

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：32206

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：24108007

研究課題名(和文)分子生物学的解析に基づくプラズマ誘起細胞増殖・腫瘍細胞死誘起メカニズムの体系化

研究課題名(英文) Systematization of the mechanism by which plasma irradiation causes cell growth and tumor cell death

研究代表者

清水 伸幸 (SHIMIZU, Nobuyuki)

国際医療福祉大学・臨床医学研究センター・教授

研究者番号：70262128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 55,900,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマの医療応用には大きな期待が寄せられているが、その効果発現メカニズムは不明である。本研究では、プラズマが細胞死を惹起するメカニズムを培養細胞実験で検討し、過酸化水素と一酸化窒素の関与を証明した。更に、今後のプラズマの臨床応用の広がりを見据え、小動物(マウス)と大動物(ミニブタ)を用いて、プラズマ照射装置が生体へ及ぼす影響、特に癒着形成と全身および局所の炎症の評価を行う系を確立した。

研究成果の概要(英文)：The application of the plasma into medical field is thought to be greatly useful, but the mechanism of plasma irradiation is still unclear. In our study, we performed cultured cell experiments and proved that hydrogen peroxide and nitrogen oxide played important roles of cell death. The spread of the clinical applicability of plasma is expected. So, we established a mouse animal and a pig model to investigate the influence of plasma irradiation equipment, especially focusing on adhesion formation and inflammation.

研究分野：消化器外科

キーワード：プラズマ医療科学 動物モデル 酸化ストレス プロテオソーム

1. 研究開始当初の背景

医療現場においては低侵襲治療が広がりを見せているが、手術創を小さくすることに主眼が置かれ、止血に関しては寧ろ長期的には侵襲の強くなるエネルギーデバイスが使用されることが増え、真の低侵襲治療を達成するための新たな医療機器開発が求められている。また、特に、がん治療においては、手術・放射線・薬物治療への抵抗性を呈する疾患に対して、第4の治療法開発が急務となっている。

大気圧低温プラズマの医療応用は、止血装置としての低侵襲性や、手術等に代わる新たな治療法となる可能性などの期待が寄せられている。しかしながら、プラズマ照射が生体内や腫瘍細胞内で効果を発揮するメカニズムは十分に解明されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

大気圧低温プラズマ照射装置は医療機器としての実用化が望まれており、臨床応用が近いと考えられる止血装置は小動物実験における止血能力や癒着軽減といった利点はあるが、作用発現のメカニズムには不明な点も多い。また、プラズマ照射を施した細胞培養液の抗腫瘍効果に関しても、そのメカニズムは明らかになっていない。

我々は、プラズマが実臨床の場で用いられるために欠くことのできないと考えられる、正常組織や腫瘍組織に対するプラズマ照射が及ぼす影響を検討した。すなわち(1)プラズマが細胞死を誘発するメカニズムについて明らかにすることを目標として検討を開始した。

培養細胞系から小動物モデルまででの検討を開始したところ、本研究領域内でもプラズマ照射装置の多様性が次第に明らかとなり、どのような装置を実臨床に導入するべきかという問題が生じた。そこで装置の生物学的評価を行うための実験系を確立するべく、(2)マウス腹腔内癒着モデルの確立を行い、引き続き(3)マウス癒着モデルに対するプラズマ照射の影響を検討した。また前臨床試験としての大動物実験として、(4)ミニプタを使用した止血力評価と生物学的影響検討のモデルの作成を行うこととした。

3. 研究の方法

【1】プラズマが細胞死を誘発するメカニズム

プラズマ照射が生体組織に及ぼす影響に関して、培養細胞を plasma-activated medium (PAM) で刺激した際に、どのような生物学的変化が生じ、どのような細胞内情報伝達系が活性化されるかについて検討した。すなわち、ヒト肺胞上皮細胞由来 A549 細胞に対する PAM の影響について、酸化ストレス等の炎症を惹起する既知の様々なサイトカイン、およびその阻害薬を

投与する系との比較検討を進めた。

【2】マウス腹腔内癒着モデルの確立

生後 8-12 週齢の Balb/c マウスを、イソフルランの吸入麻酔下に開腹した。開腹創は約 1cm とし、腹腔外に盲腸を愛護的に出し、盲腸壁を双極型電気メスを用いて焼灼処置を行った。盲腸壁 3 か所を双極型電気メスし焼灼処置を行い、焼灼処置後は愛護的に腹腔内に盲腸を環納した。7 日後に安楽死させ、再開腹し腹腔内の癒着発生状況を評価するとともに、この際に生じている炎症の評価を行った。また、このモデルで腹水のプロテオミクス解析を行うプロトコル策定を進めた。

【3】マウスモデルに対するプラズマ照射の影響

確立したマウス腹腔内癒着モデルに対してプラズマ照射を行い、通常電気メスを用いた際に生じる変化との比較検討を行った。

【4】ミニプタモデルの確立

我々は、マウスの空腸動脈からの出血に対して行った止血操作において、大気圧低温プラズマ止血が、高周波止血に比べて、術後の炎症性癒着を顕著に改善できることを見出している。これをもとに、ミニプタの大網・腸間膜の非筋性動脈(毛細血管や細小動脈)より出血させ、マイルドプラズマ止血を行い、その効果効能について、高周波凝固装置を用いた止血を比較対象として評価する系を確立した。

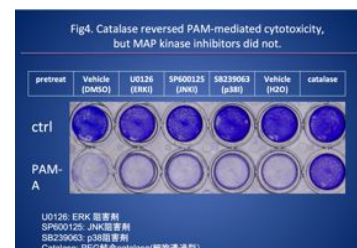
4. 研究成果

【1】プラズマが細胞死を誘発するメカニズム

ヒト肺胞上皮細胞由来 A549 細胞において、PAM は用量依存性に細胞障害性を示し、主要な 3 種の MAP kinase (ERK, JNK, p38) を強く活性化した。また、PAM は NF- κ B のリン酸化を引き起こし、炎症反応も惹起すること、histone H2AX, ATM のリン酸化を引き起こし、DNA 障害も惹起することが示唆された。

これらの細胞障害性には過酸化水素が関与していることが示唆された。

低濃度 PAM の前処置により、Doxorubicin による細胞障害性が軽減された。過酸化水素前処理でも Doxorubicin の毒性に抵抗性を示すが低濃度 PAM の効果に比べて弱かった。低濃度 PAM 前処理による細胞保護効果は、炎症性サイトカインによる細胞障害に対しては、Doxorubicin の場合より効果が



弱かった。以上の知見から、低濃度 PAM は細胞保護効果を示すが、その効果は酸化ストレスに依存するものの、過酸化水素以外の因子も介在することが示唆された。

プラズマ発生装置の違いによる PAM 内のラジカル由来因子についての検討では、プラズマ装置により、PAM 内の過酸化水素濃度は同程度でも、nitrite に関しては大きな違いが生じていた。これは空気中の窒素由来の NO 生成の違いを反映していると思われるが、nitrite はその分子状態のままでは生体内で比較的非活性であるが、虚血組織やアシドーシス組織では NO に還元されることが知られており、生体内に対する PAM の効果として、過酸化水素で説明できないものについては NO を介する可能性が考えられた。

【2】マウス腹腔内癒着モデルの確立

マウスモデルにおける適切な高周波凝固装置の出力が 3W であることを見出し、癒着形成時に血中 IL-6, IL-10 発現増強が認められることを確認した。

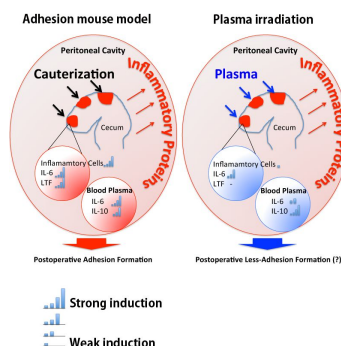


このモデルで腹水のプロテオミクス解析プロトコルを決定し、本モデルで検討すべき 7 種のタンパク質を同定した。

【3】マウスモデルに対するプラズマ照射の影響

癒着モデルにおいて認められた炎症性細胞（好中球、マクロファージ）の粘膜層への浸潤がプラズマ照射においては殆ど認められなかった。プラズマ照射による IL-6 の血中濃度の上昇は軽微であるが、IL-10 の血中濃度は癒着モデル同様にプラズマ照射によって上昇した。

局所における IL-6(mRNA) は癒着モデルとプラズマ照射時で有意な差は認められなかった。IL-6 の産生は好中球、マクロファージ、Th2 細胞のような炎症性細胞以外にも、繊維芽細胞、血管内皮細胞からも産生されることが知られており、それらの mRNA を検出している可能性が考えられた。一方、ラクトフェリンは好中球から産生されるが、プラズマ照射に対する癒着モデルにおけるラクトフェリンの mRNA レベルは、組織学的に確認された浸潤している好中球の量と関連していた。今後は局所における炎症と腹水中に放出される炎症タンパ



ク質の違いを検証すべき、と考えられた。

【4】ミニプタモデルの確立

全身麻酔下に開腹し、大網・腸間膜の非筋性動脈をメスで切開・出血させ、大気圧低温プラズマもしくは、高周波凝固装置を用いて止血処置を行い止血効果判定後に標本を採取して、安楽殺する。また、閉腹後に一定期間飼育した後に、麻酔下に実験動物用 PET で炎症の評価を行い、その後に安楽殺させて臓器を回収し、タンパク発現、遺伝子発現を解析するシステムを構築した。

ミニプタモデルによる PET-CT 撮像により、止血部位局所の炎症程度を、同一個体で継時的に観察することが可能となった。これまでの実験系では血液検査等で全身の炎症反応の評価を行ったが、本モデルでは局所の炎症を評価でき、今後は大気圧低温プラズマ止血装置の適正化に役立つものと期待している。



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 104 件)

1) Y. Saito, Y. Akazawa-Ogawa, A. Matsumura, K. Saigoh, S. Itoh, K. Sutou, M. Kobayashi, Y. Mita, M. Shichiri, S. Hisahara, Y. Hara, H. Fujimura, H. Takamatsu, Y. Hagihara, Y. Yoshida, T. Hamakubo, S. Kusunoki, S. Shimohama, N. Noguchi, Oxidation and interaction of DJ-1 with 20S proteasome in the erythrocytes of early stage Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* 29(2016) 30793.

2) K. Takemoto, H. Iwanari, H. Tada, K. Suyama, A. Sano, T. Nagai, T. Hamakubo, T. Takahashi, Optical inactivation of synaptic AMPA receptors erases fear memory. *Nat Biotechnol.* 35(2017) 38-47.

3) K. Soda, H. Yamashita, K. Chang, T. Kawamura, T. Hamakubo and N. Shimizu, Plasma Irradiation Effects to Intra-Abdominal Organ Compared with Adhesion Mouse Model, *Plasma Medicine* (2017), In Printing.

4) L.W. Yuan, H. Yamashita, Y. Seto, Glucose metabolism in gastric cancer: The cutting-edge, *World journal of gastroenterology*, 22 (2016) 2046-2059.

5) Akimoto Y, Ikehara S, Yamaguchi T, Kim J, Kawakami H, Shimizu N, Hori M, Sakakita H, Ikehara Y. Galectin expression in healing wounded skin treated with low-temperature plasma: comparison with

- treatment by electronical coagulation. Arch Biochem Biophys 605 (2016) 86-94.
- 6) N. Yokoi, Y. Fukata, D. Kase, T. Miyazaki, M. Jaegle, T. Ohkawa, N. Takahashi, H. Iwanari, Y. Mochizuki, T. Hamakubo, K. Imoto, D. Meijer, M. Watanabe, M. Fukata, Chemical corrector treatment ameliorates increased seizure susceptibility in a mouse model of familial epilepsy. Nature Medicine. 21(2015) 19-26.
- 7) N. Nomura, G. Verdon, HJ Kang, T. Shimamura, Y. Nomura, Y. Sonoda, SA Hussien, AA Qureshi, M. Coincon, Y. Sato, H. Abe, Y. Nakada-Nakura, T. Hino, T. Arakawa, O. Kusano-Arai, H. Iwanari, T. Murata, T. Kobayashi, T. Hamakubo, M. Kasahara, S. Iwata, D. Drew, Structure and transport mechanism of the mammalian fructose transporter GLUT5. Nature 526(2015) 397-401.
- 8) T. Arakawa, T. Kobayashi-Yurugi, Y. Alguel, H. Iwanari, H. Hatae, M. Iwata, Y. Abe, T. Hino, C. Ikeda-Suno, H. Kuma, D. Kang, T. Murata, T. Hamakubo, AD Cameron, T. Kobayashi, N. Hamasaki, S. Iwata, Crystal structure of the anion exchanger domain of human erythrocyte band 3. Science. 350(2015) 680-4.
- 9) K. Niimi, S. Aikou, S. Kodashima, K. Yagi, S. Oya, D. Yamaguchi, H. Yamashita, N. Yamamichi, M. Fujishiro, K. Koike, Y. Seto, Video of the Month: A Novel Endoscopic Full-Thickness Resection for Early Gastric Cancer, The American journal of gastroenterology, 110 (2015) 1535.
- 10) Y. Okumura, S. Aikou, H. Onoyama, K. Jinbo, Y. Yamagata, K. Mori, H. Yamashita, S. Nomura, M. Takahashi, K. Koyama, T. Momose, H. Abe, K. Matsusaka, T. Ushiku, M. Fukayama, Y. Seto, Evaluation of 18F-FDG uptake for detecting lymph node metastasis of gastric cancer: a prospective pilot study for one-to-one comparison of radiation dose and pathological findings, World journal of surgical oncology, 13 (2015) 327.
- 11) K. Fujiwara, K. Koyama, M. Suga, M. Ikemura, Y. Saito, A. Hino, H. Iwanari, O. Kusano-Arai, K. Mitsui, H. Kasahara, M. Fukayama, T. Kodama, T. Hamakubo, T. Momose, A 90Y-labelled anti-ROB01 monoclonal antibody exhibits antitumour activity against hepatocellular carcinoma xenografts during ROB01-targeted radioimmunotherapy. EJNMMI Research. 4 (2014) 29.
- 12) K. Daigo, M. Nakakido, R. Ohashi, R. Fukuda, K. Matsubara, T. Minami, N. Yamaguchi, K. Inoue, S. Jiang, M. Naito, K. Tsumoto, T. Hamakubo, Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. Sci Signal. 7(2014) ra88.
- 13) Y. Okumura, H. Yamashita, S. Aikou, K. Yagi, Y. Yamagata, M. Nishida, K. Mori, S. Nomura, J. Kitayama, T. Watanabe, Y. Seto, Palliative distal gastrectomy offers no survival benefit over gastrojejunostomy for gastric cancer with outlet obstruction: retrospective analysis of an 11-year experience, World journal of surgical oncology, 12 (2014) 364.
- 14) T. Mitsui, K. Niimi, H. Yamashita, O. Goto, S. Aikou, F. Hatao, I. Wada, N. Shimizu, M. Fujishiro, K. Koike, Y. Seto, Non-exposed endoscopic wall-inversion surgery as a novel partial gastrectomy technique, Gastric Cancer, 17 (2014) 594-599.
- 15) Okumura Y, Mori K, Yamagata Y, Fukuda T, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Iida T, Mihara M, Seto Y. A two-stage operation for thoracic esophageal cancer: esophagectomy and subsequent reconstruction by a free jejunal flap. Surg Today 44: 395-398, 2014
- 16) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. Nature Genetics 46(6):583-587, 2014
- 17) Shinozaki S, Chang K, Sakai M, Shimizu N, Yamada M, Tanaka T, Nakazawa H, Ichinose F, Yamada Y, Ishigami A, Ito H, Ouchi Y, Starr ME, Saito H, Shimokado K, Stamler JS, Kaneki M. Inflammatory stimuli induce inhibitory S-nitrosylation of the deacetylase SIRT1 to increase acetylation and activation of p53 and p65. Sci Signal. 2014 Nov 11;7(351),
- 18) T. Kohno, N. Urao, T. Ashino, V. Sudhakar, RD McKinney, T. Hamakubo, H. Iwanari, M. Ushio-Fukai, T. Fukai, Novel Role of Copper Transport Protein Antioxidant-1 in Neointimal Formation After Vascular Injury. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 33(4) (2013) 805-13.
- 19) Kaneki M, Fukushima Y, Shinozaki S, Fukaya M, Habiro M, Shimizu N, Chang K, Yasuhara S, Martyn JA: iNOS inhibitor, L-NIL, reverses burn-induced glycogen synthase kinase-3 activation in skeletal muscle of rats. Metabolism. 62, 341-346, 2013

20) Sips PY, Irie T, Zou L, Shinozaki S, Sakai M, Shimizu N, Nguyen R, Stamler JS, Chao W, Kaneki M, Ichinose F. Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosoglutathione reductase protects against sepsis-induced myocardial depression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304(8), H1134-46, 2013

21) Ikehara Y., Sakakita H, Shimizu N, Ikehara S, Nakanishi H. Formation of Membrane-like Structures in Clotted Blood by Mild Plasma Treatment during Hemostasis. *J Photopol Sci Tech* 26(4), 555-557, 2013

22) Mitsui T, Goto O, Shimizu N, Hatao F, Wada I, Niimi K, Asada-Hirayama I, Fujishiro M, Koike K, Seto Y. Novel technique for full-thickness resection of gastric malignancy: feasibility of nonexposed endoscopic wall-inversion surgery (news) in porcine models. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 23(6):e217-21, 2013.

23) K. Daigo, N. Yamaguchi, T. Kawamura, K. Matsubara, S. Jiang, R. Ohashi, Y. Sudou, T. Kodama, M. Naito, K. Inoue, T. Hamakubo, The proteomic profile of circulating pentraxin 3 (PTX3) complex in sepsis demonstrates the interaction with azurocidin 1 and other components of neutrophil extracellular traps. *Mol Cell Proteomics*. 11(6) (2012) M111.015073.

24) Daigo K, Hamakubo T. Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* 3, 378, 2012

25) Sugita M, Sugita H, Kim M, Mao J, Yasuda Y, Habiro M, Shinozaki S, Yasuhara S, Shimizu N, Martyn JA and Kaneki M: Inducible nitric oxide synthase deficiency ameliorates skeletal muscle insulin resistance but does not alter unexpected lower blood glucose levels after burn injury in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 61, 127-136, 2012

26) Muroya M, Chang K, Uchida K, Bougaki M, Yamada Y. Analysis of cytotoxicity induced by proinflammatory cytokines in the human alveolar epithelial cell line A549. *Biosci Trends* 6, 70-80, 2012

〔学会発表〕(計 16 件)

1) 浜窪隆雄 お茶の水がん学アカデミア第120回集会「がんの放射線抗体治療について」2016/1/20 順天堂大学

2) 浜窪隆雄 第30回日本薬物動態学会「がんの抗体PETイメージングと抗体放射線治療について」2015/11/12 タワーホール船橋

3) Nobuyuki Shimizu: Systematization of the mechanism by which plasma irradiation

causes cell growth and tumor cell death. Workshop -Challenge of Plasma Science towards Future- Medicine 9th International Conference on Reactive Plasma / 68th Gaseous Electronics Conference. Oct 12, 2015, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA

4) 浜窪隆雄 分子イメージングによる次世代がん研究と抗がん創薬・治療の推進「胃がん転移のPETイメージングのための小分子化抗体のプロープ作製」2015/1/26 一橋講堂

5) 浜窪隆雄 次世代バイオ医薬品創出の向けた設計・基盤技術最前線「診断・治療のための小分子化抗体の設計について」2014/10/20 ソラシティカンファレンスセンターお茶の水

6) Sakakita H, Ikehara Y, Kim J, Shimizu N, Ikehara S, Nakanishi H, Yamada H, Yamagishi Y, Kiyama S, Kubota A, Ichinose M, Niwa T: Introduction of Medical Plasma Equipment for the Minimally Invasive Treatment. 10th International Conference on Flow Dynamics (ICFD)/OS10: Advanced Physical Stimuli and Biological Responses, 2013/11/25, Sendai International Center, Sendai

7) 清水伸幸: 炎症と発癌. プラズマ医療科学の創生 名古屋拠点ゼミ, 2013/10/25, 名古屋大学 I B 電子情報館電気系会議室 (名古屋)

8) 張京浩, 清水伸幸 他: 炎症反応で活性化される細胞障害性シグナルの検討. プラズマ医療科学の創世 - 新学術領域研究公開シンポジウム, 2013/09/28, 名古屋大学 I B 電子情報館大講義室 (名古屋)

9) Shimizu N: Surgical Treatment for Gastric Cancer: What should we research on? Research conference of Division of Gastrointestinal Surgery, 2012/10/31, Seoul National University, Seoul

10) 清水伸幸: 分子生物学的解析に基づくプラズマ誘起細胞増殖・腫瘍細胞死誘起メカニズムの体系化. プラズマ医療科学の創世 - 新学術領域研究公開シンポジウム, 2012/09/29, 弘済会館ビル (四谷)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<アウトリーチ活動>

1) 高校生見学 講演「抗体でガンをやっつける - バイオ医薬の設計」石川県立工業高等学校 52名 2016/7/25 東京大学先端科学技術研究センター

2) 先端研リサーチツアー 島根県立浜田
高校(1年生50名) 2015/12/10
3) がん啓発イベント『がんを知る展』 医
学監修(企画:医療福祉総合研究所)
4) 東京大学・ミュンヘン大学学生交流セ
ミナー 2014/9/11 (ミュンヘン大学生10
名)
5) 高校生のためのオープンキャンパス模擬
抗議 「抗体でがんをやっつける~免疫抗体
分子の認識機構を探る~」東京大学工学部
2014/8/6,
6) 清水伸幸:さんのう健康講座 低侵襲治
療の最前線. 2013/10/04, 山王病院 山王ホ
ール(参加者33名)
7) 清水伸幸:山王メディカルクラブ広報誌
(2013年6月号)医療情報 ヘリコバクテ
ー・ピロリ菌の除菌について(発行部数600
部)
8) 清水伸幸:さんのう健康講座 胃がん
のおはなし. 2013/05/31, 山王病院 山王ホ
ール(参加者49名)
9) 高校生見学、講演「コンピュータでがん
の薬を作る-抗体医薬の話」群馬県立高崎高
校 61名 2012/9/5 東京大学先端科学技術研
究センター

<報道関連>

1) 日経産業新聞 2015年8月24日
「抗体医薬 パーツ分け製造」
2) 日経産業新聞 2015年5月28日
「タンパク質使い悪性肺がん治療」
3) 日経メディカル(電子版):癌 Experts ;
胃癌術後は食事開始日が早いほど在院日数
が短い、全国242施設アンケート調査結果
【胃癌学会2015】2015/03/09
4) メディカルノート
(<https://medicalnote.jp/>)
上部消化管内視鏡検査とは
- 胃がんの早期発見に重要な検査
特殊な内視鏡検査と検査前後の注意点
胃がんの低侵襲手術-有用性と今後の展望
胃がんの予後-手術法や止血方法の進歩

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 伸幸 (SHIMIZU, Nobuyuki)
国際医療福祉大学・臨床医学研究センタ
ー・教授
研究者番号:70262128

(2)研究分担者

浜窪 隆雄 (HAMAKUBO, Takao)
東京大学・先端科学技術研究センター・
教授
研究者番号:90198797
張 京浩 (CHANG Kyungho)
東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号:50302708

山下 裕玄 (YAMASHITA, Hiroharu)

東京大学・医学部付属病院・講師
研究者番号:50599397

(3)連携研究者

(4)研究協力者