

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82208

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09217

研究課題名(和文) 空気プラズマ照射液による骨軟部腫瘍の革新的治療法の創出

研究課題名(英文) Innovative treatment of soft tissue tumors by air plasma-activated medium

研究代表者

鈴木 良弘 (Suzuki, Yoshihiro)

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

研究者番号：80206549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧空気プラズマ照射液が骨肉腫などの骨軟部腫瘍細胞を強く傷害する一方で正常細胞はほとんど傷害しないことを発見した。そのメカニズムとしては、腫瘍細胞のミトコンドリアの中に含まれる鉄と活性酸素の反応による過酸化脂質の生成を促してミトコンドリアの中に酸化ストレスを起こし、その性質を細胞破壊的な酸化型に変えてしまうことであることがわかった。酸化型となったミトコンドリアは核近くに移動し傷害の要因になる。このようなミトコンドリアの変化が腫瘍細胞だけに起こり、正常細胞では起こらないことが空気プラズマ照射液の腫瘍細胞特異的な傷害性の仕組みのひとつであることが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、空気プラズマは骨軟部腫瘍細胞に鉄依存性経路による細胞傷害を誘導し、ミトコンドリア内酸化ストレスとそれによるミトコンドリアの酸化型への転換と核への接近が重要であることやこの誘導が腫瘍選択的に起こることを初めて明らかにしたことである。この成果は、空気プラズマ照射液による腫瘍標的型治療の分子基盤を提供し、ミトコンドリア内酸化ストレスが腫瘍細胞選択的な傷害のための有力な標的となることを示して副作用の少ないがん治療につながる。

研究成果の概要(英文)：We discovered that a non-thermal atmospheric air plasma-treated solution strongly damages bone and soft tissue tumor cells, such as osteosarcoma, while causing minimal damage to normal cells. The underlying mechanism is that it promotes the production of lipid peroxides through a reaction between iron contained in the mitochondria of tumor cells and reactive oxygen species, causing oxidative stress in the mitochondria and changing their properties to an oxidative form that is destructive to cells. The oxidative mitochondria then move closer to the nucleus and become a cause of nuclear damage. Our findings revealed that this type of mitochondrial change occurs only in tumor cells but not in normal cells, and this is one of the mechanisms behind the tumor cell-specific damage by air plasma-treated solution.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 活性酸素 一酸化窒素 オゾン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫に代表される骨軟部腫瘍の標準治療による治療は進展した腫瘍では非常に困難となり、画期的な治療法が切望されている。その治療抵抗性にはアポトーシス耐性が大きく寄与しているので、別の細胞死の誘発はその新たな制御法として期待できる。フェロトーシスは鉄依存性の制御されたネクローシスで、近年がん細胞死における関与が注目されている。低温大気圧プラズマは、室温、大気圧下で作成されるプラズマで、その直接照射や照射液は腫瘍細胞特異的な増殖抑制作用を持ち、アポトーシスならびに非アポトーシスを誘発することから画期的ながん治療ツールとして期待されている。われわれは、空気プラズマを細胞培養液に照射した空気プラズマ照射液 (Air plasma-activated medium, APAM) が、骨肉腫(LM8, HOS, 143B)や線維肉腫(HT1080)細胞の増殖を鉄依存性に抑制し、細胞死を増加させることを発見した。さらにこの細胞死には最近われわれが発見した細胞死に関連する特異的なミトコンドリアの形態と細胞内分布変化、すなわち、その断片化と傷害された細胞核の片側の辺縁部への集合、単極性核辺縁部ミトコンドリア凝集 Monopolar perinuclear mitochondrial clustering, MPMC) が付随した。

### 2. 研究の目的

APAM の鉄依存性の増殖抑制作用のメカニズムを MPMC の役割に焦点を当てて明らかにする。この細胞死の性質を解析してフェロトーシスとの関連性を明らかにする。これらの知見に基づき APAM による MPMC を標的とした骨軟部腫瘍に対する新規な制御法の分子的基盤を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

**細胞:** 骨軟部腫瘍細胞として、ヒト骨肉腫(LM8, HOS, 143B)、線維肉腫(HT1080)細胞を、正常細胞としてヒト皮膚線維芽細胞 HDF ならびにヒト肺線維芽細胞 WI-38 をそれぞれ用いた。細胞は、10%ウシ胎児血清(GIBCO、Life Technologies) 100U/ml Penicillin、100 µg/ml Streptomycin を含むダルベッコ培地(DMEM、GIBCO、Life Technologies)で 37 °C、95%空気 5%CO<sub>2</sub> 下に培養した。**APAM 作製:** ピエゾプラズマジェット(Piezobrush PZ2、Relyon、ドイツ)を用いて空気プラズマを周囲の空気から作成した。APAM は、プラズマを液面上 20 mm からフェノールレッド不含 DMEM 1 mL あたりに 1 分照射して調製した。**APAM 中の酸化物の測定:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は Hydrop-EX (五稜化薬) で NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度は、キット (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> Assay Kit CII, Colorimetric Kit, Dojindo) を用いてグリース法でそれぞれ測定した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ならびに NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 濃度は、標準の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および NaNO<sub>2</sub>/NaNO<sub>3</sub> による検量線を用いて、算出した。オゾン(O<sub>3</sub>)濃度はオゾンデジタルパックテスト (DPM2-O<sub>3</sub>、共立化学工業) およびポーラログラフィ O<sub>3</sub> メーター (DOZ-1000PE、株式会社カスタム) で測定した。**細胞増殖の測定:** 96 穴プレートに接着させた細胞を 72 時間薬剤処理した後、WST-8 アッセイ (Cell count Reagent SF, ナカライテスク) で測定した。**細胞死モードおよび細胞膜統合性の解析:** 細胞を Annexin-FITC ならびに 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) で染色して FACSCalibur で測定し、CellQuest Pro ならびに Flowjo で定量化した。**生細胞イメージング:** ミトコンドリア、細胞内活性酸素(ROS)、過酸化脂質の動態は、すべて生細胞イメージングで解析した。細胞をポリリジンコート 35 mm ディッシュにまき、一晚培養した。ミトコンドリア動態は、薬剤処理した細胞を洗浄後、ミトコンドリアを MitoTracker Red または Green (MTR/MTG) でそれぞれ染色し、核はヘキスト 33342 で対比染色した。ROS はそれぞれの化学種に特異的なプローブを用いて検出した。細胞内ならびにミトコンドリア 2 価鉄はそれぞれ FerroOrange (Dojindo) と MitoFerroGreen (MTFG、五稜化薬) で検出した。試料は生物顕微鏡 BZ X-700 (キーエンス) で TRITC、GFP および DAPI フィルターを用いて、40 倍レンズまたは 100 倍油浸レンズで観察し BZ-H3A ソフトウエアで解析した。**タイムラプス解析:** プローブを負荷した細胞に薬剤を添加後に顕微鏡インキュベーターシステム(細胞培養チャンバーC070T、温度 & CO<sub>2</sub> 制御装置 BE052A、プラスト社)で培養しながら H3XT タイムラプスモジュール(キーエンス)を用いてシグナルを BZ X-700 で経時的にモニターした。**Caspase 活性化解析:** アポトーシスの指標である、Caspase-3 活性化を評価するために、切断型 Caspase-3 の増加ならびに完全長 Caspase-9 の減少をそれぞれの分子に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットティングにより解析した。**統計:** 実験は 3 回以上行い、データは平均値 ± 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

APAM は試験した骨肉腫ならびに線維肉腫細胞すべての増殖を濃度依存的に抑制し、細胞死を誘発した。これに対して、APAM は腫瘍細胞に有効な濃度で正常線維芽細胞の増殖や生存にはほとんど影響しなかった。さらに、LM8 ならびに 143B 移植マウスでこれらの腫瘍の増殖を抑制する一方で体重減少などの副作用を起さず、高い腫瘍選択的毒性を示した(Suzuki-Karasaki M et al., Int J Mol Sci 2022)。細胞形態、アネキシン V/7-AAD 染色、細胞膜統合性、およびウエスタンブロットティングによるカスパーゼ活性化の解析の結果、細胞株によってアポトーシスまた

はカスパーゼ非依存性細胞死が増加することが示された。しかし、後者は RIP1/3 阻害剤やリソソーム不安定化剤では抑制されないことからネクロトーシスやオートファジー細胞死の寄与は小さいと考えられた。一方、この細胞死は、抗酸化剤ならびに鉄キレート剤で抑制される点がフェロトーシスと類似していた。

そこで次に細胞死がフェロトーシスであるかどうかを検討した。フェロトーシスを起こした細胞の形態学的特徴は細胞質の抜けた風船型球状細胞の出現であるが、APAM 処理細胞でも同様の形状が観察された。しかし、フェロトーシスでは細胞核の形態には変化がないとされているのに対して APAM 処理細胞では、明らかな核の変形、縮小、分解が認められた。フェロトーシス細胞のもう一つの特徴は、ミトコンドリア形態の変化で、電子顕微鏡でミトコンドリアの体積減少、密度増加、外膜崩壊、およびクリステの消失が観察される。APAM 処理によって、ミトコンドリア形態だけではなく細胞内分布に特徴的な変化が起きることを発見した。ミトコンドリア形態変化は APAM の濃度や処理時間に応じて分裂から断片化、膨化、ならびに MPMC と段階的に起こった。MPMC とはミトコンドリアが断片化した後に核の片側の辺縁部に集合する現象である (Suzuki-Karasaki M et al., Int J Mol Sci 2022)。この変化は腫瘍細胞特異的で細胞死に相関して見られ、またこれまで報告されている細胞保護的なミトコンドリアの細胞内分布とは異なる。MPMC には ROS と微小管を介するミトコンドリアの移動が関与した。

シスチントランスポーターに作用する典型的なフェロトーシス誘発剤エラスチンも細胞増殖を抑制し、細胞死を増加させ、その効果は鉄キレート剤ならびにフェロスタチン 1 (Fer-1) で抑制された。これに対して、APAM による増殖抑制作用の Fer-1 に対する感受性は細胞の状態によって顕著に変動した。これらの結果は APAM による鉄依存性細胞死がフェロトーシスだけではない可能性を示した。そこで、APAM とエラスチンの生物学的作用を詳細に比較した。まず、APAM とは異なり、エラスチンは核およびミトコンドリア形態にほとんど変化を与えなかった。また、両者とも細胞質の過酸化脂質 (LPOs) を増加させたが、APAM 処理細胞では特異的にミトコンドリア内での増加が見られた。この増加には  $H_2O_2$  やヒドロキシルラジカルの増加が付随することからフェントン反応の関与が強く示唆された。以上の結果から APAM は典型的なフェロトーシスとは異なる鉄依存性細胞死を誘発できること、MPMC がこの細胞死に特異的に関与することと推測される。この細胞死では Fer-1 の標的とされている脂質ラジカル種とは別のラジカル種生成による別経路で LPOs が産生されると考えられる。

MPMC は ROS と微小管リモデリングを介して誘発され、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の消去酵素であるカタラーゼで抑制された。APAM は  $10 \mu M$  程度の  $H_2O_2$  を含み、細胞内の  $H_2O_2$  ならびに、ミトコンドリア内にスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、脂質ラジカルを増加させた。カタラーゼは MPMC、微小管リモデリングならびに APAM の増殖抑制作用を抑制することから  $H_2O_2$  が重要なメディエーターとなることがわかった。しかし、最大  $100 \mu M$  までの  $H_2O_2$  を細胞外から添加しても抗腫瘍効果を含む APAM の生物学的作用は模倣できなかった。この結果は、他の酸化物がメディエーターとして関与することを示唆した。

APAM 作製中にオゾン ( $O_3$ ) の生成をその独特の臭気から発見した。 $O_3$  は  $H_2O_2$  よりも強い酸化力を持ち、かなり水に溶けて、細胞膜を傷害できるので、APAM 中の溶存  $O_3$  が酸化ストレスを起こして増殖抑制作用のメディエーターとなると考え、この仮説を検証した。APAM 中には数十 mg/L の高い濃度の  $O_3$  が存在することを見出した。さらに、高濃度の  $O_3$  溶液は APAM と同レベルの  $O_3$  と  $H_2O_2$  を含んでいた。 $O_3$  溶液は APAM と同等の抗腫瘍作用を  $H_2O_2$  依存性に発揮した (Suzuki-Karasaki M et al. Eur J Cell Biol 2023)。また、ミトコンドリア酸化ストレス、微小管リモデリング、および MPMC を  $H_2O_2$  依存性に誘発した。APAM と同様に、 $O_3$  溶液も非腫瘍細胞では MPMC も細胞毒性も示さなかった。さらに、フェロトーシスならびに別の鉄依存性細胞死を増加させた。Fe (II) プローブを用いた生細胞イメージングから APAM と  $O_3$  溶液はともにオルガネラ内の不安定 Fe (II) を減少させることを見出した。 $O_3$  が水に溶けると  $H_2O_2$  ならびにヒドロキシルラジカルが生成されるので、 $O_3$  が APAM 中の  $H_2O_2$  の産生源のひとつであり、抗腫瘍作用の最も重要なメディエーターであると考えられる。 $O_3$  からの直接的、または  $H_2O_2$  と Fe (II) による間接的なヒドロキシルラジカル生成がフェロトーシスなどの酸化的細胞死の誘発につながると思われる。現在さらに APAM/ $O_3$  溶液による酸化ストレス増加による酸化的細胞死経路の分子レベルでの解析を行っている。

APAM/ $O_3$  溶液による増殖抑制作用に対して高密度の腫瘍細胞は抵抗性を示し、その抵抗性はグルタチオン合成やカタラーゼ活性阻害剤によって解除できることを発見した (Suzuki-Karasaki M et al. Eur J Cell Biol 2023)。この結果は高密度の腫瘍細胞は腫瘍幹細胞性を持ち、薬剤耐性を示すことが報告されていることと一致する。さらに、この発見は将来の臨床応用において予測される APAM/ $O_3$  溶液抵抗性細胞の出現に対する有効な方策を提示している。APAM/ $O_3$  溶液に対する感受性は細胞の増殖状態によって大きく変動し、臨床では感受性の個人差がさらに大きいと考えられる。われわれの発見はこの感受性の変動が抗酸化系活性の変動によることを示唆する。また、抑制剤の併用により APAM/ $O_3$  溶液の有効性を高め、また使用濃度の減少により有害事象を抑制することができるので、治療効果を増大させることができる。今後、これらのアジュバント作用を多剤耐性細胞や腫瘍幹細胞でも確認し、将来の臨床応用につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ochiai Yushi, Suzuki-Karasaki Manami, Ando Takashi, Suzuki-Karasaki Miki, Nakayama Hideki, Suzuki-Karasaki Yoshihiro	4. 巻 103
2. 論文標題 Nitric oxide-dependent cell death in glioblastoma and squamous cell carcinoma via prodeath mitochondrial clustering	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151422 ~ 151422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2024.151422	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 Suzuki-Karasaki Manami, Ochiai Yushi, Inami Shizuka, Okajima Hiroshi, Suzuki-Karasaki Miki, Nakayama Hideki, Suzuki-Karasaki Yoshihiro	4. 巻 102
2. 論文標題 Ozone mediates the anticancer effect of air plasma by triggering oxidative cell death caused by H2O2 and iron	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 151346 ~ 151346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejcb.2023.151346	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 Ando Takashi, Suzuki-Karasaki Manami, Suzuki-Karasaki Miki, Ichikawa Jiro, Ochiai Toyoko, Yoshida Yukihiro, Haro Hirotaka, Suzuki-Karasaki Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Combined Anticancer Effect of Plasma-Activated Infusion and Salinomycin by Targeting Autophagy and Mitochondrial Morphology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 2041~2041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2021.593127	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 Suzuki-Karasaki Manami, Ando Takashi, Ochiai Yushi, Kawahara Kenta, Suzuki-Karasaki Miki, Nakayama Hideki, Suzuki-Karasaki Yoshihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Air Plasma-Activated Medium Evokes a Death-Associated Perinuclear Mitochondrial Clustering	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23031124	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 鈴木良弘、鈴木真奈美
2. 発表標題 Changes in mitochondrial morphology and positioning in cancer cell death caused by mitochondria oxidative stress
3. 学会等名 26th International Symposium on Molecular Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木真奈美、落合祐之、印南静加、岡嶋洋、鈴木美喜、中山秀樹、鈴木良弘
2. 発表標題 Ozone exhibits antitumor activity by triggering mitochondria targeted oxidative cell death
3. 学会等名 26th International Symposium on Molecular Medicine (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木真奈美、落合祐之、印南静加、岡嶋洋、鈴木美喜、中山秀樹、鈴木良弘
2. 発表標題 Aqueous ozone exhibits tumor-targeting anticancer activity via death-associated perinuclear mitochondrial assembly
3. 学会等名 14th world congress on Targeting Mitochondria (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 落合祐之、鈴木真奈美、鈴木美喜、鈴木良弘
2. 発表標題 Glioblastoma cell death induced by cold atmospheric plasma through an iron-dependent pathway
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山秀樹、鈴木真奈美、川原健太、篠原光祐、平山真弓、鈴木良弘
2. 発表標題 空気プラズマによるミトコンドリアを標的とした口腔癌治療の基盤研究
3. 学会等名 第68回日本口腔外科学総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Manami Suzuki-Karasaki, Kenta Kawahara, Miki Suzuki-Karasaki, Hideki Nakayama, Yoshihiro Suzuki-Karasaki
2. 発表標題 Oral cancer cell death caused by air plasma-activated medium via mitochondrial repositioning
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木真奈美、落合祐之、川原健太、中山秀樹、鈴木良弘
2. 発表標題 プラズマ照射液による選択的ミトコンドリアポジショニング異常の誘発
3. 学会等名 第76回日本口腔外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yushi Ochiai, Manami Suzuki-Karasaki, Miki Suzuki-Karasaki, Atsuo Yoshino, Yoshihiro Suzuki-Karasaki
2. 発表標題 Air plasma-activated medium injures malignant glioma cell lines by inducing a ferroptosis-like cell death
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 オゾン含有水溶液組成物	発明者 鈴木良弘	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2021 172840	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------