

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17944

研究課題名（和文）低温プラズマによる悪性神経膠腫治療の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on the treatment of malignant glioma by air plasma activated medium

研究代表者

落合 祐之（OCHIAI, Yushi）

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：20815469

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：低温プラズマ照射液（APAM）はグリオブラストーマに抗腫瘍効果を示した。APAMによる細胞死は既知の細胞死経路ではなく、鉄依存性を示したがフェロトーシスとも異なっていた。細胞死に先行してミトコンドリアの断片化と傷害された核の一方の極への集積（MPMC）が誘導され、ミトコンドリア内の不安定鉄プール、ヒドロキシラジカル、ならびに過酸化脂質も同様に集積し、これらの変化ならびに細胞死は鉄除去で抑制された。一方、APAMは正常細胞ではMPMCも細胞死も誘発しなかった。以上の結果は、APAMがグリオブラストーマに対してMPMCを介してフェロトーシスとは異なる鉄依存性細胞死を誘発することを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオブラストーマは集学的な治療に関わらず、予後不良な疾患である。本研究ではAPAMがグリオブラストーマを選択的に傷害し、その作用はフェロトーシスとは異なる鉄依存性細胞死であることを明らかにした。さらに、この作用には、MPMCと核傷害が関与することを見出した。グリオブラストーマの治療抵抗性にはアポトーシス耐性が大きく寄与しているため、アポトーシスとは異なる細胞死を強力かつ腫瘍細胞特異的に誘発できるAPAMは、革新的な腫瘍標的型治療ツールとして期待できる。さらに、その細胞死にMPMCならびにミトコンドリア鉄プールが重要であるという発見は、これらが新たな創薬の標的となる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：Air Plasma activated medium (APAM) exhibited a potent anti-tumor effect against glioblastoma by triggering cell death. Robust mitochondrial denaturation and nuclear shrinkage or decomposition were observed in the late stage of cell death. The canonical cell death forms, such as apoptosis, autophagy, and necroptosis played a minor role in cell death. Cell death was iron-dependent but was different from ferroptosis either. Mitochondrial fragmentation and assembly at the one polar of the perinuclear sites (MPMC) proceeded to cell death. Concomitantly, hydroxyl radicals and lipid peroxides accumulated within mitochondria. Also, the mitochondrial labile iron pools were assembled at the perinuclear sites. Removing iron prevented all these events, nuclear damage, and cell death. Finally, APAM minimally affected nonmalignant cell growth. Our findings suggest that APAM induces iron-dependent cell death distinct from ferroptosis in glioblastoma via MPMC.

研究分野：脳神経外科

キーワード：プラズマ ミトコンドリア グリオブラストーマ 鉄 腫瘍標的型治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(グリオブラストーマ、以下 GBM)はグリオーマの中でも最も悪性度が高く(グレード IV)、標準治療による治療は非常に困難で、全生存期間はわずか15か月に留まっており、画期的な治療法が切望されている。その治療抵抗性にはアポトーシス耐性が大きく寄与しているため、異なる細胞死の誘発は GBM 治療における新規なアプローチとなることが期待できる。フェロトーシスは鉄依存性の制御されたネクローシスで、近年がん細胞死における関与が注目されている。低温大気圧プラズマ(Cold atmospheric plasma, CAP)は、室温、大気圧下で作成されるプラズマである。空気で作成した CAP を細胞培養液に照射した空気プラズマ照射液(Air plasma-activated medium, APAM)が、鉄依存性を引き起こして GBM 細胞を傷害することを発見した。さらにこの細胞死には最近われわれが報告した細胞死に関連するミトコンドリアの細胞核辺縁部凝集 Monopolar perinuclear mitochondrial clustering, MPMC)が付随した。

2. 研究の目的

本研究では、APAM が誘発する GBM 細胞死のモードを明らかにし、その分子メカニズムを MPMC の細胞死における役割に焦点を当てて解明し、これらの知見に基づく APAM による GBM 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: GBM 細胞モデルとしてヒト A172, T98G, 他の脳腫瘍モデルとしてアストロサイトーマ U251MG 細胞株を、正常細胞としてヒト皮膚線維芽細胞 HDF ならびにヒト肺線維芽細胞 WI-38 をそれぞれ用いた。細胞は、10%ウシ胎児血清(GIBCO、Life Technologies) 100U/ml Penicillin、100 µg/ml Streptomycin を含むダルベッコ培地(DMEM、GIBCO、Life Technologies)中で 37 °C で 95% 空気、5%CO₂ 下に培養した。**APAM 作製:** CAP を piezo素子を搭載したプラズマジェット (PiezobrushPZ2、Relyon、ドイツ)で周囲の空気から作成した。APAM は、この CAP を液面 20 mm からフェノールレッド不含 DMEM 1 mL あたりに 1 分照射して調製した。**APAM 中の酸化物の測定:** H₂O₂ 濃度は Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (ThermoFisher Scientific) で NO₂⁻/NO₃⁻濃度は、Griess assay Kit (NO₂/NO₃ Assay Kit C11, Colorimetric Kit, Dojindo) でそれぞれ測定した。H₂O₂ ならびに NO₂⁻/NO₃⁻濃度は、標準の H₂O₂ および NaNO₂/NaNO₃ による検量線を用いて、算出した。**細胞増殖の測定:** WST-8 アッセイで測定した。**細胞死モードおよび細胞膜統合性の解析:** 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。**生細胞イメージング:** ミトコンドリア、細胞内活性酸素(ROS)、一酸化窒素(NO)ならびに過酸化脂質の動態は、すべて生細胞イメージングで解析した。ミトコンドリア動態は、薬剤処理した細胞を洗浄後、ミトコンドリアを MitoTracker Red または Green (MTR/MTG)でそれぞれ染色し、核はヘキスト 33342 で対比染色した。ROS はそれぞれの化学種に特異的なプローブを用いて検出した。細胞内不安定鉄プール(labile iron pool, LIP)ならびにミトコンドリア LIP はそれぞれ FerroOrange (Dojindo)と MitoFerroGreen (MTFG、五稜化薬)で検出した。試料は生物顕微鏡 BZ X-700 (キーエンス)で TRITC、GFP および DAPI フィルターを用いて、4、40 倍レンズまたは 100 倍油浸レンズで観察し BZ-H3A ソフトウェアで解析した。**Caspase 活性化解析:** アポトーシスの指標である、Caspase-3 活性化を評価するために、切断型 Caspase-3 の増加ならびに完全長 Caspase-9 の減少をそれぞれの分子に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。**統計:** 実験は 3 回以上行い、データは平均値 ± 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

本研究の結果、APAM は濃度依存的に GBM およびアストロサイトーマ細胞の増殖を抑制し、細胞核を破壊して細胞死を誘発することが示された。それに対して 10 µM までの Cisplatin(CDDP) ならびに 30 µM までの Temozolomide (TMZ)はこれらの細胞の増殖をほとんど抑制できなかった。一方、APAM は正常線維芽細胞の増殖や生存にはほとんど影響せず、高い腫瘍細胞選択性を示した。細胞死モード、細胞膜統合性、およびウエスタンブロッティングによるカスパーゼの解析の結果、この細胞死は、アポトーシスによるものではなく主にネクローシスによることが示された。これらの発見は、APAM が薬剤抵抗性 GBM 細胞にも有効かつ安全な抗がん剤となる可能性を示している。

APAM による GBM 細胞死は、抗酸化剤ならびに鉄キレート剤で抑制される点がフェロトーシスと類似していた。そこで次に細胞死がフェロトーシスであるかどうかを検討した。フェロトーシスを起こした細胞の形態学的特徴は細胞質の抜けた風船型球状細胞の出現であるが、APAM 処理により同様の形状の細胞が増加した。フェロトーシスでは核の形態には変化がないとされてい

るのに対して APAM 処理により、明らかな核縮小と分解が認められた。もう一つの特徴は、ミトコンドリア形態の変化で、電子顕微鏡でミトコンドリアの体積減少、密度増加、外膜崩壊、およびクリステの消失が観察される。われわれは、APAM 処理によって、ミトコンドリア形態だけではなく細胞内分布に特徴的な変化が起きることを発見した。ミトコンドリア形態変化は刺激の強度、持続時間に応じて融合、分裂から断片化、膨化、ならびにクラスター形成と段階的に起こる。同時にミトコンドリアは核の両方または周囲から核の一方の辺縁部に分布を変化させる。この細胞内分布は細胞死に関連し、またこれまで報告されている細胞保護的なミトコンドリアの細胞内分布とは異なることからこれを MPMC と命名した (Suzuki-Karasaki M et al., *Int J Mol Sci* 2022)。MPMC には ROS と微小管を介するミトコンドリアの移動が関与する。GBM 細胞において CDDP や TMZ は MPMC を起こさず、また APAM は正常細胞では MPMC を誘導しなかったことから MPMC は GBM 細胞死と相関することが確認された。APAM 細胞死とフェロトーシスの異同をさらに調べるためにシスチントランスポーターに作用して典型的なフェロトーシスを誘発する Erastin と APAM の作用を比較した。Erastin は、APAM 同様に GBM 細胞の増殖抑制と細胞死を誘発し、その作用はフェロトーシス阻害剤 Ferrostatin-1 (Fer-1) および鉄キレート剤により抑制された。また、Erastin は細胞内過酸化脂質 (LPOs) を増加させた。以上の結果から Erastin は GBM 細胞においてフェロトーシスを誘発することが確認された。APAM も LPOs を増加させたが、Fer-1 は APAM の効果を抑制しなかった。さらに、APAM とは異なり、Erastin は MPMC を起こさなかった。これらの結果は、APAM による細胞死は典型的なフェロトーシスとは異なり、MPMC がこのフェロトーシス様細胞死に特異的に関与することを示している。この細胞死では Fer-1 の標的とされている脂質ラジカル種とは別のラジカル種生成による別経路で LPOs が産生されると考えられる。

これまで骨肉腫および口腔癌細胞で MPMC は ROS と微小管を介して誘発されることを示した (Suzuki-Karasaki M et al., *Int J Mol Sci* 2022) が、GBM 細胞でも同様のメカニズムによることが確認された。APAM 中には $10\ \mu\text{M}$ 程度の過酸化水素 (H_2O_2) が検出され、また細胞内の H_2O_2 ならびに、ミトコンドリア内スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、脂質ラジカルを増加させる。そこで、 H_2O_2 の消去酵素であるカタラーゼの作用を調べたところ、カタラーゼは MPMC ならびに APAM 毒性を抑制することから H_2O_2 が MPMC のメディエーターとなることがわかった。MPMC に必要な微小管リモデリングもカタラーゼで抑制され、 H_2O_2 を介することが示唆されたがそのメカニズムは現在のところ不明である。

プラズマ照射液 (Plasma-treated liquids, PTLs) の抗がん作用のメディエーターの一つとして亜硝酸イオンが考えられている。その理由は、一部の PTL 中に亜硝酸イオン (NO_2^-) が検出され、 H_2O_2 と NO_2^- の併用投与が相乗的に細胞死を増加させるためである。APAM 中には数百 μM レベルの NO_2^- が検出された。 NO_2^- はそれ自身毒性を示さず、それによりミトコンドリアは分裂せずむしろ融合した。一方、 H_2O_2 はミトコンドリアを分裂させた。MPMC ではミトコンドリアは分裂だけではなく、核辺縁部でのクラスター形成 (凝集) が必要であるので、 H_2O_2 と NO_2^- の併用はこれらの相反するミトコンドリア形態変化を共同して誘導する可能性が考えられた。そこで、両者を併用投与するとミトコンドリアの分裂と凝集が認められたが、その形態は APAM の低濃度処理に類似し、高濃度の APAM による MPMC とは同一ではなかった。これらの結果は、強い MPMC の誘発には他のメディエーターが関与することを示唆する。

MPMC の初発反応であるミトコンドリアの分裂は、GTPase 活性を持つ Dynamin-related protein1 (Drp1) の Ser616 のリン酸化で調節され、 H_2O_2 がこのリン酸化を増加させることを以前に報告している (Saito et al., *Oncotarget* 2016)。PTL によるミトコンドリアの分裂は Ser616 のリン酸化を伴うが Drp1 の活性抑制または発現減少によって抑制されないことから分裂メカニズムは Drp1 非依存性と考えられた。この仕組みはまだ明らかではないが、Drp1 を介する生理的な分裂は可逆的であるが、APAM によるそれは非可逆的であることから、異なるメカニズムによることが十分考えられる。その候補としてはミトファジーがある。ミトファジーはミトコンドリア膜電位喪失が引き金となることが知られているが、APAM はこれを強く起こす。予備実験では、APAM によるミトファジーの促進が観察されており、今後さらにこの可能性を追求したい。

本研究のもう一つの成果として APAM が細胞内一酸化窒素 (NO) を増加させることを発見した。興味深いことに、NO はミトコンドリア内に増加した。NO の選択的除去は MPMC ならびに細胞死を抑制した。一方、NO 供与剤はミトコンドリア内 NO を増加させ、MPMC と細胞死を促進した。APAM と NO 供与剤を併用投与すると強い MPMC が誘発され、細胞死が相乗的に増加した。NO は通常 NO 合成酵素 (NOS) によって産生される。NOS には神経型 nNOS、内皮細胞型 eNOS、ならびに誘導型 iNOS の 3 つのアイソタイプの他に iNOS と免疫学的に類似するミトコンドリア内 NOS (mtNOS) の存在が考えられている、さらに、mtNOS の発現と活性化が低酸素で増加することが示されている (Valdez et al., *Mol Aspects Med* 2004)。APAM はがん細胞の低酸素環境維持に関与するミトコンドリアの分布を変調させることから、低酸素シグナリングとそれによる細胞生存維持を喪失させると考えられる (現在検討中)。APAM の標的となる NOS およびミトコンドリア内 NO を変調

させる仕組みについて現在さらに解析を進めている。

さらに、この発見は将来の臨床応用において予測される APAM 抵抗性細胞の出現に対する有効な方策を提示している。APAM 感受性は GBM 細胞の増殖状態によって異なっており、患者間ではこの差がさらに大きいと考えられる。NO 供与剤の併用により APAM の有効性を高め、また使用濃度の減少により有害事象を抑制することができるので、治療効果を増大させることができる。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、NO 供与剤のアジュバント作用を動物移植腫瘍でも確認し、将来の臨床応用のための基盤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 Suzuki-Karasaki Manami, Ando Takashi, Ochiai Yushi, Kawahara Kenta, Suzuki-Karasaki Miki, Nakayama Hideki, Suzuki-Karasaki Yoshihiro | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Air Plasma-Activated Medium Evokes a Death-Associated Perinuclear Mitochondrial Clustering | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 1124 ~ 1124 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23031124 | 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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 落合祐之 |
| 2. 発表標題 低温大気圧空気プラズマ照射液はフェルトーシス/オキシトーシス様細胞死を誘発してグリオブラストーマを傷害する |
| 3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木真奈美 |
| 2. 発表標題 低温大気圧プラズマはミトコンドリア内細胞分布を変化させて口腔癌に細胞死を誘発する |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|