

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09640

研究課題名(和文) 大気圧プラズマによる微小環境を標的とした難治性腹膜播種制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanisms of intractable peritoneal metastasis treated with atmospheric pressure plasma for targeting the tumor microenvironment

研究代表者

中村 香江 (Nakamura, Kae)

名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・特任講師

研究者番号：10744047

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)：婦人科悪性腫瘍に特徴的な腹膜播種微小環境では、免疫細胞が本来の機能から変化し、がんの進展に寄与することが明らかにされている。本研究では、腫瘍抑制的かつ細胞活性化効果を有する大気圧プラズマを液体化したプラズマ活性液を用いて、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫活性化効果について検討を行った。その結果、1) 腹膜播種巣への抗腫瘍活性を有するM1型マクロファージの浸潤増加、2) がん性腹水により免疫抑制されたT細胞の免疫抑制解除効果、3) TGF- β 1により免疫抑制されたT細胞の活性化を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科悪性腫瘍に特徴的な腹膜播種は、難治性・治療抵抗性の象徴的な病態として着目されている。このような腫瘍微小環境では、恒常性維持に関わる細胞が変化し、難治性・治療抵抗性の基盤となっている。近年、注目されているがん免疫療法は、このような微小環境に対し本来の効果を十分発揮できないことが課題の一つとなっており、プラズマ活性液はこのような難治性となった腹膜播種に対し、複合がん免疫療法として既存の免疫療法のブレイクスルーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that immune cells whose character was changed at the peritoneal metastasis microenvironment could contribute to cancer progression in gynecologic malignancy. In this study, we investigated the activation of anti-tumor immune response in tumor microenvironment treated with plasma-activated solution, liquified gaseous of an atmospheric pressure plasma, having an effect of anti-tumor and cell activation. The results showed 1) increased M1-type macrophage, having an anti-tumor activity, infiltration in the peritoneal metastasis, 2) cancellation of the immunosuppression of T cells induced by patient-derived cancerous ascites, and 3) activation of T cell immunosuppressed by TGF- β 1.

研究分野：プラズマ医療科学

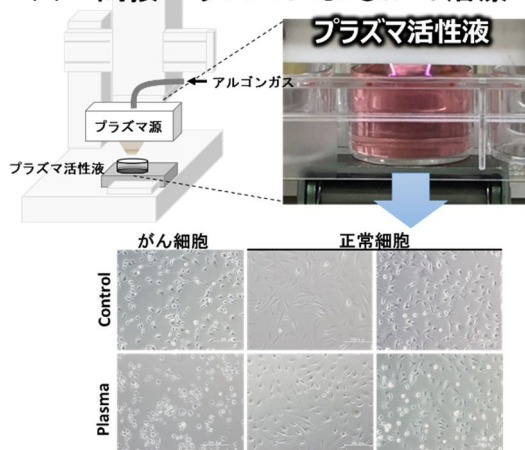
キーワード：卵巣がん 大気圧プラズマ プラズマ活性液 腫瘍微小環境 がん免疫

1. 研究開始当初の背景

婦人科悪性腫瘍の中でも卵巣がんは、無症状のまま進行し腹膜播種を起こしやすく特に予後不良である。難治性かつ治療抵抗性の腹膜播種を克服することで、卵巣がんに限らず消化器系を含めて様々な悪性腫瘍患者の予後の改善につながることを期待できるため、腹膜播種をターゲットとした革新的治療の開発に対するニーズは強い。特に卵巣がんにおける腹膜播種は難治性・治療抵抗性の象徴的な病態として着目してしており、腹膜微小環境に存在する腹膜中皮細胞やその他の免疫系細胞ががん関連細胞に変化し、難治性・治療抵抗性の基盤となって存在する。このような細胞に、正常な機能を復活させることが可能となれば、がんの強固な治療抵抗性を切り崩すことへとつながっていくと考え、がん細胞だけでなく腹膜播種病変に存在する微小環境へのアプローチにこそ、難治性・治療抵抗性を解く鍵が存在していると確信した。

プラズマの医療応用は大気圧や液中での非平衡（低温）プラズマ生成技術が開発されてきた2000年頃より、滅菌や殺菌、さらには止血などの医療装置として検討され、がん治療への臨床応用に向けてプラズマ医療の最先端領域では国内外の複数の研究グループから、その有効性が次々と報告されている。我々の研究グループは、プラズマを照射した溶液（プラズマ活性液）にも強力な抗腫瘍効果があることを世界に先駆けて実証した。プラズマ活性液を用いてプラズマを間接的に照射する技術を用いることができれば、プラズマを直接照射することが困難な場所や無数に散らばったがん細胞、目視では確認できない小さながんの播種に対して有効な汎用性の高い治療方法となると考えた。さらに、我々のグループでは、プラズマ活性培養液（Plasma-activated medium; PAM）が正常細胞に影響を与えずにがん細胞を選択的に殺傷可能であることを明らかにした（図1）。一方で、正常細胞には細胞機能を賦活化するというBiphasicな効果があることも明らかにしており、悪性腫瘍にはブレーキとして、正常細胞にはアクセルとして機能すれば、腹膜微小環境を構成する細胞の機能の正常化・賦活化によって既存の免疫療法や化学療法を補強する複合がん免疫療法として活用できる可能性があることを確信した。

図1 間接プラズマによるがん治療



2. 研究の目的

婦人科悪性腫瘍に特徴的な進展様式の一つである腹膜播種は難治性であり、故に予後不良となる。加えて再発がんの多くが化学療法抵抗性を獲得し治療耐性となることも根治を難しくしている。近年、分子標的薬や免疫療法などの開発が進められているが、腹膜播種を伴った進行・再発がんへの効果は十分とは言い難く、これまでの概念を覆すような取り組みが求められている。我々は腹膜播種制御に対する革新的治療法として、大気圧プラズマの抗腫瘍活性を汎用性の高い液体化する方法に成功し、プラズマ活性液として世界に先駆けて報告した。プラズマ活性液は、in vitro および in vivo において劇的な抗腫瘍効果が認められることを確認したが、これまでの抗腫瘍療法とは全く異なる機序の関与が示唆されている。プラズマ活性液は正常細胞には増殖促進的、腫瘍細胞には増殖抑制的に機能するという容易に理解しがたい現象を生じうる。このような知見を踏まえ、本研究では抗腫瘍腹膜微小環境におけるプラズマ活性液の腫瘍抑制機構の解明、ならびに免疫賦活化効果による新規治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) マウス腹膜播種モデルを用いた腹膜微小環境へのプラズマ活性液の影響を明らかにするためにマウス大網組織に着目し、プラズマ活性液腹腔内投与による卵巣がん細胞の大網への播種の経時的な評価、さらに免疫組織学的解析によりがん微小環境内に存在するマクロファージについて検討を行った。
- (2) ヒト進行卵巣がん患者の腹腔内環境は、免疫抑制にあることが報告されている。そこで、卵巣がん患者から採取した腹水により活性化が抑制された健常人由来 CD8 陽性 T 細胞が、プラズマ活性液により腹水により誘導された免疫抑制を解除できないかどうかについて検討を行った。
- (3) がんの腹膜播種形成にとって重要な因子の一つである TGF- β 1 により T 細胞の活性化の抑制が誘導されるかどうか検討を行い、TGF- β 1 により抑制された T 細胞の増殖に対し、プラズマ活性液により活性化が可能であるかどうかについて検討を行った。

4. 研究成果

- (1) プラズマ活性液の腹膜播種に対するさらに詳細なメカニズムを明らかにするために、*in vivo* imaging と組織学的解析を組み合わせ、卵巣がん細胞のマウス大網への播種を経時的に評価した。その結果、がん細胞の播種3日後には対象群において大網へのがんの播種および増殖が見られたのに対し、プラズマ活性液投与群では、がん細胞の播種及び増殖が有為に抑制されていることが明らかとなった。さらに、大網播種巣の組織学的解析の結果、プラズマ活性液投与群において、顕著なM1型マクロファージの浸潤が見られ、抗腫瘍免疫が活性化された可能性を示した(図2)。
- (2) ヒト卵巣がん患者から採取した腹水が、健康人由来CD8陽性T細胞のIFN γ 分泌量を濃度依存的に抑制した。一方良性腫瘍の腹水ではがん性腹水に見られるような抑制効果は検出されなかった。よって、がん性腹水には免疫活性を抑制する効果があることが示唆された(図3)。そこで、プラズマ活性液が、腹水により免疫活性を抑制されたT細胞の機能を回復できないかどうかを細胞増殖試験において検討したところ、256倍希釈および1024倍希釈のプラズマ活性液処理を行ったT細胞において、腹水による活性抑制が解除され、T細胞の増殖が亢進することが明らかとなった(図4)。
- (3) (2)で示したがん性腹水の免疫活性の抑制効果を示す因子の一つとして、腹膜播種形成にとって重要な因子であるTGF- β 1が挙げられる。そこで、TGF- β 1により免疫抑制状態の誘導が可能かどうか、さらに、プラズマ活性液による免疫抑制状態におけるT細胞の細胞増殖の活性化が可能かどうかについて検討を行った。その結果、TGF- β 1によりT細胞の増殖抑制がみられ、512倍希釈、1024倍希釈および2048倍希釈したプラズマ活性液により、T細胞の増殖を活性化させる効果を認めた(図5)。

図2

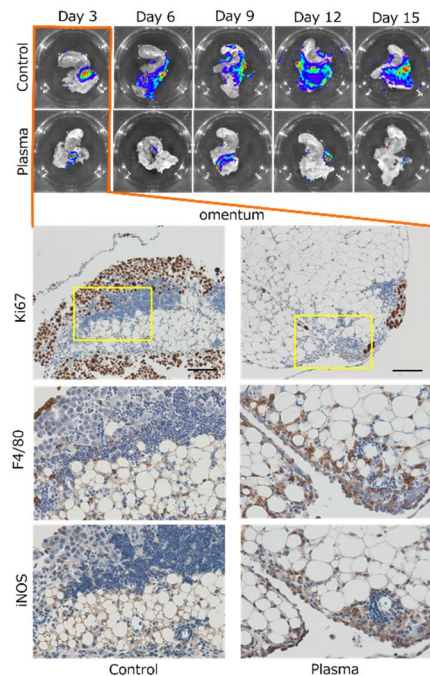


図3

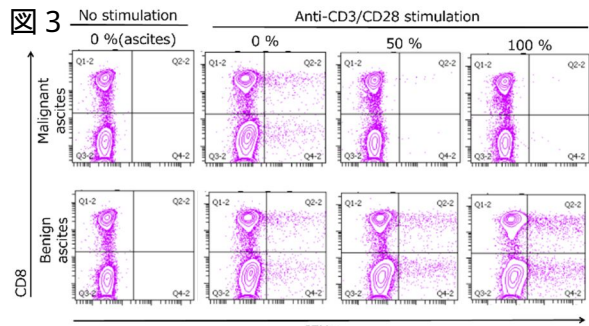


図4

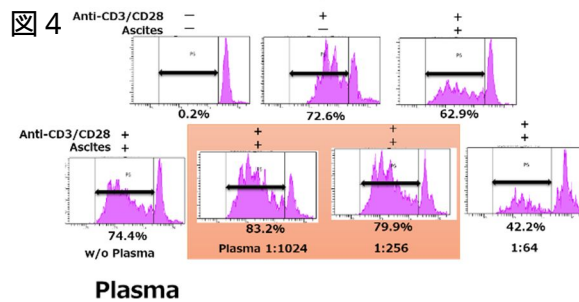
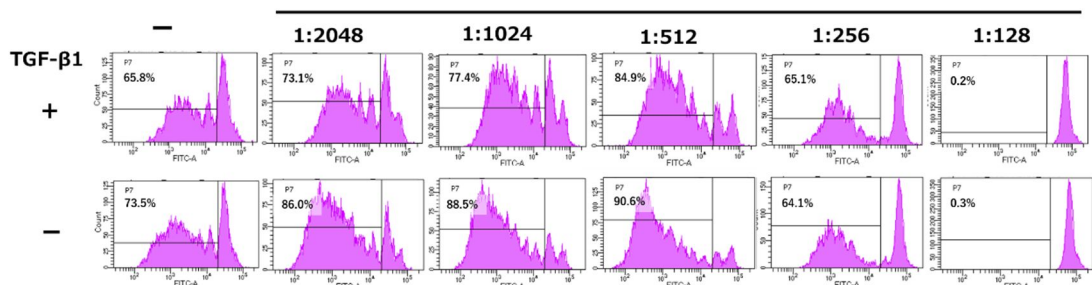


図5



以上の結果より、プラズマ活性液は適切な濃度域において抗腫瘍免疫を増強させる可能性が明らかとなった。特にがん患者の腹膜播種巣のがん微小環境で予想される免疫抑制状態において、腫瘍マクロファージへの分化誘導、細胞傷害性T細胞の活性化と言った、抗腫瘍免疫能を強化する効果が期待できる。

このようなプラズマ活性液の免疫賦活化効果は、現在盛んに開発が進められているCTLやTIL、CAR-T細胞治療の治療効果向上のための複合的な治療法として効果を発揮できると予想され、固形腫瘍治療へのブレイクスルーとなる可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 16件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Toyokuni S, Zheng H, Kong Y, Sato K, Nakamura K, Tanaka H, Okazaki Y.	4. 巻 57
2. 論文標題 Low-temperature plasma as magic wand to differentiate between the good and the evil.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	6. 最初と最後の頁 38-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2023.2190860.	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 Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Miron C, Okazaki Y, Toyokuni S, Nakamura K, Kajiyama H, Hori M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Plasma activated Ringer's lactate solution.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	6. 最初と最後の頁 14-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2023.2182663.	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 Yoshikawa N, Nakamura K, Kajiyama H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Current understanding of plasma-activated solutions for potential cancer therapy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Free Radic Res.	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） 10.1080/10715762.2023.2193308.	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 芳川 修久, 中村 香江, 梶山 広明	4. 巻 40
2. 論文標題 プラズマ活性化溶液を用いた難治性腹膜播種に対する新規治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本婦人科腫瘍学会雑誌	6. 最初と最後の頁 151-158
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 Nakamura Kae, Yoshikawa Nobuhisa, Yoshihara Masato, Ikeda Yoshiki, Higashida Akihiro, Niwa Akihiro, Jindo Takahiro, Tanaka Hiromasa, Ishikawa Kenji, Mizuno Masaaki, Toyokuni Shinya, Hori Masaru, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 17
2. 論文標題 Adjusted multiple gases in the plasma flow induce differential antitumor potentials of plasma activated solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plasma Processes and Polymers	6. 最初と最後の頁 1900259 ~ 1900259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ppap.201900259	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 Nakamura Kae, Yoshikawa Nobuhisa, Mizuno Yuko, Ito Miwa, Tanaka Hiromasa, Mizuno Masaaki, Toyokuni Shinya, Hori Masaru, Kikkawa Fumitaka, Kajiyama Hiroaki	4. 巻 13
2. 論文標題 Preclinical Verification of the Efficacy and Safety of Aqueous Plasma for Ovarian Cancer Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13051141	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16件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 H. Kajiyama, K. Nakamura, H. Tanaka, M. Mizuno, K. Ishikawa, S. Toyokuni, M. Hori
2. 発表標題 The aqueous plasma therapy for ovarian cancer -Aiming for controlling disseminated peritoneal metastasis-
3. 学会等名 9th International Conference on Plasma Medicine (ICPM9) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 K. Nakamura, K. Sugiyama, N. Yoshikawa, M. Yoshihara, T. Matsukawa, H. Tanaka, M. Mizuno, S. Toyokuni, M. Hori and H. Kajiyama.
2. 発表標題 Immunostimulatory Effect of Plasma-Activated Solutions in the Intraperitoneal Environment of Ovarian Cancer.
3. 学会等名 9th International Conference on Plasma Medicine (ICPM9) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakamura K, Mizuno M, Yoshikawa N, Tanaka H, Ebisawa K, Kamei Y, Toyokuni S, Niwa A, Jindo T, Hori M, Kikkawa F, Kajiyama H.
2. 発表標題 Plasma-activated Solution Promotes Wound Healing in Diabetic Mouse via Keratinocytes Activation.
3. 学会等名 8th International Conference on Plasma Medicine. (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微小な腹膜播種に対するプラズマ活性溶液の有効性を前臨床試験にて実証！
<https://www.plasma.nagoya-u.ac.jp/news/post-47.html#000091>

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	田中 宏昌 (Tanaka Hiromasa) (00508129)	名古屋大学・低温プラズマ科学研究センター・教授 (13901)	
研究分担者	芳川 修久 (Yoshikawa Nobuhisa) (60804747)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	

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