

令和 3 年 4 月 8 日現在

機関番号：82208

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08279

研究課題名(和文) プラズマ照射液/NOxドナーによるメラノーマ治療の基礎研究

研究課題名(英文) Melanoma treatment by plasma-activated infusion and NOx donors

研究代表者

落合 豊子(Ochiai, Toyoko)

一般社団法人プラズマ化学生物学研究所・研究部・研究員

研究者番号：40133425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヘリウムプラズマを用いて、臨床使用が容易であるプラズマ活性化輸液(Plasma-activated infusion, PAI)を創製した。PAIはアポトーシス抵抗性がん(メラノーマ、骨肉腫)に対し強力な殺細胞作用を示す一方で正常細胞の生存にはほとんど影響せず、がん細胞選択的に作用した。PAIの抗がん作用には、mTOR経路の活性化を介するオートファジーの阻害とRIP1/3経路の活性化による非アポトーシス型細胞死のネクロトーシスの誘発が関与した。一酸化窒素供与体は、PAIによるミトコンドリアネットワーク崩壊とネクロトーシスを増強して抗がん効果を著しく高めることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低温大気圧プラズマを照射された液体(プラズマ照射液)は、がん細胞だけを傷害する性質を持つため、副作用の少ない次世代のがん治療法として注目されている。本研究によって現在臨床で使用されている輸液剤から作成したPAIががん細胞を選択的に傷害し、その作用をNOx供与体が顕著に増強することが明らかとなった。これらの知見はPAIとNOx供与体の併用による腫瘍標的型がん治療の理論的基盤を提供する。近年アポトーシスに抵抗性を持つがんの治療の戦略法として非アポトーシス型細胞死の誘発が注目されている。PAIがこのタイプの細胞死を誘発できることからPAI/NOxによる治療はこれらのがんに有効となることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Non-thermal atmospheric plasma (NTAP)-activated liquids have emerged as new promising anticancer agents because they preferentially injure malignant cells. We have generated plasma-activated infusion (PAI) as a novel NTAP-based anti-neoplastic agent. PAI was prepared by irradiating helium NTAP to form a clinically approved infusion fluid. PAI dose-dependently killed malignant melanoma and osteosarcoma cell lines resistant to apoptosis-targeting agents, including TRAIL while showing much lower cytotoxic effects on dermal and lung fibroblasts. Autophagy inhibition through the mTOR pathway activation and necrosis were involved in the anticancer effect. PAI increased the intracellular nitric oxide (NO) and various NOx donors augmented the anticancer effect. NO donors also augmented the mitochondrial network collapse, which played a role in PAI's anticancer effect. Thus, combined administration of PAI and NO donors is a promising approach for treating apoptosis-resistant cancers.

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 骨肉腫 プラズマ照射輸液剤 ミトコンドリア オートファジー
ネクロトーシス 一酸化窒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低温大気圧プラズマ(以下プラズマと略)は室温、大気圧下で気体の放電によって作成されるプラズマである。プラズマを照射した細胞培養液、緩衝液、水などの液体(プラズマ照射液)は、種々の腫瘍細胞を傷害する一方、正常細胞には毒性を示さないことから、副作用の少ない新規な抗がんツールとして注目されている。プラズマ照射液の抗がん作用ならびに腫瘍選択性のメカニズムは解明されていないが、酸化ストレスが関与しており、過酸化水素(H_2O_2)がそのメディエーターとして重要であることが明らかにされていた。われわれは、臨床に即応用できる利点を考えて、従来広く使われている培養液の代わりに臨床で使用されている輸液剤の使用を着想し、誘電体バリア放電型プラズマジェットで作成したヘリウムプラズマを輸液剤に照射してプラズマ照射輸液(Plasma-activated infusion, PAI)を作成した。PAIの抗がん作用を調べたところ、典型的なアポトーシス誘発剤である TRAIL(腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド)に抵抗性を示すメラノーマや骨肉腫細胞株に有効であること、非アポトーシス細胞死を誘発すること、およびこの抗がん作用は H_2O_2 単独では説明できないことを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、プラズマ照射液が誘発する細胞死のモードを明らかにし、そのメカニズムを分子レベルで理解すること、 H_2O_2 以外の細胞死メディエーターの存在を明らかにすること、これらの発見に基づく PAI によるアポトーシス抵抗性のがん細胞に対する新規な治療法の分子的基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞: がん細胞としてヒトメラノーマ、ヒト骨肉腫細胞株を、正常細胞としてヒト皮膚線維芽細胞 HDF ならびにヒト肺維芽細胞 WI-38 をそれぞれ用いた。PAI 作製: ヘリウムプラズマは、誘電体バリア放電プラズマジェットで作製し、PAI は、プラズマを液面 20 mm からソルデム 3A (テルモ) 1 mL あたりに 1 分照射して調製した。PAI 中の酸化物の測定: H_2O_2 濃度は Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (サーモフィッシャーサイエンティフィック) で NO_2^- / NO_3^- 濃度は、Griess assay Kit (NO_2^-/NO_3^- Assay Kit CII, Colorimetric Kit, ドージンド-)でそれぞれ測定した H_2O_2 ならびに NO_2^-/NO_3^- 濃度は、標準の H_2O_2 および $NaNO_2/NaNO_3$ による検量線を用いて、算出した。細胞内 ROS の産生は細胞を処理後 ROS プロブ DCFH-DA で染色して FACSCalibur で測定した。細胞生存率は WST-8 アッセイで測定した。アポトーシスおよび細胞膜統合性は、細胞を Annexin-FITC ならびに 7-Amino-actinomycin D(7-AAD)で染色して FACSCalibur で測定し、CellQuest Pro ならびに Flowjo で定量化した。カスパーゼ活性化は、NucView で染色し、Muse Cell Analyzer (メルクミリポア)で測定、解析した。オートファジー測定は、cyto-ID で染色し、FACSCalibur で測定し、データを CellQuest Pro ならびに Flowjo で解析した。また、ウェスタンブロットにより LC3 I/II 発現、P62 のリン酸化(Ser351)ならびに mTOR 経路の分子のリン酸化を解析した。ネクロトーシス解析はウェスタンブロットにより RIP1、RIP3 のリン酸化を解析した。ミトコンドリアおよび小胞体ネットワークの生細胞イメージング: 薬剤処理した細胞を洗浄後、ミトコンドリアと小胞体(ER)を MitoTracker と ER Green でそれぞれ染色し、核はヘキスト 33342 で対比染色した。生物顕微鏡 BZ X-700 (キーエンス)で TRITC、GFP および DAPI フィルターを用いて 100 倍油浸レンズで観察し BZ-H3A ソフトウェアで解析した。統計: 実験は 3 回以上行い、データは平均値 \pm 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

本研究で、われわれは臨床で使用されている輸液剤から新奇なプラズマ照射液 PAI を作製し、これがメラノーマや骨肉腫細胞株に対して強い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。その一方で、PAI は正常線維芽細胞や骨芽細胞の生存率にはほとんど影響せず、高い腫瘍選択性を示した。さらに、PAI は自家移植骨肉腫腫瘍の増殖と肺転移を顕著に抑制し、体重減少等の副作用を起こさないことを見出した。これらの発見は、PAI が有効で安全な抗がん剤となる可能性を示している。また PAI による細胞死は、カスパーゼ活性化を介するアポトーシスとは異なること、一部の細胞では RIP1 ならびに RIP3 の活性化によるネクロトーシスが関与することを発見した。さらに、PAI は、オートファジー抑制系である mTOR 複合体の活性化を介してオートファジーを抑制することも明らかにした。われわれは以前にメラノーマや骨肉腫では、栄養が十分でストレスのない条件下でも構成的にオートファジーが活性化されていること、種々のオートファジー阻害剤が非アポトーシス細胞死を起こすこと、および TRAIL によるアポトーシスを増強することを報告している (Ito et al., *Int J Oncol*, 2018; Onoe-Takahashiet al., *Int J Oncol*, 2019)。これらの知見から、メラノーマや骨肉腫ではオートファジーが不断に活性化されてアポトーシスならびに非アポトーシス細胞死から保護していると考えられる。これを考慮すると、PAI の強

力な抗腫瘍活性には、オートファジー抑制が大きく寄与していることが推測される。近年、オートファジー阻害によって、種々の抗がん剤に対する耐性が低下することが報告され、オートファジーを標的とする抗がん剤やアジュバント剤によるがん治療が注目され、一部の薬剤は臨床試験されつつある。本研究の知見は、PAI が、オートファジー標的薬としても有力であることを示しており、この分野に大きく寄与することが期待される。

プラズマ照射液の抗がん作用のメディエーターとして過酸化水素が重要な役割を果たしていることは広く認められているが、この他に亜硝酸イオンの関与が考えられている。これは、一部の PAL 中に亜硝酸イオンが検出され、過酸化水素と亜硝酸イオンが共存すると相乗的な細胞死が起こることが複数の研究グループから報告されたためである。しかし、亜硝酸イオンはそれ自身ほとんど毒性がなく、その仕組みは不明であった。PAI 中には mM 以下の過酸化水素と亜硝酸イオンが検出された。また、亜硝酸イオンは細胞内の一酸化窒素レベルを増加させることを初めて明らかにした。さらに、PAI も一酸化窒素を増加させ、種々の合成一酸化窒素供与剤（細胞内で一酸化窒素を産生する薬剤）との併用投与はその抗がん作用を顕著に増強させることを発見した。これらの知見を合わせると、PAI 中の亜硝酸イオンの還元によって生じる一酸化窒素がその抗がん作用のメディエーターとして働くというシナリオが想定される。興味深いことに、がんの微小環境の特徴の一つである低酸素は一酸化窒素の生合成経路に影響を与えることが知られている。すなわち、正常酸素圧下では、一酸化窒素はその合成酵素から産生されるが、低酸素下ではこの経路が不活化され、代わりに亜硝酸イオンや硝酸イオンの還元による一酸化窒素産生が促進される。この反応の元となる生体内還元剤ならびにその仕組みは解明されていないが、これらの事実を考慮すると、低酸素下の条件で増殖・生存するがん細胞は正常細胞よりも窒素酸化物の還元による一酸化窒素の産生が起こりやすく、これが PAI の腫瘍選択的細胞毒性の一因となっている可能性が考えられた。今後このシナリオをさらに検証したい。

一酸化窒素がどのようにしてメディエーターとして働くかという問題に関して、われわれは、一酸化窒素がミトコンドリアネットワーク異常を促進することを初めて明らかにした。これまでプラズマ照射培地が腫瘍選択的にミトコンドリアネットワーク異常を誘発すること、およびこの異常が抗腫瘍活性に深く関与することを報告してきた (Saito et al., *Oncotarget*, 2016) が、PAI も同様の作用を示すことがわかった。ミトコンドリアネットワーク異常は刺激の強度、持続時間に応じて融合、短縮化から断片化、膨化、ならびにクラスター形成と段階的に起り、クラスター形成が細胞死に必須であることが示唆された。ミトコンドリアネットワーク崩壊による細胞死とその制御は、基礎生物学の最近のトピックスであるだけでなく、神経変性疾患、心臓病、糖尿病等の多種多様な疾患の要因となることが明らかになり、臨床的にも重要な研究課題になりつつある。プラズマ照射液の細胞死誘発の研究は国内外で盛んであるが、ミトコンドリアネットワークに対する作用はわれわれが世界に先駆けて見出ししており、そのメカニズムにおける活性酸素の役割や、腫瘍選択的細胞毒性との関連の発見等によって、この分野を先導している。本研究の成果は、ミトコンドリアのネットワーク異常は、腫瘍特異的に惹起され細胞毒性に必須であるというシナリオの一般性を強化するものである。この異常における一酸化窒素の役割をさらに解析したい。

もう一つの本研究の成果は、PAI と一酸化窒素供与剤の併用による相乗的な抗がん作用の発見である。この発見は臨床における PAI 抵抗性細胞の出現に対する有効な方策を提示している。In vitro においても PAI に対するがん細胞の感受性は、細胞種によって異なっており、臨床では患者間でこの差がさらに大きい可能性がある。一酸化窒素供与剤を併用することで、PAI に対する感受性を増加させ、治療効果を増大させることができる。加えて、その併用により PAI の投与濃度を減少させ副作用の出現もさらに抑えることができる。今後、in vivo における両者の併用投与の抗腫瘍効果を検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujikawa I, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y	4. 巻 21
2. 論文標題 Aspirin Induces Mitochondrial Ca ²⁺ Remodeling in Tumor Cells via ROS-Depolarization-Voltage-Gated Ca ²⁺ Entry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 4771
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21134771	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 Nakagawa C, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y.	4. 巻 21
2. 論文標題 The Mitochondrial Ca ²⁺ Overload via Voltage-Gated Ca ²⁺ Entry Contributes to an Anti-Melanoma Effect of Diallyl Trisulfide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 491
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21020491.	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 Onoe-Takahashi A, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y.	4. 巻 54
2. 論文標題 Autophagy inhibitors regulate TRAIL sensitivity in human malignant cells by targeting the mitochondrial network and calcium dynamics.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1734-1746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4760	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 Ito T, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Tokunaga T, Yoshida Y, Ochiai T, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y.	4. 巻 53
2. 論文標題 Cold PSM, but not TRAIL, triggers autophagic cell death: A therapeutic advantage of PSM over TRAIL.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 503-514
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4413	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Toyoko Ochiai.
2. 発表標題 The role of mitochondrial toxicity in tumor-selective toxicity
3. 学会等名 23rd International Symposium on Molecular Medicine. Bangkok, Thailand. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki-Karasaki M, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y.
2. 発表標題 Cold atmospheric plasma irradiated liquid : a novel tumor-selective anticancer liquid advantageous over PAM.
3. 学会等名 23rd International Symposium on Molecular Medicine, Bangkok, Thailand. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki-Karasaki M, Ando T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y.
2. 発表標題 Air plasma-activated medium induces an iron-dependent cell death in human malignant tumor cells.
3. 学会等名 24th World Congress on Advances in Oncology & 24th International Symposium on Molecular Medicine. Sparta, Greece (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki-Karasaki M, Suzuki-Karasaki M, Miyahara H, Ochiai T, Suzuki-Karasaki Y.
2. 発表標題 Critical regulatory role of reactive oxygen/nitrogen species (RONS) in the antitumor activity of cold plasma-stimulated transfusion (PLAST).
3. 学会等名 23rd World Congress on Advances in Oncology. Athens, Greece. (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 抗癌剤の製造方法、抗癌剤および医薬	発明者 鈴木良弘、鈴木美喜、落合豊子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特許 第666792	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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	鈴木 良弘 (Suzuki Yoshihiro) (80206549)	一般社団法人プラズマ化学生物学研究所・研究部・代表理事 (82208)	

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
---------	---------