

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13390

研究課題名(和文) プラズマ活性溶液による生存・増殖シグナリングの制御と細胞の生死・増殖の制御

研究課題名(英文) Controlling cell death, survival, and growth by plasma-activated solutions

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プラズマ照射した溶液をプラズマ活性溶液と名付け、プラズマ活性溶液による抗腫瘍効果のメカニズムやプラズマ活性溶液の腹膜播種治療に向けた研究を産婦人科、消化器外科、先端医療臨床研究支援センターなどと進めた。また工学部生物化学工学グループとの共同研究によりプラズマ活性溶液による未分化iPSの分離に成功するなどがん治療から再生医療にいたるまでプラズマ活性溶液の用途を幅広く見出した。

研究成果の概要(英文)：We have previously developed plasma-activated medium (PAM) that is plasma-treated medium for cancer treatments. In this study, we collaborated with department of obstetrics and gynecology and department of gastrointestinal surgery, and have developed plasma-activated Ringer's lactate solution to treat with ovarian, gastric, and pancreatic cancers which are peritoneally disseminated. In addition, we collaborated with biochemical engineering lab, and found that PAM selectively eliminates undifferentiated human induced pluripotent stem cells. Thus, plasma-activated medium have broadened the applications of plasmas in medicine.

研究分野：プラズマ医療科学

キーワード：プラズマ医療

1. 研究開始当初の背景

近年、大気圧下で(生体に照射可能なほどに)低温なプラズマを生成する技術が開発され、その医療・農業応用が活発に研究されている(図1)。

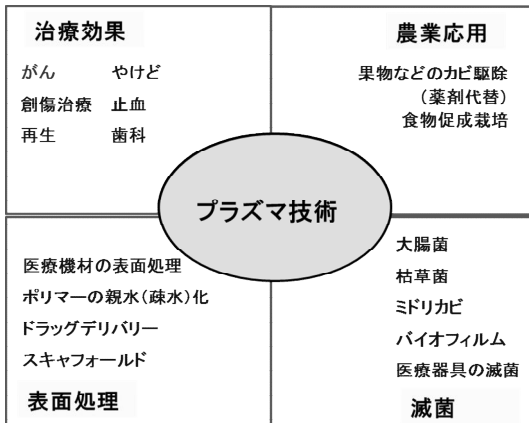


図1: 大気圧プラズマの医療応用

このような学術的背景において、申請者は名古屋大学における医工連携の枠組みの下、大気圧プラズマを用いたがん治療の研究に積極的に取り組んできた。特に**プラズマ照射した溶液による抗腫瘍効果を発見**し、これを**プラズマ活性溶液**と名付け、**プラズマ活性培養液による脳腫瘍培養細胞へのアポトーシス(プログラム細胞死)誘導の細胞内機構として、生存・増殖シグナリングを抑制することを世界に先駆けて発見**した。

一方で申請者はこれまでに分子生物学・システム生物学的手法を用いて外部刺激に対する細胞応答を引き起こすシグナリングネットワークの解析及び、シグナリングネットワークの操作の研究を専門として行ってきた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が培った分子生物学・システム生物学的手法を用いて、生存・増殖シグナリングをプラズマ活性溶液により操作することにより細胞の生死・増殖の制御を試みる。それにより、プラズマ活性溶液の有効性と応用範囲を見極める。現代のがん治療

法では困難な腹膜播種、脳髄液播種などの治療に資するプラズマ活性溶液から、市場価値の高い皮膚の再生、水産物の成長促進などに資するプラズマ活性溶液にいたるまで、幅広いプラズマ活性溶液の臨床応用・産業化の早期実現を目指す。

3. 研究の方法

図2に示すように溶液にプラズマ照射しプラズマ活性溶液を作製した。

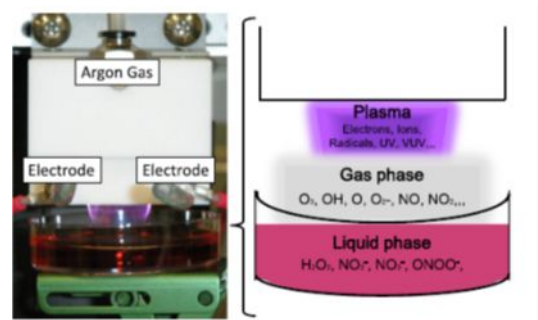


図2: プラズマ活性溶液の作製

グリオブラストーマ培養細胞にプラズマ活性溶液を投与し、インキュベーター付き顕微鏡にてタイムラプスイメージングを行った。

溶液として、培養液、乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液などを用い、細胞についてもグリオブラストーマ以外にも産婦人科との共同研究により卵巣癌細胞、子宮頸癌細胞、消化器外科との共同研究により膵癌細胞、胃癌細胞などを用いた。また工学部生物化学工学グループとの共同研究によりプラズマ活性溶液による未分化iPS細胞と分化した細胞との分離能を調べた。

4. 研究成果

図3にプラズマ活性培養液中のグリオブラストーマのタイムラプス画像を示す。

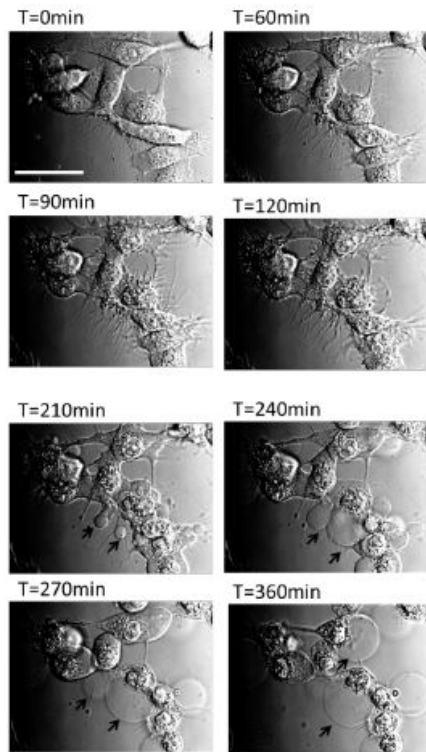


図3：プラズマ活性培養液中のグリオブラストーマのタイムラプス写真

グリオブラストーマ培養細胞はプラズマ活性培養液投与後、60～120分には複数の突起のような構造物を作り、120分後以降、突起の先端に小さい水泡のような構造物を形成するようになった。やがて水泡は膨らみ、240～360分には1つの風船のような構造物を形成した。

消化器外科との共同研究によりプラズマ活性培養液は、グリオブラストーマのみならず、膵癌細胞においても抗腫瘍効果を示すことが *in vitro* 及び *in vivo* の実験から分かった(成果文献[18])。また胃癌の腹膜播種モデル動物実験においてもプラズマ活性培養液の有効性を示すことに成功した(成果文献[5])。

産婦人科との共同研究により、グリオブラストーマ、卵巣癌、子宮頸癌においてプラズマ活性乳酸リンゲル液およびプラズマ活性酢酸リンゲル液が抗腫瘍効果を示すことを *in vitro* および *in vivo* の実験結果により示し

た(成果文献[6])。

更には工学部生物化学工学グループとの共同研究によりプラズマ活性培養液により未分化 iPS を分化した細胞に対して選択的に殺傷することに成功し、未分化 iPS の新しい分離法を確立した(成果文献[8])。

これらの成果よりプラズマ活性溶液は卵巣癌、胃癌、膵癌の腹膜播種の治療に有用であるということが示唆されると共に、未分化 iPS の分離という再生医療応用にも有用であることが分かり、応用の幅を広げることにつながった。

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 H_2O_2 and NO_2^- generated in plasma-activated medium, *J Phys D Appl Phys*, 50 (2017) 155202., 査読有
- [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., 査読有
- [3] H. Tanaka, M. Hori, Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma, *J Clin Biochem Nutr*, 60 (2017) 29-32., 査読有
- [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. , 査読有

[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. Koderu, Intraperitoneal Administration of Plasma-Activated Medium: Proposal of a Novel Treatment Option for Peritoneal Metastasis From Gastric Cancer, *Annals of surgical oncology*, (2017). , 査読有

[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. , 査読有

[7] H. Tanaka, M. Mizuno, F. Kikkawa, M. Hori, Interactions between a Plasma-activated medium and Cancer Cells, *Plasma Medicine*, 6 (2016) 101-106. , 査読有

[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. , 査読有

[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. , 査読有

[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. , 査読有

[11] H. Kajiyama, F. Utsumi, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori, F. Kikkawa, Possible therapeutic option of aqueous plasma for refractory ovarian cancer, *Clinical Plasma Medicine*, 4 (2016) 14-18. , 査読有

[12] T. Ito, K. Ishikawa, D. Onoshima, N. Kihara, K. Tatsukoshi, H. Odaka, H. Hashizume, H. Tanaka, H. Yukawa, K. Takeda, H. Kondo, M. Sekine, Y. Baba, M. Hor, Microfluidic Transport Through Microsized Holes Treated by Nonequilibrium Atmospheric-Pressure Plasma, *Ieee T Plasma Sci*, PP (2016) 1-6. , 査読有

[13] 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. , 査読有

[14] L. Shi, Y. Wang, F. Ito, Y. Okazaki, H. Tanaka, M. Mizuno, M. Hori, D.R. Richardson, S. Toyokuni, Biphasic effects of l-ascorbate on the tumoricidal activity of non-thermal plasma against malignant mesothelioma cells, *Archives of biochemistry and biophysics*, 605 (2016) 109-116. , 査読有

[15] 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. , 査読有

[16] 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. Kodera, 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. , 査読有

[17] H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, S. Maruyama, Y. Kodera, 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. , 査読有

[18] 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. Kodera, Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells, *International journal of oncology*, 47 (2015) 1655-1662. , 査読有

{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”, 6th international conference on plasma medicine, Bratislava, Slovakia, Sep05-11, 2016

[3] 田中 宏昌(招待講演)、堀 勝、「ドライブ

ロセスと医療」、夏季実習セミナー(II)“ドライブ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 Kodera, Fumitaka Kikkawa, and Masaru Hori, “INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS OF CANCER CELL DEATH USING PLASMA-ACTIVATED MEDIUM”, The 3rd 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