

令和 6 年 6 月 29 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：21K10128

研究課題名（和文）プラズマ照射液を用いた治療抵抗性口腔癌の革新的治療法の創出

研究課題名（英文）Development of a new approach for controlling drug-resistant oral cancers using APAM

研究代表者

鈴木 真奈美（Suzuki, Manami）

一般社団法人プラズマ化学生物学研究所・研究部・研究員

研究者番号：10842883

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扁平上皮がん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。また細胞傷害に伴って、ミトコンドリアが傷害された細胞核の辺縁に集まるといった特異的なミトコンドリア動態変化が誘発されることを見出した。細胞死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が誘発されること、この酸化型となったミトコンドリアが細胞核近くに移動して細胞核を傷害することが考えられた。

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、空気プラズマが鉄依存性経路による細胞傷害を誘導し、この経路としてミトコンドリア動態変化を介する酸化型ミトコンドリアの細胞核への接近が関与す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する。このミトコンドリアの形態変化は腫瘍選択的にみられたことから、ミトコンドリアの酸化ストレス誘導は腫瘍細胞選択的な細胞傷害のための有力な標的となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Our findings indicate that cold atmospheric air plasma medium (APAM) has potent

anticancer activity in drug- and radiation-resistant squamous cell carcinoma, including oral cancers. This effect results from specific mitochondrial morphological changes in which highly oxidative mitochondria asymmetrically gather at the peripheral area of damaged nuclei, called MPMC. Increased mitochondrial hydroxyl radicals, likely through mitochondrial iron and hydrogen peroxide, lead to lipid peroxide production and oxidized mitochondria. The resulting closer location of such oxidative mitochondria to the nucleus owing to MPMC could cause the nucleus injury. The fact that MPMC occurs explicitly in tumor cells suggests that this event plays a role in the tumor cell-specific APAM cytotoxicity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミトコンドリア 酸化ストレス 活性酸素 低温大気圧プラズマ 扁平上皮癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 集学的医療の発展により、進行初期の口腔がん治療成績は飛躍的に改善されたが、一度進展すると、きわめて浸潤・転移し易く、予後が不良であること、また、放射線や薬剤に対して抵抗性となることが治療上の問題となっている。これらのがんはアポトーシスに耐性であることから、別の細胞死の誘発が有力な治療戦略となる。低温大気圧プラズマ(以下 CAP)は、室温・大気圧条件下で気体の電離により作製されたプラズマを指す。CAP およびこれを培地、輸液剤など様々な液体に照射したプラズマ照射液(PTSs)はアポトーシスだけではなく、非アポトーシス細胞死も誘導し、正常細胞は傷害しないことから新たな腫瘍標的型治療法への応用が期待されている。しかし作成法や実験条件により生物活性が変動するため、そのメカニズム解明が課題となっている。われわれは PTSs の抗がん作用に空気が必要であるという独自の発見から、空気プラズマ照射液(以下 APAM)を創出し、これが従来のヘリウムガスを使用したプラズマと比較して高い抗腫瘍活性を示す事を見出した。APAM が誘発する細胞死は、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼの阻害剤で抑制されなかったが、活性酸素消去剤ならびに鉄キレート剤によって完全に抑制されたことからアポトーシスとは異なる細胞死であると考えられた。酸化ストレスならびに鉄ストレスが関与する点から細胞死経路として鉄依存性細胞死(フェルトーシス)の関与が予想された。

### 2. 研究の目的

本研究では APAM 誘発細胞死における細胞死がどのように誘発されるかメカニズムを解析する。また、ミトコンドリアのミトコンドリアダイナミクスに着目してその役割を解析する。マウス移植腫瘍に対する有効性を検討して、プラズマ照射液を用いた新規な治療法の確立につながる新たな知見を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

**使用細胞:** 口腔がん細胞として SAS、HOC313 細胞株を、正常細胞モデルとして、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)、およびヒト上皮メラノサイト(WI-38)をそれぞれ用いた。すべての細胞は 10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)中 37 $^{\circ}$ C、95%空気、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。**APAM 作製:** ピエゾプラズマジェットを用いて空気プラズマを周囲の空気から作成し、このプラズマを液面上約 20mm からフェノールレッドフリー DMEM に 1ml あたりに 1 分照射することで作成作製した。**APAM 中の酸化物質測定:** 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>/NO<sub>3</sub> Assay Kit CII, Colorimetric Kit, Dojindo)を用いてグリーン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ケットテスト(DPM2-03、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。**細胞増殖率測定:** 細胞増殖率は、WST-8 アッセイ法により以下のように行った。細胞を 96 穴マイクロプレートに播種して一晚培養した。細胞状態が良好であることを確認した後 APAM を添加して 72 時間刺激した。刺激後の細胞に Cell Counting Kit (Dojindo) を加え 2 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した。**ミトコンドリアの生細胞イメージング:** 細胞を 35mm ポリリジン処理細胞培養ディッシュに播種して接着後に APAM あるいは薬剤で 2 時間処理した。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、高解像度蛍光顕微鏡(BZ-X-700, Keyence)で観察した。得られた蛍光画像を BZ-H3A ソフトウェアで解析した。**活性酸素・活性窒素の産生検出:** 細胞内スーパーオキシドを MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific)で、ヒドロキシルラジカルを OxiOrange (五稜化薬)で、一酸化窒素を DAR-4M AM でそれぞれ処理した。**鉄の検出:** 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。**タイムラプス観察:** 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、ブラスト社)で細胞を培養しながら H3XT タイムラプスモジュール(キーエンス)を用いて蛍光シグナルを BZ X-710 で経時的にモニターした。**ウエスタンブロットティング:** 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。**解析と統計:** 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 法で解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) APAM の細胞死様態解析と、新たなミトコンドリア分布の発見

APAM は試験したすべての細胞株に対して、濃度依存的に顕著な細胞増殖抑制を示した。一方で、正常細胞においては、腫瘍細胞に有効な濃度でも形態変化および増殖抑制効果は最小限であった。また、LM8 ならびに 143B 移植マウスにおいても APAM は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こさず、高い腫瘍選択的毒性を示した。(Suzuki-Karasaki M et al. *Int J Mol Sci* 2022)。汎カスパーゼ阻害剤 zVAD-FMK (zVAD) は、細胞株によっては、APAM の作用を抑制したが、他の細胞株では阻害せず、カスパーゼ非依存性の異なる経路の関与が示唆された。APAM 細胞死の様態を知るために、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ティングによるカスパーゼ活性化解析した。APAM が誘導するカスパーゼ非依存性細胞死は RIP1/3 阻害剤やリソソーム不安定化剤では抑制されず、抗酸化剤ならびに鉄キレート剤で抑制された。これに対して、フェロスタチン-1 (Fer-1) では抑制されなかった。フェロトキシスとの異同を調べるためにシスチントランスポーターに作用する典型的フェロトキシス誘発剤エラスチンの作用と比較した。エラスチンは細胞増殖を抑制し、細胞死を増加させ、その効果は鉄キレート剤ピビルジルおよび Fer-1 で抑制された。

フェロトキシスでは細胞核の形態には変化がないことが知られている。また、ミトコンドリア形態の変化として体積減少、密度増加、外膜崩壊、およびクリステの消失が観察されることが報告されている。APAM とエラスチンの違いを比較するためにエラスチン・APAM 処理後の細胞核およびミトコンドリアの形態および分布を観察した。さらに、刺激後の細胞質およびミトコンドリア内における酸化ストレスの有無を検証した。エラスチン刺激後の細胞では、細胞核およびミトコンドリア形態変化がほとんど見られなかった。また細胞質でのみ脂質ラジカルが増加し、ミトコンドリアでの上昇は見られなかった。一方 APAM 刺激後の細胞では、エラスチンと異なり濃度や処理時間に応じて段階的に細胞核の変形、縮小およびミトコンドリア分裂、断片化、膨化が観察された。細胞死に先行してミトコンドリアは変形、縮小した細胞核片側の辺縁部に集合するという特徴的な分布 (以下 MPMC) を示した (Suzuki-Karasaki M et al. *Int J Mol Sci* 2022)。MPMC は微小管依存的に誘発され、これに伴ってミトコンドリア内過酸化脂質、 $H_2O_2$ 、ヒドロキシルラジカルが増加した。また、APAM 処理後の細胞ではミトコンドリア内遊離鉄の細胞核辺縁への集積が観察され、これらの変化は過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の消去酵素であるカタラーゼで顕著に抑制された。

APAM で同様に処理した正常細胞 HDF および WI-38 ではこれらの変化は見られなかった。

以上の結果から APAM は細胞内鉄を介した典型的なフェロトキシスとは異なりミトコンドリアでのフェントン反応を介したヒドロキシルラジカルおよび脂質ラジカルが増加することで誘発される鉄依存性細胞死を引き起こすこと、MPMC がこの細胞死に特異的に関与することが推測された。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過酸化脂質が産生され、これがミトコンドリアの機能不全と細胞核の傷害を誘発すると考えられる。

MPMC の誘導は過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の消去酵素であるカタラーゼで抑制されたことから、 $H_2O_2$  が重要なメディエーターとなることが明らかになった。これに反して最大  $100 \mu M$  までの  $H_2O_2$  を細胞外から添加しても MPMC および細胞増殖抑制のような APAM の生物学的作用は再現されなかった。この結果は、 $H_2O_2$  だけではなく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する。

## 2) オゾン水溶液の創出

オゾン ( $O_3$ ) は  $H_2O_2$  よりも強い酸化力を持ち、水に溶けることでヒドロキシルラジカルを産生する。APAM 作製時に強いオゾン臭が発生することから、APAM 内の溶存オゾンが酸化ストレスのメディエーターとなることを着想した。測定の結果、APAM 中には数十 mg/L の高い濃度のオゾンが存在していたためこの仮説を実証した。純粋酸素を電解バリア放電法で電離して得られたオゾンを培地内にバブリングして溶存オゾン水溶液 (ODM) を作製し、刺激後の細胞の反応を調べた。 $O_3$  溶液は APAM と同様に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。(Suzuki-Karasaki M et al., *Eur J Cell Biol* 2023) さらに、フェロトキ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。

これらの結果から  $O_3$  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た。 $O_3$  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キ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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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 無
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 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 無
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 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 -
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

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

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 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 (招待講演)
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
3. 学会等名 14th world congress on Targeting Mitochondria (招待講演)
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 (招待講演)
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 鈴木真奈美、鈴木美喜、中山秀樹、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

〔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 鈴木真奈美	権利者 鈴木良弘
産業財産権の種類、番号 特許、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
---------	---------