

# 大腸がん治療への応用を目的とした プラズマ照射生理食塩水投与の有効性調査

電気・化学専攻 医用工学領域 2181233 篠原 克弥

(主査：森 晃 教授 副査：島谷 祐一 准教授, 小林 千尋 講師)

## 1. 緒言

近年、プラズマ技術の発展により大気圧下において低温のプラズマの生成が可能となったことから、プラズマが生体に及ぼす影響について研究が進められている。従来の研究から大気圧低温プラズマ(Atmospheric pressure Low Temperature Plasma;ALTP)によってがん細胞の増殖を抑制することが示唆されている。がんの中でも大腸がんは日本におけるがん罹患患者の中で最も多い疾患であるが<sup>[1]</sup>、現行の大腸がん治療では後遺症や副作用が生じる可能性がある。したがって、新しい大腸がんの治療法の開発が求められている。本学では大腸がんに焦点を当てた ALTP の研究が行われており、大腸がん細胞の一種である Colo-205 ヒト大腸がん細胞に対するプラズマの影響について研究が行われた<sup>[2]</sup>。研究の結果から、コントロールの培地では増殖傾向を示した一方で ALTP 照射培地では大腸がんの増殖が抑制されていることが確認された。したがって、プラズマによって大腸がんの進行を抑制する可能性が示唆された。以上より、本研究では ALTP による生体内の大腸がん進行抑制に期待して、大腸がんモデルラットを用いた ALTP による治療効果について検討を行う。本稿では、プラズマ照射生理食塩水(Plasma Treated Saline:PTS)の作製方法、大腸がんモデルラットに対する PTS 投与実験、PTS が遺伝子発現に与える影響について述べる。

## 2. PTS 作製実験

大腸がんに対する ALTP の影響を調査するにあたり、大腸内に対して ALTP の直接照射は侵襲性が高く、医療応用を目的とする上で不当である。したがって、ALTP を生理食塩水に照射して作製した PTS を投与することで大腸がんに与える影響について調査を行う。

### 2.1 PTS 作製方法

プラズマの PTS の作製にあたり、がん細胞に有効とされる活性種の生成を確認する必要がある。図 1 に PTS 作製方法、表 1 にプラズマ生成条件を示す。

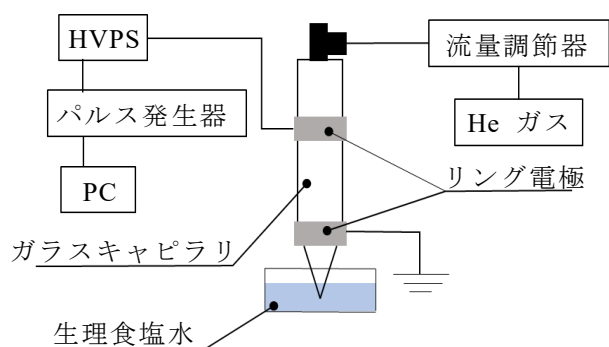


図 1 PTS 作製方法

表 1 プラズマ生成条件

ガス流量 [L/min]	周波数 [kHz]	電圧 [kV]	時間 [s]
1.0	3.0	13	300

## 2.2 成分分析

PTS 内の活性種濃度を測定するためにパックテストを用いて吸光度法により  $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{NO}_2$ 、 $\text{NO}_3$  の測定を行った。図 2 に活性種濃度を示す。

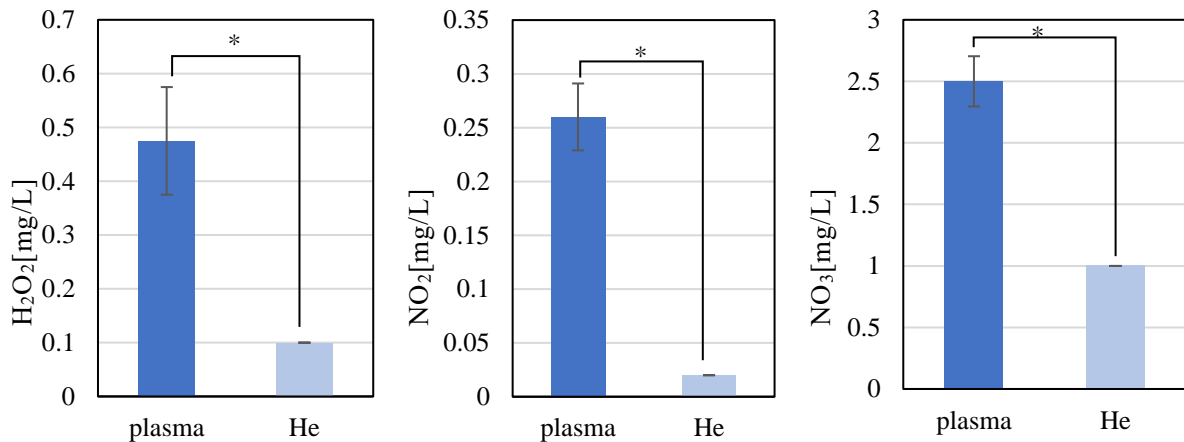


図 2 活性種濃度(n=3, S.E.)(\* p<0.05)

図 2 からプラズマを照射することで  $\text{H}_2\text{O}_2$  や  $\text{NO}_x$  などの活性種が生成されていることが確認された。

## 3. プラズマ照射生理食塩水による腸内投与の効果検討

PTS が大腸がんモデルラットに与える影響について調査を行うために、大腸がんモデルラットに対する PTS の投与実験を行った。本実験では臨床応用へ向けて PTS による腸内洗浄を目的とした腸内投与による効果の検討を行った。加えて、尾静脈投与がラットに与える負荷について検討を行った。

### 3.1 実験方法

#### 3.1.1 大腸がん作製方法

大腸がんモデルラットの作製にはアゾキシメタン(AOM: Azoxymethane)(FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.)とデキストラン硫酸ナトリウム(DSS: Dextran Sulfate Sodium) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Co., Ltd.)を用いる。生後 5 週間の雄性の KAD(Kyoto Apc Delta)ラットに、体重 1 [kg]に対して 20 [mg]の AOM を皮下注射し、1 週間後に DSS 濃度 2%の飲料水を 7 日間投与することで大腸がんを誘発させる。KAD ラットは、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子である Apc 遺伝子にナンセンス突然変異を持つラットである。AOM は発がん物質であり、大腸がんを誘発する試薬である。AOM には、がん細胞の増殖を促す K-ras 経路と  $\beta$ -catenin 経路の促進作用、アポトーシスを促す TGF $\beta$  経路の抑制作用が存在する<sup>[3]</sup>。DSS は飲水投与によって腸粘膜上皮細胞に傷害を起こし、大腸がんを併発しやすいとされる大腸炎を誘発させる。AOM と DSS によって作製される大腸がんモデルラットは AOM 投与から約 8 週で腫瘍が発生するとされている。以降から、AOM を投与した週を 0 週として表記する。

#### 3.1.2 PTS 投与方法

本実験ではコントロール群 2 匹、腸内投与群 5 匹、尾静脈投与群 1 匹に分けて比較を行った。コントロール群では大腸がんモデルラットの肛門から 6[mL]の生理食塩水を流し込む処置を行った。腸内投与群では大腸がんモデルラットの肛門から 6[mL]の

PTS を流し込んで洗浄を行った。尾静脈投与群では 6[mL]の生理食塩水に対してプラズマを照射して作製した PTS のうち 0.5[mL]を尾静脈から注射で投与した。それぞれの処置は 8 週から 23 週にかけて行った。

### 3.2 評価方法

本実験では悪液質による体重減少を評価するための体重変化，内視鏡を用いて腫瘍の発生や肥大化を評価する腸内観察，細胞状態や転移浸潤を評価する病理検査にて PTS の影響評価を行った。体重変化，腸内観察は 0 週から 23 週にかけて週に 2 回，病理検査は 23 週のラットから腸を摘出して専門機関に委託した。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 体重変化

がんによって食欲の低下や免疫の低下から体重減少などが起こる悪液質と呼ばれる性質が生じる。したがって，悪液質の調査からがん化の時期を推測するために体重変化の観察を行った。しかし，PTS の投与による体重の違いに差は見られなかった。また，悪液質による体重の減少も確認出来なかった。

#### 3.3.2 腫瘍形状および腫瘍数変化

内視鏡を用いて腫瘍の発生および増殖の評価を行った。腫瘍数の変化については，腫瘍の発生が早い個体はその後腫瘍の増殖が確認され，PTS による腫瘍増殖の抑制は見られなかった。また，内視鏡を用いて腫瘍肥大の観察を行った。図 3 に 23 週目における腸内画像を示す。



①コントロール群(rat B)

②腸内投与群(rat C)

③尾静脈投与群(rat H)

図 3 腸内画像(23 週目)

図 3 から PTS による腸内投与はコントロールと比べて腫瘍の形状，大きさに違いが確認出来なかった。一方で，PTS の尾静脈投与によって腫瘍の肥大化抑制が確認された。腸内投与で効果が現れなかった原因として PTS を腸内に流し込んだ後は短時間で排出されるため腫瘍に作用する時間が短いことが挙げられる。一方で尾静脈投与により肥大化を抑制した理由として血管を通じて腫瘍に影響を与えたことが挙げられる。

#### 3.3.3 病理検査

病理検査による細胞の形状の診断から PTS が細胞のがん化に与える影響の調査を行った。病理検査結果からすべての検体で高分化型の管状腺癌が確認された。

### 3.4 考察

本実験において腸内投与では効果が小さいことが示唆された。原因として腸内投与では PTS が腸内に残存する時間が短いことが挙げられる。一方で，図 3 から尾静脈投与では腫瘍肥大の抑制が見られた。肥大化の抑制について，腫瘍は血管から栄養を吸収することで肥大化することから血管を介した尾静脈投与により腫瘍に対して直接的に活性種が作用した可能性が考えられる。しかし，病理検査からいずれの処置におい

てもがんの進行が進んだ状態であったため、PTSによる進行の抑制について評価するために実験期間の短縮が必要であると考えた。

#### 4. プラズマ照射生理食塩水の投与方法の違いが与える影響調査

3章の実験から尾静脈投与によるラットの衰弱が見られなかったことから、尾静脈投与が与える負荷が少ないことが確認された。臨床における輸液や静脈投与を目的として尾静脈投与による効果の調査を行う。本実験では3章の実験を踏まえて実験期間を短縮化することでPTSががん進行に与える影響について調査を行う。

##### 4.1 実験方法

3章と同様にAOM/DSSモデルを用いた大腸がんモデルラットにてPTSの影響を調査した。3章の実験から実験期間を短縮し、処置は8週から20週にかけて行った。本実験では、コントロール群2匹、腸内投与群3匹、尾静脈投与群4匹で実験を行った。また、PTSの作用を評価するために遺伝子発現解析を評価項目に追加した。

##### 4.2 評価方法

3章の実験と同様に体重変化、腸内観察、病理検査にてPTSの影響の評価を行った。また、大腸がんに対するPTSの作用機序解明に向けて遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析はtotal RNA溶液作製、cDNA合成、RT-qPCRの順で行う。

最初にtotal RNA溶液の作製を行った。AOM投与20週後に大腸がんモデルラットから大腸を摘出して組織を採取した。採取した組織を0.75[mL]のRNA抽出用試薬ISOGEN(NIPPON GENE Co., LTD.)を用いて組織を溶解してRNAを抽出した。クロロホルム140[μL]、イソプロパノール0.32[μL]、70%エタノール0.7[mL]を用いてtotal RNA溶液を作製した。

続いてcDNA合成を行った。FastGene™ scriptaseII 5X Ready Mix Odt(LS65)(NIPPON Genetics Co., Ltd.) 2[μL]、RNA1[μg]分のtotal RNA溶液、RNAフリー水で計10[μL]になるよう混合した。サーマルサイクラーにて逆転写反応を起こし、cDNAを回収した。

次に、TBGreen Premix Ex Taq™ II ROX plus(TAKARA Bio Co., Ltd)及びStepOne™ Real-Time PCR system(Thermo Fisher SCIENTIFIC Co., Ltd)を用いてRT-qPCRを行った。RT-qPCRとは1検体で既知の値を検量線とし、検量線と比較して遺伝子の発現量を比較する方法である。TBGreenを5[μL]、ROX difference dyeを0.2[μL]、フォワードプライマーとリバースプライマーを各0.4[μL]、純水を3[μL]、4倍希釈cDNA溶液を1[μL]混合し、PCR反応溶液の調製を行った。StepOneにて逆転写反応、PCR反応を行った。本実験では大腸の炎症について評価を行うためにIL-6(Interleukin-6)について調査を行った。IL-6とは組織の炎症や感染や組織損傷に反応して迅速かつ一過性に産生され、急性期反応、造血、免疫反応の刺激を通じて宿主防御に関与する。本実験で使用したプライマーを表2に示す。

表2 本実験で使用したプライマー

<i>β-actin</i>	Forward	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC
	Reverse	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>IL-6</i>	Forward	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
	Reverse	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 体重変化

本実験においても体重変化の観察から処置による影響の違いは確認出来ず、3章の実験結果と同様の傾向が見られた。また、3章の結果と同様に悪液質による体重の減少は見られなかった。

#### 4.3.2 腫瘍形状および腫瘍数変化

3章と同様に内視鏡による腸内観察で腫瘍の発生・増殖、肥大化の評価を行った。本実験において腸内投与群では腫瘍の発生に遅れが生じた。原因として、DSS 投与期間に衰弱が確認出来たため、DSS の投与量を少なくしたことが挙げられる。腫瘍の発生・増殖については3章と同様の傾向を示し、PTS による腫瘍発生・増殖の抑制は見られなかった。また、腫瘍形状については3章の実験と同様に尾静脈投与によって腫瘍の肥大化抑制が確認された。したがって、PTS の尾静脈投与により大腸がんの進行抑制が示唆された。

#### 4.3.3 病理検査

病理検査による診断からすべての検体で高分化型の管状腺癌が確認された。しかし、コントロール群および腸内投与群では粘膜下組織への転移浸潤が確認された一方で尾静脈投与群では浸潤の程度が浅い粘膜固有層間質までの転移浸潤が確認された。したがって、PTS の尾静脈投与により転移浸潤の抑制が示唆された。

#### 4.3.4 遺伝子発現解析

本実験では IL-6 の発現について調査を行った。図 4 に IL-6 の発現量を示す。

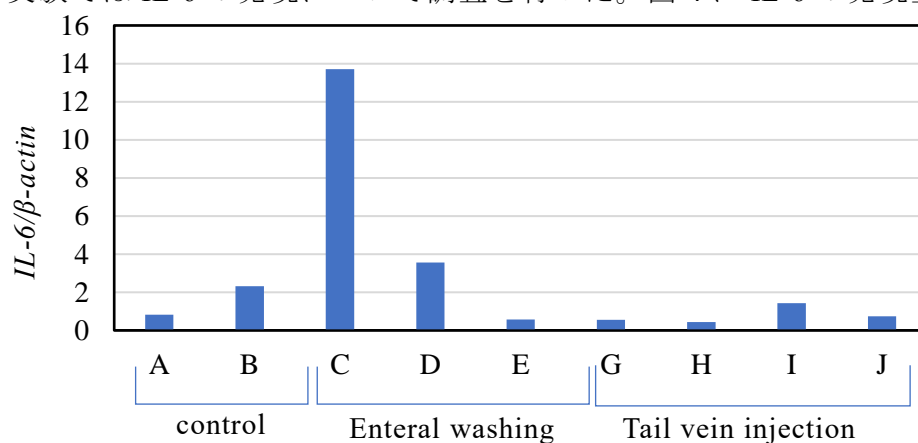


図 4 IL-6 の発現量

図 4 よりコントロールに比べて腸内投与では IL-6 発現量が高くなる傾向が見られた。一方で尾静脈投与では発現が少なくなる傾向が見られた。

### 4.4 考察

3章の実験と4章の実験からPTSの腸内投与は腫瘍の発生や肥大化に与える影響は小さいと考えられる。一方で尾静脈投与では腫瘍発生に大きな差異は生じなかったが、腫瘍肥大の抑制が見られた。また、図4よりコントロールおよび腸内投与ではIL-6の発現が見られた一方で尾静脈投与では発現が見られなかった。上記の結果から、尾静脈投与では細胞死が生じたことにより腫瘍の肥大化を抑制したことが考えられる。また、IL-6の発現は脂肪の褐色化を促し、悪液質を促進させることが確認されている。したがって、PTSの尾静脈投与が悪液質に対しても有効であることが考えられる。

## 5. プラズマ照射生理食塩水の尾静脈投与が遺伝子発現に与える影響

### 5.1 実験方法

3章, 4章の実験から PTS の尾静脈投与に効果が見込めたため, 尾静脈投与に焦点を当てた実験を行った。これまでの実験同様 AOM/DSS モデルを用いた大腸がんモデルラットに対して PTS の影響を調査した。本実験では 4章の実験と同様に AOM の投与から 20 週にて組織の採取を行った。本実験では, コントロール群 2 匹, 尾静脈投与群 2 匹で実験を行った。

### 5.2 評価方法

本実験では体重変化, 腸内観察, 遺伝子発現解析にて評価を行った。本実験では腫瘍壊死因子である *TNF- $\alpha$* , アポトーシス調節因子の *caspase-3*, 血管内皮増殖因子である *VEGF*(*vascular endothelial growth factor*), 血管新生抑制因子である *TSP-1*(*Thrombospondin-1*)の解析を行った。本実験で使用したプライマーを表 3 に示す。

表 3 本実験で使用したプライマー

<i><math>\beta</math>-actin</i>	Forward	AAATGGGCTCCCTCTCATCAGTTC
	Reverse	TCTGCTTGGTGGTTTGCTACGAC
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	Forward	GACGTTGACATCCGTAAGACC
	Reverse	CTAGGAGCCAGGGCAGTAATCT
<i>Caspase-3</i>	Forward	GGACCTGTGGACCTGAAAAA
	Reverse	GCATGCCATATCATCGTCAG
<i>VEGF</i>	Forward	CGTCTACCAGCGCAGCTATTC
	Reverse	CTCCAGGGCTTCATCATTGC
<i>TSP-1</i>	Forward	AACGTGGATCAGAGGGACAC
	Reverse	GTCATCGTCATGGTCACAGG

### 5.3 実験結果

#### 5.3.1 体重変化

3章, 4章の実験と同様に体重変化による悪液質の評価を行った。本実験において尾静脈投与群では増加傾向を示したが, コントロール群では体重の減少が確認された。

#### 5.3.2 腫瘍形状および腫瘍数変化

PTS 投与により腫瘍の発生・増殖および肥大化に与える影響について調査を行った。腸内観察による腫瘍数変化、腫瘍形状の変化については 3, 4章の結果と同様の傾向が確認された。

#### 5.3.3 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析により PTS が腫瘍組織と正常組織の *TNF- $\alpha$*  および *caspase-3* に与える影響を調査した。図 5 に *TNF- $\alpha$*  の発現量, 図 6 に *caspase-3* の発現量を示す。図 5 から PTS の投与により *TNF- $\alpha$*  が発現していることが示唆された。しかし, 図 6 から *caspase-3* の発現は PTS の投与による発現増加は確認されなかった。したがって、腫瘍の肥大化抑制はアポトーシス以外の要因があることが考えられる。上記の結果から腫瘍の肥大には血管新生が関わっていることから血管新生関連因子に着目した。本実験では血管新生促進因子 *VEGF* および血管増殖抑制因子 *TSP-1* の発現解析を行った。図 7 に



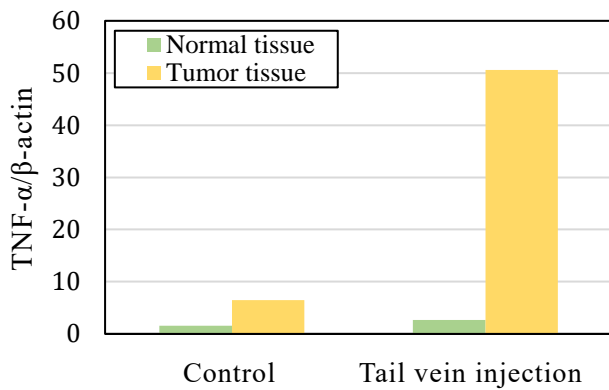


図 5 TNF- $\alpha$  の発現量  
(control : Normal N=1, Tumor N=2  
TVI:Normal N=2, Tumor N=4)

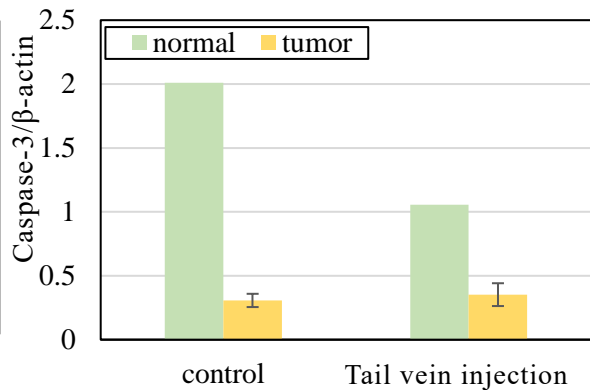


図 6 caspase-3 の発現量  
(Normal N=2, Tumor N=4)

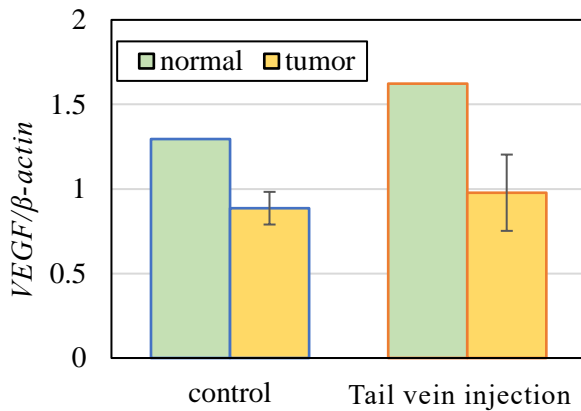


図 7 VEGF の発現量  
(Normal N=2, Tumor N=4)

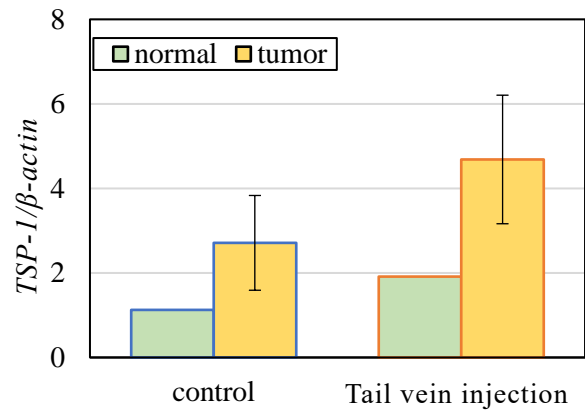


図 8 TSP-1 の発現量  
(Normal N=2, Tumor N=4)

VEGF の発現比較, 図 8 に TSP-1 の発現比較を示す。図 7 から, VEGF の発現について PTS 投与とコントロールで発現の違いに差は見られなかった。しかし, TSP-1 においては尾静脈投与により発現する傾向が見られた。

## 6. 考察

5 章の結果から, 体重変化についてコントロールでは体重の減少が見られた一方で, 尾静脈投与では体重の減少は見られなかった。4 章における実験結果から尾静脈投与により IL-6 の発現を抑制していることから PTS の尾静脈投与により脂肪の褐色化を抑えて悪液質を抑制したことが考えられる。また, 3 章から 5 章の結果から PTS の尾静脈投与により腫瘍の肥大化抑制が確認された。腫瘍の肥大化を抑制した原因として細胞死の誘導や血管新生の抑制が考えられる。しかし, TNF- $\alpha$  の発現が確認された一方でアポトーシス調節因子である caspase-3 の発現に差を示さなかったことからアポトーシス以外の細胞死が引き起こされた可能性が考えられる。上記の細胞死について, TNF- $\alpha$  の下流では IKK が活性化することが確認されており, IKK は H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による酸化ストレスで細胞死を誘導することから PTS により IKK に酸化ストレスが商事や可能性が考えられる。また, 図 7 より静脈投与によって VEGF の発現に差は見られなかった一方

で図 8 より TSP-1 の発現傾向が示唆された。図 9 に血管新生関連経路を示す。

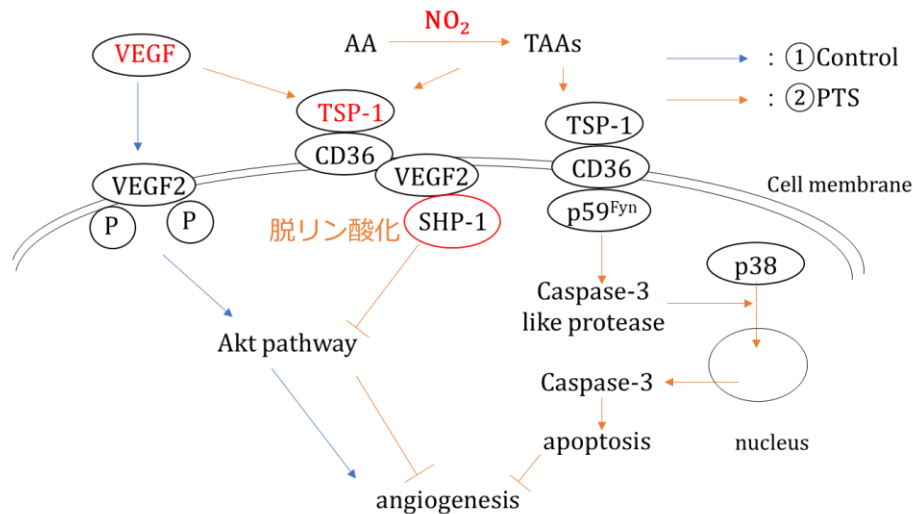


図 9 血管新生関連経路

血管新生関連経路では NO<sub>2</sub> によりトランスアラキドン酸が生成されることで TSP-1 が発現することが確認されている。TSP-1 の発現により akt 経路が抑制されるため、PTS 内の NO<sub>2</sub> が TSP-1 の発現を誘導することで血管新生を抑制し、腫瘍肥大を抑制した可能性が考えられる。

## 7. 結言

本稿では、大腸がんモデルラットの作製方法、PTS の作製方法、遺伝子発現解析、PTS の投与が大腸がん促進遺伝子に及ぼす影響、PTS の投与が正常組織と腫瘍組織に与える影響の違いについて述べた。実験結果から PTS の腸内投与は大腸がんに対する効果が小さいことが考えられる。一方で尾静脈投与によりアポトーシス調節因子の発現は見られなかったが、血管新生抑制因子の発現が見られた。本研究の成果から PTS の尾静脈投与により腫瘍肥大の抑制、がん細胞の浸潤抑制、悪液質の抑制が示唆され、PTS が大腸がんの進行を抑制することが考えられる。今後の展望として臨床応用に向けた動物実験として、サンプル数の確保および作用機序の解明が必要であると考えられる。

## 参考文献

- [1] 国立がん研究センター, がん情報サービス(大腸がん), 2023.1.20
- [2] 奥野菜々子ほか, "大腸がん細胞に対する大気圧低温プラズマ照射培地による細胞障害の検討", 第 30 回 MAGDA コンファレンス in 広島 講演論文集, pp117-122
- [3] Kazuto Yoshimi et al., "Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat", *Cancer sci*, Vol.100, No.11, pp.2022-2027, 2009