

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2012～2016

課題番号：24108008

研究課題名（和文）プラズマ医療科学の臨床応用論的学術基盤の構築と体系化

研究課題名（英文）Systematization and development of clinical applications for plasma medicine based on scientific infrastructure

研究代表者

吉川 史隆 (Kikkawa, Fumitaka)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40224985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 140,600,000円

研究成果の概要（和文）：非平衡大気圧プラズマの医療応用への研究が世界中で進められており、中でもがん治療への有用性が次々と報告されている。我々は現行の治療法では完治が困難な進行性難治癌である、グリオーマ、並びに卵巣癌をターゲットとしたプラズマ癌治療の有用性を明らかにし、中皮腫をモデルにその科学的基盤を構築した。特に、プラズマを照射した溶液にも抗腫瘍効果を見出し、髄腔内或は腹腔内播種を伴う癌腫への効果的なプラズマ治療法としての可能性を示した。一方、細胞活性化において、我々の研究グループで開発した脂肪幹細胞へのプラズマ刺激により高品質の幹細胞が生成され、再生医療分野においてもその有用性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Non-thermal plasma has been focused on as a novel medical practice. There have been a number of reports showing the effect of non-thermal plasma on cell death of various cancers. We have succeeded in selective killing of ovarian cancer and glioblastoma brain tumor cells, which are difficult to achieve complete remission under the present therapies, using not only directly but also indirectly plasma referred to as plasma-activated liquids. We have also elucidated that the effects and mechanisms of non-thermal plasma on biological systems using mesothelioma. We have demonstrated that plasma-activated liquids might be more useful for advanced cancers with metastasis and micro-dissemination. On the other hand, for developing medical applications of non-thermal plasma, we have achieved a certain result for regenerative medicine using human adipose tissue-derived stromal cells we established. These discoveries have led to the use of non-thermal plasma for alternative clinical applications.

研究分野：産婦人科学

キーワード：大気圧非平衡プラズマ プラズマ活性化溶液 癌治療 再生医療 卵巣癌 脳腫瘍 悪性中皮腫 脂肪幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年注目を浴びている大気圧非平衡プラズマは、これまでの産業への用途に加え、様々な臨床における新規治療技術としての可能性が期待されており、世界中で新規治療法への応用が研究され始めていた。米国では2007年にプラズマ医療国際会議が開催されて以来、その発表件数は爆発的に増加している。一方、名古屋大学・プラズマナノ工学研究センターは、世界の先端を走るプラズマ技術力を有し、世界のプラズマプロセス研究を引っ張っている。今回、我々は、プラズマナノ工学研究センターが中心となり創成する、新学術領域『プラズマ医療科学』において、プラズマナノ工学研究センターと連携し『プラズマ医療科学総合拠点』として本学際領域の構築を目指した。

実験室レベルで用いる簡易プラズマ発生装置などは研究開始当初において既に作成済みで、本プラズマ装置を用いた卵巣癌への抗腫瘍効果を見出し、細胞実験での研究成果を報告した¹⁾。この医工連携ネットワークを基盤に、『プラズマ医療科学総合拠点』を構築し、プラズマの医療への実用化に向けた研究体制の確立を推進していた。

2. 研究の目的

本研究はプラズマによる(1)癌治療、(2)再生医療の実用化に向け、(3)プラズマが生体内へ与える影響とその作用機序の解明を基に、臨床応用への包括的研究を名古屋大学大学院医学系研究科 プラズマナノ工学研究センターとの緊密な医工連携により実現することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) プラズマの癌治療への応用

癌治療への応用に関して対象疾患を卵巣癌、脳腫瘍ならびに悪性中皮腫に設定した。以下にそれぞれの研究方法を述べる。

卵巣癌に対するプラズマの効果

プラズマ活性化溶液による抗腫瘍効果を、種々卵巣癌細胞株ならびにその抗がん剤耐性株を用いて評価した。これらの細胞実験で見られた効果を踏まえ、マウス皮下腫瘍モデルならびに腹膜播種モデルにおけるプラズマ治療の効果を評価した。

脳腫瘍に対するプラズマの効果

卵巣癌と同様にプラズマ活性化溶液を用い、脳腫瘍細胞株(グリオブラストーマ)と正常培養細胞(アストロサイト、線維芽細胞等)への選択的抗腫瘍効果について検討した。またその細胞内分子機構に関するシグナリングネットワークにおいても詳細に調査した。

悪性中皮腫に対するプラズマの効果

中皮腫培養細胞に対しプラズマ照射による抗腫瘍効果の詳細な検討を行った。特にプラズマ感受性に影響を及ぼす因子等を明らかにし、作用機序の解明を行った。

(2) 再生医療に対するプラズマの応用

我々のグループで開発した高い分化・増殖

能を有する低血清培養ヒト脂肪由来幹細胞(LASC)は、各種疾患モデルに対し、再生促進および免疫抑制能を介して高い治療効果を示すことを明らかにしている。このLASCにプラズマ処理を行い、さらに高い効果を有する幹細胞作成が可能かどうかを検討した。(3) プラズマが生体内へ与える影響とその作用機序の解明

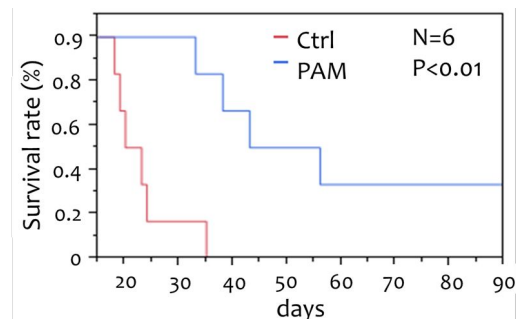
核酸、タンパク質、脂質へ及ぼす影響を生化学的に解析すると同時に、細胞や動物臓器へのプラズマの影響を形態学的な解析により検討した。

4. 研究成果

(1) プラズマの癌治療への応用

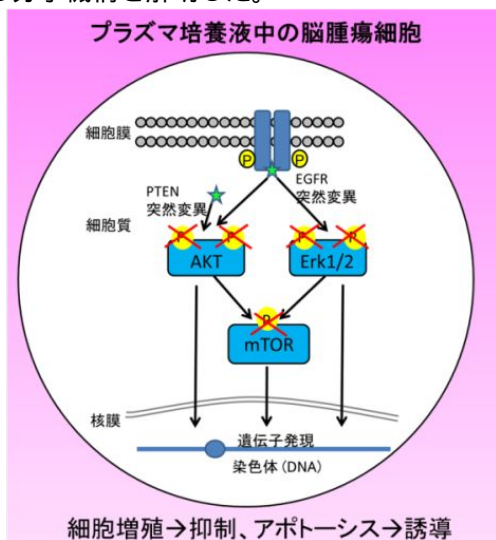
卵巣癌に対するプラズマの効果

我々は既にプラズマの直接照射による卵巣癌細胞への抗腫瘍効果を見出していたが、臨床応用を念頭に置いた場合、生体内に浸潤または播種している癌細胞を他の臓器への影響無く治療することが望ましい。そこでプラズマの直接照射に加え、プラズマを間接的に作用させるプラズマ活性化培地(Plasma-activated medium; PAM)の抗腫瘍効果について卵巣癌細胞株とその抗がん剤耐性株に対し検討を行った。その結果、抗癌剤獲得耐性の癌細胞に対しPAMがオリジナルの癌細胞と同等に抗腫瘍効果を示すことを細胞実験並びに動物実験の両方において明らかにした。その作用機序として、プラズマにより生成される活性酸素種が癌細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。さらに、PAMは種々卵巣癌細胞株に対しても幅広く抗腫瘍効果を有し、癌細胞は卵巣癌腹膜播種のカウンターパートである腹膜中皮細胞よりも強い感受性を示したことから、PAMによる選択的抗腫瘍効果を明らかにした。一方で、プラズマの抗腫瘍効果は、細胞種、細胞数、プラズマの強度に依存的事であることが既に報告されている。そこで、形態学的違いとプラズマ感受性についても検討を行った。その結果、間葉系様表現型を示す細胞或は細胞集団に対し、プラズマ感受性が高くなる傾向を明らかにし、一般的に癌の悪性度が高くなると言われる上皮間葉転換を起した細胞に対しプラズマ治療が有効である可能性を示唆した。これらの結果を踏まえ、マウス卵巣癌腹膜播種モデルへのPAMの治療効果を検討した結果、PAMの腹腔内投与治療により、癌細胞の腹膜への接着・遊走・浸潤を抑制し、生存期間の延長を実証した。



脳腫瘍に対するプラズマの効果

脳腫瘍の治療において重要な課題の一つは、正常な脳組織に傷害を与えずに腫瘍細胞のみを死滅させる選択的治療技術の開発である。PAM を用いて、正常細胞（アストロサイト、線維芽細胞）にはほとんど影響を与えずに、グリオプラストマ培養細胞に対し選択的にアポトーシスを誘導し、PAM の選択的抗腫瘍効果を明らかにした。またその細胞内分子機構として、PAM が生存・増殖シグナリングネットワークを抑制することにより、グリオマにアポトーシスを誘導していること実証し PAM の抗腫瘍効果誘導における分子機構を解明した。



一方で、PAM は細胞培養液により作製されており、直接ヒトに使うことが困難である。そこですでに臨床の現場で汎用されているヒトに使うことのできる乳酸リングル溶液や酢酸リングル溶液に着目しプラズマ活性化溶液の作成ならびに評価を試みた。その結果、プラズマ活性化リングル液は、PAM と同様に、グリオプラストマ培養細胞や卵巣癌細胞に対して抗腫瘍効果をもたらし、正常細胞（乳腺上皮細胞、皮膚細胞）に対しては細胞毒性が比較的小さいことを明らかにした。この活性が乳酸ナトリウムに起因することも示唆され、新たな化学療法への可能性が見出された。

悪性中皮腫に対するプラズマの効果

アスベスト繊維の曝露により発生する中皮腫も体腔内で増殖するため治療の困難ながんである。中皮腫培養細胞に対しプラズマを直接照射することで照射時間依存的に細胞死を誘導することを明らかにした。また、抗癌剤とプラズマ照射では特に非腫瘍細胞で反応が顕著に異なり、プラズマの正常細胞への低毒性が示唆された。さらに、プラズマ刺激に対し細胞内の重要な因子として、鉄の存在を明らかにした。細胞内における鉄の局在は通常ミトコンドリア内に存在し、プラズマ刺激によりミトコンドリアを介したアポトーシス誘導による抗腫瘍効果が既に報告されている。中皮腫細胞においても、鉄を添

加することでプラズマ感受性が亢進し、鉄をキレートすることで低下することを示し、触媒性 2 価鉄がプラズマの効果左右する重要な因子であることを明らかにした。さらに、アスコルビン酸の細胞への添加により、プラズマに対する感受性が顕著に亢進することを発見し、プラズマ治療の調節因子となりうる可能性が示唆された。また、プラズマによる細胞死はアポトーシスによることが我々を含む多くの研究によって報告されているが、特に中皮腫細胞を用いた研究において、プラズマがオートファジーを誘導することも明らかにし、新しい細胞死の機構を示した。

(2) 再生医療に対するプラズマの応用

我々のグループが開発した高い分化能とサイトカイン分泌能を有する脂肪由来幹細胞 (LASC) は高い抗炎症作用を持つことがすでに明らかになっている。しかし、実用化レベルには至っておらず、更なる改良が必要である。そこで我々は LASC をプラズマ処理することでさらに高機能性の LASC の作成を試みた。その結果、LASC を PAM 処理することで、再生・免疫調整能に有効な成長因子 (HGF, VEGF) の分泌量がわずかに上昇することが明らかとなった。一方、炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1, TNF- α) の上昇も見られ、PAM は LASC に対し何らかの変化をもたらすことが示唆された。

(3) プラズマが生体内へ与える影響とその作用機序の解明

プラズマを医療分野で有効に使用するためには、その本質を明らかにして生物学的作用の原理を解明し、既存の生物学との連続性を保持する必要がある。そこで、細胞を構成する成分である核酸及び細胞膜の主成分であるフォスファチジルコリンへ及ぼす影響を生化学的に解析したところ、DNA の切断や修飾、過酸化脂質の生成が確認され、プラズマの細胞への照射は酸化ストレスを与える可能性が示唆された。そこで、プラズマにより生成されるラジカルを電子スピン共鳴により分析した。その結果、ヒドロキシラジカルの生成が確認され、紫外線により誘導される DNA 傷害の増加も認められたことからプラズマ照射は酸化ストレスを負荷することが判明した。さらに、動物臓器へのプラズマの影響を形態学的な解析により検討したところ、プラズマ照射は局所に酸化ストレスを導入することが明らかとなった。種々のがんでは酸化ストレスが通常より高い状態にあることから²⁾、目的に応じたプラズマ発生装置の開発に有用なパラメーターを特定するための基礎的データを得た。

<引用文献>

- 1) Iseki S. et al. Appl. Phys. Lett. 100, 113702(2012)
 - 2) Toyokuni S. et al. FEBS Lett 358: 189-91(1995)
5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 157 件)

*Tanaka, H., Nakamura, K., Mizuno, M., Ishikawa, K., Takeda, K., Kajiyama, H., Utsumi, F., Kikkawa, F., Hori, M. Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects. *Sci. Rep.* 6, 36282, 2016. 査読有 10.1038/srep36282

Shi, L., Wang, Y., Ito, F., Okazaki, Y., Tanaka, H., Mizuno, M., Hori, M., Richardson, D. R., *Toyokuni, S. Biphasic effects of l-ascorbate on the tumoricidal activity of non-thermal plasma against malignant mesothelioma cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 605, 109-116, 2016. 査読有 10.1016/j.abb.2016.05.016

Utsumi, F., *Kajiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Toyokuni, S., Hori, M., Kikkawa, F. Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol. Rep.* 35, 3169-3177, 2016. 査読有 10.3892/or.2016.4726

Okazaki, Y., Wang, Y., Tanaka, H., Mizuno, M., Nakamura, K., Kajiyama, H., Kikkawa, F., Hori, M. and *Toyokuni, S. Direct exposure of non-equilibrium atmospheric pressure plasma confers simultaneous oxidative and ultraviolet modifications in biomolecules. *J Clin Biochem Nutr.* 55, 207-215, 2014. 査読有 10.3164/jcbn.14-40

Utsumi, F., *Kajiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Hori, M., Kikkawa, F. Selective cytotoxicity of indirect non-equilibrium atmospheric pressure plasma against ovarian clear-cell carcinoma. *Springer plus.* 3, 398, 2014. 査読有 10.1186/2193-1801-3-398

*Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Nakamura, K., Utsumi, F., Kajiyama, H., Kano, H., Maruyama, S., Kikkawa, F. and Hori, M. Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells. *Plasma Medicine.* 2, 207-220, 2014. 査読有 10.1615/PlasmaMed.2013008267

Utsumi, F., *Kajiyama, H., Nakamura, K., Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Kondo, H., Kano, H., Hori, M., Kikkawa, F. Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *PLOS ONE.* 8(12), e81576, 2013. 査読有 10.1371/journal.pone.0081576

*Tanaka, H., Mizuno, M., Ishikawa, K., Nakamura, K., Kajiyama, H., Kano, H., Kikkawa, F. and Hori, M. Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase. *Plasma Medicine.* 1, 265-277, 2012. 査読有 10.1615/PlasmaMed.2012006275

[学会発表](計 284 件)

Kajiyama, H. The Effect of Aqueous Plasma therapy Targeting for Occult

Peritoneal Metastasis of Ovarian Cancer. International Conference on Plasma Medical Science Innovation (ICPMSI) 2017, 2017 年 2 月 28 日, Noyori Conference Hall in Nagoya University (Aichi, Nagoya), Japan. Toyokuni, S. Plenary lecture 1: Insights into chemical reaction mechanism in plasma medicine from the viewpoint of oxidative stress. 6th International Conference on Plasma Medicine. 2016 年 9 月 5 日, Bratislava, Slovakia.

Tanaka, H., Mizuno, M., Kajiyama, H., Toyokuni, S., Maruyama, S., Kikkawa, F. and Hori, M. (他 7 人) Plasma-activated medium and cancer. 6th International Conference on Plasma Medicine. 2016 年 9 月 5 日, Bratislava, Slovakia.

岡崎泰昌、水野正明、梶山広明、吉川史隆、堀 勝、豊國伸哉、(他 5 人) 非平衡大気圧プラズマは酸化ストレス傷害を起こす。第 104 回日本病理学会総会、平成 27 年 5 月 2 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

Tanaka, H., Mizuno, M., Kajiyama, H., Toyokuni, S., Maruyama, S., Kikkawa, F., Hori, M. (他 11 人)

CANCER THERAPY USING PLASMA-ACTIVATED MEDIUM AND THE INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS. the 2nd International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, 2015 年 3 月 15 日, E&S Hall in Nagoya University (Aichi, Nagoya), Japan. Toyokuni, S., Shi, L., Wang, Y. and Okazaki, Y. Direct exposure of non-thermal plasma confers simultaneous oxidative and UV modifications in biomolecules and its application to cancer therapy. 2014 MRS fall meeting and exhibit

Symposium G: Plasma processing and diagnostics for life sciences. 2014 年 12 月 3 日, Boston, Massachusetts, USA. Kajiyama, H., Nakamura, K., Utsumi, F., Tanaka, H., Hori, M., Kikkawa, F. Future Perspective of Strategic Plasma Therapy for Refractory Epithelial Ovarian Cancer. The 1st International Workshop on Plasma for Cancer Treatment. 2014 年 3 月 25 日 Washington D.C., USA

Kajiyama, H., Utsumi, F., Nakamura, K., Tanaka, H., Hori, M., Kikkawa, F. Perspective of strategic plasma therapy for prognostic improvement of patients with ovarian cancer. Symposium O: Plasma Processing and Diagnostics for Life Sciences. 2013 JSAP-MRS Joint Symposia. 2013 年 9 月 16 日, Kyotanabe campus, Doshisha University (Kyoto, Kyotanabeshi) Japan.

Maruyama, S. Potential of adipose tissue-derived stem cells and low temperature physical plasma for use in regenerative medicine. 5th International Symposium on Advanced Plasma Science and its

Applications for Nitrides and Nanomaterials ISPlasma 2013, 2013年1月31日, Noyori Conference Hall in Nagoya University (Aichi, Nagoya), Japan.

〔図書〕(計4件)

ロピンス基礎病理学 原書9版
豊國伸哉、高橋雅英、総ページ数:1087
丸善出版 2014年、

出願状況(計11件)

名称:抗癌剤および輸液とそれらの製造方法
ならびに抗癌物質

発明者:水野 正明、堀 勝、吉川 史隆、
梶山 広明、(他6名)

権利者:名古屋大学

種類:特許

番号:PCT/JP2015/006419

出願年月日:2015/12/23

国内外の別: 国際特許

名称:抗腫瘍水溶液および抗癌剤とそれらの
製造方法

発明者:水野 正明、堀 勝、吉川 史隆、
梶山 広明、(他6名)

権利者:名古屋大学

種類:特許

番号:PCT/JP2013/001139

出願年月日:2013/2/26

国内外の別: 国際特許

〔その他〕

ホームページ等

<http://plasmamed.nagoya-u.ac.jp/shingakujutsu/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 史隆 (KIKKAWA, Fumitaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:40224985

(2)研究分担者

豊國 伸哉 (TOYOKUNI, Shinya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:90252460

研究分担者

水野 正明 (MIZUNO, Masaaki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号:70283439

研究分担者

丸山 彰一 (MARUYAMA, Shoichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号:10362253

研究分担者

梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号:00345886

(3)連携研究者

坪井 直毅 (TSUBOI, Naotake)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号:50566958

(4)研究協力者

岡崎 泰昌 (OKAZAKI, Yasumasa)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号:30403489

田中 宏昌 (TANAKA, Hiromasa)

名古屋大学・未来社会創造機構 特任講師

研究者番号:00508129

秋山 真一 (AKIYAMA, Shinichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師、

研究者番号:20500010

内海 史 (UTSUMI, Fumi)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号:10749261

神村 豊 (KAMIMURA, Yutaka)

名古屋大学・大学院医学系研究科・医員

橋爪 博司 (HASHIZUME, Hiroshi)

名古屋大学・未来社会創造機構 特任助教

王 越 (WANG, Yue)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

石 蕾 (SHI, Lei)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

伊藤 文哉 (ITHO, Fumiya)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

博士課程3年

彭 楊 (Peng, Yang)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

博士課程2年

中村 香江 (NAKAMURA, Kae)

名古屋大学・大学院医学系研究科・

客員研究員