

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08270

研究課題名(和文)非平衡大気圧プラズマ(冷たいプラズマ)を用いたメラノーマに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of new therapy for malignant melanoma using non-thermal atmospheric pressure plasma (cold plasma)

研究代表者

白石 研 (Shiraishi, Ken)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80710863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマは皮膚癌の中で最も悪性度が高く転移を起こしやすい。化学療法の感受性は低く新たな治療法の開発が求められている。近年、熱的に非平衡な「冷たいプラズマ」を大気圧下で生成する技術が実用化され、医療への応用が進められている。本研究においてプラズマの直接照射のみならずプラズマ照射培養液がメラノーマに対し抗腫瘍効果をもち、その機序として癌細胞にアポトーシスを引き起こすことが確認された。また、アポトーシス関連因子の遺伝子スクリーニングにより、ある遺伝子の発現がプラズマ照射により大きく変化することが分かった。プラズマの腫瘍抑制機序が解明されつつあり、新規治療法としての実用化が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりプラズマがメラノーマに対して抗腫瘍効果をもつことが明らかとなった。その機序として癌細胞にアポトーシスを引き起こすことが確認され、それに関連する因子の同定にも成功した。実際に人に対して応用可能な照射量や照射液濃度の設定、安全な照射法の開発を進めていく。また、副作用を検討した上で、注射液や軟膏など治療薬としての実用化も進めていく。従来の治療法に代わるプラズマ療法は画期的かつ独創的な新規治療法である。今回はメラノーマを用いたが、他の多くの癌にも応用が可能と考える。プラズマの臨床応用は、一度転移してしまうと手がつけられなかった進行性の癌患者に対して新たな治療戦略になる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Melanoma is the most malignant skin cancer. As chemotherapy is not enough effective for metastatic melanoma, the development of new therapy is required. In recent years, non-equilibrium atmospheric pressure plasma (cold plasma) has developed and applied for medical field. In this study, we confirmed that not only direct plasma irradiation but also plasma-irradiated culture medium has an anti-tumor effect for melanoma cells. One of the mechanism of these effect is that cold plasma induces apoptosis in melanoma cells. In addition, by real-time RT-PCR screening, we found that the expression of certain apoptosis-related genes was significantly changed by plasma irradiation. As the mechanism of anti-tumor effect by cold plasma has gradually been elucidated, the utility of new plasma therapy for melanoma can be expected in near future.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

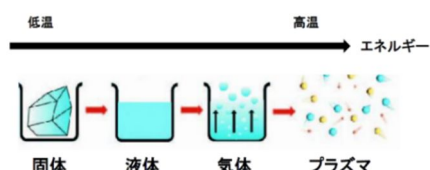
キーワード：メラノーマ 非平衡大気圧プラズマ アポトーシス 抗腫瘍効果 増殖抑制 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) メラノーマについて

メラノーマは色素細胞(メラノサイト)由来の皮膚悪性腫瘍であり、皮膚癌の中で最も悪性度が高く転移を起こしやすい。リンパ節転移や遠隔転移を起こしたものの5年生存率は極端に低下する。その理由の一つに化学療法や放射線療法に対するメラノーマの感受性が極めて低い。また、最近では、免疫チェックポイント阻害剤が使用されているが、重篤な副作用や経済的な理由で断念せざるを得ない例も多く、新たな治療法の開発が早急に求められている。近年、多くの悪性腫瘍で、自己複製能力と多分化能を併せ持つ少数の細胞集団(癌幹細胞)が存在することが明らかになった。癌幹細胞は腫瘍形成能力を持つだけでなく化学療法抵抗性を持つ。そのため、従来の化学療法ではそれらを完全に抑えることができず、腫瘍の転移と再発を引き起こす。メラノーマにおいても癌幹細胞マーカーがいくつか報告され、それらを標的とした新たな治療法の研究・開発が進んでいる。

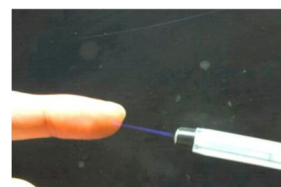
(2) 非平衡大気圧プラズマとは



プラズマは固体・液体・気体に続く物質の第4の状態である。狭義のプラズマとは、気体を構成する分子が電離し陽イオンと電子に別れて運動している状態であり電離した気体に相当する(左図)。

近年、熱的に非平衡な冷たい「プラズマ」を大気圧下で生成する技術が実用化された。

これにより、生体等のソフトマテリアルに熱の影響を与えることなくプラズマを照射することが可能になった。(右図: 指で触れるペンシル型の「冷たいプラズマ」研究分担者・神野教授作製)



(3) プラズマを用いた医療への応用

現在、世界中でプラズマのバイオ・医療応用の研究が進められている。例えば、組織の殺菌、血液凝固、創傷治癒の促進、歯の脱色、遺伝子導入などにもプラズマが応用されている。2010年、Vandammeらは、腫瘍あるいは癌細胞に直接プラズマを照射すると癌細胞が死滅することを発見した。(Plasma Process Polym 7:264-273, 2010) また、2013年、Tanakaらはプラズマを照射した培養液が正常な細胞に影響を与えることなく、選択的に脳腫瘍や卵巣癌の細胞を死滅させることを明らかにした。その分子メカニズムとして、プラズマ照射培養液により、癌細胞で恒常的に活性化されているAKT分子が抑制され、癌細胞をアポトーシスに導くことが分かった。(Plasma Medicine Journal, 2013) 更に、Utsumiらは抗癌剤耐性の卵巣癌細胞に対しても抗腫瘍効果が見られ、実際に、マウスの皮下に抗癌剤耐性癌細胞を接種し腫瘍を形成させ、同部位にプラズマ照射液を注射した結果、腫瘍の形成が著しく抑制された。(PLoS One; 8(12),2013) このように、培養細胞のみならず生体内での抗腫瘍効果もすでに実証されている。

(4) メラノーマに対する新たな治療法の確立

しかし、プラズマがどのように癌細胞をアポトーシスに導くのか詳しいメカニズムは分かっていない。また、これまでメラノーマに対するプラズマの有効性や作用機序を解析した報告は全くない。プラズマ照射された培養液中のメラノーマ細胞で一体何が起きているのか。これを解明することが新たな治療法となる鍵と考える。

2. 研究の目的

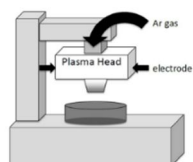
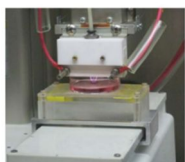
本研究の目的は、プラズマ直接照射およびプラズマ照射培養液のメラノーマに対する抗腫瘍効果を調べ、その分子メカニズムを生化学的、分子細胞生物学的に解明することにより、メラノーマに対する新たな治療法を開発することである。メカニズムを解明できれば、将来的に様々な形で臨床応用が可能となる。例えば、原発性メラノーマに対してプラズマを外から直接照射する方法やプラズマ照射液を含有する注射薬の皮下投与、プラズマ照射液を濃縮した軟膏の塗布などで腫瘍を縮小することも可能となるかもしれない。また、プラズマ照射液を大量に作成し、その中に一定時間入浴してもらうことで(プラズマ浴)皮膚表面に発生した皮膚癌(メラノーマに限らず)を抑制できるかもしれない。

メラノーマの予後が不良である原因として再発や転移を起こしやすいという特徴があり、加えて再発・転移メラノーマに対する有効な治療法がないことが挙げられる。その要因として、抗癌剤抵抗性の細胞(癌幹細胞)の存在が大きい。現在までに、幹細胞性をもつメラノーマ細胞を制御する物質は非常に限られ、実際に治療として使用され効果を得ているものは存在しない。そこで、幹細胞性をもつメラノーマ細胞に対するプラズマの影響も調べ、その抑制効果を確認し、そのメカニズムが解明できれば、従来の方法では全く歯が立たなかった抗癌剤耐性のメラノーマに対する新たな治療法ともなり得る。

このように、従来の治療法（手術、化学療法、免疫療法、放射線療法）に代わる治療法としてのプラズマ療法は今後大きく発展する画期的かつ独創的な新規治療法である。今回はメラノーマ細胞を用いて遂行予定であるが、本研究は、他の多くの癌、特に化学療法抵抗性である癌幹細胞がすでに同定されている癌（白血病、脳腫瘍、肝腫瘍、膵臓癌、肺腫瘍、大腸癌、前立腺癌など）にも応用できる可能性が高い。正常の組織に影響を与えることなく選択的に癌細胞あるいは癌幹細胞を殺傷できるこのプラズマの臨床応用は、一度転移してしまうと全く手がつけられなかった進行性の癌患者に対して新たな治療戦略になる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

1. プラズマのメラノーマに対する抗腫瘍効果を調べる



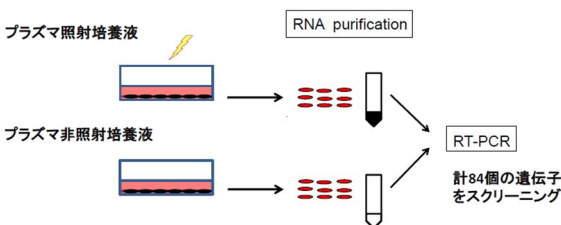
非平衡大気圧プラズマ発生装置を用いて、培養メラノーマ細胞にプラズマを直接照射した場合、あるいはプラズマ培養液でメラノーマ細胞を培養した場合の細胞増殖抑制効果の評価する。プラズマ照射液は左図のように、プラズマ発生装置から 1.5cm 離れた部位から通常培養液（RPMI1640）に照射し異なる照射時間後に回収する。（例：

0、0.5、1、3、5、10、15、30 分）あらかじめ通常培養したメラノーマ細胞の培養液を、回収したプラズマ培養液と交換して 24-72 時間後の生存細胞数を CCK アッセイにより評価する。

2. プラズマによるアポトーシスの誘導

これまでの報告では、プラズマの抗腫瘍効果の機序としてアポトーシスの関与が指摘されている。そこで、アポトーシスのインヒビターによる前処置や、Trypan blue 染色、Annexin-V/PI 染色、caspase-3 cleavage assay、TUNEL 染色等の方法により、プラズマが実際にメラノーマに対してアポトーシスを誘導するかどうかを詳細に調べる。

3. 抗腫瘍効果に関与する遺伝子のスクリーニング



プラズマ照射培養液および非照射培養液で培養したメラノーマ細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現の差を qRT-PCR で比較検討しスクリーニングを行う。（左図）

スクリーニングにはアポトーシスや cell survival 等に重要な計 84 種類の遺伝子プライマーを用いる。（下図）

4. 候補遺伝子の同定とシグナル伝達解析

スクリーニングの結果を解析し、いかなる因子の発現がプラズマ照射により増強あるいは抑制されているかを明らかにする。特に発現の差が大きい候補遺伝子を同定し、定量 PCR や Western blot 法により同因子の関与する細胞内シグナル伝達経路の解析を行う。もし、ある特定の因子が同定されれば、同因子をノックダウンした場合には、プラズマ照射による腫瘍抑制効果がリバースされるかどうかを調べる。ノックダウンには同因子の shRNA をターゲットとするレンチウィルスを使用する。

Induction of Apoptosis:
CRADD, FADD, TNF, TNFRSF10B (DR5), ABL1, CIDEA, CIDEB, TP53, TP73, CFLAR (CASPER), DAPK1, TNFRSF25 (DR3), BAD, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L1, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP8, CD27 (TNFRSF7), CD70 (TNFSF7), CYCS, DFFA, DIABLO (SMAC), FAS (TNFRSF6), FASLG (TNFSF6), GADD45A, HRK, LTA (TNFB), NOD1 (CARD4), PYCARD (TM61/ASC), TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF25 (DR3), TNFSF9, TP53BP2, TRADD, TRAF3.
Anti-Apoptosis: AKT1, BAG1, BAG3, BAX, BCL2, BCL2A1 (BH-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BCL2L10, BCL2L2, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L15, BCL2L16, BCL2L17, BCL2L18, BCL2L19, BCL2L20, BCL2L21, BCL2L22, BCL2L23, BCL2L24, BCL2L25, BCL2L26, BCL2L27, BCL2L28, BCL2L29, BCL2L30, BCL2L31, BCL2L32, BCL2L33, BCL2L34, BCL2L35, BCL2L36, BCL2L37, BCL2L38, BCL2L39, BCL2L40, BCL2L41, BCL2L42, BCL2L43, BCL2L44, BCL2L45, BCL2L46, BCL2L47, BCL2L48, BCL2L49, BCL2L50, BCL2L51, BCL2L52, BCL2L53, BCL2L54, BCL2L55, BCL2L56, BCL2L57, BCL2L58, BCL2L59, BCL2L60, BCL2L61, BCL2L62, BCL2L63, BCL2L64, BCL2L65, BCL2L66, BCL2L67, BCL2L68, BCL2L69, BCL2L70, BCL2L71, BCL2L72, BCL2L73, BCL2L74, BCL2L75, BCL2L76, BCL2L77, BCL2L78, BCL2L79, BCL2L80, BCL2L81, BCL2L82, BCL2L83, BCL2L84, BCL2L85, BCL2L86, BCL2L87, BCL2L88, BCL2L89, BCL2L90, BCL2L91, BCL2L92, BCL2L93, BCL2L94, BCL2L95, BCL2L96, BCL2L97, BCL2L98, BCL2L99, BCL2L100, BCL2L101, BCL2L102, BCL2L103, BCL2L104, BCL2L105, BCL2L106, BCL2L107, BCL2L108, BCL2L109, BCL2L110, BCL2L111, BCL2L112, BCL2L113, BCL2L114, BCL2L115, BCL2L116, BCL2L117, BCL2L118, BCL2L119, BCL2L120, BCL2L121, BCL2L122, BCL2L123, BCL2L124, BCL2L125, BCL2L126, BCL2L127, BCL2L128, BCL2L129, BCL2L130, BCL2L131, BCL2L132, BCL2L133, BCL2L134, BCL2L135, BCL2L136, BCL2L137, BCL2L138, BCL2L139, BCL2L140, BCL2L141, BCL2L142, BCL2L143, BCL2L144, BCL2L145, BCL2L146, BCL2L147, BCL2L148, BCL2L149, BCL2L150, BCL2L151, BCL2L152, BCL2L153, BCL2L154, BCL2L155, BCL2L156, BCL2L157, BCL2L158, BCL2L159, BCL2L160, BCL2L161, BCL2L162, BCL2L163, BCL2L164, BCL2L165, BCL2L166, BCL2L167, BCL2L168, BCL2L169, BCL2L170, BCL2L171, BCL2L172, BCL2L173, BCL2L174, BCL2L175, BCL2L176, BCL2L177, BCL2L178, BCL2L179, BCL2L180, BCL2L181, BCL2L182, BCL2L183, BCL2L184, BCL2L185, BCL2L186, BCL2L187, BCL2L188, BCL2L189, BCL2L190, BCL2L191, BCL2L192, BCL2L193, BCL2L194, BCL2L195, BCL2L196, BCL2L197, BCL2L198, BCL2L199, BCL2L200.
Regulation of Apoptosis: BAG1, BAG3, BCL10, BCL2, BCL2A1 (BH-1/A1), BCL2L1 (BCL-X), BCL2L10, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L14, BCL2L15, BCL2L16, BCL2L17, BCL2L18, BCL2L19, BCL2L20, BCL2L21, BCL2L22, BCL2L23, BCL2L24, BCL2L25, BCL2L26, BCL2L27, BCL2L28, BCL2L29, BCL2L30, BCL2L31, BCL2L32, BCL2L33, BCL2L34, BCL2L35, BCL2L36, BCL2L37, BCL2L38, BCL2L39, BCL2L40, BCL2L41, BCL2L42, BCL2L43, BCL2L44, BCL2L45, BCL2L46, BCL2L47, BCL2L48, BCL2L49, BCL2L50, BCL2L51, BCL2L52, BCL2L53, BCL2L54, BCL2L55, BCL2L56, BCL2L57, BCL2L58, BCL2L59, BCL2L60, BCL2L61, BCL2L62, BCL2L63, BCL2L64, BCL2L65, BCL2L66, BCL2L67, BCL2L68, BCL2L69, BCL2L70, BCL2L71, BCL2L72, BCL2L73, BCL2L74, BCL2L75, BCL2L76, BCL2L77, BCL2L78, BCL2L79, BCL2L80, BCL2L81, BCL2L82, BCL2L83, BCL2L84, BCL2L85, BCL2L86, BCL2L87, BCL2L88, BCL2L89, BCL2L90, BCL2L91, BCL2L92, BCL2L93, BCL2L94, BCL2L95, BCL2L96, BCL2L97, BCL2L98, BCL2L99, BCL2L100, BCL2L101, BCL2L102, BCL2L103, BCL2L104, BCL2L105, BCL2L106, BCL2L107, BCL2L108, BCL2L109, BCL2L110, BCL2L111, BCL2L112, BCL2L113, BCL2L114, BCL2L115, BCL2L116, BCL2L117, BCL2L118, BCL2L119, BCL2L120, BCL2L121, BCL2L122, BCL2L123, BCL2L124, BCL2L125, BCL2L126, BCL2L127, BCL2L128, BCL2L129, BCL2L130, BCL2L131, BCL2L132, BCL2L133, BCL2L134, BCL2L135, BCL2L136, BCL2L137, BCL2L138, BCL2L139, BCL2L140, BCL2L141, BCL2L142, BCL2L143, BCL2L144, BCL2L145, BCL2L146, BCL2L147, BCL2L148, BCL2L149, BCL2L150, BCL2L151, BCL2L152, BCL2L153, BCL2L154, BCL2L155, BCL2L156, BCL2L157, BCL2L158, BCL2L159, BCL2L160, BCL2L161, BCL2L162, BCL2L163, BCL2L164, BCL2L165, BCL2L166, BCL2L167, BCL2L168, BCL2L169, BCL2L170, BCL2L171, BCL2L172, BCL2L173, BCL2L174, BCL2L175, BCL2L176, BCL2L177, BCL2L178, BCL2L179, BCL2L180, BCL2L181, BCL2L182, BCL2L183, BCL2L184, BCL2L185, BCL2L186, BCL2L187, BCL2L188, BCL2L189, BCL2L190, BCL2L191, BCL2L192, BCL2L193, BCL2L194, BCL2L195, BCL2L196, BCL2L197, BCL2L198, BCL2L199, BCL2L200.
DEATH Domain Proteins:
CRADD, DAPK1, FADD, TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TNFRSF11B, TNFRSF11A, TNFRSF18, TNFRSF21, TNFRSF25 (DR3), TRADD.
Caspases and Regulators:
Caspases: CASP1 (ICE), CASP10 (MCH4), CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR (CASPER), CRADD, PYCARD (TM61/ASC).
Caspase Activators: AIFM1 (PDCDH), APAF1, BAX, BCL2L10, CASP1 (ICE), CASP9, NOD1 (CARD4), PYCARD (TM61/ASC), TNFRSF10A, TNFRSF10B (DR5), TP53.
Caspase inhibitors: CD27 (TNFRSF7), XIAP (BIRC4).

計84個（注：上のリストには重複あり）

5. Vivo における抗腫瘍効果の検討

Vitro での抑制効果が vivo でも同様に見られるかを確認するため、NOD/SCID マウスを用いて、まずプラズマ照射液の腫瘍抑制効果の評価する。マウスの皮下にメラノーマ細胞を注射し腫瘍を形成させ、腫瘍の形成を確認後にプラズマ照射液と非照射液（コントロール）を週 3 回、腫瘍形成部に皮下注射する。形成された腫瘍容量を定期的に測定し 28 日目にマウスから腫瘍を摘出し最終容量を評価する。摘出した腫瘍は切片化し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織学的な違いを明らかにする。更に、各々のマウスから主要な臓器、所属リンパ節などを摘出し、プラズマの転移抑制効果についても同様に評価する。

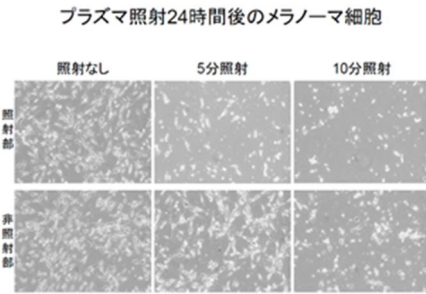
6. 同定した遺伝子の抗腫瘍効果への関与

スクリーニング（qRT-PCR）で特定された因子をノックダウンしたメラノーマ細胞をマウスに注射し、上述 5 で見られた抑制効果がリバースされるか否かを調べる

7. 以上の実験を、幹細胞性をもつメラノーマ細胞を用いても同様に進行。

4. 研究成果

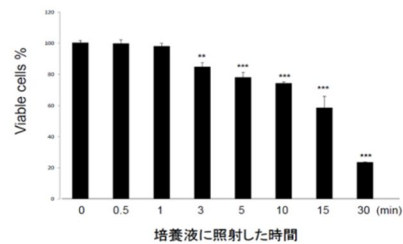
まず、10種類のメラノーマ細胞を用いて、増殖スピード、細胞の形態、細胞の起源、遺伝子発現の違いを確認し、本実験に適した2種類の細胞を選択した。増殖スピードが最も速く、分裂能・転移能が高いA細胞と増殖スピードが最も遅く、分裂能・転移能が低いB細胞を選択し、以下の各実験に使用した。また、愛媛大学理工学部プラズマ科学に所属する研究分担者の協力のもと、本実験に適した非平衡大気圧プラズマの照射条件(照射間隔、電圧、波長など)を検討し、



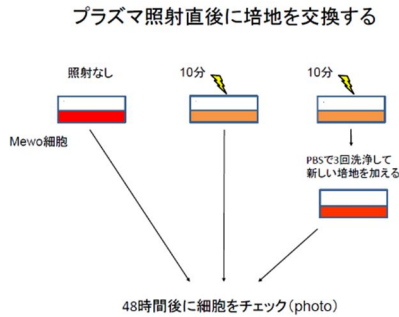
ディッシュに播種したメラノーマ細胞に均等に照射できるようにプラズマ照射器の改良を行った。次に、プラズマ発生装置を用いて、培養メラノーマ細胞にプラズマを直接照射した場合、あるいはプラズマ培養液でメラノーマ細胞を培養した場合の細胞増殖抑制効果を調べた。培養メラノーマ細胞にプラズマを直接照射(5分、10分)すると、照射部位の細胞は24時間後には大半が死滅したが、非照射部位の細胞も同様に大半が死滅することが確認された。このことから、プラズマには直接照射以外の間接的な作用で細胞に影響を与えている可能性が考えられ、プラズマで処理した培養液に注目した。(左図)

プラズマ発生装置から1.5cm離れた部位から、0、0.5、1、3、5、10、15、30分の異なる時間で照射し回収した培養液を用いて、メラノーマの増殖抑制効果を確認した。96ウェルプレートに3000個のメラノーマ細胞を播種し、24時間通常培養を行った後に、上記のプラズマ処理培養液で培地を交換し、24-72時間後の増殖能をCCKアッセイで評価した。その結果、照射時間依存性にプラズマ処理培養液はメラノーマの生存率(増殖)を抑制することができた。(右図)

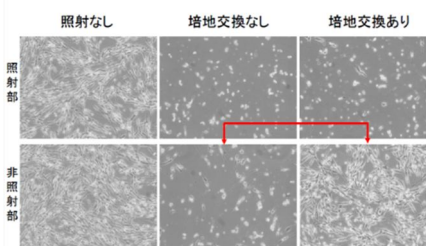
プラズマ照射液で培養72時間後のviable cells (メラノーマ細胞)



次に、トランスウェルを用いたマイグレーションアッセイおよび scratch やストッパーを用いた gap closure アッセイを行った結果、いずれもプラズマ処理培養液に暴露されたメラノーマ細胞では遊走能の低下が認められた。更に、トランスウェルにマトリジェルをコートした細胞浸潤アッセイを行った結果、プラズマ処理培養液に暴露されたメラノーマ細胞ではコントロール細胞に比べて浸潤能が抑制されることが分かった。そこで、プラズマで処理された培養液中で何が起きているのかを検討した。まず プラズマ照射直後に培地を交換した細胞でも同様の影響が見られるかを検討した。(次頁・図)



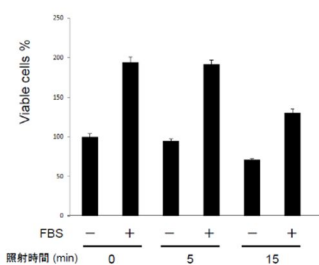
プラズマ10分照射後に培地交換を行った細胞と行わなかった細胞の48時間後の比較写真



その結果、プラズマ照射直後に培地を交換すると細胞増殖抑制効果が減弱することが分かり、細胞自体ではなく培養液中の物質の変化が影響している可能性が示唆された。

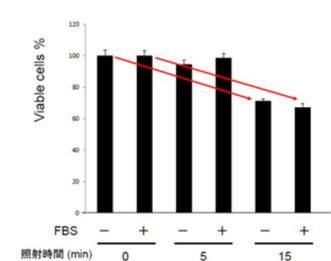
次に 血清ありと血清なしの照射培養液で差が見られるかどうかを検討した。(下図)

プラズマ照射液で培養72時間後のviable cells (Mewo細胞)



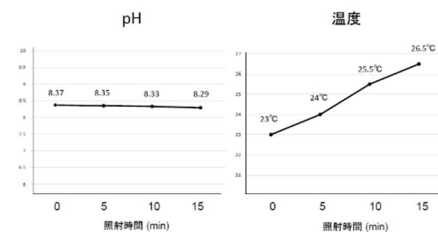
その結果、左図のように血清の有り無しで細胞増殖および増殖抑制効果に差が見られたが、増殖抑制率を検討したところ、右図のように両者に大きな差は見られなかった。つまり、プラズマ照射は添加された血清には影響を与えないことが確認された。

プラズマ照射液で培養72時間後のviable cells (Mewo細胞)



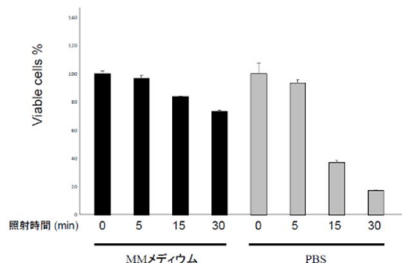
次にプラズマ照射による PH と温度変化による細胞への影響がないかを検討した。右図のように、プラズマ照射により培養液中の PH はほぼ変化がなかったが、温度は照射時間が長いほど上昇傾向が見られた。ただし、この温度変化とプラズマの細胞増殖抑制作用との関連性は不明であった。

プラズマ照射後の培養液中のpHと温度の変化



更に、通常培養液の代わりに PBS にプラズマを照射した場合における増殖抑制効果を検討した。(下図)

プラズマ照射液で培養24時間後のviable cells (Mewo細胞)

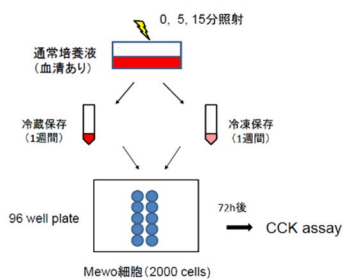


その結果、興味深いことに PBS でも

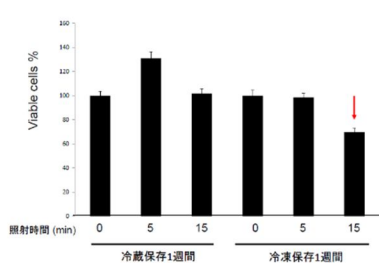
通常培養液と同様の増殖抑制効果を認めた。このことから、プラズマ照射による培地の組成変化ではなく産生される何らかの物質(活性酸素など?)が影響している可能性が示唆された。

次に、プラズマ照射培養液の細胞増殖抑制効果は照射培養液を冷凍・冷蔵保存しても効果が持続するかどうかどうかを検討した。(下図)

プラズマ照射培養液を冷蔵・冷凍保存する

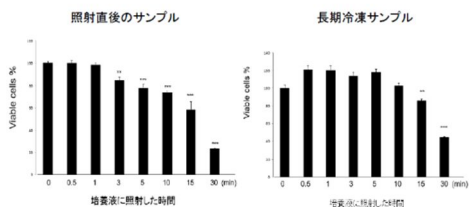


プラズマ照射培養液の冷蔵・冷凍保存による影響



左図のように、1週間冷蔵したプラズマ照射培養液では増殖抑制効果が減弱(消失)したが、1週間冷凍保存した場合は抑制効果が保たれることが分かった。1か月間冷凍保存した場合も同様に抑制効果は持続し、長期間の冷凍保存

プラズマ照射液で培養72時間後のviable cells (Mewo細胞)



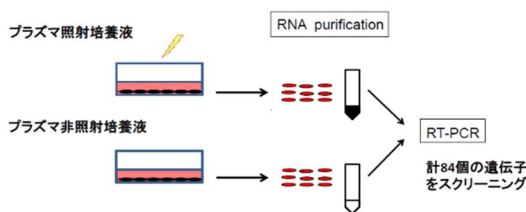
が可能であることが明らかとなった。

また、プラズマ照射培養液と細胞との接触時間を減らしても抑制効果が見られること(1、3、6、12時間の暴露)も確認した。

過去の報告では、プラズマの抗腫瘍効果の機序としてアポトーシスの関与が指摘されている。そこで、プラズマ照射培養液および非照射培養液で培養したメラノーマ細胞から RNA を抽出し、遺伝子発現の差を qRT-PCR で比較検討しスクリーニングを行った。スクリーニングにはアポトーシスや cell survival 等に重

要な計 84 種類(下表)の遺伝子プライマーを用いた。

その結果、両メラノーマ細胞において数種類の遺伝子の発現に大きな差が見られた。これらの候補遺伝子の定量 PCR および蛋白発現を実際に Western blot 法で解析した結果、ある遺伝子 X の発現が定量 PCR でも蛋白レベルでも大きな差が見られた。現在、同因子が関与する細胞内シグナル伝達経路の分子の発現差も Western blot 法で確認中である。今後はプラズマの抗腫瘍効果における遺伝子 X の関与を明らかにしていく。



更に、マウスを用いた vivo におけるプラズマの抗腫瘍効果の検討を進めていく。Vitro での抑制効果が vivo でも同様に見られるかを確認するため、NOD/SCID マウスを用いて、プラズマ照射液の腫瘍抑制効果を評価する。マウスの皮下にメラノーマ細胞を注射し腫瘍を形成させ、腫瘍の形成を確認後にプラズマ照射液と非照射液(コントロール)を週3回、腫瘍形成部に皮下注射する。形成された腫瘍容量を定期的に測定し28日目にマウスから腫瘍を摘出し最終容量を評価する。摘出した腫瘍は切片化し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織学的な違いを明らかにする。更に、各々のマウスから主要な臓器、所属リンパ節などを摘出し、プラズマの転移抑制効果についても同様に評価する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yoshihisa Ikeda, Ryo Fukushima, Kazuki Tange, Hideki Motomura, Taiju Saito, Masafumi Jinno	4. 巻 57(1)
2. 論文標題 Growth acceleration of Nile tilapia at 21 to 31 weeks of age with plasma-treated air-supplied water	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 21-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10715762.2023.2185124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yugo Kido, Hideki Motomura, Yoshihisa Ikeda, Susumu Satoh, Masafumi Jinno	4. 巻 16(1)
2. 論文標題 Clarification of electrical current importance in plasma gene transfection by equivalent circuit analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hideki Mori, Masamoto Murakami, Teruko Tsuda, Kenji Kameda, Ryo Utsunomiya, Kana Masuda 1, Ken Shiraishi, Xiuju Dai, Mikiko Tohyama, Hiroki Nakaoka, Koji Sayama	4. 巻 90(2)
2. 論文標題 Reduced-HMGB1 suppresses poly(I:C)-induced inflammation in keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 154-165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.01.007	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 -
1. 著者名 Masafumi Jinno et al	4. 巻 60
2. 論文標題 The new technology of molecular and gene introduction method using discharge plasma: plasma brings features of random genome integration-free and damage-free to cells, genomic-DNA and external introducing molecules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Xiuju Dai, Masamoto Murakami, Ken Shiraishi, Jun Muto, Mikiko Tohyama, Hideki Mori, Ryo Utsunomiya, Koji Sayama	4. 巻 52(6)
2. 論文標題 EGFR ligands synergistically increase IL-17A-induced expression of psoriasis signature genes in human keratinocytes via I B and Bcl3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Immunol.	6. 最初と最後の頁 994-1005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/eji.202149706	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 -

1. 著者名 Xiuju Dai, Jun Muto, Ken Shiraishi, Ryo Utsunomiya, Hideki Mori, Masamoto Murakami, Koji Sayama	4. 巻 142(8)
2. 論文標題 TSLP Impairs Epidermal Barrier Integrity by Stimulating the Formation of Nuclear IL-33/Phosphorylated STAT3 Complex in Human Keratinocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 2100-2108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.01.005	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 -

1. 著者名 Daisuke Nanba, Fujio Toki, Kyosuke Asakawa, Hiroyuki Matsumura, Ken Shiraishi, Koji Sayama, Kyoichi Matsuzaki, Hiroshi Toki, Emi K Nishimura	4. 巻 220(11)
2. 論文標題 EGFR-mediated epidermal stem cell motility drives skin regeneration through COL17A1 proteolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202012073	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 -

1. 著者名 Xiuju Dai, Ken Shiraishi, Jun Muto, Ryo Utsunomiya, Hideki Mori, Masamoto Murakami, Koji Sayama	4. 巻 142(1)
2. 論文標題 Nuclear IL-33 Plays an Important Role in IL-31-Mediated Downregulation of FLG, Keratin 1, and Keratin 10 by Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Activation in Human Keratinocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 136-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.05.033	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 -

1. 著者名 Xiuju Dai, Ryo Utsunomiya, Ken Shiraishi, Hideki Mori, Jun Muto, Masamoto Murakami, Koji Sayama	4. 巻 141(11)
2. 論文標題 Nuclear IL-33 Plays an Important Role in the Suppression of FLG, LOR, Keratin 1, and Keratin 10 by IL-4 and IL-13 in Human Keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 2646-2655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.04.002	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 -

1. 著者名 Mikiko Tohyama, Akira Matsumoto, Teruko Tsuda, Xiuju Dai, Ken Shiraishi, Koji Sayama	4. 巻 101(3)
2. 論文標題 Suppression of IL-17A-induced CCL20 production by cytokine inducible SH2-containing protein 1 in epidermal keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 202-209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.01.005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Xiuju Dai, Mikiko Tohyama, Masamoto Murakami, Ken Shiraishi, Shuang Liu, Hideki Mori, Ryo Utsunomiya, Kazutaka Maeyama, Koji Sayama	4. 巻 1866(5)
2. 論文標題 House dust mite allergens induce interleukin 33 (IL-33) synthesis and release from keratinocytes via ATP-mediated extracellular signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis .	6. 最初と最後の頁 165719
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2020.165719	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Utsunomiya, Xiuju Dai, Masamoto Murakami, Kana Masuda, Hidenori Okazaki, Teruko Tsuda, Hideki Mori, Ken Shiraishi, Mikiko Tohyama, Koji Sayama	4. 巻 27(9)
2. 論文標題 Heparinoid suppresses Der p-induced IL-1 production by inhibiting ERK and p38 MAPK pathways in keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Dermatol.	6. 最初と最後の頁 981-988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13685	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Masafumi Jinno et al.
2. 発表標題 Plasma Mediated Spontaneous Cell Membrane Permeation and its Applications: Endocytosis and Random Genome Integration-Free
3. 学会等名 ISPlasma2022/IC-PLANTS2022（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神野 雅文 他
2. 発表標題 プラズマ遺伝子・分子導入法の機序と応用
3. 学会等名 SPP-39/SPSM34（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masafumi Jinno et al
2. 発表標題 Spontaneous and Genome Integration Free External Molecular/Gene Introduction to Cells Triggered by Complex Stimulus Generated by Plasma
3. 学会等名 8th International Conference on Plasma Medicine, WeA2-2, (2020)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020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
研究分担者	神野 雅文 (Jinno Masafumi) (30274335)	愛媛大学・理工学研究科（工学系）・教授 (16301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	本村 英樹 (Motomura Hideki) (80332831)	愛媛大学・理工学研究科（工学系）・准教授 (16301)	

	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
研究 協 力 者	津田 照子 (Tsuda Teruko)		
研究 協 力 者	丹 えりこ (Tan Eriko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関