

プラズマ活性化乳酸リンゲル液による皮膚血管肉腫の新規治療法の開発

名古屋大学大学院 医学系研究科 皮膚科

宮崎 朗

名古屋大学医学部附属病院 皮膚科

滝 奉樹

森 章一郎

名古屋大学低温プラズマ科学研究センター

堀 勝

田中 宏昌

中村 香江

1. 研究の背景・目的

皮膚血管肉腫は頭部・顔面に好発する血管またはリンパ管内皮細胞由来の稀な悪性腫瘍である。悪性黒色腫よりも治療成績が悪く、5年生存率は10%台であるが、希少疾患であることも相まって、有効な化学療法が乏しい。タキサン系抗癌剤のパクリタキセルが第一選択薬として使用されるが、一時的な奏功にとどまっている。近年、プラズマ照射された溶液（プラズマ活性化溶液）が、がん細胞に細胞死を誘導することがわかり、非平衡大気圧プラズマの医療・バイオ応用が盛んに研究されている。名古屋大学ではこれまでに独自に開発した超高密度プラズマ発生装置を用いたがん治療を研究してきた。またその過程で、乳酸リンゲル液にプラズマ照射したプラズマ活性化乳酸リンゲル液（PAL: plasma activates lactate in Ringer's solution）を開発した¹。これまでに、グリオブラストーマ、卵巣癌、膵癌腹膜播種に対し、PALを用いてin vitroで抗腫瘍効果を実証してきた²⁻⁴。本研究ではPALの血管肉腫における有効性を評価し、臨床研究に向けての基礎的データを得ることを目的とした。

2. 研究の対象ならびに方法

1. 培養細胞株を用いた in vitro での有効性評価

血管肉腫細胞株 (ISOS-1, ISO-HAS-B, HAMON) を東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから入手した。1 日目に血管肉腫細胞株を 96 well プレートに 10,000 cells/well で播種、2 日目に乳酸リンゲル液で段階希釈した PAL で 1 時間処理した。3 日目に MTS assay (CellTiter 96® Aqueous One Solution Assay (Promega)) を行い、生細胞数を計測した。

2. 培養細胞株のマウス移植モデルを用いた in vivo での有効性評価

ヒト由来マウス血管肉腫細胞である ISOS-1 を 3×10^6 個ずつ、マトリゲルと混合の上、ヌードマウス (Balb/cSlc-nu/nu) の側腹部皮下に播種した。5 日後から 200uL の PAL (PAL 処理群) または乳酸リンゲル液 200uL (コントロール群) を週 3 回皮下投与し、腫瘍体積の変化を計測した。

3. PAL 治療後の腫瘍検体を用いた RNA-seq 解析

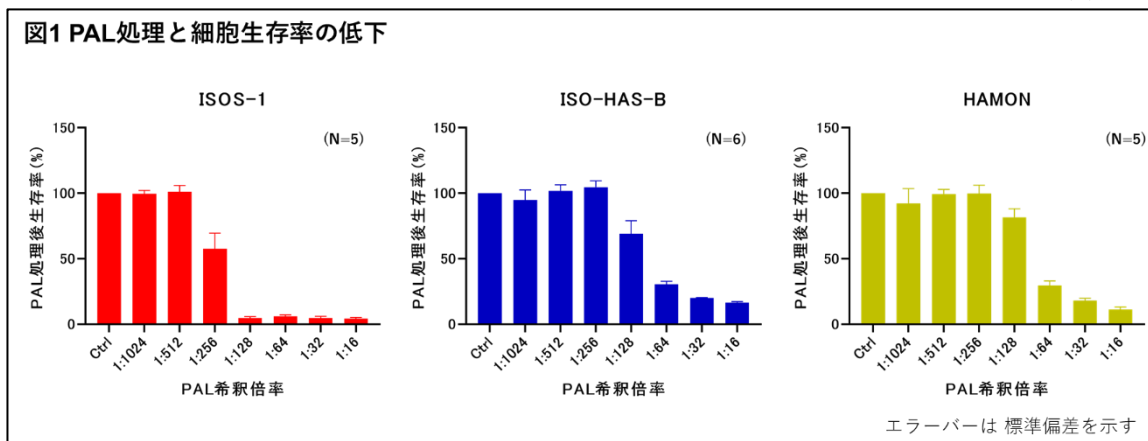
マウス移植モデルにおいて、6 週間 PAL 投与後の腫瘍検体を回収し、PAL 処理群 (N=3)、コントロール群 (N=3) について、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA を抽出した。Poly A 選択法により、mRNA ライブラリー調製を行い、Illumina Novaseq xplus でシーケンスした。Differentially Expressed Gene (DEG) 解析、KEGG パスウェイ解析は Novomagic software (Novogene) を用いた。

3. 研究結果

【1】血管肉腫細胞株で PAL 処理は生存率を低下させる

PAL は容量依存的に細胞生存率を低下させた (図 1)。細胞株により感受性は差があるが、おおむね 128 倍以上で生存率の低下が生じ、16 倍希釈ではいずれも残細胞数は 10% 程度であった。

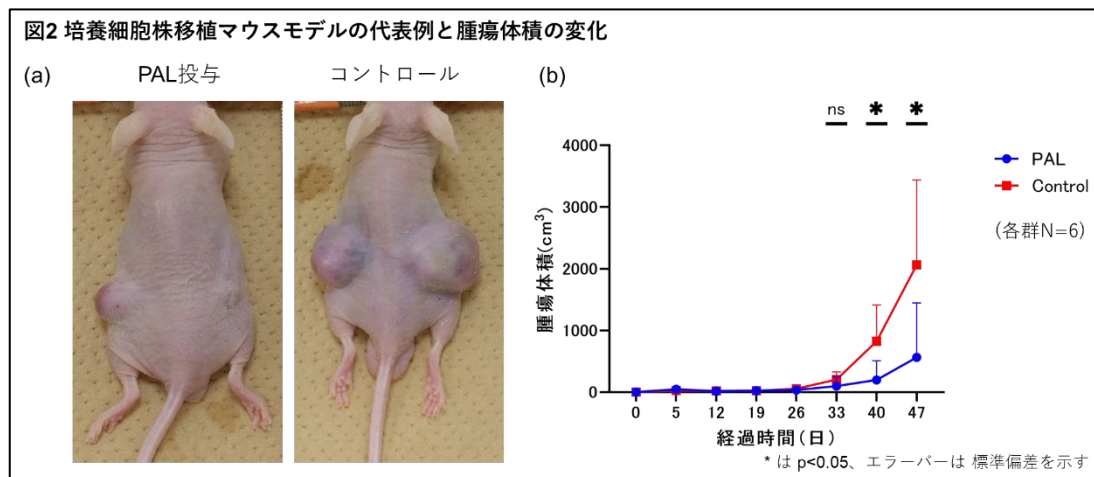
図1 PAL処理と細胞生存率の低下



【2】 血管肉腫細胞株マウス移植モデルで、PAL 投与は腫瘍増大を抑制した。

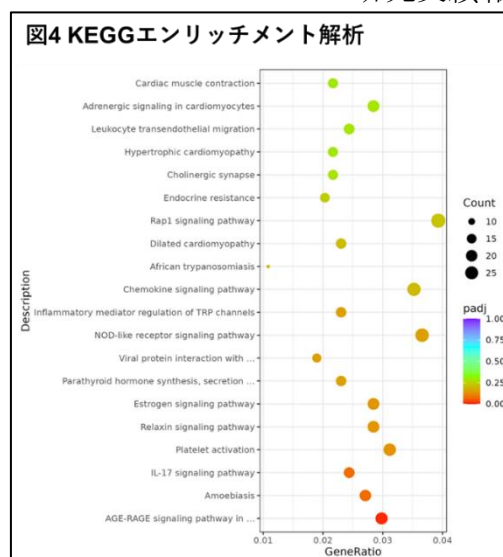
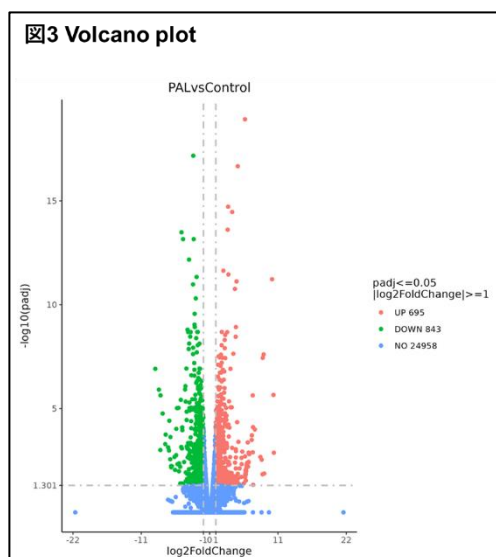
PAL 投与群とコントロール群の代表例と経時的な腫瘍体積の変化を図 2 に示す。播種 40 日後から、PAL の週 3 回投与は腫瘍の増大を有意に抑制した。PAL 投与群で、体重減少や皮膚の潰瘍形成等、明らかな副作用は認めなかった。

図2 培養細胞株移植マウスモデルの代表例と腫瘍体積の変化



【3】 マウス移植モデルから回収した腫瘍検体の網羅的遺伝子発現解析

【2】の投与実験から腫瘍検体を回収し、RNA-seq 解析を行った。1,538 個の DEG が同定され、発現上昇が 695 個、発現低下が 843 個であった(図 3)。KEGG パスウェイ解析の結果を図 4 に示す。エンリッチメントされたパスウェイは AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、Amoebiasis、IL-17 signaling pathway、Platelet activation、Relaxin signaling pathway 等であった。それらで低下がみられた遺伝子には、*Jun*、*Edn1*、*Pim1*等が含まれた。



4. 考察

本研究では、予後不良な希少がんである血管肉腫において、PAL の投与が複数の細胞株での細胞生存抑制効果を示すことを確認した。また腫瘍細胞移植モデルでは、有意な腫瘍増殖抑制効果を *in vivo* 実験で明らかにした。これらは低温プラズマ活性化乳酸リンゲル液が十分な抗がん活性を有することを示唆している。発現低下がみられた Jun は転写因子複合体 AP-1 を構成し、proto-oncogene として知られる。またエンドセリン 1 (Edn1) は血管収縮因子であるが、がん幹細胞でも共通して高発現しており、細胞増殖、上皮間葉転換、血管新生を促進といったがん細胞の維持に重要である⁵。Pim1 は造血系悪性腫瘍と前立腺がんが高発現しており、血液細胞の増殖に関連している。いずれもがん細胞の維持・増殖に重要であり、PAL ががん細胞に多面的な作用をもたらすことで、細胞死を引き起こしていることが示唆される。また副作用の面でも、マウスモデルにおいて体重減少や皮膚潰瘍は認めなかった。今後の低温プラズマを利用した創薬においても、高い安全性を示す可能性がある。ほかのがん種を含めて、PAL の有効性の機序はまだ不明な部分が多い。これらをより正確に解明し、最終的にはヒトでの臨床試験につなげることが求められる。

5. 文献

1. Tanaka H, Nakamura K, Mizuno M, et al. Non-thermal atmospheric pressure plasma

- activates lactate in Ringer' s solution for anti-tumor effects. *Sci Rep.* 2016;6(1):36282. doi:10.1038/srep36282
2. Tanaka H, Hosoi Y, Ishikawa K, et al. Low temperature plasma irradiation products of sodium lactate solution that induce cell death on U251SP glioblastoma cells were identified. *Sci Rep.* 2021;11(1):18488. doi:10.1038/s41598-021-98020-w
3. Nakamura K, Yoshikawa N, Mizuno Y, et al. Preclinical Verification of the Efficacy and Safety of Aqueous Plasma for Ovarian Cancer Therapy. *Cancers.* 2021;13(5):1141. doi:10.3390/cancers13051141
4. Sato Y, Yamada S, Takeda S, et al. Effect of Plasma-Activated Lactated Ringer' s Solution on Pancreatic Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(1):299-307. doi:10.1245/s10434-017-6239-y
5. Harrison M, Zinovkin D, Pranjol MZI. Endothelin-1 and Its Role in Cancer and Potential Therapeutic Opportunities. *Biomedicines.* 2024;12(3):511. doi:10.3390/biomedicines12030511

6. 研究発表

・論文発表

なし

・学会発表

なし