida,1 Toyoko Ochiai,5 Yasuaki Tokuhashi,1 and Yoshihiro Suzuki-Karasaki3,6	4. 巻 53
2. 論文標題 Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 503-514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 3.Takata N, Ohshima Y, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y	4. 巻 51(1)
2. 論文標題 Mitochondrial Ca ²⁺ removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis-resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 193-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2017.4020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 2.Ohshima Y, Takata N, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y.	4. 巻 51(4)
2. 論文標題 Disrupting mitochondrial Ca ²⁺ homeostasis causes tumor-selective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 1146-1158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2017.4096	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安藤 隆 (ANDO Takashi) (10377492)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鈴木 良弘 (SUZUKI Yoshihiro) (80206549)	一般社団法人プラズマ化学生物学研究所・研究部・代表理事 (82208)	