

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06252・19K21346

研究課題名（和文）難治性腹膜播種の完全除去を目指す大気圧プラズマを応用した革新的腹腔内治療の開発

研究課題名（英文）Development of novel intraperitoneal therapy based on atmospheric pressure plasma for complete removal of peritoneal dissemination

研究代表者

池田 芳紀（Ikeda, Yoshiki）

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：30820378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：プラズマ活性溶液の子宮体癌に対する効果に関してはこれまでに報告がなく、我々はプラズマ活性溶液が子宮体癌細胞に対して抗腫瘍効果を有し、その作用機序はオートファジー（細胞の自食作用）細胞死が関与することを初めて示した。複数の子宮体癌細胞に対しプラズマ活性溶液を投与したところ、子宮体癌細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することがわかった。プラズマ活性溶液の作用機序としてオートファジー細胞死の活性化（オートファジーに関連するタンパクLC3Bの発現増加）が関与することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体癌はわが国では毎年約15,000人が罹患、約2,100人が死亡し、罹患数、死亡数ともに年々増加している。早期に診断された場合の予後は良好であるが、進行した状態で診断された場合や再発した場合の予後は不良で、化学療法に抵抗性をもつ難治性腹膜播種であるケースも多い。また、わが国の保険診療の下で子宮体癌に対して投与可能な薬剤は限られており、腹膜播種を伴う進行・再発子宮体癌に対する新規治療法の開発への需要が高まっている。本研究結果により、子宮体癌に対する新規治療法としてプラズマ活性溶液の臨床応用の可能性が拓かれた。

研究成果の概要（英文）：Anti-tumor effects of plasma-activated medium (PAM) on endometrial cancer remain unknown. Our results demonstrated that PAM inhibited cell viabilities by inducing autophagic cell death in endometrial cancer cells. We investigated the inhibitory effect of PAM on the viabilities of endometrial cancer cells in vitro. Our data showed that the viabilities of AMEC and HEC50 endometrial cancer cell lines were decreased by PAM at a certain PAM ratio, and PAM treatment effectively increased autophagic cell death in a concentration dependent manner. In addition, we evaluated the molecular mechanism of PAM activity and found that PAM treatment in both HEC1A and HEC50 endometrial cancer cells increased the protein expression of LC3B which is a biomarker of autophagy.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮体癌 腹膜播種 腹腔内治療 大気圧プラズマ プラズマ活性溶液 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍における腹膜播種は難治性で予後不良な進展様式の一つである。根治することは稀であり、次第に化学療法抵抗性を獲得し治療耐性となっていく。様々な分子標的薬、免疫療法等の研究が進められているが、腹膜播種を伴う婦人科悪性腫瘍の進行・再発例への効果は十分とは言えず、治療成績向上に寄与する新たな治療の開発が急務である。研究代表者が所属するグループは腹膜播種制御に対する新規治療法として、大気圧プラズマによる癌治療の実用化に向け、実験室で使用可能な簡易プラズマ発生装置を開発し、卵巣癌に対する *in vitro* および *in vivo* で劇的な抗腫瘍効果を証明したが、そのメカニズムには未知の部分が多い。本研究では大気圧プラズマによる腹膜微小環境の変化を様々な角度から検証し、抗腫瘍効果のメカニズムを解明する。

2. 研究の目的

子宮体癌はわが国では毎年約 15,000 人が罹患、約 2,100 人が死亡し、罹患数、死亡数ともに年々増加している対策すべき悪性腫瘍の一つである。早期に診断された場合の予後は良好であるが、進行した状態で診断された場合や再発した場合の予後は不良で、化学療法に抵抗性をもつ難治性腹膜播種である場合もしばしば経験する。また、わが国の保険診療の下で子宮体癌に対して投与可能な薬剤は限られており、腹膜播種を伴う進行・再発子宮体癌に対する新規治療法の開発への需要が高まっている。

これまでに、改良したプラズマ活性リンゲル液が培養細胞およびマウス卵巣癌腹膜播種モデルに対する高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにしてきた。現時点では、その作用機序は溶液に含まれる多量の活性酸素種による影響と考えているが、十分に解明できてはいない。また、プラズマ活性溶液の子宮体癌に対する効果はこれまでに報告がない。そこで、子宮体癌に対するプラズマ活性溶液の効果を確認するとともに、その作用機序の解明を目指し研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 使用した細胞株

計 4 つの子宮体癌細胞株 AMEC、HEC50、ISHIKAWA、RL95 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) を 10% 熱不活化ウシ胎児血清 (FBS, Thermo Fisher Scientific K.K., 東京, 日本) 1% ペニシリン - ストレプトマイシン (Nacalai tesque, 京都, 日本) を用いて RPMI-1640 培地 (no. R8758, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で維持した。すべての細胞は 37 °C、5%CO₂ 加湿インキュベーターで培養した。

(2) 使用抗体

抗 LC3A/B 抗体 (Cat. 4445, Cell Signal Technologies (CST), 東京, 日本) HRP 結合二次抗体 (CST, 東京, 日本) を用いた。

(3) 実験に用いたプラズマ装置およびプラズマ活性溶液調製

非平衡大気圧プラズマシステム (Fuji Corporation, 愛知, 日本) を超高電子密度 (約 2×10^{16} cm⁻³) でプラズマ源として利用した。システムの条件を以下に記す。酸素ガス、窒素ガス混合アルゴンガスフロー (2 標準リットル/分; slm)、15 kV 60 Hz の交流電源、15 mm の電極間距離、20 mm のスリット長、アルゴンガスパーズ (10 slm)、60 mm 細胞培養ディッシュ (AGCTECHNO GLASS CO., LTD, 静岡, 日本) に入れた FBS を含まない RPMI-1640 メディウム 10 mL に上記の非平衡大気圧プラズマを照射した。これをプラズマ活性溶液とする。プラズマヘッドの出口とメディウム表面間の露出距離はすべての実験で 4 mm とした。

(4) 細胞生存アッセイ

細胞株 (細胞 1×10^4 個) を最初に 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養後に希釈したプラズマ活性溶液で 24 時間処理した。その後 Cell Counting Kit-8 (DojinDo Molecular Technologies Inc., Maryland, USA) を用い、添付文書に従って細胞生存アッセイを行った。次に、マイクロプレートリーダー (Multiskan FC, Thermo Fisher Scientific K.K., 東京, 日本) を用いて 450 nm で吸収値を計測した。

(5) ウェスタンブロッティング

希釈したプラズマ活性溶液で各時間処理した後、冷却した PBS で細胞を洗浄した。5 倍希釈 RIPA バッファー [1 M Tris-HCl (pH 7.4)、5 M NaCl、10% デオキシコール酸ナトリウム、125 mM EDTA] およびプロテアーゼ阻害剤カクテル錠 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) を用い氷上で回収した。タンパク質を SDS-PAGE ゲルで分離し、ポリフッ化ビニリデン膜 (Merk-Millipore, 東京, 日本) 上に転写した。膜を種々の抗体で処理し、HRP 結合二次抗体 (GE Healthcare Life Sciences, 東京, 日本) で 1 時間室温にて処理した。ECL™ ウェスタンブロッティング検出試薬 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) で結合した抗体を可視化し、Image Quant LAS4000 Mini Imaging System (GE) で分析した。オートファジー抗体サンプリングキット (1:1000; Cat. 4445, CST, 東京, 日本) および抗 GAPDH 抗体 (1:1000; Cat. 2118, CST, 東京, 日本) をイムノブロッティングに使用した。

(6) アネキシン V/7-AAD 染色アッセイ

細胞を 60 mm ディッシュプレートで 24 時間培養した後、希釈したプラズマ活性溶液 (濃度 1:8) で各時間処理した。次に細胞をトリプシン処理し、冷却した PBS で 2 回洗浄した。その後 1 倍の結合バッファー (BD Pharmingen, Cat. 51-66121E) に細胞 1×10^6 個/mL の濃度で再懸

濁した。次に細胞を APC-Annexin V (Cat. 550474, BD Pharmingen) および 7-AAD (Cat. 559925, BD Pharmingen) で染色し、穏やかに混合し、暗所で 15 分間室温にて静置した。各チューブに 1 倍の結合バッファーを追加した後、フローサイトメトリーで細胞を分析し、初期/後期アポトーシス細胞の population を決定した。Staurosporine (1 μ M, 197-10251, 和光) で 6 時間 37 $^{\circ}$ C にて培養した細胞をポジティブコントロールとして使用した。

(7) 免疫蛍光染色法

細胞を 6 ウェルプレートのカバーガラス上で 24 時間培養した後、希釈したプラズマ活性溶液 (濃度 1:4) で 1 時間処理した。その後 100%メタノールで 15 分間 20 $^{\circ}$ C にて固定し、PBS で洗浄後、ブロッキングバッファー [10%正常ヤギ血清 (Dako; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) および 0.3% Triton-X in PBS] で 1 時間室温にて処理し、抗 LC3B 抗体 (1:200) (Cat. 3868, CST, 東京, 日本) でブロッキングバッファー中 4 $^{\circ}$ C にて一晩処理した。PBS で 3 回洗浄後、Alexa Fluor 594 結合二次抗体 (1:500) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) で 1 時間室温にて処理し、DAPI (1:500) で PBS 中室温にて 5 分間処理した。最終的に細胞は蛍光顕微鏡 (BX60; Olympus, 東京, 日本) を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) プラズマ活性溶液は希釈率および細胞種に応じて子宮体癌の細胞生存を阻害

計 4 つの子宮体癌細胞株 (AMEC、HEC50、ISHIKAWA、RL95) における細胞生存アッセイにより、子宮体癌細胞に対するプラズマ活性溶液の抗細胞増殖効果を評価した。図 1A は、希釈率を変化させたプラズマ活性溶液で 24 時間処理した細胞の生存率を示している。プラズマ活性溶液は濃度依存的にすべての子宮体癌細胞株の生存細胞の割合を低下させた。AMEC および HEC50 細胞は、他の細胞株よりもプラズマ活性溶液に対して高い感受性を示した。そのため、次からの実験はこれらの細胞株を使用した。図 1B, C に示すように、プラズマ活性溶液による 0.5 時間の処理によって、AMEC および HEC50 細胞株の両方で細胞生存率が大幅に低下した。2~24 時間以内にプラズマ活性溶液によって誘導される AMEC 細胞の形態変化は、細胞死でしばしば観察される形態に類似していた (図 1D)。これらの結果から、子宮体癌細胞においてプラズマ活性溶液が細胞生存を抑制し、細胞死を誘導する可能性があることが示唆された。

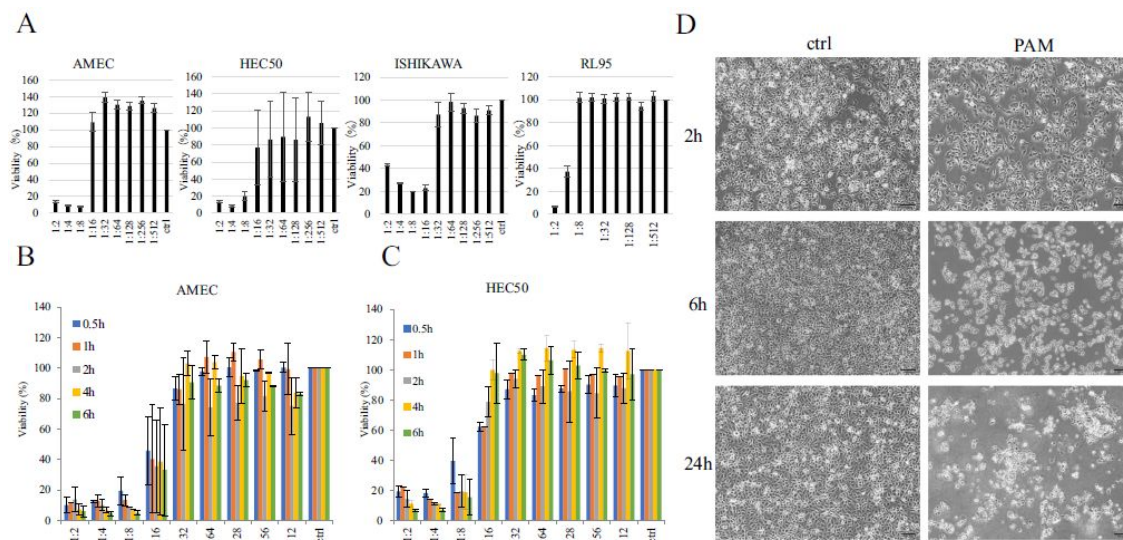


図 1. プラズマ活性溶液は希釈率、細胞種、処理時間に応じて子宮体癌の細胞生存を阻害

(2) プラズマ活性溶液は時間依存的に子宮体癌細胞の細胞死を誘導

次にアネキシン V/7-AAD 染色アッセイによりプラズマ活性溶液が子宮体癌細胞における細胞死を効果的に誘導したかどうかを評価した。プラズマ活性溶液による治療は、AMEC と HEC50 細胞の両方でアネキシン V 陽性細胞の割合を増加させた (図 2A, B)。AMEC 細胞では、24 時間のプラズマ活性溶液処理で初期アポトーシス細胞が 10.9%から 12.7%に増加した。しかしこの差は有意ではなかった (図 2A)。一方、後期アポトーシス細胞は 24 時間のプラズマ活性溶液処理により、6.1%から 85.3%に大幅に増加した ($p < 0.05$) (図 2C)。HEC50 細胞では、初期アポトーシスは有意に誘導されなかったが (6.8% \rightarrow 8.7%)、後期アポトーシスはプラズマ活性溶液処理により、3.5%から 49.6%に有意に増加した ($p < 0.05$) (図 2D)。これらの結果から、プラズマ活性溶液が時間依存的に子宮体癌細胞の細胞死を効果的に誘導することが示唆された。

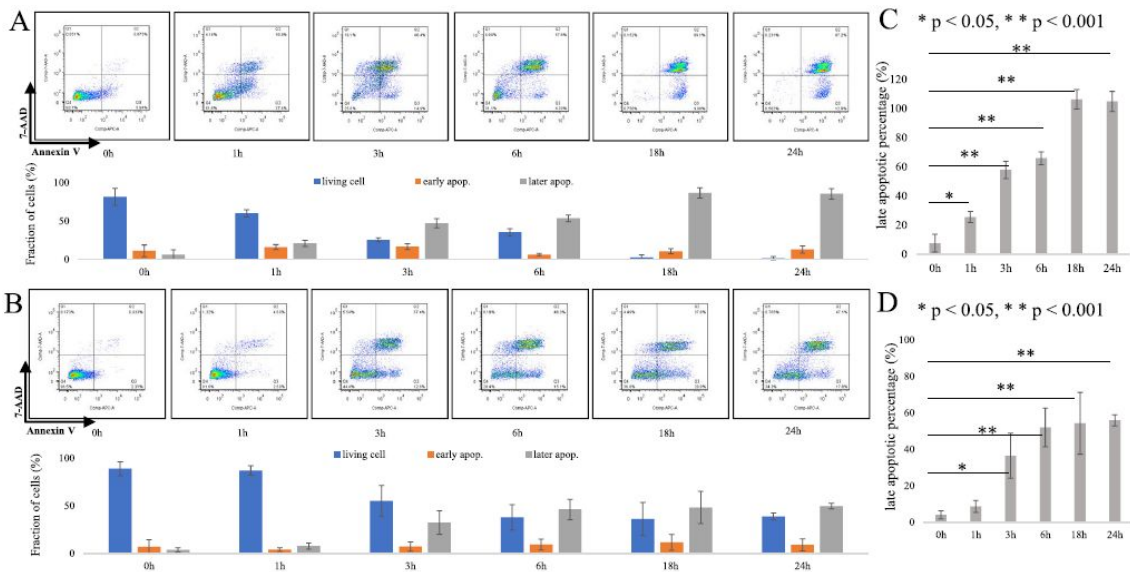


図 2 . プラズマ活性溶液は時間依存的に子宮体癌細胞の細胞死を誘導

(3) プラズマ活性溶液は子宮体癌細胞のオートファジーを誘導

細胞免疫蛍光染色を用い LC3B タンパク質を染色してオートファゴソームを探索することで、プラズマ活性溶液によって誘導される細胞死のメカニズムを解明した。免疫細胞化学染色により、プラズマ活性溶液処理によって AMEC 細胞における細胞内のオートファゴソームが増加したことが明らかとなった(図 3A)。図 3B に示すようにプラズマ活性溶液の処理時間を変化させても、AMEC 細胞において濃度依存的に LC3B のタンパク質レベルは増加した。これらの結果から、プラズマ活性溶液が LC3B の活性化を誘導したことが示された。

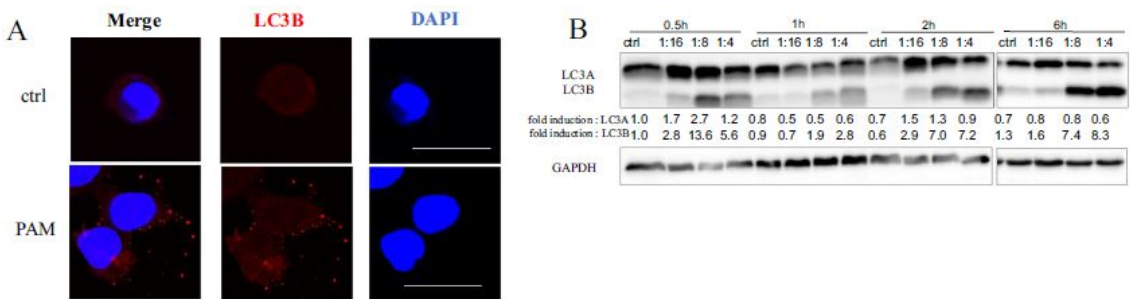


図 3 . プラズマ活性溶液は子宮体癌細胞のオートファジーを誘導

(4) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

プラズマ活性溶液の子宮体癌に対する効果に関してはこれまでに報告がなく、我々は複数の子宮体癌細胞に対してプラズマ活性溶液を投与することにより、子宮体癌細胞の増殖を抑制し、細胞死を誘導することを初めて示した。また、プラズマ活性溶液による抗腫瘍効果メカニズムとしてオートファジー細胞死の活性化が関与していることを突き止めた。

本研究成果により、子宮体癌に対する新規治療法としてプラズマ活性溶液の臨床応用の可能性が拓かれた。子宮体癌の難治性病態の一つである腹膜播種に対する有効な治療法の選択肢となり得る。新規治療法確立に向けては、治療効果のさらなる向上や安全性等の評価が必要となる。プラズマの臨床応用を実現するために、今回用いたプラズマ活性溶液に代わる新たなプラズマ活性溶液の開発も進めている。これまでに集積してきた知見を一層深めつつ、より治療効果の高いプラズマ活性溶液を開発し、難治性腹膜播種に対する新規治療法の確立を目指したい。

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 1件）

1. 著者名 Yoshikawa Nobuhisa, Liu Wenting, Nakamura Kae, Yoshida Kosuke, Ikeda Yoshiki, Tanaka Hiromasa, Mizuno Masaaki, Toyokuni Shinya, Hori Masaru, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Plasma-activated medium promotes autophagic cell death along with alteration of the mTOR pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-020-58667-3	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----