

# 低温プラズマによる遺伝子発現の制御を介した細胞機能発現に関する基盤的研究

岐阜薬科大学  
大塚 智裕

## 1. はじめに

プラズマとは固体、液体、気体に次ぐ物質の第4の形態であり、通常は太陽などの高エネルギー状態において原子から電子が離れ、イオンと電子が混在している状態を指す。一方でプラズマ技術の進展に伴い、これまで真空や高温など特殊な環境下でしか生成できなかったプラズマが常温かつ大気圧下で生成できるようになり、このプラズマは低温プラズマ (Non-Thermal Plasma; NTP) と呼ばれている。NTP は半導体製造に必須の技術として利用されている。

NTP は生体や培養細胞等に直接照射できるほど低温で生成できることから、近年では NTP の医療・農業等のバイオ分野への応用が精力的に検討されている。医療分野においては創傷治癒、止血、抗がん作用などが報告されており、特に創傷治癒については皮膚の創傷に対する治療デバイスとしてすでに臨床応用されている。一方で、NTP のこれらの作用のメカニズムについては不明な点が多く残されており、臨床応用の課題となっている。また、NTP は比較的新しい技術であり、どのような疾患に対して有用か十分に検討されていない。

本研究では、NTP 照射による遺伝子発現変化を網羅的に解析し、そのメカニズムを検証することで、NTP を利用した新しい細胞機能発現制御技術とそれを活用した新規適応の開発を目指すための基盤を構築することを目的とした。

## 2. NTP による遺伝子発現変化の網羅解析

はじめに正常細胞とがん細胞に対する NTP の応答性を比較するために、ヒト表皮角化細胞株 HaCaT 細胞およびヒトトリプルネガティブ乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞の培養系に対して NTP の照射を行い、細胞傷害性を比較した。本研究で利用した NTP 照射システムは、パワーコントローラー/ガス流量レギュレーター、アルゴン (Ar) ガスボンベ、プラズマヘッド (PN-120 TPG、NU グローバル) で構成されている。Ar ガスの流量は 2.4 標準リットル/分 (SLM) とした (図 1)。35 mm dish に各細胞を培養し、NTP を照射した後、24 時間培養して細胞傷害性を MTT 法で測定した。MDA-MB-231 細胞においては NTP 照射時間依存的に細胞傷害性が増加した一方、HaCaT 細胞では顕著な細胞傷害性は認められなかった。

HaCaT 細胞と MDA-MB-231 細胞の細胞応答が異なる NTP 照射条件において細胞の遺伝子発現変化を確認するために、NTP 照射 4 時間後に回収した細胞から total RNA を抽出し、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を実施した (図 2)。得られた発現データを用いて Gene Ontology 解析、Reactome Pathway Database を用いたパスウェイ解析を実施し、細胞ごとに制御される遺伝子やパスウェイに共通するものと差異があるものを確認した。また、一例

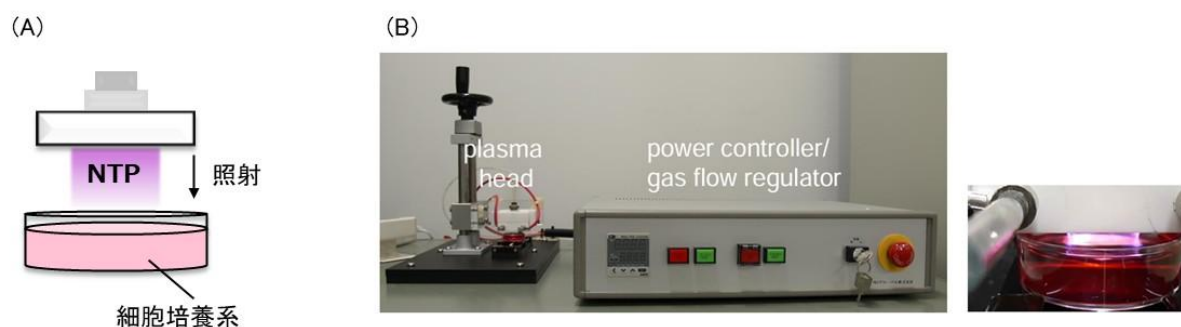


図 1 NTP の照射装置と照射法

(A) NTP 照射の模式図、(B) 照射装置の外観および照射の様子

として MDA-MB-231 細胞の発現データについて The Library of Integrated Network-Based Cellular Signatures (LINCS) ツール<sup>2)</sup>を用いて遺伝子発現変化が類似する化合物を探索した結果、類似化合物の上位に Sirt2 阻害剤の AGK-2 があった (図 2)。なお、この結果は HaCaT 細胞の遺伝子発現データを用いた LINCS による解析では確認されなかった。

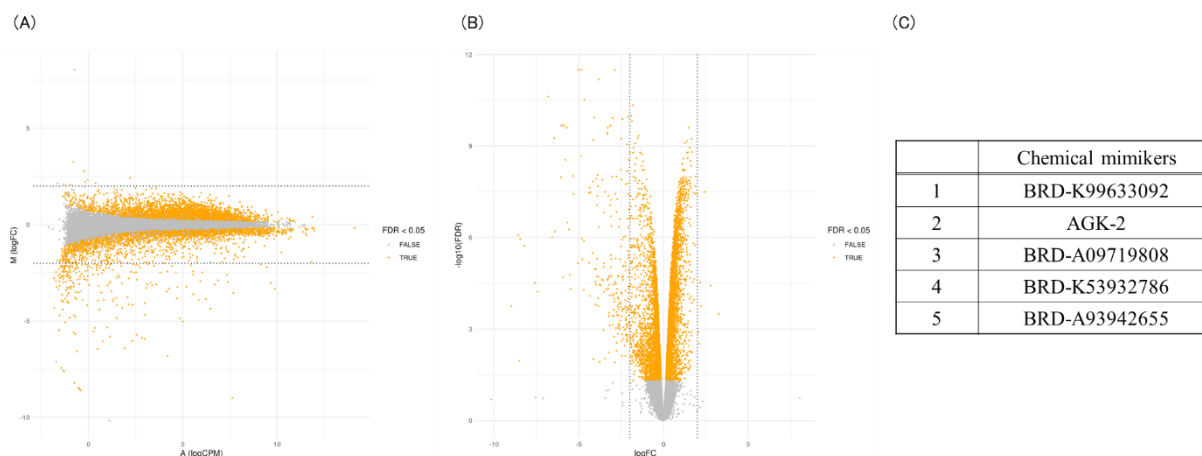


図 2 トランスクリプトーム解析結果

(A) MA プロット (縦軸: サンプル間の発現量の変動比、横軸: 発現量の平均値)、  
 (B) ボルケーノプロット (縦軸: 統計的有意性、横軸: サンプル間の発現量の変動比)、  
 (C) LINCS 解析結果 (上位 5 化合物)

### 3. NTP 照射が Sirt2 におよぼす影響の検討

前項で NTP 照射が Sirt2 阻害剤に類似の遺伝子発現変化を示す可能性を見出したため、NTP 照射により Sirt2 阻害作用が生じる可能性について検討した。Sirt2 はヒストン脱アセチル化酵素の一種であり、Sirt2 の一部はヒストンのアセチル化を介して遺伝子発現をエピジェネティックに制御することが知られている。一方で、Sirt2 の多くは細胞質に存在し、タンパク質のアセチル化を介して細胞機能を調節することが報告されている。Sirt2 がアセチル化するタンパク質のうち、Sirt1 や Sirt3 と比較して Sirt2 に特異的な標的として  $\alpha$ -tubulin の脱アセチル化が知られているため、NTP 照射により  $\alpha$ -tubulin のアセチル化が変化するかを指標に Sirt2 阻害作用の有無を検討した。その結果、アセチル化  $\alpha$ -tubulin 特異抗体を用いた Western

Blotting 法により、NTP 照射後に  $\alpha$ -tubulin のアセチル化が照射時間依存的に増加することを見出した (図 3)。なお、Sirt のサブタイプによらず脱アセチル化される p53 タンパク質のアセチル化も同様に検討したところ、NTP 照射時間依存的にアセチル化 p53 タンパク質が増加した (図 3)。

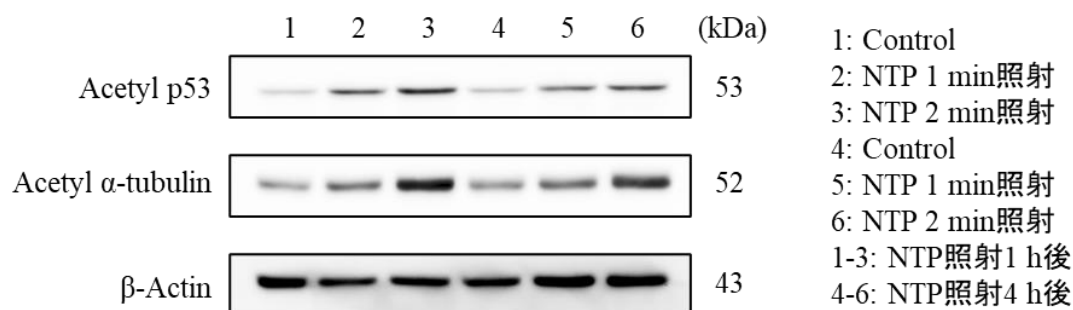


図 3 アセチル化タンパク質の変動解析

Sirt2 阻害剤である AGK-2 を MDA-MB-231 細胞に処置すると、アセチル化  $\alpha$ -tubulin の核周囲への局在が増加し、核が固くなること、また細胞遊走能が低下することが報告されている<sup>3)</sup>。核が柔らかいと細胞が狭い空間を移動できるため転移しやすくなると考えられており、転移性の高いがん細胞の核は柔らかいことが知られている<sup>4)</sup>。NTP は AGK-2 と同様に  $\alpha$ -tubulin のアセチル化の増加作用を介して核を固くし、MDA-MB-231 細胞の転移性を低下させる可能性が考えられる。一方で、 $\alpha$ -tubulin のアセチル化は Sirt2 のみでなくヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 によっても制御されるため、今後は NTP の作用が HDAC6 の活性低下に起因する可能性についても解析する必要があると考えている。

#### 4. NTP 照射による細胞内代謝物の変動解析

NTP による遺伝子発現変化にはエピジェネティクスが関与する報告があるが、詳細は不明である。エピジェネティクスにおけるメチル化のメチル基供与源はメチオニン回路であるが、その中のメチオニン (Met) を含む溶液に NTP を直接照射すると、Met が分解・誘導体化することをこれまでに確認している。よって、NTP によるメチオニン回路を中心とした細胞内代謝経路への影響が細胞機能発現に影響している可能性について検討を行った。

MDA-MB-231 細胞を NTP 照射 10 分後から 240 分後に回収し、細胞中に含まれる代謝物の解析を LC-MS/MS を用いて分析したところ、まずメチオニン回路分子のうち Met および S-adenosyl-Methionine (SAM) が検出可能であった。続いて、その他のアミノ酸含量や  $\text{NAD}^+$  含量の分析も含めて NTP による影響を解析したところ、NTP 照射 10 分後から 30 分後における細胞内  $\text{NAD}^+$  量の減少を確認した。しかし、その他の代謝物について顕著な変動は認められなかった。一方で、Met については照射 240 分後において低下傾向が認められた。よって、NTP 照射は細胞内の Met 含量に直接は影響しないが、培地中の Met 濃度低下や NTP 由来活性種の作用などにより NTP 照射 240 分後より遅い時間において細胞内 Met 含量を低下させ、メチオニン回路に影響する可能性が考えられた。また、Sirt2 は  $\text{NAD}^+$  依存性酵素である

め、NTP 照射による Sirt 活性の変化は NTP による細胞内 NAD<sup>+</sup>含量の低下作用に起因する可能性があるが、これらの詳細については今後も継続して検討していきたい。

## 5. まとめ

本研究ではがん細胞および正常細胞に対する NTP の作用を明らかにするために、トランスクリプトーム解析を実施して遺伝子発現調節を網羅的に解析し、1 例として NTP が調節する可能性のあるタンパク質を新たに見出した。また、その機構として細胞内代謝への作用が関わる可能性も示した。今回発見した Sirt2 タンパク質の阻害作用はがん細胞の転移抑制にかかわることから、NTP による新たな抗がん作用の発見につながることを期待される。また、NTP 照射による遺伝子発現変化や NTP 照射が機能調節するタンパク質について、今回得られた知見のみでなく、本研究のデータを基に今後も継続して解析することにより、NTP の生物・医療分野におけるさらなる新機能の発見に貢献できると考えている。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人 天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

## 参考文献

- 1) Tanaka H, Hori M. “Medical applications of non-thermal atmospheric pressure plasma,” J Clin Biochem Nutr. 60, 29-32, 2017.
- 2) Amar Koleti, Raymond Terryn, Vasileios Stathias, et al., “Data Portal for the Library of Integrated Network-based Cellular Signatures (LINCS) program: integrated access to diverse large-scale cellular perturbation response data,” Nucleic Acids Res. 46(D1), D558-D566, 2018.
- 3) Emily Jessop, Natalie Young, Beatriz Garcia-Del-Valle, et al., “SIRT2 Inhibition by AGK2 Promotes Perinuclear Cytoskeletal Organisation and Reduces Invasiveness of MDA-MB-231 Triple-Negative Breast Cancer Cells in Confined In Vitro Models,” Cells. 13(23), 2023, 2024.
- 4) Shaobao Liu, Yuan Li, Yuan Hong, et al., “Mechanotherapy in oncology: Targeting nuclear mechanics and mechanotransduction,” Adv Drug Deliv Rev. 194, 114722, 2023.