

令和元年6月7日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10851

研究課題名(和文)低温大気圧プラズマ技術を用いた骨肉腫治療法の開発

研究課題名(英文) Cold plasma-stimulated transfusion (PLAST) induces cell death in murine and human osteosarcoma cell lines

研究代表者

安藤 隆 (ANDO, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：10377492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧プラズマは非侵襲性の新規がん治療ツールとして非常に期待されるものである。本研究では自作した大気圧LFプラズマジェット装置を使用しプラズマ照射液を作成し、この照射液の骨肉腫細胞への抗腫瘍効果を明らかにすることが目的とした。

プラズマ照射液はマウスおよびヒト骨肉腫細胞株に対し細胞増殖抑制を示した。一方、骨芽細胞株に対する抑制は少なかった。また、プラズマ照射液で誘導される細胞死におけるアポトーシス、オートファジーの役割は限定的であった。さらなる細胞死メカニズムの解明が必要であるが、アポトーシス抵抗性を持つ骨肉腫に対する新規治療法の候補となりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前よりプラズマを腫瘍細胞に直接照射した研究は報告されてきたが、直接照射できる腫瘍は限られる。我々を含むいくつかの研究チームは、プラズマ照射液を使用した抗腫瘍効果を報告した。本研究では、活性化培養液が常温でも殺細胞効果を示したのは臨床応用に向け意義あるものであった。

さらに、プラズマ照射液は骨芽細胞株と比較して、骨肉腫細胞株に有意に強い細胞増殖の抑制効果のみならず、正常細胞への侵襲の少ない抗腫瘍効果を持つ可能性が示唆される。このことは、実臨床において安全度が高いものと考えられる。プラズマ活性化補液療法の実用化は、骨肉腫患者の予後を改善すると同時に、より副作用の少ない治療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：The prognosis of osteosarcoma has not changed over the past two decades; the prognosis for patients with lung metastasis is still poor and the development of new treatments is urgently required. Cold plasma-stimulated medium are promising novel anti-cancer tools due to their strong anticancer activities and high tumor-selectivity. Here we assessed the anti-tumor activity of another PSM prepared using transfusion (PLAST) toward osteosarcoma cell lines. PLAST strongly suppressed the growth of mouse and human and murine osteosarcoma cell lines while it had smaller effects on that of human and murine osteoblast cell lines. PLAST-induced cell death was not inhibited by caspase inhibitors and accompanied by minimum autophagic flux. Moreover, the cytotoxic effects of PLAST were not suppressed by various pharmacological apoptosis or autophagy inhibitors. It could be a candidate for a novel treatment for osteosarcoma with apoptosis resistance, though further elucidation of mechanism is necessary.

研究分野：骨軟部腫瘍学

キーワード：プラズマ照射液 骨肉腫 アポトーシス オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラズマは気体を構成する分子の一部または全体が陽イオンと電子に電離した状態を指し、個体・液体・気体に並び、物質の第4の存在状態である。半導体加工や機能性薄膜堆積等においては不可欠であるが、近年医療分野においても応用が進められ、中でも、温度が室温に近い低温大気圧プラズマが生体に作用し、止血・血管新生・臓器癒着防止・細胞増殖促進などの多岐に渡る効果を示すことが報告されている。癌治療の分野では肺癌、メラノーマおよび卵巣癌の細胞株に対し、低温大気圧プラズマが殺細胞効果を持つことが最近報告された。我々は、大気圧 LF プラズマジェット装置でプラズマを作成し、これを培養液に照射して作成されるプラズマ活性化培養液が薬剤抵抗性がん細胞株に対してがん細胞特異的な殺細胞作用を示すことを明らかにしてきた。この殺細胞効果は活性酸素の関与が示唆されており、プラズマ照射された癌細胞は明らかな細胞形態の変化をきたし細胞死に至ることも証明してきた。

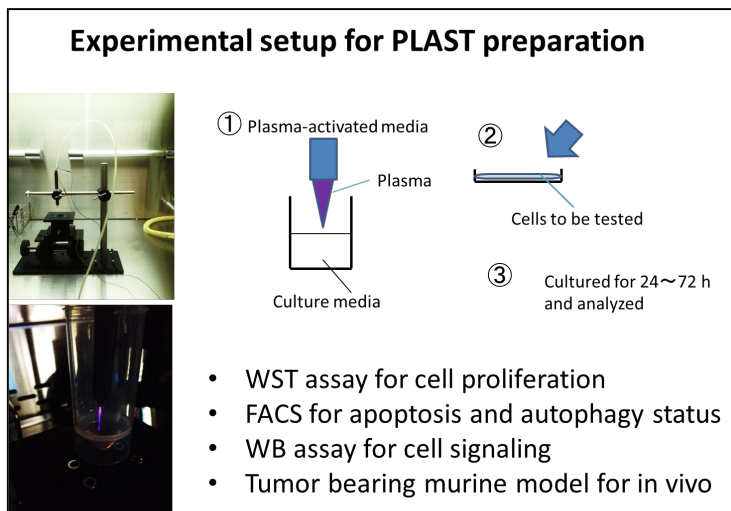
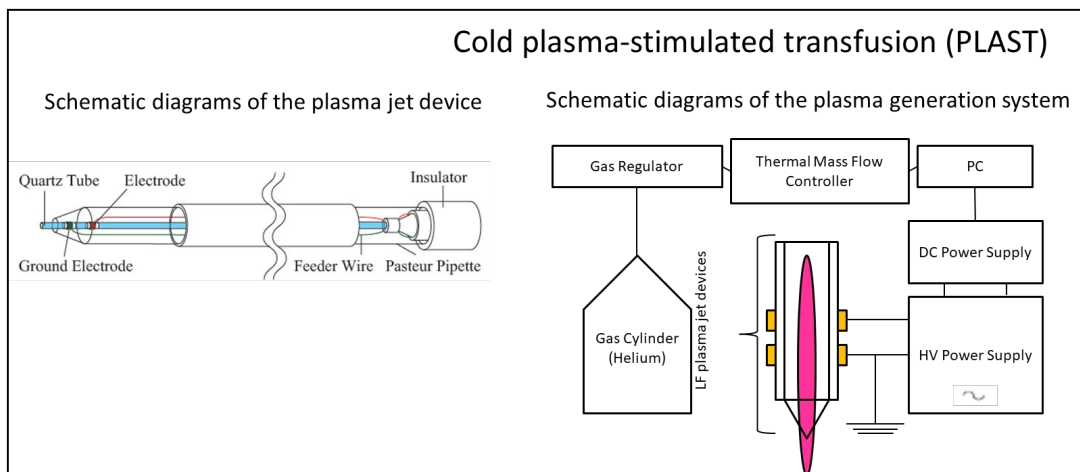
骨肉腫は腫瘍細胞が類骨あるいは骨を直接生産する悪性非上皮性腫瘍と定義される。骨肉腫は造血系腫瘍を除いた原発性骨悪性腫瘍の中では最も頻度が高く、10歳代に好発し男性に多い。四肢長管骨に好発し血行性遠隔転移をきたしやすく予後不良であり、40年前には5年生存率は10-15%にすぎなかったが、手術療法の進歩、系統的化学療法の導入によって70%以上の生存率となっている。しかしながら、最近10年の生存率の緩やかな伸びと現行の化学療法薬剤の強い副作用が問題となっている。さらなる生存率の改善と副作用の少ない薬剤の開発が期待される。

2. 研究の目的

本研究では自作した大気圧 LF プラズマジェット装置を使用し、骨肉腫細胞への抗腫瘍効果を明らかにし、プラズマ活性化培養液を骨肉腫の治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。計画していた具体的な研究項目は、(1) プラズマ活性化培養液の骨肉腫細胞株への増殖抑制効果を確認すること、(2) プラズマ活性化培養液による細胞増殖抑制効果メカニズムの解明、(3) 骨肉腫担癌マウスモデルに対するプラズマ活性化培養液の抗腫瘍効果を確認すること、の3つである。

3. 研究の方法

研究分担者である鈴木良弘により作成されたプラズマ発生装置は下の図のようなペンシル型であり、これを、ガスシリンダーと電圧電源と接続しコンピューターで制御する。

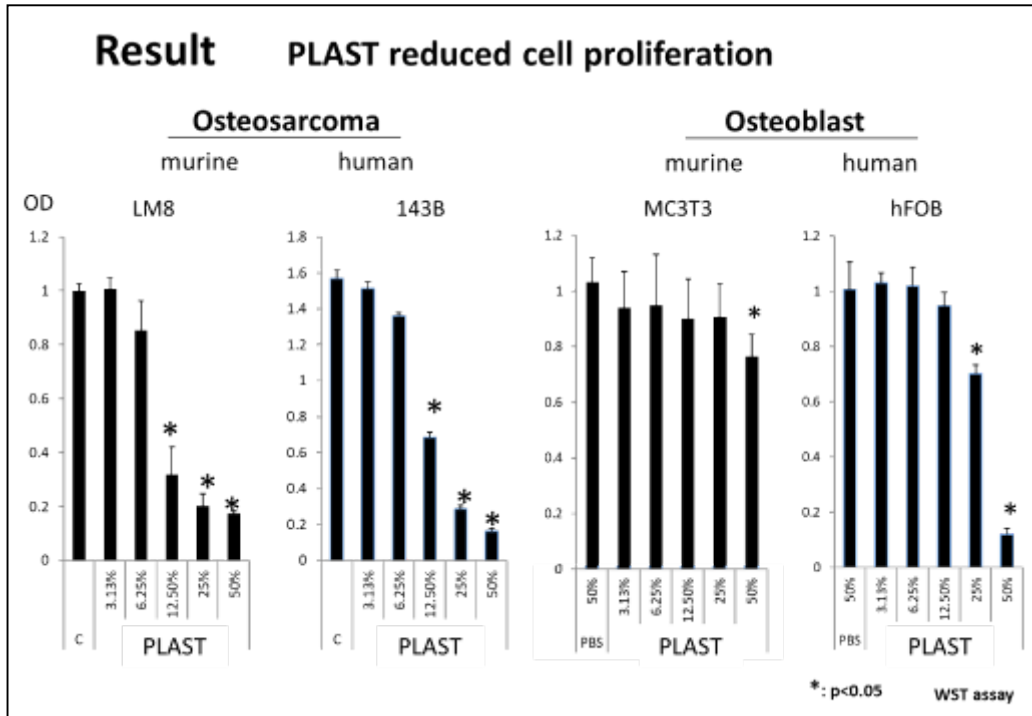


このプラズマを照射した培養液をプラズマ照射液として実験に用いた。

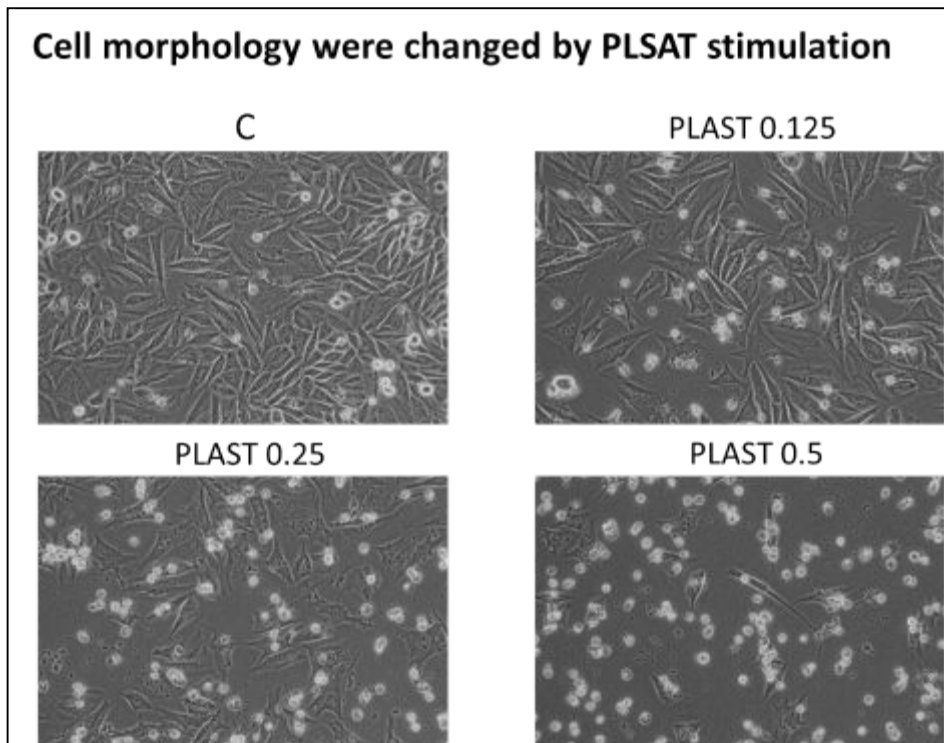
- 1) 細胞増殖はWST assayにて評価した。
- 2) アポトーシス、オートファジーの評価はFACSにて評価した。
- 3) 細胞内シグナルはWBにて評価した。
- 4) 骨肉腫細胞担がんマウスによって、プラズマ照射液の効果を検討した。

4. 研究成果

- 1) プラズマ照射液の細胞増殖に対する影響。

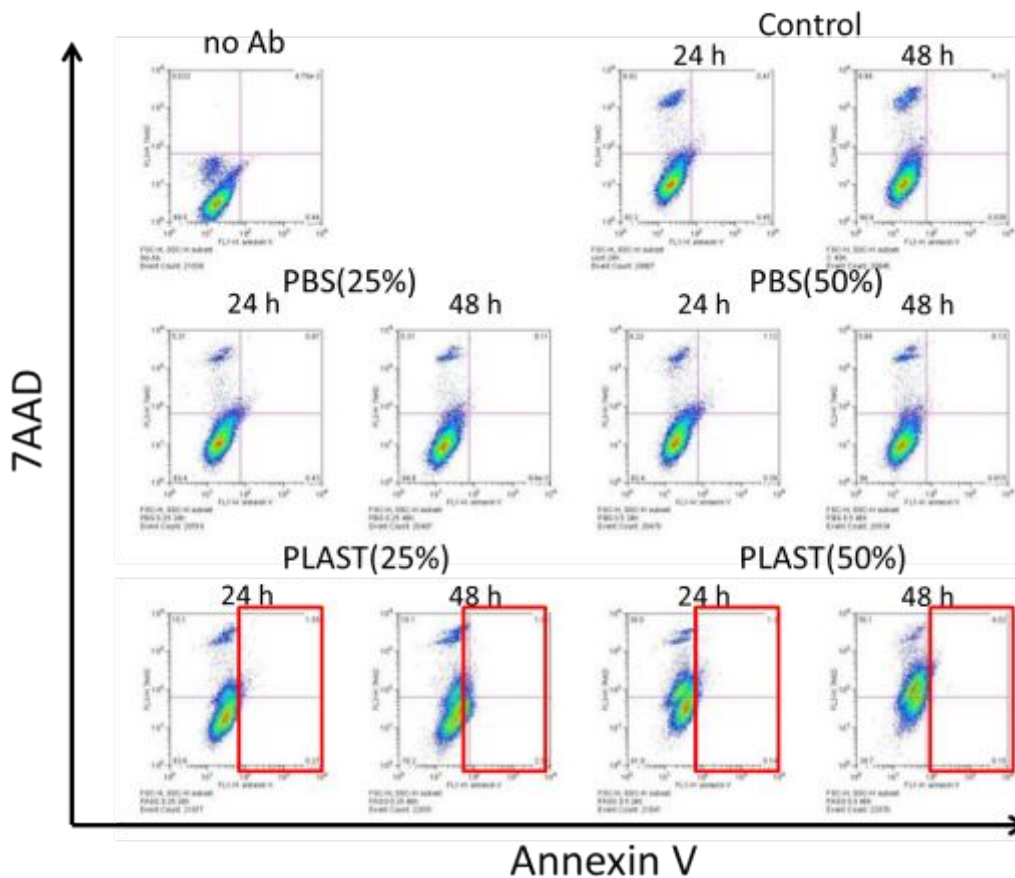


マウスおよびヒトの骨肉腫細胞株に対し低濃度から細胞増殖抑制がみられた。一方、マウスおよびヒトの骨芽細胞株に対しての作用は限定的であった。



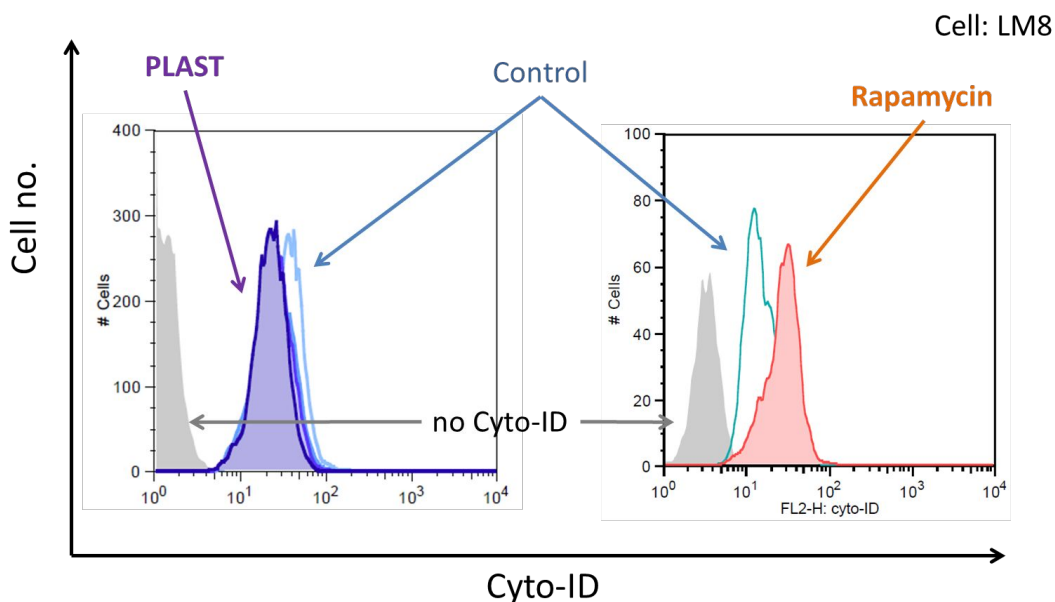
形態的には、プラズマ照射液の濃度依存的に紡錐形が保たれなくなり、小円形となる。

2) プラズマ照射液の細胞死の評価 (アポトーシス)



プラズマ照射液により、骨肉腫細胞は細胞死を起こすが、アポトーシスを起こす細胞はほとんどみられなかった。

3) プラズマ照射液の細胞死の評価 (オートファジー)

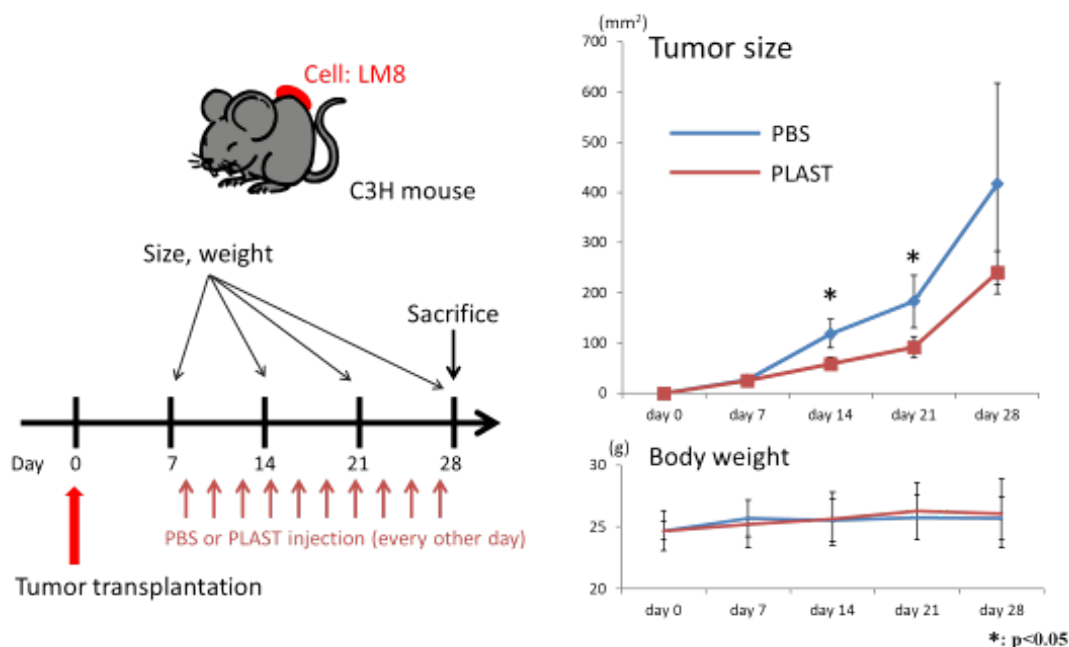


Autophagy on LM8 cells were evaluated by Cyto-ID® Autophagy detection kit, Enzo

また、Cyto-ID による評価では、プラズマ照射液により、骨肉腫細胞はオートファジーを起こさなかった。

4) 骨肉腫細胞担がんマウスに対するプラズマ照射液の効果

PLAST suppressed the tumor growth in vivo



PBS に比較してプラズマ照射液で、腫瘍径は有意に抑制されていた。
また、両者に体重の差は見られなかった。

プラズマ照射液は骨肉腫細胞に対し、in vitro においても in vivo においても腫瘍抑制効果がみられた。腫瘍死の検討では、アポトーシスでもオートファジーでもなかったが、アポトーシス抵抗性腫瘍などにおいての新たな治療候補の1つになりうると考えている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

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. Int J Oncol. 2018 Mar;52(3):697-708. doi: 10.3892/ijo.2018.4251. Epub 2018 Jan 23.

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. Int J Oncol. 2018 Aug;53(2):503-514. doi: 10.3892/ijo.2018.4413. Epub 2018 May 21.

[学会発表](計 2 件)

23rd World Congress on Advances in Oncology

September 20-22, 2018

Athens Marriott Hotel, Athens, Greece

Cold plasma-stimulated transfusion (PLAST) induces necroptosis in murine and human osteosarcoma cell lines. T. Ando, M. Suzuki-Karasaki, H. Haro, Y. Suzuki-Karasaki

第 92 回日本整形外科学会学術総会

2019 年 5 月 9 日 (木) ~ 12 日 (日)

パシフィコ横浜、横浜市

プラズマ照射液による骨肉腫細胞への死誘導効果の検討

安藤隆、市川二郎、鈴木良弘、波呂浩孝

〔その他〕

ホームページ等

(1) 山梨大学整形外科ホームページにて研究グループ、内容紹介

<https://yamanashi-orthop.com/>

(2) 23rd World Congress on Advances in Oncology 学会 HP にて

RECIPIENTS OF THE AWARDS OF THE BEST PRESENTATIONS:発表

<https://www.spandidos-publications.com/pages/awards>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 良弘

ローマ字氏名：SUZUKI Yoshihiro

所属研究機関名：一般社団法人プラズマ化学生物学研究所

部局名：研究部

職名：代表理事

研究者番号（8桁）：80206549

(2)研究協力者

研究協力者氏名：波呂 浩孝

ローマ字氏名：HARO Hirotaka

研究協力者氏名：市川 二郎

ローマ字氏名：ICHIKAWA Jiro

研究協力者氏名：佐藤 信隆

ローマ字氏名：SATO Nobutaka

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。