

主論文の要旨

**Effect of Indirect Nonequilibrium Atmospheric Pressure
Plasma on Anti-Proliferative Activity against Chronic
Chemo-Resistant Ovarian Cancer Cells *In Vitro* and *In Vivo***

In vitro および *in vivo* における
抗癌剤耐性卵巣癌株に対する間接照射非平衡大気圧プラズマの効果

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

内海 史

【緒言】

プラズマとは固体、液体、気体に引き続く第4の状態ともいわれ、電子、正、負イオン、中性原子、中性、荷電分子などを含む気体によって構成されている。これは気体にエネルギーを加えて気体中の分子を原子に解離し、原子をさらにイオンと電子に電離することによって作ることができる。従来のプラズマは低気圧プラズマといい真空容器での発生に限られていたが、近年大気圧中低温でプラズマを発生させることのできる非平衡大気圧プラズマの開発が進み、製造・産業分野に限らず医療分野においても殺菌や創傷治癒、癌治療といった応用が進められている。癌治療においては、これまでプラズマは種々の癌に対してアポトーシスを誘導することが報告されてきている。

我々はこれまで、非平衡大気圧プラズマ(Non-equilibrium Atmospheric Pressure Plasma; NEAPP)発生装置を用い、卵巣癌細胞に直接照射した場合に与える選択的抗腫瘍効果について報告してきた。その主な作用は、プラズマから発せられるフリーラジカルを含む活性酸素種(ROS)や活性窒素種(RNS)などによる細胞の酸化還元平衡の障害に起因する細胞内ROSの上昇によるものであるといわれている。

卵巣癌は比較的初回の化学療法反応性は良好な癌であるが、治療を続けるうちに抗癌剤耐性を獲得し再発転移を来す。また腹腔内という閉鎖空間に原発し容易に播種を形成する。プラズマを卵巣がんの治療へ適応させるためにはプラズマの腹腔内への応用が不可欠となる。その一つとして、プラズマを溶液に照射し、ROS、RNSを溶液中に移行させ、そのプラズマ照射溶液を細胞に曝露させるというプラズマ間接照射の方法があげられる。プラズマ間接照射は、直接照射に劣らない効果が期待できるという報告もあり、十分治療応用が期待できる方法である。

【目的】

NEAPPによって作成したプラズマ照射溶液(NEAPP-activated medium ;NEAPP-AM)が、当教室で樹立、作成した卵巣癌株とその化学療法耐性株に対しても効果があるかどうかを調べることを目的とした。

【方法】

はじめに、NEAPP-AMの当教室で作成した卵巣癌株(NOS2、NOS3)に対しての抗腫瘍効果を確認した。まず、あらかじめRPMI-1640、6mlにNEAPPをそれぞれ示してある時間照射しNEAPP-AMを作成。NOS2、NOS3細胞に添加し、24時間後の細胞生存率をMTSアッセイで評価した。次いでNEAPPの主な作用と考えられているROSの関与を間接照射であるNEAPP-AMでも示すために、細胞内ROSのスキャベンジャーであるN-acetylcysteine (NAC)と、グルタチオン(GSH)合成阻害剤であるL-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO)を併用し、NEAPP-AMの抗腫瘍効果に与える影響を上記と同様の方法で確認した。続いて、臨床上卵巣癌でよく問題となる、化学療法耐性株に対してのNEAPP-AMの効果を検討するために、NOS2、NOS3のパクリタキセル、シスプラチン耐性株を作

成し(TR;パクリタキセル耐性株、CR;シスプラチン耐性株)、NEAPP-AMの効果を同様にMTSアッセイにより調べた。

NOS2、NOS2TRにおいて、NEAPP-AMによる腫瘍増殖抑制作用がアポトーシスによるものであるかを確認するため、カスパー3/7の検出実験を行った。NOS2、NOS2TR細胞にカスパー3/7detection kit を試薬の製品プロトコールに従って使用しNEAPP-AMを曝露した4時間後に蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞内ROSの増加を確認するために、細胞内ROSの検出試薬5-6-chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA)を使用し、NEAPP-AM添加後の細胞内ROSを検出した。

NEAPP-AMのin vivoでの効果を調べるために、NOS2、NOS2TR細胞でヌードマウスのxenografted modelを作成しNEAPP-AMの効果を検討した。NOS2、NOS2TR細胞を 1×10^3 個マウスの大腿に皮下注射しその24時間後よりNEAPP-AMとコントロールとしてプラズマを照射していないRPMI-1640を週3回局所注射しその腫瘍形成能の違いを比較した。また摘出腫瘍をHE染色し比較した。

【結果】

NOS2、NOS3に対するNEAPP-AMの細胞増殖抑制作用を24時間後にMTSアッセイで評価したところ優位に腫瘍増殖を抑制した($p < 0.05$)(Figure 2A-B)。NACとBSOの併用しNEAPP-AMの効果に対してのROSの関与を検討した結果、NEAPP-AMに見られた増殖抑制作用はNACにより阻害され、またBSOにより増強された(Figure 3A-B)。これらの結果より、NEAPP-AMにより誘発される細胞内ROSがNEAPP-AMの抗腫瘍効果の主な原因であると考えられた。抗癌剤耐性株に対するNEAPP-AMの効果を親株と同様の方法で調べた実験では、いずれの耐性株でも親株と同等の細胞増殖抑制作用を確認することができた(Figure 5A-B)。

NEAPPによる殺細胞効果がアポトーシスの誘導であることは最近言われてきているが、NEAPP-AMを使用した場合でもNOS2、NOS2TR共にNEAPP-AMに曝露したものはカスパー3/7が検出され、NEAPP-AMによる殺細胞効果はカスパーを介したアポトーシスの誘導にあることが示された(Figure 6A-B)。またNEAPP-AMによる細胞内ROSを確認するためCM-H₂DCFDAを使用し検討した。NEAPP-AM に曝露された細胞はNOS2、NOS2TRともに細胞内でROSによる還元産物であるDCFの信号が検出され、細胞内ROSの関与が示唆された(Figure 7A-B)。

In vivo studyでは、NOS2、NOS2TRいずれの群においても、NEAPP-AM投与群で有意に測定腫瘍体積は抑制された(Figure 8C-D)。投与開始28日後の摘出腫瘍重量もNOS2においてはNEAPP-AM投与群でコントロール群と比較して66%($p = 0.017$)、NOS2TRでも52%($p = 0.014$)抑制された(Figure 8E)。実験を通して大きな副作用は見られなかった。摘出腫瘍の摘出腫瘍のHE染色をFigure 8F-Gに示す。いずれの腫瘍でも中心性壊死を認めた他は組織学的相違を認めなかった。

【結語】

今回非平衡大気圧プラズマ(NEAPP)の間接照射により、卵巣癌細胞株とその抗癌剤耐性株での抗腫瘍効果をin vitro, in vivoにおいて証明した。その抗腫瘍効果のメカニズムは、細胞内のROSの上昇によるアポトーシスの誘導が一因であると考えられる。今後腹膜播種モデルに対する腹腔内投与としても応用していきたい。