

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06883

研究課題名(和文) プラズマによる腫瘍特異的細胞死の誘導機序に関する研究

研究課題名(英文) Mechanistic study on tumor-selective killing by plasma

研究代表者

相馬 正義 (SOMA, Masayoshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30246855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧プラズマは、がん細胞だけを傷害して正常細胞に影響を与えないために副作用の少ない次世代の癌治療法として期待されている。しかし、その腫瘍選択的な細胞死誘発作用のメカニズムについてはよくわかっていないのでこれについて調べた。その結果、低温大気圧プラズマはがん細胞だけにミトコンドリアの断片化と凝集を起し死滅させること、またその原因として、活性酸素がこれらのミトコンドリア形態異常のメディエーターであり、がん細胞の方が正常細胞よりも活性酸素蓄積による酸化ストレスが起りやすいためであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cold atmospheric plasma (CAP) exhibits cytotoxicity against malignant cells, but not toward normal cells and is emerging as a promising new tool for cancer treatment. We found that CAP-activated medium (PAM) induced mitochondrial network aberration in a panel of human cancer cells, but not in non-transformed cells. CAP irradiation resulted in the generation of reactive oxygen species (ROS) most likely hydrogen peroxide (H₂O₂) in PAM, and in turn caused intracellular ROS generation especially within the mitochondria. PAM caused excessive mitochondrial fragmentation, swelling, and clustering, all responses as well as the cell death were abolished by ROS scavengers. The vulnerability of tumor cells to mitochondrial network aberration seemed to result from their higher sensitivity to mitochondrial ROS accumulation induced by PAM or H₂O₂. The present findings shed a light on the importance of mitochondrial network remodeling as a powerful target for tumor-selective cancer treatment by PAM.

研究分野：総合領域

キーワード：プラズマ 癌 ミトコンドリア 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

新規ながん治療法として室温、大気圧下で作成される低温(コールド)大気圧プラズマ(Cold atmospheric plasma, CAP)が注目されている。正常細胞に影響を与えず腫瘍細胞を傷害することから、副作用の少ない抗がんツールとして期待されている。しかし、その研究の歴史は浅く、その作用機序は、活性酸素(ROS)とアポトーシスの誘発以外ほとんど解明されていなかった。われわれは、CAP 照射培地(Plasma-activated medium, PAM)でがん細胞を培養するとミトコンドリアの断片化と凝集が誘導されることを見出した。この反応は、正常細胞では見られず、腫瘍特異的であることから、CAP の腫瘍選択的な傷害性のカギとなる現象と考えられた。

2. 研究の目的

このミトコンドリア形態の変化の生物学的意義ならびに分子メカニズムについてROSの関与ならびに細胞死の誘発における役割を中心に解析する。さらに、この解析を踏まえてCAPの抗がん効果を高める技法の開発を行い、CAPによる効果的ながん治療法の分子的基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) CAPならびにPAMの作成:

CAPは誘電体バリア放電装置を有する自作大気圧プラズマジェット装置でヘリウムガスの放電により作成した(ガス流速 300 mL/分、周波数 20KHz、ピーク電圧 8kV、電流 20 mA)。10%ウシ胎児血清(FCS)を含む DMEM 培地 1 mL にCAPを1または5分間照射したものをPAMとした。

(2)細胞:

がん細胞モデルとして、ヒト骨肉腫細胞、悪性黒色腫、肺がん細胞株を用いた。正常細胞モデルとして、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)、ヒト肺線維芽細胞(WI-38)、ヒト上皮メラノサイトを用いた。これらの細胞にPAMを添加後24~72時間培養して実験に供した。

(3)ミトコンドリアの形態観察:

生細胞イメージングで行った。細胞を8穴イメージングチェンバーに播き、接着後に24時間薬剤で処理した。ミトコンドリアをMitoTracker CMXRos、細胞核をHoechst33342でそれぞれ染色して、EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, 1200倍)で観察した。共焦点イメージングは、63x, 1.20 n.a.油浸レンズ(C-Apochromat)を用いて、Airyscan laser scanning microscopy (LM880, Carl-Zeiss Microscopy)で観察した。

(4) ROSの産生:

PAM中のROSレベルはFRAS4 Free Radical Analytical System(WisnerII Co. Ltd., Pharma, Italy)を用いたdROMテストで行っ

た。CAPによる細胞内ROSの産生は、ミトコンドリア局在型スーパーオキシドプローブMitoSOX Redを用いてマイクロプレート蛍光リーダー(Fluoroskan ACENT, Thermo Fisher Scientific)で測定した(励起 542 nm, 発光 592 nm)。

(5)細胞増殖、生存率、細胞死解析:

既報のように行った。細胞を96穴マイクロプレートに播き、PAM添加24~72時間後にcell counting reagent SFを添加し1時間インキュベートして細胞増殖を測定した。細胞生存率は、WST-8アッセイによるCell counting Kit (Dojindo)で測定した。細胞死は、細胞を8穴イメージングチェンバーに播きPAM添加18時間後にLIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて生細胞をCalcein-AM, 死細胞をEthD-1で染色後、EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, 300倍)で観察した。

(6)ウエスタンブロッティング:

ミトコンドリアの分裂に關与するDrp1およびリン酸化のレベルについて特異的抗体を用いたウエスタンブロッティング法で解析した。

4. 研究成果

(1) PAMは起源の異なるがん細胞を傷害し、その作用は腫瘍選択的である

CAP照射1分間で作成したPAMは細胞傷害性が弱かったが、CAP照射5分間PAMは強く細胞を傷害した。PAM添加18~24時間後にA375悪性黒色腫、A549肺がん、MG63骨肉腫細胞のいずれでも細胞形態の異常やディッシュからの剥離が見られ、72時間後には生存率が有意に減少した。これに対して、正常細胞であるHDFやメラノサイトでは生存率はほとんど減少しなかった(図1)。

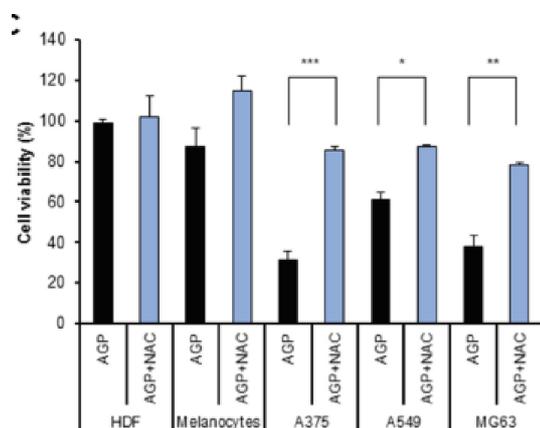


図1. PAMの腫瘍選択的細胞傷害作用

(2) PAM による細胞死は細胞非依存性ならびに依存性 ROS を介する

dROM テストの結果、CAP 照射 5 分後 PAM 中の ROS・フリーラジカルレベルは放電なしでヘリウムガスを噴射したコントロールに比較して有意に増加したが、CAP 照射 1 分後では増加しなかった。コントロール、1 および 5 分間照射のレベルはそれぞれ、 21.5 ± 0.7 , 25.7 ± 3.2 , 33.3 ± 1.9 1 CARR Units (N=3) ここで 1 CARR は 0.08 mg/dL ($240 \mu\text{M}$) H_2O_2 に相当)。CAP 照射後 MitoSOX Red レベルは速やかに濃度、時間依存的に増加し、その増加は抗酸化剤 *N*-acetylcysteine (NAC) により完全に抑制された。NAC は PAM による細胞死をほぼ完全に抑制した (図 1)。PAM による細胞死は汎カスパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK、カスパーゼ-3 特異的阻害剤 Z-DEVD-FMK、ネクロトシス阻害剤 Necrostatin-1 によって全く抑制されなかった。

(3) PAM によるミトコンドリアの形態異常は ROS を介し、腫瘍特異的細胞死の要因である未処理がん細胞ではミトコンドリアは網状構造を示したが、PAM 添加 30 分~2 時間後から断片化し、4 時間後には膨潤して点状を呈した。高濃度 PAM 処理細胞ではこれらがさらに凝集した。このようなミトコンドリアの形態変化は放電なしのコントロールや正常細胞では 24 時間後でも見られなかった。これらの反応は、NAC によって完全に抑制された。さらに、細胞外から H_2O_2 を添加すると腫瘍特異的にミトコンドリアの断片化・膨潤・凝集が誘発され、これらの反応も NAC によって抑制された。

(4) PAM/ROS によるミトコンドリアの形態異常には Drp1 依存性経路が関与する

がん細胞では PAM 処理 1 時間後くらいからミトコンドリアの分裂に必要な Drp1 の Ser 616 のリン酸化が時間依存性に増加したが、正常細胞ではそのような変化は見られなかった。 H_2O_2 添加によっても同様の Drp1 Ser 616 のリン酸化の増加が腫瘍特異的に見られた。一方、Drp1 阻害剤 Mdivi-1 や Drp1 ノックダウンによってもミトコンドリアの形態異常は抑制されずかえって促進された。

(5) がん細胞は正常細胞よりもミトコンドリア酸化ストレスが起きやすい

PAM または H_2O_2 添加後の MitoSOX Red レベルはいずれのがん細胞でも正常細胞よりも有意に高かった。

(6) 研究の主な成果・国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

本研究の結果、ミトコンドリアの形態異常が PAM による細胞死誘発に深く関与することが初めて明らかとなった。また、この異常は、PAM の生物活性のメディエーターとして報告

されていた ROS を介し、これらの生物作用を H_2O_2 が模倣できることを示した。PAM による細胞死誘発のメカニズムは国内外で精力的に研究されているが、PAM によるミトコンドリアの形態異常はわれわれが初めて見出したもので、これを研究しているグループはない。

本研究の成果はこれまで不明であった ROS による酸化ストレスがどのように細胞死を誘発するかという問いに一つの答えを提供するものであり、がん細胞死の分子レベルのメカニズム研究に大きく貢献できる。

本研究のもう一つの大きな成果は、PAM の腫瘍選択性のメカニズムの一端を明らかにした点である。本研究から ROS による酸化ストレスに対してがん細胞が正常細胞よりも脆弱であり、この脆弱性がミトコンドリアでの ROS 蓄積が高いことによることが示された。ミトコンドリアの形態異常が ROS を介して誘発されることから、がん細胞は正常細胞よりもこのミトコンドリア形態異常が強く起りやすいことになり、PAM が腫瘍選択的に働く理由が理解できる。ミトコンドリアは非常に動的な細胞内小器官であり、生理的条件下においても、細胞内で分裂 融合を絶えず繰り返してその形態と機能を維持している。近年、ミトコンドリア形態変化の疾病における役割に注目が集まっている。特に、正常細胞の細胞死の促進が関連する神経変性疾患や糖尿病などのいくつかの疾患は、ミトコンドリアの分裂の亢進に起因することが明らかになりつつある。これに対して、がん細胞の細胞死におけるミトコンドリアの分裂の役割には促進と抑制の相反する報告があり、明らかになっていない。

われわれの実験系では、ミトコンドリアの分裂 (断片化) だけでは強い細胞死誘発には不十分で、その凝集が必要であることが示された。興味深いことに、誘発される細胞死はカスパーゼ非依存性であることから、非アポトーシス型の細胞死であると考えられた。この知見は、ミトコンドリアの分裂の役割についての相反する結果は細胞死の様態によって、役割が異なることに起因する可能性を示した。腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (TRAIL) は、PAM と同様に腫瘍細胞選択的に細胞死とミトコンドリアの形態異常を誘発し、その作用は Mdivi-1 によって促進される。

注目すべきことに、本研究で、Mdivi-1 は PAM 感作剤としても作用することならびにミトコンドリアの形態異常を増強することが分かった。この発見は、少なくともヒト骨肉腫細胞、悪性黒色腫、肺がん細胞では生理的なミトコンドリアの分裂がミトコンドリアの形態異常を抑制することを示唆している。また、この知見は、細胞死につながるミトコンドリアの断片化は Drp1 で制御される生理的な分裂過程以外のメカニズムで起きることが示唆される。

最近、ミトコンドリアの断片化はミトファジーによっても誘発されることが報告された。ミトファジーは、本来傷害されたミトコンドリアを除去してミトコンドリアの機能を維持するための細胞保護的な反応であるが、神経変性疾患などではこれが異常亢進することがミトコンドリアの形態異常と細胞死の要因となることが示されている。本研究で明らかになったように、がん細胞のミトコンドリアでは酸化ストレスが起りやすいため、その傷害も正常細胞に比べて頻度が高いと考えられ、これに対するミトファジーも活性化されていることが想像に難くない。従って、PAM によるミトコンドリアの形態異常ならびに細胞死がミトファジーの過度な活性化に起因しており、それが細胞選択性の要因となることが考えられる。この仮説の立証は今後の課題である。

<引用文献>

Akita M, Suzuki-Karasaki M, Fujiwara K, Nakagawa C, Soma M, Yoshida Y, Ochiai T, Tokunaga T, Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial division inhibitor-1 induces mitochondrial hyperfusion and sensitizes human cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *International Journal of Oncology* 2014 45:1901-1912. doi: 10.3892/ijo.2014.2608.

Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget* 2016 7:19910-19927. doi: 10.18632/oncotarget.7889.

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3件)

1. Tokunaga T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ito T, Onoe-Takahashi A, Ochiai T, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. Plasma-stimulated medium kills TRAIL-resistant human malignant cells by promoting caspase-independent cell death via membrane potential and calcium dynamics modulation. *Int J Oncol* 査読有 2018 52(3):697-708. doi: 10.3892/ijo.2018.4251.
2. Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma

M, Suzuki-Karasaki Y.

Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget* 査読有 2016 7(15):19910-27. doi: 10.18632/oncotarget.7889.

3. Suzuki-Karasaki Y, Saito K, Fujiwara K, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Soma M. Distinct effects of TRAIL on the mitochondrial network in human cancer cells and normal cells: role of plasma membrane depolarization. *Oncotarget* 査読有 2015 6(25):21572-88. Doi: 10.18632/oncotarget.4268

[学会発表](計1件)

1. 徳永智彦、小野江明日香、相馬正義、落合豊子、鈴木良弘：Plasma-stimulated medium (PSM)のアポト - シス抵抗性悪性腫瘍に対する抗腫瘍作用メカニズム 第33回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2017年6月 秋田

6. 研究組織

(1)研究代表者

相馬 正義 (SOMA, Masayoshi)
日本大学・医学部・教授
研究者番号：30246855

(2)研究分担者

鈴木 良弘 (SUZUKI, Yoshihiro)
日本大学・医学部・研究員
研究者番号：80206549

浅井 朋彦 (ASAI, Tomohiko)
日本大学・理工学部・教授
研究者番号：00386004

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)
日本大学・医学部・助教
研究者番号：40595708