

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：23701  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2014～2016  
課題番号：26460630  
研究課題名(和文) プラズマ刺激を感知する細胞機構の解明 プラズマ医療の推進に向けた分子基盤の確立  
  
研究課題名(英文) Molecular mechanism of cellular responses to non-thermal plasma irradiation  
  
研究代表者  
原 宏和 (Hara, Hirokazu)  
  
岐阜薬科大学・薬学部・准教授  
  
研究者番号：30305495  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：低温大気圧プラズマ(NTP)を利用した「プラズマ医療」は新しい医療分野として期待されている。NTP照射によりがん細胞が選択的に死滅することから、NTPは新しいがん治療法として特に注目されている。本研究を実施し、NTPにより惹起される細胞死では細胞内の亜鉛ストアから遊離した亜鉛が細胞死に関与すること、この遊離亜鉛量の違いがNTPに対する細胞の感受性に影響を及ぼしていることを明らかにした。本研究成果は、NTPを利用するがん治療において有益な情報になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：There is growing evidence that non-thermal plasma (NTP) irradiation has a broad array of biological effects. Since NTP irradiation has been reported to selectively damage cancer cells, its application is believed to be useful for cancer therapy. The indirect NTP irradiation method using plasma-activated medium (PAM) is equally as effective to kill cancer cells as the direct NTP irradiation method. The anti-cancer effects of PAM have been shown to be attributed to reactive oxygen species (ROS) within it. Oxidative stress caused by ROS induces the liberation of zinc (Zn) from intracellular Zn stores and Zn-dependent cell death. Therefore, Zn is thought to function as a second messenger activated by oxidative stress. In this study, we have demonstrated that Zn released from intracellular sources serves as a key mediator of PAM-induced cell death. Our findings suggest that the conversion of PAM stimulus to a Zn signal is a critical step in the PAM-induced cell death process.

研究分野：病態生化学

キーワード：大気圧プラズマ 酸化ストレス 細胞死 がん 亜鉛

## 1. 研究開始当初の背景

プラズマはラジカル、イオン、電子、光など活性粒子の集合体である。近年、プラズマを大気圧下で生成することが可能になり、この大気圧プラズマを利用した「プラズマ医療」は新しい医療分野として注目されている。プラズマ照射による外科手術時の止血や創傷処理など、実際に臨床現場においてその有効性が報告されている領域もある。また、*in vitro* および *in vivo* の実験系においてプラズマ照射ががん細胞にアポトーシスを誘導すること、火傷などの皮膚創傷治癒を促進することなどの研究成果も報告され、今後の発展が期待されている。しかし、このようなプラズマ照射の有効性を裏付ける細胞および分子生物学的な作用機序については十分に解明されていない。

## 2. 研究の目的

亜鉛 (Zn) は生体内で鉄に次いで多い必須微量元素である。これまで、Zn は酵素の活性や転写因子などの構造維持に関与する分子と考えられてきたが、近年の研究から、Zn はカルシウムと同様なシグナル伝達物質としてもその重要性が認識されている。ほとんどの Zn は細胞内ではメタロチオネイン (MT) や Zn フィンガー構造を有するタンパク質に結合した状態で存在している。しかし、活性酸素種 (ROS) や活性窒素種 (RNS) によりこれらタンパク質が修飾されると、タンパクから Zn が遊離し、遊離 Zn はセカンドメッセンジャーとして機能する。この現象は「Zn シグナル」と呼ばれている。また、Zn 輸送に関わる多くのトランスポーターが存在していることから、細胞内の遊離 Zn の動態は厳密に制御されていると考えられている。

プラズマ照射による DNA 切断が抗酸化剤により抑制されることなどから、プラズマ照射により生じる様々な細胞応答に ROS の関与が示唆されている。実際、プラズマ照射による細胞死が、抗酸化剤より抑制されることが報告されている。ROS は Zn シグナルを活性化することから、我々は、プラズマ照射により惹起される細胞死や細胞応答において Zn シグナルが重要な役割を担っているのではないかと考えるに至った。そこで本研究では、プラズマ照射という物理的な刺激が細胞内で Zn シグナルに変換されることにより様々な細胞内応答を誘導している可能性を細胞および分子生物学的な手法を用いて検証した。

## 3. 研究の方法

(1) プラズマ照射培地 (Plasma-activated medium, PAM) の作製: 3.5 cm ディッシュに血清を含まない DMEM 6 mL を加え、プラズマを照射 (条件: Ar ガス流速 2 mL/min、照射時間 3 min) し、PAM を作製した。その後、分注して使用時まで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。

(2) 細胞培養: ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞、ヒト肺胞基底上皮腺がん A549 細胞、正常ヒト繊維芽細胞、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を使用した。

(3) 細胞傷害性: 96 穴プレートに培養した細胞を種々の量の PAM を含む無血清 DMEM 中で 1 時間処理した。その後、10% FCS を含む DMEM に置換し、20 時間以上培養した。細胞傷害は MTT 法により評価した。

(4) mRNA の測定: 細胞から総 RNA を抽出した後、cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として各遺伝子に特異的なプライマーを用い PCR を行った。

(5) Zn イメージング: 3.5 cm ディッシュで培養した細胞に Zn 蛍光プローブ Fluo-Zin3 AM を添加し、20 分インキュベーションした。無血清 DMEM で洗浄した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Zn イメージングを行った。

(6) Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) 活性: カバーガラス上で培養した細胞を使用した。この細胞に PAM を 1 時間曝露した。固定化後、anti-poly [ADP-ribose] mouse IgG monoclonal antibody と反応させた。2 次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体を、核染色に Hoechst 33342 を使用した。検出は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

(7) ウェスタンブロット: 細胞を可溶化した後、SDS-PAGE にて分離した。その後、PVDF 膜に転写し、一次抗体、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いてウェスタンブロットを行った。検出は化学発光により行った。

(8) NAD<sup>+</sup>測定: 24 穴プレートに培養した細胞を PAM で 1 時間曝露した。その後、10% FCS を含む DMEM に置換し、1.5 時間培養した。NAD<sup>+</sup>の検出および測定は、EnzyChrom NAD<sup>+</sup>/NADH assay kit (BioAssay Systems) を用いて行った。

(9) ATP 測定: 24 穴プレートに培養した細胞を PAM で 1 時間曝露した。その後、10% FCS を含む DMEM に置換し、3 時間培養した。細胞を冷 PBS で洗浄後、過塩素酸を用いて ATP を抽出し、ENLITEN ATP Assay System (プロメガ) を用いて ATP 量を測定した。

(10) ミトコンドリア内 ROS 測定: 3.5 cm ディッシュで培養した細胞を PAM で 1 時間曝露した。その後、mitoSox を添加し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて蛍光強度を測定

した。

#### 4. 研究成果

##### (1) PAM による細胞死の分子機構

PAM による細胞死における Zn の関与：プラズマ照射の方法には、培養している細胞に直接プラズマを照射する直接法と、DMEM などの培地にプラズマを照射し作製した PAM を細胞に曝露させる間接法がある。本研究では、安定的に供給可能な PAM を用いて検討を行った。SH-SY5Y 細胞に PAM を曝露したとき、PAM は用量依存的に細胞死を誘導した。この細胞死は抗酸化剤 N-アセチルシステイン (NAC) により抑制されたことから、PAM による細胞死には酸化ストレスが関与していると考えられた。そこで、PAM 誘導性細胞死における Zn の役割を確かめるために、細胞透過性の Zn キレート剤 TPEN を用いて検討したところ、PAM 誘導性の細胞死は TPEN により抑制された。PAM は 15 分以内に細胞内遊離 Zn を増加させたが、DMEM には Zn が含まれていないことから、この現象に細胞外からの Zn 流入は寄与していないと考えられた。また、NAC は PAM による細胞内 Zn の遊離を抑制した。PAM は、ミトコンドリアにおける ROS 産生亢進、PARP-1 の活性化、細胞内 NAD<sup>+</sup> および ATP の減少を引き起こしたが、TPEN はこれらの現象をすべて抑制した。また、PARP-1 阻害剤や NAD<sup>+</sup> の前駆体となるニコチンアミドの添加により細胞死は抑制された。

以上より、PAM 誘導性の細胞死は、PAM の曝露により生じる細胞内遊離 Zn の増加が細胞内エネルギー産生を障害することに起因していると考えられた。

細胞内 Zn レベルの差異と PAM 感受性：上述したように、PAM 刺激により細胞内で増加する遊離 Zn が細胞死に関与していることが明らかとなった。そこで次に、正常線維芽細胞と PAM に対する感受性が高いヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞を用いて、PAM 感受性の差異について細胞内 Zn の面から検討した。PAM は SH-SY5Y 細胞の細胞死を引き起こしたが、線維芽細胞では PAM による細胞傷害はほとんど認められなかった。PAM の刺激により細胞内 NAD<sup>+</sup> は両細胞において同程度減少したが、ATP の減少やミトコンドリア障害は SH-SY5Y 細胞でのみ認められた。NAD<sup>+</sup> および ATP の減少、ミトコンドリア障害は TPEN により抑制された。また、Zn 存在下で線維芽細胞に PAM を負荷したとき、PAM による ATP の減少、ミトコンドリア障害、細胞

死が引き起こされた。PAM や酸化剤により遊離する細胞内 Zn 量は、線維芽細胞に比べ SH-SY5Y 細胞の方が多かった。

以上より、PAM による遊離する細胞内 Zn 量の違いが、PAM に対する細胞の感受性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(2) PAM による A549 細胞増殖抑制の分子機構：細胞傷害を惹起しない程度の低用量 PAM の短時間負荷が、がん細胞の増殖を抑制することを見出したので、そのメカニズムの解明にも取り組んだ。A549 細胞に低用量の PAM を 1 時間負荷したとき、PAM を負荷した細胞では 24、48、72 時間後の細胞数が減少したことから、PAM による細胞増殖抑制効果が認められた。PAM 負荷 24 時間後の細胞では G2/M 期や Sub G1 期の細胞が増加することから、PAM は A549 細胞において G2/M 期停止や一部アポトーシスを誘導していると考えられた。また、PAM は時間依存的に p53 タンパク質の細胞内蓄積を増加させ、p53 依存的な遺伝子 p21 や PUMA の発現を誘導した。これらの現象は TPEN により抑制され、PAM 負荷による細胞内遊離 Zn の増加も認められた。

以上より、低用量の PAM は A549 細胞において細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが明らかとなった。これらの現象は、PAM により遊離した細胞内 Zn が p53 シグナルを活性化することで引き起こされている可能性が示唆された。

(3) プラズマ照射による皮膚創傷治癒の分子機構：皮膚へのプラズマ照射は創傷治癒を促進することが報告されている。創傷治癒の過程では、炎症性サイトカインが重要な役割を担っており、そのうち、IL-8 は細胞の遊走や増殖を促進することから創傷治癒に関わるサイトカインの一つとして知られている。一方、プラズマ照射により生成する ROS、RNS などの活性種が細胞機能を調節していることが示されている。本研究では、プラズマ照射が皮膚細胞における IL-8 発現に及ぼす影響を明らかにするために、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞を用いて検討した。

プラズマ照射 (直接照射) 時間依存的に IL-8 mRNA 発現は増加した。また、その発現はプラズマ照射後 4 時間で最大となった。2 分間のプラズマ照射により培地中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と亜硝酸の濃度はそれぞれ 30 μM および 1 mM 程度となった。プラズマを HaCaT 細胞培養系に直接照射した場合の方が、PAM や 30 μM の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を含む培地を細胞に負荷した場合に比べ、

IL-8 mRNA の発現量は多かった。プラズマ照射により MAP キナーゼの ERK および JNK の活性化が認められたが、プラズマ照射による IL-8 mRNA 発現は ERK 経路阻害剤でのみ抑制された。また、抗酸化剤(  $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron, PBN )の前処理により、プラズマ照射誘導性の IL-8 mRNA 発現は抑制された。

以上より、プラズマ照射による IL-8 発現亢進には、プラズマ照射により生じる ROS が重要な役割を担っていることが明らかとなった。しかし、細胞へのプラズマ直接照射の方が PAM より強い効果を示したことから、ROS 以外の因子が関与している可能性についても今後検討していく必要がある。

#### (4) まとめ

これらの結果より、プラズマという物理的的刺激から Zn シグナルへの変換がプラズマによる細胞傷害の初期応答に重要であること、細胞内 Zn 含有量の多いがん細胞はプラズマによる細胞傷害が起きやすいことが明らかとなり、本研究成果はプラズマを利用するがん治療において有益な情報になると考えられる。

#### 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6件)

Hara H, Sueyoshi S, Taniguchi M, Kamiya T, Adachi T: Differences in intracellular mobile zinc levels affect susceptibility to plasma-activated medium-induced cytotoxicity. *Free Rad Res* **51**, 306-315, 2017. 査読有

DOI: 10.1080/10715762.2017.1309527.

Horiba M, Kamiya T, Hara H, Adachi T: Cytoprotective effects of mild plasma-activated medium against oxidative stress in human skin fibroblasts. *Sci Rep* **7**, 42208, 2017. 査読有

DOI: 10.1038/srep42208.

Adachi T, Kano A, Nonomura S, Kamiya T, Hara H: Histone deacetylase inhibitors stimulate the susceptibility of A549 cells to a plasma-activated medium treatment. *Arch Biochem Biophys* **606**, 120-127, 2016. 査読有

DOI: 10.1016/j.abb.2016.07.019.

Adachi T, Nonomura S, Horiba M, Hirayama T, Kamiya T, Nagasawa H, Hara H: Iron stimulates plasma-activated medium-induced A549 cell injury. *Sci Rep* **6**, 20928, 2016. 査読有

DOI: 10.1038/srep20928.

Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Takeda K, Hashizume H, Nakamura K, Utsumi F, Kajiyama H, Kano H, Okazaki Y, Toyokuni S, Akiyama S, Maruyama S, Yamada S, Kodera Y, Kaneko H, Terasaki H, Hara H, Adachi T, Iida M, Yajima I, Kato M, Kikkawa F, Hori M: Plasma with high electron density and plasma-activated medium for cancer treatment. *Clinical Plasma Medicine* **3**, 72-76, 2015. 査読有

DOI: 10.1016/j.cpme.2015.09.001.

Hara H, Taniguchi M, Kobayashi M, Kamiya T, Adachi T: Plasma-activated medium-induced intracellular zinc liberation causes death of SH-SY5Y cells. *Arch Biochem Biophys* **584**, 51-60, 2015. 査読有

DOI: 10.1016/j.abb.2015.08.014.

#### [学会発表](計23件)

1. 原 宏和, 足立哲夫: 大気圧プラズマ負荷に対するがん細胞応答機構(シンポジウム), 日本薬学会第137年会, 仙台(2017, 3/25-28)
2. Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi: Intracellular Free Zinc Mediates Cellular Responses to PAM, ICPMS2017, Nagoya (2017, 2/27-28)
3. 加納綾女, 野々村早帆, 神谷哲朗, 原 宏和, 足立哲夫: プラズマ照射培地負荷によるがん細胞死に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の増強効果, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 岐阜(2016, 10/30)
4. 堀田英美里, 原 宏和, 神谷哲朗, 足立哲夫: ヒト表皮角化細胞 HaCaT におけるプラズマ照射による IL-8 発現誘導機構, 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会 2016, 岐阜(2016, 10/30)
5. Hirokazu Hara, Miko Taniguchi, Mari Kobayashi, Sayaka Sueyoshi, Tetsuro Kamiya, Tetsuo Adachi: Intracellular free zinc plays an important role in plasma-activated medium-induced cell death, ICPM6, Bratislava (2016, 9/4-6)
6. 足立哲夫, 加納綾女, 野々村早帆, 神谷哲朗, 原 宏和: ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤はがん細胞のプラズマ照射培地に対する感受性を増強する, 第69回日本酸化ストレス学会学術集会, 仙台(2016, 8/30-31)
7. 小林真理, 原 宏和, 末吉紗也子, 神谷哲朗, 足立哲夫: プラズマ照射培地より惹起される A549 細胞増殖抑制における

- 細胞内亜鉛の関与，第 62 回日本薬学会東海支部大会，名古屋（2016,7/2）
8. 末吉紗也子，原 宏和，谷口美紘，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射培地による細胞傷害と細胞内亜鉛動態の関連性，日本生化学会中部支部例会・シンポジウム，津（2016, 5/21）
  9. 堀場美の里，神谷哲朗，原 宏和，足立哲夫：プラズマ照射培地負荷によるヒト線維芽細胞での酸化ストレス抵抗性の獲得，日本薬学会第 136 年会，横浜（2016, 3/26-29）
  10. 原 宏和，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射に対する細胞応答の分子機構，第 4 回新学術領域「プラズマ医療科学の創成」全体会議，名古屋（2016, 3/6）
  11. 原 宏和，谷口美紘，小林真理，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射培地による SH-SY5Y 細胞傷害の分子機構 -正常細胞との比較-，日本酸化ストレス学会東海支部 第 4 回学術集会，鈴鹿（2016, 2/6）
  12. 原 宏和，谷口美紘，小林真理，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射により惹起される細胞傷害における亜鉛の役割，メタルバイオサイエンス研究会 2015，名古屋（2015, 8/27-28）
  13. 原 宏和，谷口美紘，小林真理，神谷哲朗，足立哲夫：PAM による細胞傷害の分子機構 -細胞内  $Zn^{2+}$  の役割-，新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」+「統合的神経機能の制御を標的とした糖鎖の作動原理解明」合同公開シンポジウム，名古屋（2015, 8/5）
  14. 足立哲夫，野々村早帆，堀場美の里，平山 祐，神谷哲朗，永澤秀子，原 宏和：プラズマ照射培地による癌細胞アポトーシスへの鉄イオンの関与，第 68 回日本酸化ストレス学会学術集会，鹿児島（2015, 6/11-12）
  15. 野々村早帆，平山 祐，神谷哲朗，原 宏和，永澤秀子，足立哲夫：プラズマ照射培地による A549 細胞傷害への鉄イオンの関与，日本薬学会第 135 年会，神戸（2015, 3/25-28）
  16. 谷口美紘，原 宏和，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射培地により惹起される細胞死における細胞内遊離亜鉛の関与，日本薬学会第 135 年会，神戸（2015, 3/25-28）
  17. 原 宏和，谷口美紘，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射培地による亜鉛シグナルの活性化は細胞死を惹起する-プラズマ照射に対する細胞応答の分子機構-

- 第 4 回新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」全体会議，名古屋（2015, 3/21-22）
18. 谷口美紘，原 宏和，神谷哲朗，足立哲夫：プラズマ照射培地により惹起される細胞死における亜鉛シグナルの関与，第 4 回新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」全体会議，名古屋（2015, 3/21-22）
  19. Tetsuo Adachi，Hiromasa Tanaka, Saho Nonomura, Tetsuro Kamiya, Hirokazu Hara, Shin-ichi Kondo, Masaru Hori: Plasma-activated medium induced cancer cell injury by a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network, IWPC2015, Nagoya (2015, 3/16-17)
  20. 原 宏和，谷口美紘，足立哲夫：プラズマ照射培地により惹起される細胞死には細胞内遊離亜鉛の上昇が関与する，第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会，京都（2014, 9/4-5）
  21. 足立哲夫，野々村早帆，原 宏和，田中宏昌，堀 勝：プラズマ照射培地による A549 細胞傷害とそのメカニズム，第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会，京都（2014, 9/4-5）
  22. 足立哲夫，野々村早帆，田中宏昌，原 宏和，近藤伸一，堀 勝：プラズマ照射培地による A549 細胞アポトーシス誘導とそのメカニズム，新学術領域合同公開シンポジウム，名古屋（2014, 8/9）
  23. 原 宏和，谷口美紘，足立哲夫：プラズマ照射培地により惹起される細胞死の分子機構-亜鉛シグナルの関与-，「プラズマが拓す新学術領域と今後の展開」合同シンポジウム，名古屋（2014, 6/14）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research\\_rinyaku.html](http://www.gifu-pu.ac.jp/research/research_rinyaku.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 宏和 (HARA, Hirokazu)

岐阜薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30305495

(2)研究分担者

足立哲夫 (ADACHI, Tetsuo)  
岐阜薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：40137063

神谷哲朗 (KAMIYA, Tetsuro)  
岐阜薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：60453057