

《様式 B》

(平成 27 年度募集) 第 28 回 助成研究 完了報告書

研究テーマ	「安心・安全なプラズマ医療の提供に向けたプラズマ照射培地製造法の至適化」
研究責任者	岐阜薬科大学 教授 足立哲夫 <a href="mailto:adachi@gifu-pu.ac.jp">adachi@gifu-pu.ac.jp</a>
共同研究者 1	NU エコ・エンジニアリング 代表取締役 加納浩之
共同研究者 2	岐阜薬科大学 准教授 原 宏和
共同研究者 3	岐阜薬科大学 講師 神谷哲朗

## 1. 研究内容および成果ならびに今後予想される効果の概要

近年、大気圧下で非平衡低温プラズマを発生させ、生体組織や細胞に照射することが可能になり、止血、皮膚・創傷治療、がん治療など「プラズマの医療への応用」が一気に拡大してきた。しかも、細胞や組織に直にプラズマを照射するのではなく、予めプラズマを照射して製造した培地である **plasma-activated medium (PAM)** を細胞や組織に負荷する間接法の有効性が報告されてきた。報告者は、プラズマの最終的な臨床の場への応用を想定した場合、事業所にて PAM を製造・保管し、必要に応じての医療施設に供給し患者に適応することが可能な間接法の方が「より安心・安全な医療の提供」に繋がると判断し、PAM の有効性を明らかにする研究を進め、以下の成果が得られた。

報告者は、PAM のがん細胞アポトーシス誘導作用について明らかにしてきた (Adachi, T., *et al.*, *Free Rad. Biol. Med.*, **79**, 28-44, 2015, Adachi, T., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 20928, 2016)。そこで、本研究ではこの PAM の作用を増強させる手段としてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の併用の可能性を検討した。その結果、がん細胞を HDAC 阻害剤 (トリコスタチン A やバルプロ酸) で前処理した場合 PAM の効果が有意に増強されることを見出した。この併用効果のメカニズムについて検討した結果、PAM による DNA 切断が有意に増強され (TUNEL 法、 $\gamma$ H2AX WB、PARP-1 活性化にて評価)、また、PARP-1 活性化により誘導される ATP 枯渇や細胞内へのカルシウム流入が著しく亢進されることが判明した (Adachi, T., *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **606**, 120-127, 2016)。

緩和な条件で調製した PAM (mild PAM) にて正常細胞を処理することで強いストレ

スに対する抵抗性（プレコンディショニング効果）が獲得される可能性を検討した。その結果、皮膚線維芽細胞を mild PAM にて前処理した場合、その後の強い酸化ストレスに対する抵抗性を示すことが判明した。そのメカニズムとして、mild PAM による Nrf2 シグナル経路の活性化を介した heme oxygenase-1 発現亢進によることが判明した（Horiba, M., Adachi, T., *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 42208, 2017）。

PAM の調製には細胞培養用培地 DMEM を用いるが、これをヒトに投与することはできない。そこで、医療現場で用いられている乳酸リンゲル液（Lac-R）にプラズマを照射し調製した plasma-activated lactated Ringer's solution（PAL）のがん細胞アポトーシス誘導作用を PAM と比較した結果、PAM に比べ強い効果が認められた。現在、その効果増強メカニズムについて詳細な検討を継続している。プラズマ照射の最終的な臨床の場への応用を想定した場合、PAL の方が PAM に比べ実用化が近いと思われるが、PAM に比べ PAL についての基礎研究は大きく遅れており、作用メカニズムなど不明な点が多い。報告者の研究成果は PAL 有効性に関しての有益な情報を提供するものと考ええる。

## 2. 実施内容および成果の説明

オーロラや雷といった自然現象を発生させるプラズマは、原子や分子が電離してできる電荷を帯びた粒子を含む「物質の第 4 状態」であり、アーク放電、集積回路製造（情報通信機器、家電）、薄膜合成、光源、空気清浄など主に理工学の分野に応用されてきた。しかし、近年、大気圧下で非平衡低温プラズマを発生させ、生体組織や細胞に照射することが可能になり、止血[1]、皮膚・創傷治療[2]、がん治療[3,4]など「プラズマの医療への応用」が急速に進められてきた。しかも、細胞や組織に直にプラズマを照射するのではなく、予めプラズマを照射して製造した培地である plasma-activated medium（PAM）を細胞や組織に負荷する間接法の有効性が報告されてきた[5,6]。報告者は、プラズマ照射の最終的な臨床の場への応用を想定した場合、事業所にて PAM を製造・保管し、必要に応じての医療施設に供給し患者に適応することが可能な間接法の方が「より安心・安全な医療の提供」に繋がると判断し、PAM の有効性を明らかにする研究を進め、PAM 負荷に対する細胞応答シグナリングについての研究成果を発表してきた。

### 1) プラズマ照射条件決定

PAM 調製用の培地としては、Sigma-Aldrich 社 Dulbecco's modified Eagle's medium（DMEM）を用いた。プラズマ照射装置として共同研究者・加納浩之が開発した NU-Global PN-120 を用い、アルゴンガス流量は 2 standard liters/min とした（図 1）。

がん治療に向けた実験に使う PAM の場合、35 mm culture dish に DMEM を 6 mL 入れ、プラズマ照射時間を 3 分とした。

創傷治癒への応用に向けた実験に使う PAM (mild PAM) の場合は、60 mm culture dish に DMEM を 4 mL 入れ、プラズマ照射時間を 2 分とした。

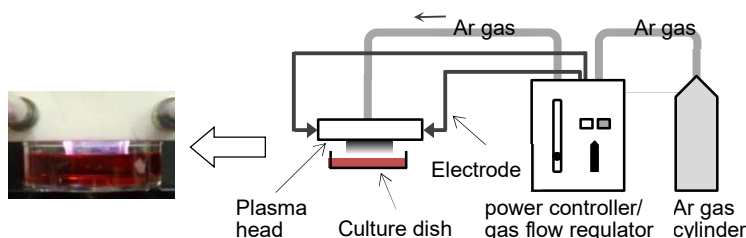


図 1 プラズマ照射装置を用いた PAM の調製

## 2) プラズマ照射培地の安定性

PAM 調製後に  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した場合、がん細胞傷害活性は安定に保持されることが判明した。

## 3) HDAC 阻害剤併用による PAM のがん細胞アポトーシス誘導作用の増強

PAM をがん細胞に負荷した場合、細胞死 (アポトーシス) を誘導することはすでに報告している。本研究では、この作用を増強させる手段としてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の併用の可能性を検討した。HDAC 阻害剤はクロマチン構造を弛緩させることで、がん放射線療法の効果を増大させることが報告されている [7]。本研究では HDAC 阻害剤としてトリコスタチン A (TSA) またはバルプロ酸 (VPA) を用い、A549 肺胞基底上皮がん細胞をこれら試薬で 12 時間処理した後、PAM を負荷した場合のアポトーシス誘導の変化を測定した。その結果、TSA は 0.1 から  $1\ \mu\text{M}$  の範囲で、VPA は 0.2 から 2 mM の範囲で PAM の効果を有意に増強した (図 2a,b)。次に HDAC 阻害剤併用効果のメカニズムについて検討した結果、これらの試薬は、PAM による DNA 切断を有意に増強することが判明した (TUNEL 法 (図 2c)、 $\gamma\text{H2AX}$  Western blotting (図 2d)、PARP-1 活性細胞免疫染色法 (図 2e) にて評価)。また、PARP-1 活性化により誘導される ATP 枯渇や細胞内へのカルシウム流入 (図 2f) を著しく亢進した。一方、HDAC 阻害剤の併用は損傷 DNA 修復因子である Rad51、Ku70、Ku80 の mRNA 発現を有意に低下させた。以上の結果より、HDAC 阻害剤の併用は PAM による DNA 傷害を増幅することでがん細胞死誘導作用を増強させることが判明した [8]。

## 4) Mild PAM のプレコンディショニング効果

PAM 負荷はがん細胞死を誘導するが、一方で、緩和な条件で調製した PAM (mild PAM) は細胞増殖作用を有すること報告されている [9]。本研究では、正常細胞を mild PAM にて処理することで強いストレスに対する抵抗性 (プレコンディショニング効果) が獲得される可能性を検討した。正常ヒト皮膚線維芽細胞を用い、mild PAM 負荷やス

トレス負荷の条件について検討し、皮膚線維芽細胞を mild PAM にて 6 時間処理した後、一端、培地を細胞培養用 10%FCS 添加 DMEM 培地に交換し 18 時間培養した後、強いストレスとして 500  $\mu$ M 過酸化水素を 4 時間負荷した後に細胞生存率を測定することとした (図 3a)。その結果、mild PAM にて前処理したヒト皮膚線維芽細胞では、過酸化水素曝露により惹起される細胞死が抑制された (図 3b)。この反応は mild PAM 処理による抗酸化酵素 heme oxygenase-1 (HO-1) の mRNA およびタンパク発現の亢進によることが判明した (図 3c,d)。HO-1 発現は転写因子 Nrf2 により調節を受けることが報告されているが[10]、本研究では mild PAM 負荷により Nrf2 の核移行が観察された (図 3e)。また、Nrf2 のノックダウンにより、HO-1 mRNA 発現が低下し (図 3f)、過酸化水素に対する mild PAM の細胞保護効果が低下した (図 3g)。以上より、酸化ストレスに対する抵抗性の獲得は、mild PAM による Nrf2 シグナル経路の活性化を介して HO-1 発現が亢進することで発揮されると考えられた[11]。

## 5) PAL のがん細胞アポトーシス誘導作用

PAM の調製には細胞培養用培地 DMEM を用いるが、これをヒトに投与することはできない。そこで、医療現場で用いられている乳酸リンゲル液 (Lac-R) にプラズマを照射して調製した plasma-activated lactated Ringer's solution (PAL) のがん細胞アポトーシス誘導作用を PAM と比較した結果、PAM より強い効果が認められた。現在、その効果増強メカニズムについて詳細に検討を継続している。

- [1] Miyamoto K, *et al.* Low temperature plasma equipment applied on surgical hemostasis and wound healings. *J Clin Biochem Nutr* 2017;60:25-28.
- [2] Haertel B, *et al.* Non-thermal atmospheric-pressure plasma possible application in wound healing. *Biomol Ther* 2014;22:477-490.
- [3] Tanaka H & Hori M. Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma. *J Clin Biochem Nutr* 2017;60:29-32.
- [4] Kajiyama H, *et al.* Future perspective of strategic non-thermal plasma therapy for cancer treatment. *J Clin Biochem Nutr* 2017;60:33-38.
- [5] Utsumi F, *et al.* Variable susceptibility of ovarian cancer cells to non-thermal plasma-activated medium. *Oncol Rep* 2016;35:3169-3177.
- [6] Adachi T, *et al.* Plasma-activated medium induced A549 cell injury by a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network. *Free Radic Biol Med* 2015;79:28-44.
- [7] Heerboth S, *et al.* Use of epigenetic drugs in disease: an overview, *Genet Epigenet* 2014;6:9-19.
- [8] Adachi T, *et al.* Histone deacetylase inhibitors stimulate the susceptibility of A549 cells to a plasma-activated medium treatment. *Arch Biochem Biophys* 2016;606:120-127.
- [9] Kim J & Keum YS. NRF2, a key regulator of antioxidants with two faces towards cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:2746457.
- [10] Itoh K, *et al.* Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria. *J Clin Biochem Nutr* 2015;56:91-97.

- [11] Horiba M, *et al.* Cytoprotective effects of mild plasma-activated medium against oxidative stress in human skin fibroblasts. *Sci Rep* 2017;7:42208.