

主論文の要旨

**Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells**

〔 胃癌細胞に対するプラズマ治療の効果 〕

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

(指導：小寺 泰弘 教授)

鳥居 康二

## 【背景】

胃癌は世界でも主要な死因の一つであり、根治切除を施行できた症例においても、腹膜播種や肝転移などの術後再発が起こりうる。中でも、腹膜播種を伴う胃癌に対する治療はいまだ満足しうるものではなく、新たな治療方法が求められている。非平衡大気圧プラズマ (NEAPP) は電離した気体から構成され、止血、歯牙漂白、創傷治癒などの分野において応用されている。近年、種々の癌細胞株に対する NEAPP の抗腫瘍効果が報告されており、手術、化学療法、放射線治療に続く新しい治療法として期待されている。しかし体内の病変にプラズマを直接照射することは困難であり、また、プラズマ照射に伴って発生する紫外線などによる、周囲正常組織への副作用については不明である。本研究ではプラズマを照射した培地を用い、胃癌細胞に対する殺細胞性およびその機序を検討した。

## 【方法】

60 mm ペトリディッシュに入れた RPMI-1640 培地 6 ml に対して、プラズマを一定時間照射して plasma-activated medium (PAM) を作成し、殺細胞性を検討した。4 種類の胃癌細胞 (NUGC4, MKN28, MKN45, SC-2-NU) および正常組織細胞 (WI-38) をそれぞれ 96 well プレートに播種し、24 時間培養後に培地を PAM に交換した後、さらに 24 時間培養し、殺細胞性を WST-1 アッセイにて評価した。また、12 well プレートに胃癌細胞を播種し、培地を PAM に交換してから経時的な形態変化を観察した。8 well カルチャースライドに胃癌細胞を播種し、PAM で 2 時間培養した細胞において Caspase-3/7 の活性化を蛍光顕微鏡にて測定した。また、60mm ペトリディッシュに胃癌細胞を播種し、PAM で 2 時間培養した後に annexin V で染色し、陽性率をフローサイトメトリにて測定した。その後、8 well カルチャースライドを用い、PAM により培養した細胞において活性酸素種 (ROS) の取り込みを蛍光顕微鏡にて観察した。ROS スカベンジャーである N アセチルシステイン (NAC) 存在下にて PAM による 24 時間の培養後、WST-1 アッセイを行った。また、4 種類の胃癌細胞における CD44 variant9 (CD44v9) の発現をフローサイトメトリで、また、胃癌の臨床検体を用いて定量 RT-PCR を行い、CD44v9 の発現を測定した。

## 【結果】

PAM により培養した胃癌細胞において、24 時間後に細胞数の減少を認めた。また、PAM により培養すると、5 時間後には細胞は球形に変化し、24 時間後にはすべての細胞種において細胞質が膨化する、アポトーシスを示唆する形状変化を示した。PAM の殺細胞性はプラズマ照射時間、細胞種類、播種する細胞数によって差異を認めたが、正常組織細胞は胃癌細胞と比較して PAM 低感受性の傾向を認めた。細胞を PAM により 2 時間培養すると、形態変化をきたした細胞に caspase-3/7 の活性化を認め、また、フローサイトメトリでは annexin V 陽性細胞の割合が増加し、アポトーシスを起こしていることが示唆された。また、PAM により 2 時間培養した細胞には ROS の取り込み

が認められた。以上より、PAM の殺細胞性は ROS によるアポトーシスの誘導であることが示唆された。さらに、NAC 存在下にて PAM による培養を行うと、殺細胞性は NAC 非存在下と比較して著明に低下していた。また、PAM 感受性と CD44v9 の発現の相関を調べたところ、4 種類の細胞株のうち、PAM 感受性の高い細胞は CD44v9 の発現が低く、また、PAM 感受性の低い細胞は CD44v9 の発現が高かった。

### 【考察】

NEAPP による抗腫瘍効果が報告され、新たな治療法として期待されているが、直接照射に伴う紫外線などの電磁波による副作用についてはいまだ不明である。これに対し、プラズマを照射した培地を用いることにより、グリオーマに対する抗腫瘍効果が示されている。プラズマの殺細胞性に関する機序として、種々の ROS が産生されることが報告されているが、まだ十分には解明されていない。CD44 はスプライシングにより多数の variant isoform が存在し、中でも、CD44v9 は胃癌幹細胞マーカーの候補として考えられ、再発や化学療法・放射線治療への抵抗性との相関が報告されている。近年、CD44v9 の発現と ROS 耐性の機序についての報告もなされており、本研究においても CD44v9 が高発現している胃癌細胞は PAM 低感受性を呈しており、臨床検体においても、腹膜播種症例では CD44v9 が低発現の傾向がみられ、PAM による治療が奏功する可能性が期待された。

### 【結論】

PAM は胃癌細胞に対して細胞傷害性を持ち、そのメカニズムは ROS 産生を介したアポトーシスの誘導であることが示唆された。PAM は一定の条件下において選択的に癌細胞の殺細胞性を示すため、腹膜播種に対する新たな治療法として有望と考えられた。