

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

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：15K09792

研究課題名(和文) 低温大気圧プラズマによるメラノーマ治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic study on melanoma-killing activity of plasma-stimulated medium

研究代表者

落合 豊子(OCHIAI, Toyoko)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：40133425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧プラズマ照射液(PSM)は、癌細胞を強く傷害する一方、正常細胞に影響を与えないため、副作用の少ない新規な癌治療ツールとして期待されている。しかし、その腫瘍選択的な細胞傷害作用のメカニズムについてはよくわかっていない。本研究では、ヒトメラノーマに対する抗がん効果のメカニズムについて調べた。その結果、PSMはミトコンドリア内の酸化ストレスや細胞膜電位およびカルシウム動態の変調を介したミトコンドリア形態異常を起すこと、がん細胞の方が正常細胞よりもPSMによる酸化ストレスを受けやすいことが、その腫瘍選択的な作用の要因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plasma-stimulated medium (PSM) has emerged as a cold atmospheric plasma-based anticancer tool because it exhibits cytotoxicity against malignant cells, but not toward normal cells. However, the mechanisms of the anticancer effect and those underlying the tumor-selectivity remain unclear. We found that PSM induced mitochondrial network aberration in human malignant melanoma cells, but not in melanocytes. PSM had reactive oxygen species (ROS), which in turn resulted in the generation of superoxide within the mitochondria. The oxidative stress caused excessive mitochondrial fragmentation, swelling, and clustering, and a caspase-independent cell killing. The heavier mitochondrial network aberration in melanoma cells resulted from their higher sensitivity to mitochondrial ROS accumulation, plasma membrane depolarization, and calcium dysregulation. Our findings indicate the importance of mitochondrial network remodeling as a powerful target for tumor-selective melanoma treatment by PSM.

研究分野：皮膚科学

キーワード：低温大気圧プラズマ メラノーマ 腫瘍選択性 ミトコンドリア 活性酸素 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

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)は、正常細胞に影響を与えず腫瘍細胞を傷害することから、新規な副作用の少ない抗がんツールとして期待されている。CAPは組織透過性が低いため、体内のがんには適応できない。CAP照射培地(Plasma-stimulated medium, PSM)は、CAP直接照射と同様に、がん細胞だけを傷害するため、CAP照射よりも広範囲ながんに適用できると期待されている。しかし、CAPやPSMの抗がん作用のメカニズムについては、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、PSMががん細胞特異的にミトコンドリアネットワーク異常を誘発することを見出した。

2. 研究の目的

PSMによるミトコンドリアネットワーク異常の細胞傷害における役割ならびに分子メカニズムについて解析をおこない、その結果を基にしてPAMの抗がん効果を高める薬剤の探索を行い、効果的ながん治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) CAPならびに PSM 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PSMとした。

(2) 細胞: ヒトメラノーマ細胞モデルとしてA375, A2058細胞、正常細胞モデルとして、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)、ヒト上皮メラノサイトをそれぞれ用いた。これらの細胞にPSMを添加後24~72時間培養して実験に供した。

(3) 細胞生存率、カスパーゼ-3/7活性化、細胞膜統合性、細胞死測定: 細胞生存率は、WST-8アッセイにより既報のように行った(文献)。細胞を96穴マイクロプレートに播き、PSM添加72時間後にCell Counting Kit (Dojindo)を添加し1時間インキュベートして450 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(ARBO MX, Perkin-Elmer)で測定した。カスパーゼ-3/7活性化、細胞膜統合性ならびに細胞死測定は Muse Caspase-3/7 Kit (Millipore)を用いて、Muse Cell Analyzer (Millipore)で測定した。細胞をカスパーゼ-3/7活性化は NucView で、細胞膜統合性は 7-Amino-actinomycin D(7-AAD)でそれぞれ定量化した。

(4) ミトコンドリアの生細胞イメージング: 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。FluoBrite DMEM (Thermo Fisher Scientific)中でミトコンドリアを MitoTracker CMXRos、細胞核を Hoechst33342 でそれぞれ染色して、100 x, 1.40 n.a. (UPlanSApo Super-Apochromat) 油

浸レンズを用いて、生物顕微鏡(BzX-700, Keyence)で観察し、BZ-H3A ソフトウェアで解析した。

(5) ROSの産生: 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ンプ 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)。

(6) 細胞膜脱分極の測定: 細胞膜ポテンシャルの変化は、アニオン bis-oxonol 型 電位感受性プローブ DiBAC4(3)を用いてマイクロプレート蛍光リーダー (Fluoroskan ACENT)で測定した(励起 485 nm, 発光 538 nm)。

(7) 細胞内カルシウム測定: 細胞を 1 mM 塩化カルシウムを含む Hanks' s Balanced Salt Solution (HBSS)中で、刺激後、細胞質内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub>)およびミトコンドリア内カルシウムイオン濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub>)の変化をそれぞれ、Fluo4-AM および rhod2-AM を用いてマイクロプレート蛍光リーダー (Fluoroskan ACENT)で測定した( Fluo4-AM: 励起 485 nm, 発光 538 nm; rhod2-AM: 励起 542 nm, 発光 592 nm)。小胞体からのカルシウム放出およびストア依存性カルシウム流入(SOCE)は 1 mM EGTA を含む HBSS 中で Fluo4-AM 負荷細胞を 1 μM Thapsigargin で刺激してカルシウム放出を測定後、2 mM 塩化カルシウムを添加して SOCE を測定した。

(8) ウェ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ェスタンブロッティング法で解析した。

(9) データ分析: すべての実験は3回以上行い、データは平均値±標準偏差で表し、一元配置分散分析と Tukey 法で分析した。p<0.05を有意とした。

4. 研究成果

(1) PSM 誘発細胞死の模態: PSMは、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (TRAIL)に耐性を示すメラノーマ細胞を濃度依存的に傷害した(図1A,B)。

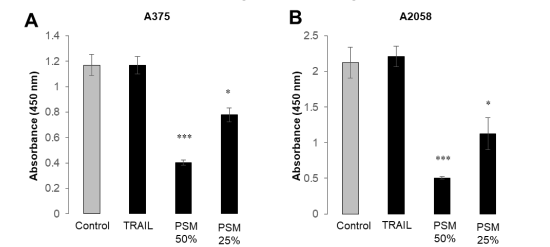


図1. PSMのTRAIL耐性メラノーマ細胞に対する細胞傷害作用

A375 (A), A2058 (B)細胞をPSM(原液を25, 50%に希釈した溶液), TRAIL (100 ng/mL)で72時間インキュベートした後にWST法で生存率を測定した(\*p<0.05; p<0.001 vs コントロール, N=3)

予備実験の結果、PSMによる細胞死は、汎力

スパーゼ阻害剤 Z-VAD-FMK、カスパーゼ-3/7 特異的阻害剤 Z-DEVD-FMK のいずれでも抑制されなかった。さらに、PSM はカスパーゼ-3/7 分子自体およびその基質である poly ADP-ribose polymerase の切断をほとんど起こさなかった。そこで、カスパーゼ-3/7 活性化を調べた結果、PSM は、24 時間以内に前期アポトーシス (NucView<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) ならびに後期アポトーシス (NucView<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) 細胞の両方を増加させた。その一方で、ネクローシス細胞 (NucView<sup>-</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) はほとんど増加せず、ネクローシス阻害剤 Necrostatin-1 によって全く抑制されなかった。これらの結果は、PSM による細胞死は、カノニカルなアポトーシスやネクローシスとは異なると考えられる。

**(2) ミトコンドリアネットワーク異常の細胞死における役割:** ミトコンドリアは網状構造を示すが、PSM による細胞障害性の程度に応じて、ヒトメラノーマ細胞のミトコンドリアは、短縮化、断片化、膨潤 (点状) 凝集像を呈した。ミトコンドリアの重度な形態異常 (断片化、膨潤、凝集) は放電なしのコントロールや正常細胞では見られなかった。一方、TRAIL はミトコンドリアの短縮化・断片化のみを起し、PSM のような、それらの膨潤や凝集は見られなかった (図 2)。

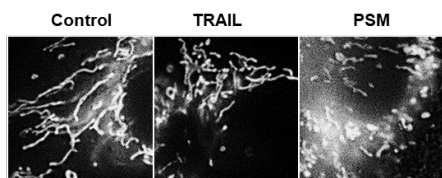


図 2. メラノーマ細胞のミトコンドリア形態に及ぼす PSM の影響

A2058 細胞を MitoTracker CMXRos で染色しミトコンドリアの形態を生物顕微鏡で観察した。

これらの反応は、細胞死と同様に抗酸化剤 *N*-acetylcysteine (NAC) によって完全に抑制された。さらに、細胞外から H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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・凝集ならびに細胞死が誘発され、これらの反応も全て NAC によって抑制された。

**(3) ミトコンドリアネットワーク異常における ROS の役割と分子メカニズム:** 5 分間 CAP 照射 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コントロール、5 分間照射のレベルはそれぞれ、21.5 ± 0.7, 33.3 ± 1.9 1 CARR Units (N=3)。1 CARR は 0.08 mg/dL (240 μM) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に相当)。さらに、PSM を添加するとミトコンドリア内 ROS (mROS) レベルは速やかに濃度、時間依存的に増加し、その増加は NAC により完全に抑制された。また、PSM または H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加後の正常細胞の mROS レベルはメラノーマ細胞の方が有意に低かった。メラノーマ細胞では PSM 処理 1 時間後くらいからミトコンドリア

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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

**(4) ミトコンドリアネットワーク異常の制御因子の同定:**

細胞膜脱分極: これまで細胞膜脱分極は mROS 増加による酸化ストレスや、ミトコンドリアの膜完全性の破壊による膨潤を助長して、細胞死誘発の増強因子として働くことを明らかにしてきた (文献)。そこで、PSM の細胞膜脱分極への影響を調べたところ、PSM は、刺激直後から持続的に細胞膜脱分極を惹起させるのに対して、TRAIL はそのような迅速な脱分極作用を示さなかった (図 3)。

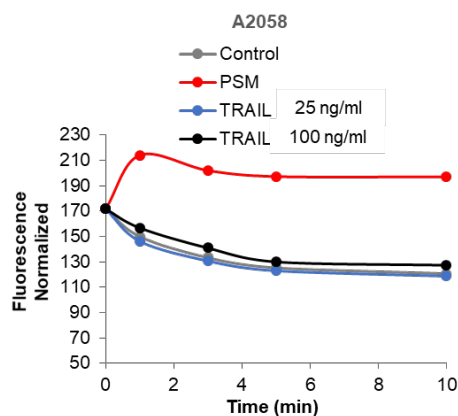


図 3. PSM は迅速かつ持続的な細胞膜脱分極をメラノーマ細胞に誘発する。A2058 細胞に DiBAC4(3)を負荷し、各薬剤を添加後経時的に蛍光を測定した。

カルシウム: 最近われわれは、細胞死刺激後数分以内が細胞内カルシウム濃度、特に [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub> が変化すること、ならびに [Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub> の変動によってアポトーシスならびに非アポトーシス細胞死が誘発されることを報告している (文献)。そこで、PSM がカルシウム動態に影響するかどうかを調べた。小胞体カルシウムストアからのカルシウム放出とそれに続く SOCE は、細胞内カルシウム濃度上昇の最も基礎的なメカニズムであり、[Ca<sup>2+</sup>]<sub>mit</sub> に影響を及ぼし、細胞の増殖、生存で重要な役割を果たしている。小胞体 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性を阻害する Thapsigargin (Tg) 刺激でカルシウム放出と SOCE を活性化し、ベースラインからの増加量をそれぞれ F<sub>release</sub>、F<sub>influx</sub> とする (図 4A) と、PSM は、濃度依存的に F<sub>release</sub> を増加させ、F<sub>influx</sub> を減少させた (図 4B,C)。これに対して、TRAIL はそのような作用を示さなかった (図 4)。

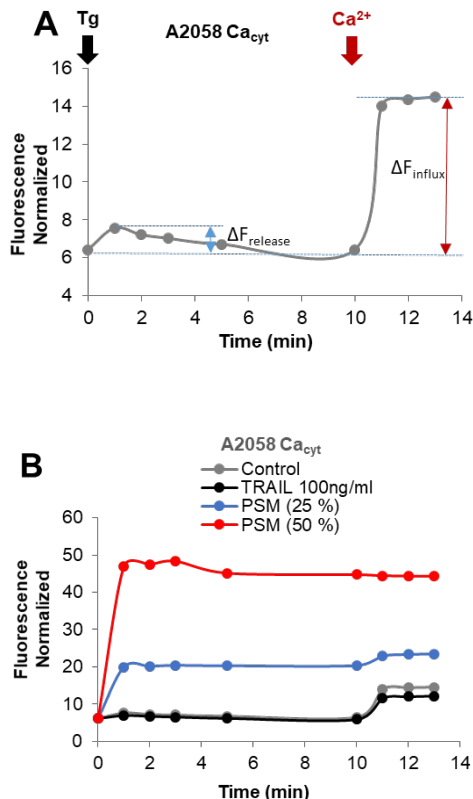


図 4. PSM は小胞体カルシウムストアを増加させ SOCE を抑制する  
 (A) Fluo4-AM を負荷した A2058 細胞をカルシウム不含 HBSS 中で Tg で刺激して (Tg 黒矢印) 小胞体カルシウム放出 ( $F_{release}$ ) を起こさせ、その後カルシウム ( $Ca^{2+}$  赤矢印) を加えて SOCE ( $F_{influx}$ ) を誘導、それぞれの蛍光強度変化を測定した。(B) PSM, TRAIL 添加細胞それぞれで上記の実験を行った。Tg 刺激 0 分;  $Ca^{2+}$  添加 10 分。

(5) 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

本研究の第一の成果は、ミトコンドリアの形態異常がメラノーマ細胞死において重要な役割を果たしており、ROS 特に  $H_2O_2$  がそのメディエーターであることを明らかにしたことである。これまで、ROS が CAP ならびに PSM の抗がん作用のメディエーターであることは広く知られていたが、一重項酸素、スーパーオキシド、 $H_2O_2$ 、一酸化窒素など様々な化学種が検出されるため、そのうちのどれがメディエーターなのか、またどのようにして細胞死に関与するのかもほとんどあきらかにされていなかった。本研究から、PSM 中に生じた  $H_2O_2$  が細胞に作用し、ミトコンドリア中にスーパーオキシドを産生させ、酸化ストレスを生じること、この酸化ストレスがミトコンドリアの形態異常を引き起こすこと、およびこれらの反応が正常細胞よりもがん細胞で起きやすいことが明らかとなった。CAP ならびに PSM 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、PSM

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、ミトコンドリアの形態異常という新しい ROS の標的を明らかにしたもので、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、という問いにひとつの答えを提供し、がん細胞死の分子レベルならびに腫瘍選択性のメカニズム研究に新しい視点を与えると期待される。

ミトコンドリアの形態変化の細胞死調節における役割は、最近の分子生物学のトピックのひとつであり、またパーキンソン病、心臓病、糖尿病など様々な疾病に深く関与することが明らかになりつつあることから、基礎ならびに応用の両面から注目を集めている。本研究で明らかとなった重要な知見として、ミトコンドリアの段階的な形態変化とその細胞死における役割の相違がある。ミトコンドリアの形態異常は刺激の程度、時間に応じて短縮化・断片化・膨潤・凝集と段階的に起り、その凝集がキーとなる細胞死シグナルであることが示された。ミトコンドリアは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。この動的過程の主要な仕組みは GTPase 活性を持つ Dynamin 関連タンパク質群であり、このうち Dynamin-related protein1 (Drp1) の Ser616 のリン酸化が分裂に必須と考えられている。PSM はこのリン酸化を時間依存性に増加させ、その増加のタイムコースはミトコンドリアの短縮化、断片化と一致することから、Drp1 依存性であると考えられた。この考えに一致して、Drp1 の阻害剤 Mdivi-1i やノックダウンにより分裂は抑制された。一方、ミトコンドリアの断片化、膨潤ならびに凝集は、Drp1 の機能抑制によって阻害されず、むしろ増強された。この発見は、少なくともヒトメラノーマ細胞では生理的な Drp1 依存性のミトコンドリアの分裂が、細胞死に関連する Drp1 非依存性のミトコンドリアの形態異常を抑制していることを示唆している。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。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報告されている。本研究で明らかにしたように、メラノーマ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にその傷害が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やすいと考えられる。この仮説の検証は今後の課題である。

本研究はまた、いくつかのミトコンドリアの形態異常制御因子を明らかにした。そのひとつは細胞膜脱分極である。神経細胞などで見られる生理的な細胞膜脱分極は、一過性で、

再分極により過分極に向かうが、ここで起る細胞膜脱分極は再分極を伴わず、持続性であった。そのメカニズムは現在のところ不明であるが、これにより、断片化したミトコンドリアの凝集が促進され、細胞死が増強されることが分った。興味あることに、この細胞膜脱分極の少なくとも一部は ROS 依存的で、がん細胞の方が正常細胞よりも有意に起りやすかった。正常細胞でも PSM によるミトコンドリアの分裂・断片化は見られるが、凝集はほとんど起らないことと考え合わせると、PSM の腫瘍選択性の一端は、ROS による細胞膜脱分極に対する腫瘍細胞と正常細胞との感受性の相違に起因するものと考えられた。持続性細胞膜脱分極はアポトーシスの初期に見られ、カスパーゼ活性化に必要であることが広く認められているが、少なくともわれわれの実験系で見られる PSM による細胞死はカノニカルなアポトーシスではないことから、他の細胞死モードにもこのタイプの細胞膜脱分極とミトコンドリアの形態異常は関与するものと考えられる。

近年、がん治療の新たな標的としてカルシウムの動態が注目されている。その理由は、その動態に関して、種々の腫瘍が特異的な性質を持ち、それが造腫瘍性、悪性形質、薬剤耐性、増殖増加、アポトーシスからの回避、ならびに細胞生存に関与することがわかってきたからである。本研究によって PSM が小胞体カルシウムプールを増加させ、SOCE を抑制することが初めて明らかにされた。SOCE は小胞体カルシウムストアの枯渇によって活性化されることから、両者の変化には因果関係があり、最近 SOCE が細胞増殖ならびに生存に関与することが報告されていることから、この効果が PSM の抗がん作用に寄与していると考えられた。現在のところ、この小胞体カルシウムプールの増加のメカニズムは不明である。小胞体はミトコンドリアと並んで最も重要な細胞内カルシウム貯蔵器官であり、小胞体からミトコンドリアへミトコンドリアカルシウムユニポーター(MCU)を介した経路でカルシウムが輸送されている。これによる  $[Ca^{2+}]_{mit}$  の増加がミトコンドリア内の物質代謝、エネルギー生産、ミトコンドリアの形態ならびにホメオスタシスの維持に不可欠であることが知られている。最近われわれは、MCU を介するミトコンドリアへのカルシウム輸送抑制によってミトコンドリアの分裂が抑制され、TRAIL によるミトコンドリアの形態変化と細胞死を促進することを見出している(文献)。従って、PSM も同様に小胞体からミトコンドリアへのカルシウム輸送を抑制している可能性がある。これらの知見をまとめると、カルシウム動態の変調が SOCE のような細胞生存性のカルシウム経路を介する細胞保護的なミトコンドリアの形態変化を妨げて、その致死的な形態異常を惹起する可能性が示された。このシナリオの検証が今後の課題である。

#### <引用文献>

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

Depolarization Controls TRAIL-Sensitization and Tumor-Selective Killing of Cancer Cells: Crosstalk with ROS. Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Uchida M, Ochiai T. *Frontiers in Oncology* 2014 May 30;4:128. doi: 10.3389/fonc.2014.00128. eCollection 2014.

Depolarization Controls TRAIL-Sensitization and Tumor-Selective Killing of Cancer cells: Crosstalk with ROS. Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Uchida M, Ochiai T. *Frontiers in Oncology* 2014 May 30;4:128. doi: 10.3389/fonc.2014.00128. eCollection 2014.

Disrupting mitochondrial  $Ca^{2+}$  homeostasis causes tumor-selective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities. Ohshima Y, Takata N, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 2017 51:1146-1158. doi: 10.3892/ijo.2017.4096.

#### 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)

Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL. Ito T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Tokunaga T, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. *International Journal of Oncology* 2018 査読有 doi:10.3892/ijo.2018.4413.

Plasma-stimulated medium kills TRAIL-resistant human malignant cells by promoting caspase-independent cell death via membrane potential and calcium dynamics modulation. Tokunaga T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ito T, Onoe-Takahashi A, Ochiai T, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. *International*

〔学会発表〕(計 2 件)

徳永智彦、小野江明日香、相馬正義、落合豊子、鈴木(唐崎)良弘。  
Plasma-stimulated medium (PSM)の悪性黒色腫に対する抗腫瘍効果 第 33 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2017 年 秋田。  
高橋明日香、藤川一穂、鈴木(唐崎)美喜、落合豊子、鈴木(唐崎)良弘。ヒトメラノーマ細胞の TRAI 耐性におけるオートファジーの関与第 32 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会 2016 年 鹿児島。

〔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：  
出願年月日：  
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

落合豊子 (OCHIAI,Toyoko)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号：40133425

(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

(3)連携研究者

( )

研究者番号：