

大気圧低温プラズマ照射による乳がん細胞への影響の検証

電気・化学専攻 医用工学領域 2181266 本田 雅貴

(主査：森 晃 教授 副査：島谷 祐一 准教授, 小林 千尋 講師)

1. 緒言

がんは日本国内で年間 35 万人以上の死亡者数を記録している疾患である^[1]。本研究ではその中でも 2019 年に女性の部位別罹患数が最多を記録した乳がんを対象とする。乳がんは乳汁を生成する乳腺小葉や、乳汁を乳頭に繋ぐ乳管に形成される。現在の治療方法には、切除などの外科治療や薬物療法、放射線治療などが挙げられる。しかし、現行の治療方法は乳汁の生成機能の喪失等による精神的負担や吐き気等の副作用から患者への負担が大きい。従って、患者への負担が少ない新規の乳がん治療方法の確立が必要である。

本研究では、表面加工や滅菌技術などのほか、生体に対しても応用されているプラズマに着目する。生体にプラズマを作用させる場合には、大気圧低温プラズマ (Atmospheric Low Temperature Plasma : ALTP) が用いられる。ALTP は、大気圧気体に外部電界や磁界を印加することで、電子のみ高いエネルギーを持ったプラズマである。本研究で使用する ALTP は、大気圧下で高電圧の印加に加え、He ガスを流し込み生成を行う。近年の研究により、ALTP にはがん細胞への有用性が示唆されている。従って、乳がんに対しても大気圧低温プラズマが有効である可能性があると考え、乳がんへの ALTP の影響の検証を行う。

2. トリプルネガティブ型乳がん

乳がんは細胞に含まれるたんぱく質により以下の 5 つのサブタイプに大別される。① Luminal A 型, ② Luminal B (Her 2 陰性) 型, ③ Luminal B (Her 2 陽性) 型, ④ Her2 型, ⑤ Triple Negative Breast Cancer (TNBC) 型の以上 5 種である。表 1 に乳がんのサブタイプ分類方法を示す。サブタイプの分類の指標となるたんぱく質には、エストロゲン受容体 (Estrogen Receptor: ER), プロゲステロン受容体 (Progesterone Receptor: PgR), 上皮成長因子受容体 2 (Human epidermal receptor 2: Her2) がある。TNBC 型は ER, PgR, Her2 全てが陰性であり、薬物治療の際に標的となるたんぱく質が存在しない。従って、TNBC 型の薬物療法には細胞障害性抗がん薬が用いられるが、正常細胞の増殖機能も阻害する副作用がある。近年、数種の分子標的薬が承認された TNBC 型だが、他のサブタイプに比べ治療方法が限定的である。従って、本研究では TNBC 型に対する ALTP の治療効果に着目する。

表 1 乳がんのサブタイプ分類方法

	①	②	③	④	⑤
ER	positive	positive	positive	negative	negative
PgR	positive	positive /negative	positive /negative	negative	negative
Her2	negative	negative	positive	positive	negative

3. ALTP に期待される作用

ALTP は反応性の高い Reactive oxygen species(ROS)や Reactive nitrogen species(RNS)等を含む活性種を生成する。ALTP によって生成された活性種が酸化ストレスを引き起こし、がん細胞の選択的な細胞死を誘起出来ると考えた^[3]。本研究では、生体に対して低侵襲な細胞死であるアポトーシスの誘導を目指す。

3.1 酸化ストレスによるアポトーシス誘導

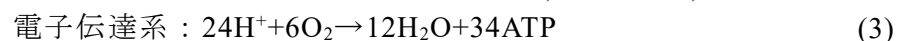
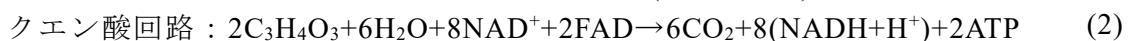
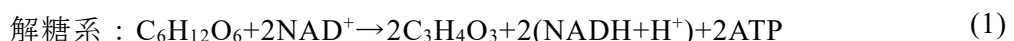
酸化ストレスとは生体内の酸化・還元状態の維持機構が破綻した状態である^[2]。生体内ではエネルギー産生のために取り込まれた酸素が、代謝過程で ROS に変化する。この ROS は抗酸化機序により除去されるが、抗酸化機序が十分に機能していない場合、生体内に ROS が蓄積し酸化ストレス状態となる。酸化ストレス状態では活性種は、DNA 損傷の要因の一つとなる。ROS, RNS によって生じるアポトーシス経路を図 1 に示す^[4]。

本研究では ROS, RNS を生成する ALTP を乳がん細胞に間接的に作用させ、人為的に酸化ストレスを引き起こし乳がん細胞のアポトーシス誘導を目指す。

3.2 乳がん細胞の選択的なアポトーシス誘導

本研究は低侵襲な治療方法の確立を目指している。しかし、酸化ストレスはがん細胞だけでなく、正常細胞へも細胞機能の障害を引き起こす。そこで、がん細胞と正常細胞の酸化ストレスに対する感受性の違いに着目した。感受性の違いに寄与する原因の一つに代謝機構の違いが挙げられる。

代謝とは細胞内で起こる同化や異化を総称し、これらの反応を介しアデノシン三リン酸(adenosine tri phosphate : ATP)の生成が行われる。ATP は解糖系、クエン酸回路、電子伝達系を介し生成される。式(1)~(3)にそれぞれの ATP 産生の化学式を示す。



上記の式(1)~(3)に示すように解糖系では細胞に取り込まれたグルコースは細胞質気質でピルビン酸と ATP に分解される。クエン酸回路は解糖系で生成されたピルビン酸をミトコンドリアマトリクスで ATP の他、水素を生成する。ここで生成された水素がミトコンドリア膜内で引き起こされる電子伝達系を介し多くの ATP の生成に寄与する。

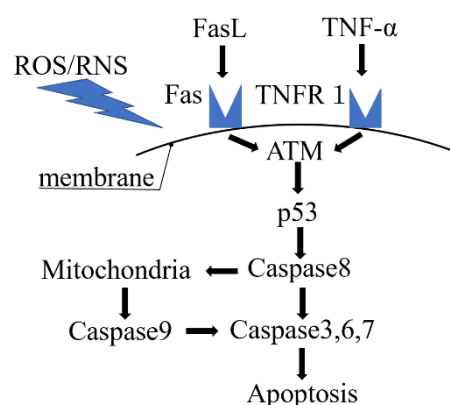


図 1 酸化ストレスによるアポトーシス経路

正常細胞では以上 3 つの代謝機構全てを用いて ATP の産生が行われる。一方でがん細胞は ATP の生成に解糖系を主に用いる。そこで、解糖系での ATP 産生を阻害する事でがん細胞内のみ ATP 枯渇を招き、アポトーシスが誘導されると考えた。この際、正常細胞内の ATP の産生量も減少が予想されるが、電子伝達系では解糖系の約 17 倍の ATP を産生する事が可能なので、ATP が枯渇する事は無いと考える。解糖系はグルコースの分解から 9 の段階を経て ATP を産生する。その際に発現するグリセルアルデヒド - 3 - リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase:GAPDH) や、ピルビン酸キナーゼ M2(Pyruvate Kinase M2:PKM2)が活性種により機能が制御され、がん細胞の選択的な細胞死を誘導すると考える。

4. ALTP を用いた TNBC 型治療

本研究では、ALTP による低侵襲な乳がん治療方法の確立を目的とする。ALTP を臨床現場で応用する際には、生理食塩水に ALTP を照射したプラズマ処理水(Plasma treated saline:PTS)による治療を考えている。ALTP を患部に直接照射する場合、患者の身体の一部を切開する必要がある。そこで、PTS を注射や点滴により生体へ投与し、低侵襲な治療法を目指す。

本稿では乳がん細胞に対し、細胞培養培地に ALTP を照射したプラズマ処理培地(Plasma treated medium:PTM)を作用させ、ALTP の効果検証を行う。

5. ALTP 照射溶液の成分分析

本研究では大気圧下で高電圧の印加に加え、He ガスを流し込み ALTP の生成を行う。この ALTP に含まれる活性種が乳がん細胞に酸化ストレスを引き起こし、細胞死を誘導すると考える。そこで、本実験では ALTP を照射した生理食塩水に含まれる ROS, RNS の濃度計測を行う。

5.1 実験方法

生理食塩水に対して ALTP を照射した。ALTP は周波数 3 [kHz],印加電圧 13[kV], He ガス流量 1.0[mL]の条件下で生成した。生成した ALTP を 1.0[mL]の生理食塩水に 120[s]照射し、照射直後から 72 時間経過後までの活性種の濃度計測を行った。図 2 に ALTP 照射時の概要を示す。活性種の濃度計測はデジタルパックテスト(共立理化学研究所)を用いて行った。デジタルパックテストは、発色試薬を用いた吸光光度法により対象物質の計測を行う。表 2 にデジタルパックテストの仕様を示す。また、計測対象の活性種は過酸化水素、亜硝酸、硝酸とし、過酸化水素のみ 2 倍希釈で計測を行った。

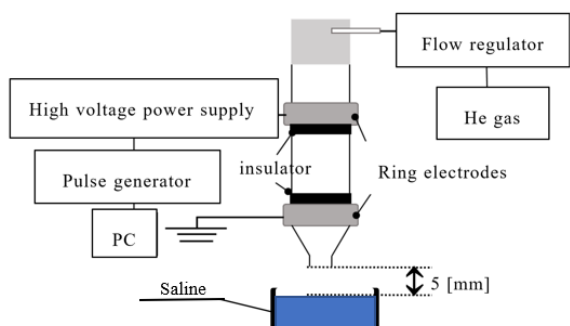


図 2 ALTP 照射時のイメージ

表 2 デジタルパックテストの仕様

対象物質	計測可能範囲[mg/L]	分解能
NO ₃	1.0 ~ 25	0.1
NO ₂	0.02 ~ 1.0	0.01
H ₂ O ₂	0.1 ~ 2.0	0.01

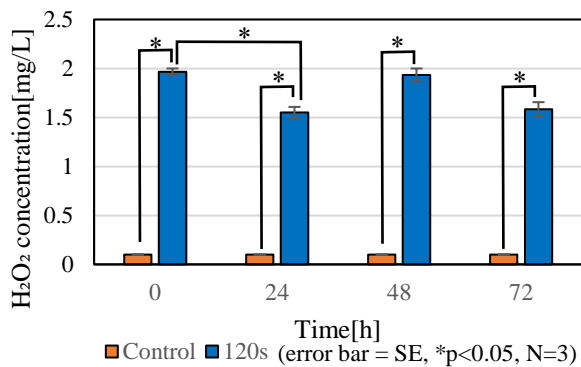


図3 H₂O₂濃度の時間変化

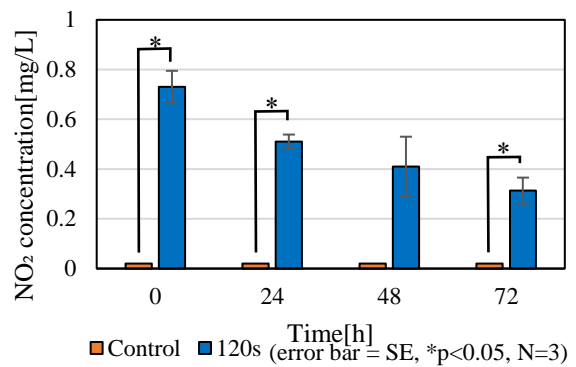


図4 NO₂濃度の時間変化

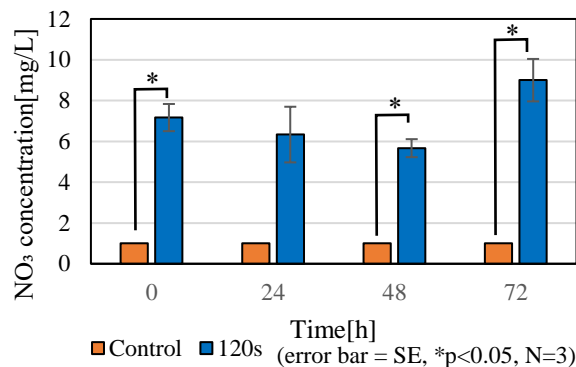


図5 NO₃濃度の時間変化

5.2 実験結果

図3~5に過酸化水素、亜硝酸、硝酸の計測結果を示す。以上の結果から、本実験で用いるALTPによりROS, RNSの産生が確認された。殆どの条件下で、ALTP照射を行っていないControl群と比較し、ALTP120[s]照射群が有意に活性種を生成した。また、活性種濃度の減衰は過酸化水素の0[h]~24[h]の期間のみ有意な減衰が引き起こされた。一方で、硝酸は実験開始から72[h]後に濃度が上昇した。これは亜硝酸が硝酸に変化した為と考える。

6. 正常細胞へのALTP照射実験

本研究では乳がんへの低侵襲な治療方法の確立を目指している。これは従来の乳がん治療はがん細胞だけでなく、正常細胞にも影響を与える事で副作用を引き起こしている為である。そこで、本実験ではがん細胞のアポトーシスを誘導する事が期待されているALTPが正常細胞に与える影響を検証した。

ALTPの正常細胞への効果検証を行うため、ALTPを照射したPlasma照射群とALTP未照射のControl群を比較した。本実験で使用したALTPは、周波数3[kHz],印加電圧13[kV],照射時間120[s]の条件で生成を行った。また、細胞はマウス頭蓋冠細胞であるMC3T3-E1を使用した。MC3T3-E1を12 well plateに 1.0×10^5 [cells/well]毎に播種し、37°C, CO₂濃度5%の環境下で24時間インキュベートを行う。その後、細胞培養培地とPTMを取り替え、24~72時間後に生細胞の様子を観察と数の計測を行った。本実験では正常細胞へALTPを間接的に作用させた。これは、4章で述べた臨床現場の想定に加え、正常細胞に直接ALTP照射を行うことで、風圧や熱によりALTPとは異なる要因

で正常細胞が死滅する事を防ぐためである。従って、PTM と正常細胞を培養している培地を取り換える事で、正常細胞に対し ALTP を間接的に作用させる。

6.1 光学顕微鏡による細胞の観察

培地の交換を行った Control 群と、PTM を暴露させた Plasma 照射群の細胞の様子を 24 時間毎に光学顕微鏡で観察した。其々の細胞の様子を図 6 に示す。

Control 群, Plasma 照射群共に実験開始から 24 時間後には細胞から仮足が伸び well plate の基底面に接着している様子が確認された。経過時間毎に Plasma 照射群と Control 群と比較すると、実験開始 24 時間後では細胞密度が低い様子が確認された。

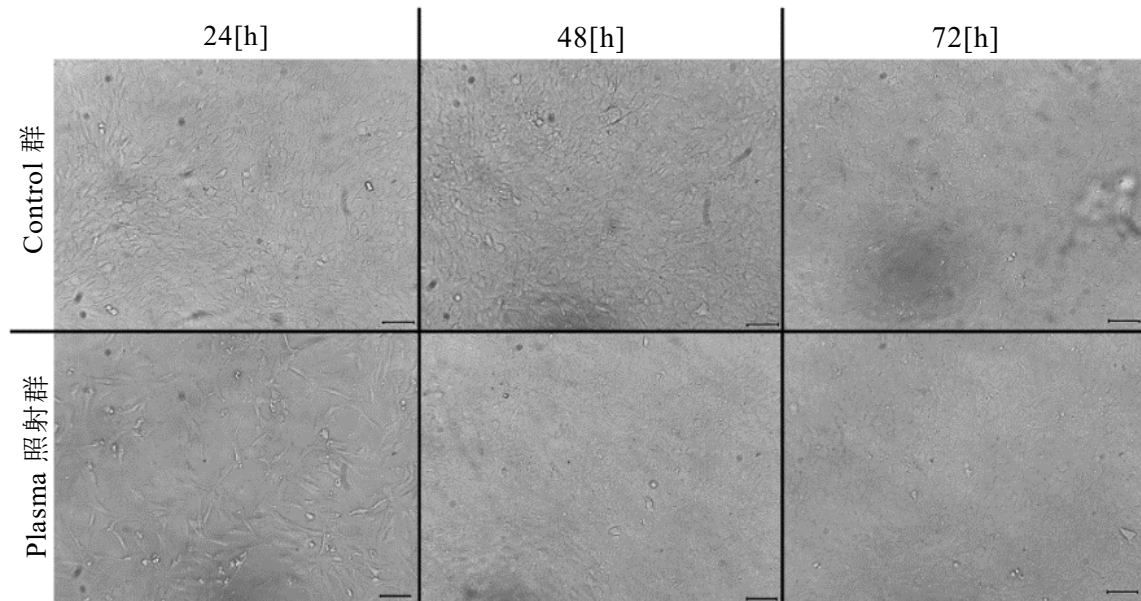
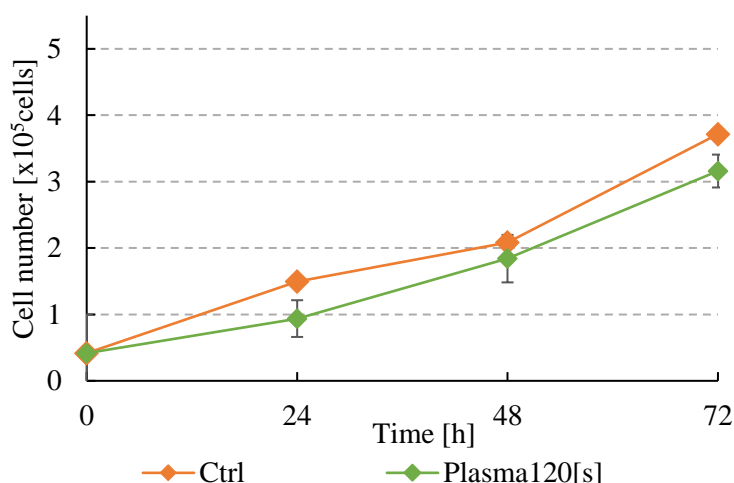


図 6 Control 群と Plasma 照射群の MC3T3-E1 の様子(Scale bar: 100[μ L])

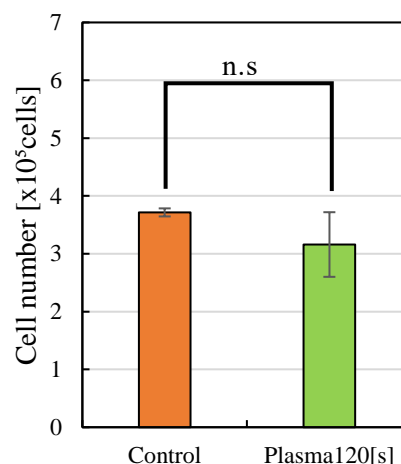
6.2 トリパンプルー染色による生細胞数の計測

生細胞数の計測には、トリパンプルー染色を用いた。トリパンプルー染色とは、生細胞数を決定する染色剤である。死細胞の細胞膜を透過し、細胞質を青く染色するため、生細胞の計測が可能である。このトリパンプルー染色による生細胞数の経時変化を図 7 に示す。

細胞計測開始時は約 0.4×10^5 [cells/well]であったが、双方の条件群共に培養時間が経過する毎に細胞の増殖が確認された。72 時間後には Control 群で約 3.7×10^5 [cells/well] となった。Plasma 照射群は Control 群と比較し、常に細胞数が抑えられていた。しかし、24~72 時間の間 Control 群と比べ有意な生細胞数の減少は確認されなかった。これは ALTP により引き起こされた酸化ストレスが、正常細胞に影響を及ぼしている事が考えられる。酸化ストレスにより解糖系での代謝産物が抑制された後、好機呼吸によって ATP が産生された事で細胞の有意な減少が抑えられたと考える。従って、ALTP は正常細胞の増殖に大きな影響を与えない事が示唆された。



(a)生細胞数の時間変化



(b)72 時間後の生細胞数

図 7 MC3T3-E1 の生細胞数(error bar = SE, *p<0.05, N=3)

7. 乳がん細胞への ALTP 照射実験

ALTP の乳がん細胞への効果検証を行うため、4 つの照射条件で乳がん細胞に対して ALTP を照射した。本実験で使用した ALTP は、周波数 3 [kHz],印加電圧 13[kV],照射時間 30, 60, 90, 120 [s]の条件下で生成を行った。また、使用する細胞は JCRB 細胞バンクから BT-20/CMV-Luc を購入した。BT-20/CMV-Luc は、ヒト乳がん細胞株の TNBC 型である。6 章と同様の手順で ALTP を乳がん細胞へ間接的に作用させ評価を行った。評価方法は細胞の観察、生細胞数の計測に加え RT-qPCR 法による遺伝子発現解析を用いた。

7.1 光学顕微鏡による細胞の観察

培地の交換を行った Control 群と、PTM を暴露させた Plasma30[s]照射群の細胞の様子を 24 時間毎に光学顕微鏡で観察した。其々の細胞の様子を図 8 に示す。

図 8 より、Control 群では 72 時間後に well plate の基底面が細胞によって埋まっている様子が確認された。一方で Plasma30[s]照射群では 72 時間後でも細胞は点在している程度の様子であった。また、細胞の形状が Control 群と比較し、丸みを帯びており基底面に十分な接着が行われていない様子が確認された。従って、Control 群との細胞数に差異が生じている事が示唆された。

7.2 トリパンプルー染色による生細胞数の計測

トリパンプルー染色による生細胞数の経時変化を図 9 に示す。

細胞計測開始時は約 0.9×10^5 [cells/well] の生細胞数が計測され、Control 群は培養時間が経過すると共に細胞の増殖が確認された。72 時間後には約 3.7×10^5 [cells/well] となった。一方で Plasma 照射群も同様に 72 時間後には全ての照射条件において計測開始時と比較し、生細胞数が増殖した。しかし、Plasma 照射群は Control 群と比べ生細胞数の増殖を有意に抑制した。加えて、Plasma60, 90, 120[s]照射群は計測開始時から 72 時間経過後の有意な増殖を抑えた。

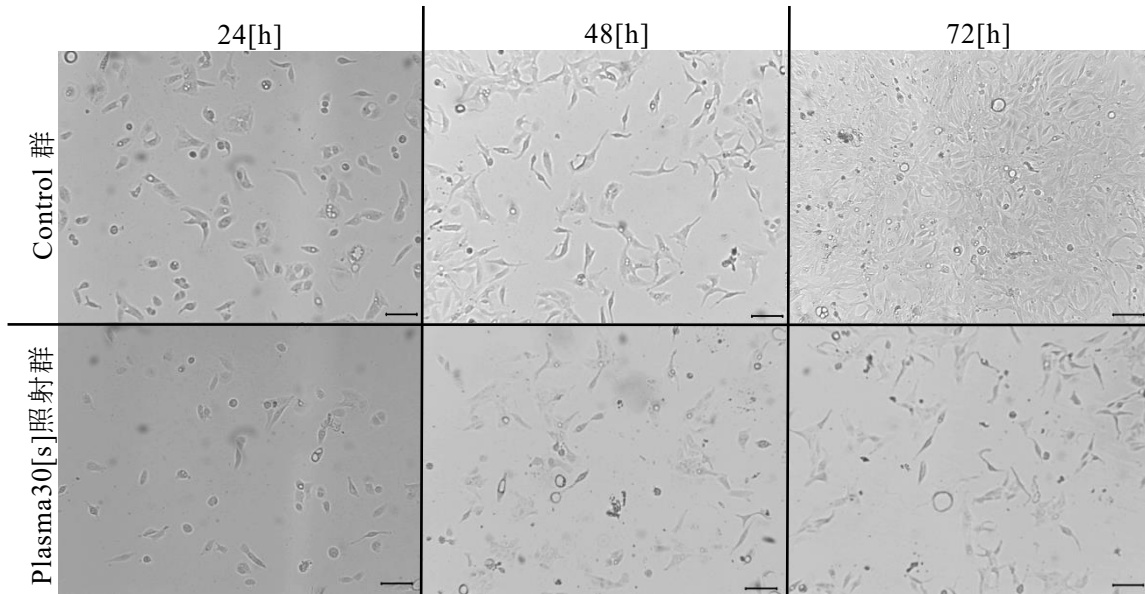
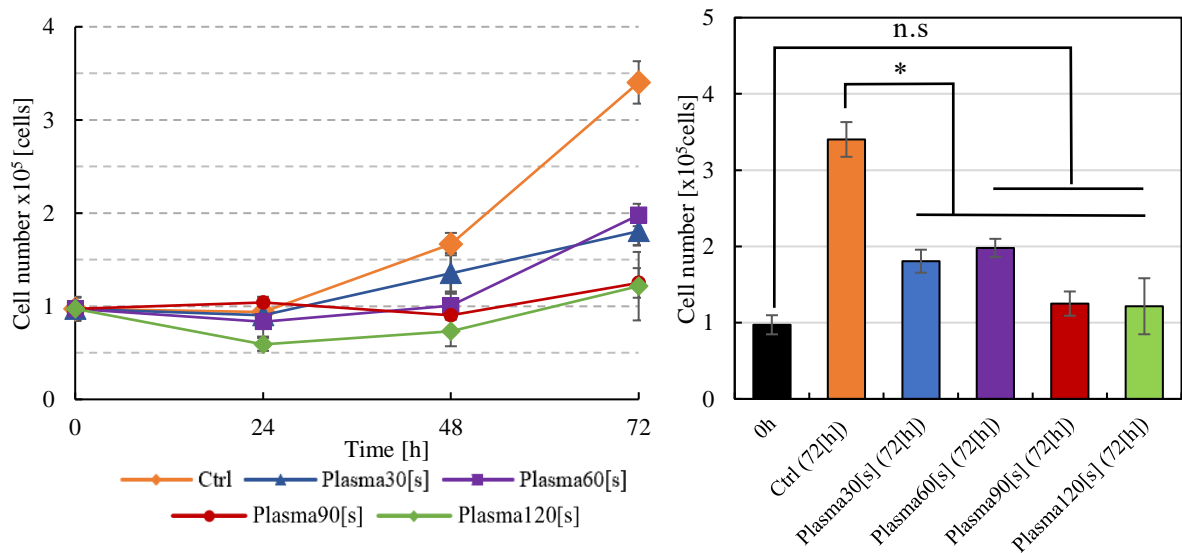


図8 Control群と Plasma30[s]照射群の BT-20 の様子(Scale bar: 100[μ L])



(a)生細胞数の時間変化

(b)0 時間後と 72 時間後の生細胞数

図9 BT-20 の生細胞数(error bar = SE, *p<0.05, N=3)

7.3 RT-qPCR による遺伝子発現量測定

本実験では、アポトーシス誘導因子である *Fas*(Forward: ATTCTGCCATAAGCCC , Reverse: CTGTGTACTCCTTCCC) と , *Caspase-3*(Forward:CAGTGGAGGCCGACTT , Reverse:TGGCACAAAGCGACTG)に加え, 解糖系で発現する *GAPDH*(Forward: ATGTTTCGTCATGGGTGTGAA, Reverse: GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT)の遺伝子発現解析を行った。*Fas* は細胞膜上に存在する受容体であり, リガンドである *FasL* と結合しアポトーシスの誘導を行う物質である。また, *Caspase-3* はたんぱく質分解反応を触媒する酵素の一種である。アポトーシス誘導経路の下流に位置し, アポトーシスを実行する。*GAPDH* は解糖系で発現し, 酸化ストレスに対し感受性が強いタンパク質であ

る。

本実験では照射時間 120[s]の条件下で生成した PTM に作用させ、72 時間後に遺伝子発現解析を行った。本実験ではターゲット遺伝子と内在性コントロール遺伝子である β -actin を比較し、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行った^[7]。RT-qPCR によるターゲット遺伝子の測定結果を図 10 に示す。

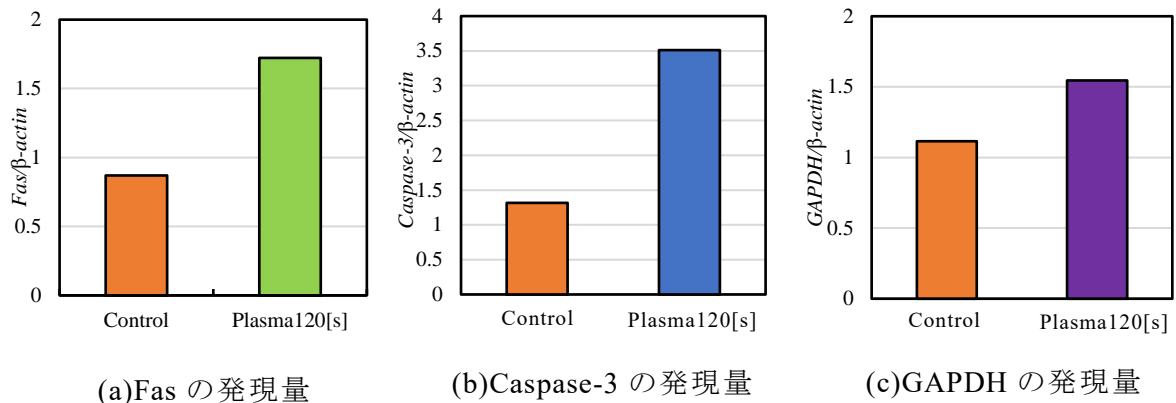


図 10 遺伝子発現解析の結果(N = 2)

図 10 はターゲット遺伝子の発現量を β -actin(Forward: AGAGCTACGAGCTGAC , Reverse: AGCACTGTGTTGGCGTACAG)の発現量で割った結果を示している。双方の Plasma120[s]照射群でアポトーシスを誘導する遺伝子の発現量が多く示された。従って、ALTP が乳がん細胞のアポトーシスを引き起こした可能性がある。しかし、GAPDH は ALTP により発現量が増加した。従って、GAPDH が乳がん細胞の選択的なアポトーシス誘導に寄与していない事が示唆された。

8. 結言

本研究では、罹患数が多く治療薬の少ない TNBC 型に対して、ALTP を用いた低侵襲な治療を目指している。本稿では正常細胞と乳がん細胞に ALTP の照射を行った。結果として、ALTP は正常細胞の増殖に大きな影響を与えず乳がん細胞の有意な増殖抑制効果がある事が示唆された。また、増殖抑制効果が引き起こされた原因の一つにアポトーシスが誘導遺伝子の発現が確認できた事から、ALTP が乳がん治療の補助療法になり得る可能性がある。

参考文献

- [1] 国立がん研究センター, https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html, 2022.7.10
- [2] 五十嵐 和彦, "細胞老化の酸化ストレス応答性: Bach1 による指揮", 生化学第 81 巻 6 号, pp502-510, 2009
- [3] 原 宏和, "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", J. Plasma Fusion Res. Vol97, No3(2021)123-128
- [4] Ryutaro Kajihara, "The molecular mechanism of the apoptotic signal transduction pathway", 熊本大学医学部保健学科紀要第 8 号, 2012