

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K03524

研究課題名（和文）大気圧プラズマによる抗腫瘍効果と免疫賦活化を利用した新規口腔がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel oral cancer therapy utilizing the anti-tumor effect and immune activation by atmospheric pressure plasma.

研究代表者

山下 佳雄（Yamashita, Yoshio）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：50322300

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）：口腔癌治療には手術、放射線治療、化学療法が主流であるが、さまざまな問題点を抱えている。特に超高齢社会となった現代では、さまざまな既往をもつ患者が多く、治療に難渋する。安全でかつ効果的な新規の口腔癌治療法を開発することを目的に、本研究は行われた。大気圧プラズマを活用することにより、口腔癌細胞株への抗腫瘍効果が得られることが確認された。一方で、正常細胞への侵襲は限りなく抑えることも確認できた。また免疫系細胞へ一定の条件下で大気圧プラズマを照射することで免疫機能が賦活化することも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から、大気圧プラズマが口腔癌治療として活用できることが示唆された。つまり、抗腫瘍効果を維持したまま、従来の治療法で問題となる皮膚炎や口内炎といった副作用の出現が少ない治療法となり得る。高齢者や様々な既往症をもった患者など幅広い適応を有する新規の治療法になると考える。また一方で、大気圧プラズマによって免疫系細胞の賦活化も確認されたことから、照射によって周囲に浸潤している免疫系細胞にも影響を及ぼすことで、自己の抗癌作用の向上も期待できる。この治療法が確立されれば、口腔癌治療に大きく貢献できると確信する。

研究成果の概要（英文）：Surgery, radiotherapy, and chemotherapy are the mainstays of oral cancer treatment, but they present various problems. Especially in today's hyper-aged society, many patients have various pre-existing conditions that make treatment difficult. The purpose of this study was to develop a new, safe and effective oral cancer treatment. By utilizing atmospheric pressure plasma, it was confirmed that an antitumor effect on oral cancer cell lines could be obtained. On the other hand, it was also confirmed that invasion of normal cells is minimized. It was also found that irradiation of immune system cells with atmospheric plasma under certain conditions can activate immune functions.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：顎顔面外科

キーワード：大気圧プラズマ 口腔がん 免疫

1. 研究開始当初の背景

プラズマは物質の「第4の状態」と言われており、気体にさらに高エネルギーを与え、電子と中性子が一定の軌道周回ができなくなり、電子が分離した状態を呼ぶ。自然界における稲妻やオーロラはプラズマによって発生する現象である。工業界での応用はさまざま、蛍光灯をはじめ脱臭などにも応用されている。医療分野においても、すでにいくつかの応用がなされている。滅菌機器への応用がなされており臨床の現場で用いられている。また、歯科界においてはデンタルインプラントのチタン表面にプラズマを照射することで、表面の濡れが高まり血液や組織への浸透性が向上することが知られている。この親水性が上がる性質を利用して実際の臨床にも応用されている。また骨芽細胞の骨造成能が上がるとの報告もある。一方で、癌関連のプラズマの研究は多くはなく、まだ一部の癌腫にて基礎研究が行われているのが現状である。子宮頸癌細胞へ Ar プラズマ照射した溶液を注入すると細胞死を誘導することが報告されており、動物実験においても同様の結果が報告されている。しかし、その他の癌腫における研究は少ない。

2. 研究の目的

口腔癌の治療は外科手術、放射線療法、化学療法が一般的であるが、各治療法において合併症や副作用など問題を抱えている。放射線を用いた根治治療においては重度の口腔粘膜炎や照射部位の皮膚炎のため、根治的な治療を完遂できない症例も多い。特に近年の高齢化に伴い口腔癌を患った高齢者が増加しており、低侵襲で安全な治療が求められている。つまり抗癌効果は高く、かつ安全性の高い新規治療法が求められている。過去にわれわれは口腔癌細胞株に大気圧プラズマを直接的に照射すると、感受性の差異はあるものの、すべての細胞株において細胞死が誘導されることを報告した。一方で正常細胞においてはプラズマ照射に抵抗性があることも明らかにした。これらの結果から、口腔癌の新規治療法としてプラズマが有用であることが示唆された。

今回、大気圧プラズマの抗腫瘍効果をさらに向上させるために、間歇的、複数回プラズマ照射あるいは抗がん剤との併用効果を検討した。さらに免疫系細胞への影響に関しても検討を行った。

さらに近年、腫瘍免疫が注目されているが、自身の免疫力による抗腫瘍効果を期待する戦略である。我々の予備研究において大気圧プラズマ照射によって免疫系細胞が賦活化される可能性が示唆された。よって今回、個々の免疫系細胞(B細胞、T細胞、NK細胞など)が、プラズマ照射によって、どのような反応を示すのか詳細な検討を行うこととした。

3. 研究の方法

- 1) 口腔癌以外で他臓器由来のヒト癌細胞株に対して大気圧プラズマの影響を検証し、特異性の有無を解析する。
- 2) 口腔癌を移植した動物での癌組織に対する大気圧プラズマの効果を検証する。
- 3) 正常細胞株、正常組織への大気圧プラズマの影響を解析し安全性を検証する。
- 4) 抗癌剤・分子標的薬との併用による治療効果を *in vitro*, *in vivo* 両方にて

評価する。

5) 大気圧プラズマによる癌細胞内のシグナル伝達のメカニズムを生化学的に解析する。特にアポトーシス関連分子に着眼する。

6) T・B・NK 細胞由来の細胞株への大気圧プラズマ照射における、影響について検討する。

4. 研究成果

われわれの結果からプラズマ照射時間に依存的に口腔癌細胞は細胞死を引き起こすのに対して、正常細胞は抵抗性を示すことが判明した。正常細胞と癌細胞とのプラズマの反応が異なる理由はまだ明らかにはなっていない。プラズマにより細胞壁に障害が生じている可能性が強く、癌細胞の細胞壁がより障害を受けやすいのではないかと推測する。正常細胞もプラズマによる細胞壁障害は起こっているものの、修復機構がより働き細胞死に至らないと考えている。ただし正常細胞であってもプラズマの照射量を高くしたり、照射時間を延ばすことで正常細胞への影響も著しく現れることが確認されている。臨床的には、正常細胞における可逆的な至適線量を見極めなくてはならない。

また同じ口腔癌細胞株であってもプラズマの感受性が異なっていた。この感受性の違いが細胞株を樹立した部位や組織型の違いによるものか、あるいは細胞内のシグナル伝達に違いがあるのかは今後、検討しなくてはならない。

プラズマの抗癌作用を高めるために、化学療法との併用を検討した。口腔癌の標準治療として用いられている白金系プラチナ製剤としてのシスプラチンで検討を行った。正常細胞もシスプラチン濃度依存性に細胞死が起こるため、正常細胞への影響が低い濃度での検討を行った。シスプラチン感受性の高い HSC 3 細胞においては、プラズマとの併用において、相乗的ではなく、相加的な抗腫瘍効果が確認された。一方、シスプラチン耐性の細胞株 HSC2 に対しては、プラズマによる障害を与えた後に、シスプラチンを投与することでさらなる抗癌作用を期待できる。抗癌剤を先に投与した後にプラズマを照射する系であっても、ほぼ同様の結果を得た。抗癌剤に耐性を示す癌細胞に対して、抗腫瘍効果を上げるための戦略として期待ができる。分子標的薬との併用に関しては、予想された基礎実験がワークせず、いまだ結果を得ることができていない。継続検討とする。

近年、腫瘍免疫が注目を浴びている。実際に、腫瘍免疫を利用した癌治療も臨床応用されている。今回のわれわれの結果から、T 細胞、B 細胞、NK 細胞いずれにおいても大気圧プラズマ照射によって賦活化されることが判明した。現象としては、一定量までは賦活化されるが、その定量を少しでも越えると、むしろ腫瘍細胞同様に細胞死に導かれる。照射条件は非常に厳密であり、再現性を得ることが難しいことも判明した。実験環境に左右されやすいため、湿度や温度に依存するのではないかと推測している。今回は細胞株での結果であるため、今後、ヒトから採取した新鮮リンパ球による実験を計画している。

以上の結果から、腫瘍細胞への抗腫瘍効果を出しつつ、免疫細胞へは賦活化を誘導できる適切な照射量・時間を導き出さなくてはならない。

プラズマは放射線装置と異なり、遮壁など特別な施設や装置を必要としない。つまり一般的な放射線治療時に必要となる RI 治療棟のような施設がなくとも、外来や診療所でも可能な治療となる。特に RI 発生装置は非常に高額であるが、プラズマ発生装置は小型で安価に作製が可能である。さらにプラズマの産生に大気圧を使用していることから治療

におけるランニングコストも非常に安価と予想される。しかしプラズマの産生においてはオゾンが産生されるため、長時間の照射は人体への影響が懸念される。発生する活性酸素の処理は的確な対処が必要となる。

参考文献

- 1 . Ono R., Ohtsubo T., Hayashi N., Aijima R., Yamashita Y., Goto M.
Inactivation of oral cancer cell using active species generated by atmospheric plasma.
J Photopolym Sci Technol Vol.29 (3): 443-445. 2016.
- 2 . Mine K., Miyamaru Y., Hayashi N., Aijima R., Yamashita Y.
Mechanism of inactivation of Oral cancer cells irradiated by active oxygen species from DBD plasma. Plasma Medicine Vol.7 (3): 201-213. 2017.
- 3 . Hayashi N, Miyamura Y, Aijima R, Yamashita Y.
Activation of p53-mediated apoptosis pathway in HSC3 cancer cell irradiated by atmospheric DBD oxygen plasma.
IEEE Transactions on Plasma Science Vol.47 (2): 1093-1099. 2019.
4. Iwamoto S, Nishiyama M, Kawasaki M, Morito S, Sakumoto T, Toda S, Yamashita Y., Aoki S.
Oral-specific microenvironments regulate cell behavior and anticancer drug sensitivity of tongue squamous cell carcinoma. Human Cell. 2023;
5. 中野 陸、林 信哉、合島怜央奈、山下佳雄、小林 明
「低圧酸素プラズマの照射による植物種子の遺伝子発現効果」
プラズマ応用科学 Vol.26 (2):91-95, 2021年

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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamakawa N, Umeda M, Yoshii Y, Mitsudo K, Noguchi M, Kusakawa J, et al.	4. 巻 30(2)
2. 論文標題 Multicenter retrospective study of nivolumab for recurrent/metastatic oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 247-258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.14471.	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 Iwamoto S, Nishiyama M, Kawasaki M, Morito S, Sakumoto T, Toda S, Yamashita Y, Aoki S.	4. 巻 36 (2)
2. 論文標題 Oral-specific microenvironments regulate cell behavior and anticancer drug sensitivity of tongue squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 643-656
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-00866-x. Epub 2023 Jan 30.	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 Furuno T, Sogawa R, Hashimoto T, Matsuo S, Shirahama W, Kamura T, Hosoya K, Senjyu Y, Yamashita Y, Inoue T, Yamauchi M, Katsuya H, Noguchi M, Sueoka-Aragane N, Shimanoe C.	4. 巻 47 (2)
2. 論文標題 Association between the prognostic nutritional index and the occurrence of immune-related adverse events.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 361-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b23-00760.	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 Danjo A, Aijima R, Yoshimoto R, Tanaka S, Iwamoto S, Katsuki T, Aoki S, Kido M, Yamashita Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 An ultrasonic osteotomy device enhanced post-osteotomy bone healing beyond that with a conventional rotary device in a rat calvaria model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Oral Maxillofac Surg Pathol	6. 最初と最後の頁 243-251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajoms.2021.10.002	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshio Yamashita
2. 発表標題 Implant Prosthetic Treatment for Reconstructed Jawbones Using Dynamic 3D Navigation System
3. 学会等名 9th World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO 2023 (招待講演) (国際学会))
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武藤 玲於奈, 林 信哉, 野田 稔, 山下 佳雄, 佐野 真那理, 青木 誠, 森田 貴之
2. 発表標題 誘電体バリア放電プラズマにより生成される活性酸素種を用いた長尺細管内滅菌 特性
3. 学会等名 医療機器学
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 桐田 忠昭、原田 浩之	4. 発行年 2023年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 724
3. 書名 口腔癌	

〔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
研究分担者	合島 怜央奈 (Aijima Reona) (30756143)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	

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1件

国際研究集会 9th World Congress of the International Academy of Oral Oncology (IAOO 2023)	開催年 2023年～2023年
--	--------------------

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