

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19849

研究課題名(和文) プラズマ照射液腹腔内投与による癌性腹膜炎制御への挑戦

研究課題名(英文) Intraperitoneal administration of plasma activated medium: Proposal of a novel treatment option for peritoneal metastasis from gastroenterological cancer

研究代表者

服部 憲史 (HATTORI, Norifumi)

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70744051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： プラズマを照射した培養液(プラズマ照射液：plasma activated medium (以下 PAM))は、胃癌および膵癌細胞株において抗腫瘍効果を認めた。正常細胞株は癌細胞株と比較し、PAMに対する感受性が低く、PAMに対する抵抗性を示した。マウスモデルにおいても、PAMの抗腫瘍効果を確認した。PAMは最適な条件下において選択的な癌細胞に対する抗腫瘍効果を示すことから、プラズマ照射液による治療は、胃癌および膵癌治療において有望な治療法となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We demonstrated that plasma-activated medium (PAM) treatment, which induced apoptosis through intracellular ROS generation, had antitumor effects on gastric cancer cell lines and pancreatic cancer cell lines. PAM effectively killed pancreatic cancer cells (Capan2) in comparison with human pancreatic duct epithelial cells (HPDE6/C7). PAM inhibited the tumor growth of gastric cancer and pancreatic cancer in vivo animal study. The cytotoxic effects were selective to cancer cells at optimal experimental conditions, showing potential of the PAM treatment as a novel mode of treatment for gastric cancer and pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：プラズマ療法 癌性腹膜炎 腹腔内投与 非平衡常圧プラズマ アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

プラズマとは、固体、液体、気体続く物質の第4の状態と呼ばれ、電子、陽イオン、ラジカル、光などから構成され、高エネルギー状態にある。従来プラズマは高温低圧下に産生されていたが、低温大気圧下での産生（非平衡大気圧プラズマ：NEAPP）が可能となり、その様々な特性から「医療用プラズマ」という新たな研究領域が確立された。プラズマ治療は癌治療における手術、化学療法、放射線治療に続く「第4の治療法」として期待されている。近年プラズマを照射した培養液（プラズマ照射液：plasma activated medium (以下PAM)）が膠芽腫、卵巣癌に対して抗腫瘍効果を有することが確認されており、我々も消化器癌においては胃癌で、PAMの抗腫瘍効果を確認した。また正常細胞株（線維芽細胞株）は、癌細胞株と比較しPAMに対する抵抗性を示し、PAMは選択的な細胞障害性を有することも報告してきた。正常細胞を傷害することなく、腫瘍細胞のみにターゲットを絞ることができる治療こそが、癌治療において極めて有用な治療法である。

2. 研究の目的

(1) プラズマ照射液による細胞障害性の検討

我々は胃癌細胞株に対する細胞障害性を報告してきたが、膵癌などその他の消化器癌と正常細胞株についてもPAMの癌細胞選択的な細胞障害性を調べる。細胞障害性メカニズムについて検討するため、細胞形態変化、Caspase3/7活性、活性酸素種(ROS)産生の変化について解析する。

(2) プラズマ照射液の癌性腹膜炎に対する効果の検証

胃癌細胞株を用い、腫瘍の進展、転移に関連する癌細胞の遊走能および接着能にPAMが与える影響について検討する。マウス癌性腹膜炎モデルを作成し、*in vivo*での効果の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 膵癌細胞株に対するプラズマ照射液による抗腫瘍効果とその機序の検討

4種の膵癌細胞株(PANC-1, Capan-2, BxPC-3, MIA Paca-2)と正常細胞株(膵管上皮細胞:HPDE6/7)を用いた。プラズマ照射液:plasma-activated medium (PAM)は、アルゴンガスをを用い60mmペトリディッシュに10%FBSの含まれていないRPMI-1640培地を6ml投与し、電極と培地の液面との距離を15mm、プラズマの照射時間を30秒、1分、2分、3分、5分と設定し作成した。まずPAMの細胞障害性をWST-1アッセイにより調べた。96wellプレートに1000, 5000, 10000細胞数の膵癌細胞およ

び膵管上皮細胞を播種し、24時間培養後に培地をPAMに交換、さらに24時間培養し細胞増殖能検査を行った。細胞障害メカニズムについて検討するために、細胞形態変化、Caspase3/7の活性、活性酸素種

(ROS)の変化についても解析した。12wellプレートに膵癌細胞を播種し、培地をPAMに交換してから経時的に細胞形態変化を観察した。8wellカルチャースライドに膵癌細胞株を播種し、PAMで2時間培養後、Caspase3/7の活性化を蛍光顕微鏡にて検出した。その後、8wellカルチャースライドに膵癌細胞株を播種し、PAMで2時間培養後、ROSの蓄積を蛍光顕微鏡にて観察した。ROSの役割について評価するためにROSスカベンジャーであるNアセチルシステイン(NAC)存在下にPAMによる24時間培養後、WST-1アッセイにて細胞増殖能検査を行った。最後にPAMの治療効果を検証するためにマウス皮下腫瘍モデルによる*in vivo* studyを行った。Capan2を用い、癌細胞皮下接種後、週3回、PAM投与群は200 μ lのPAMを、コントロール群は200 μ lのRPMI-1640を皮下注射し腫瘍体積の比較検討を行った。

(2) プラズマ照射液の胃癌癌性腹膜炎に対する効果の検証

3種の胃癌細胞株(SC-2-NU, AGS, GCIY-EGFP)を使用し、遊走能はwound healing assayにて、接着能はadhesion assayにて検討した。マウス癌性腹膜炎モデルはEGFP導入胃癌細胞株(GCIY-EGFP)を用いて作成した。腹腔内へのGCIY-EGFP株の腹腔内注入に引き続き、同日より2mlのPAMを腹腔内に連日4日間投与、3日間の休止の後さらに4日間の連日投与を行った。播種形成の状況については、IVIS Spectrumを用いた*in vivo* imagingの手法を用い、7日毎にマウス腹部の蛍光を定量的に測定することによりモニタリングを行った。

4. 研究成果

(1) 膵癌細胞株に対するプラズマ照射液による抗腫瘍効果とその機序の検討

すべての膵癌細胞株においてPAMによる抗腫瘍効果を認め、細胞株によってその感受性に差異を認めた(Fig. 1)。正常細胞株は癌細胞株と比較しPAMに対する感受性が低く、PAMに対する抵抗性を示した(Fig. 2, 3)。PAM投与により、膵癌細胞株自体の縮小、核の濃縮、細胞膜の空胞形成といったアポトーシスに特有の形態変化を認め

(Fig. 4)、形態変化を来した細胞に一致してCaspase 3/7の活性化を認め(Fig. 5)、PAMによりアポトーシスが誘導されたことを確認した。さらに細胞内においてROSの蓄積が増加し(Fig. 6)、NACによりPAMの抗腫瘍効果がすべての癌細胞株にお

いて抑制されたことから (Fig. 7), プラズマにより産生された ROS がアポトーシスを誘導することが示唆された. マウス皮下腫瘍モデルにおいてはコントロール群と PAM 投与群における癌細胞皮下接種後 28 日目の腫瘍体積を比較したところ, PAM 投与群において有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた (89 ± 38 vs. 28 ± 22 ($\text{mm}^3 \pm \text{SD}$), $p = 0.0031$). PAM 投与群の腫瘍重量は, コントロール群と比較し 64%減少した ($p = 0.0018$). 病理組織所見において PAM 投与群は約 60%の腫瘍変性を認めた (Fig. 8).

Fig. 1

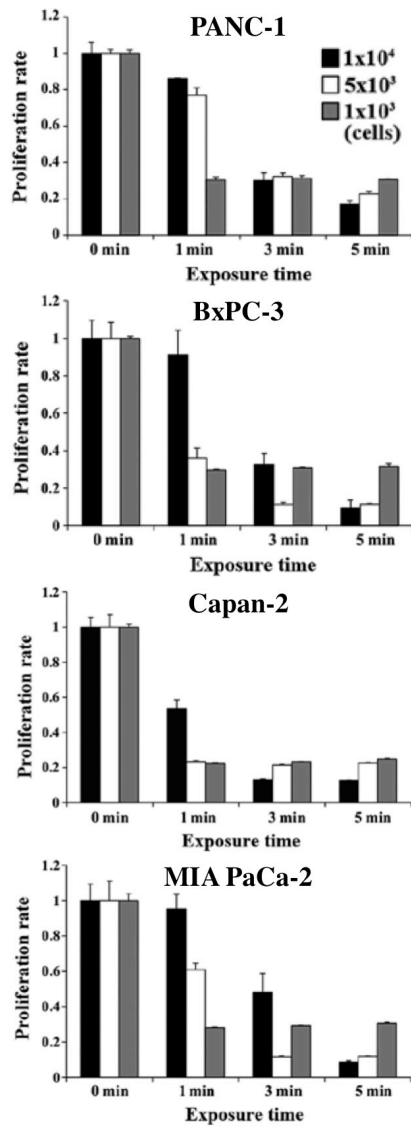


Fig. 2

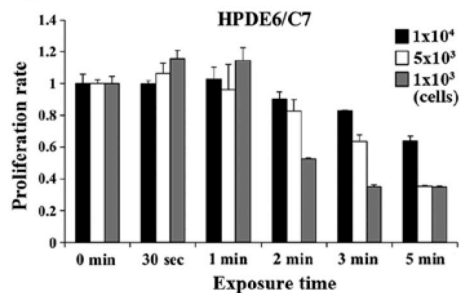


Fig. 3

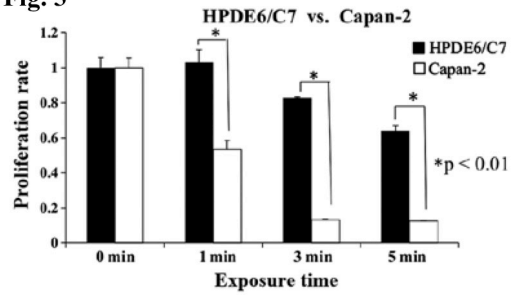


Fig. 4

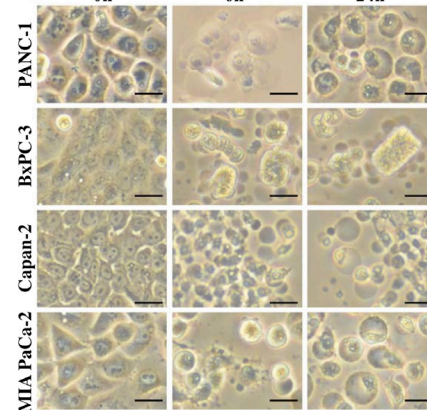


Fig. 5

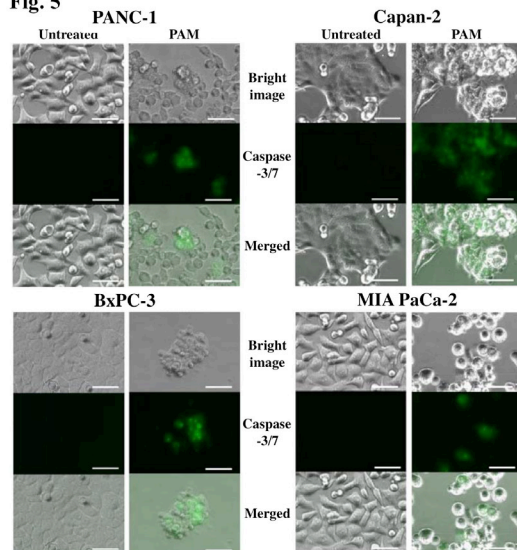


Fig. 6

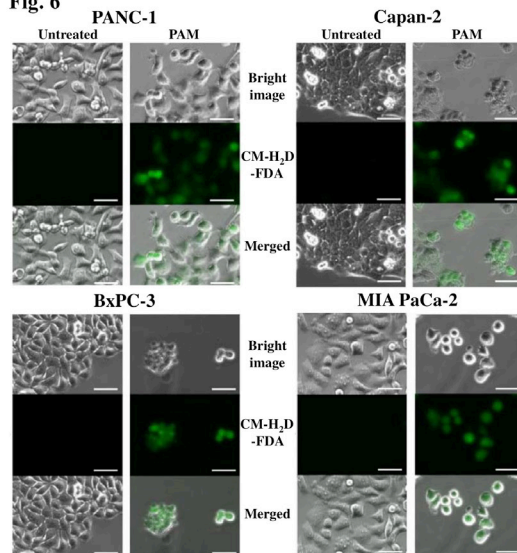


Fig. 7

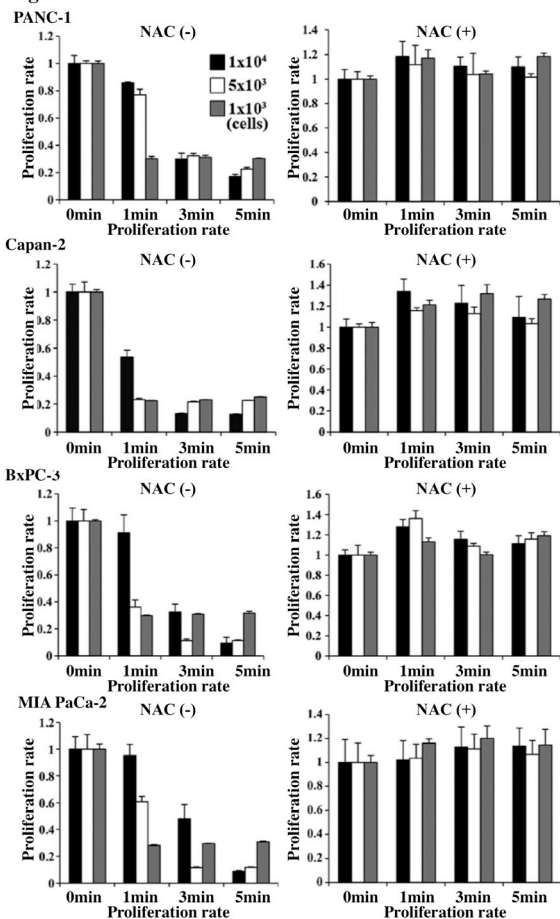
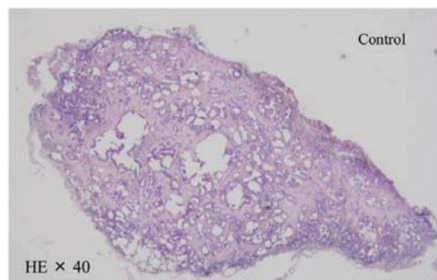
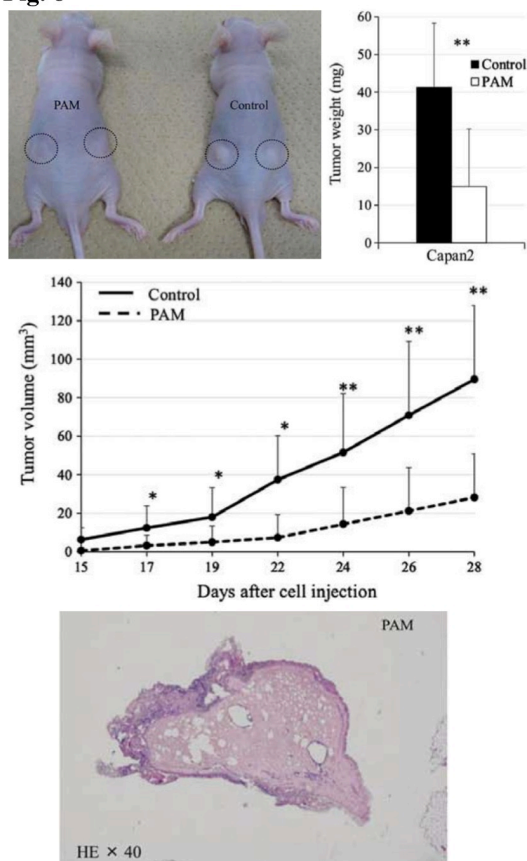


Fig. 8



(2) プラズマ照射液の胃癌癌性腹膜炎に対する効果の検証

SC-2-NU, AGS において PAM 存在下においては細胞の遊走が低下する傾向が示された (Fig 9). また浮遊状態とした SC-2-NU, AGS, GCIY-EGFP を短時間 PAM に暴露することによりいずれの細胞株も著明に接着能が低下することが示された (Fig 10). これら *in vitro* の実験結果も踏まえ、マウス癌性腹膜炎モデルにおける PAM の腹腔内投与の有効性と安全性を検証することを目的に *in vivo* study を施行した. 治療開始 15 日目の時点で、control 群 (n=5) においては全例に播種の形成を示唆する所見を認める一方で、PAM 腹腔内投与群 (n=5) においては、1 例に播種の形成が疑われるのみであった. 同日、全例開腹下に観察を行ったが、*in vivo* imaging で得た結果と同様に播種形成率は control 群及びプラズマ照射液腹腔内投与群においてそれぞれ 100%, 20% であった (Fig. 11). 治療期間中に食事摂取量の低下や体重の変化は認めず、腹膜炎や腹腔内臓器障害などの PAM による有害事象を疑わせる所見も認めなかった.

Fig. 9

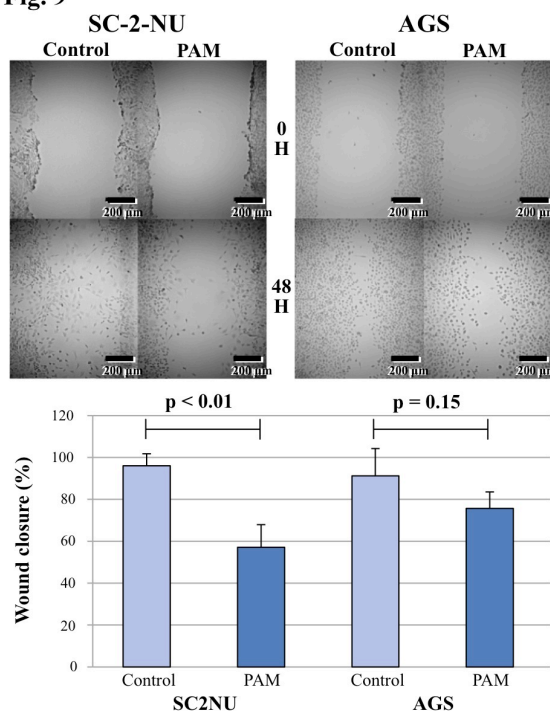


Fig. 10

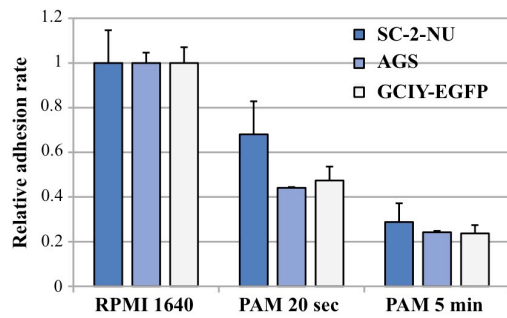
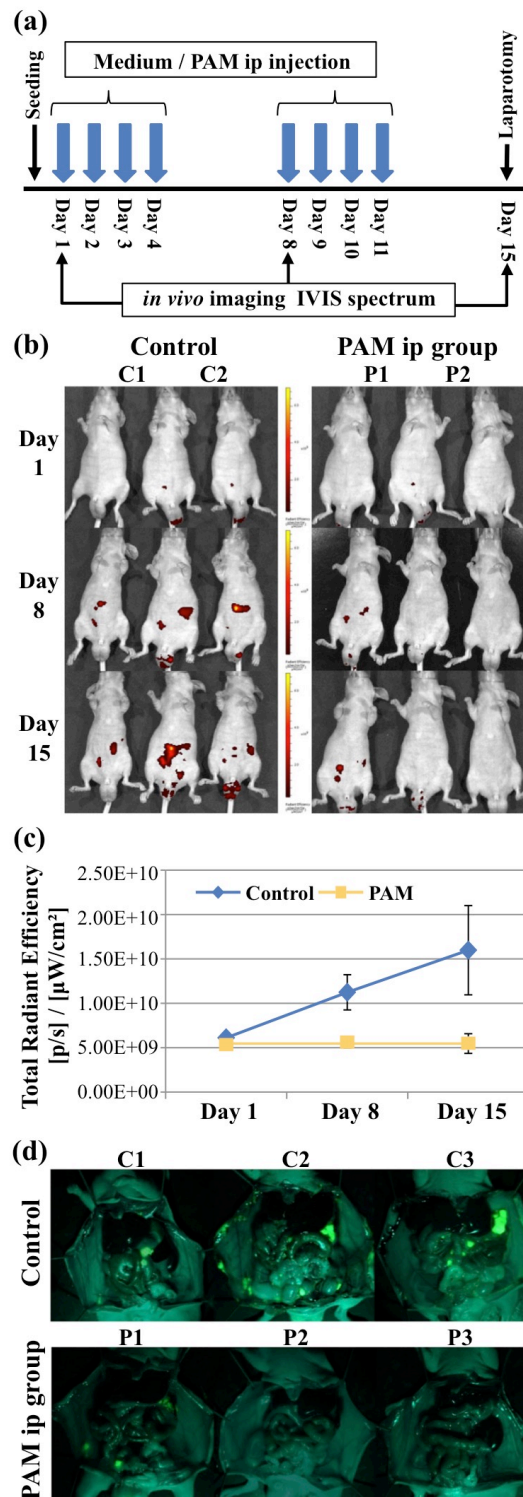


Fig. 11



本研究は、消化器癌において胃癌のみならず、膵癌においても PAM の抗腫瘍効果を認め、マウス皮下腫瘍モデルにおいても PAM の膵癌細胞株に対する腫瘍増大抑制効果を確認した。胃癌においては、マウス腹膜播種モデルにおいて PAM の腹腔内投与が腹膜播種形成を抑制することを初めて示し、PAM の腹腔内投与が胃癌腹膜播種治療において有望な治療法となる可能性が示唆された研究である。

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 2 件)

① Shigeomi Takeda, Suguru Yamada, Norifumi Hattori, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Hiroaki Kajiyama, Mitsuro Kanda, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Tsutomu Fujii, Michitaka Fujiwara, Masaaki Mizuno, Masaru Hori, Yasuhiro Kodera. *Annals of Surgical Oncology*. 2017 May;24(5):1188-94. doi: 10.1245/s10434-016-5759-1. 査読有り

② Norifumi Hattori, Suguru Yamada, Koji Torii, Shigeomi Takeda, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Hiroaki Kajiyama, Mitsuro Kanda, Tsutomu Fujii, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Masaaki Mizuno, Masaru Hori, Yasuhiro Kodera. *Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. International Journal of Oncology*. 2015 Nov;47(5):1665-62. doi: 10.3892/ijo.2015.3149. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 武田重臣, 山田 豪, 服部憲史, 田中宏昌, 神田光郎, 小林大介, 田中千恵, 藤井努, 藤原道隆, 水野正明, 小寺泰弘. Plasma-activated medium (PAM) による新たな胃癌腹膜播種治療の可能性. 第 117 回日本外科学会定期学術集会. 2017 年 4 月 27 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市西区)

② 武田重臣, 山田 豪, 神田光郎, 田中千恵, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘 (研究協力者: 武田重臣). Effectiveness of intraperitoneal administration of plasma activated medium in mouse models. (腹膜播種に対する plasma activated medium (PAM) の有効性に関する研究). 第 75 回日本癌学

会学術総会. 2016年10月6日. パシフ
ィコ横浜 (神奈川県・横浜市西区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 憲史 (HATTORI, Norifumi)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：70744051

(2) 研究協力者

武田 重臣 (TAKEDA, Shigeomi)
名古屋大学・大学院医学系研究科
・大学院生