

低温大気圧プラズマ技術を用いた癌治療方法の開発

齋藤孝輔¹⁾, 浅井朋彦²⁾, 福田昇¹⁾³⁾, 鈴木良弘¹⁾, 照井正¹⁾, 上野高浩¹⁾,
篠島由一¹⁾, 小口治久⁴⁾, 五十嵐潤¹⁾, 藤原恭子¹⁾, 相馬正義¹⁾

Development of anti-cancer therapy using non-thermal atmospheric pressure plasma

Kohsuke SAITO¹⁾, Tomohiko ASAI²⁾, Noboru FUKUDA¹⁾³⁾, Yoshihiro SUZUKI¹⁾, Tadashi TERUI¹⁾,
Takahiro UENO¹⁾, Yui SHINOJIMA¹⁾, Haruhisa KOGUCHI⁴⁾, Jun IGARASHI¹⁾,
Kyoko FUJIWARA¹⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

低温大気圧プラズマは医療分野において非侵襲性の治療ツールとして非常に有望であるが、癌治療への応用に関しては知見が限られている。本研究では癌細胞を効果的に死滅させることが可能なプロトコルの開発を目指して、大気圧LFプラズマジェット装置を自作し、メラノーマ細胞株への効果を確認した。プラズマ照射した培地を用いて培養すると、メラノーマを含む複数の癌細胞株は正常細胞株と比較して強い生存率の低下を示し、その効果は培養開始後長期間観察された。一方、sphere 形成能は、プラズマ照射により影響をうけず、本研究での照射法ではプラズマは癌幹細胞に対する効果が弱いと考えられた。癌細胞が正常細胞と比較してプラズマに対し高い感受性を示す原因を解明することで、癌幹細胞に対しても殺傷効果を持つ、より効果的な照射プロトコルの確立が期待できると考える。

1. はじめに

プラズマは気体を構成する分子の一部または全体が陽イオンと電子に電離した状態を指し、個体・液体・気体に並ぶ、物質の第4の存在状態である。半導体加工や機能性薄膜堆積等においてプラズマ技術は不可欠であるが、近年医療分野においても応用が進められ、中でも、温度が室温に近い低温大気圧プラズマが生体に作用し、止血、血管新生、臓器癒着防止、細胞増殖促進などの多岐に渡る効果を示すことが報告されている。その作用機序は不明な点が多いが、プラズマにより生成するフリーラジカル、励起原子・分子、電子、紫外線が作用している可能性が考えられている。

癌治療の分野では肺癌、メラノーマおよび卵巣癌の細胞株に対し、低温大気圧プラズマが殺細胞効果を持つこと、その細胞死のメカニズムに活性酸素がかかわっている可能性があることが最近報告され

た¹⁾²⁾。有毒物質を用いず、また放射線のような取扱いの危険性の少ないプラズマは新規の癌治療ツールとして非常に期待が持てるが、まだ限られた細胞で行われた研究であり、その作用機序、最適条件などについては不明な点が多い。

近年、癌細胞集団は一部の自己複製能および多分化能をもつ癌幹細胞によって維持されていることが分かってきた。抗癌剤で癌細胞増殖を抑制しても、癌幹細胞の残存により再発する。そこで癌組織を根絶するためには癌幹細胞を確実に消滅させる必要がある。これまでに癌幹細胞特異的なマーカーの探索、およびそれをターゲットとした治療法の探索がなされてきた。現在までに、CD20, CD44, CD133, CD271, ABC transporter G2 (ABCG2), ABC transporter B5 (ABCB5), Aldehyde dehydrogenase (ALDH) などが癌幹細胞のマーカーとして報告さ

1) 日本大学医学部

2) 日本大学理工学部

3) 日本大学大学院総合科学研究科

4) 産業技術総合研究所

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

れている。それらの一部は機能的に癌幹細胞の抗酸化機構を上昇させたり、薬剤耐性を強化するなど生存率を上げる方向に機能することが証明されている。例えばすい臓癌や大腸癌等多くの癌で癌幹細胞マーカーとして知られているCD44は pyruvate kiase M2と相互作用し³⁾、その結果細胞のエネルギー産生を解糖系依存に移行させる。ミトコンドリアにおける呼吸でエネルギー産生を行う場合と比較して、グルタチオンの消費や活性酸素の産生が低く抑えられ、結果的にCD44陽性細胞の抗酸化機構が維持され、細胞の生存率が上昇する。またCD44がアミノ酸シスチンの輸送体と相互作用し、シスチンの細胞内取り込み活性を上昇させ、その結果細胞のグルタチオン濃度を上昇させ、細胞の抗酸化機構を強化するとの報告もある⁴⁾。また同じく癌幹細胞マーカーの一つであるALDHのアイソザイムの一つALDH1A3をsiRNAでノックダウンすると、増殖抑制、アポトーシス誘導が起こることが観察されている⁵⁾。つまり、これらの分子はマーカーとしてのみならず治療標的としても有望であり、その発現低下や機能抑制を誘導して癌幹細胞を特異的に殺す試みが研究されている。

現時点において、プラズマの抗腫瘍効果に関する報告では、癌幹細胞のみでなく腫瘍細胞全体を標的

としているため、癌細胞集団の全滅は期待できず、また用いた細胞株の種類が少なく、治療法として確立するためには知見が限られている。そこで我々は腫瘍細胞を効果的に殺傷できるプラズマ治療法の確立を最終目的として、1) プラズマ照射装置の設計・作成、2) メラノーマ細胞株に対する効果的なプラズマ照射条件の検討、3) プラズマ照射の癌幹細胞に対する効果の確認を行った。

2. 対象および方法

1) プラズマ照射装置；

dielectric barrier discharge (DBD) 放電の一種である大気圧LFプラズマジェット装置（以下、LFジェット装置）を作成した。照射の際はPCに接続したマスフローコントローラー8500MC（寿産業）により照射量、電圧、時間等を制御し、条件設定をソフトを用いて簡単に変更できるシステムを作成し、以下の実験に使用した。照射部の形状はペンシル型とした（図1）。

2) 培養液中のフリーラジカルの測定（d-ROMsテスト）；

プラズマ照射後の培養液中のヒドロキシラジカルの生成量を活性酸素・フリーラジカル自動分析装置

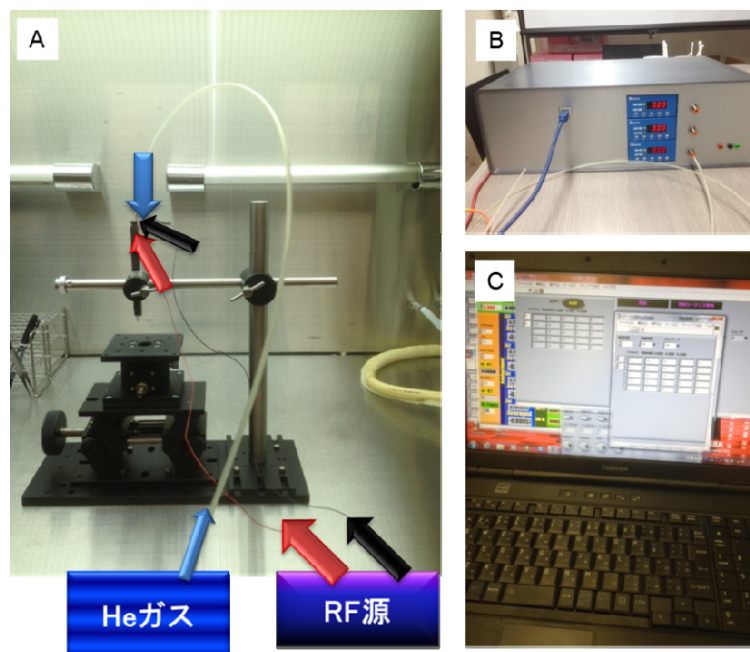


図1 プラズマ照射装置 (LFジェット装置)

A. 照射装置本体、B. 照射条件（ガス流量、電圧、照射時間）の制御装置、C. 照射条件制御装置をコントロールするPCソフト

(FRAS4) を用いて計測した。本測定法では培養液中の2価, 3価の鉄がイオン化され, これらの鉄イオンを触媒として培養液中のヒドロキシペルオキシド群が分解を受ける。この分解産物がクロモゲンを酸化して呈色するため, その変化を光度計で測定することでヒドロキシペルオキシドの量が定量できる。

3) 細胞株;

我々の研究室で所持するメラノーマ細胞株17種のうち, 文献的に, もしくは我々が以前に行ったマウス皮下腫瘍を作成する実験から癌幹細胞がある程度含まれている可能性の高いA375, A2058, HMY-1を用いて実験を用いた。また比較検討用に肺癌細胞株A549, 骨肉腫細胞株MG63, 繊維芽細胞HDFを用いた。

4) プラズマ照射培地の作成;

メラノーマ培養用の培地であるDMEM・10%FBSに対し印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/min, 時間60~300秒の照射を行った。コントロールとして, 電圧をかけずにヘリウムガスのみを同じ流量, 時間照射した培地も作成した。

5) 細胞生存率の定量;

細胞を 1×10^3 個/100 μ l, wellの密度で96well 培養プレートに播種し, 翌日プラズマ照射培地もしくはガスのみを照射した培地に置換し, 培養を続けた。培地置換後24時間目以降に, WST8 アッセイにより細胞の生存率を測定した。

5) Sphere 形成試験;

A375 もしくは A2058 細胞を 3×10^5 個/2ml, wellの密度で低接着性の6ウェルプレートに播種し, 翌日プラズマもしくはガス照射済みの培地に置換した。その後培養を続け, 72時間目に sphere 形成の状態を観察した。

6) PCRおよびFACS による癌幹細胞マーカー発現細胞の解析;

7~8割コンフルエントの培養細胞よりトータルRNAを抽出し, 逆転写によるcDNA作成後, PCRを行い幹細胞マーカーの発現状態を調べた。さらに,

6.5×10^5 個の細胞を2mlのPBS+3% FCSにサスペンドし, APCラベルされた抗CD133抗体およびFITCラベルされた抗CD44抗体と反応させ, FACSCalibur (BD Biosciences) により解析した。アイソタイプコントロールとしてはAPCラベルのマウスIgGおよびFITCラベルのマウスIgGを用いた。

3. 結果

1) プラズマ照射装置の設計と照射効果の確認;

マスフローコントローラーによるガス流量の制御が可能なLFジェット装置を作成し, 条件設定・変更をPC上のプログラムで容易にできるシステムを構築した(図1)。本装置を用いて, 培地にプラズマを照射し, 生成したヒドロキシペルオキシドを定量したところ, 印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/分, 300秒の照射条件でコントロールよりも高いヒドロキシペルオキシド群の生成が確認できた。未処理やガスのみ, 60秒の短い照射では生成が確認できなかったことから, これはプラズマ照射により生成したヒドロキシペルオキシドであると考えた(図2)。

2) メラノーマ細胞株を殺傷できる照射条件の検討;

作成したLFジェット装置を用い, 複数のメラノーマ細胞株へのプラズマ照射を行って効果的に細胞死を誘導できる条件について検討した。印加電圧8kV, ヘリウムガス流量1.5ml/分, 300秒という条件でプラズマ照射を行った培地, もしくはヘリウムガスのみを照射した培地に置換しメラノーマ細胞株HMY-1の培養を行ったところ, 照射24時間後の時

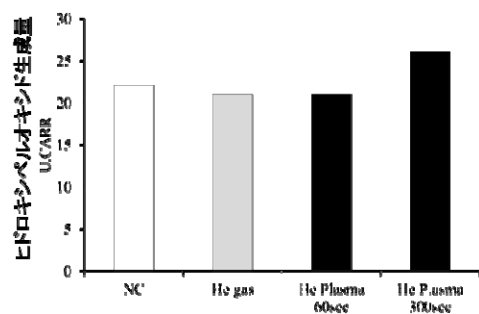


図2 d-ROMsテストによるヒドロキシペルオキシドの定量

5mlの培養液にプラズマもしくはヘリウムガスのみを照射し, 液中に生じたヒドロキシペルオキシドの量をFRAS4により測定した。

点で細胞増殖が完全に抑えられ、照射後120時間目までその効果が持続していることが判った(図3)。

3) プラズマ照射培養液による腫瘍選択的毒性の検討；

上記と同じ条件で、メラノーマを含む複数の細胞株を培養し、プラズマ照射もしくはガス照射培養液にて培養後72時間後に生存率を比較を行った。それぞれの細胞におけるヘリウムガス照射後の生存率を100%として表した場合、繊維芽細胞細胞株HDFは98.6%、正常メラノサイトは87.0%の生存率であった。一方、メラノーマ細胞株A375は31.2%、A2058は14.6%、また肺癌細胞株A549は61.5%、骨肉腫細胞株MG63は37.8%の生存率を示した(図4)。

4) Sphere 形成能に対するプラズマの効果；

癌幹細胞はsphere 形成能を持つことから、メラノーマ細胞株A375とA2058を低接着性の培養プレートに播種し、プラズマ照射の有無によるsphere 形成能の変化を解析した。プラズマ照射培地で72時間培養した細胞のsphere 形成を観察したが、いずれの細胞もガスのみを照射した培地下で培養した細胞と比較してsphere の個数や大きさに差は見られなかった。

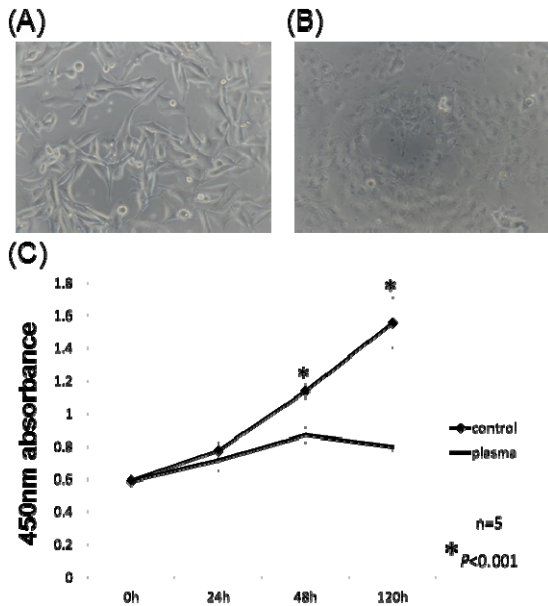


図3 メラノーマ細胞株HMY-1に対するプラズマ照射効果の確認

ガス照射(A)もしくはプラズマ照射(B)を行った培養液にて培養後、24時間目の画像
C. ガスまたはプラズマ照射培地にて120時間まで培養を行い、細胞の生存率をWST8 assayにより継続的に計測した。

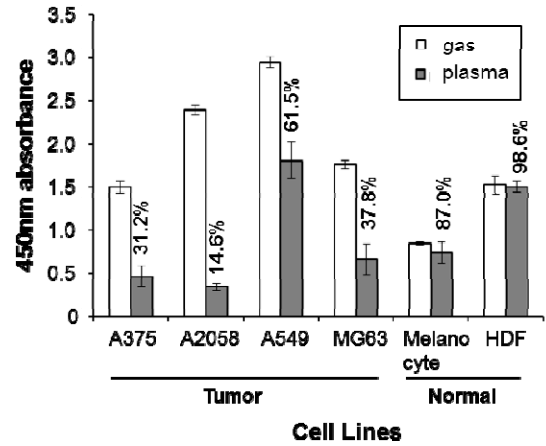


図4 各種細胞株に対するプラズマ照射効果の確認
メラノーマ細胞株A375, A2058, 肺癌細胞株A549、骨肉腫細胞株MG63、正常メラノサイト、繊維芽細胞HDFをそれぞれプラズマ照射培地もしくはガスのみを照射した培地を用いて培養し、72時間後の生存率をWST8 assayにより確認した。

5) 癌幹細胞マーカー発現細胞の検出；

癌幹細胞マーカーを標的とした薬剤とプラズマ照射との併用効果を確認するために、メラノーマ細胞株における幹細胞マーカーの発現状態を解析した。PCRによる解析ではCD133は全ての細胞において発現が見られ、CD20はG361とHMY-1において発現が確認され、CD44はA75において発現していることが判った(図5)。癌幹細胞はCD44およびCD133の両方が陽性であるとの報告があること、またCD44に対してはその機能や発現を抑制する薬剤が存在することから、この二つのマーカーの発現

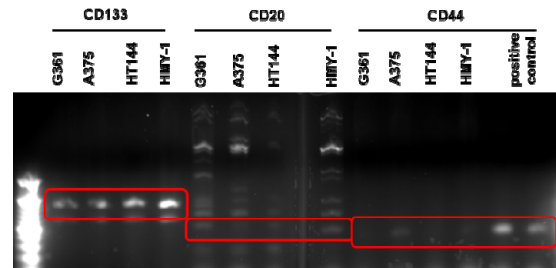


図5 メラノーマ細胞株における癌幹細胞マーカーの発現解析

メラノーマ細胞株G361, A375, HT144, HMY-1よりRNAを抽出し、癌幹細胞マーカーCD133, CD20, CD144の発現をPCRにより調べた。

している細胞の存在量をFACSを用いて解析した。その結果A375細胞においては、CD44とCD133をともに発現している細胞は全体の0.33%と極めて少ない事が判った(図6)。

4. 考察

本研究において、我々は照射条件をPCにて容易に設定・変更できるプラズマ装置を作成し、腫瘍細胞株に対するプラズマの殺細胞効果の検討を行った。我々の実験ではプラズマ照射を行った培地で培養したメラノーマ細胞株には120時間まで強い増殖抑制が観察された。また各種細胞間で比較すると、メラノーマ細胞株以外に骨肉腫細胞株や肺癌細胞株でもプラズマ照射培地で培養することで強い増殖抑制効果が見られたが、繊維芽細胞や正常メラノサイトにおいてはプラズマの効果は殆ど観察されなかった。

一方、本研究で用いたプラズマ照射条件では、メラノーマのsphere形成能に変化を引き起こさなかったことから、癌幹細胞の生存率に影響を与えていないと考えられた。メラノーマ細胞集団における癌幹細胞マーカー発現細胞の比率も極めて低く、従って癌幹細胞を標的とした薬剤とプラズマ照射の併用を行って効果的かつ完全に癌細胞集団を死滅させるという当初の計画を改変する必要があると考える。

本研究では、癌細胞が正常細胞と比較してプラズマ照射への高い感受性を持つ事が確認されたが、そ

のメカニズムは現時点では不明である。癌細胞と正常細胞のプラズマへの反応性の違いが何により起こっているのか、そのメカニズムを解明することで、より効果的な照射プロトコルの開発が可能になると考える。癌細胞は正常細胞と比べて活性酸素に対して高い感受性を持つことから、その性質を利用して副作用の少ない抗癌剤を開発する試みが数多くなされているが⁶⁾、プラズマによる細胞死においても、その作用機序に関わる因子の一つに活性酸素があるとされていることから、活性酸素への耐性を左右する薬剤と併用することで、より強力に癌幹細胞を含む癌細胞集団を死滅させる照射法の確立が可能となるかもしれない。今後は癌細胞と正常細胞において、プラズマ照射時にどのような反応が生じているか、その生化学的、分子生物学的違いについて、より詳細に解析していく計画である。

謝辞

本研究は平成25年度日本大学学術研究助成金(総合研究)の支援により実施されたものであり、ここに感謝の意を表します。

文献

- 1) Sensenig R, Kalghatgi S, Cerchar E, Fridman G, Shereshevsky A, Torabi B, Arjunan KP, Podolsky E, Fridman A, Friedman G, Azizkhan-Clifford J, Brooks AD. Non-thermal plasma induces apoptosis in melanoma cells via production of intracellular reactive oxygen species. *Ann Biomed Eng* 39 (2): 674-687 (2011)
- 2) Iseki S, Ohta T, Aomatsu A, Ito M, Kano H, Higashijima Y, Hori M. Rapid inactivation of *Penicillium digitatum* spores using high-density nonequilibrium atmospheric pressure plasma. *Applied Physics Lett* 100, 113702 (2012)
- 3) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H. Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72 (6): 1438-1448 (2012)
- 4) Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H, Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19 (3): 387-400 (2011)
- 5) Luo Y1, Dallaglio K, Chen Y, Robinson WA, Robinson SE, McCarter MD, Wang J, Gonzalez R, Thompson DC, Norris DA, Roop DR, Vasiliou V, Fujita M. ALDH1A isozymes are markers of human melanoma

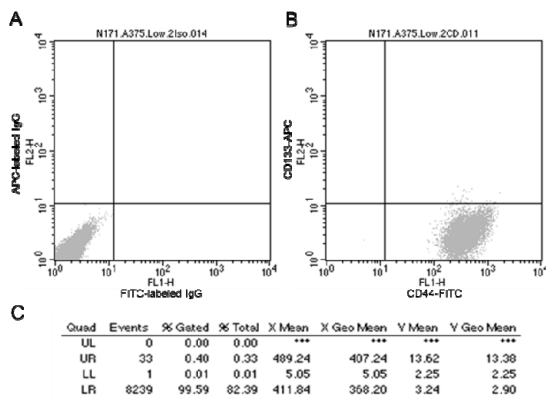


図6 FACSによる癌幹細胞マーカー発現細胞の検出
メラノーマ細胞株G361集団中におけるCD44、CD133陽性細胞をFACSにより検出した。A. アイソタイプIgGによる検出。B. CD44 (FL1)、CD133(FL2) 陽性細胞の検出。C. 測定結果(B)の集計。

- stem cells and potential therapeutic targets. *Stem Cells* 30 (10): 2100-2113 (2012)
- 6) Suzuki-Karasaki Y, Suzuki-Karaski M, Uchida M, Ochiai T. Depolarization controls TRAIL-sensitization and tumor-selective killing of cancer cells: crosstalk with ROS. *Frontiers in oncology* 4 (128): 1-14 (2014)