

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K20995

研究課題名（和文）放電プラズマを非腫瘍部へ照射したときの癌の免疫効果の検証

研究課題名（英文）Study of anti-tumor immune effect induced by plasma irradiation to normal tissue

研究代表者

小野 亮（Ono, Ryo）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：90323443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍を有するマウスの非腫瘍部にプラズマを照射したときに、照射部から離れた腫瘍に抗腫瘍効果が得られることを示した。マウスの背中左上付近にプラズマを1日10分間、計5日間照射すると、照射部から離れた右脇腹にあるマウス大腸がんColon-26腫瘍の成長が遅れることが観測された。この効果が得られるのは、プラズマ照射初日の腫瘍体積がある程度小さい必要があることが示された。免疫不全マウスを用いた実験により、この正常組織照射による抗腫瘍効果はT細胞由来の適応免疫が効いていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がんを有するマウスの正常組織に放電プラズマを照射すると、照射部から離れた場所にある腫瘍に抗腫瘍効果が得られることを示した。そして、この効果がマウスの抗腫瘍免疫反応によるものであることを示した。このような現象は、他の放射線治療などの分野でもほとんど観測されたことはなく、副作用が比較的小さいと考えられているプラズマの正常組織照射による、新たながん治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, it was shown that plasma irradiation to normal tissue of tumor-bearing mice have an anti-tumor effect on tumors distant from the irradiated area. When plasma was irradiated to the upper left back of the mice for 10 minutes a day for a total of 5 days, it was observed that the growth of mouse colon cancer Colon-26 tumor on the right flank, located far from the irradiated area, was slowed. This effect was observed only when the tumor volume on the first day of plasma irradiation was relatively small. Experiments using immunodeficient mice suggested that this antitumor effect of normal tissue irradiation was due to T cell-derived adaptive immunity.

研究分野：プラズマ応用工学

キーワード：プラズマ医療 がん治療 免疫治療 正常組織照射 ストリーマ放電

1. 研究開始当初の背景

放電プラズマでがんを治療するプラズマ医療の研究が、国内外で精力的に進められている。2012～2016年には「プラズマ医療科学の創成」が科研費の新学術領域で採択され、新しい研究分野として大きく期待されている。その中で、我々はプラズマをがんの免疫治療に使える可能性を世界で初めて動物実験で示し、画期的な成果として注目を集めてきた。具体的には、左右両脚つけ根にメラノーマ腫瘍を有するマウスの、右脚の腫瘍にプラズマを照射すると、メラノーマに対するマウスの免疫が活性化し、照射部位から離れた左脚の腫瘍にも抗腫瘍効果が表れる遠達効果を観測した。また、右脚つけ根のみにメラノーマ腫瘍を有するマウスの腫瘍をプラズマ照射し、マウスの抗腫瘍免疫を向上させた後に腫瘍を切除すると、切除後の再発が免疫により抑制される再発抑制効果も観測された。また、この免疫の効果が数週間以上にわたり長期間持続する、免疫記憶効果も確認した。近年では、他の研究グループからも、プラズマ照射による抗腫瘍免疫を動物実験で観測した例が、いくつか報告されている。

がんの免疫治療は、近年、免疫チェックポイント阻害剤とよばれる免疫治療薬が開発され、臨床で広く用いられている。免疫チェックポイント阻害剤は高価であり、患者の10～30%にしか効かないという問題があるものの、有効な治療法として大きく注目されている。一方、プラズマは極めて安価で、かつ副作用も少ないことが海外の数千人規模の治験で示されており、プラズマによるがんの免疫治療が確立されれば、小さな副作用でがんの免疫治療ができる、全く新しいがんの治療法につながる可能性がある。このように、プラズマはがん免疫治療の新たな一手となる大きな可能性を秘めているが、実際の治療において体内の腫瘍にどのようにプラズマを照射するかという問題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、この「プラズマを体内の腫瘍に照射する」問題を解決するため、プラズマを腫瘍ではなく非腫瘍部に照射し、がんに対する免疫効果が得られるかどうかを検証することを目的とする。具体的には、右脇腹に腫瘍を有するマウスに対して、プラズマをマウスの背中左上付近に照射し、右脇腹の腫瘍に抗腫瘍効果が得られるかどうかを検証する。そして、この正常組織照射による抗腫瘍効果が得られる条件を探索するとともに、その機序の解明も行う。機序の解明は、試薬や抗体を用いた生化学的分析に加え、プラズマの何が効いているかを調べるためのプラズマ計測およびシミュレーションも行う。

本研究で、正常組織照射による抗腫瘍効果が得られれば、画期的な治療法につながる可能性がある。正常組織照射で抗腫瘍免疫が得られれば、この免疫は長期間、全身に対して効果があるので、転移した癌にも効果を発揮する可能性がある。仮にプラズマ単独では効果が弱ければ、プラズマを他の治療法と併用することもできる。例えば、腫瘍切除の手術前にプラズマを非腫瘍部に照射して患者の免疫を高め、予後の再発や転移を抑制するといった使い方が考えられる。放射線治療や抗がん剤と併用して、免疫の力でこれらの治療効果を高める手法も考えられる。また、数年前から臨床で広く使われるようになった、免疫チェックポイント阻害剤との併用も考えられる。

3. 研究の方法

マウス大腸がん細胞 (Colon-26) を C57BL/6J マウスの右脇腹に皮下注射して、腫瘍を形成する。注射から6日目に、マウスの背中左上の正常組織に対して、プラズマを1日10分間、連続して計5日間照射する。そして、その後の腫瘍サイズの日ごとの増加を計測し、正常組織のプラズマ照射により腫瘍の成長を遅らせることができるかどうかを観察する。プラズマは、電圧値25 kV、パルス幅20 ns程度のパルスストリーマ放電を用い、これを100 Hzで照射する。プラズマ医療ではプラズマで生成される活性酸素種が効いていると考えられているため、これらを多く生成する加湿酸素ガスを0.5 L/minで放電領域に流す。

腫瘍サイズの観察と平行して、機序解明のための生化学分析も行う。腫瘍サイズがある程度大きくなったところで腫瘍を切除し、腫瘍に含まれる様々な免疫細胞をフローサイトメトリー (FACS) で計測する。計測する免疫細胞は、好中球、単球、マクロファージ、樹状細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、キラーT細胞の7種とする。プラズマの正常組織照射により、これらの腫瘍内免疫細胞の数が変化するかどうかを調べる。

本研究で用いるパルスストリーマ放電の、何が抗腫瘍効果に効いているかを調べる研究の一環として、プラズマ医療で効果が高いと考えられているOHラジカルの計測および、酸素系活性種の代表であるオゾンのレーザー計測を行う。本研究では背景ガスに空気ではなく加湿酸素を用いているため、特に酸素濃度の影響に注目した計測を行う。また、関連して、ストリーマ放電のシミュレーションの開発も行う。

4. 研究成果

正常組織をプラズマ照射したときの、腫瘍の成長の遅れを計測する実験では、プラズマの抗腫瘍効果が現れる場合と現れない場合があった。プラズマの効果が現れた時の実験結果の例を図1に示す。グラフの線1本ずつがマウス1匹ずつの腫瘍体積を表している。図1の「CTRL」はプラズマを照射していない参照群、「背中照射」は正常組織にプラズマを照射した群、「腫瘍照射」は腫瘍にプラズマを照射した群である。正常組織照射群及び腫瘍照射群は、同程度に腫瘍の成長が抑えられていることが分かる。正常組織照射でも、照射部位から離れた箇所の腫瘍に抗腫瘍効果が現れる、いわゆる「遠達効果」が得られることを示している。一方で、この結果とは対照的に、プラズマ照射の効果がほとんど観測されない実験も何回かあった。これらの実験データをすべてまとめて分析した結果、プラズマ照射を開始する6日目（がん細胞の注射日を0日目とする）の腫瘍体積が、 70 cm^{-3} 以下の場合にはプラズマの効果が現れやすく、 100 cm^{-3} を超える場合は効果が現れにくい傾向が判明した。一方、参照群では6日目の腫瘍体積によらず、同程度に腫瘍は成長した。6日目の腫瘍体積が 70 cm^{-3} 以下の群のみ選択して統計分析にかけると、 $p < 0.01$ の有意差で正常組織照射によるプラズマの抗腫瘍効果が観測された。このような正常組織照射による抗腫瘍効果は、放射線治療などの研究でもほとんど報告された例はなく、有意差をもってこのような効果を観測できたことは、今後の新たながん治療法の開発に向けた一歩になると期待される。本研究成果は、*Journal of Physics D: Applied Physics* のレターに掲載された[1]。

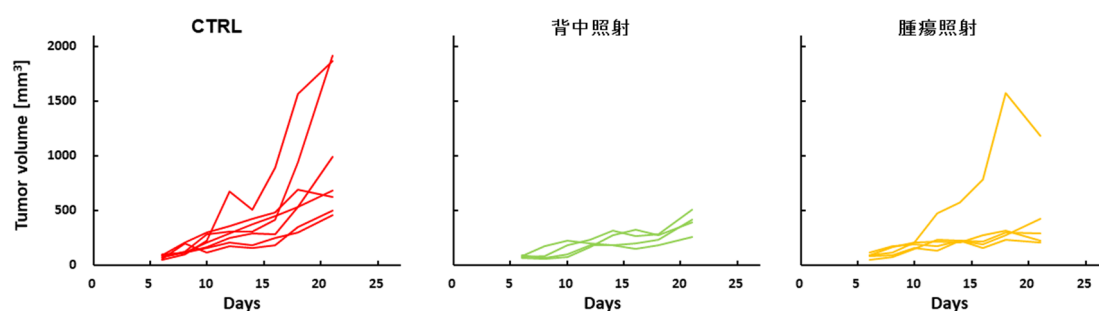


Fig. 1 腫瘍成長曲線。左から順に参照群、正常組織照射群、腫瘍照射群。

正常組織照射による抗腫瘍効果が免疫によるものかを調べるため、免疫不全マウスを用いた実験も行った。適応免疫に必要なT細胞およびB細胞を欠損したSCIDマウスを用いた実験では、正常組織照射による抗腫瘍効果は観察されなかった。また、T細胞のみ欠損したnu/nuマウスを用いた実験でも、正常組織照射による抗腫瘍効果は観察されなかった。これらの結果から、正常組織照射による抗腫瘍効果には、T細胞由来の適応免疫が必要であることが示唆された。

正常組織照射で抗腫瘍適応免疫が誘起される理由を調べるには、さらなる分析が必要である。そこで、正常組織照射したマウスの腫瘍内免疫細胞を調べるFACS計測も行った。FACS計測の実験は計6回行い、腫瘍を採取する日数も何通りか変化させた実験を行ったが、計測した7種類の免疫細胞にプラズマ照射による変化は観察されなかった。

本研究では、正常組織照射による抗腫瘍遠達効果を、有意差有りて観測することに成功した。免疫不全マウスを用いた実験により、この現象にはT細胞由来の適応免疫が効いていることが示唆された。一方、腫瘍内免疫細胞のFACS計測では、測定した免疫細胞群に正常組織照射による変化は観察されず、正常組織照射によりどのようにT細胞由来の適応免疫が誘起されるのか、未だ不明である。将来、この手法を臨床に用いるには機序の解明は必須であり、今後さらなる研究が必要である。また、プラズマ照射条件は1通りしか用いておらず、照射条件の最適化は行っていない。この最適化を将来行えば、より強い抗腫瘍効果が得られることか期待される。このように、未だ多くの課題が残されているが、本研究では正常組織照射による抗腫瘍遠達効果が少なくとも存在することを明らかにしたことで、十分な研究成果を得ることができた。

[1] R. Jinno et al, "Antitumor abscopal effects in mice induced by normal tissue irradiation using pulsed streamer discharge plasma," *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 55, 17LT01 (2022)

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jinno Reima, Komuro Atsushi, Yanai Hideyuki, Ono Ryo	4. 巻 55
2. 論文標題 Antitumor abscopal effects in mice induced by normal tissue irradiation using pulsed streamer discharge plasma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 17LT01 ~ 17LT01
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6463/ac4c23	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 Komuro Atsushi, Ryu Terumasa, Yoshino Akihiro, Namihira Takao, Wang Douyan, Ono Ryo	4. 巻 54
2. 論文標題 Streamer propagation in atmospheric-pressure air: effect of the pulse voltage rise rate from 0.1 to 100 kV ns ^{<sup>?1</sup> and streamer inception voltage}	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 364004 ~ 364004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6463/AC0B0F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Ryo, Zhang Xiang, Komuro Atsushi	4. 巻 53
2. 論文標題 Effect of oxygen concentration on the postdischarge decay of hydroxyl density in humid nitrogen-oxygen pulsed streamer discharge	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 425201 ~ 425201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6463/ab98c3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 神野 玲磨, 小室 淳史, 柳井 秀元, 小野 亮
2. 発表標題 マウス正常組織へのプラズマ照射による大腸がん腫瘍の成長抑制効果と原理解明
3. 学会等名 2022年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 和田 健吾, 神野 怜磨, 小室 淳史, 柳井 秀元, 小野 亮
2. 発表標題 免疫不全マウスの正常組織に対するプラズマ照射の抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 2022年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉野 彰浩, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 大気圧02/N2中における正極性シングルフィラメントストリーマ放電の特性計測
3. 学会等名 2022年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Z. Wei, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Simulation Study for Influence of the Ionization Rates on Positive Primary Streamer Propagation
3. 学会等名 2022年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Z. Wei, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Two-Dimensional Simulation of atmospheric single-filament streamer with finite element method
3. 学会等名 Japan-Ruhr University Bochum Workshop, Bridging the Pandemic: Reigniting Cooperation on Plasma Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Ono and A. Komuro
2. 発表標題 Validation of streamer discharge simulation with measurements
3. 学会等名 Japan-Ruhr University Bochum Workshop, Bridging the Pandemic: Reigniting Cooperation on Plasma Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 R. Ono, R. Jinno, A. Komuro, and H. Yanai
2. 発表標題 Anti-tumor abscopal effect on CT26 tumor in mice induced by electrical discharge plasma irradiation on normal tissue
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Z. Wei, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Two-dimensional simulation of single filament streamer discharge in atmospheric pressure air
3. 学会等名 8th East Asia Joint Symposium on Plasma and Electrostatics Technologies for Environmental Applications (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 A. Yoshino, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Measurements of single-filament pulsed positive streamer discharge and two-dimensional ozone density distribution in atmospheric-pressure nitrogen-oxygen mixture - effects of oxygen concentration
3. 学会等名 74th Annual Gaseous Electronics Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. Inada, T. Shioda, R. Nakamura, M. Maeyama, A. Kumada, and R. Ono
2. 発表標題 High spatial resolution measurement of electric field in positive secondary streamer discharge under atmospheric-pressure air
3. 学会等名 74th Annual Gaseous Electronics Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神野 玲磨, 小室 淳史, 柳井 秀元, 小野 亮
2. 発表標題 マウス正常組織へのプラズマ照射による大腸がん腫瘍の成長抑制効果
3. 学会等名 第45回静電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Z. Wei, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Development of the simulation model of an atmospheric-pressure streamer discharge in air by using COMSOL
3. 学会等名 第45回静電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野 彰浩, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 正極性シングルフィラメントストリーマ放電の $O_2(v = 6)$ 計測 酸素濃度による影響
3. 学会等名 第45回静電気学会全国大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 電圧立ち上がり速度と電極曲率による1次ストリーマの制御
3. 学会等名 38th Symposium on Plasma Processing/33rd Symposium on Plasma Science for Materials
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲田 優貴, 塩田 達俊, 中村 亮介, 小野 亮, 前山 光明
2. 発表標題 空間制御された大気圧空気中正極性2次ストリーマ放電に対する電子密度、換算電界、発光強度の包括的測定
3. 学会等名 38th Symposium on Plasma Processing/33rd Symposium on Plasma Science for Materials
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神野 玲磨, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 活性種によるガン細胞への効果の定量的評価
3. 学会等名 38th Symposium on Plasma Processing/33rd Symposium on Plasma Science for Materials
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野 彰浩, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 正極性シングルフィラメントストリーマ放電の進展とレーザー誘起蛍光法を用いたオゾン密度計測-酸素濃度による影響
3. 学会等名 38th Symposium on Plasma Processing/33rd Symposium on Plasma Science for Materials
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉野 彰浩, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 正極性シングルフィラメントストリーマの進展計測とオゾン密度計測 酸素濃度による影響
3. 学会等名 2021年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀部 ひかり, 中川 雄介, 小室 淳史, 小野 亮
2. 発表標題 大気圧He/02プラズマジェットの0密度計測
3. 学会等名 2021年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

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
研究協力者	柳井 秀元 (Yanai Hideyuki)		なし

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------