

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870307

研究課題名（和文）プラズマによるがん培養細胞の細胞死の細胞内分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidating the intracellular molecular mechanisms of cell death of cancer cells by atmospheric pressure plasma

研究代表者

田中 宏昌（Tanaka, Hiromasa）

名古屋大学・未来社会創造機構・講師

研究者番号：00508129

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：超高電子密度大気圧プラズマを照射した培養液が脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導することを発見し、この培養液を「プラズマ活性培養液」と名付けた。プラズマ活性培養液が脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導する細胞内分子機構として、生存・増殖シグナリングネットワークを抑制すること、またプラズマ活性培養液が細胞内に活性酸素種（ROS）を上昇させることが関与していることを明らかにした。プラズマ活性溶液の成果はプラズマ医療科学の分野に大きな波及効果をもたらし、研究期間全体を通じて、プラズマ活性溶液に関する10件の論文公表と7件の特許出願を行った。

研究成果の概要（英文）：We found that plasma-irradiated medium induced apoptosis on glioblastoma brain tumor cells, and termed this medium plasma-activated medium (PAM). PAM down-regulated activities of signaling molecules in the survival and proliferation signaling network and induced reactive oxygen species (ROS) on glioblastoma to induce apoptosis. The PAM projects have brought us many collaborative works that include collaborations with departments of Obstetrics and gynecology, Gastrointestinal surgery for treatments of peritoneal dissemination of ovarian cancers and gastric cancers, and Ophthalmology for treatments of age-related macular degeneration. We have published 10 papers and applied for 9 patents.

研究分野：プラズマ医療

キーワード：プラズマがん治療

1. 研究開始当初の背景

近年、非平衡大気圧プラズマの医療応用が大きな注目を集めている。申請者らはプラズマ密度が従来の約100倍高く生成される独自に開発された非平衡大気圧プラズマ源を用いて卵巣がん培養細胞にアポトーシスを誘導することに成功した(図1、Iseki et al., 2012)。

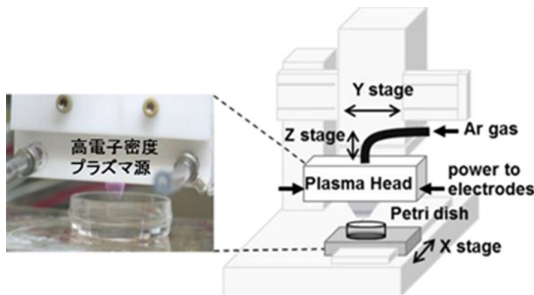


図1: 医療研究用超高電子密度大気圧プラズマ発生装置

更に線維芽細胞などの正常細胞にはほとんど影響を与えることなく、卵巣がん細胞を選択的に殺傷できる条件範囲を見出すことにより、非平衡大気圧プラズマを用いた卵巣がん細胞の選択的殺傷治療への可能性を示した。

更に申請者らは、プラズマをがん細胞に直接照射することなく培養液に照射することにより、プラズマ照射された培養液が抗腫瘍効果を発揮することに注目し、現時点で有効な治療法に乏しい難治病の悪性脳腫瘍グリオブラストーマ培養細胞をプラズマ培養液を用いてアポトーシスを誘導することに成功した(Tanaka et al., 2013)。また、グリオブラストーマに対する正常細胞アストロサイト培養細胞にはほとんど影響を与えることなく、グリオブラストーマを選択的に殺傷できることを示した。これまでの研究でプラズマががん細胞にアポトーシスを誘導することは分かったが、その細胞内分子機構はほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、プラズマを用いたがん治療に向けて、非平衡大気圧プラズマあるいは非平衡大気圧プラズマを照射した溶液ががん細胞及び正常細胞の細胞内シグナル伝達に与える影響を分子細胞生物学的手法を用いて明らかにし、細胞によるプラズマに対する感受性の違い(例えば我々はプラズマが正常細胞には影響を与えずにがん細胞を選択的に死滅することができることを見出している)を説明する細胞内分子機構を明らかにすることを主要な目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではグリオブラストーマ培養細胞にプラズマを直接あるいはプラズマ照射液を投与することにより、がん細胞に影響を与える細胞内分子をウェスタンブロット法(タン

パク質発現レベルで)リアルタイムPCR法(遺伝子発現レベルで)や免疫蛍光染色法(細胞内分子の細胞内局在の変化などを調べること)により明らかにする。特に生存・増殖に重要でがん化と深い関わりのあるPI3K-AKTシグナル伝達経路やRas-MAPKシグナル伝達経路を中心にプラズマが脳腫瘍培養細胞グリオブラストーマにおいてアポトーシスをもたらす細胞内分子機構を明らかにする。更に、cDNAマイクロアレイを用いてゲノムワイドにプラズマが影響を与える遺伝子群を探索する。更にはプラズマに対する細胞の種類による感受性の違いをRNAi法(遺伝子機能欠失に基づく解析)や遺伝子導入法(遺伝子機能獲得に基づく解析)を用いて明らかにする。

プラズマが影響を与える細胞内分子を複数種類のヒト脳腫瘍細胞株(U251SP株、U87MG株など)及び正常細胞株(アストロサイト初代培養株など)を用いて解明する。特にPI3K-AKTシグナル伝達経路のAKTの上流や下流で様々な細胞内分子が相互作用し増殖・生存を制御していることが知られているがそれらの分子がプラズマによりどのような影響を受けるのかをウェスタンブロット法、リアルタイムPCR法、や免疫蛍光染色法などを用いて明らかにする。

4. 研究成果

(1) U251SP脳腫瘍培養細胞株ではEGFR遺伝子の突然変異やPTEN遺伝子の突然変異によりPI3K-AKTシグナル伝達経路やRAS-MAPKシグナル伝達経路が恒常的に活性化されており、そのことで、アポトーシスが抑制され異常な増殖が起こると考えられている。

本研究により、プラズマ活性溶液(PAM)

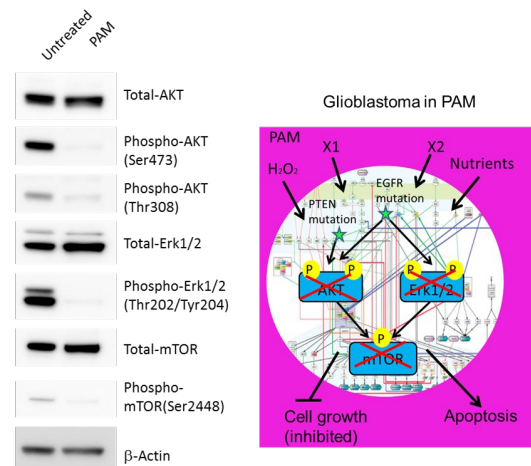


図2: プラズマ活性溶液は脳腫瘍培養細胞の生存・増殖シグナリングを抑制することによりアポトーシスを誘導する。

は脳腫瘍培養細胞に対して、PI3K-AKTシグナル伝達経路やRAS-MAPKシグナル伝達経路の活性化を抑制することが分かった。すなわち、PAMはこれらの生存・増殖シグナリングネットワークを抑制することにより脳腫瘍培養細胞にアポトーシスを誘導するという細胞

内分子機構モデルを構築した(図2、Tanaka et al., 2014)。

(2) 更に、プラズマ活性溶液の成果はプラズマ医療科学の分野に大きな波及効果をもたらした。本研究成果をまとめた論文は投稿雑誌内でダウンロード数が世界一を記録した。プラズマ活性溶液の成果を国際会議で8件、国内会議で2件発表した上に、国内外で7件の招待講演を行い、広く普及活動に努めた。これらの成果が世界で認められ、第2回プラズマがん治療国際ワークショップ IWPCT-2 (The second International Workshop on Plasma and Cancer Treatment)が名古屋大学で堀勝教授をchairとして開催されるに至った(図3)。



図3: 第2回プラズマがん治療国際ワークショップ (The 2<sup>nd</sup> International Workshop on Plasma for Cancer Treatment)

(3) またプラズマ活性溶液を用いた共同研究が活発に行われ、10件の論文公表と7件の特許出願の成果に結びついた。例えば、産婦人科との共同研究によりプラズマ活性溶液は抗癌剤耐性卵巣がん細胞に対しても効果があることを in vitro 及び in vivo の実験により示した(Utsumi et al., 2013)。更にはプラズマ活性溶液に関する成果を review としてまとめた(Tanaka et al., 2014)。

#### <引用文献>

Sachiko. Iseki, Kae Nakamura, Moe Hayashi, Hiromasa Tanaka, Hiroki Kondo, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Fumitaka Kikkawa, Masaru

Hori, Selective killing of ovarian cancer cells through induction of apoptosis by nonequilibrium atmospheric pressure plasma, Applied Physics Letters 100: 113702, 2012

Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Kae Nakamura, Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Hiroki Kondo, Hiroyuki Kano, Masaru Hori, Fumitaka Kikkawa, Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells In Vitro and In Vivo, PLOS ONE 8(12): e81576, 2013

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Kae Nakamura, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Fumitaka Kikkawa, Masaru Hori, Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase, Plasma Medicine, 査読有, Vol.1, No.3-4, 2013, pp265-277, DOI: 10.1615/PlasmaMed.2012006275

Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Kae Nakamura, Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Shoichi Maruyama, Fumitaka Kikkawa, Masaru Hori, Cell survival and proliferation signaling pathways are downregulated by plasma-activated medium in glioblastoma brain tumor cells, Plasma Medicine, 査読有, Vol.2, No.4, 2014, pp207-220, DOI: 10.1615/PlasmaMed.2013008267

Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Keigo Takeda, Kae Nakamura, Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Yasumasa Okazaki, Shinnya Toyokuni, Shoichi Maruyama, Fumitaka Kikkawa, and Masaru Hori, Plasma Medical Science for Cancer Therapy: Toward Cancer Therapy Using Nonthermal Atmospheric Pressure Plasma, IEEE TRANSACTIONS ON PLASMA SCIENCE, 査読有, Vol. 42, No. 12, 2014, pp3760-3764, DOI: 10.1109/TPS.2014.2353659

〔学会発表〕(計 17 件)

Hiromasa Tanaka (Invited), Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Keigo Takeda, Kae Nakamura, Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Yasumasa Okazaki, Shinya Toyokuni, Shoichi Maruyama, Fumitaka Kikkawa, Masaru Hori, INTRACELLULAR MOLECULAR MECHANISMS OF APOPTOSIS IN CANCER CELLS BY PLASMA-ACTIVATED MEDIUM, The 1<sup>st</sup> International Workshop on Plasma for Cancer Treatment, Washington D.C., USA, Mar. 25-26, 2014

田中 宏昌 (招待講演)、水野 正明、豊國 伸哉、丸山 彰一、小寺 泰弘、吉川 史隆、堀 勝、気圧プラズマを用いたがん研究に向けた基礎研究、第 26 回腎とフリーラジカル研究会、2014 年 9 月 20 日、名古屋

Hiromasa Tanaka, Masaaki Mizuno, Kenji Ishikawa, Keigo Takeda, Kae Nakamura, Fumi Utsumi, Hiroaki Kajiyama, Hiroyuki Kano, Yasumasa Okazaki, Shinya Toyokuni, Shoichi Maruyama, Fumitaka Kikkawa, Masaru Hori, Signaling circuits that are affected by plasma-activated medium in brain tumor cells, 5<sup>th</sup> International Conference on Plasma Medicine, Nara, Japan, May. 18-23, 2014

〔産業財産権〕

出願状況 (計 7 件)

名称：抗腫瘍水溶液および抗癌剤とそれらの製造方法

発明者：堀 勝、水野 正明、吉川 史隆、梶山 広明、中村 香江、内海 史、石川 健治、竹田 圭吾、田中 宏昌、加納 浩之  
権利者：名古屋大学

種類：特許

番号：2014-122088

出願年月日：2014 年 6 月 13 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 宏昌 (Tanaka, Hiromasa)

名古屋大学・未来社会創造機構・特任講師

研究者番号：00508129

(2) 連携研究者

石川 健治 (Ishikawa, Kenji)

名古屋大学・プラズマナノ工学研究センター・特任教授

研究者番号：60417384

中村 香江 (Nakamura, Kae)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：10744047