

**Plasma - stimulated media の**  
**アポトーシス抵抗性悪性腫瘍に対する抗腫瘍作用**  
**メカニズム (要約)**

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系感染症内科学専攻  
徳永 智彦  
2018 年

指導教員 矢内 充

# 論文要約

## 論文題名

Plasma - stimulated media のアポトーシス抵抗性悪性腫瘍に対する抗腫瘍作用メカニズム

### 背景：

メラノーマ、骨肉腫は悪性度の高い悪性腫瘍であり、化学療法、放射線療法、免疫療法などの各種治療に抵抗性を示す。様々な集学的治療により予後は改善されてきているが、劇的な予後の改善には至っておらず、新たな治療が必要とされている（1,2）。

Tumor necrosis factor (TNF) - related apoptosis inducing ligand (TRAIL) は TNF スーパーファミリーに属するサイトカインであり、活性酸素 (Reactive Oxygen Species; ROS) の蓄積、がん細胞のカスパーゼ活性化、ミトコンドリアダイナミクス、カルシウムシグナル、および細胞膜脱分極に影響を及ぼして抗腫瘍効果を示す一方、正常細胞には影響を与えないため、腫瘍選択性を持つ次世代の抗腫瘍薬として期待されている。

低温大気圧プラズマは、室温、大気圧条件下で、ヘリウムやアルゴンなどの気体の放電によって作成され、Cold plasma と呼ばれており、TRAIL と同様に正常細胞に影響を与えず各種の腫瘍細胞を特異的に傷害するため新たながん治療法として期待されている（3-6）。しかし、Cold plasma は組織浸透性が小さく、直接照射する方法では治療標的が皮膚癌などの体表近くのものに限定される。

そこで近年、細胞培養液に Cold plasma を照射して生成したプラズマ活性化メディウム (Plasma - stimulated media; PSM) が注目されている。PSM も TRAIL と同様に悪性腫瘍に対して強い抗腫瘍作用を示す一方で正常細胞はほとんど傷害しないことが示されている（7-10）。

しかし、これまで TRAIL と PSM の抗腫瘍効果を同じ細胞系で比較した研究はなく、どちらが抗がんツールとして優れているかは不明である。

### 目的：

前述のように TRAIL は様々な腫瘍に対して抗腫瘍効果を示すが、骨肉腫やメラノーマは TRAIL に対して耐性であることが示されている（11）。

そこで、今回、我々は同様な抗腫瘍効果を持つ PSM の骨肉腫、メラノーマに対する有効性を検討した。

また、PSM が引き起こす細胞内のカルシウム濃度や細胞膜電位の変化を TRAIL

刺激によって引き起こされる変化と比較することで TRAIL との相違がどのような生物学的作用によるものなのかを解明し、これらの悪性腫瘍に対する新たな治療法の開発の可能性について検討した。

対象と方法：

HOS 細胞（骨肉腫）、A2058 細胞（メラノーマ）、WI-38 細胞（肺線維芽細胞）を用いた。

PSM と TRAIL で処理した細胞の生存率の測定、カスパーゼ-3/7 活性と 7-amino-actinomycin D (7-AAD) の測定、蛍光顕微鏡によるミトコンドリアネットワークの形態の観察、ミトコンドリア内と細胞質カルシウムの測定、細胞膜電位の測定を行い、その効果の違いを比較した。

結果：

### **実験 1. 骨肉腫細胞、メラノーマ細胞、肺線維芽細胞に対する TRAIL および PSM の細胞障害効果**

TRAIL (100 ng/ml) で 72 時間処理した場合、HOS 細胞、A2058 細胞の生存率は未処理の場合と比較して有意な低下を認めなかった。

一方、25%、50% PSM で処理した場合は濃度依存的に HOS 細胞と A2058 細胞の生存率を有意に減少させた ( $p < 0.01$ )。

WI-38 細胞では、TRAIL、PSM による処理では、HOS 細胞、A2058 細胞ともに生存率の有意な低下を認めなかった。

### **実験 2. 骨肉腫細胞、メラノーマ細胞における PSM によるカスパーゼの活性化とカスパーゼ阻害剤、スーパーオキシド消去剤の効果**

実験 2-1. TRAIL および PSM の骨肉腫細胞、メラノーマ細胞におけるカスパーゼ 3/7 活性と 7-AAD に与える効果

HOS 細胞では、TRAIL は前期、後期アポトーシス細胞を有意に増加させなかったが PSM は後期アポトーシス細胞を 2.85% から 26% まで有意に増加させた ( $p < 0.01$ )。

A2058 細胞では、TRAIL ( $p < 0.05$ )、PSM ( $p < 0.01$ ) はともに後期アポトーシス細胞を有意に増加させた。

実験 2-2. PSM の骨肉腫細胞、メラノーマ細胞におけるスーパーキシド消去剤 (MnTBaP)、カスパーゼ阻害剤 (Z-VAD-FMK) の効果

HOS 細胞では PSM に MnTBaP を添加した場合、有意に生存率を改善させたが、A2058 細胞では有意差を認めなかった ( $p < 0.01$ )。

また、PSM に Z-VAD-FMK を添加した場合、HOS 細胞、A2058 細胞ともに 100% PSM、25% PSM のいずれにおいても細胞の生存率に有意な改善はみられなかった。

### 実験 3. TRAIL および PSM によるミトコンドリアネットワークの変化

未処理の場合は HOS 細胞、A2058 細胞の両方で健常な細胞核の周囲に網状のミトコンドリアが観察された。

TRAIL で処理した場合は、細胞ならびに核の形態はほとんど変化させずミトコンドリアを短縮させたが線維状の構造は保たれていた。

これに対して、PSM で処理した場合は核の断片化、ミトコンドリアの著しい断片化と凝集が観察された。

### 実験 4. TRAIL および PSM による細胞質カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_{cyt}$ )、ミトコンドリア内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_{mit}$ ) の恒常性の変化

#### 実験 4-1. PSM によるカルシウム恒常性の変化

HOS 細胞では PSM (12.5% - 50%) は 1 分以内に  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  と  $[Ca^{2+}]_{mit}$  の両者を増加させ、その効果は 10 分間持続した。

$[Ca^{2+}]_{cyt}$  の増加が濃度依存的であるのに対して、 $[Ca^{2+}]_{mit}$  の増加は高濃度ではむしろ少なくなる傾向であった。

A2058 細胞では PSM (12.5% - 50%) は 1 分以内に  $[Ca^{2+}]_{mit}$  を増加させ、その効果は 10 分間持続した。

$[Ca^{2+}]_{cyt}$  は PSM の濃度が増加すると変化が少なくなる傾向であった。

## 実験 4-2. TRAIL および PSM による store-operated $\text{Ca}^{2+}$ entry (SOCE) の変化

PSM で処理した細胞では、無処理や TRAIL で処理した細胞に比べて小胞体プールからのカルシウム放出を示す  $\Delta F_{\text{release}}$  は有意に高値となり、その変化は濃度依存性を示した ( $p < 0.01$ )。

その一方で、ストア依存性カルシウム流入を示す  $\Delta F_{\text{influx}}$  は PSM で処理した場合、無処理や TRAIL で処理した場合よりも有意に低値を示し、この変化も濃度依存的であった ( $p < 0.01$ )。

## 実験 5. TRAIL および PSM の細胞膜脱分極作用

A2058 細胞、HOS 細胞において PSM は 1 分以内に細胞膜脱分極を誘発し、その効果は 10 分間持続した。これに対して TRAIL は 100 ng/ml まで有意な膜電位の変化を起こさなかった。

考察：

実験 1 で PSM は TRAIL 耐性の骨肉腫細胞、メラノーマ細胞に抗腫瘍効果を示し、肺線維芽細胞に対する細胞毒性が低いことを確認した。

これまでの報告では PSM は主としてアポトーシスを誘導して抗腫瘍効果を発揮するとされてきたが、これに対し、我々は PSM がアポトーシスとは異なる細胞死を引き起こすことを報告した (12)。

この結果を確認するために、実験 2 で PSM が誘導する細胞死の特徴を検討したところ HOS 細胞においては PSM は初期 (24 時間以内) に TRAIL よりも強くカスパーゼを活性化させ細胞膜傷害を誘発した。

また、HOS 細胞、A2058 細胞を PSM で長時間 (72 時間) 処理したときに誘導される細胞死は、カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK で抑制されなかった。一方で HOS 細胞ではスーパーオキシド選択的消去能を有する MnTBaP で細胞死が抑制されたが、A2058 細胞ではその効果は認められなかった。

この結果より PSM は初期にはカスパーゼ-3/7 の活性化を誘発するが、PSM による遅発性の細胞死はカスパーゼ非依存性であり細胞種によってはスーパーオキシド依存性であると考えられた。

我々は、低濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  はミトコンドリア膜電位の消失およびカスパーゼ 3/7 の活性化およびアポトーシスを促進し、一方、高濃度の  $\text{H}_2\text{O}_2$  はカスパーゼ非依存性細胞死を誘発することを報告している (13)。

したがって、PSM 刺激後の異なる時間 (24 および 72 時間) におけるカスパーゼ

依存性アポトーシスならびに遅発型カスパーゼ非依存性細胞死の誘発は時間とともに  $\text{H}_2\text{O}_2$  が高濃度に蓄積することによって誘導される細胞死がアポトーシスからカスパーゼ非依存性細胞死へと切り替わった可能性があると考えられたが、MnTBaP の効果は細胞種によって異なり、PSM が誘導する細胞死におけるスーパーオキシドおよびそれに起因する  $\text{H}_2\text{O}_2$  などのオキシダントの役割は細胞によって相違があることが示唆された。

ミトコンドリアは、分裂と融合を繰り返し、網状構造のネットワークおよび機能を維持している（ミトコンドリアダイナミクス）。我々は TRAIL と PSM がともにミトコンドリアネットワークを標的としてその腫瘍選択的な細胞毒性を発揮することを報告した（12, 14）。

実験 3 で、TRAIL と PSM がミトコンドリアネットワークに与える影響を直接比較した結果、PSM は TRAIL よりも強力にミトコンドリアネットワークを破綻させることが示され、ミトコンドリアネットワークの異常が顕著なほど、細胞の生存率も低下する傾向がみられた。

我々は、細胞内カルシウム動態、特にミトコンドリアカルシウムの恒常性を維持することが細胞の生存や機能を維持するために重要であり、その変調が TRAIL による細胞死誘発に関与していることを見出した（15, 16）。

そこで、今回 PSM の細胞内カルシウム濃度に対する作用について検討したところ、実験 4-1 では PSM がカルシウム恒常性の破綻を誘発し、PSM も TRAIL と同様に細胞内カルシウムの恒常性を破綻させることで腫瘍細胞に対し細胞死を誘導している可能性が考えられた。

SOCE は小胞体のカルシウムプールが枯渇すると開口して細胞外カルシウムを流入させる。SOCE が機能不全になればカルシウム恒常性は大きなダメージを受けることになり、細胞が生存できなくなると考えられる。

実験 4-2 では PSM が小胞体にカルシウムを蓄積させ、SOCE によるカルシウムの流入を阻害することが示され、PSM は SOCE を阻害することで抗腫瘍効果を発揮している可能性が考えられた。

我々は TRAIL による持続的な細胞膜の脱分極がミトコンドリアの過剰な断片化と凝集に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた（17）。

実験 5 で HOS 細胞と A2058 細胞を PSM と TRAIL で処理した直後から細胞膜電位を測定したところ PSM が TRAIL よりも強力に即時的で持続的な細胞膜の脱分極を誘発することを見出した。

したがって PSM は、TRAIL よりも強く細胞膜電位ならびにカルシウム恒常性の破綻を誘発することにより、TRAIL 抵抗性悪性腫瘍細胞においてもミトコンドリアネットワーク異常を惹起して、強力な抗腫瘍効果を示すと考えられた。さらに PSM に

よる強力な細胞膜脱分極が SOCE の阻害を誘発することが、TRAIL よりも強力な抗腫瘍効果を示す要因の一つであると考えられた。

現在のところ骨肉腫やメラノーマなどの悪性腫瘍は TRAIL を含む多くの抗がん剤に耐性を示し、治療が困難である。本研究は PSM がこれらに対しても強い抗腫瘍効果を示す一方で正常細胞に影響を与えないことを明らかにした。

今後、現時点では完全には同定されていない活性因子やその細胞膜電位、カルシウム、ミトコンドリアダイナミクスに対する作用機構を解明していく必要がある。

PSM を臨床応用するにあたっては人体に害のない新たなプラズマ活性化溶液を検討する必要がある。また、プラズマが遺伝子発現に影響を与えているという報告もあることから (6, 10)、生体への安全性も検討していく必要がある。プラズマ医療が有効な治療方法として確立されるようにこれらの課題を克服していく必要があると考えられた。

#### 引用文献

1. Iwata S, Nakamura T, Gaston CL, Carter SR, Tillman RM, Abudu A, Jeys L, Grimer RJ. Diaphyseal osteosarcomas have distinct clinical features from metaphyseal osteosarcomas. *Eur J Surg Oncol*. 2014 Sep; 40(9): 1095-100.
2. 日本皮膚悪性腫瘍学会編：皮膚悪性腫瘍取扱い規約 第2版（2010年8月）；金原出版.
3. Keidar M, Walk R, Shashurin A, Srinivasan P, Sandler A, Dasgupta S, Ravi R, Guerrero-Preston R, Trink B. Cold plasma selectivity and the possibility of a paradigm shift in cancer therapy. *Br J Cancer*. 2011 Oct; 105(9): 1295-301.
4. Zucker SN, Zirnheld J, Bagati A, DiSanto TM, Des Soye B, Wawrzyniak JA, Etemadi K, Nikiforov M, Berezney R. Preferential induction of apoptotic cell death in

- melanoma cells as compared with normal keratinocytes using a non-thermal plasma torch. *Cancer Biol Ther.* 2012 Nov; 13(13): 1299-306.
5. Arndt S, Unger P, Wacker E, Shimizu T, Heinlin J, Li YF, Thomas HM, Morfill GE, Zimmermann JL, Bosserhoff AK, Karrer S. Cold atmospheric plasma (CAP) changes gene expression of key molecules of the wound healing machinery and improves wound healing in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013 Nov; 8(11): e79325.
  6. Ishaq M, Evans MM, Ostrikov KK. Effect of atmospheric gas plasmas on cancer cell signaling. *Int J Cancer.* 2014 Apr; 134(7): 1517–28.
  7. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M, Kikkawa F. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013 Dec; 8(12): e81576.
  8. Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, et al. Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer.* 2015 Jul; 18(3): 635–643.
  9. Hattori N, Yamada S, Torii K, Takeda S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Kanda M, Fujii T, Nakayama G, Sugimoto H, Koike M, Nomoto S, et al.



- Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2015 Nov; 47(5): 1655-62.
10. Adachi T, Tanaka H, Nonomura S, Hara H, Kondo S, Hori M. Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network. *Free Radic Biol Med.* 2015 Feb; 79: 28-44.
11. Leng Y, Qiu L, Hou J, Zhao Y, Zhang X, Yang S, Xi H, Huang Z, Pan L, Chen W. Phase II open-label study of recombinant circularly permuted TRAIL as a single-agent treatment for relapsed or refractory multiple myeloma. *Chinese Journal of Cancer.* 2016 Sep; **35(1)**:86
12. Saito K, Asai T, Fujiwara K, Sahara J, Koguchi H, Fukuda N, Suzuki-Karasaki M, Soma M, Suzuki-Karasaki Y. Tumor-selective mitochondrial network collapse induced by atmospheric gas plasma-activated medium. *Oncotarget.* 2016 Apr; 7(15): 19910-27.
13. Tochigi M, Inoue T, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Ra C, Suzuki-Karasaki Y. Hydrogen peroxide induces cell death in human TRAIL-resistant melanoma through intracellular superoxide generation. *Int J Oncol.* 2013 Mar; 42(3): 863-72.
14. Judée F, Merbahi N, Yousfi M. Genotoxic and cytotoxic effects of plasma activated media on Multi-Cellular Tumor Spheroids. *Plasma Med.* 2016 Jun; 6(1): 47-57

15. Ohshima Y, Takata N, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. Disrupting mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis causes tumor-selective TRAIL sensitization through mitochondrial network abnormalities. *Int J Oncol.* 2017 Oct; 51(4): 1146-58.
16. Takata N, Ohshima Y, Suzuki-Karasaki M, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Suzuki-Karasaki Y. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> removal amplifies TRAIL cytotoxicity toward apoptosis-resistant tumor cells via promotion of multiple cell death modalities. *Int J Oncol.* 2017 Jul; 51(1): 193-203.
17. Suzuki-Karasaki Y, Fujiwara K, Saito K, Suzuki-Karasaki M, Ochiai T, Soma M. Distinct effects of TRAIL on the mitochondrial network in human cancer cells and normal cells: role of plasma membrane depolarization. *Oncotarget.* 2015 Aug; 6(25): 21572-88.