

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21008

研究課題名（和文）プラズマ活性乳酸リンゲル液を用いた口腔癌に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for oral cancer with Plasma-activated Ringer's Lactate Solution

研究代表者

佐藤 康太郎 (Sato, Kotaro)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00908808

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：プラズマ活性乳酸リンゲル液（PAL）を投与することで口腔癌細胞では正常細胞と比較して低濃度で殺細胞効果を示し、癌細胞特異的に効果を発揮し、細胞死として主に鉄依存性細胞死であるフェロトーシスが起きていることを明らかにした。また、遊走および浸潤能の減弱がみられ、上皮間葉転換と関わりがあるLysyl oxidase (LOX)の有意な発現低下がみられた。口腔癌モデルマウスではPALを投与することで舌上皮におけるLOXの発現低下がみられ、さらには発癌および頸部リンパ節転移が抑制され、副作用がなく、生存率は有意に延長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマ活性乳酸リンゲル液は口腔癌細胞に対してフェロトーシスを引き起こし、さらにコラーゲンおよびコラーゲンクロスリンクの形成を抑制することで転移を抑制させる可能性が示唆された。PALが口腔癌に対して副作用が少なく、効果的な治療方法であることが客観的に示され、今後の臨床研究への橋渡しとして重要な結果が得られたと考える。

研究成果の概要（英文）：Plasma-activated Ringer's lactate solution (PAL) treatment killed OSCC cells more effectively than control non-tumorous cells and suppressed cell migration and invasion. The type of cell death was ferroptosis. After applying PAL, the protein level of LOX was decreased in cancer cells in vitro and in vivo. Additionally, PAL improved the survival rate and suppressed collagenous matrix formation.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 フェロトーシス コラーゲン プラズマ

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は本邦でも増加傾向にあり、進行口腔癌の生存率は過去 20 年間改善を認めていないのが現状である。口腔癌は手術療法に並ぶ治療法が存在しない一方で、既往疾患等により手術が行えない場合もある。その際には化学放射線療法などが適応になるものの、副作用の観点から治療中断を余儀なくされることもある。さらには、治療後の再発を制御することは生存率の改善や患者の QOL 維持のために非常に重要である。口腔癌は罹患率が 1-3%と少ないものの、治療に伴う QOL の低下が著しい領域であることから、効果的でありかつ副作用が少なく長期にわたって使用可能な新規治療法の開発が喫緊の課題となっている。

プラズマとは固体、液体、気体に次ぐ第 4 の状態であり、ヒドロキシルラジカルや過酸化水素、紫外線などを含む高エネルギーの状態をいう。プラズマの応用法には 病変に直接プラズマを照射する直接法と 乳酸リンゲル液に照射してできたプラズマ活性乳酸リンゲル液 (PAL) を全身的に投与する間接法が存在する。直接法によって悪性中皮腫や卵巣がんに対して *In vitro* および *vivo* にて効果を認めたとの報告はあるもののアプローチの方法が課題となっていた。一方で口腔癌は直視が可能であり、アプローチが比較的容易であることから、研究代表者は過去に直接法による研究を行い、正常組織細胞には傷害を与えず、口腔癌細胞に対する二価鉄量依存的な選択的殺細胞効果があることを報告した。ただし深達度が約 1mm と報告されているため、深部の病変への作用が懸念されていた。そこで経静脈的に投与することで全身に作用させることが可能である間接法の PAL が近年注目され始めている。

型コラーゲンは 3 重らせん構造を特徴とし、コラーゲン分子同士はコラーゲンクロスリンクによって強力に結合して構造を保っており、クロスリンクの形成開始にはリシルオキシダーゼ (LOX) が関与する。コラーゲン分子の形成初期段階でリシルヒドロキシラーゼ 2 (LH2) がリシン残基を水酸化した後形成されたコラーゲンクロスリンク (LH2 由来コラーゲンクロスリンク) が多く見られる場合、癌の進展や転移能に関与することが報告されてきている。LOX や LH2 をターゲットとした薬剤は副作用等の観点から臨床応用が進んでいないのが現状である。一方、LH2 がコラーゲン分子の形成に関与するには、プラズマの作用機序と同様に二価鉄が重要であるが、その点に着目した治療法の試みは行われていない。

2. 研究の目的

本研究ではコラーゲンクロスリンクに着目し、PAL の口腔癌に対する効果および機序を明らかにすることによって臨床応用に結び付けることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) : PAL を用いた口腔正常細胞と口腔癌細胞への効果および機序の解明。
本研究では培養細胞に対して PAL を添加し、細胞生存率、鉄関連タンパク質発現の変化および細胞死の種類の同定を行った。加えて、遊走および浸潤能の評価を行った。

(2) : 口腔癌マウスモデルを使用した PAL の有効性評価。
口腔癌マウスモデルを用いて PAL の腫瘍発生予防および抗腫瘍効果に関する検討を行い、投与に伴う体重の変化や血液成分の変化を含めた副作用の観察を経時的に行った。さらに生存率の検討や組織標本などを使用して全身臓器の詳細な組織学的評価もを行い、PAL の安全性および有効性の検討を行った。

(3) : PAL によるコラーゲンクロスリンク形成に関わる因子の変化を検討。
口腔癌細胞に対して PAL を添加し、コラーゲンクロスリンクに関わる因子の発現変化を確認した。また、上記の口腔癌マウスモデルでも同様に検討した。

4. 研究成果

PAL を投与することで、口腔癌細胞では線維芽細胞や上皮細胞などの正常細胞と比較して低濃度で殺細胞効果を示し、癌細胞特異的に効果を発揮することを確認した(図1)。また、ウエスタンブロット法ではフェリチン、フェロポーチンの低下が見られ、フローサイトメトリーでは脂質過酸化、電子顕微鏡ではミトコンドリアの形態変化がみられた。以上より、細胞死として主にフェルトーシスが起きていることを明らかにした。

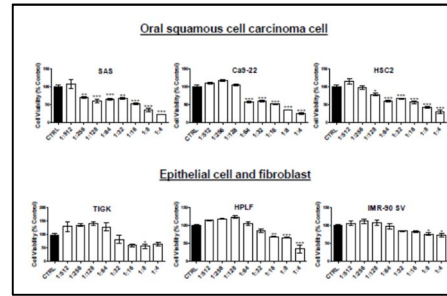


図 1

Migration および invasion assay では遊走および浸潤能の減弱がみられ、上皮間葉転換と関わりがある Lysyl oxidase (LOX) の有意な発現低下がみられた(図2)。

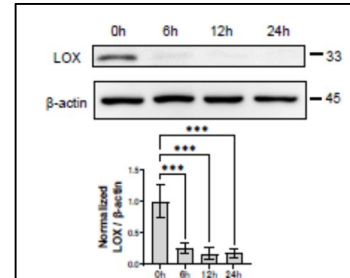


図 2

口腔癌モデルマウスを使用した *In vivo* の実験でも PAL を投与することで舌上皮における LOX の発現低下がみられ、さらには発癌および頸部リンパ節転移が抑制され、生存率は有意に延長した(図3)。組織学的に検討したところ、コラーゲンの形成抑制が観察された。血液検査では特に異常値は認めず、その他臓器に対する副作用は現時点では見られなかった。また、PAL 投与群ではフェルトーシスが引き起こされていることも明らかとなった。

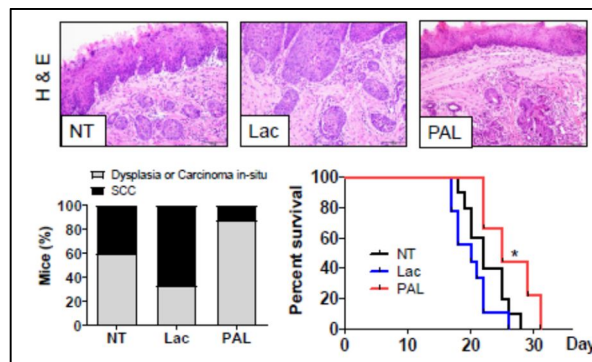


図 3

以上より、PAL が口腔癌に対して副作用が少なく、効果的な治療方法であることが客観的に示されつつあり、今後の臨床研究への橋渡しとして重要な結果が得られたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Kotaro, Fujii Kouki, Tanaka Hiromasa, Hori Masaru, Hibi Hideharu, Toyokuni Shinya	4. 巻 57
2. 論文標題 Exposure of low-temperature plasma after vaccination in tongue promotes systemic IgM induction against spike protein of SARS-CoV-2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 30 ~ 37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2023.2190486	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤康太郎、日比英晴
2. 発表標題 プラズマ活性化乳酸リンゲル液を用いた口腔癌に対する新規治療法
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤康太郎
2. 発表標題 基礎研究のエビデンスをセンスよく臨床に応用する - 現在進行中のtranslational research - Lysyl hydroxylase 2 (LH2) 由来コラーゲンクロスは頭頸部癌の転移促進に関与する
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

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

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