

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16798

研究課題名(和文)膀胱癌に対するプラズマを用いた新規膀胱温存療法の開発

研究課題名(英文)New strategy for bladder cancer using atmospheric pressure plasma jet

研究代表者

福原 秀雄(FUKUHARA, Hideo)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：20527600

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧プラズマを培養液に照射して、培養液中に発生したラジカルによる間接的な相互作用である抗腫瘍効果に着目し、研究を進めてきた。そして、培養液にプラズマを照射すると種々の化学反応による活性型ラジカルが発生し、それが膀胱癌細胞に対して細胞内シグナル伝達経路の活性化を誘導して、アポトーシスを引き起していることを突き止めた。膀胱は管腔臓器であり、プラズマを照射した治療液を膀胱内に注入することができる。この方法は“膀胱療法”において、その効果を最大限に引き出すことが可能である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果により、プラズマを用いた新しい治療法により膀胱癌に対する良好な効果を認めた。今後は更なるメカニズムを解明し、膀胱癌に対する新たな膀胱温存療法の開発が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：Atmospheric pressure plasmas jets kill cancer cell not only directly, but also indirectly affected cancer cell with plasma-irradiated medium. Medium which APPJs was irradiated generated the several biochemical activities. Plasma-activated medium (PAM) induces especially ROS generation by complicated chemical reactions into medium. ROS is well-known to activate apoptosis signal cascades for various cancer cells. PAM treatment may become a potential therapeutic strategy for human bladder cancer as intravesical therapy.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：膀胱癌 プラズマ医療 アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究予定期間の2年で、プラズマ照射した培養液による膀胱癌のアポトーシス誘導メカニズムを明らかにする。まず、プラズマを照射した培養液(DMEM)を用いて、電子スピン共鳴(ESR)法による培養液中に発生したラジカルの同定と発生量を検討する。

続いて、ヒト膀胱癌細胞でのミトコンドリア膜電位測定、カスパーゼ活性測定等の細胞死シグナルへの影響およびp53/JNK/ERK/TNFの発現変動により細胞増殖能への影響を検討する。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞に直接プラズマを照射することによる直接的な物理効果を検討するものではなく、プラズマを照射した培養液に着目し、発生したラジカルによる間接的な相互作用である抗腫瘍効果に着目し研究する事を最大の目的とする。

具体的には、プラズマ照射した培養液(DMEM)のヒト膀胱癌細胞に対する殺細胞効果に着目して、プラズマ療法におけるアポトーシス誘導メカニズムを解明することを目的とする。本研究の成果は、今後の膀胱癌に対する低侵襲的な膀胱内注入療法としての新規治療法の確立目指した基盤研究となる。

3. 研究の方法

Apoptosisを誘導する細胞内シグナル伝達の検討

ヒト膀胱癌細胞株に対して、プラズマを照射しラジカルの発生したDMEMで培養し、細胞内シグナル伝達経路を解析する。具体的には、ヒト膀胱癌細胞でのミトコンドリア膜電位測定、カスパーゼ活性測定等の細胞死シグナルへの影響およびp53/JNK/ERK/TNFの発現変動により細胞増殖能への影響を検討する

細胞周期および細胞増殖因子の検討

プラズマ照射培養液の膀胱癌細胞への細胞周期や細胞増殖因子に対する影響を検討する。

G0/1期・S期・M期の細胞割合を測定し、G1 arrestを誘導していないかどうか詳細に解明する。具体的には、細胞周期に及ぼす影響として、ヒト膀胱癌細胞に対して、フローサイトメトリーを用いて周期の変化とウエスタンブロットティングによるサイクリン依存キナーゼの変化を検討する。さらに、各種cyclin/cyclin dependent kinase (CDK)やp21/p53の発現変化を測定し、詳細なメカニズムを明らかにする。

モデルマウスによる治療効果の検討

ヌードマウスを用いて、ヒト膀胱癌細胞株による同所移植モデルを作製し、プラズマ照射培養液を膀胱内に注入し膀胱療法を実施する。まず、経時的な腫瘍サイズ変化および体重測定を行い治療効果および安全性についての検討を行う。さらに膀胱注後に、ルミノールを用いた蛍光イメージングを実施し、腫瘍内に発生した活性酸素量を定量化し治療効果を解析する。次に、病理組織学的検討としてTUNEL染色を実施し、アポトーシスインシデンス(Apoptotic incidence)を測定することにより抗腫瘍効果を明らかにする。さらにCD31染色を実施し、血管密度であるマイクロ vessel density(MDV)を測定し、血管新生阻害効果についても明らかにする。

4. 研究成果

低温大気圧プラズマを照射したDMEM中に発生した活性酸素種が、ヒト膀胱癌細胞に対して細胞内シグナル伝達経路の活性化を誘導して、Caspase-3上昇を伴うアポトーシスを引き起していることを突き止めた。さらに細胞周期に着目した研究においてはT24細胞において細胞周期を

調節する因子の発現を変化させることで G1 arrest を誘導し、細胞周期を停止させる作用も見出した。このように低温大気圧プラズマを照射した DMEM によりアポトーシス誘導する抗腫瘍効果を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Szili Endre J, Oh Jun-Seok, Fukuhara Hideo, Bhatia Rishabh, Gaur Nishtha, Nguyen Cuong K, Hong Sung-Ha, Ito Satsuki, Ogawa Kotaro, Kawada Chiaki, Shuin Taro, Tsuda Masayuki, Furihata Mutsuo, Kurabayashi Atsushi, Furuta Hiroshi, Ito Masafumi, Inoue Keiji, Hatta Akimitsu, Short Robert D	4. 巻 27
2. 論文標題 Modelling the helium plasma jet delivery of reactive species into a 3D cancer tumour	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plasma Sources Science and Technology	6. 最初と最後の頁 14001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi:10.1088/1361-6595/aa9b3b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hideo Fukuhara, Jun-Seok Oh, Endre Szili and Inoue Keiji
2. 発表標題 Atmospheric pressure helium plasma for bladder cancer cells
3. 学会等名 28Th Annual meeting of MRS-Japan 2018（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----