

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18846

研究課題名（和文）放電プラズマによる癌の転移抑制効果の検証

研究課題名（英文）Verification of suppression of cancer metastasis by discharging plasma

研究代表者

小野 亮（Ono, Ryo）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：90323443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：放電プラズマで癌に対する免疫を活性化する手法において、癌の転移を抑制する効果があるかどうかをマウスの実験で検証した。皮膚癌の一種であるメラノーマの肺転移抑制実験では、放電プラズマの効果을否定しない結果も一部得られたものの、明確な効果が得られない結果もあった。これに代わる実験として、転移抑制にも効果があると考えられる、癌の免疫治療に用いられる免疫チェックポイント阻害剤の抗PD-1抗体の効果をプラズマで向上できるかを調べた実験では、明確な効果が得られた実験と、効果が得られない実験とがあった。プラズマ照射条件を最適化すれば、プラズマの効果がさらに明確に示される可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プラズマによる癌の転移抑制に関わる実験を2種類行い、いずれも明確な効果、あるいはプラズマの効果を否定しない結果が一部得られたが、効果がみられない結果も多く観測された。しかし、プラズマの照射条件はまだ最適化しておらず、この最適化を行えばプラズマの効果は向上するため、一部でもプラズマの効果を示唆する結果が得られたことは、今後のプラズマ癌免疫治療の研究における一つの指針を示すことができたと見える。

研究成果の概要（英文）：We examined whether discharge plasma has the effect of reducing cancer metastasis using mice, where the plasma can activate the immune system specific to cancer. In the experiments on suppressing lung metastasis of melanoma, which is a type of skin cancer, a result did not deny the effect of plasma, but the other result did not show an apparent effect. Next, we did an alternative experiment to examine whether the plasma could enhance the effect of anti-PD-1 antibodies, which is used for cancer immunotherapy and may also have the effect of suppressing cancer metastasis. An experiment showed an apparent effect of the plasma, whereas other experiments did not show apparent effects. We suggested that the effect of plasma may be more clearly observed if the conditions of plasma treatment are optimized.

研究分野：プラズマ応用工学

キーワード：プラズマ医療 癌治療 免疫治療 転移 ストリーマ放電

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放電プラズマで癌を治療するプラズマ医療の研究が、国内外で精力的に進められている。2012～2016年には「プラズマ医療科学の創成」が科研費の新学術領域で採択され、新しい研究分野として大きく期待されている。プラズマは癌治療、創傷治療、止血、皮膚病治療などへの利用が研究されており、また細胞の遺伝子導入、細胞の分化促進、殺菌など、細胞レベルへの応用研究も盛んに行われている。その中で、我々はプラズマを癌の免疫治療に使える可能性を世界で初めて動物実験で示し、画期的な成果として注目を集めてきた。具体的には、マウスの左右両脚に皮膚癌の一種であるメラノーマ (B16F10) の癌腫瘍を作り、右脚の腫瘍のみプラズマを照射すると、右脚だけでなく左足の腫瘍に対しても抗腫瘍効果が現れる現象を発見した。そして、その理由を調べた結果、プラズマをマウスの腫瘍に照射すると、マウスの癌に対する免疫が活性化し、その結果マウスの全身の同種の腫瘍に対しても抗腫瘍効果が表れた可能性を示した。さらに、免疫効果が一時的なものでなく長期間持続することも別の実験で確認した。具体的には、マウスの右脚にメラノーマ B16F10 の癌腫瘍を作り、プラズマを照射後に腫瘍をすべて一旦切除した。このとき、マウス体内では癌に対する免疫がプラズマ照射で活性化されているはずであり、その効果は長期間持続することが期待される。その後 3 週間空けてから、今度は腫瘍を切除したのとは異なるほうの脚、すなわち左足に同種の癌腫瘍を作成し、マウスの免疫でこの再移植した腫瘍に抗腫瘍効果が現れるかを調べた。その結果、プラズマ照射により、再移植腫瘍に対する抗腫瘍効果が観測された。この結果は、少なくともプラズマ照射から 3 週間にわたり、この効果が持続することを示した。このように我々の動物実験により、プラズマに癌の免疫治療の効果がある可能性が示された。

癌の免疫治療では、死亡率がとりわけ高くなる「癌の再発」と「癌の転移」を抑える効果が期待される。患者の癌に対する免疫が向上することで、全身の癌に対する長期の抗腫瘍効果が期待され、手術で腫瘍を切除後に、ミクロに残存した癌細胞からの再発を免疫で抑制したり、あるいは局所から全身に転移する腫瘍の抑制、あるいは転移した腫瘍の縮小なども期待される。実際に、我々の先行研究でも、メラノーマ B16F10 腫瘍切除後の再発をプラズマ照射で抑制できる可能性をマウスの実験で示した。このような背景のもと、本研究では、癌の転移に対するプラズマの効果調べることを目的とする。転移抑制は癌治療の大きな課題の一つであり、本研究が成功すれば、プラズマ医療のみならず、従来の癌治療の分野にも大きなインパクトを与える。

癌の免疫治療は、近年では免疫治療用の薬剤 (免疫チェックポイント阻害剤) が開発されるなど、治療法の一つとして確立しつつある。しかしこの免疫チェックポイント阻害剤は高価であり、かつ奏効率が低いという問題がある。奏効率は効果が出る率のことで、患者全体の 10～30%にしか効き目がないという問題がある。一方、プラズマは極めて安価であり、また副作用がほとんどないことが海外の数千人規模の治験で明らかになっており、本手法は安価で有望な治療法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、プラズマによる癌の免疫治療を進展させ、担癌マウスにプラズマを照射してマウスの癌に対する免疫を高め、免疫の効果で癌の転移を抑制できるかを検証する。プラズマ照射により、癌の転移が抑制できるかどうかを直接的に観測するとともに、転移抑制にも効果が期待されすでに広く利用されている免疫チェックポイント阻害剤の効果をプラズマ照射で高めることができるかどうかを検証する。また、プラズマの何か効いているかを調べる研究の一環として、プラズマ計測、シミュレーション開発、および活性種供給手法の開発も行う。

3. 研究の方法

腫瘍の転移抑制を観測する実験では、マウスメラノーマ細胞 (B16F10) を C57BL/6 マウスの右脚あるいは背中に注射して腫瘍を作成する。腫瘍がある程度大きくなったらプラズマを 1 日 10 分間×5 日間腫瘍に照射し、照射最終日に腫瘍を切除する。その後、免疫が活性化するのに十分な日数 (2 週間程度) を空けてから、尾静脈から B16F10 細胞を再度注射する。B16F10 は肺転移しやすいことが知られており、本実験でもこの再移植した B16F10 の肺転移がプラズマ照射で抑制されるかどうかを調べる。B16F10 にはルシフェリンと呼ばれる発光物質がついた特殊な細胞を用い、IVIS とよばれる装置で腫瘍の分布を測定することができる。

当初はこの実験のみ行う予定であったが、B16F10 の転移能が予想以上に高く、プラズマの効果を見るには実験の難易度が高いことが分かった。そこで 2 つ目の実験として、転移抑制にも効果が期待される免疫チェックポイント阻害剤、抗 PD-1 抗体の効き目をプラズマでアシストする実験も行った。免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療では、先に述べた通り、奏効率が低いことが最大の問題となっている。プラズマでこの効き目を向上させることができれば、治療のオプションが 1 つ増えることとなる。実験では、B16F10 に加えて大腸癌細胞 (CT26) も用いる。右脚に腫瘍を作成したマウスに抗 PD-1 抗体を数回に分けて注射し、プラズマ照射の有無で腫瘍の成長が異なるかどうかを調べる。

本実験では、医療用のプラズマ源としては特殊なナノ秒ストリーマ放電を用いる。この放電の何が抗腫瘍効果に効いているのかを調べる研究の一環として、プラズマの電子密度および電子エネルギー分布のレーザー計測、プラズマ医療で効果が高いと考えられている OH ラジカルのレーザー計測、およびストリーマ放電シミュレーションの開発も行う。

4. 研究成果

B16F10の再移植腫瘍の転移抑制効果を見る実験では、プラズマ照射と非照射群8匹ずつのうち、非照射群で3匹が再移植前に衰弱した。再移植前に転移があった可能性がある。残りのマウスで再移植実験を行い肺への転移を調べた結果、肺転移が確認された匹数はプラズマ照射群で4/8匹、非照射群では4/5匹となり、プラズマ照射による転移抑制の効果を、少なくとも否定しない結果が得られた。一方、次の実験では、再移植前に衰弱したマウスの匹数はいずれも1/8匹だった。また、再移植した腫瘍の肺転移が確認されたマウスの匹数はいずれも6/7匹で、プラズマ照射の明確な効果は確認されなかった。

上記の実験ではB16F10の転移能が予想以上に強く、肺以外へ転移したマウスもいくつかあり、肺転移のみで転移を比較する実験としては不十分であった。注射する癌細胞の濃度を下げるなどの改良を試みたがうまくいかず、本研究に適した実験条件を見つけるまでに至らなかった。したがって、次は上記とは異なる2つ目の実験を開始することにした。一方で、上記の実験ではプラズマの転移抑制効果を示唆する結果は得られたので、適切な実験条件を見つけることができれば、転移抑制効果の実験を行える可能性は示すことができた。

2つ目の実験では、免疫チェックポイント阻害剤の一つである抗PD-1抗体の効果を、プラズマ照射で向上できるかどうかを調べた。免疫チェックポイント阻害剤はすでに癌の免疫治療で利用されており、癌の転移抑制にも効果が期待される。免疫チェックポイント阻害剤は奏効率が低いことが大きな問題となっており、プラズマで癌に対する免疫を向上させれば、免疫チェックポイント阻害剤の奏効率を上げることができる可能性がある。癌種にはメラノーマ細胞B16F10および大腸癌細胞CT26を用いた。B16F10は免疫原性が低い、すなわち免疫が効きにくい癌種であり、一方のCT26は免疫原性が高い。このように、免疫に対する感度の異なる2種類の癌種を用いて実験を行った。マウスの右脚に腫瘍を作り、腫瘍がある程度の大きさになったら、一定量の抗PD-1抗体を1日おきに3日間、計3回注射で投与するとともに、プラズマ照射を1日10分間×5日間行った。予備実験で、抗体投与もプラズマ照射も行っていないコントロール群と、抗体のみ投与する群で差がつかないような条件を探した。すなわち、抗体だけではほとんど効果がない条件を探した。これは実際の治療において、免疫チェックポイント阻害剤がぎりぎり効かない程度の条件を模擬している。抗体投与のみの群と抗体+プラズマ照射の群を比較した結果、B16F10では差がなかったが、CT26では抗体+プラズマ照射の方が腫瘍の成長が遅くなる現象が観測された。これは、抗体の効果がプラズマ照射により増強されたことを示唆している。この実験ではかなり明確な差が観測されたが、一方、CT26でもプラズマの効果がみられない実験も多かった。免疫は一般にデリケートなので、各実験のわずかな条件の違いがこの差を生んでいる可能性がある。どのような条件であれば効果が出るのかを明確にするには、プラズマのどの要素が効いているかを調べる研究が重要であり、これが次に述べるプラズマ計測とシミュレーションにつながる。また、本実験ではプラズマ照射条件の最適化を行っていない。最適条件を調べれば、今よりも格段にプラズマの効果が上がる可能性もあり、現在の不安定な実験結果が改善される可能性もある。B16F10では今回は効果がみられなかったが、こちらでもプラズマ照射条件を最適化すれば、効果が出てくる可能性もある。

先に述べた通り、本研究ではプラズマの何が抗腫瘍効果に効いているかが全く分かっていないのが研究全体のネックになっている。そこで、長期的な課題ではあるが、プラズマの何が効いているかを明確にする研究の一環として、本研究で用いているパルスストリーマ放電の計測とシミュレーションの開発を行った。計測では、放電の重要なパラメータである電子密度および電子のエネルギー分布を測定した。電子密度計測では二次元レーザー干渉法を用いて、電子密度の絶対値と放電パルス中における密度増減の様子を観測した。また、電子エネルギー分布はレーザーを用いたトムソン散乱計測を行い、電子のエネルギー分布を明らかにした。これと平行して、ストリーマ放電のシミュレーションを行い、ストリーマ放電の進展や形状および生成される活性種密度(オゾン)を実験結果と比較し、実験結果を再現できているところとできていないところを明らかにした。これら3つの研究は、いずれも他大学との共同研究で行った。また、プラズマ医療で重要と言われているOHラジカルの密度をレーザー誘起蛍光法で測定し、その密度および挙動を明らかにした。この他、OHラジカルのみの照射効果を分離して調べる手法として、プラズマではなく真空紫外光によるH₂O分子の光解離反応で生成したOHを照射する手法の開発にも取り組んだ。いくつかの化学種密度の測定結果とシミュレーション結果を比較し、シミュレーションが実験結果を精度よく再現できていることを確認するとともに、OHの照射効果を定量的に計測できるかを実証する実験も行った。最終的にはマウスへの照射を意図しているが、簡単に実証するためにマウスではなくポリマーの表面にOHを照射して、OHラジカルによる表面改質反応を定量的に測定できることを実証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 Ono Ryo, Nakamura Takuya, Zhang Xiang	4. 巻 52
2. 論文標題 Photofragmentation laser-induced fluorescence of ozone using narrowband and broadband KrF excimer lasers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 045201 ~ 045201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1088/1361-6463/aaec44	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 Inada Yuki, Komuro Atsushi, Ono Ryo, Kumada Akiko, Hidaka Kunihiko, Maeyama Mitsuaki	4. 巻 52
2. 論文標題 Two-dimensional electron density measurement of pulsed positive secondary streamer discharge in atmospheric-pressure air	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 185204 ~ 185204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab0725	査読の有無 無
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 Ono Ryo, Komuro Atsushi	4. 巻 53
2. 論文標題 Generation of the single-filament pulsed positive streamer discharge in atmospheric-pressure air and its comparison with two-dimensional simulation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 035202 ~ 035202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab4e65	査読の有無 無
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 Ono Ryo, Iwase Atsuro, Murakami Shinichiro, Zen Shungo	4. 巻 387
2. 論文標題 Comparison of measured and simulated chemical species densities in vacuum ultraviolet photolysis method of Ar/H ₂ O/O ₂ mixture developed for selectively supplying reactive species	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry	6. 最初と最後の頁 112148 ~ 112148
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2019.112148	査読の有無 無
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 Tonita Kentaro, Inada Yuki, Komuro Atsushi, Zhang Xiang, Uchino Kiichiro, Ono Ryo	4. 巻 53
2. 論文標題 Measurement of electron velocity distribution function in a pulsed positive streamer discharge in atmospheric-pressure air	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physics D: Applied Physics	6. 最初と最後の頁 08LT01 ~ 08LT01
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1088/1361-6463/ab58b4	査読の有無 無
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 Ono Ryo, Tokuhiko Makoto	4. 巻 29
2. 論文標題 Spatiotemporal measurement of OH density from upstream to downstream in humid helium atmospheric-pressure plasma jet	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Sources Science and Technology	6. 最初と最後の頁 035021 ~ 035021
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1088/1361-6595/ab3c75	査読の有無 無
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 Ono Ryo, Murakami Shinichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative measurement of the effect of OH radicals on the surface treatment of polypropylene	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Processes and Polymers	6. 最初と最後の頁 e200024 ~ e200024
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1002/ppap.202000024	査読の有無 無
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22件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 8件)

1. 発表者名 R. Ono
2. 発表標題 Optical diagnostics in atmospheric-pressure non-thermal plasma
3. 学会等名 Europhysics Conference on the Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Inada, R. Ono, A. Kumada, K. Hidaka, and M. Maeyama
2. 発表標題 Talbot interferometer for two-dimensional electron density measurement over positive secondary streamer discharge propagating in atmospheric-pressure air
3. 学会等名 Europhysics Conference on the Atomic and Molecular Physics of Ionized Gases 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 徳弘 誠, 小野 亮
2. 発表標題 大気圧プラズマジェットにおけるOH密度計測
3. 学会等名 第42回静電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 篤郎, 小野 亮
2. 発表標題 真空紫外光を用いた選択的活性種生成法のシミュレーションの検証
3. 学会等名 第42回静電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲田 優貴, 小野 亮, 小室 淳史, 熊田 亜紀子, 日高 邦彦, 前山 光明
2. 発表標題 大気圧空気中正極性2次ストリーマ放電内の2次元電子密度分布測定
3. 学会等名 第42回静電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石崎 啓, 近藤 陽介, 水野 和恵, 小野 亮
2. 発表標題 ナノ秒パルスプラズマによるマウス大腸がんの抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 第42回静電気学会全国大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩瀬 篤郎, 小野 亮
2. 発表標題 真空紫外光を用いた選択的活性種生成法のシミュレーションの検証
3. 学会等名 2019年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳弘 誠, 小野 亮
2. 発表標題 ヘリウム大気圧プラズマジェットのOH密度時空間分解計測
3. 学会等名 2019年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎 啓, 近藤 陽介, 水野 和恵, 小野 亮
2. 発表標題 ナノ秒パルスプラズマを用いた正常組織への照射による抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 2019年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石崎 啓, 坂本 達哉, 水野 和恵, 小野 亮
2. 発表標題 ナノ秒パルスプラズマを用いたマウスメラノーマの肺転移抑制効果の検証
3. 学会等名 2019年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Tokuhiko and R. Ono
2. 発表標題 Spatiotemporal measurement of OH radical density in helium atmospheric pressure plasma jet
3. 学会等名 34th International Conference on Phenomena in Ionized Gases & 10th International Conference on Reactive Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 H. Ishizaki, Y. Kondo, K. Mizuno, and R. Ono
2. 発表標題 Anti-tumor effect induced by irradiation to normal tissue using nanosecond pulsed streamer discharge
3. 学会等名 34th International Conference on Phenomena in Ionized Gases & 10th International Conference on Reactive Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 A. Iwase and R. Ono
2. 発表標題 Verification of simulation on vacuum ultraviolet photolysis method for selectively producing reactive species
3. 学会等名 34th International Conference on Phenomena in Ionized Gases & 10th International Conference on Reactive Plasmas (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 X. Zhang, A. Komuro, and R. Ono
2. 発表標題 Temporal variation of OH density in wet nitrogen pulsed streamer discharge with a trace amount of oxygen
3. 学会等名 34th International Conference on Phenomena in Ionized Gases & 10th International Conference on Reactive Plasmas (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Ono, X. Zhang, and A. Komuro
2. 発表標題 Measurement of single-filament pulsed positive streamer discharge and its comparison with 2D simulation results
3. 学会等名 34th International Conference on Phenomena in Ionized Gases & 10th International Conference on Reactive Plasmas (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S. Murakami and R. Ono
2. 発表標題 Quantitative measurement of the effect of OH radicals on surface treatment of polypropylene
3. 学会等名 11th Asia-Pacific International Symposium on the Basics and Applications of Plasma Technology (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 近藤 陽介, 武田 早代, 柳井 秀元, 小野 亮
2. 発表標題 ナノ秒パルスプラズマと抗PD-1抗体の併用による抗腫瘍効果の検証
3. 学会等名 第43回静電気学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲田 優貴, 小野 亮, 小室 淳史, 熊田 亜紀子, 日高 邦彦, 前山 光明
2. 発表標題 空間制御された大気圧空気中正極性ストリーマ放電の2次元電子密度分布測定
3. 学会等名 第43回静電気学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 X. Zhang, A. Komuro, R. Ono
2. 発表標題 Measurement of temporal variation of OH density in wet nitrogen-oxygen pulsed streamer discharge with different amounts of oxygen
3. 学会等名 第43回静電気学会全国大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 健太郎, 内野 喜一郎, 稲田 優貴, 小室 淳史, 章 翔, 小野 亮
2. 発表標題 トムソン散乱計測による空气中ストリーマ放電の電子速度分布関数計測
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 X. Zhang, R. Ono
2. 発表標題 OH-LIF measurement in a single filament positive streamer discharge under different oxygen concentration
3. 学会等名 2020年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上 晋一郎, 小野 亮
2. 発表標題 ポリプロピレンの表面処理におけるOHラジカルの効果の定量的測定
3. 学会等名 2020年度静電気学会春期講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

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