小特集

大気圧低温プラズマに対する細胞応答と がん治療への展開

Cellular Responses Induced by Cold Atmospheric Pressure Plasma and Application in Cancer Therapy

1. はじめに

1. Introduction

田 中 宏 昌,堀 勝
TANAKA Hiromasa and HORI Masaru 名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター (原稿受付: 2020年11月19日)

1.1 プラズマ医療科学の創成

近年, 大気圧低温プラズマの医療応用研究が活発に進め られている. プラズマは電子, イオン, ラジカルから構成 されているが、照射時には電界や衝撃波も重畳される. 大 気圧下で生体に照射可能な常温常圧のプラズマを生成する 技術が進展し、大気圧低温プラズマを用いた画期的な医療 効果が報告されるようになった、我が国では、2012年度か ら2017年度にかけて文部科学省科学研究費新学術領域研究 「プラズマ医療科学の創成」(領域代表:堀 勝,名古屋大 学)が立ち上がり、名古屋大学、豊橋技術科学大学、岐阜 薬科大学, 富山大学, 名城大学, 愛知県がんセンターなど の中部地区の研究教育機関や, 東京大学, 産業技術総合研 究所, 筑波大学, 創価大学, 東京都市大学, 首都大学東京, 芝浦工業大学, 杏林大学, 東北大学, 大阪大学, 理化学研 究所, 岡山大学, 愛媛大学, 九州大学, 帯広畜産大学など 日本全国の教育研究機関が参画し、学生も含めると総勢 200~400人規模の研究者が、プラズマ医療科学の学理の構 築のために活発に研究活動を進めてきた。新学術領域研究 総括班が中心となって, プラズマ医療科学に関する成果を 体系的にまとめたものとして、8章,51節,458ページから なる英文教科書「Plasma Medical Science」が出版された [1].

本新学術領域では、装置パラメータから粒子パラメータ により低温プラズマを特徴づけることにより、低温プラズ マが生体に及ぼす複雑な影響を系統立てて考察することと し, 低温プラズマによる止血[2,3], 遺伝子導入[4,5], が ん治療などについて、その分子機構の解明を目指した研究 が展開された.一方で、生体も細胞、組織、器官、個体な ど様々な階層を持ち, 低温プラズマの影響も階層に分けて 考えることにより、複雑な生体システムにおいてどのよう な作用をもたらすのかを系統立てて考察することが必要で ある. 更には、細胞内にも外界の刺激を受け取った後にシ グナル伝達ネットワーク,遺伝子発現ネットワーク,代謝 ネットワークを介して, 生理学的応答を示すため, 低温プ ラズマに対する細胞応答を解析し、その機構を洞察し、反 応モデルを構築することが重要である. 以上のように、プ ラズマ医療科学は、複雑な入力系と複雑かつ特異な出力系 を有する極めて挑戦的な新学術領域と言えるが、我が国で は、これらの研究に組織立って取り組むことにより、本分 野における国際発表の件数などにおいて世界を先導する成 果を挙げてきた.

本小特集では、特にプラズマがん治療研究に焦点を当て、大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開について我が国及び世界の研究の最先端を紹介する.

1.2 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

現在のプラズマがん治療研究では、大気圧低温プラズマ

Center for Low-Temperature Plasma Science, Nagoya University, Nagoya, AICHI 464-8603, Japan

corresponding author's e-mail: htanaka@plasma.engg.nagoya-u.ac.jp

を腫瘍に直接照射するアプローチとプラズマ照射溶液をが ん細胞に投与する方法や低温プラズマにより免疫系を活性 化しがん細胞を攻撃する間接的なアプローチが遂行されて いる. 第2章では、プラズマ照射溶液(プラズマ活性溶液 と名付けた) による様々ながん細胞を用いた培養細胞実験 や動物実験に関する先駆的な研究成果と現状を述べる [6]. 第3章では, 岐阜薬科大学の原, 足立らが, 阻害剤等 を用いたシステマティックな実験によって, プラズマ活性 溶液による抗腫瘍効果の作用機序を解明してきた成果が示 されている[7]. 第4章では、富山大学の近藤らによって、 放射線治療,超音波療法,温熱療法と低温プラズマ治療法 の比較が行われ、低温プラズマによる細胞死を特徴づけな がら、分子機構の解明を行ってきた成果が示されている [8]. 第5章では, 東京大学の小野らによって, 担癌モデル マウスに対して、低温プラズマ照射により免疫系が活性化 されることを発見した画期的な成果が示されている[9].

大気圧低温プラズマに対する細胞応答を考える上で, 重 要な因子として,酸化ストレスが挙げられる.大気中に含 まれる窒素,酸素,水と低温プラズマが反応することによ り様々な活性酸素窒素種(Reactive oxygen and nitrogen species, RONS) が細胞外に生成される. また, プラズマ 生命科学の多くの論文で報告されているように、細胞内に も RONS が検出される. これまでに、生物学で構築されて きた酸化ストレスの実験手法や概念がプラズマ医療科学に おいても適用され、分子機構の解明を牽引してきた. 一方 で、低温プラズマが独自に及ぼす細胞応答なども報告され ており、今後、更なる研究が必要である。また、細胞死の 種類としてもアポトーシスが多く報告される中、免疫原性 細胞死、オートファジー、ネクロトーシス、フェロトーシ スなど様々な種類の細胞死を引き起こしうることや複数種 類の細胞死を同時に引き起こしうることなども報告されて おり、これらの事実もプラズマに起因する複雑な入力系が 及ぼす複雑かつ特異な出力系として、今後、系統立てて体 系化すれば、新たな学理の創成につながる. また、免疫系 の活性化においては、複数種類の細胞や組織の遠隔への相 互作用を考慮することが必要であり、個体への応答とし て,新たな免疫学を創成できる可能性を秘めている.

プラズマ医療研究のアプローチとして, プラズマパラメータという複雑な入力に対して, 個々の生体に対して複

雑かつ特異な現象が見出されており、今後は、AI を駆使した機械学習を取り入れることによって、現象の体系化や重要なパラメータの特定などが可能になると考えられる. さらに、個々のプラズマが誘起する画期的な医療に資する現象について、1) プラズマ中の活性種の挙動、2) プラズマと溶液との相互作用の解明、3) 溶液中で生成された短寿命あるいは長寿命活性種と電界、光、衝撃波との相互作用による細胞内での分子反応機構の解明、4) 細胞内での反応を基軸にした動物実験を系統的にシームレスに解析し、医療応用に資するプラズマ医療装置の創製を実現することが必要である.

ドイツや米国などでプラズマ装置をがん患者に対して直接照射した例などが、すでに報告されているが、今後、大気圧低温プラズマのがん治療への応用を考える上で、プラズマ装置の規格化に基づく国際標準化や動物実験などによる有効性、安全性の評価などが必要である.

また、プラズマ医療科学は、学際領域の科学であり、プラズマ生命科学に関するグローバルな教育システムの確立も急務である。

人類が科学的に解明すべき未踏のターゲットとして,宇宙と脳が挙げられているが,プラズマ科学は,その両者のターゲットに挑戦することで,人類の永続的な進展に寄与できる科学領域を担っている.近い将来,ダークマターや核融合エネルギーの科学領域と脳や再生医療の科学領域を融合する重要な学際領域として,プラズマ科学が存在していることを期待している.

- [1] S. Toyokuni *et al.*, *Plasma Medical Science* (Academic Press. 2018).
- [2] Y. Ikehara et al., J. Photopolym Sci. Technol 26, 555 (2013).
- [3] K. Miyamoto et al., J. Clin. Biochem. Nutr. 60, 25 (2017).
- [4] S. Sasaki et al., Appl. Phys. Express. 7, 026202 (2014).
- [5] M. Jinno *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. **605**, 59 (2016), DOI 10.1016/j.abb.2016.04.013 (2016).
- [6] H. Tanaka et al., Rev. Mod. Plasma Phys. 1, 3 (2017).
- [7] T. Adachi et al., Free Radic. Biol. Med. 79C, 28 (2014).
- [8] M.U. Rehman *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. **605**, 19 (2016).
- [9] K. Mizuno et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 50,12LT01 (2017).



小特集 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

2. プラズマ照射溶液が誘発する細胞死

2. Cell Death Induced by Plasma-Activated Solutions

田中宏昌, 堀 勝¹⁾
TANAKA Hiromasa and HORI Masaru¹⁾
¹⁾名古屋大学 低温プラズマ科学研究センター
(原稿受付: 2020年11月19日)

プラズマがん治療研究はプラズマ生命科学において最も挑戦的な研究テーマである。この十数年の間に世界中で、基礎的な研究から応用研究まで幅広く展開されている。これまでに、培養細胞実験レベルから動物実験レベルに至るまで様々ながん細胞が研究されてきた。また、低温プラズマを生体に直接照射するのみならず、プラズマ照射溶液を投与したり、低温プラズマによる免疫原性細胞死を誘導する研究が展開されている。分子機構を考える上で、酸化ストレスが重要視されているが、本章では、プラズマ照射溶液が誘発する細胞死について包括的に紹介する。

Keywords:

low-temperature plasma, cancer treatment, plasma-activated medium (PAM), cell death, signal transduction

2.1 プラズマがん治療

2004年にストーフェル (Stoffels) らが培養細胞にプラズ マニードルでプラズマ照射した結果を報告して以来[1], 様々ながん細胞や正常細胞の培養細胞に対して大気圧低温 プラズマによるプラズマ照射実験が行われてきた. 2010年 頃から, 免疫不全のヌードマウスの脇腹にがん細胞を移植 した担癌モデルマウスに対してプラズマを照射し, 抗腫瘍 効果を示す結果が報告されるようになった[2-4]. 更には 2015年頃から、ドイツやアメリカにおいて臨床応用事例が 報告されるようになった. グライフスヴァルト大学病院 (Greifswald University Hospital) のメテルマン (Metelmann) らは頭頚部癌患者12人に対して, 感染性のがん潰瘍 をプラズマ照射し,鎮痛剤の要求の軽減や細菌による悪臭 の軽減などの効果が得られたことを報告している[5]. 更 に,頭頚部癌患者6人に対して,腫瘍の増殖をモニターし, 腫瘍が80%ほど小さくなった後に、急激に大きくなり亡く なった症例や1回治療を行った後に亡くなった症例などの 報告がされた[6]. 以上のようにプラズマがん治療の研究 は,この十数年の間に基礎的な研究から臨床応用研究まで 幅広く活発に展開されてきたが、以下では特にプラズマ照 射溶液が誘発する細胞死の分子機構に注目し、これまでの 我々の成果や世界で行われてきた研究成果を紹介する.

2.2 直接照射法と間接照射法

元々、低温プラズマの使用法としてレーザーメスのような直接照射法が考えられていたが、2010年以降、低温プラズマを照射した溶液による抗腫瘍効果や、低温プラズマにより免疫系が活性化され免疫原性細胞死を誘導することな

どが発見され、プラズマがん治療の応用範囲を拡げること が可能になった.

2.2.1 プラズマ活性溶液の発見

我々は、超高電子密度大気圧低温プラズマ装置を開発 し,がん治療研究を行ってきた.低温プラズマを照射した 培養液を脳腫瘍培養細胞に投与すると抗腫瘍効果を示すこ とを発見し, プラズマ照射培養液をプラズマ活性培養液 (Plasma-activated medium, PAM) と名付けた[7]. 照射 方法を最適化することにより, アストロサイト正常細胞に は細胞毒性がなく, 脳腫瘍培養細胞を選択的に殺傷するこ とが可能なPAMの作製にも成功した. 我々は, 卵巣癌担癌 モデルマウス動物実験により、PAM は卵巣癌においても 抗腫瘍効果を示すことを証明した[4]. 我々は更に, 産婦人 科,消化器外科と共同で,それぞれ卵巣癌腹膜播種モデル 動物実験[8],胃癌腹膜播種モデル動物実験[9]により, PAM の腹腔内投与により腹膜播種を抑制できることを示 した. 我々は更に、臨床に使用されている点滴液 (乳酸リ ンゲル液, 酢酸リンゲル液, 重炭酸リンゲル液がよく使わ れている)のプラズマ照射溶液を開発し、それぞれ、プラ ズマ活性乳酸リンゲル液(Plasma-activated Ringer's lactate solution, PAL), プラズマ活性酢酸リンゲル液 (Plasma-activated Ringer's acetate solution, PAA), プラ ズマ活性重炭酸リンゲル液(Plasma-activated Ringer's bicarbonate solution, PAB) と名付けた[10]. 細胞分子生物 学実験において培養液と並んで良く使用されるリン酸緩衝 生理食塩水 (Phosphate Buffered Saline, PBS) にプラズマ 照射した溶液による細胞毒性についても報告されている [11]. プラズマ活性溶液はがん治療のみならず様々な医療

Center for Low-Temperature Plasma Science, Nagoya University, Nagoya, AICHI 464-8603, Japan

corresponding author's e-mail: htanaka@plasma.engg.nagoya-u.ac.jp

応用目的にも有効であることがわかってきており、例えば、我々は眼科と共同で、加齢黄斑変性治療にもプラズマ活性溶液が有効であることを報告した[12]. 我々は更に装置メーカーと共同で、プラズマ活性溶液の臨床応用に向けて、気相制御下でプラズマ活性溶液を作製する装置を開発した[13].

2.2.2 低温プラズマによる免疫原性細胞死の誘導

ドレクセル大学のグループは、マイクロ秒パルス誘電体 バリア放電 (Dielectric Barrier Discharge, DBD) プラズマ 及びナノ秒パルス DBD プラズマを用いて、低温プラズマ が免疫原性細胞死 (immunogenic cell death, ICD) を誘導 しうることを示した[14,15]. 免疫原性細胞死とは, 治療に より死につつあるがん細胞が発するシグナルが引き金と なって免疫系を活性化しその他のがん細胞も遠隔的に攻撃 するようなタイプの細胞死で、Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs) と呼ばれるシグナルを発し, 免 疫原性細胞死を誘導するがん細胞の表面に Calreticulin (CRT) タンパクが発現したり、細胞外に ATP を放出した りなどする. ドレクセル大学の Lin らは, 培養細胞の実験 系により、低温プラズマが DAMPs を誘導することにより ICD を誘導しうることを示した. 更に Lin らは, 担癌モデ ル動物実験系により、低温プラズマ処理した結腸癌細胞を ワクチンとして用いて、低温プラズマが ICD を誘導できる ことを動物実験レベルで実証した[16].一方で、東京大学 小野らは、担癌モデルマウス実験系により、片方の脇腹に 移植したがん細胞にプラズマ照射すると反対側の脇腹に移 植したがん細胞に対しても腫瘍抑制効果を示すことを見出 し, 低温プラズマによる免疫系の活性化について実証した [17].

2.3 プラズマ活性溶液による細胞死の分子機構

低温プラズマは電子,イオン,ラジカル,光などからなる複合体であるが,大気中の窒素,酸素,水などと反応して,一酸化窒素,原子状酸素,ヒドロキシルラジカルなどの短寿命活性種を生成し,液相中では,過酸化水素,亜硝酸イオン,硝酸イオンなどの長寿命活性種を生成し,更に,溶液中の成分と反応し,溶液の種類に応じて,多様な生理活性物質を生成すると考えられている(図1).

過酸化水素と亜硝酸イオンが反応することにより、過酸化亜硝酸が生成し、更に過酸化水素と反応することにより一重項酸素が生成する。フライブルグ大学のBauerらは、一重項酸素が細胞表面のCatalaseを不活化することにより、細胞表面付近に過酸化水素と過酸化亜硝酸が常に存在する状態が実現され、そのことで、二次的な一重項酸素が細胞表面付近に生成されることで、過酸化水素の細胞内の流入を促進することで細胞死が導かれるというモデルを提唱した[18].

低温プラズマやプラズマ活性溶液で処理された細胞の多くは細胞内に活性酸素窒素種(Reactive oxygen and nitrogen species,RONS)を生成することが報告されており、RONSが細胞内のタンパク質などと相互作用することにより、酸化ストレス応答を誘導して、細胞死などの細胞応答

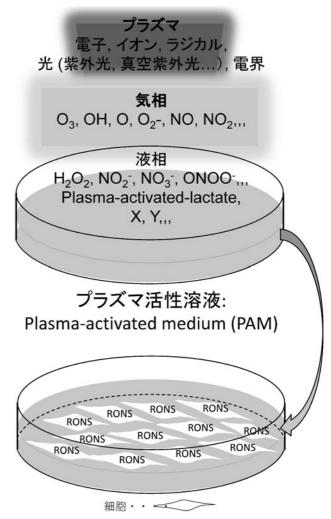


図1 プラズマ活性溶液による細胞死の分子機構.

を引き起こすと考えられている.

2.3.1 酸化ストレス

ROS がターゲットとする生体内高分子として、タンパク質、核酸、脂質などがよく研究されており、例えば、脂質過酸化を測定する方法として、TBARS(2-thiobarbituric acid reactive substances)という方法が用いられ、多価不飽和脂肪酸脂質過酸化物の分解物であるマロンジアルデヒド(MDA)の量として測定される。また、DNAの酸化損傷マーカーとして 8-OHdG が使われている。我々は生体反応病理学と共同で、低温プラズマによる安全性の評価のために TBARS や 8-OHdG の測定を行った[19]。また、最近、鉄に依存した脂質過酸化の連鎖がもたらす新規の細胞死としてフェロトーシスが提唱され、低温プラズマやプラズマ活性溶液により細胞にフェロトーシスが誘導される可能性が示唆されている[20]。

2.3.2 小胞体 (ER) ストレス

タンパク質はアミノ酸からなるが、アミノ酸の酸化はタンパク質の機能に影響を与える。例えば、システインはタンパク質中のその他のシステインとジスルフィド結合を通じてタンパク質の高次構造を作り、タンパク質の折り畳み(フォールディング)に必要と考えられているが、ジスルフィド結合は酸化還元状態(レドックスバランス)により

制御され、レドックスバランスが保たれないと、正常な高次構造を持つタンパク質が維持されない。細胞内小器官の1つである小胞体 (endoplasmic reticulum, ER) はこのような異常な高次構造を形成したタンパク質を正常に戻す役割を担っていると考えられているが、異常な高次構造を形成したタンパク質が蓄積されると、小胞体ストレスとして検知され、アポトーシスなど細胞死のシグナル伝達を引き起こすことも知られている。我々はプラズマ活性溶液が小胞体ストレスのマーカーとして知られているいくつかの遺伝子発現を上昇させることを見出した[21]。先に述べた免疫原性細胞死のDAMPsの1つであるCRTは一般的に小胞体内腔に局在し、新規に合成されたタンパク質の品質管理やフォールディングに関係することが知られており、小胞体ストレスと免疫原性細胞死は密接に関係していると考えられている。

2.3.3 DNA 損傷応答による細胞死

細胞内の RONS は、塩基損傷、塩基脱落、1本鎖 DNA 切断, 2本鎖 DNA 切断など, DNA にも損傷を与えること が知られている. またこれらのDNA損傷は, 放射線などに よっても引き起こされるほか、常日頃から酸化ストレスに さらされているため, ある一定の割合で起こっていると考 えられるが、通常では、DNA 損傷修復機構が働き、これら の DNA 損傷による突然変異の蓄積から回避されている. しかしながら、細胞内のRONSが増える等して、DNA損傷 修復機構が間に合わないほどの酸化ストレスを受けると, アポトーシスなどの細胞死のプログラムが引き起こされる と考えられている。2本鎖 DNA 切断のマーカーとして γ-H2AX と呼ばれるリン酸化されたヒストン H2AX がよく 用いられる. DNAに2本鎖切断が発生すると, H2AXがリ ン酸化されることを利用して, γ-H2AX の蛍光抗体により 2 本鎖 DNA 切断を可視化させることができる. この技術 を用いて、低温プラズマが細胞内で2本鎖 DNA 切断を誘 導することが示されている[22].

2.3.4 酸化ストレス依存性の細胞死と酸化ストレス非依存性の細胞死

前述のように、我々は PAM と PAL を開発してきた が、PAMとPALは、脳腫瘍培養細胞に対して全く異なる 分子機構で細胞死を誘導することがわかった[23].まず, 我々はPAM投与した脳腫瘍培養細胞とPAL投与した脳腫 瘍培養細胞の細胞内 ROS を可視化し、PAM の方が PAL に比べ脳腫瘍培養細胞に多くの細胞内 ROS を誘導するこ とを発見した. 更にマイクロアレイ解析により、PAM投与 した脳腫瘍培養細胞の遺伝子発現を網羅的に調べたとこ ろ, GADD45α, ATF3, CDKNIA など GADD45シグナル伝 達経路に関連する遺伝子が PAM 投与により遺伝子発現量 が2倍以上に増加した遺伝子群のトップ10の中にリスト アップされた、GADD45 シグナル伝達経路は酸化ストレス に応答してアポトーシスを誘導するシグナル伝達経路であ り、PAM 投与した脳腫瘍培養細胞では、細胞内の ROS に応答して、GADD45シグナル伝達経路が活性化すること によりアポトーシスを誘導することが示唆された. また, 我々は先に PAM 投与した脳腫瘍培養細胞は、PI3K-AKT

シグナル伝達経路を抑制することを発見していたが, PI3K-AKT シグナル伝達経路は GADD45α 遺伝子の発現を **負に制御していることも知られているため、これらの結果** は全て首尾一貫していると考えられる. 我々は更に、定量 リアルタイム PCR 法によりマイクロアレイ解析により同 定された遺伝子発現量の経時測定を行い、PAM 投与した 脳腫瘍培養細胞において、GADD45シグナル伝達経路に関 連する遺伝子発現量が上昇することを確認する一方で, PAL 投与した脳腫瘍培養細胞においては、それらの遺伝子 発現の上昇が見られないことも確認した. 以上の結果よ り、PAM は脳腫瘍培養細胞に対して酸化ストレス依存的 な細胞死を誘導し、PALは酸化ストレス非依存的な細胞死 を誘導すると結論づけた. 今後, PAL がどのようなシグナ ル伝達経路により細胞死を誘導するのかを明らかにしたい と考えている. 更には、細胞内の化学反応の網羅的な解析 を行うことにより, 低温プラズマやプラズマ活性溶液が細 胞に及ぼす影響を遺伝子発現ネットワーク、シグナル伝達 ネットワーク, 代謝ネットワークの相互作用として包括的 に解明したいと考えている(図2).

2.4 結論

現在,プラズマがん治療について世界中で盛んに研究されている。大きく直接照射法と間接照射法に分類することができ,間接照射法はプラズマ活性溶液を使用する方法と免疫系を活性化する方法に分類できる。プラズマがん治療研究としては臨床応用研究が行われているものから,基礎的な研究が行われているものまで幅広く研究が進められている。様々ながん細胞に対して,培養細胞実験レベルから動物実験レベルまで展開されてきた。低温プラズマによる細胞死の分子機構についても酸化ストレスに関連するものが多く報告される一方で,未知の機構についての報告もあり,特に間接照射法においては未解明の謎が多くある。今後,臨床応用などの実用化に向けて,有効性,安全性の試験及び,低温プラズマが直接的あるいは間接的に生体に及ばす機構の更なる解明が必要である。

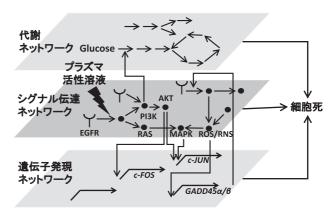


図2 プラズマ活性溶液による遺伝子発現、シグナル伝達、代謝ネットワークへの影響.

- [1] I.E. Kieft et al., Bioelectromagnetics 25, 362 (2004).
- [2] M. Vandamme et al., Plasma Process. Polym. 7, 264 (2010).
- [3] M. Keidar et al., Br. J. Cancer. 105, 1295 (2011).
- [4] F. Utsumi et al., PLoS. One 8, e81576 (2013).
- [5] Hans-Robert Metelmann *et al.*, Clin. Plasma Med. 3, 17 (2015).
- [6] H.R. Metelmann et al., Clin. Plasma Med. 9, 6 (2018).
- [7] H. Tanaka et al., Plasma Med. 1, 265 (2013).
- [8] K. Nakamura et al., Sci. Rep. 7, 6085 (2017).
- [9] S. Takeda et al., Ann. Surg. Oncol. 24, 1188 (2017).
- [10] H. Tanaka et al., Sci. Rep. 6, 36282 (2016).
- [11] D.Y. Yan et al., Sci. Rep.-Uk 6, 26016 (2016).

- [12] F. Ye et al., Sci. Rep. 5, 7705 (2015).
- [13] K. Nakamura *et al.*, Plasma Process Polym. DOI ARTN e1900259 10.1002/ppap.201900259 (2020).
- [14] V. Miller et al., Phys. Plasmas 22, 122005 (2015).
- [15] A. Lin et al., Plasma Process Polym. 12, 1392 (2015).
- [16] A.G. Lin et al., Oncoimmunology 7, e1484978 (2018).
- [17] K. Mizuno et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 50, 12LT01 (2017).
- [18] G. Bauer et al., Redox Biol. 26, 101301 (2019).
- [19] Y. Okazaki et al., J. Clin. Biochem. Nutr. 55, 207 (2014).
- [20] S. Toyokuni et al., Cancer Sci. 111, 2665 (2020).
- [21] T. Adachi et al., Free Radic. Biol. Med. 79C, 28 (2014).
- [22] S. Kalghatgi et al., PLoS One 6, e16270 (2011).
- [23] H. Tanaka et al., Sci. Rep. 9, 13657 (2019).



小特集 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

3. 大気圧低温プラズマによる 細胞のエネルギー産生障害の分子機構

3. Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma-Induced Dysfunction of Cellular Energy Production

原 宏和,足立哲夫 HARA Hirokazu and ADACHI Tetsuo 岐阜薬科大学 臨床薬剤学研究室

(原稿受付:2020年11月6日)

大気圧低温プラズマ(NTAPP)照射は、正常細胞に比べがん細胞に対しより強く傷害を及ぼすことから、がんの新規治療法として期待されている。NTAPP 照射により活性酸素種(ROS)が生成することから、ROS がNTAPP の抗がん活性発現に重要な役割を担っていると考えられているが、その機序には不明な点も多い。本章では、NTAPP 照射により生成された ROS が優先的にがん細胞を死滅させる機序について、がん細胞のエネルギー代謝の視点から解説する。

Keywords:

non-thermal atmospheric pressure plasma, reactive oxygen species, NAD+, glycolysis, mitochondria

3.1 はじめに

近年、大気圧下で安定してプラズマを生成させることが 可能となり、この大気圧低温プラズマ (non-thermal atmospheric pressure plasma; NTAPP) をがん治療, 止血, 創傷 治癒などの医療分野へ応用する取り組みが精力的に進めら れている[1-3]. 特に, NTAPP 照射は正常細胞に比べてが ん細胞に対しより強く傷害を及ぼすことから、NTAPP は がんの新規治療法として期待されている[4]. NTAPP 照射 は細胞に直接照射した場合だけではなく, あらかじめ NTAPP を照射した培地 (plasma-activated medium; PAM) や乳酸リンゲル液 (plasma-activated lactated Ringer's solution; PAL) などをがん細胞に負荷する間接照射によって も, 抗がん作用を発揮する[5]. NTAPP を照射した溶液に は活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)や活性窒素 種 (reactive nitrogen species; RNS) が含まれていることか ら, これらの活性分子種による酸化ストレスが細胞死を引 き起こすと考えられているが、詳細な作用機序には未だ不 明な点が多い.

細胞は自らの生存のためにエネルギーを必要とする.がん細胞のエネルギー産生機構は正常細胞とは異なり、高エネルギー物質である ATP の産生効率の良いミトコンドリアにおける酸化的リン酸化ではなく、主に細胞質での解糖系を利用している[6].がん細胞におけるこの特有なエネルギー代謝プロファイルの変化は、ワールブルグ効果として知られている.我々は以前、がん細胞をPAMで処理したときに生じる細胞死では、細胞内ニコチンアミドアデニン

ジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide; NAD+) が減少することを報告している[7]. NAD+は、エネルギー産生、DNA 修復、遺伝子発現など、細胞機能の制御を担う重要な物質である[8]. PAM による NAD+の減少は、ATPの枯渇などエネルギー産生障害を伴う細胞死を誘導する。それゆえ、がん細胞に特有のエネルギー代謝が NTAPPの抗がん活性を導いている可能性が考えられる.

本章では、NTAPP 照射により産生する ROS が、がん細胞のエネルギー産生障害を引き起こす機序について最近の知見を紹介したい.

3.2 NTAPP 照射に対する細胞のレドックス応答3.2.1 NTAPP 照射溶液中の活性分子種

NTAPP 照射された培養液(DMEM),リン酸緩衝生理食塩水 (PBS),リンゲル液などの液体中には,ROS や RNS など多くの活性分子種が含まれている.我々も,PAM や PAL中には高濃度 ($600\sim800~\mu$ M) の H_2O_2 が存在していることを報告している[5]. H_2O_2 は NTAPP 照射時に気相で起きる反応により生成し,この H_2O_2 が液体中に拡散することが報告されている[9].また,NTAPP 照射溶液中に多量のヒドロキシルラジカルが生成していることから,液体中でヒドロキシルラジカルから H_2O_2 に変換されている可能性も示されている[10].

NTAPP 照射溶液中には、ROS 以外に、一酸化窒素 (NO) や亜硝酸イオン (NO $_2$) などの RNS も含まれており、Griess 法を用いた測定から、PAM または PAL 中の NO $_2$ の濃度は

 ${\it Gifu\ Pharmaceuticals\ University,\ GIFU\ 501-1196,\ Japan}$

corresponding author's e-mail: hara@gifu-pu.ac.jp

ミリモル濃度に達することがわかっている。また、NTAPP 照射時には、溶液中に NO とスーパーオキシドアニオン (O_2^-) により生成する高反応性のペルオキシナイトライト $(ONOO^-)$ も検出される。

NTAPP を照射し作製した PAM や PAL は様々なタイプ のがん細胞を死滅させる[4,5]. このPAM誘発性の細胞死 は, 抗酸化剤 (*N*-アセチルシステイン, グルタチオンなど) あるいは抗酸化酵素 (カタラーゼなど) によって抑制され る. また、PAM や PAL 中に含まれている H_2O_2 (>600 μ M) および NO₂ (>1 mM) に相当する濃度の H₂O₂ および NO₂を添加した DMEM またはリンゲル液で細胞を処理し たとき,ある程度 PAM や PAL 誘発細胞死を再現すること ができることから、NTAPP 照射が引き起こすがん細胞の 細胞死には、ROSやRNSによる酸化ストレスが密接に関与 していると考えられている.しかし、H₂O₂やNO₂のみの添 加では PAM の細胞毒性を完全に再現することができない [11]. それゆえ, PAM (または PAL) 誘導性の細胞死には H₂O₂ や NO₂ 以外の因子も寄与していると考えられている が、それら因子については未だ十分な解明がなされていな Vi.

3.2.2 ROS によるタンパク質の酸化修飾

細胞はタンパク質など生体分子の酸化還元(レドックス) 反応を利用し細胞機能を制御している. タンパク質のシステイン残基に含まれるチオール基は酸化修飾を受けやすく, ROS はチオール基の酸化修飾を介して様々なタンパク質の活性を可逆的に調節していることから, 細胞内の重要なシグナル伝達物質として機能していると考えられている.

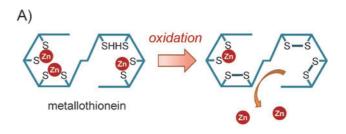
タンパク質内のシステイン残基は ROS の主要な標的であり、一般にシステインのチオール基は、 H_2O_2 などの ROS によって速やかにシステインスルフェン酸(-SOH)に酸化され、ジスルフィド結合を形成する。スルフェン酸がさらに酸化されると、スルフィン酸(-SO $_2$ H)またはスルホン酸(-SO $_3$ H)となる。スルフェン酸への酸化とジスルフィド結合の形成は可逆的な修飾であるのに対し、スルフィン酸やスルホン酸への変換はシステイン残基の不可逆的な修飾であると考えられている。NTAPP 照射がシステインの酸化を引き起こし、スルホン酸が生成することも報告されている[12]。このように、NTAPP 照射により生成された ROS はタンパク質に含まれているシステイン残基の酸化修飾を引き起こし、酵素阻害、細胞内遊離亜鉛(Zn^{2+})の増加、細胞内 ROS 産生亢進など様々な細胞応答を誘発する。

3.2.3 PAM による細胞死と細胞内遊離 Zn²⁺の関連性

必須微量元素である Zn^{2+} は酵素の活性発現やタンパク質の高次構造の維持に重要な役割を担っている。細胞内 Zn^{2+} の大部分($80\sim90\%$)は、亜鉛フィンガー構造を有する転写因子やメタロチオネイン(MT;システインに富んだ分子量 6-7 kDa の金属結合タンパク質)などの Zn^{2+} 結合タンパク質のシステイン残基やヒスチジン残基に配位しているため、細胞内の遊離 Zn^{2+} 濃度は非常に低い。 ROS/RNS によるシステインチオールの修飾は Zn^{2+} 結合タンパク質などから Zn^{2+} の遊離を促し、遊離した Zn^{2+} は Zn^{2+} 依

存性の細胞死を引き起こすことが報告されている[13]. それゆえ、 Zn^{2+} 自体はレドックス非感受性金属であるが、酸化ストレスによる細胞障害と密接に関連している. また、 Zn^{2+} は酸化ストレス誘導性の細胞内メディエーターとして働くため、 Zn^{2+} 結合タンパク質は ROS/RNS シグナルを亜鉛シグナルに変換する分子スイッチとして機能している(図 1 A).

ヒト神経芽腫 SH-SY 5 Y 細胞を PAM で処理したとき、PAM誘導性細胞死が引き起こされるが、この細胞死は細胞透過性 Zn^{2+} キレート剤である N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) 存在下で抑制される[7]. 蛍光 Zn^{2+} プローブ FluoZin-3 を用いた細胞内 Zn^{2+} イメージングの実験により、我々は、PAM 曝露後速やかに SH-SY5Y 細胞内の遊離 Zn^{2+} レベルが上昇することを報告している(図1B). また、抗酸化剤 NAC は遊離 Zn^{2+} の上昇を抑制する. これらの結果は、PAM 誘導細胞傷害において、 Zn^{2+} 結合タンパク質の酸化修飾により遊離する Zn^{2+} が重要な役割を担っていることを示唆している。それゆえ、PAM による細胞内 Zn^{2+} 恒常性の破綻は、PAM による細胞傷害と密接に関連していると推察される.



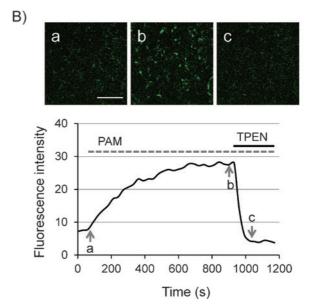


図 1 ROS による細胞内 Zn²⁺の動態変化 A) システインのチオール基の酸化修飾による Zn²⁺含有タンパク質からの Zn²⁺遊離 B) PAM 処理による SH-SY5Y 細胞内遊離 Zn²⁺の増加 Scale bar = 200 μm.

3.3 NTAPP 処理溶液による細胞のエネルギー産 生障害

3.3.1 がん細胞と解糖系

グルコースは細胞における主要なエネルギー供給源である。グルコースは細胞に取り込まれた後、一連の酵素反応による代謝を受け、最終的に 2 分子のピルビン酸まで分解される(図 2)。このグルコース異化の過程は解糖系として知られている。その後のピルビン酸代謝は酸素の有無により異なり、好気的条件下ではピルビン酸はミトコンドリアにおいてアセチル-CoA に変換され CO_2 まで分解されるが、嫌気的条件下では乳酸デヒドロゲナーゼ(lactate dehydrogenase; LDH)により代謝され乳酸を生成する(乳酸発酵)。解糖系では 1 分子のグルコースから 2 分子の ATPしか生成されないが、好気的条件下でピルビン酸から変換されたアセチル-CoA は、ミトコンドリアのトリカルボン酸(TCA)回路および酸化的リン酸化を経て大量の ATPを産生する.

がん細胞は、その高い増殖能を維持するために特有のエ ネルギー代謝システムを有している.一般に、がん細胞は エネルギーを得るために、ATP 産生効率が高いミトコン ドリアにおける酸化的リン酸化よりも解糖系を主に利用し ている、そのため、がん細胞ではグルコースの取り込みが 著しく増加し、乳酸の生成が増加している. がん細胞にお けるこのようなエネルギー代謝プロファイルの変化は, ワールブルグ効果として知られている[6]. LDH によるピ ルビン酸の乳酸発酵は、グリセルアルデヒド3-リン酸 (glyceraldehyde 3-phosphate; G3P) を1, 3-ビスホスホグリ セリン酸 (1,3-bisphosphoglycerate; 1,3-BPG) に変換する際 に必要な NAD⁺を再生成するため, この過程は増大した解 糖系フラックスを維持するために機能している. がん細胞 と正常細胞の間のエネルギー代謝のこのような違いが、が ん細胞が NTAPP に対して高い感受性を示すことに寄与し ている可能性が考えられている.

3.3.2 NTAPP による解糖系の阻害

PAM 処理が神経膠芽腫 U251SP 細胞の解糖系に影響を 及ぼすことが報告されている[14]. メタボロミクス解析に より、PAM で処理した U251SP 細胞では G3P 量が上昇 し、3-ホスホグリセリン酸(3-phosphoglycerate; 3-PG)量 が低下することが判明した. グリセルアルデヒド-3-リン 酸デヒドロゲナーゼ (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) は、NAD⁺の存在下でG3Pを1,3-BPG に変換する酵素であり、この反応は解糖系の律速段階と なっている. この反応に続いて、1,3-BPGがホスホグリセリ ン酸キナーゼにより3-PGに変換されるとき、ADPから ATPが生成される(図2). それゆえ, GAPDHの基質であ るG3Pの蓄積はGAPDHの阻害が起きていることを示して おり、PAMによる解糖系の抑制は細胞内 ATP を減少させ ると推察される. 多くのがん細胞は ATP 供給を解糖系に 依存しているため、PAM による解糖系の抑制はがん細胞 の生存に影響を及ぼすと考えられる.

GAPDH は酸化ストレスに対して感受性が高いことが知られている. H_2O_2 処理により心筋細胞でグルコース代謝の

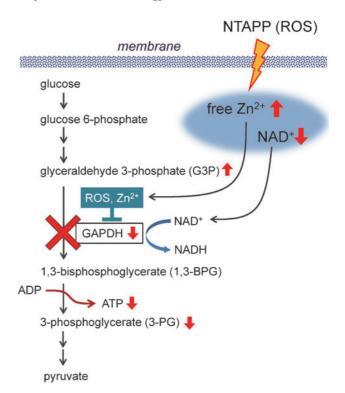


図2 NTAPP 照射による解糖系の阻害.

抑制が認められるが、H₂O₂によりGAPDHの活性は著しく 阻害される一方で、他の解糖系酵素の酵素活性はほとんど 影響を受けない[15]. また, H₂O₂ による GAPDH の阻害は その活性部位に存在するシステインのチオール基の酸化修 飾により生じることが報告されている[16]. それゆえ, PAM による解糖系の抑制は、PAM 中に含まれている高濃 度の H₂O₂ による GAPDH 阻害が関与していると推察され る(図2).解糖系におけるグルコース代謝の阻害は、がん 細胞におけるエネルギー産生を低下させることから,がん 治療の有望な戦略の一つである. Kaushik らは[17], THP-1細胞や U937細胞などの単球系細胞株に NTAPP を 直接照射したとき, 2-デオキシ-D-グルコース (2-deoxy-D-glucose; 2-DG) 存在下では NTAPP の細胞傷害性が増強 されることを報告している. NTAPP 照射と2-DGの併用処 理は細胞内 ATP の枯渇を誘引し、この併用処理は正常な 末梢血単核細胞よりもがん細胞でより効果的であった。細 胞内に取り込まれた2-DGは、ヘキソキナーゼにより2-デオキ シ-D-グルコース-6-リン酸(2-deoxy-D-glucose-6-phosphate; 2DG-6-P) に変換されるが、2DG-6-P はそれ以上代謝されな いため,2DG-6-P が蓄積し,グルコース-6-リン酸イソメ ラーゼの阻害を引き起こす. それゆえ, 2-DG は解糖経路の 最初の段階を阻害する, 実際, 2-DG の投与は, 放射線や抗 がん剤の抗がん効果を高めることも示されている[18]. し たがって、解糖系を阻害する薬物との併用は NTAPP の抗 がん活性を増大させるのに有効であると考えられる.

3.3.3 NTAPP による細胞内 NAD⁺の低下

NAD⁺は生体における酸化還元反応を担う重要な補酵素であり、エネルギー産生、DNA 修復、遺伝子発現など多様な生理機能の発現に寄与している。高い増殖能を有するがん細胞は、その代謝需要を満たすために NAD⁺の代謝回転

が速く、NAD+の供給はニコチンアミド(nicotineamide; NAM)からNAD+を再合成するサルベージ経路に依存している(図3). 解糖系においても、NAD+はGAPDHによるG3Pから1,3-BPGへの変換に必須である. それゆえ、NAD+の著しい欠乏は解糖系の律速段階であるGAPDHの反応を阻害し、細胞内ATPを枯渇させ、エネルギー不足を伴う細胞死を誘導する[19]. 実際、細胞内NAD+低下を抑制するピルビン酸の投与はPAMによる細胞障害を抑制することから、PAMによる細胞死は細胞内NAD+低下により引き起こされていると考えられる[5]. 一方で、我々は、ピルビン酸の存在下では、PAM中の H_2O_2 量が減少することからピルビン酸自体が抗酸化剤として機能も有していることを報告している[5]. それゆえ、PAMの細胞傷害の抑制はピルビン酸の抗酸化作用が関与している可能性も否定できない.

NTAPP 照射が細胞内 NAD+を減少させる原因の一つ に、ポリ[ADP-リボース]ポリメラーゼ-1 (Poly[ADPribose|polymerase 1; PARP-1) の関与が指摘されている. PARP-1 は、NAD⁺を利用してポリ[ADP-リボース]を形 成する酵素であり、標的となるタンパク質のポリ ADP リ ボシル化を促進する.この酵素は、DNA 複製、DNA 修復、 アポトーシスなど様々な反応で重要な役割を担っている. PARP-1 は、DNA 損傷誘導剤や放射線により DNA 損傷を 受けた後, DNA 損傷部位にリクルートされ, PARP-1 自身 や DNA 修復関連タンパク質の ADP リボシル化を促進す る. PARP-1 欠損症では放射線による DNA 損傷や細胞毒性 に対する感受性が高くなることから、この酵素は DNA 損 傷の修復に必要な酵素であると考えられる. しかし一方 で、PARP-1 の過剰な活性化は著しい NAD+の消費を促進 し、ATP 枯渇に伴う細胞死を引き起こす。実際に、PAM で細胞を処理したとき、PARP-1の活性化が亢進し、細胞 内 NAD⁺および ATP 量は減少した[5,7]. また、PARP-1 阻害剤は、PAMによる細胞死を抑制した、これらの結果か ら, PARP-1によるNAD⁺の過剰消費はPAM誘導細胞死の 主要な要因であることが推察される(図3). さらに, PARP-1 の過剰な活性化より生じるポリ [ADP - リボース]

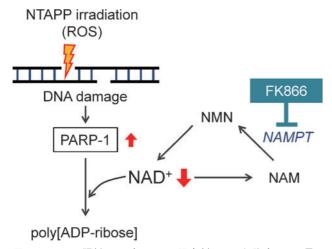


図3 NTAPP照射および NAMPT阻害剤による細胞内 NAD+量の 低下の機序.

の細胞内蓄積はミトコンドリアからアポトーシス誘導因子 (AIF)やチトクローム c の放出を促進することで、細胞死のシグナル伝達を誘発することも報告されている.

また、神経細胞の過剰な Zn^{2+} 曝露は、細胞内の $NAD^+ \nu$ ベルを低下させ、 GAPDH 活性を抑制することが報告されている [20]. それゆえ、 ROS に加え、 PAM による解糖系の阻害には、遊離した Zn^{2+} が部分的に関与している可能性もある(図 2).

3.3.4 ニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラー ゼ阻害剤の併用効果

上述したように、NAD⁺のサルベージ経路はがんの増殖に重要な役割を担っている。NAD⁺のサルベージ経路の律速酵素であるニコチンアミドホスホリボシルトランスフェラーゼ(nicotinamide phosphoribosyltransferase; NAMPT)は、NAMからNAD⁺前駆体であるニコチンアミドモノヌクレオチド(nicotinamide mononucleotide; NMN)を生成する酵素で、多くのがん細胞でその発現が亢進している[21].FK866などのNAMPT阻害剤は、細胞内のNAD⁺およびATPを枯渇させ、がん選択的な細胞傷害を誘導することから[22]、NAMPTは抗がん剤開発の有用なターゲットの一つに挙げられてる。

FK866は細胞内 NAD⁺レベルを低下させることで, がん 細胞におけるGAPDHの反応を阻害するため、我々はPAM の抗がん効果は FK866 との併用により増強されるとの仮 説を立てた (図3). そこで, PAMと FK866 の併用効果を 確かめたところ、乳がん MDA-MB-231 細胞において、 PAM 単独処理に比較し PAM と FK866 の併用により著し い細胞死が引き起こされた[23]. FK866 は細胞内 NAD+ を減少させ、細胞内 ATP の枯渇を引き起こすことから、 PAMとFK866の併用療法は細胞内のエネルギー産生を効 率的に阻害すると推察される。また、PAMとFK866の併 用により、MDA-MB-231 細胞の細胞内 ROS が増大するこ とも確認された、このROSの亢進はNAD+の減少による抗 酸化酵素の活性低下が関与している可能性がある。これら の結果から、FK866などのNAMPT阻害剤との併用は、 PAM の抗がん活性を高めるのに効果的であると考えられ る.

3.4 NTAPP によるミトコンドリア障害

3.4.1 トリカルボン酸回路の阻害

細胞のエネルギー産生を担うミトコンドリアは、酸化的リン酸化により ATPを生産している。そのため、ミトコンドリアの機能不全により、細胞はエネルギー不足に陥る。トリカルボン酸(TCA)回路(Krebs 回路またはクエン酸回路とも呼ばれている)は、ミトコンドリア内に存在している 8 つの酵素から構成されている。これらの酵素は、酸化的リン酸化で利用される還元型補酵素 NADH と FADH2を生成する一連の反応を行っている。 TCA 回路の 2 つの酵素、アコニターゼと α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (α -ketoglutarate dehydrogenase; KGDH)は、酸化ストレスの影響を受けやすいことが知られている [24]。

直接的および間接的 NTAPP 照射はともにミトコンドリ

ア機能を低下させる. ケラチノサイト細胞株 HaCaT 細胞 を He あるいは He-N₂プラズマを照射した PBS にて処理し たとき、ミトコンドリアのアコニターゼおよび KGDHの不 活性化や、ミトコンドリア活性の低下が認められた[25]. 我々もPAMで処理したSH-SY5Y細胞においてアコニター ゼ活性が低下することを報告している[26]. また, PAM によるアコニターゼの阻害は Zn²⁺キレート剤 TPEN によ り抑制された. 精製アコニターゼを用いた実験では、Zn²⁺ はアコニターゼ活性を直接阻害することも報告されている [27]. さらに、KGDHの活性も Zn^{2+} によって強く阻害され る[28]. このことは、ROS に加え、遊離 Zn²⁺も NTAPP 誘発される TCA 回路の阻害やミトコンドリア機能障害に 関与していることを示唆している.一方, Kurake らは [14],メタボローム解析を行い、PAM で処理した細胞で は TCA サイクルに関連する代謝物のレベルが変化しない ことを報告している. この結果の差異の理由は不明である が、NTAPP 照射液中の ROS/RNS 量の違いや、NTAPP 照射液の処理時間の違いが細胞の代謝に影響を与えている のかもしれない.

3.4.2 電子伝達経路の阻害

好気的条件下ではミトコンドリアにおける酸化的リン酸化を介して、大部分のATPは生成されている。酸化的リン酸化の過程は、ミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系(ETC)の4つの主要なタンパク質複合体(I~IV)と F_0F_1 -ATP合成酵素(複合体 V としても知られている)で構成されている。細胞に取り込まれた酸素の約95%は、複合体IVとしても知られるチトクロームc酸化酵素によって代謝され、2分子の水を生成するが、全酸素の数%は消費されず、ROSの生成につながる。それゆえ、ミトコンドリアは、生理的あるいは病理学的条件下での細胞内ROSの主な発生源であると考えられ、細胞傷害に関与していることが指摘されている。

これまでに、いくつかの種類のがん細胞において、 NTAPP の直接および間接照射によりミトコンドリアにお ける ROS 産生が増加することが報告されている. 現在, そ のメカニズムは完全には解明されていないが、PAM 中の ROSによる ETC 複合体の阻害、ミトコンドリア膜電位 $(\Delta \phi)$ の消失などのミトコンドリア障害がミトコンドリア 由来の ROS の産生亢進を引き起こしていると考えられる. 実際、複合体 I~III は酸化およびニトロ化ストレスの影響 を受けやすく、ROS/RNS はこれら複合体の活性を直接阻 害する[29]. また、複合体 I のレドックス感受性チオール のグルタチオニル化は、複合体Iの酵素活性を低下させ、 スーパーオキシドアニオンの生成を増加させることも報告 されている[30]. 我々も, △φ の検出試薬 JC-1 を用いた蛍 光イメージングにより、がん細胞を PAM で処理したとき、 $\Delta \phi$ が低下することを明らかにしている[5]. さらに、ヒト 神経芽腫SH-SY5Y細胞において、Zn²⁺キレーターのTPEN がPAMによるミトコンドリアのROS産生を抑制すること から、PAMにより遊離したZn²⁺がこの現象に関与してい ることも考えられる. 実際, Zn²⁺自身がミトコンドリア ETC を阻害し、ミトコンドリアの脱分極と機能不全を引き

起こすことが報告されている[31]. それゆえ, 細胞内の Zn²⁺は, 部分的には, PAM誘発ミトコンドリア機能不全にも関与している可能性も考えられる. これらの結果から, NTAPP 照射により生成した ROS は, ミトコンドリア機能障害やミトコンドリア ROS の産生に密接に関与していると考えられる.

一方、田中らは[32]、NTAPP 照射乳酸リンゲル溶液 (PAL) 中には ROS が存在するにもかかわらず、PAL で処理したヒト神経膠芽腫 U251SP細胞では ROS の産生増加が認められないことを報告している。これらの実験結果の差異は、実験条件の違い(NTAPP源、溶液の種類、処理時間、細胞の種類など)が NTAPP 誘導性ミトコンドリアの ROS 産生に影響を与えている可能性がある。NTAPP 処理後の細胞内 ROS 産生の詳細なメカニズムを解明するためには、さらなる研究が必要である。

3.5 まとめ

NTAPP 照射によって生成された ROS/RNS は、タンパ ク質の酸化修飾、細胞内 NAD+量の減少、Zn²⁺の遊離など 様々な細胞応答を誘発し、解糖系の阻害やミトコンドリア 機能障害を引き起こす. がん細胞は, 正常細胞とはエネル ギー代謝プロファイルが異なっており, 主に解糖系を利用 して細胞のエネルギー需要を満たしている. それゆえ, NTAPP 照射により生じる NAD+の減少は、がん細胞で亢 進している解糖系の阻害することで、がん細胞におけるエ ネルギー産生を抑制すると考えられる. NTAPP 照射が, 正常細胞に比べ、がん細胞に対して感受性が高い理由の一 つにはこのようながん細胞特有のエネルギー代謝が関与し ていると推察される. 一方, H_2O_2 や NO_2 の培養液中への添 加ではPAMによる細胞死を完全には再現しないことから, 同定されていない因子が解糖系などの阻害に関与している 可能性もある. 近年, NTAPP の抗がん活性のメカニズム の解明は大きく進展したが、未だ十分に理解できたとはい えず、安心・安全なプラズマ医療を提供するためには、さ らなる研究の飛躍が期待される.

謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP26460630 および 17K08957 の助成を受けたものである.

- [1] S. Arndt et al., PLoS One 8, e79325 (2013).
- [2] K. Miyamoto *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. **605**, 95 (2016).
- [3] H. Tanaka et al., Plasma Med. 1, 265 (2011).
- [4] H. Tanaka et al., Sci. Rep. 6, 36282 (2016).
- [5] T. Adachi et al., Free Radic Biol. Med. 79, 28 (2015).
- [6] M.V. Liberti and J.W. Locasale, Trends Biochem. Sci. 41, 211 (2016).
- [7] H. Hara et al., Arch. Biochem. Biophys. 584, 51 (2015).
- [8] C. Cantó et al., Cell Metab. 22, 31 (2015).
- [9] Y. Gorbanev et al., Chemistry 22, 3496 (2016).
- [10] M.U. Rehman *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. **605**, 19 (2016).

- [11] N. Kurake et al., Arch. Biochem. Biophys. 605, 102 (2016).
- [12] J.W. Lackmann et al., Sci. Rep. 8, 7736 (2018).
- [13] E. Aizenman et al., J. Neurochem. 75, 1878 (2000).
- [14] N. Kurake et al., Arch. Biochem. Biophys. 662, 83 (2019).
- [15] D.R. Janero *et al.*, Am. J. Physiol, Cell Physiol. **266**, C179 (1994).
- [16] S. Hara *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. **456**, 339 (2015).
- [17] N. Kaushik et al., Sci. Rep. 5, 8587 (2015).
- [18] D. Zhang et al., Cancer Lett. 355, 176 (2014).
- [19] C.T. Sheline et al., J. Neurosci. 20, 3139 (2000).
- [20] K.E. Dineley et al., J. Neurochem. 85, 563 (2003).
- [21] S. Chowdhry et al., Nature 569, 570 (2019).
- [22] M. Hasmann and I. Schemainda, Cancer Res. 63, 7436

(2003).

- [23] M. Nagaya et al., Arch. Biochem. Biophys. 676, 108155 (2019).
- [24] A.L. McLain et al., Free Radic. Res. 45, 29 (2011).
- [25] M. Dezest et al., Sci. Rep. 7, 41163 (2017).
- [26] H. Hara et al., Free Radic. Res. 51, 306 (2017).
- [27] L.C. Costello et al., J. Biol. Chem. 272, 28875 (1997).
- [28] A.M. Brown et al., J. Biol. Chem. 275, 13441 (2000).
- [29] J.P. Bolaños et al., Free Radic. Biol. Med. 21, 995 (1996).
- [30] E.R. Taylor et al., J. Biol. Chem. 278, 19603 (2003).
- [31] T.A. Link and G. von Jagow, J. Biol. Chem. **270**, 25001 (1995).
- [32] H. Tanaka et al., Sci. Rep. 9, 13657 (2019).



小特集 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

4. がん治療をめざした大気圧プラズマによるアポトーシス機構の解明 --物理的・化学的増感をめざして---

4. Elucidation of Mechanism of Apoptosis Induced by Cold Atmospheric Plasma toward to Cancer Therapy -Sensitization by Physical and Chemical Modalities-

近藤 隆

KONDO Takashi

富山大学学術研究部医学系・放射線診断治療学講座・放射線腫瘍学部門

(原稿受付:2020年11月10日)

大気圧プラズマによる細胞死(アポトーシス)とその増強を試みた.温熱は物理的にプラズマによるアポトーシスを増強した.一方,放射線との併用では、相加的増強に留まった.細胞内グルタチオンを減らすスルファサラジンは化学的に、プラズマによるアポトーシスを増強した.また、最近の研究では、金ナノ粒子(2 nm)がプラズマによるアポトーシスを増強することが判明した。大気圧プラズマのがん細胞致死効果の特異性が期待されており、今後のいかにこの効率を高めるか期待されている.

Keywords:

Cold atmospheric plasma, apoptosis, glutathione, sulfasalazine, hyperthermia, radiation, cancer therapy

4.1 はじめに

プラズマは固体・液体・気体に続く物質の第4の状態である。狭義のプラズマは、気体を構成する分子が電離し、陽イオンと電子に分かれて運動している状態であり、電離気体に相当する。真空で発生するプラズマは半導体加工技術に広く用いられ、熱プラズマも治療に使われている。胃や鼻腔表面の組織凝固壊死を誘導する熱凝固装置である。近年、低温大気圧プラズマ技術の発展が目覚ましく、止血、がん治療、遺伝子・薬物導入、殺菌・滅菌、創傷治療等、多くの医療分野への利用が注目されている。

比較のため4つの物理的因子の特徴をまとめた(**図1**). 放射線はその光子エネルギーが高く,化学反応も速い.超

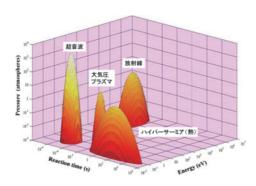


図 1 物理学的 4 因子の特徴. 各物理的因子の特徴をエネルギー (eV), 圧力(atm), および反応速度(秒)で表す.

音波の特徴は高い圧力であり、ハイパーサーミア(熱)のそれは緩やかな反応速度と低い一分子あたりのエネルギーである。大気圧プラズマの特徴はこれら3因子の中間に位置する(図1)[1]. 但し、生体に加わるエネルギーの総量では、超音波やハイパーサーミアの方が放射線に比べて、桁違いに大きい。

4.2 がん治療の様式

がんを治療する場合は、手術療法・化学療法(免疫チェックポイント阻害剤を含む)・放射線療法の三大療法が中心である。このうち手術と放射線治療は局所療法である。放射線治療は物理的治療法で、高エネルギー X 線が多用されるが、陽子線や炭素線等の粒子線が加わり、多くの種類が利用されている。物理的治療法には温熱療法やアブレーション(焼灼)療法があり、最近では光照射と増感剤(薬)の併用療法も進んでいる(図 2)。

4.3 放射線がん治療

放射線治療法とは X 線等の放射線照射することにより、がん細胞に細胞死を誘発し、また、細胞分裂による増殖能力をなくすことによりがん腫瘍の増殖を抑える方法である.最近では治療機器や照射方法の進歩により、正常な細胞・組織に与える損傷が少なくなってきた.そのため、多くのがんが治療対象になり、他の療法との併用も可能であることからその利用は拡大している.

 $Division\ of\ Radiation\ Oncology,\ Department\ of\ Radiology,\ Faculty\ of\ Medicine,\ Toyama\ University,\ TOYAMA\ 930-0194,\ Japan$

corresponding author's e-mail: kondot@med.u-toyama.ac.jp

物理的方法

- ・放射線(アルファ線、ベータ線、ガンマ線、X線、電子線、 陽子線、重粒子線、中性子線)
- 陽士禄、里粒士禄、甲性士禄) ・温熱(ハイパーサーミア)(ラジオ波)
- ・アブレーション(マイクロ波、ラジオ波、超音波)

化学的方法

- •抗がん剤*
- ・免疫チェックポイント阻害剤*

物理+化学的方法

- ·光力学的治療、光免疫治療
 - *全身療法であり、他は局所療法である。

図 2 がん治療の物理的・化学的様式.がん治療法を物理学的方法,化学的方法,および両者併用法として分類した.このうち,化学療法は全身療法であるが,他はすべて局所療法である.

放射線の作用は原子・分子の励起・電離である。これにより、水分子が分解されて、各種活性種が生じる(図3)。直接、標的分子であるDNA等に損傷が生じる場合(直接作用)と周囲の水分子が励起・電離されて生じる活性酸素種が標的分子に作用し、損傷が生じる場合(間接作用)があり、X線の場合には後者が約7割とされており、活性酸素種の役割は大きい(図4)。

4.4 温熱によるがん治療

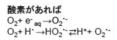
発熱患者の腫瘍が消失した例等の歴史的知見からがん組

励起 $H_2O \rightarrow H_2O^* \rightarrow OH + H^*$

電離

 $H_2O \rightarrow H_2O \cdot + e$: $H_2O + H_2O \cdot \rightarrow H_3O^*_{aq} + OH$ $e^- + H_2O \rightarrow OH^- + H^$ $e^- + nH_2O \rightarrow e^-_{aq}$ (水和電子)

イオンやラジカルの再結合 $H_3O^+_{aq}+e^-_{aq}\rightarrow H^++H_2O^ \cdot OH+^+OH\rightarrow H_2O_2^ H^++H^+\rightarrow H_2^-$



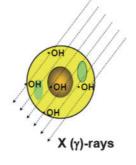


図3 放射線による活性酸素生成.放射線による水分子の励起および電離により活性種が生成する.これらは、再結合し、過酸化水素等、より安定な活性酸素種となる.酸素が存在するとスーパーオキシドが生成し、還元性分子から酸化性分子へ変わる.これらの反応は細胞内に起きる.

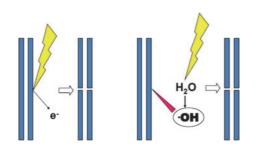


図4 放射線の直接作用と間接作用. 放射線による励起および電離により標的分子の損傷が生成する. これを直接作用と呼ぶ. 一方, 水分子の励起および電離により生成する活性酸素種による標的分子の損傷が生成する. これを間接作用と呼び, X線等の低 LET 放射線では約7割の生物作用を担う.

織は正常組織に比べ熱に弱いことがわかってきた. 細胞は 40℃を超えると死にはじめ、大きながん組織の性状であ る, pH や酸素分圧が低い状態は熱感受性を上げる. 特に 42.5℃ 以上の温度では、タンパク質の変性を誘発、細胞死 が顕著となる.外部からの電磁波エネルギーを与え 42.5℃ 以上に腫瘍部を加温しがん治療する試みがハイパーサーミ アである. がん組織と正常組織に同時に加えても正常組織 は血管が拡張して血流が増え, 放熱しやすいが, がん組織 はほとんど血管の拡張が無く,血流が少なく,蓄熱しやす い. 放射線に抵抗性の S 期細胞は温熱感受性であり、温度 が高いと放射線による細胞致死効果も上がる, 加えて抗が ん剤の効果を増強する等の特長を有し、ハイパーサーミア 治療は正常組織へのダメージは少なく、がんの病巣領域を 治療することができるものと期待されている.一方、正確 な標的部位の加温やリアルタイムでの組織内温度の把握等 の課題もある.

ハイパーサーミアの細胞に対する作用は細胞膜の流動性や透過性の向上、タンパク質の高次構造の変化、および細胞内活性酸素の生成である。各温度の生物・生体作用を図5に示す。

4.5 細胞死の誘導

がん治療の基本はがん細胞死の誘導であり、細胞増殖の抑制である。以前はがん細胞のコロニー形成能を指標に治療の在り方が研究されてきたが、細胞死にも各種あり、最近では遺伝子制御された細胞死(アポトーシス)が注目されてきた。アポトーシスとはあらかじめ決められた(遺伝子制御された)メカニズムに従って、刺激が入ると順次生化学的に分子が活性化して細胞が能動的に自滅する現象である。以下に放射線アポトーシスの例を示す(図 6)。

細胞膜の破壊や細胞内容物の漏出を伴う病理形態学的な壊死(ネクローシス)は古くより認識されていた。比較的高い線量の照射後に認められる組織の炎症はこれによる。一方,放射線照射後の早期に,細胞核が濃縮する形態学的変化は,ピクノーシスとして知られていたものの,アポトーシスの概念が導入されて以来,胸腺細胞や白血病細胞株を用いた研究により放射線アポトーシスの基礎的知見が得られた。これらの細胞は数Gyの照射後,数時間で十分なアポトーシスを起こす。一方で,がん細胞の中にも早期に

- 37 ℃以下 正常領域
- 38~39 ℃ 境界領域
- 40~42 °C マイルドハイパーサーミア領域 遺伝子発現の変化、細内代謝の変化、細胞膜 の変化、アポトーシスの誘導、熱耐性の獲得
- ====42.5 °C============
- 43~45°C ハイパーサーミア領域

タンパク質の変性、細胞内小器官の構造変化 アポトーシスからネクローシスへの転換

- ・56 °C ・60 °C以上
- 補体の不活化温度 高温度治療域(凝固・壊死)

アブレーション治療

図 5 温度の生物・生体作用.熱の生物作用・生体作用は温度に 依存する.温熱誘発細胞死については、42.5℃ を境界とし て、作用機序が大きく異なる.

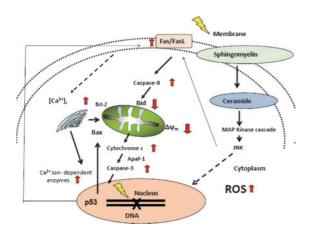


図 6 放射線によるアポトーシスのメカニズム. 放射線のよる主たるアポトーシス経路して、ミトコンドリアを介して下流のカスペースが活性化する経路があり、放射線アポトーシス経路として多く報告されているのは、1)DNA 損傷を起点とする p53 依存性経路であり、他に 2)細胞膜に由来する Ca²⁺介在経路である. Fas/FasL介在経路には p53依存性の DNA 損傷が起点となる場合と細胞内活性酸素による場合がある. Ca²⁺の増加は細胞内のカルパインをはじめとするや Ca²⁺依存性酵素類を活性化する. その Ca²⁺は細胞外からの導入も重要であるが、ミトコンドリアや小胞体に貯蔵されており、これらが複雑に協調してアポトーシス制御に働くと思われる.

アポトーシスを起こす細胞もあるが多くはアポトーシスを起こしにくく,また,アポトーシスを起こす場合でも多くの時間を必要とし増殖を介して細胞死を呈する. 照射後の発現経過も多様で,分裂期崩壊や老化様細胞死 (増殖停止)を経てアポトーシスに至ると考えられる.

放射線照射後に多く細胞分裂の異常を生じ、分裂期に停止して直接死滅する際の主たる細胞死が分裂期崩壊である。この分裂期崩壊がおこるためには、M期チェックポイントが正常に働くことが必要とされている。放射線を照射した細胞の経時的観察で、異常な細胞分裂(不完全分裂)を起こすことは知られていたが、その変化は多様で、二核細胞や多核細胞の形成、多極分裂等があるが、分子機構はまだ不明な点が多い。老化様細胞死は、放射線照射後、細胞の代謝は行われているが細胞増殖が不可逆的に G1 期で停止した状態を示す。G1 期停止機能を失ったがん細胞では、異常分裂を経て、多核あるいは巨核細胞となって増殖を停止する。指標として老化関連ベータ・ガラクトシダーゼ染色で陽性となる。放射線によりオートファジーも誘発され、オートファジーとアポトーシスがバランスをとり細胞死を制御している。

大気圧プラズマについても同様で細胞死の全体像を示す場合でも細胞死に至る過程は多様であり、また時間依存性に変化する(図7).

最近,大気圧プラズマによる細胞死として従来の分類に 属さない特異的な細胞死が報告されている[2].

4.6 大気圧プラズマによる細胞死,アポトーシス

大気圧プラズマは多量の活性酸素種を生成することが知られている。そこで、大気圧アルゴン (Ar) プラズマと X線の生物効果についてヒトリンパ腫細胞株 U937 を用いて

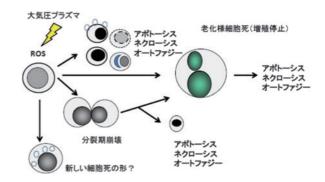


図7 大気圧プラズマによる細胞死の例. 大気圧プラズマにおいても直接、アポトーシス、ネクローシス、オートファジーの形態学的細胞死を示す場合と分裂期崩壊および老化様細胞死(増殖停止)を経て、細胞死に至る過程があると思われる.

アポトーシス (細胞死) を指標に両者を比較した. その結 果 Ar プラズマ 1 分間の照射では15%アポトーシスが誘発 された. また、X線では同様の効果を得るのに吸収線量で 7.5 Gy (J/kg) が必要であった. Ar プラズマと X 線により 生成された OH 量を DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-Noxide) をスピン補捉剤として用いてEPR (Electron Paramagnetic Resonance; ESR とも称する) - スピン補捉法 で定量比較した. Ar プラズマ 1 分間照射時の OH 量は約 $5.8 \times 10^{-5} \,\mathrm{M}$ (ニトロキシドに換算して) であった. ま た、X線照射で同様の収率を得るには、225 Gvを必要とし た. 従って、液中で生成する *OH 量を同一生物学的効果 (U937 を用いてアポトーシスが15%生成する条件) で比較 すると X 線より約30(225/7.5)倍多いことになる. 即ち, 大 気圧プラズマは極めて効率の高い活性酸素生成源と言える [3]. 逆に,放射線の側から見ると OH は細胞内に生成し た場合に細胞死の誘発に有効であるが、細胞外に生成し た*OHは効率が低いとも言える. これら大量にしかし細胞 外に生成した活性酸素種を如何に細胞内へ導入するか、ま た,細胞側の抗酸化性を如何に低減するかが,大気圧プラ ズマ誘発細胞死の増強に重要である.

4.7 大気圧プラズマによる細胞死の増強

大気圧プラズマが水溶液中に多量に活性酸素種を生成することが判明した.この活性酸素種をさらに細胞内に効率よく導入きる方法を探索する試みで、細胞膜透過性の亢進が判明しているハイパーサーミアを併用した.さらに、放射線は細胞膜の透過性亢進と自身が細胞内に効率よく活性酸素種を生成するので、その両面から併用効果を期待して、アポトーシスの生成を指標に調べた.その結果、ハイパーサーミアとの併用では細胞死に関して相乗的効果が得られたが、放射線との併用では相加的であった.ハイパーサーミア併用による活性酸素種の細胞外から内への導入効果が顕著で、両者を合わせた「プラズマサーミア」が提唱される(図8)[4].

さらに、化学的にプラズマによるアポトーシス誘導を増強する方法として、細胞内グルタチオン(GSH)量を低下させるためシステイントランスポータ阻害剤であるスルファサラジン(SSZ)を用いた。SSZ 処理により、GSH

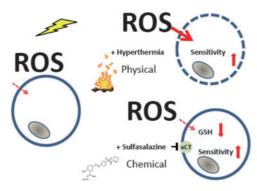


図8 大気圧プラズマによる細胞死の物理的および化学的方法. プラズマ照射に対して温熱 (ハイパーサーミア)を併用し, 細胞膜の透過性の亢進により細胞外にできた活性種の細胞 内導入を図る手法とスルファサラジンにより,細胞内の GSH を減少させて,活性種に対する感受性を高める方法が 考えられる.

の材料となるシステインの細胞内への取り込みが阻害され、その結果、細胞の抗酸化性が低下すると考えられる.また、その効果を放射線のそれと比較した. SSZ 添加によりプラズマおよび放射線照射に対して同程度のアポトーシス増強効果を示したが、細胞外に多量の活性酸素種を生成するプラズマと細胞内にも生成する放射線では、Fas 発現の有無、カスペース発現の差等その増強機構は異なることが判明した(図9)[5].

4.8 大気圧プラズマ誘発アポトーシスに与える 金属ナノ粒子の影響

金属をナノ(10億分の1メートルサイズ)のスケールまで微小化すると一般の特性とは異なる性質をあらわすことがある。また、ナノサイズ粒子には、①比表面積が大きく生体分子の多量結合が可能、②適切な表面加工で生体内循環性が向上、③EPR(Enhanced permeation and retention)効果による腫瘍集積性向上、などの特徴がある。このようなナノ粒子の特性を生かし、診断や治療に応用する試みは"ナノメディシン"の一つとして注目を集めている。すでに放射線科学の分野では一例として金ナノ粒子を放射線増感剤としてがん治療に役立てようとする試みがされている。

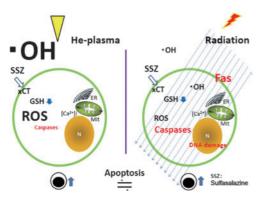


図 9 プラズマおよび放射線誘発アポトーシスに与えるスルファサラジンの影響.システイントランスポータ阻害剤であるスルファサラジン (SSZ) は細胞内の GSH を減少させて、活性種に対する感受性を高めた.プラズマおよび放射線照射に対して同程度のアポトーシス増強効果を示したが、細胞外に多量の活性種を生成するプラズマと細胞内に活性種を生成する放射線では、その増強機構は異なる.

東京大学 宮本研究室で開発された白金ナノ粒子 (Nano-Pt) は、カタラーゼおよびスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を示すことが報告され、我々も、この Nano-Pt を用いて、放射線によるアポトーシス誘導に対して如何に作用するかを調べた。その結果、放射線により誘導される細胞内酸化ストレスを抑制し、さらにアポトーシス頻度も低下させることが判明した。U937 細胞に対して He プラズマ照射は顕著なアポトーシスの生成を誘導するので、細胞内活性酸素種の除去に Nano-Pt を利用して、アポトーシスおよびその関連指標への影響を検討したところ、有意な細胞内活性酸素種の低下およびアポトーシス抑制効果を認めた (図10)[6].

Nano-Pt は抗酸化活性を有し、大気圧プラズマで誘発されるアポトーシスを抑制したが、抗酸化活性がないと思われる金ナノ粒子の影響について検討した。その結果、Nano-Pt と同様の2 nm サイズの金ナノ粒子は He プラズマ誘発アポトーシスを増強した。他方、サイズの大きな40および100 nm サイズの金ナノ粒子での効果はなかった。その原因として細胞内GSHの低下が考えられるが、メカニズムの詳細については、今後の検討課題である(図11)[7].

4.9 今後の展望

低温大気圧プラズマのライフサイエンスへの応用には、相互作用の本質を決定する「プラズマで生成される活性な粒子と生体との反応」を照射側と生体側の両立場で分子レベルから捉えて、プラズマの生体への影響を解明し、相互作用を定量的に評価することが不可欠となる。今後、プラズマドーズの標準化を含めこの分野のさらなる発展に期待

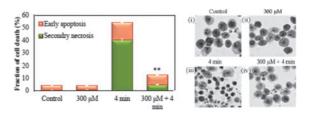


図10 白金ナノ粒子による He プラズマ誘発アポトーシスの防護効果. カタラーゼ, SOD 活性を有する白金ナノ粒子(300 μ M)の添加は、He プラズマ(4 分照射)によるアポトーシスを抑制した(左図). 右図はギムザ染色による細胞形態像を示す.

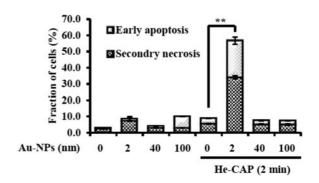


図11 金ナノ粒子による He プラズマ誘発アポトーシスの増強効果.金ナノ粒子(2 nm)の添加は、He プラズマによるアポトーシスを増強した.一方、サイズの異なる40および 100 nm 金ナノ粒子に増強効果はなかった.

したい. 放射線は吸収線量の概念が明確であり、初期過程の解明も進んでいるので、大気圧プラズマとの比較対象の様式として有用である[8].

近年の研究により、がんや様々な内臓疾患、神経疾患などの多くの疾病、様々な生活習慣病、また老化現象とフリーラジカルや活性酸素との関連が指摘されている。その予防のための抗酸化機能食品・補助食品等の開発が行われており、医薬品でも抗酸化機能が再認識されている。このため、大気圧プラズマは簡便にかつ大量の活性酸素種を定量的に生成する装置として利用する価値は極めて高い。最近、大気圧プラズマの研究発展は目覚ましく多くの生物学的影響が報告され、また、がん治療を初めとして幅広い医療応用のみならずバイオ全般に利用する可能性も広がってきた。今後は大気圧プラズマの生物効果を如何に修飾する

か検討すべき課題も多くあり、今後の発展が望まれる.

- [1] T. Kondo *et al.*, *Plasma Medical Science* (Academic Press, Cambridge, 2018) p.133.
- [2] D Yan et al., Oncotarget 8, 15977 (2017).
- [3] H. Uchiyama et al., PLoS One. 10, e0136956 (2015).
- [4] R. Moniruzzaman et al., Sci. Rep 7, 11659 (2017).
- [5] R. Moniruzzaman *et al.*, Free Radic. Biol. Med. **129**, 537 (2018).
- [6] P. Jawaid et al., J. Cell Mol Med. 20, 1737 (2016).
- [7] P. Jawaid et al., Cell Death Discov. 6, 83 (2020).
- [8] M.U. Rehman *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. **605**, 19 (2016).

•

小特集 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

5. マウスへのプラズマ照射でみられる免疫を介した抗腫瘍効果

5. Antitumor Immune Response Induced by Plasma Irradiation in Mice

小野 亮 ONO Ryo 東京大学

(原稿受付:2020年9月3日)

プラズマをがんの免疫治療に使える可能性が近年注目を集めている。マウスの悪性腫瘍にプラズマを照射すると、プラズマを照射した腫瘍のみならずマウスの全身の腫瘍に抗腫瘍効果が働く現象が確認されており、免疫との関連が議論されている。本章では、このプラズマによるがんの免疫効果に関する研究例を紹介する。また、同種の現象はがんの放射線治療や光線力学療法などでも広く確認されており、これらの研究例もあわせて紹介する。

Keywords:

immunotherapy, cancer, tumor, mouse, abscopal effect, systemic long-term antitumor effect, plasma, streamer discharge

5.1 はじめに

プラズマでがんを治療する研究が、動物実験で広く行わ れている[1-3]. その多くは悪性腫瘍(がん)にプラズマ を照射して、その腫瘍を縮小あるいは成長鈍化させる研究 である. がん細胞に、プラズマで生成された活性種や高電 界で刺激を与え、がんを弱らせる手法である。このような プラズマによるがんの直接的な治療は, 読者の皆さんも想 像しやすいであろう.一方,プラズマでがんに対するマウ スの免疫を活性化して、その活性化した免疫でマウスの全 身の腫瘍に抗腫瘍効果を与える免疫治療の研究も近年はじ まっている[3-11]. 研究はまだ初期段階で研究例も少な く、免疫がどの程度関与しているのか、どのような機序で 免疫が作用しているのかなど、まだわかっていないことが ほとんどであるが、いくつかの有望な結果が得られてい る. 本章では、このプラズマによるがんの免疫治療に関す る研究を紹介する. 筆者のグループでは、プラズマによる 免疫効果の可能性を示す初期的な動物実験に成功してお り, この研究結果についても紹介する[12,13].

プラズマでがんに対する免疫を誘起すると言われても、本当にそのようなことが起きるのかと疑念を持たれる読者も多いであろう。実は、このようながんに対する免疫効果は、がんの放射線治療や光線力学療法(photodynamic therapy: PDT)では広く確認されている[14-18]. これらの手法も、放射線による刺激や活性種などの刺激を用いており、プラズマとの類似性が高い. その類推から、プラズマでも同様の免疫効果が表れるのではないかと、以前よりプラズマ医療のコミュニティでは考えられてきた[19,20].この仮説が、近年の実験により試されているのが現状である.本章では、放射線治療やPDTにおける免疫関係の研究例も紹介し、このようながんの免疫効果がプラズマでも起

こりうる現象であることを示す.

5.2 プラズマによるがんの免疫関連研究

プラズマによるがんの免疫関連研究を紹介する.

5.2.1 遠達効果

遠達効果は、マウスやヒトの悪性腫瘍に放射線やプラズマを照射したときに、その腫瘍のみならず、離れた箇所にある別の腫瘍にも抗腫瘍効果が働く現象である。例えば右腕の皮膚がんに放射線を照射すると、左腕にある皮膚がんや、あるいは肺に転移した皮膚がんなどにも抗腫瘍効果が働くような現象である。英語では abscopal effect と呼ばれている。この遠達効果の原因のひとつに免疫反応がある。放射線を右腕の皮膚がんに照射すると、その刺激でがんに対する患者の免疫が高まり、その免疫の働きで左腕の皮膚がんも抗腫瘍効果を受ける、というものである。したがってプラズマ照射でこの遠達効果が観察されれば、プラズマががんに対する免疫反応を誘起できることを示唆する一つの証拠となる。

筆者のグループでは、この遠達効果をマウスの腫瘍のプラズマ照射実験で観察することに成功した[12]. 図1のように、マウスの右脚と左脚に皮膚がんの一種であるメラノーマ細胞を皮下注射して腫瘍を作り、右脚のメラノーマ腫瘍にのみプラズマを照射した。プラズマ医療では希ガス大気圧プラズマジェットやバリア放電がよく用いられるが、この実験では筆者のグループ独自のナノ秒パルスストリーマ放電を用いた。プラズマ照射は1日10分間で、連続して5日間照射を行った。右脚と左脚の腫瘍のサイズは日ごとに大きくなり、プラズマ照射後も大きくなり続けるが、この腫瘍の成長速度がプラズマ照射の効果で遅くなるかどうかを測定するため、日ごとの腫瘍サイズの測定を

 $The\ University\ of\ Tokyo$

author's e-mail: ryo-ono@k.u-tokyo.ac.jp

行った.動物実験は個体差によりデータのばらつきが大きいため、ある程度の匹数をそろえて実験を行い統計処理する必要がある.この実験では、プラズマを照射するマウスを5匹程度用意し、これを「プラズマ照射群」とした(図1(a)).一方、プラズマ照射が腫瘍成長速度に与える影響を調べるには、プラズマ照射をしなかった場合のデータも測定する必要がある.この参照用に、右脚と左脚に同様にメラノーマ腫瘍を作り、プラズマは一切照射しないマウスの一群も用意した(図1(b)).このように、一切手を加えなかった場合の参照用の一群を、専門用語で「コントロール群」と呼ぶ.

この実験はデータのばらつきが大きく、またプラズマの 効果がはっきりと出にくい実験だったため、1回の実験で は有意な差が観察されなかった. 最終的に4回実験を行 い、それらの実験結果をまとめて処理したところ、プラズ マによる遠達効果が認められた. 実験結果を図2に示す [12]. 横軸の V_0 と V_3 は腫瘍の体積を表し、それぞれプラズ マ照射を開始した初日(0日目)と4回目のプラズマ照射 日 (3日目) の体積である. すなわち、横軸の V_3/V_0 は 0 日目の腫瘍体積に対する3日目の腫瘍体積の比率を表して いる. 腫瘍は0日目から3日目の間にも成長するので、こ の比はほとんどが1より大きくなっている。この比が小さ いほど、0日目から3日目の間の腫瘍の成長が遅いことを 意味する. 図 2 は、4 回の実験で測定した V_3/V_0 の値を、小 さい順に並べた時の累積度数分布を表している。#1~#4 が4回の実験の番号で、それぞれ実験条件を微妙に変化さ せている. 実験条件については文献[12]を参照されたい.

図2の結果からわかることは、右脚と左脚の腫瘍ともに、プラズマ照射群(図中のTreated)のほうがコントロール群(図中のCTRL)よりも V_3/V_0 の値が小さい、すなわち腫瘍の成長速度が遅くなっていることである。プラズマ照射群において、右脚の腫瘍はプラズマ照射したが、左脚の腫瘍はプラズマを照射していない。それにもかかわらず、左脚の腫瘍もプラズマ照射群において成長が鈍化している。これは、右脚の腫瘍にプラズマ照射した結果、左脚

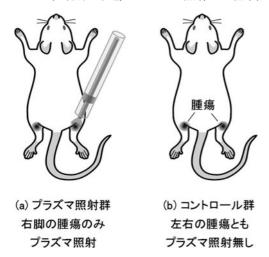


図 1 プラズマ照射による遠達効果を調べる実験[12]. 左右両脚に皮下腫瘍を作り、プラズマ照射群は右脚の腫瘍をプラズマ照射し、コントロール群は左右いずれもプラズマ照射しない.

の腫瘍も成長が遅くなったことを意味している.この結果 は、プラズマ照射による遠達効果を意味している.

この実験では、マウスがメラノーマに対する免疫を獲得 したかどうか確認するため、ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) とよばれる分析も行った. マウスや ヒトなどの生物は、ある病気にかかるとその病気を記憶す る.そして次に同じ病気にかかりそうになったときに,こ の記憶された免疫が速やかに発動するため、その病気には かかりにくくなる. 水疱瘡に一度かかると, 二度目はかか りにくくなるのも免疫記憶の働きである. このELISAの実 験では、予想通り、プラズマ照射したマウスがメラノーマ に対する免疫を記憶していることが確認された[12].一方 のコントロール群では、メラノーマに対する免疫が記憶さ れていないことも確認した. このメラノーマに対する免疫 記憶が図2の抗腫瘍効果の要因であるかどうかはさらに検 討が必要だが、少なくともプラズマが遠達効果と免疫記憶 を誘起できることは示され、プラズマによるがんの免疫治 療に道を拓く結果が得られた.

先の水疱瘡の例からもわかる通り、免疫記憶は長期間持続する.がんの免疫治療においても、この長期的な免疫記憶は望ましい特性である.後述するように、長期的な免疫記憶により、手術で切除したがんの再発抑制や転移したがんの治療に一定の効果を発揮できるかもしれない.次節では、この長期的な免疫記憶の観察を試みた実験を紹介する.

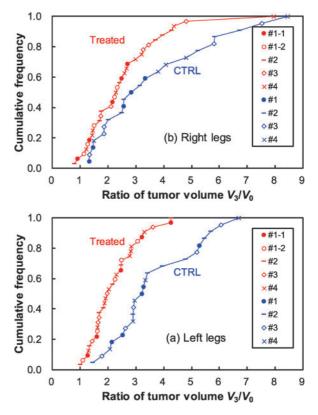


図 2 プラズマ照射開始日(0日目)と照射 4 回目(3日目)の腫瘍体積の比 V_3/V_0 の累積度数分布. (a) 左脚の腫瘍と(b) 右脚の腫瘍の結果. Treated はプラズマ照射群, CTRL はコントロール群(参考文献[12]の図 2 を引用).

5.2.2 全身性の長期的効果

筆者らは、プラズマで誘起された全身性の抗腫瘍効果、すなわちプラズマ照射した腫瘍だけでなく全身の腫瘍に効果を与える現象が免疫によるものと仮定し、この効果が長期間持続するかどうかを調べる実験を行った[13].

この実験では、再チャレンジ実験とよばれる手法を用いた。マウスの右脚に1つだけメラノーマ腫瘍を作り、前節の実験と同様に1日10分間、5日間プラズマ照射した。そして、5回目のプラズマ照射が終わったら腫瘍を切除して2~3週間待った。この切除した腫瘍を、以下では一次腫瘍とよぶ。一次腫瘍切除後に2~3週間待つ間、マウスは腫瘍無しの状態になるが、切除前のプラズマ照射で誘起された免疫反応は腫瘍切除後もマウスの体内で継続し、免疫記憶として残ると仮定した。2~3週間待った後、次に腫瘍を切除したのと反対側の左脚にメラノーマ腫瘍を再度皮下注射で作った。そしてこの再度作った腫瘍、すなわち再チャレンジした腫瘍(以下、二次腫瘍)が、マウスの免疫で成長鈍化するかどうかを測定した。プラズマ照射群とは別にコントロール群も用意し、コントロール群はプラズマ照射を行わない以外はすべて同じ条件で実験を行った。

再チャレンジした二次腫瘍のサイズが日ごとに大きくな る様子を測定した成長曲線を図3に示す. ただし横軸は、 一次腫瘍にプラズマ照射を開始した初日を0日目としてい る. この実験では、プラズマ照射群とコントロール群、そ れぞれ8匹ずつで実験を開始したが、一次腫瘍切除後の再 発、転移、および再移植の失敗などで、プラズマ照射群は 5匹、コントロール群は3匹まで減少している。図3の結 果は、プラズマ照射群で二次腫瘍の成長が著しく鈍化して いることを示している. すなわち, 右脚の一次腫瘍のプラ ズマ照射で発生した抗腫瘍効果は, 一次腫瘍切除後に少な くとも30日間以上の長期間にわたってマウスの体内に保持 され、しかもこの抗腫瘍効果は左脚の二次腫瘍に効果を示 したことから、局所的ではなく全身性であることを示して いる. この効果が免疫によるものであるかどうかを調べる 分析も行ったが, 決定的な証拠はまだ得られておらず, 今 後の課題である.

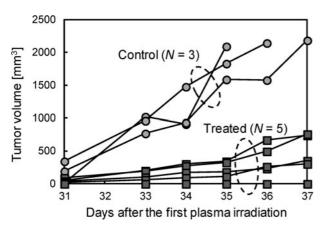


図 3 再チャレンジした二次腫瘍の成長曲線 (参考文献[13]の図 3 (b)を修正して再プロット).

5.2.3 がんの再発に対する効果

前節の再チャレンジの実験では、付随してもう一つの実験を行った[13]. がんの再発に対する抑制効果を調べる実験である.

前節の再チャレンジの実験における一次腫瘍の切除では、目に見える腫瘍が残らない程度の切除では不十分である。ミクロな腫瘍が残り再発が起きてしまう。そのため、前節の実験ではより広範囲に深くまで一次腫瘍を切除した。一方、本節の再発を調べる実験では、腫瘍の切除を敢えて不十分にして、すべてのマウスで再発が起きるようにした。そして、プラズマ照射群とコントロール群で再発した腫瘍の成長に差が出るかどうかを調べた。実験結果を図4に示す。プラズマ照射群では、再発した腫瘍の成長が鈍化していることがわかる。これが免疫によるものかどうかは不明だが、いずれにせよ、手術切除前のプラズマ照射でがんの再発を抑制できる可能性を示唆している。

5.2.4 その他の免疫に関する研究例

以上紹介した我々の研究の他にも、プラズマがん治療の 免疫に関する研究例がいくつかあるので紹介する. Drexel 大学のグループは、培養中の大腸がん細胞をプラズマで直 接処理し、これをマウスに注射して大腸がんに対する免疫 応答が得られるかどうかを実験した[21]. この実験で免疫 応答が得られると考えられる理由を説明する. がん細胞は 免疫細胞から発見されにくい特性をもつが、プラズマでが ん細胞が死ぬと, がん細胞の表面特性や分泌物の変化によ り、免疫細胞から発見されやすくなるとする考え方があ る. このような細胞死のことを免疫原性細胞死 (immunologic cell death: ICD) とよぶ. したがって, プラズマ処理 で免疫原性細胞死を起こしたがん細胞をマウスに注射する ことで、マウスの免疫細胞がこれを発見して免疫が活性化 する可能性がある. いわばワクチンである. この論文では 細胞注射後に再チャレンジ実験を行い. 大腸がんに対する 免疫が得られたことを示唆する結果が得られている.

INP Greifswald のグループは、プラズマ照射した生理食塩水でマウスのがんを縮小させる実験を行い、このときのがんの細胞死が免疫原性細胞死であることを示した[22].

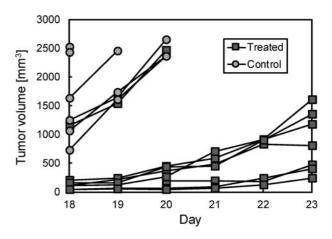


図4 一次腫瘍切除後に再発した腫瘍の成長曲線(参考文献[13] の図2(d)を修正して再プロット).

プラズマ処理した生理食塩水には、プラズマで生成された様々な活性種が溶け込んでおり、これら活性種の効果でがんを治療する手法である。この実験では、がんは免疫ではなく活性種の刺激で直接細胞死した可能性もあり、この後の免疫反応の発生を示唆する結果にとどまっているが、プラズマ処理食塩水が腫瘍内の免疫応答を誘発する可能性が示唆された。

動物実験の他に、シャーレの中の細胞のみを用いた実験も行われており、マクロファージや T 細胞などの免疫細胞がプラズマで活性化されることや、がん細胞がプラズマで免疫原性細胞死を起こすことが観察されている[23-32]。プラズマががんの免疫応答を誘起できる証拠が、しだいに集まりつつある。

5.2.5 プラズマによるがんの免疫関連研究のまとめ

ここまで、まだ初期段階ではあるが、プラズマの免疫効 果を示唆する実験結果をいくつか紹介した. では, このよ うな免疫効果をもつプラズマを、どのようにがん治療に使 えるであろうか. がんは手術で完全に切除できれば治癒す る. 手術切除は最も確実な治療法である. しかし, 切除後 にミクロながん細胞が取り切れずに残っていると、これが 再発することがある. 取り残したがん細胞が全身に転移す ると、さらに状況は悪くなる. ここで、例えば手術切除後 の患部にプラズマを照射し、患者のがんに対する免疫を長 期間上げることができたらどうであろうか. 手術で取り残 した程度の小さなサイズのがんであれば、手術後の再発を 免疫の力で押さえることができるかもしれない。免疫は全 身に効果があるので、転移したがんにも効くかもしれな い. プラズマではなく抗体等を用いた同様の研究は、実際 に行われている[33].一方,マウスの実験で結果が出て も、ヒトを対象とした臨床で同様の結果が出るとはまった く限らず、そこには非常に大きなハードルがある. これを 実現させるのにどれほどの困難があるかは、がん治療の専 門家でない筆者にも容易に想像がつくが、少なくとも最良 の条件がそろえば全身性の長期的な抗腫瘍効果が起きる可 能性があることは示されたことになる.

5.3 放射線治療および PDT における免疫応答

ここまでに紹介したがんに対する免疫反応誘起は,放射線治療やPDTではよく知られた現象である[14-18]. 一見不思議に見える免疫反応誘起も,科学的なエビデンスがしっかりと蓄積されている現象であることを示すため,放射線治療とPDTにおける免疫応答の研究を紹介する.

5.3.1 放射線治療における免疫応答

放射線治療は、X線などの放射線を腫瘍に照射してがん 細胞を死滅させる治療法である. 放射線は体を透過するため,体内の腫瘍に照射する場合も手術で腫瘍をむき出しに する必要がなく,体の外から放射線を照射できる利点がある.

放射線による遠達効果は、稀ではあるが古くから報告例があった[34]. 現在では放射線ががんに対する免疫を高めることがわかっており、その機序も明らかになりつつある. 免疫応答は、最初に樹状細胞とよばれる細胞が細菌や

がん細胞の破片など(抗原とよぶ)を細胞内に取り込み、 これが危険な異物であることを認識することから始まる. 放射線は、この樹状細胞の働きを活性化したり、免疫原性 細胞死を引き起こして樹状細胞が取り込む抗原を発生しや すくすると考えられている[15,34]. マウスの実験では, 樹 状細胞を増殖させる薬剤と放射線を併用すると, 片方だけ では得られなかった遠達効果が得られることが観測されて いる[34]. また、この遠達効果の実験では、2つのがんの 種類を異なるものにすると遠達効果が観測されなくなり, マウスに誘起された免疫が放射線を照射したがんの種類に 特異的なものであることが示されている. 同様の併用実験 や[35],あるいは樹状細胞そのものの投与と放射線を併用 した免疫誘導の実験[36,37]も行われている.この他にも, 免疫チェックポイント阻害剤やその他薬剤と放射線の併用 [38-42]や,放射線単独で抗腫瘍免疫を発生させる研究 [42-45]も行われている. いずれの研究でも, 免疫発生時に 生じる免疫細胞やサイトカインとよばれる物質が増加して いることや、免疫不全マウスでは効果がでないことなどを 示し、その要因が免疫であることも示している.

5.3.2 PDT における免疫応答

PDT は腫瘍に集積しやすい光感受性物質を体内に投与し、この物質が吸収する波長の光を腫瘍に照射することで光感受性物質から活性酸素種を生成し、この活性酸素種の働きで腫瘍を死滅させる手法である。可視から赤外光に反応する光感受性物質が用いられる。PDT は抗腫瘍免疫を誘起することも知られており、免疫関係の研究も多くなされている。PDTで免疫が発生する機序も詳しく調べられているが、ここでは機序の詳細には立ち入らず、どのような実験が行われているかを概観する。

PDT の免疫に関する初期の論文[46]ではi)通常のマウ ス+PDT, ii)免疫不全マウス+PDT, iii)通常のマウス+ 手術切除,の3つの群でがんを治療し,治療から100日後に 再チャレンジ実験を行った. そして, i)の群のみ再チャレ ンジした腫瘍が拒絶され、PDTによる免疫記憶が示唆され た. i) の群でも、一次腫瘍とは別の種類のがんを二次腫瘍 として用いた場合は再チャレンジの拒絶が起きず, 一次腫 瘍に特異的な免疫の記憶が示された. 免疫不全マウスを用 いた PDT の実験はその後も異なる種類のがんについて行 われ,同じような結果が得られた[47,48].通常マウスの PDT 照射で得られた免疫細胞を免疫不全マウスに移植す ると、免疫不全マウスでも PDT の効きが良くなる結果も 得られた。複数種ある免疫細胞を1種類ずつ無くしたマウ スを用いて、PDTではどの免疫細胞が効いているかを調 べ、免疫応答の機序を調べる研究も行われた[49]. 特定の 免疫細胞を活性化あるいは不活化する薬剤との併用実験 [50-52], 樹状細胞投与との併用実験[53,54], その他再 チャレンジ実験や、免疫発生時に生じる免疫細胞やサイト カインを調べることで、PDTにより抗腫瘍免疫が発生して いることを示す様々な研究[55-59]が行われてきた.

以上のように、放射線治療やPDTでは、がんに対する免疫応答が条件によっては誘起されることが確立されている.したがって、これらと同様に活性種や物理的刺激を用

いるプラズマ照射においても、がんに対する免疫応答が得られたとしても不思議はない.

5.4 おわりに

がんは生き物にとって有害な異物である.したがって、本来はがんに対する免疫が働いて、がんを叩く機能が備わっているべきである.しかし、がん細胞には免疫を巧みに回避する機能が備わっている.この免疫回避能力をいかにして減少させ、免疫細胞にがん細胞が攻撃対象となる異物であることを認識させるかが、免疫治療のポイントとなる.近年、免疫チェックポイント阻害剤という薬品を用いたがんの免疫治療が、大きな注目を集めている.がんの免疫治療は、従来の手術切除、放射線治療、化学療法に続く主流のひとつになる可能性もあり、プラズマによる免疫治療の可能性も今後検討の価値は十分にあると思われる.

近年、医療にかかる経費の増加が国の予算を圧迫しており、医療の質を保ったままいかに経費を削減するかが重要な課題となる。プラズマ装置は、がんの治療という枠組みで考えると極めて安価であり、オペレーションにもほとんどお金がかからない。また、海外で行われている、主に創傷治療や慢性皮膚病治療の臨床では目立った副作用は報告されておらず、プラズマは安価で副作用の少ない医療を提供できる可能性を有している。

- [1] J. Schlegel et al., Clin. Plasma Med. 1, 2 (2013).
- [2] E.A. Ratovitski *et al.*, Plasma Process. Polym. 11, 1128 (2014)
- [3] A. Dubuc et al., Ther. Adv. Med. Oncol. 10, 1 (2018).
- [4] V, Miller *et al.*, Plasma Chem. Plasma Process. **36**, 259 (2016).
- [5] D.B. Graves, IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci. 1, 281 (2017).
- [6] H. Tanaka et al., Plasma 1, 150 (2018).
- [7] S. Bekeschus *et al.*, Plasma Process. Polym. **16**, e1800033 (2018).
- [8] S. Bekeschus et al., Clin. Plasma Med. 12, 17 (2018).
- [9] S. Bekeschus et al., Biol. Chem. 400, 63 (2019).
- [10] X. Lu et al., Mat. Sci. Eng. R 138, 36 (2019).
- [11] M.L. Semmler et al., Cancers 12, 269 (2020).
- [12] K. Mizuno et al., J. Phys. D: Appl. Phys. 50, 12LT01 (2017).
- [13] K. Mizuno *et al.*, IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci. 2, 353 (2018).
- [14] S.C. Formenti and S. Demaria, J. Natl. Cancer Inst. 105, 256 (2013).
- [15] K. Reynders et al., Cancer Treat. Rev. 41, 503 (2015).

- [16] A.P. Castano et al., Nat. Rev. Cancer 6, 535 (2006).
- [17] J.M. Dabrowski and L. G. Arnaut, Photochem. Photobiol. Sci. 14. 1765 (2015).
- [18] D. van Straten et al., Cancers 9, 19 (2017).
- [19] D.B. Graves, J. Phys. D: Appl. Phys. 45, 263001 (2012).
- [20] D.B. Graves, Clin. Plasma Med. 2, 38 (2014).
- [21] A.G. Lin et al., Oncoimmunology 7, e1484978 (2018).
- [22] E. Freund et al., Sci. Rep. 9, 634 (2019).
- [23] V. Miller et al., Plasma Process. Polym. 11, 1193 (2014).
- [24] A. Lin et al., Plasma Process. Polym. 12, 1392 (2015).
- [25] S. Bekeschus *et al.*, Oxid. Med. Cell. Longev. 2017, 4396467 (2017).
- [26] A. Lin et al., Int. J. Mol. Sci. 18, 966 (2017).
- [27] S. Bekeschus *et al.*, Clin. Plasma Med. 7, 24 (2017).
- [28] S. Bekeschus *et al.*, IEEE Trans. Radiat. Plasma Med. Sci. 2, 138 (2018).
- [29] A. Lin et al., Adv. Sci. 6, 1802062 (2019).
- [30] J. van Loenhout et al., Cancers 11, 1597 (2019).
- [31] A. Azzariti et al., Sci. Rep. 9, 4099 (2019).
- [32] K. Rodder et al., Appl. Sci. 9, 660 (2019).
- [33] Q. Chen et al., Nat. Nanotech. 14, 89 (2019).
- [34] S. Demaria et al., Int. J. Radiat. Oncol. 58, 862 (2004).
- [35] P.K. Chakravarty et al., Cancer Res. 59, 6028 (1999).
- [36] E.Y. Nikitina and D.I. Gabrilovich, Int. J. Cancer 94, 825 (2001).
- [37] S. Teitz-Tennenbaum et al., Cancer Res. 63, 8466 (2003).
- [38] S. Demaria et al., Clin. Cancer Res. 11, 728 (2005).
- [39] M.Z. Dewan et al., Clin. Cancer Res. 15, 5379 (2009).
- [40] L.F. Deng et al., J. Clin. Invest. 124, 687 (2014).
- [41] K. Shiraishi et al., Clin. Cancer Res. 14, 1159 (2008).
- [42] Y. Yoshimoto et al., PLoS One 9, e92572 (2014).
- [43] K. Camphausen et al., Cancer Res. 63, 1990 (2003).
- [44] D. Schaue *et al.*, Int. J. Radiat. Oncol. **83**, 1306 (2012).
 [45] A. Filatenkov *et al.*, Clin. Cancer Res. **21**, 3727 (2015).
- [46] G. Canti et al., Anti-Cancer Drugs 5, 443 (1994).
- [47] M. Korbelik et al., Cancer Res. 56, 5647 (1996).
- [48] M. Korbelik and G. J. Dougherty, Cancer Res. **59**, 1941 (1999).
- [49] M. Korbelik and I. Cecic, Cancer Lett. 137, 91 (1999).
- [50] M. Korbelik et al., Brit. J. Cancer 75, 202 (1997).
- [51] J. Golab et al., Brit. J. Cancer 82, 1485 (2000).
- [52] A.P. Castano, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 5495 (2008).
- [53] A. Jalili et al., Clin. Cancer Res. 10, 4498 (2004).
- [54] H. Saji et al., Clin. Cancer Res. 12, 2568 (2006).
- [55] E. Kabingu et al., Brit. J. Cancer 96, 1839 (2007).
- [56] M. Wachowska et al., Eur. J. Cancer 50, 1370 (2014).
- [57] L.B. Rocha et al., Eur. J. Cancer 51, 1822 (2015).
- [58] M. Shams et al., Cancer Immunol. Immun. 64, 287 (2015).



小特集 大気圧低温プラズマに対する細胞応答とがん治療への展開

6. おわりに

6. Summary

栗田弘史 KURITA Hirofumi 豊橋技術科学大学

(原稿受付:2020年12月10日)

大気圧や液中での非平衡プラズマの医療応用が近年盛ん に研究されている. 大気圧低温プラズマは, 熱をほとんど 発生しないが、反応性の高い活性種を生成できるという特 徴を有し、細胞や生体に直接照射することが可能である. これまでに、プラズマ照射による微生物の殺菌のほか、抗 腫瘍効果や創傷治癒・低侵襲止血への有効性が報告され、 プラズマ医療応用に関する研究が国内外で急速に進展して いる. 本誌では、2007年7月号の小特集「医療バイオ分野 へのプラズマ応用」,2011年10月号のプロジェクトレ ビュー「プラズマ・バイオ融合科学への新展開」などでプ ラズマ医療応用に関連する記事が掲載されている. 年会に おいても関連するシンポジウムやオーガナイズドセッショ ンが数多く開催され、その注目度は高い.

さまざまな医療応用が検討されているなかで、プラズマ 照射やプラズマ照射溶液ががん細胞の自発的な細胞死であ るアポトーシスを誘導することが特に注目されていてお り、放射線治療や抗がん剤治療に代わる副作用の少ない新 規ながん治療技術として期待されている. プラズマ照射に よる抗腫瘍効果は15年以上前から報告されているが、その メカニズムについては不明な点が多く、試行錯誤的な研究 が多かった.しかし、第1章で述べられているように、科 研費新学術領域研究「プラズマ医療科学の創成」(2012-2016年度 領域代表:堀 勝 名古屋大教授)で、プラズ マ生成・計測技術と生命科学・医学の融合研究が推進さ れ,この分野の変革期となった。中でも,低温プラズマを 照射した培養液を脳腫瘍培養細胞に投与すると抗腫瘍効果 を示すことを発見した研究成果は特筆すべきものであり, 本誌2015年12月号の小特集「プラズマが誘導する生体応答 とそのバイオ・医療応用」のなかでその時点での最新成果 がまとめられている。本小特集は、プラズマ照射に対する 細胞応答とがん治療への応用に関する研究について、主に 2015年以降の進展を紹介することを目的として企画され た. 以下に各記事の要点をまとめた.

第2章では、プラズマがん治療研究が直接照射法と間接 照射法に大きく分類でき, 間接照射法はプラズマ活性溶液 を使用する方法と免疫系を活性化する方法にさらに分類で

きることを示した. プラズマ活性溶液については, 低温プ ラズマを照射した細胞培養液だけでなく, 臨床に使用され ている点滴液や細胞生物学実験で使われる生理食塩水にプ ラズマ照射してもプラズマ活性溶液が作成できることが示 された. もうひとつの間接照射である免疫原性細胞死につ いても、培養細胞実験および動物実験で免疫系の活性化が 実証されていることが示された. プラズマ照射プラズマ活 性溶液による細胞死の分子機構について、細胞に対する直 接因子となり得る各種活性酸素の生成や、これらが酸化ス トレスとして生体分子に作用し、細胞死誘導と密接な関係 にあることが示されている. 併せてプラズマ活性溶液が酸 化ストレス非依存的細胞死を誘導する可能性が示され、今 後さらなる研究の進展が期待される.

第3章では、プラズマ照射により生成された活性酸素が 優先的にがん細胞を死滅させる機序について、がん細胞の エネルギー代謝の視点から解説された. 本章では間接照射 法であるプラズマ活性溶液による細胞死の分子機構につい て、それに関与しうる活性分子種の測定、これらが引き起 こすタンパク質の酸化修飾、細胞内 NAD+量の減少、Zn²⁺ の遊離など様々な細胞応答が、解糖系の阻害やミトコンド リア機能障害を引き起こすことが示された. がん細胞は, 主に解糖系を利用して細胞のエネルギー需要を満たしてい るため、NAD+の減少はがん細胞で亢進している解糖系を 阻害することでがん細胞におけるエネルギー産生を抑制す ることが示された. がん細胞に対して正常細胞と比較して プラズマ活性溶液に対する感受性が高い理由の一つとし て, がん細胞特有のエネルギー代謝が関与していると推察 された. また, 過酸化水素や亜硝酸イオンの培養液への添 加ではプラズマ活性溶液による細胞死を完全には再現しな いことから、同定されていない因子が解糖系などの阻害に 関与している可能性も指摘された.

第4章では、既存のがん治療の様式、特に放射線や温熱 によるがん治療と細胞死誘導機構について概説され. その 上で、プラズマ照射に対する細胞応答との比較が示され、 大気圧プラズマは極めて効率の高い活性酸素生成源である ことが示された. また, プラズマ照射と温熱を併用するこ

Toyohashi University of Technology, Toyohashi, AICHI 441-8580, Japan

author's e-mail: kurita@chem.tut.ac.jp

とにより、生成した活性酸素を細胞内に効率よく導入することでプラズマ照射による細胞死を増強する試みが示された. さらに、スルファサラジンおよび金ナノ粒子との併用によるヘリウムプラズマ誘発アポトーシスの増強および抑制の可能性が示された.

第5章では、プラズマによるがんの免疫治療に関する研究の最新動向がまとめられている。免疫反応による抗腫瘍効果の具体例として、マウスの悪性腫瘍にプラズマを照射したときに、その腫瘍のみならず、離れた箇所にある別の腫瘍にも抗腫瘍効果が働く遠達効果が示された。さらに、マウスへのプラズマ照射が全身性の抗腫瘍効果を示す可能性も指摘した。さらに、プラズマ照射による免疫反応誘起が科学的に起こり得る現象であることを示すため、放射線治療や光線力学療法における免疫応答が概説された。

以上のように、大気圧プラズマのがん治療への応用に向けた研究は、核酸・タンパク質といった分子から個体まで

も対象として基礎研究から臨床応用研究まで幅広く行われており、まだ多くの不明な点が残されているものの、「プラズマががん治療に本当に使えるのか」という疑念が徐々に晴れつつある。安全・安心なプラズマ医療の提供のためには、エビデンスを着実に積み重ねて信頼を得ることが不可欠である。その一方で、プラズマ照射に対する細胞応答は極めて多様かつ複雑であり、プラズマ照射による抗腫瘍効果の全容解明にはさらなる検討が必要である。また、抗腫瘍効果も含めたプラズマ医療応用研究では、ある効果を得るために必要な刺激がプラズマである必要があるかどうか考慮する必要がある。すなわち、細胞に対する本質的な刺激が何かを明らかにすることが求められる。この点においても、様々な観点からのアプローチを基に現象を正しく理解する基礎研究がますます重要になる。

本小特集をきっかけにして多くの学生や研究者が参画してこの分野の研究がさらに進展することを願っている.

の 小特集執筆者紹介 へのの



たなかなるまさ

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター教授. 2004年に東京大学理学系研究科物理学専攻博士合を取得. 分子生物学やシステム生物学などを専門とし, プラズマ医療研究におい

て、プラズマ活性溶液によるがん治療研究などで成果を挙げており、プラズマバイオ研究のフロンティアを開拓したいと考えている.



ほり まさる 掘 勝

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター教授,センター長. 1986年名古屋大学大学院工学研究科電子工学専攻修了(工学博士). 超微細加工プロセス,ナノデバイスの創製およびプ

ラズマ医療・農水産に関する研究に従事. 長年, バラの園芸に夢中になってきましたが, 最近は, ベリー系 (マスカットベリー A, ブラックベリー, ブルーベリー, ラズベリー)を楽しんでいます. プラズマによって, ベリーハッピーな高付加価値果樹の栽培に挑戦したいと思います.



原 宏和

岐阜薬科大学薬学部 准教授. 1994年 岐阜薬 科大学大学院 博士 (薬学). これまで,活性酸 素種 (ROS) による細胞機能の制御に関する研 究を進めてきた. 最近は, ROSが引き起こす神

経細胞内の金属イオン (亜鉛, 銅など) 動態異常に興味を持ち、その分子機構の解明に取り組んでいる。



を 立 哲 夫

岐阜薬科大学教授(2021年3月定年退官予定). 薬学博士. 主な研究分野は酸化ストレスへの細胞応答と抗酸化酵素の発現調節. 長年の酸化ストレスに関する研究のアプローチを

プラズマというテーマに適応し、久しぶりにワクワク実験の毎日でした。



こん どう たかし 隆

富山大学 学術研究部医学系 放射線診断治療 学講座,放射線腫瘍学部門. 主な研究分野:大 気圧プラズマ,温熱 (ハイパーサーミア),超 音波および放射線による細胞死と酸化ストレ

スに関する研究に従事.



が野 売

東京大学新領域創成科学研究科教授. 2000年 東京大学工学系研究科 博士 (工学). 大気圧 プラズマの基礎と応用研究に取り組んでい る. 本稿で紹介したがんの免疫治療は, 動物実

験も含めてこれまでのバックグラウンドと大きく異なる分野 ゆえ,困難も多い一方,興味の尽きない研究テーマである.家族そろって温泉旅行好きなので,普通に旅行に行ける日々が 戻ってくることを心待ちにしている.



栗田弘史

豊橋技術科学大学大学院工学研究科・准教授博士(工学).最近は主に大気圧プラズマや電場に対する細胞応答やその応用(遺伝子導入)に関する研究を行っています.健康維持や

体重管理のためにできるだけ自転車やジョギングで体を動か すようにしていますが、最近では運動量を増やしても現状維 持が精一杯です.