

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05430

研究課題名（和文）プラズマ活性溶液を用いたがん治療とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Cancer treatments using plasma activated liquids and elucidating the mechanisms

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,500,000円

研究成果の概要（和文）：近年、大気圧プラズマの医療応用が活発に研究されている。我々は医工連携により、大気圧プラズマのがん治療研究を活発に進めてきた。その過程でプラズマ活性溶液と名付けたプラズマを照射した溶液による抗腫瘍効果を見出した。本研究では更にプラズマ活性乳酸リンゲル液を開発し、プラズマ照射した乳酸ナトリウムが抗腫瘍効果をもたらす物質であることを突き止めた。プラズマ活性溶液の提唱は世界に大きな波及効果をもたらした。

研究成果の概要（英文）：Recently, medical applications using non-thermal atmospheric pressure plasmas have attracted attention in the field of medicine. We have developed non-thermal atmospheric pressure plasma sources, and applied for cancer therapy. We found anti-tumor effects by plasma treated medium, which we termed “plasma-activated medium or PAM”. In this study, we further developed plasma-activated Ringer’s lactate solution or PAL, and we found that plasma-treated L-sodium lactate is an anti-tumor factor in the PAL. Based on these results, we proposed that PAL is promising as a novel chemotherapy for cancers such as peritoneally disseminated cancers.

研究分野：プラズマ医療

キーワード：プラズマ医療

## 1. 研究開始当初の背景

近年、大気圧プラズマの医療応用が活発に研究されている。創傷治癒、止血、がん治療などにおいて画期的な治療効果が認められたため、大気圧プラズマの医療応用に向けた有効性、安全性の試験及び作用機序の解明が世界中で競って行われるようになった。その中でも特にがん治療への応用は社会及び科学へのインパクトが大きく、プラズマがん治療に特化した国際ワークショップが開催されるに至るほど目覚ましい発展を遂げている。このような学術背景において、申請者らは医工連携のもと、プラズマナノ工学研究センターにより開発された超高電子密度大気圧プラズマ装置を用いて、卵巣がん、脳腫瘍、皮膚がん、胃がんなど様々ながんに対してがん治療の研究を進めている(図1)。特にプラズマ照射された培養液ががん細胞に対して抗腫瘍効果をもたらすことを発見して以来(申請者らはこれらを plasma-activated medium (PAM、プラズマ活性培養液)と名付けた)、現在治療が極めて困難である卵巣がん、胃がん等の腹膜播種、脳腫瘍の髄腔内播種の治療のためのプラズマ活性溶液の研究を精力的に進めている。申請者はこれまでに分子生物学、システム生物学を駆使してがん細胞などの様々な細胞応答に関するシグナル伝達機構を研究してきた。このような専門性を活かして、PAMの抗腫瘍効果の作用機序として、申請者らは脳腫瘍培養細胞において恒常的に活性化されている二大生存・増殖シグナル伝達経路、PI3K/AKTシグナル伝達経路とRAS/MAPKシグナル伝達経路の両方がPAMにより抑制されていることを世界に先駆けて発見し、PAMが脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導する細胞内分子機構のモデルを構築した。申請者らはこれらの成果を世界中の国際会議で発表し、PAMは国際会議の1つのセッションとして取り上げられるほど注目を浴びるようになった。このような成果の上に

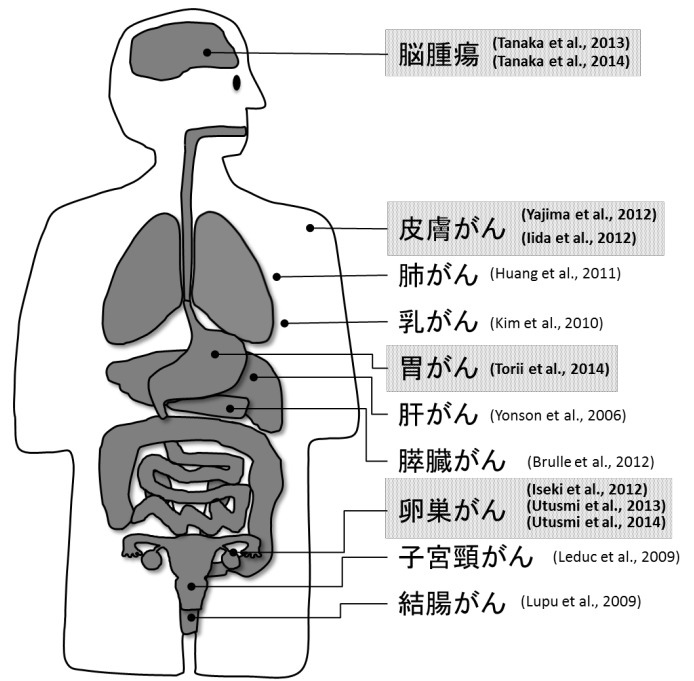


図1：プラズマがん治療研究の動向と新状況

第2回 IWPCT が2015年3月に名古屋大学で開催される(主催者：名古屋大学堀勝教授)ことが決定された。以上のように申請者らのプラズマがん治療における研究成果がプラズマ医療分野内の新分野の創成と更なる発展に大きく貢献した。

## 2. 研究の目的

申請者らのこれまでの膨大な研究データの蓄積により、プラズマ装置の種類、照射時間、照射距離、雰囲気ガス、プラズマ照射される溶液の種類、プラズマ活性溶液に曝される細胞の種類などにより、様々な細胞応答を示すことが分かってきた。

プラズマの条件や溶液の種類による細胞応答の違いを細胞内分子機構に基づき明らかにすることでプラズマ活性溶液の用途(適用範囲)を見定め、その作用機序を解明する。例えば、申請者らは異なるプラズマ装置を用いて作成された同様な抗腫瘍効果を持つプラズマ活性培養液が一方では、PI3K/AKTシグナル伝達経路のハブとなる分子である活性化型 AKT を抑制し、他方では、活性化型 AKT を抑

制しないという現象を予備的に発見した。すなわち、それぞれのプラズマ活性溶液により同様に細胞死が誘導されたとしてもその細胞内分子機構が異なるということが示された。それぞれのプラズマ活性溶液によりどのような細胞内分子機構により細胞死が誘導されるのかを研究することにより、(例えば、脳腫瘍治療用のプラズマ活性溶液、PI3K/AKTシグナル伝達経路依存性のがんに効くプラズマ活性溶液など)用途に応じたプラズマ活性溶液の開発を目的とした。

細胞の種類による細胞応答の違いをもたらす細胞内分子機構を解明することにより、プラズマ活性溶液による選択的アポトーシスの誘導の作用機序を解明し、選択性を高めるためのプラズマ活性溶液の開発などを行う。これまでの予備的な知見から、上皮系正常細胞に比べがん細胞の方がプラズマ活性溶液に対する感受性が高い(細胞死を起こしやすい)ことや、がん細胞の中でもがん種や遺伝学的バックグラウンドの違いによりプラズマ活性溶液に対する感受性が異なることが分かってきた。本研究では細胞の種類の違いによる細胞内シグナリングネットワークの違いに注目し、プラズマ活性溶液に対する細胞の感受性の違いを説明する細胞内分子機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

本プロジェクトでは、プラズマ活性溶液として、培養液よりもより臨床応用向きの点滴を対象としてプラズマ活性溶液による抗腫瘍効果の研究を進めた。図1のように乳酸リンゲル液にプラズマ照射した溶液をPAL(Plasma-activated Ringer's lactate solution)と名付け、PALによるグリオブラストーマ培養細胞に対する抗腫瘍効果を調べた。

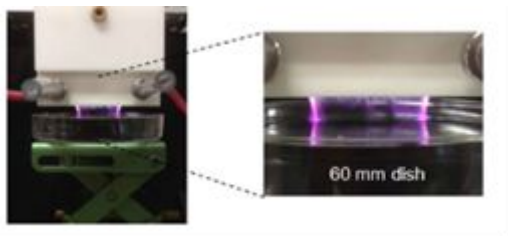


図2：プラズマ活性乳酸リンゲル液の作製

乳酸リンゲル液はNaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, 乳酸ナトリウムの4種類の成分からなるが、どの成分がプラズマ照射により抗腫瘍効果を示すのかを調べるためにNaClのみにプラズマを照射して合成したPAL、NaCl以外の成分のみにプラズマを照射して合成したPAL等を作成し、グリオブラストーマ培養細胞に対する抗腫瘍効果を調べた。

プラズマやPAMは一般に細胞に活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)を誘導することが知られている。PALがグリオブラストーマにROSを誘導するかどうかを調べるためにDCFDA試薬を用いてPALを投与したグリオブラストーマ培養細胞の細胞内ROSを調べた。PAMと比べどちらが多くROSをグリオブラストーマ培養細胞に誘導するかを調べた。

### 4. 研究成果

図2のようにプラズマ活性乳酸リンゲル液(PAL)を作製し、4倍、16倍、64倍希釈のPALをグリオブラストーマ培養細胞に投与し、MTSアッセイにより抗腫瘍効果を調べたところ、16倍希釈のPALではグリオブラストーマ培養細胞は完全に殺傷され、64倍希釈では殺傷効果が不十分であることが分かった(図3、成果文献[6])。

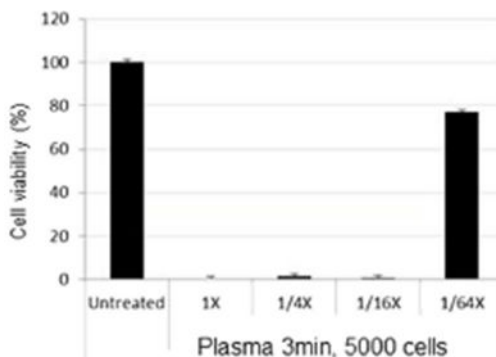


図3：PALによるグリオブラストーマ培養細胞に対する抗腫瘍効果

乳酸ナトリウム溶液のみにプラズマを照射して合成したPALはグリオブラストーマ培養細胞に対して抗腫瘍効果を示すのに対し、NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>溶液のみにプラズマを照射して合成したPALは抗腫瘍効果を示さないことが分かった。一方で、乳酸ナトリウム以外の成分のみにプラズマを照射して合成したPALは、グリオブラストーマ培養細胞に対して抗腫瘍効果を示さないのに対し、NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>以外の成分のみにプラズマを照射して合成したPALは抗腫瘍効果を示すことから乳酸ナトリウムにプラズマ照射した産物がPALの抗腫瘍物質であることが示唆された(成果文献[6])。

DCFDA試薬を用いた細胞内ROSの解析からPALはPAMに比べ細胞内にROSを誘導しないことが分かった。これらの結果からPAMとPALでは異なるメカニズムによりグリオブラ

トーマ培養細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが示唆された(図4、成果文献[6])。

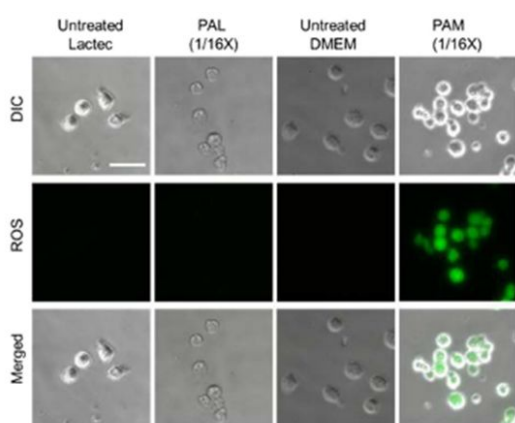


図4：グリオブラストーマ培養細胞におけるPAMおよびPAL投与による細胞内ROS誘導の比較

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計18件)

- [1] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Hashizume, K. Nakamura, H. Kajiyama, T. Kondo, F. Kikkawa, M. Mizuno, M. Hori, Effects of  $\cdot\text{OH}$  and  $\cdot\text{NO}$  radicals in the aqueous phase on  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2\cdot$  generated in plasma-activated medium, *J Phys D Appl Phys*, 50 (2017) 155202.
- [2] K. Takeda, T. Kumakura, K. Ishikawa, H. Tanaka, M. Sekine, H. Masaru, Behavior of absolute densities of atomic oxygen in the gas phase near an object surface in an AC-excited atmospheric pressure He plasma jet, *Appl Phys Express*, 9 (2017) 036201.
- [3] H. Tanaka, M. Hori, Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma, *J Clin Biochem Nutr*, 60 (2017) 29-32.
- [4] H. Kajiyama, F. Utsumi, K. Nakamura, H. Tanaka, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa, Future perspective of strategic non-thermal plasma therapy for cancer

treatment, *J Clin Biochem Nutr*, 60 (2017) 33-38.

- [5] S. Takeda, S. Yamada, N. Hattori, K. Nakamura, H. Tanaka, H. Kajiyama, M. Kanda, D. Kobayashi, C. Tanaka, T. Fujii, M. Fujiwara, M. Mizuno, M. Hori, Y. Kodera, Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer, *Annals of surgical oncology*, (2017).
- [6] H. Tanaka, K. Nakamura, M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kajiyama, F. Utsumi, F. Kikkawa, M. Hori, Non-thermal atmospheric pressure plasma activates lactate in Ringer's solution for anti-tumor effects, *Sci Rep*, 6 (2016) 36282.
- [7] H. Tanaka, M. Mizuno, F. Kikkawa, M. Hori, Interactions between a Plasma-activated medium and Cancer Cells, *Plasma Medicine*, 6 (2016) 101-106.
- [8] R. Matsumoto, K. Shimizu, T. Nagashima, H. Tanaka, M. Mizuno, F. Kikkawa, M. Hori, H. Honda, Plasma-Activated Medium Selectively Eliminates Undifferentiated Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Regenerative Therapy*, 5 (2016) 55-63.
- [9] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, Y. Yamanishi, M. Hori, Synthesis of calcium oxalate crystals in culture medium irradiated with non-equilibrium atmospheric-pressure plasma, *Appl Phys Express*, 9 (2016) 1-4.
- [10] C. Ishida, M. Mori, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, M. Hori, A. Iwase, F. Kikkawa, S. Toyokuni, Non-thermal plasma prevents progression of

endometriosis in mice, *Free Radical Res*, (2016) 1-9.

[11] F. Utsumi, H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa, Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium, *Oncology reports*, 35 (2016) 3169-3177.

[12] N. Kurake, H. Tanaka, K. Ishikawa, T. Kondo, M. Sekine, K. Nakamura, H. Kajiyama, F. Kikkawa, M. Mizuno, M. Hori, Cell survival of glioblastoma grown in medium containing hydrogen peroxide and/or nitrite, or in plasma-activated medium, *Archives of biochemistry and biophysics*, 605 (2016) 102-108.

[13] H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, H. Kondo, K. Takeda, H. Hashizume, K. Nakamura, F. Utsumi, H. Kajiyama, H. Kano, Y. Okazaki, S. Toyokuni, S. Akiyama, S. Maruyama, S. Yamada, Y. Koderu, H. Kaneko, H. Terasaki, H. Hara, T. Adachi, M. Iida, I. Yajima, M. Kato, F. Kikkawa, M. Hori, Plasma with high electron density and plasma-activated medium for cancer treatment, *Clinical Plasma Medicine*, 3 (2015) 72-76.

[14] H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, S. Maruyama, Y. Koderu, H. Terasaki, T. Adachi, M. Kato, F. Kikkawa, M. Hori, Cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma with ultra-high electron density, *Phys Plasmas*, 22 (2015) 122003.

[15] N. Hattori, S. Yamada, K. Torii, S. Takeda, K. Nakamura, H. Tanaka, H. Kajiyama, M. Kanda, T. Fujii, G. Nakayama, H. Sugimoto, M. Koike, S. Nomoto, M. Fujiwara, M. Mizuno, M. Hori, Y. Koderu, Effectiveness of plasma

treatment on pancreatic cancer cells, *International journal of oncology*, 47 (2015) 1655-1662.

他 3 件

〔学会発表〕(計 14 件)

[1] 田中 宏昌(招待講演)、「プラズマ科学と生命科学の融合」、熊本大学大学院自然科学研究科プロゼミ

熊本、2016 年 9 月 13 日

[2]H. Tanaka (invited), M. Mizuno, K. Ishikawa, K. Takeda, H. Kondo, H. Hashizume, K. Nakamura, H. Kajiyama, H. Kano, Y. Okazaki, S. Toyokuni, S. Maruyama, F. Kikkawa, and M. Hori, “Plasma-activated medium and Cancer”, 6<sup>th</sup> international conference on plasma medicine, Bratislava, Slovakia, Sep05-11, 2016

[3] 田中 宏昌(招待講演)、堀 勝、「ドライプロセスと医療」、夏季実習セミナー (II) “ドライプロセスの基礎と薄膜作製”

習志野、2016 年 8 月 25 日

[4] Hiromasa Tanaka (invited), Masaaki Mizuno, Fumitaka Kikkawa, and Masaru Hori, “Plasma-activated medium as a novel cancer therapeutic approach”, 6th International Symposium on Plasma Biosciences (ISPB 2016), Busan, Korea, Aug21-26, 2016

[5] Hiromasa Tanaka (invited), Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Keigo Takeda, Hiroshi Hashizume, Kae Nakamura, Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Yasumasa Okazaki, Shinya Toyokuni, Shoichi Maruyama, Tetsuo Adachi, Hiroki Kaneko, Hiroko Terasaki, Yasuhiro Koderu, Fumitaka Kikkawa, and Masaru Hori, “INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS OF CANCER CELL DEATH USING PLASMA-ACTIVATED MEDIUM”, The 3<sup>rd</sup> International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, Washington D.C., USA, Apr. 11-12, 2016

[6] Hiromasa Tanaka (invited) and Masaru Hori,

“Plasma Medical Innovation in Japan”,  
Special Lecture by Prof. Zdenko Machala,  
Nagoya University, Nagoya, 2016 March 11

[7] 田中 宏昌(招待講演)、水野 正明、豊國 伸哉、丸山 彰一、小寺 泰弘、寺崎 浩子、足立 哲夫、加藤 昌志、吉川 史隆、堀 勝、「非熱大気圧プラズマのがん治療への応用とその細胞内分子機構」、第 19 回 若手科学者によるプラズマ研究会、日本原子力研究開発機構 那珂核融合研究所、2016 年 3 月 14 日-16 日

[8] 田中 宏昌(招待講演)、堀 勝、「がん細胞へのプラズマ影響」、153 委員会 プラズマスクール---プラズマ医療の基礎と応用、弘済会館、2016 年 2 月 8 日

[9] 田中 宏昌(招待講演)、水野 正明、吉川 史隆、堀 勝、「大気圧プラズマを利用したがん治療」、第 18 回癌治療増感研究会シンポジウム、奈良県文化会館、2016 年 2 月 5 日-6 日

[10] H. Tanaka, M. Mizuno, F. Kikkawa, and M. Hori, “Progress of Plasma Medical Science Innovation”, Sungkyunkwan University (SKKU)& Nagoya University (NU) Joint Symposium 2015, Nagoya, Japan, Nov 25-26, 2015

[11] Hiromasa Tanaka (invited), Masaru Hori, “Interactions between plasma-activated medium and cancer cells”, Bioplasmas and Plasmas with Liquids Conference, Bertinoro, Italy, Sep13-16, 2015

[12] 田中 宏昌(招待講演)、水野 正明、豊國 伸哉、丸山 彰一、小寺 泰弘、足立 哲夫、寺崎 浩子、吉川 史隆、堀 勝、「プラズマ医療領域の創成と進展「大気圧プラズマによるがん治療」」、第 68 回日本酸化ストレス学会、鹿児島、2015 年 6 月 12 日

他 2 件、

〔図書〕(計 1 件)  
田中 宏昌、堀 勝、

ドライプロセスによる表面処理・薄膜形成の応用 **12.2**, 272-282 (2016)、2016 年 12 月 28 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 6 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、内海 史、中村 香江、石川 健治、竹田 圭吾、田中 宏昌、加納 浩之

権利者：名古屋大学、NU エコエンジニアリング株式会社

種類：特許

番号：PCT/JP2015/006419

出願年月日：2015 年 12 月 23 日

国内外の別：国外

他 5 件、

取得状況 (計 1 件)

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：堀 勝、水野 正明、吉川 史隆、梶山 広明、内海 史、中村 香江、石川 健治、竹田 圭吾、田中 宏昌、加納 浩之

権利者：名古屋大学、NU エコエンジニアリング株式会社

種類：特許

番号：6099277

取得年月日：2017 年 3 月 3 日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(3) 連携研究者

石川 健治 (ISHIKAWA KENJI)

名古屋大学・プラズマナノ工学研究センター・特任教授

研究者番号：60417384

(4) 研究協力者

中村 香江 (NAKAMURA KAE)

名古屋大学・医学研究科・研究員

加納 浩之 (KANO HIROYUKI)

NU エコエンジニアリング株式会社・社長