

## 主論文の要旨

### **Effectiveness of plasma treatment on pancreatic cancer cells**

〔 膵癌細胞株におけるプラズマ治療の効果 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

服部 憲史

## 【背景】

膵癌はヨーロッパや米国において癌による死亡原因の第4位であることが知られている。根治切除後の5年生存率は約8~19%であると報告されており、予後不良の疾患である。予後改善のために様々な治療が行われているが、効果的な治療戦略はいまだ確立されていない。

プラズマとは、固体、液体、気体に続く‘物質の第4の状態’と呼ばれ、電子、陽イオン、ラジカル、光などから構成され高エネルギー状態にある。従来プラズマは、高温低圧下に産生されていたが、低温大気圧下における産生が可能となった。非平衡大気圧プラズマ (NEAPP) を用いたプラズマ治療は、癌治療における手術、化学療法、放射線治療に続く第4の治療法として期待されている。プラズマの抗腫瘍効果については様々な癌腫において報告されているが、その多くは癌細胞に対してプラズマを直接照射した、プラズマの直接効果を検討した報告である。近年、膠芽腫、卵巣癌、胃癌においてプラズマを照射した培養液によって選択的にアポトーシスが誘導され、プラズマの間接効果による抗腫瘍効果について報告された。本研究ではプラズマの間接効果に着目し、プラズマを照射した培養液を用い膵癌細胞株に対する抗腫瘍効果とその機序を検討した。

## 【方法】

4種の膵癌細胞株 (PANC-1, Capan-2, BxPC-3, MIA Paca-2) と正常細胞株 (膵管上皮細胞: HPDE6/7) を用いた。プラズマ照射液: plasma-activated medium (PAM) は、アルゴンガスを用い、60 mmペトリディッシュに 10%FBS の含まれていない RPMI-1640 培地を 6 ml 投与し、電極と培地の液面との距離を 15 mm、プラズマの照射時間を 30 秒、1 分、2 分、3 分、5 分と設定し作成した。

まず PAM の細胞障害性を WST-1 アッセイにより調べた。96 well プレートに 1000、5000、10000 細胞数の膵癌細胞および膵管上皮細胞を播種し、24 時間培養後に培地を PAM に交換、さらに 24 時間培養し細胞増殖能検査を行った。細胞障害メカニズムについて検討するために、細胞形態変化、Caspase3/7 の活性、活性酸素種 (ROS) の変化についても解析した。12 well プレートに膵癌細胞を播種し、培地を PAM に交換してから経時的に細胞形態変化を観察した。8 well カルチャースライドに膵癌細胞株を播種し、PAM で 2 時間培養後、Caspase3/7 の活性化を蛍光顕微鏡にて検出した。その後、8 well カルチャースライドに膵癌細胞株を播種し、PAM で 2 時間培養後、ROS の蓄積を蛍光顕微鏡にて観察した。ROS の役割について評価するために ROS スカベンジャーである N アセチルシステイン (NAC) 存在下に PAM による 24 時間培養後、WST-1 アッセイにて細胞増殖能検査を行った。最後に PAM の治療効果を検証するためにマウス皮下腫瘍モデルによる *in vivo* study を行った。Capan2 を用い、癌細胞皮下接種後、週 3 回、PAM 投与群は 200  $\mu$ l の PAM を、コントロール群は 200  $\mu$ l の RPMI-1640 を皮下注射し腫瘍体積の比較検討を行った。

## 【結果】

すべての膵癌細胞株において PAM による抗腫瘍効果を認め、細胞株によってその感受性に差異を認めた (Fig. 1A)。正常細胞株は癌細胞株と比較し PAM に対する感受性が低く、PAM に対する抵抗性を示した (Fig. 1B, 1C)。PAM 投与により、膵癌細胞株自体の縮小、核の濃縮、細胞膜の空胞形成といったアポトーシスに特有の形態変化を認め (Fig. 2)、形態変化を来した細胞に一致して Caspase 3/7 の活性化を認め (Fig. 3)、PAM によりアポトーシスが誘導されたことを確認した。さらに細胞内において ROS の蓄積が増加し (Fig. 4)、NAC により PAM の抗腫瘍効果がすべての癌細胞株において抑制されたことから (Fig. 5)、プラズマにより産生された ROS がアポトーシスを誘導することが示唆された。マウス皮下腫瘍モデルにおいてはコントロール群と PAM 投与群における癌細胞皮下接種後 28 日目の腫瘍体積を比較したところ、PAM 投与群において有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた ( $89 \pm 38$  vs.  $28 \pm 22$  ( $\text{mm}^3 \pm \text{SD}$ ),  $p = 0.0031$ )。PAM 投与群の腫瘍重量は、コントロール群と比較し 64%減少した ( $p = 0.0018$ )。病理組織所見において PAM 投与群は約 60%の腫瘍変性を認めた (Fig. 6)。

## 【考察】

膵癌は消化器癌の中で最も予後不良の疾患であり、その早期診断が難しく、局所進行および遠隔転移をともなった切除不能状態で見つかる症例も多い。進行膵癌において多くみられる転移形式の 1 つである腹膜播種に対して全身化学療法や抗がん剤の腹腔内投与が行われているが、未だ十分な成果は得られておらず、新規治療方法が求められている。

プラズマは様々な癌細胞株において、アポトーシスを誘導することによって抗腫瘍効果を示すことが報告されている。癌細胞においてアポトーシスが誘導され炎症反応を引き起こさず周囲正常組織に影響を与えないことは、癌治療において有用なことである。本研究では膵癌細胞株において PAM による抗腫瘍効果を認め、細胞の形態変化と Caspase3/7 の活性化から PAM によりアポトーシスが誘導されたことを確認した。

NEAPP が産生する  $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、 $\text{OH}$ 、 $\text{NO}$  といった種々の ROS が、アポトーシスを誘導することが報告されている。本研究でも膵癌細胞内に ROS の蓄積を認め、NAC によって PAM による抗腫瘍効果が抑制された。細胞内外の ROS の種類、量については解明されておらず、今後の検討が必要である。

抗がん剤、放射線といった従来の癌治療は、正常細胞へもダメージを与えてしまうことが問題である。プラズマ治療は、卵巣癌、膠芽腫において選択的に腫瘍細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されており、本研究でも正常膵管上皮細胞株と膵癌細胞株の比較において、正常細胞株は PAM に感受性が低いことが示された。正常細胞を傷害することなく腫瘍細胞のみにターゲットを絞ることができる治療こそが、癌治療において極めて有用な治療法であり、PAM 治療は有望な治療法となる可能性がある。

我々は *in vitro* の結果をもとに *in vivo* study を行った。癌細胞皮下接種後 24 時間

後から PAM 治療を行い、癌細胞数の少ない微小転移下での PAM の抗腫瘍効果を確認した。腫瘍増殖は PAM によって完全に抑制されるものではなかったが、その理由として生体内に様々な ROS スカベンジャーが存在することが原因であると思われた。今後、腹膜播種治療への応用に向けて、PAM と抗がん剤との併用による *in vivo* study も検討していく必要がある。

#### **【結語】**

プラズマ照射液は膵癌細胞株においても抗腫瘍効果を認め、ROS によってアポトーシスが誘導されることが示唆された。PAM は最適な条件下において選択的に癌細胞に対する抗腫瘍効果を示すことから、プラズマ照射液による治療は膵癌治療において有望な治療法となる可能性がある。