

# 大気圧低温プラズマによる ヒト肺腺がんに対する影響の検討

電気・化学専攻 医用工学領域 2181285 吉野 響太

(主査：森 晃 教授 副査：島谷 祐一 准教授, 小林 千尋 講師)

## 1. 緒言

身体を形成する細胞が変異し、異常に増殖したものの内、外部からの統制を受け難いものを腫瘍と呼ぶ。腫瘍には、悪性腫瘍と良性腫瘍が存在する。また悪性腫瘍の内、特に表皮で発生するものをがんと呼ぶ。がんの内、肺がんは罹患率、死亡数が高く日本では 2019 年において、部位別死亡者数で 1 位である<sup>1)</sup>。肺がんには発生部位によって異なる種類が存在するが、中でも本研究では肺全体に発生する肺腺がんに着目した。理由として、肺がんの約半数を占める点や、喫煙との関連が少ないことが知られており、若年層や女性にも罹患が多く確認されているからである。

治療の現状として、主に外科治療、薬物療法、化学療法が用いられる。外科治療は胸腔鏡手術などの低侵襲な治療も存在するが、大きく患部を切開して手術を行う場合が多い。薬物療法と化学療法については、がん細胞のみを選択的に死滅させることが出来ず、正常細胞をも傷つけてしまうことによる副作用が課題である。精神的・肉体的に負荷が大きい。

近年、大気圧低温プラズマ (Atmospheric Low Temperature Plasma: ALTP) において、医療目的の研究が行われている。プラズマは、原子や分子が陽イオンと電子に電離した状態を指し、固体・液体・気体に次ぐ第 4 の状態と表現される。プラズマ中では、電離した原子核と電子により様々な現象が生じる。

本学では大腸がんに対する先行研究が行われ、がん細胞の増殖を抑制する効果が発見された。しかし、詳細な作用機序については判明していない事項が多い。本研究では、日本でのがん部位別罹患患者数の内最多である肺がんに着目し、ALTP を用いた低侵襲的な医療の実現を目指している。本稿では、ヒト肺腺がん細胞に対して ALTP を照射した後の生細胞数、炎症性サイトカイン、遊走能への影響について言及し、治療方法として有用であるかを検討する。

## 2. 研究目的

がんは日本の死因第一位であり、肺がんは 1998 年以降の部位別がん死亡者数において最多である。特に肺がんの中でも肺腺がんは現行の治療方法はいずれの方法も身体に対する副作用が課題として挙げられる。私は、低侵襲且つ新規的ながん治療方法の一つとして ALTP の応用に着目した。大気圧下で生成したプラズマは ROS や RNS など活性種を産生する。がん細胞は正常細胞と比較し多くのエネルギーを取り込む特性を有する為、活性種を選択的に結合させることで細胞に損傷を与え治療に繋げる事が実現可能でないかと考えた。しかし現状の課題として、肺に対して直接プラズマを照射する事は困難が生じる事や、細胞に対する ALTP の影響について、詳細な作用機序が解明されていない点が挙げられる。よって、本研究では間接的な ALTP 照射を行った後の肺腺がん

細胞に対する影響の検討を行うと共に、肺腺がんに対する ALTP の作用機序解明を目的とする。

### 3. ALTP 照射後の肺腺がん細胞に与える影響

A549 ヒト肺腺がん細胞に対し ALTP 照射を行い、細胞に対する影響を検討した。

#### 3.1 ALTP 照射後の成分分析

ALTP によって生成された ROS, RNS は細胞に対して損傷を与えることにより、細胞死を誘導することが示唆されている。デジタルパックテスト(理化学研究所, Japan)を用いて水溶液中に含まれる  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$  の成分分析を定量した。ALTP を生理食塩水に対して照射し、 $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2$  の濃度計測を行った。

##### 3.1.1 ALTP 照射後の成分分析方法

24-well プレートに各 1[mL]の生理食塩水を入れ、ALTP の照射を行った。ALTP の生成概要を Fig.1 に示す。ALTP の生成方法は、SUS304 製リング電極を 2 つ使いガラス製のピペットを誘電体とした。また、ヘリウムガスを 1[L/min]で注入し、安定したプラズマを生成した。生成条件として矩形波電源を使用し、印加電圧は 13[kVp-p], 周波数 3[kHz]である。

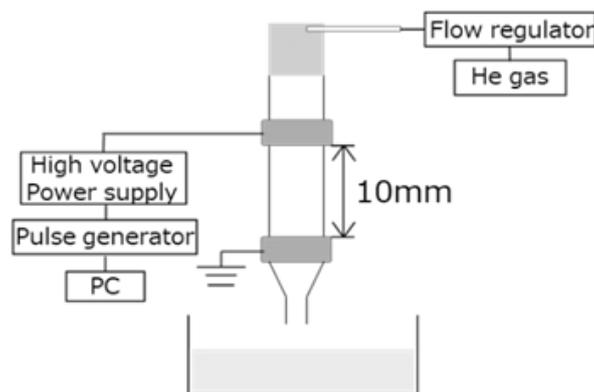


Fig.1 Schematic of the experimental set-up.

##### 3.1.2 ALTP 照射後の成分分析結果

Fig.2 に物質毎の照射後 72h までの活性種濃度における経時変化を示す。72h までで各物質の減衰に有意差は確認されなかった為、細胞に対する実験においては継続的に ROS, RNS が細胞に対して曝露されるものと考ええる。

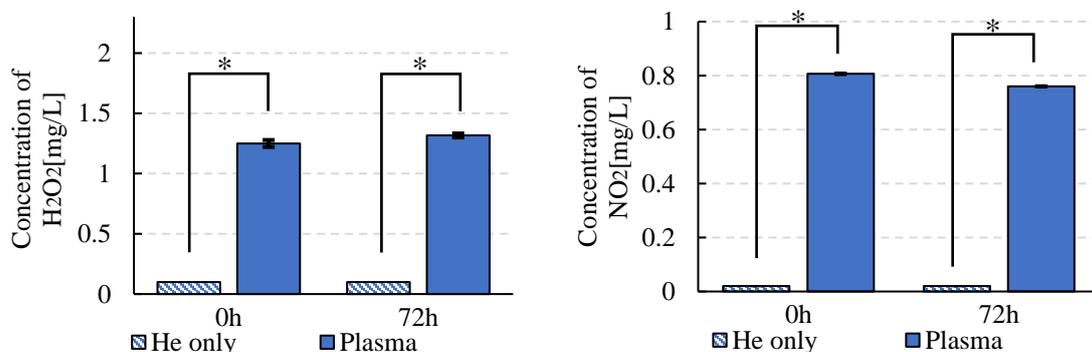


Fig.2 Component analysis results for  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $\text{NO}_2$ . (N=3, S.E.M.) (\*p<0.05)

### 3.2 ALTPがA549の生細胞数に与える影響

ALTPが肺腺がん細胞に与える影響を検討する為、本実験ではヒト肺がん由来細胞株であるA549を用いて、通常の培養を行った細胞とALTP照射後の生細胞数に差異が生じるか実験を行った。始めに、12-wellプレートに対し細胞を $1 \times 10^5$ [cells/well]播種し、各wellに1[mL]の10% Fatal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, USA)含有D-MEM (Low-Glucose)(Fujifilm Wako, Japan)培地を添加した後に37°C, CO<sub>2</sub>濃度5%にて24hインキュベートを行い細胞をプレート基底面に接着させた。その後、その後、新たに各wellに1[mL]の培地を用意し、4.1に示す照射条件にてALTP照射を行った。直ちにALTP照射後の培地に置き換え、さらに24h, 48h, 72hインキュベートの後、各wellに対して0.5[mL]の0.05% Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific, USA)を加えて細胞を遊離させた。遊離した細胞は1200[rpm]で5分間遠心分離し細胞を回収し、トリパンブルー染色後の生細胞数を血球計算盤にて計数した。対照実験群として、通常の細胞培養を行ったControl群と比較を行った。尚、各条件におけるサンプル数は12とした。

#### 3.2.1 細胞の光学顕微鏡観察画像

Fig.3にControl群とALTP照射群の光学顕微鏡での観察画像を示す。Control群は、細胞播種後24hから72hの間にコンフルエントの状態まで正常に増殖した(Fig.3A, 3B, 3C)。ALTP照射群については、照射後24h経過時で細胞形態に変化が確認され、コンフルエントの状態まで細胞の増殖は確認されなかった(Fig.3D, 3E, 3F)。また、72h経過時には仮足の伸展が確認されず、また細胞の断片化が確認され、アポトーシスと見られる様相を呈した。

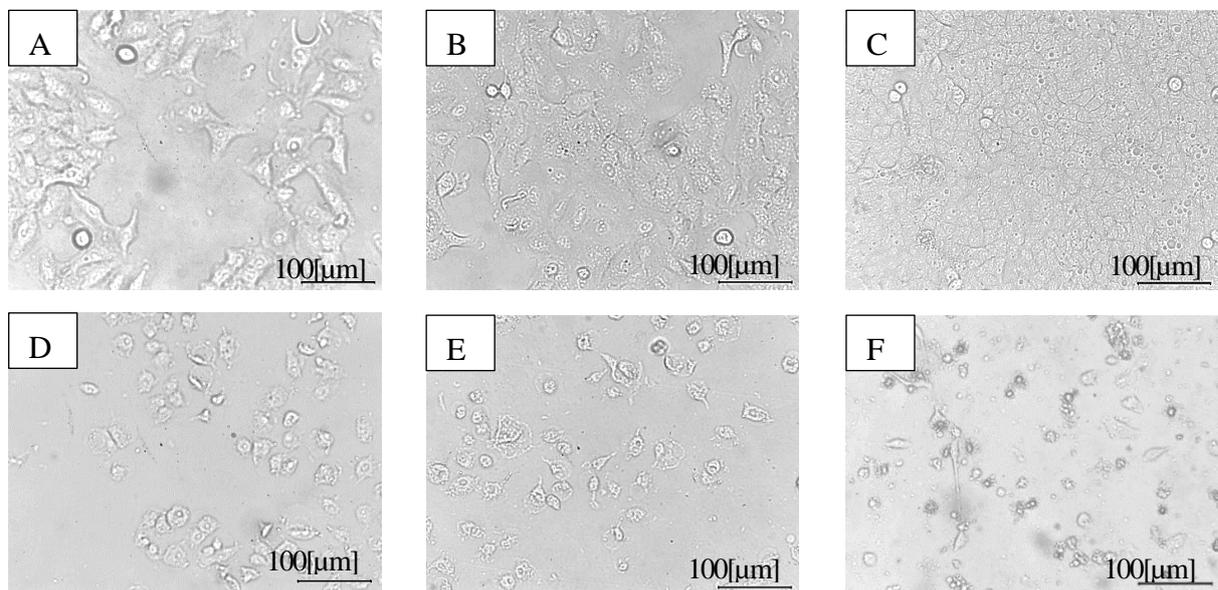


Fig.3 Bright field images of A549 cells.

(A) Control 24h, (B) Control 48h, (C) Control 72h,

(D) 24h after ALTP treatment. (E) 48h after ALTP treatment. (F) 72h after ALTP treatment

### 3.2.2 トリパンブルー染色後の生細胞数計数結果

Fig.5 に Control 群と ALTP 照射群の細胞に対しトリパンブルーによる生細胞染色を行った後の生細胞数の推移を示す。Control 群については正常な細胞増殖が行われた。24h 経過時から 72h 経過時までに約3倍に生細胞数が増加しているが、対数増殖期に入り細胞の活動が活発になったものと考ええる。Control 群は正常に細胞の増殖が確認されたが、ALTP 照射群は Control 群と比較し細胞の増殖速度が鈍化した。

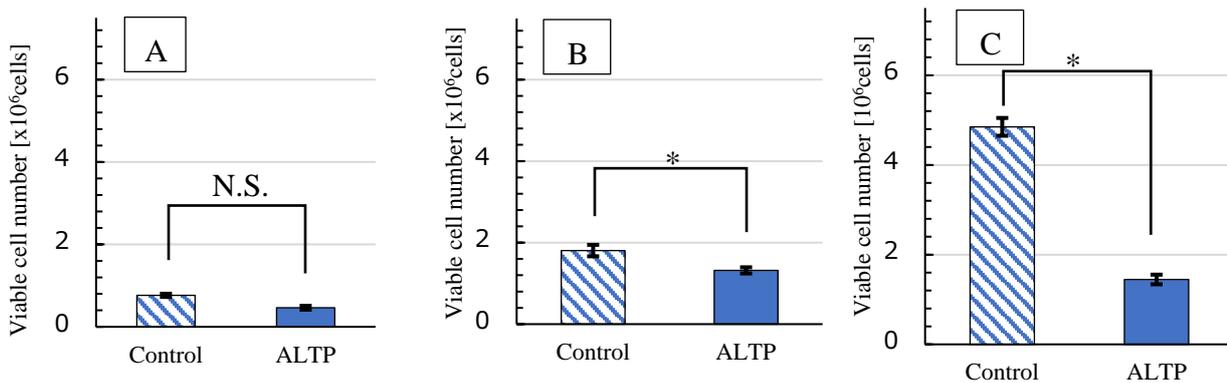


Fig.4 Number of cells after plasma treatment. (A)24h,(B)48h,(C)72h  
(N=12, S.E.M.)(\*p<0.05, N.S.=No Significant)

### 3.2.3 考察

本研究の結果より、ALTP 照射は細胞増殖を抑制する事が示唆された。要因として、抗腫瘍因子の一種である p53 と ALTP 照射による ROS, RNS の関連が存在すると考える。ROS, RNS による p53 発現増加に関するシグナル伝達経路を Fig.5 に示す。

p53 の持つ特性として、アポトーシスの誘導と細胞周期の停止が挙げられる。先行研究より、ROS, RNS による酸化ストレスが p53 の発現を活性化する事が示唆されている<sup>[3]</sup>。本研究では、ALTP の照射によって双方の活性種の生成が確認されている事から、細胞周期の停止が誘導され増殖能を低下させているのではないかと考える。

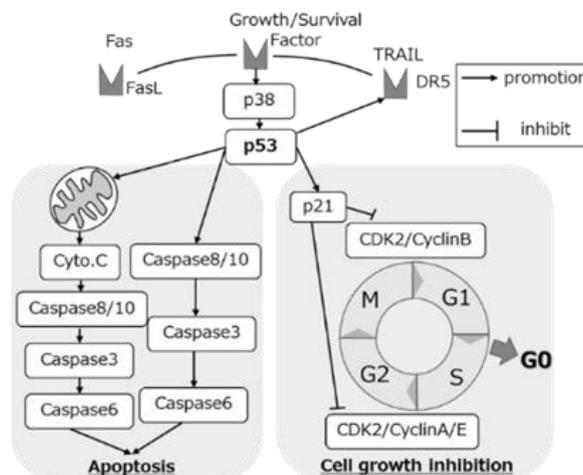


Fig.5 p53 influence cell behavior.

### 3.3 ALTP照射後のA549におけるRT-qPCRによるアポトーシス関連遺伝子の発現解析

4.2で示した様に、ALTPの照射は肺腺がん細胞の生存に影響を与える事が示唆された。しかし、作用機序については未だ判明していない事項も多く存在する。よって、細胞内の炎症性サイトカインの測定を行うことで作用機序解明に努める。

#### 3.3.1 アポトーシス関連遺伝子の発現測定方法

始めに、12-well プレートに対し細胞を  $1 \times 10^5$  [cells/well] 播種し、各 well に 1 [mL] の 10% Fatal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, USA) 含有 D-MEM (Low-Glucose) (Fujifilm Wako, Japan) 培地を添加した後に  $37^\circ\text{C}$ 、 $\text{CO}_2$  濃度 5% にて 24h インキュベートを行い細胞をプレート基底面に接着させた。その後、新たに各 well に 1 [mL] の培地を用意し、4.1 に示す照射条件にて ALTP 照射を行った。直ちに ALTP 照射後の培地に置き換え、さらに 72h インキュベートの後、培地を除去し、ISOGEN (NIPPON Genetics, Japan) を添加し RNA の単離を行った。RNA の単離後、Fast gene (NIPPON Genetics, Japan) を添加しサーマルサイクラーにて逆転写反応を行う事で cDNA の合成を行った。その後 TBGreen Premix Ex Taq™ II ROX plus (Takara Bio Co. Ltd., Japan) 及び StepOne™ Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, USA) にて遺伝子の発現を測定した。本実験では、ハウスキーピング遺伝子として  $\beta$ -actin (Forward: AGAGCTACGAGGCTGCCTGAC, Reverse: TGGCACAAAGCGACTGGAT) を用いた。対象遺伝子としてアポトーシス実行遺伝子の一つである *Caspase3* (Forward: GGAAGCGAATCAATGGACTCTGG, Reverse: GCATCGACATCTGTACCAGACC) の発現を解析した。

#### 3.3.2 アポトーシス関連遺伝子の発現測定結果

RT-qPCR による遺伝子発現解析の結果を Fig.6 に示す。Control 群と比較し ALTP 照射群は *Caspase3* の発現が増加した。A549 細胞株に対してアポトーシスを誘導した事が示唆された。

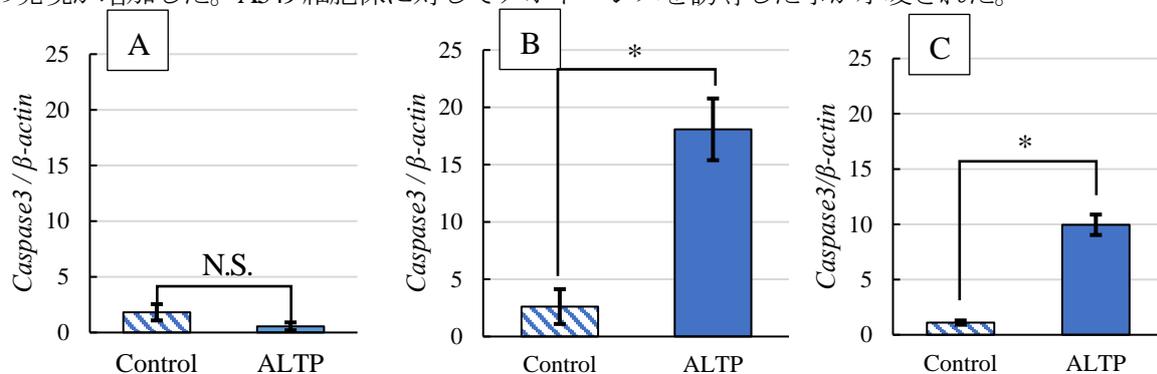


Fig.6 comparison of the concentration of *Caspase3* and  $\beta$ -actin. (A)24h (B)48h (C)72h (N=4, S.E.M.)(\*  $p < 0.05$ , N.S.=No Significant)

#### 3.3.3 考察

本研究の結果と 4.2 に示した結果より、肺腺がん細胞に対する ALTP 照射はアポトーシス誘導と細胞増殖抑制の二面性を有するのではないかと考える。先行研究では、ROS の一種である  $\text{H}_2\text{O}_2$  が細胞内の抗酸化物質であるグルタチオンやチオレドキシンに対して酸化ストレスを与え、アポトーシスを誘導する事が示唆されている<sup>14)</sup>。本研究においても、ALTP の照射による ROS, RNS 産生がアポトーシス誘導経路を活性化したと考える。

### 3.4 ALTP が A549 の遊走能に与える影響

がん治療において、がんの転移に関わる遊走能を防ぐ事は重要である。4.2 の結果より、細胞増

殖能の低下が示唆されたが、同時に細胞の遊走能についての影響は不明である。

### 3.4.1 スクラッチアッセイによる遊走能評価

スクラッチアッセイとは、化学的な刺激に対する細胞の遊走能を評価する方法として広く用いられている。12-wellプレートに $1 \times 10^5$ [cells/well]細胞を播種し、DMEM+10%FBSにて4日間インキュベートを行いコンフルエント状態にした。コンフルエント状態の細胞に対して1[mL]用マイクロピペットチップの先端で引っかき傷を作製し、創傷作成後通常の培地で培養を行ったものをControl群、創傷作成後ALTP照射培地に入れ替えたものをALTP照射群として0h(創傷作成直後)、24h、48h、72h毎に撮影し、Image Jを用いて空白領域の面積を測定した。ALTP照射条件については4.1に示す条件を用いた。

### 3.4.2 スクラッチアッセイ後の面積領域

創傷作成後の空白領域を撮影しImage Jにて空白領域の抽出を行った画像をFig.7に示す。Fig.10中の赤色で塗りつぶされている領域が空白領域である。また、創傷作成時の面積を1とした際の面積減少率についてFig.8に示す。Control群については細胞が遊走、増殖し徐々に空白領域が埋められていったが、ALTP照射群については空白領域の面積減少に明確な差異が確認されなかった。

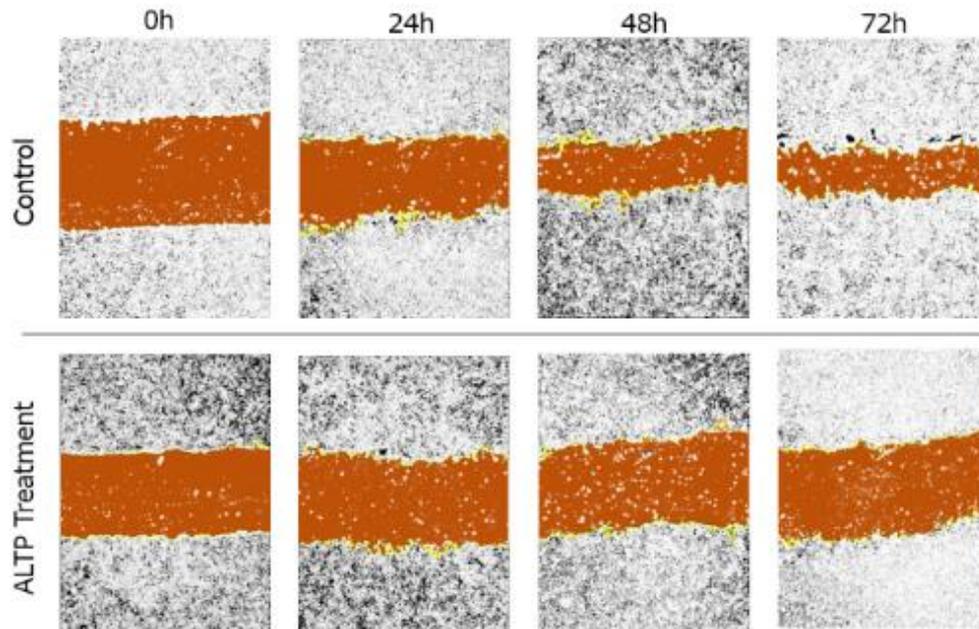


Fig.7 Image J showing only the scratched area.

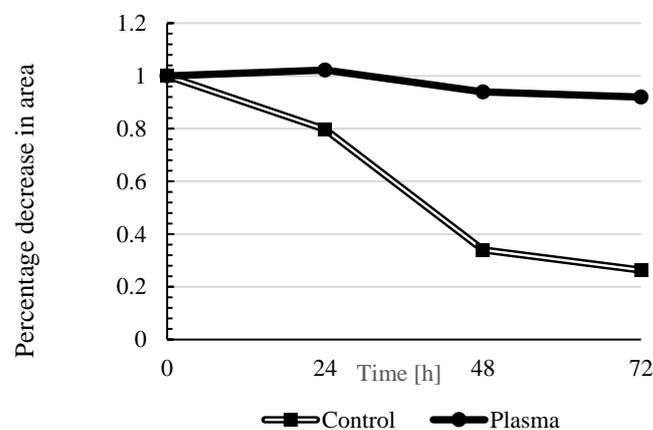


Fig.8 Percentage reduction in area of blank area after wound creation (N=6).

### 3.4.3 考察

細胞の遊走能に影響を与えた要因として、ROSによって抗腫瘍因子p53が活性化し、細胞遊走、増殖、血管新生を促進する因子である Akt を抑制している可能性を考える。Fig.9 に ROS/RNS による Akt 抑制に関するシグナル伝達経路を示す。先行研究より、ROS/RNS が p53 の発現増加を促進し、アポトーシスや細胞周期の抑制だけではなく遊走能を司る Akt の発現を抑制する事が示唆されている<sup>9)</sup>。本実験の結果からも、同様の事象が誘発されているものと考えられる。

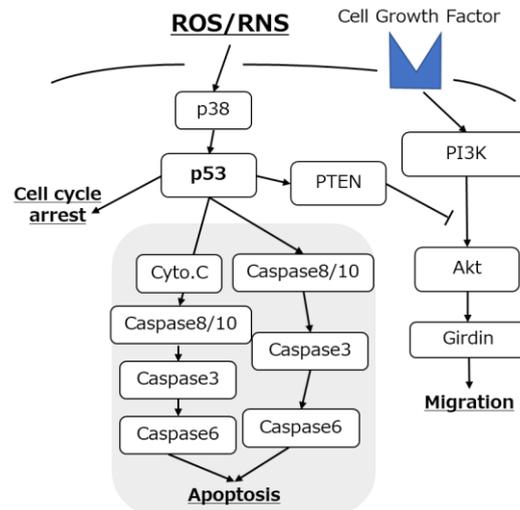


Fig.9 ROS affect cell migration.

### 3.5 ALTP照射後の A549 における遊走能関連遺伝子の発現解析

4.4 では ALTP 照射後の A549 の細胞遊走能低下が示された。しかし、スクラッチアッセイでは ImageJ での Threshold 設定が手動である為定量性に欠ける課題が存在する。よって、細胞遊走能に関する遺伝子の発現を解析した。

#### 3.5.1 細胞遊走能関連遺伝子の発現測定方法

始めに、12-well プレートに対し細胞を  $1 \times 10^5$  [cells/well] 播種し、各 well に 1[mL] の 10% Fatal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, USA) 含有 D-MEM (Low-Glucose)(Fujifilm Wako, Japan) 培地を添加した後に 37°C, CO<sub>2</sub> 濃度 5% にて 24h インキュベートを行い細胞をプレート基底面に接着させた。その後、新たに各 well に 1[mL] の培地を用意し、4.1 に示す照射条件にて ALTP 照射を行った。直ちに ALTP 照射後の培地に置き換え、さらに 24h, 48h, 72h インキュベートの後、培地を除去し、ISOGEN (NIPPON Genetics, Japan) を添加し RNA の単離を行った。RNA の単離後、Fast gene (NIPPON Genetics, Japan) を添加しサーマルサイクラーにて逆転写反応を行う事で cDNA の合成を行った。その後 TBGreen Premix Ex Taq<sup>TM</sup> II ROX plus (Takara Bio Co. Ltd., Japan) 及び StepOne<sup>TM</sup> Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific, USA) にて遺伝子の発現を測定した。本実験では、ハウスキーピング遺伝子として *β-actin* (Forward: AGAGCTACGAGGCTGCCTGAC, Reverse: TGGCACAAAGCGACTGGAT) を用いた。対象遺伝子として遊走能促進遺伝子 *Girdin* (Forward: CTCCAGGCATGAAGCGAACA, Reverse: TGGCAGAGCGAGCATCCGA) の発現を解析した。

#### 3.5.2 細胞遊走能関連遺伝子の発現測定結果

RT-qPCR による遺伝子発現解析の結果を Fig.13 に示す。Control 群と比較し ALTP 照射群は *Girdin* の発現が有意に減少した。よって、A549 細胞株に対して遊走能の低下が示唆された。

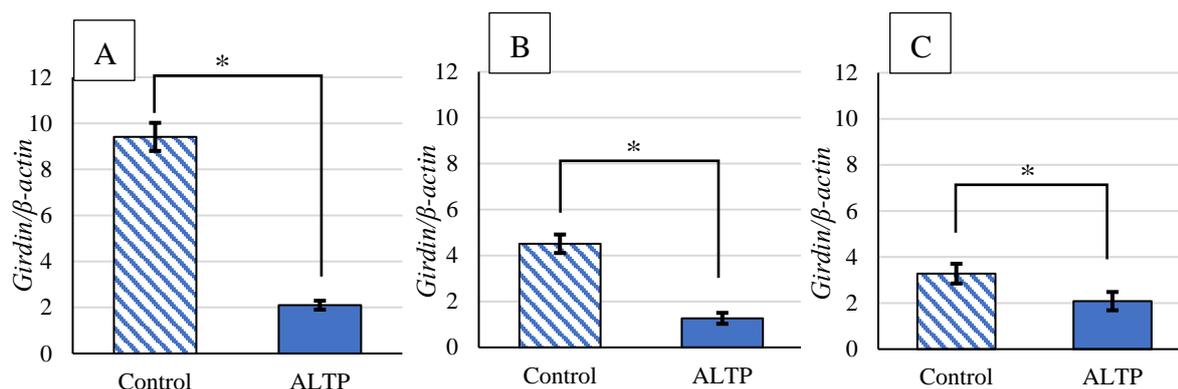


Fig.10 Comparison of the concentration of *Girdin* and  $\beta$ -actin. (A)24h (B)48h (C)72h (N=3, S.E.M.)(\*p<0.05)

### 3.5.3 考察

4.4で示したスクラッチアッセイによる結果と本実験における結果を併せて、ALTPの照射は細胞遊走能の低下を示唆した。細胞の遊走に際し、Fig.9に示す様に *Girdin* は *Akt* によるリン酸化によって活性化されるが、*PTEN* の働きによって阻害されることが知られている<sup>[6]</sup>。本実験では、ROS/RNS によってがん抑制遺伝子 *p53* が活性化されると共に *PTEN* の発現が促進された結果、*Akt/Girdin* の発現が抑制され遊走能の低下を誘導したと考える。

### 3.6 結言

私は、低侵襲且つ新規的ながん治療方法の一つとしてALTPの応用に着目した。本研究では間接的なALTP照射を行った後の肺腺がん細胞に対する影響の評価を行い、新規治療方法として有用か検討を行った。本研究における結果として、ALTPの曝露によりA549ヒト肺腺がん細胞株に対して細胞増殖能の抑制、アポトーシスの誘導、細胞遊走能の抑制が示された。特に、アポトーシス誘導と細胞遊走能低下に関して、RT-qPCRによる遺伝子発現解析から、肺腺がん細胞に対するALTPの作用機序解明に向けた進捗を示した。しかしながら、肺腺がん細胞に対してのみ評価を行っている為、肺正常細胞に対するALTPの影響は未確認であり、安全性を含め課題が存在する。よって今後の展望として、肺正常細胞に対しても同様の曝露を行い、がん細胞のみに対して死滅に導くALTP照射条件の検討が必要であると考ええる。

### 参考文献

- [1] 国立がん研究センター, “がん統計”, [https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/index.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/index.html), (参照 2022-9-7)
- [2] 奥野菜々子 et al., “大腸癌モデルラットに対する大気圧低温プラズマの影響の検討に向けたプラズマ照射水の成分分析, 第32回「電磁力関連のダイナミクス」シンポジウム”, pp.243-248, 2019
- [3] Cordani et. al., ”Mutant p53-Associated Molecular Mechanisms of ROS Regulation in Cancer Cells”, *Biomolecules*, No.10, Vol.361, 2020
- [4] Abbasi et. al., Hyaluronic acid optimises therapeutic effects of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on breast cancer, *J Cell Physiology*, 2020