

# 非熱プラズマを用いた革新的メラノーマ治療法の開発

名古屋大学大学院医学系研究科・環境労働衛生学

研究員 飯田 真智子

名古屋大学大学院医学系研究科・環境労働衛生学

教授 加藤 昌志

## 1. 研究の概要

メラノーマは、最も悪性度の高い癌のひとつである。また、近年の紫外線量の増大に伴い、メラノーマの発症率は増加傾向にあり、その増加率はすべての癌腫の中で第一位と報告されている。メラノーマは、一般に、放射線治療等に耐性の悪性腫瘍として知られる。メラノーマの約60%でBRAF遺伝子に変異がみられることが報告され(文献1)、BRAF変異を標的としたメラノーマ治療薬の開発が精力的に進められている(文献2)。一方、BRAF変異を持たないメラノーマも約40%存在する。しかしながら、BRAF変異を持たないメラノーマに対する治療法は未だ限られており、BRAF変異を持たないメラノーマを対象としたより画期的な治療法の実用化が求められる。

プラズマとは、気体分子の電離や解離により生じる反応性に富んだ粒子から成る個体・液体・気体に続く第四の物質の状態である。近年、非熱プラズマの医療応用に関する研究が世界的に広がっており、メラノーマを含む癌細胞に対する抗腫瘍効果が*in vitro*レベルで報告されている(文献3、4)。しかしながら、非熱プラズマの*in vivo*レベルでの抗腫瘍効果については、移植癌を用いた報告が存在するが非常に限られている(文献5)。さらに、自然発症の腫瘍に対する非熱プラズマの抗腫瘍効果については、我々の研究成果を除きこれまでに報告がない。

当研究室において、メラノーマを自然発症するモデルマウス(RFP-RETトランスジェニックマウス:RET-マウス)を樹立した(文献6、7)。さらに、RET-マウスに発症したメラノーマは、Braf変異を持たないことを確認した。そこで、本研究では、RET-マウスに自然発症したメラノーマを用いて、Braf変異を持たないメラノーマに対する非熱プラズマの抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

## 2. 方法

### 2-1) RET-マウスに発症した腫瘍の病理解析

RET-マウスに発症した良性腫瘍および悪性腫瘍（メラノーマ）を剖出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定後、パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色により腫瘍の病理解析を行った。

#### 2-2) 非熱プラズマ照射

大気圧プラズマ装置（文献3）を用いて、RET-マウスに発症した腫瘍に非熱プラズマを30秒照射した。プラズマ源として使用した純アルゴンガスを同条件でメラノーマに照射した腫瘍をコントロールとした。また、非熱プラズマによる熱の影響を調べるため、プラズマ照射前と照射直後の腫瘍表面温度を測定した。

#### 2-3) 定量PCR

アルゴンガスあるいは非熱プラズマの照射から6時間後、腫瘍を剖出した。RNAを抽出、cDNA合成後、Real-time PCR法により腫瘍関連遺伝子の発現レベルを調べた。Real-time PCR法およびプライマー設計は過去の報告に従った（文献8、9）。

#### 2-4) 統計解析

Mann-Whitney *U* testにより統計解析を行った。

### 3. 結果

#### 3-1) 非熱プラズマ照射が腫瘍表面温度および腫瘍形態に及ぼす影響

非熱プラズマ照射前後の腫瘍表面温度は、照射前 (n=6) 照射後 (n=6) とともに約30°Cであり、統計学的にも有意な差は認められなかった。また、非熱プラズマを照射した腫瘍と非照射の腫瘍の組織解析を行った結果、腫瘍形態に顕著な違いはみられなかった。

#### 3-2) 良性腫瘍およびメラノーマにおける腫瘍関連分子の発現解析

##### ① Cyclins

細胞周期調節因子である cyclins は、メラノーマにおいて腫瘍増殖を調整することが報告されている（文献9）。そこで、RET-マウスに発症した良性腫瘍 (n=6) およびメラノーマ (n=6) における cyclin D1, D2, E1, E2, G1, G2 の mRNA 発現レベルを解析したところ、メラノーマにおける cyclin D1, D2, E1, E2, G2 の mRNA 発現レベルは、良性腫瘍と比べて、それぞれ約2倍、12倍、7倍、2.5倍、1.2倍と高く、いずれも統計学的に有意であった ( $p < 0.05$ )。一方、cyclin G1 については、良性腫瘍とメラノーマの間で mRNA の発現レベルに有意な差はなかった。

##### ② Matrix metalloproteinases (MMPs)

MMP-2、-9、-14 は、メラノーマにおいて、浸潤・転移能に関与することが報告されている（文

献8)。そこで、RET-マウスに発症した良性腫瘍 (n=6) およびメラノーマ (n=6) における MMP-2, -9, 14 の mRNA 発現レベルを調べたところ、メラノーマにおける MMP-2、MMP-9、MMP-14 の mRNA 発現レベルは、良性腫瘍のそれらと比べて、それぞれ約 18 倍、22 倍、1.5 倍高く、いずれも統計学的に有意であった ( $p < 0.05$ )。

### 3-3) 非熱プラズマ照射による腫瘍関連分子の発現変化

メラノーマに対する非熱プラズマの抗腫瘍効果を検討するために、アルゴン (n=6) およびプラズマ (n=6) を照射したメラノーマにおける cyclins および MMPs の mRNA 発現レベルを解析した。

#### ① Cyclins

プラズマを照射したメラノーマでは、コントロールのメラノーマと比べ cyclin E1、G1、G2 の mRNA 発現レベルがそれぞれ約 30%、30%、20%と有意に減少した ( $p < 0.01$ )。一方、Cyclin D1、D2、E2 の mRNA 発現レベルは、プラズマ非照射のメラノーマとプラズマを照射したメラノーマの間に有意な差はなかった。

#### ② MMPs

非熱プラズマを照射したメラノーマでは、コントロールのメラノーマと比べ MMP-2 および MMP-9 の mRNA 発現レベルがそれぞれ約 50%減少した。統計学的にも有意であった ( $p < 0.05$ )。一方、MMP-14 mRNA 発現レベルは、コントロールのメラノーマとプラズマ照射したメラノーマの間に有意な差はなかった。

## 4. 考察

RET-マウスに自然発症したメラノーマでは、Cyclin D1、D2、E1、E2、G2 および MMP-2、-9、-14 の転写レベルが、良性腫瘍のそれらと比べて有意に高いことが確認された。さらに、非熱プラズマ照射は、腫瘍温度および腫瘍形態にはほとんど影響を及ぼさず、RET マウスに自然発症したメラノーマの Cyclin E1、G1、G2 および MMP-2、MMP-9 の転写レベルに影響を及ぼすことが示唆された。また、Cyclins は、腫瘍増殖の促進に関与すること、また、MMP-2、MMP-4 は、腫瘍の転移・浸潤を促進することが報告されていることから、非熱プラズマはメラノーマの増殖および転移浸潤能を抑制する可能性が示唆される。In vivo レベルの腫瘍研究においては、免疫機能不全マウスを用いた移植癌による解析が主流である。一方、本研究では、自然発症メラノーマを用いたことから、本研究成果は intact な免疫システム下における生体応答であると考えられる。

## 5. 結語

本研究により、初めて、非熱プラズマが自然発症メラノーマに対して抗腫瘍効果を持つ可能性が示唆された。今後より詳細な詳細に検討する必要があるものの、非熱プラズマの Braf 変異をもたないメラノーマに対する新しい治療法としての可能性が期待される。

## 6. 参考文献

1. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353: 2135-47, 2005.
2. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med* 19: 1401-09, 2013.
3. Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Nakamura K, Kajiyama H, Kan H, Kikkawa F, Hori M. Plasma-activated medium selectively kills glioblastoma brain tumor cells by downregulating a survival signaling molecule, AKT kinase. *Plasma Med* 1: 265-77, 2011.
4. Kajiyama H, Nakamura K, Utsumi F, Tanaka H, Hori M, Kikkawa F. Perspective of strategic plasma therapy in patients with epithelial ovarian cancer: A short review of plasma in cancer treatment. *Japanese Journal of Applied Physics* 53: 05FA05, 2014.
5. Utsumi F, Kajiyama H, Nakamura K, Tanaka H, Mizuno M, Ishikawa K, Kondo H, Kano H, Hori M, Kikkawa F. Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *PLoS One* 8: e81576, 2013.
6. Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, Iwamoto T, Suzuki H, Nakashima I. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17: 1885-88, 1998.
- 7 Thang ND, Yajima I, Nakagawa K, Tsuzuki T, Kumasaka MY, Ohgami N, Ly TB, Iwamoto T, Watanabe D, Kato M. A novel hairless mouse model for malignant melanoma. *J Dermatol Sci* 65: 207-12, 2012.
8. Iida M, Yajima I, Ohgami N, Tamura H, Takeda K, Ichihara S, Hori M, Kato M. The effects of non-thermal atmospheric pressure plasma irradiation on expression levels of matrix metalloproteinases in benign melanocytic tumors in RET-transgenic mice. *Eur J Dermatol* 24: 392-4, 2014.
9. Yajima I, Iida M, Kumasaka MY, Omata Y, Ohgami N, Chang J, Ichihara S, Hori M, Kato M. Non-equilibrium atmospheric pressure plasmas modulate cell cycle-related gene

expressions in melanocytic tumors of RET-transgenic mice. *Exp Dermatol* 23: 424-5, 2014.

10. Iida M, Omata Y, Nakano C, Yajima I, Tsuzuki T, Ishikawa K, Hori M, Kato M. Decreased expression levels of cell cycle regulators and matrix metalloproteinases in melanoma from RET-transgenic mice by single irradiation of non-equilibrium atmospheric pressure plasmas. *Int J Clin Exp Pathol* 8(8):9326-31, 2015.