

## 小特集 プラズマが誘導する生体応答とそのバイオ・医療応用

### 4. プラズマ活性溶液の細胞影響

#### 4. Effects of Plasma-Activated Medium on Cells

田中宏昌, 水野正明, 豊國伸哉, 丸山彰一, 小寺泰弘,  
足立哲夫, 寺崎浩子, 加藤昌志, 吉川史隆, 堀 勝  
TANAKA Hiromasa, MIZUNO Masaaki, TOYOKUNI Shinya, MARUYAMA Shoichi,  
KODERA Yasuhiro, ADACHI Tetsuo, TERASAKI Hiroko, KATO Masashi,  
KIKKAWA Fumitaka and HORI Masaru  
名古屋大学

(原稿受付: 2015年7月7日)

近年, 非平衡大気圧プラズマの医療・バイオ応用が盛んに研究されている。プラズマに含まれる電子, イオン, ラジカル, 光など様々な要因が複雑に細胞及び細胞を取り巻く環境に影響を及ぼし, 細胞応答を引き起こしていると考えられている。最近, プラズマ照射された溶液 (これはプラズマ活性溶液と名付けられた) ががん細胞にプログラム細胞死として知られるアポトーシスを誘導することがわかり, プラズマ活性溶液が細胞に及ぼす影響が活発に研究されている。脳腫瘍培養細胞においてはプラズマ活性溶液が生存・増殖シグナル伝達経路を抑制することによりアポトーシスへと導くことが明らかになった。これまでに, プラズマ活性溶液は脳腫瘍, 卵巣がん, 胃がん, 非小肺がん細胞など様々ながん細胞に有効であり, 抗癌剤耐性卵巣がん細胞に関しても有効であることがわかり, 従来のがん治療法では困難な腹膜播種等の播種性のがん治療への応用が期待される。ここではこれまで研究で明らかになりつつあるプラズマ活性溶液の細胞影響とその分子機構について紹介する。

#### Keywords:

plasma-activated medium, cancer, non-thermal atmospheric pressure plasma

#### 4.1 はじめに

宇宙の物質のほとんどがプラズマであるといわれており, プラズマは生命の誕生にも関わっているといわれるように, 宇宙で起こる現象から生命現象にいたるまでプラズマが深く関与していると考えられている。しかしながら, プラズマが生命あるいは細胞に与える影響に関する研究が活発に行われるようになったのは比較的最近のことである。これまで低圧下あるいは高温下で研究が進められていたが, 新しく大気圧下で生体のおかれた環境に近い温度でプラズマを生成する技術が生まれ, 生体・組織・細胞にその非平衡大気圧プラズマを照射することが可能になってきたからである[1-7]。

最近の研究でプラズマを細胞に直接照射するのみならず, プラズマ照射された溶液 (プラズマ活性溶液と名付けられた, 図1) を細胞に投与することにより細胞にプログラム細胞死として知られるアポトーシスを誘導できることがわかってきた[8]。本章では, プラズマ活性溶液が細胞に与える影響について最近の研究により明らかになってきたことを解説する。

#### 4.2 プラズマ活性溶液の効果

プラズマ活性溶液による抗腫瘍効果が発見されて以来,



図1 プラズマ活性溶液の作製。  
名古屋大学プラズマナノ工学研究センターにより開発された高電子密度大気圧プラズマ発生装置を用いて培養液にプラズマ照射した。

プラズマ活性溶液の効果はさまざまながん細胞に対して試された。脳には神経細胞やグリア細胞が存在し、アストロサイト細胞はグリア細胞の一種である。グリオーマはグリア細胞ががん化した脳腫瘍であるが、培養液にプラズマを3分照射したプラズマ活性培養液はアストロサイト正常細胞にほとんど影響を与えずにグリオーマ培養細胞にアポトーシスを誘導した[8] (図2)。プラズマ活性培養液は胃がん培養細胞[9]、非小細胞肺癌細胞[10] に対してもアポトーシスを誘導した。また、プラズマ活性培養液は卵巣がん培養細胞のみならず、抗癌剤耐性卵巣がん培養細胞に対してもアポトーシスを誘導した。皮下腫瘍モデルマウス実験において、コントロール群として培養液を試験群としてプラズマ活性培養液 (NEAPP-AM, Non-equilibrium atmospheric pressure plasma-activated medium) を投与し続けたところ、プラズマ活性培養液を投与した群においては腫瘍縮小効果が見出された[11] (図3)。

プラズマ活性溶液はがん治療以外にも効果を発揮することも分かってきた。加齢黄斑変性は、年齢を重ねるとともに網膜の下の脈絡膜から新生血管ができ、視力の低下をもたらす疾患である。マウスにレーザーを過剰な出力で照射することによっても脈絡膜新生血管を誘導することができ、このようなモデルマウスを使用して、プラズマ活性溶液の効果調べたところ、プラズマ活性溶液は元々存在する血管に影響を与えず、眼底の画像、網膜切片、網膜電位図の解析から眼の機能に影響を与えずに脈絡膜新生血管を抑制することがわかった[12]。

### 4.3 外界の刺激に対する細胞応答の仕組み

細胞は外界から刺激を受け取り、細胞内で情報を処理することにより様々な細胞応答を誘導する。細胞内での情報処理は細胞内のシグナル伝達分子を介して行われると考えられている (図4)。細胞と外界のインターフェイスとして細胞膜が存在し、細胞膜上には外界の様々な刺激を受け

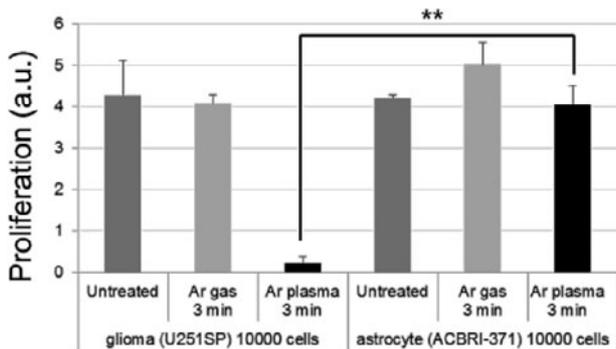


図2 プラズマ活性培養液はアストロサイト正常細胞にほとんど影響を与えず、グリオーマ培養細胞を選択的に殺傷する[8]。U251SPグリオーマ培養細胞とACBRI-371アストロサイト培養細胞をそれぞれ10000細胞ずつ播種し24時間後、未処理の培養液、アルゴンガスのみ3分間照射した培養液、アルゴンガスプラズマを3分間照射した培養液を投与した。24時間後MTSアッセイにより生存細胞数を490 nmの吸光度で評価した。このグラフはそれぞれの吸光度(生存細胞数に比例する)を示している。\*\*はStudent Tテストにおいて、p値が0.001より小さい(有意差が認められた)ことを示す。

情報を細胞内部に伝えるための受容体と呼ばれるタンパク質が存在する。これまでに様々な外界の刺激に対する受容体が同定されてきた。ペプチドやタンパク質等を含む化学物質の受容体やイオンを細胞内外に輸送するためのイオンチャンネルタンパク質、光の受容体、浸透圧ストレスの受容体等さまざまな受容体タンパク質が同定されてきた。

受容体は外界からの刺激を受け取ると、多量体を形成し

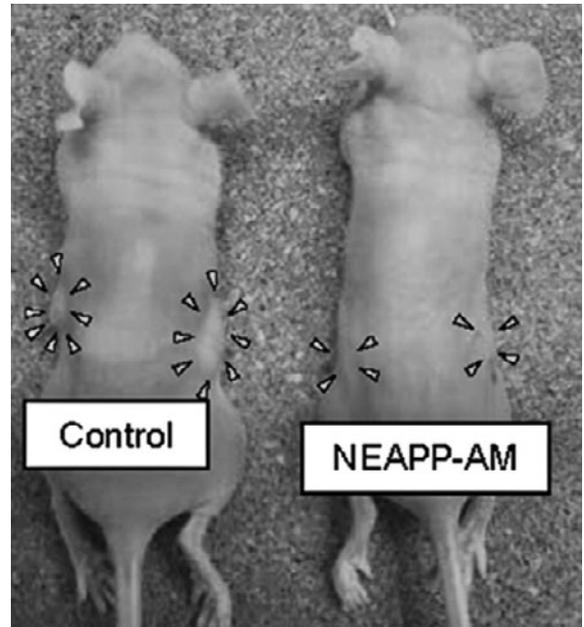


図3 プラズマ活性培養液による抗癌剤耐性卵巣がんの腫瘍縮小[11]。

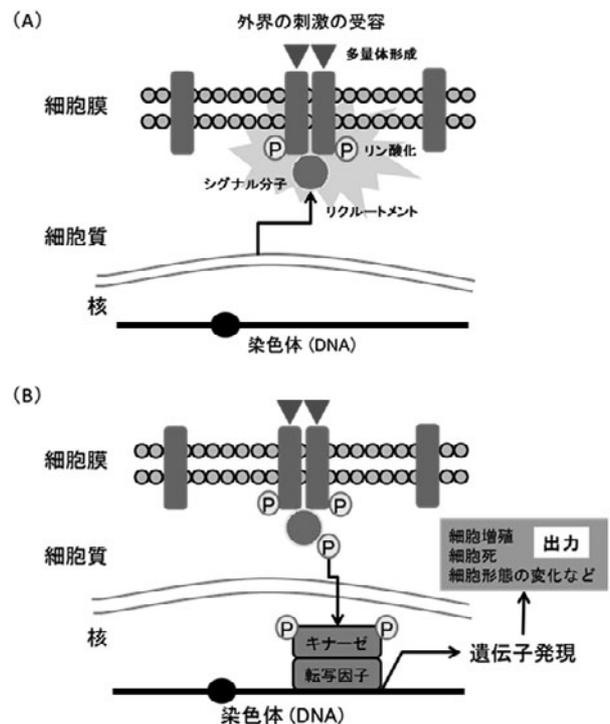


図4 外界の刺激に対する細胞応答(A)ステップ1:細胞膜上の受容体タンパク質から細胞内へのシグナル伝達 (B) ステップ2:シグナル伝達物質から遺伝子発現にいたるまでのシグナル伝達。

たり、受容体自身に備わっているリン酸化サイトをリン酸化したり、細胞質内に存在するシグナル伝達物質を細胞膜上(受容体近傍)に引き寄せる(リクルートする)ことにより、細胞内部へ情報を伝える。細胞内シグナル伝達物質はタンパク質の可逆的リン酸化等を通して更にシグナルを他のシグナル伝達物質に伝える。シグナル伝達物質の一部は核内へ移行し、転写因子を活性化することにより遺伝子発現を誘導する。またシグナル伝達物質の一部は細胞骨格制御因子として細胞骨格の再構成を行い、細胞形態の変化等を担う。

これまでの膨大な研究により様々な細胞応答に関するシグナル伝達機構が研究されてきたが、その中でも生存・増殖シグナル伝達機構は細胞の生死、がんとも関連する重要なシグナル伝達機構であり、数多くの研究がなされてきた[13]。主要なシグナル伝達機構としては、Rat Sarcoma (RAS)-Mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナル伝達経路と Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-Aktシグナル伝達経路としてよく知られている。RAS-MAPKシグナル伝達経路と PI3K-Aktシグナル伝達経路の間では経路間に複雑なクロストーク、フィードバック制御等があり、全体として生存・増殖シグナリングネットワークを形成していると考えられるのが適当である[14]。生存・増殖シグナリングネットワーク中には多くのがん遺伝子が含まれ、がん細胞には生存・増殖シグナルを恒常的に活性化するような遺伝子の突然変異が起きていることが多い。これらの事実から、近年、生存・増殖シグナリングネットワーク内の分子はがん治療の標的分子としても重要視されている。

#### 4.4 プラズマ活性溶液の細胞への影響

プラズマは電子、イオン、ラジカル、光、電界等からなるが、大気中の酸素、窒素、水蒸気等と反応して酸素ラジカル、窒素ラジカル、ヒドロキシルラジカル、一酸化窒素等を生成し、更に溶液中に過酸化水素、硝酸イオン、亜硝酸イオン等の反応生成物を生じる。溶液中の成分とも反応して反応生成物を生じると考えられ、プラズマ活性溶液は複雑な入力系と言える。培養細胞に対して、プラズマを直接照射した場合も、プラズマ活性溶液を投与した場合も細胞内に活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)を生成する。プラズマ活性溶液中に含まれる過酸化水素が大きな役割を果たしていると考えられているが、プラズマにより生成されたその他の成分も細胞応答に影響を与えていると考えられており、研究が進められている(図5)。

プラズマからラジカルが発生することや細胞内にROSを誘導することから、プラズマ医療研究においてフリーラジカルの生物学が重要な役割を果たしている。例えば、ラットから摘出した肝臓の5ミリ角片に大気圧プラズマを直接照射することにより脂質の酸化損傷ストレスが検出された[15]。フリーラジカルの生物学を適用することにより、プラズマ照射が生体へ及ぼす影響、安全にプラズマを使用するためのドーズ量に関して有用な知見が得られると期待される。DNA損傷応答のマーカーとしてリン酸化ヒストンタンパク質( $\gamma$ H2AX)がよく用いられるが、プ



図5 プラズマから細胞応答までの反応の諸過程。

ラズマ照射やプラズマ活性溶液の投与により $\gamma$ H2AXが検出されることやTP53遺伝子の発現が誘導されることなどからDNA損傷応答シグナル伝達を誘起することもわかってきた[16, 17]。

脳腫瘍においてはRAS-MAPKシグナル伝達経路の上流に位置するEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR)が恒常的に活性化されたり、Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10 (PTEN) 遺伝子の機能が欠失していたりするために、RAS-MAPKシグナル伝達経路とPI3K-Aktシグナル伝達経路が恒常的に活性化されている[18]。(PI3Kはphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)をphosphatidylinositol trisphosphate (PIP3)に変換するリン酸化酵素であるのに対し、PTENはPIP3をPIP2に変換する脱リン酸化酵素である。)これらのシグナル伝達経路は細胞成長やアポトーシスの抑制に関与している。プラズマ活性培養液を投与した脳腫瘍培養細胞において、MAPKの活性化状態やAktの活性化状態を調べたところ、これらの活性が落ちていることがわかった[19]。これらの実験結果よりプラズマ活性培養液は生存・増殖シグナリングネットワークを抑制することによりアポトーシスを誘導するという細胞内分子機構が構築された。生存・増殖シグナリングネットワーク内の分子は分子標的薬開発のターゲットとして最近注目されている。がん細胞は生存・増殖シグナリングネットワークに多く依存しているために、正常細胞に比べ生存・増殖シグナリングネットワーク内のシグナル分子に対する攻撃に弱いと考えられる。がん細胞の選択的殺傷効果を発揮するためには、がん細胞のシグナリングネットワークと正常細胞のシグナリングネットワークとの比較から、がん細胞に特異的な脆弱性に注目することが重要である。

プラズマ活性培養液を投与された脳腫瘍培養細胞におい

では、Caspase3/7の切断を経てアポトーシスにいたるシグナル伝達経路を用いていることがわかった[8]が、非小細胞肺癌では、プラズマ活性培養液が Apoptosis Inducing Factor (AIF)の上昇や細胞内カルシウムイオンの上昇を伴うカスパーゼ非依存性のアポトーシスを誘導することがわかった[10].

これまでの研究成果を総合すると、細胞の種類(突然変異の違いなど)によってプラズマ活性溶液の細胞応答が異なる可能性があり、またプラズマ活性溶液の種類によっても細胞応答の異なる可能性がある。これらの事実から、がんの選択的殺傷効果を最大限まで引き出すプラズマ活性溶液を開発できるかもしれないと期待される。

#### 4.5 おわりに

これまでの研究で、プラズマ活性溶液は画期的な治療効果を示すことが明らかになり、プラズマの医療応用の枠を大幅に広げる可能性をもたらした。プラズマが細胞に及ぼす影響を考える上でも、プラズマが溶液を介して細胞に与える影響を理解することは重要である。これまでのがん研究で培われてきた分子細胞生物学やフリーラジカルの生物学は強力な手法として期待される。またそれらの研究により、プラズマあるいはプラズマ活性溶液が様々な細胞内シグナル伝達機構に与える影響がわかってくると、全体をシステムとして理解することが重要になってくると考えられ

る。プラズマそのものが持つ多因子性や複雑性のためにプラズマ活性溶液も細胞にとって複雑な外界刺激をもたらしているのかもしれないが、今後の研究によりそれらの分子機構が解明されることを期待している。

#### 参考文献

- [1] 堀 勝: 応用物理 **2**, 132 (2014).
- [2] G. Fridman *et al.*, Plasma Process. Polym. **5**, 503 (2008).
- [3] M. Laroussi, IEEE Trans. Plasma Sci. **37**, 714 (2009).
- [4] K.D. Weltmann *et al.*, Pure Appl. Chem. **82**, 1223 (2010).
- [5] T. von Woedtke *et al.*, Pharmazie **68**, 492 (2013).
- [6] M.G. Kong *et al.*, New J. Phys. **11**, 115012 (2009).
- [7] G.E. Morfill *et al.*, New J. Phys. **11**, 115011 (2009).
- [8] H. Tanaka *et al.*, Plasma Medicine **1**, 265 (2011).
- [9] K. Torii *et al.*, Gastric Cancer **18**, 635-43 (2014).
- [10] T. Adachi *et al.*, Free Radic. Biol. Med. **79C**, 28 (2014).
- [11] F. Utsumi *et al.*, Plos One **8**, e81576 (2013).
- [12] F. Ye *et al.*, Sci. Rep. **5**, 7705 (2015).
- [13] M. Laplante and D.M. Sabatini, Cell **149**, 274-93 (2012).
- [14] E. Caron *et al.*, Mol. Syst. Biol. **6**, 453 (2010).
- [15] Y. Okazaki *et al.*, J. Clin. Biochem. Nutr. **55**, 207-215 (2014).
- [16] S. Kalghatgi *et al.*, Plos One **6**, e16270 (2011).
- [17] K. Kim *et al.*, Appl. Phys. Lett. **98**, 3701-073701 (2011).
- [18] J.T. Huse and E.C. Holland, Nat. Rev. Cancer **10**, 319-31 (2010).
- [19] H. Tanaka *et al.*, Plasma Medicine **2**, 207 (2012).