

大気圧プラズマ照射によるマクロファージの分化とサイトカイン放出特性

○ 小高沙織¹, 林信哉¹, 合島怜央奈², 山下佳雄² ¹九州大学総合理工学府, ²佐賀大学医学部

研究背景

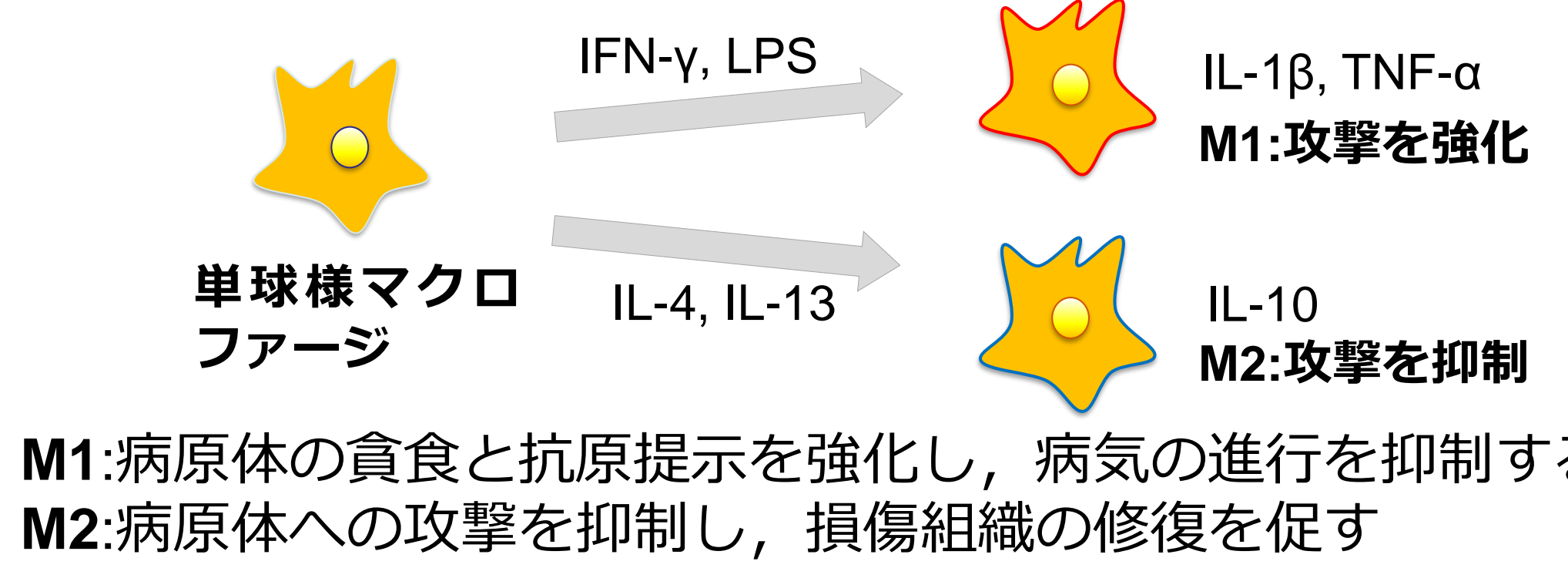
近年, がんの第四の治療法として免疫治療が効果を挙げてきている。血液中から免疫細胞を分離するとマクロファージやリンパ球が混在した状態となる。現状では, 各免疫細胞ごとに異なる活性化法を用いて, いずれかの免疫細胞を活性化させる方法が採られている。

これまでの研究より, プラズマ照射によってマクロファージやT細胞, NK細胞などを一度に活性化できる可能性が示されてきた。そこで, 複数種類の免疫細胞が混在する場にプラズマを作用させた場合に, 免疫で重要な役割を果たすマクロファージの活性化状態を明らかにすることは, プラズマ免疫治療の実用化に大きく貢献する。

マクロファージの重要な役割

- 食作用: 体内に侵入した病原体を発見し取り込み攻撃する
- 抗原提示: 病原体の抗原情報をT細胞に渡す
⇒免疫応答の開始

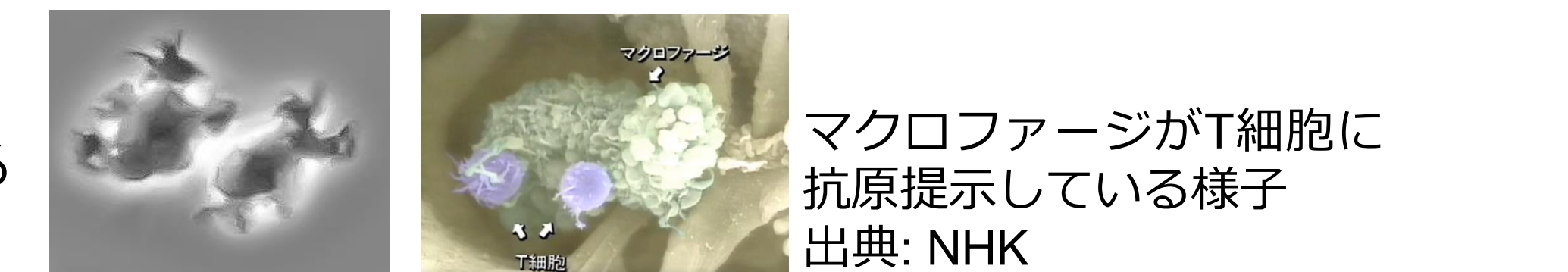
マクロファージの分化



Required	Solutions
<ul style="list-style-type: none"> ■ 血液に近い環境 ■ 細胞増殖能の向上 ■ 食作用の促進 	<ul style="list-style-type: none"> ■ 他の細胞との相互反応 ■ M1に活性化させる ■ LPS, IFN-γ ← This work

インターフェロン-γ (IFN-γ)

- T細胞やNK細胞から産出されるサイトカインであり, 腫瘍や病原体への攻撃を強化する
- マクロファージを刺激して食作用を促進させる



研究目的: マクロファージ-T細胞系に対するプラズマ照射の影響を調べ, マクロファージの分化特性を明らかにする。
最終目標: プラズマにより活性化された血液・リンパ液 (マクロファージ-T細胞) を用いた免疫治療法の確立を目指す。

実験方法

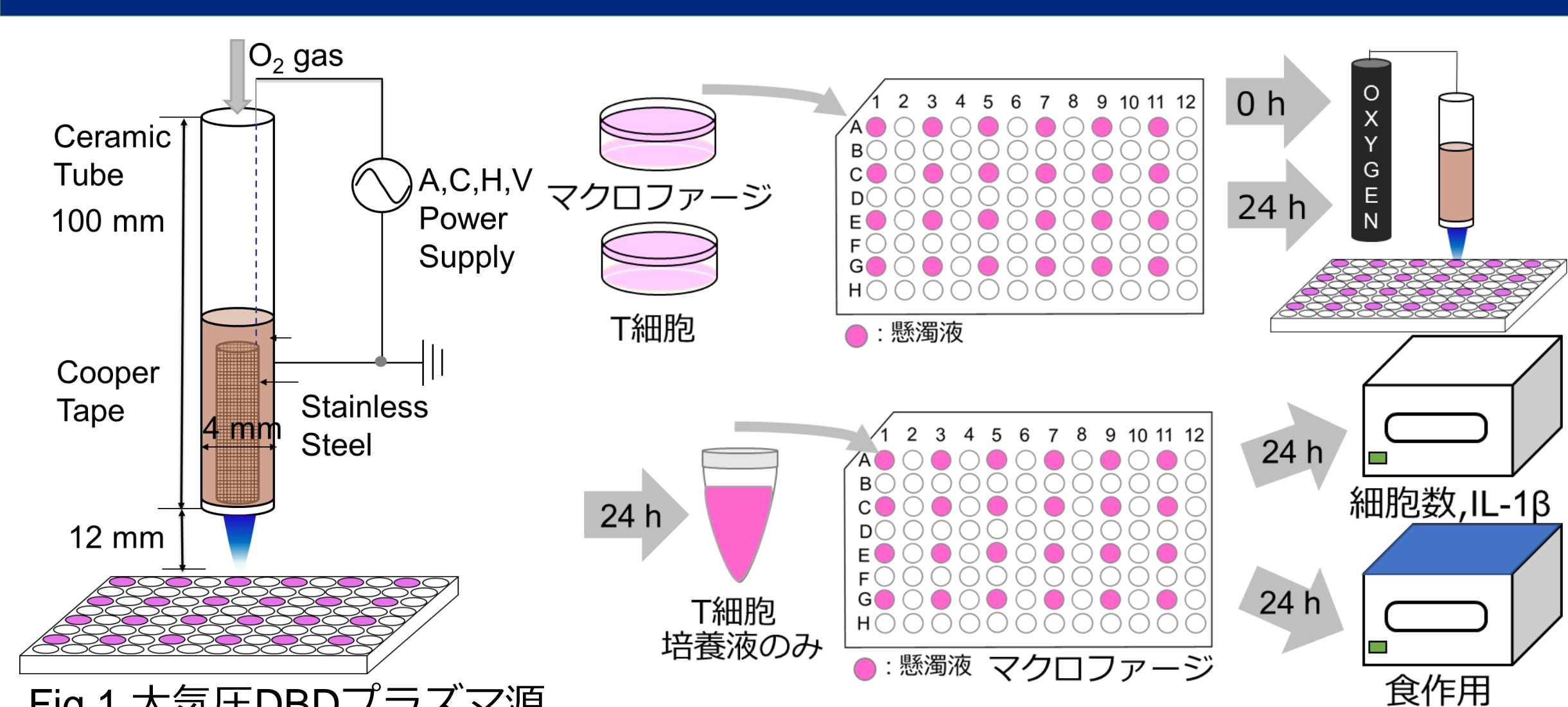


Fig.1 大気圧DBDプラズマ源

実験条件

■ マクロファージ: J774.1(Mouse)	気相オゾン濃度[ppm]	10	30	100
■ T細胞: EL-4(Mouse)	プラズマ照射時間[sec]	40	30	30
■ 生成ガス: 純酸素				

食作用の評価方法: 蛍光ビーズ

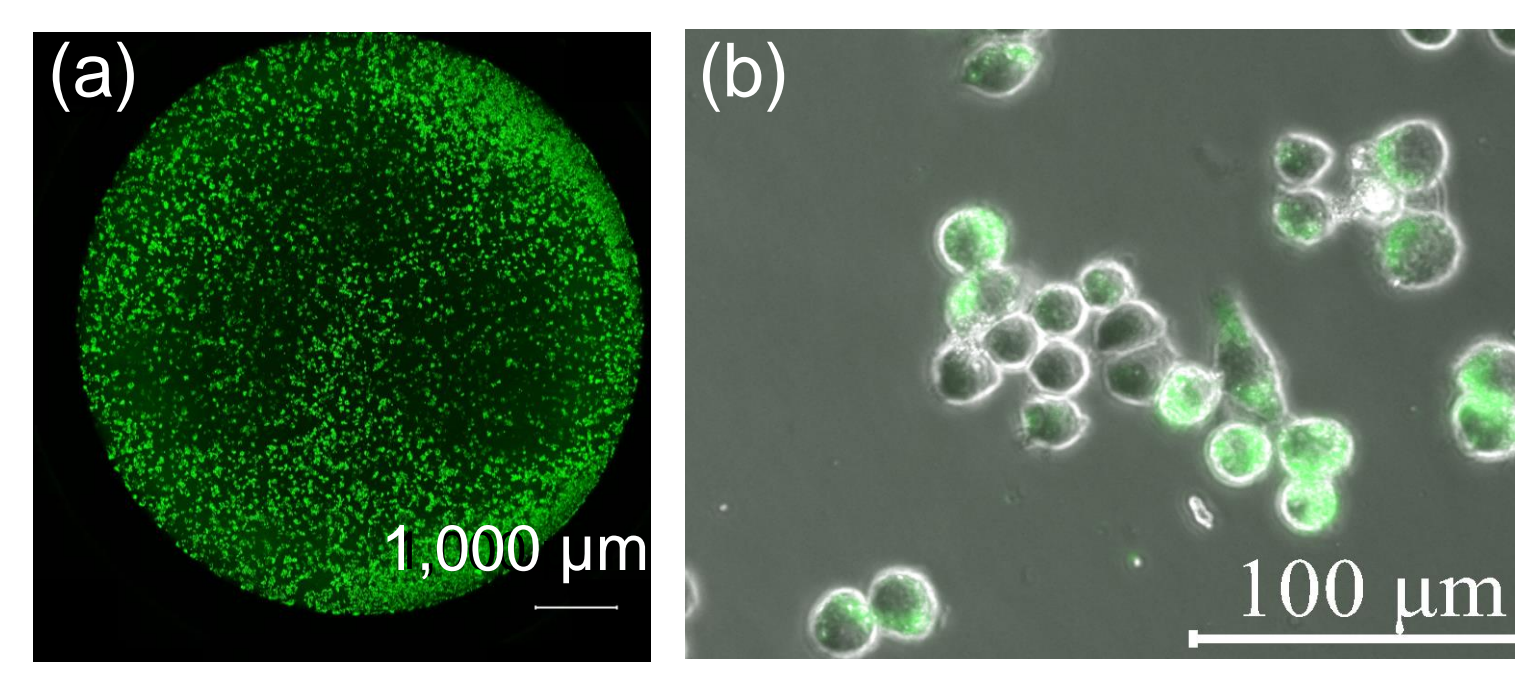
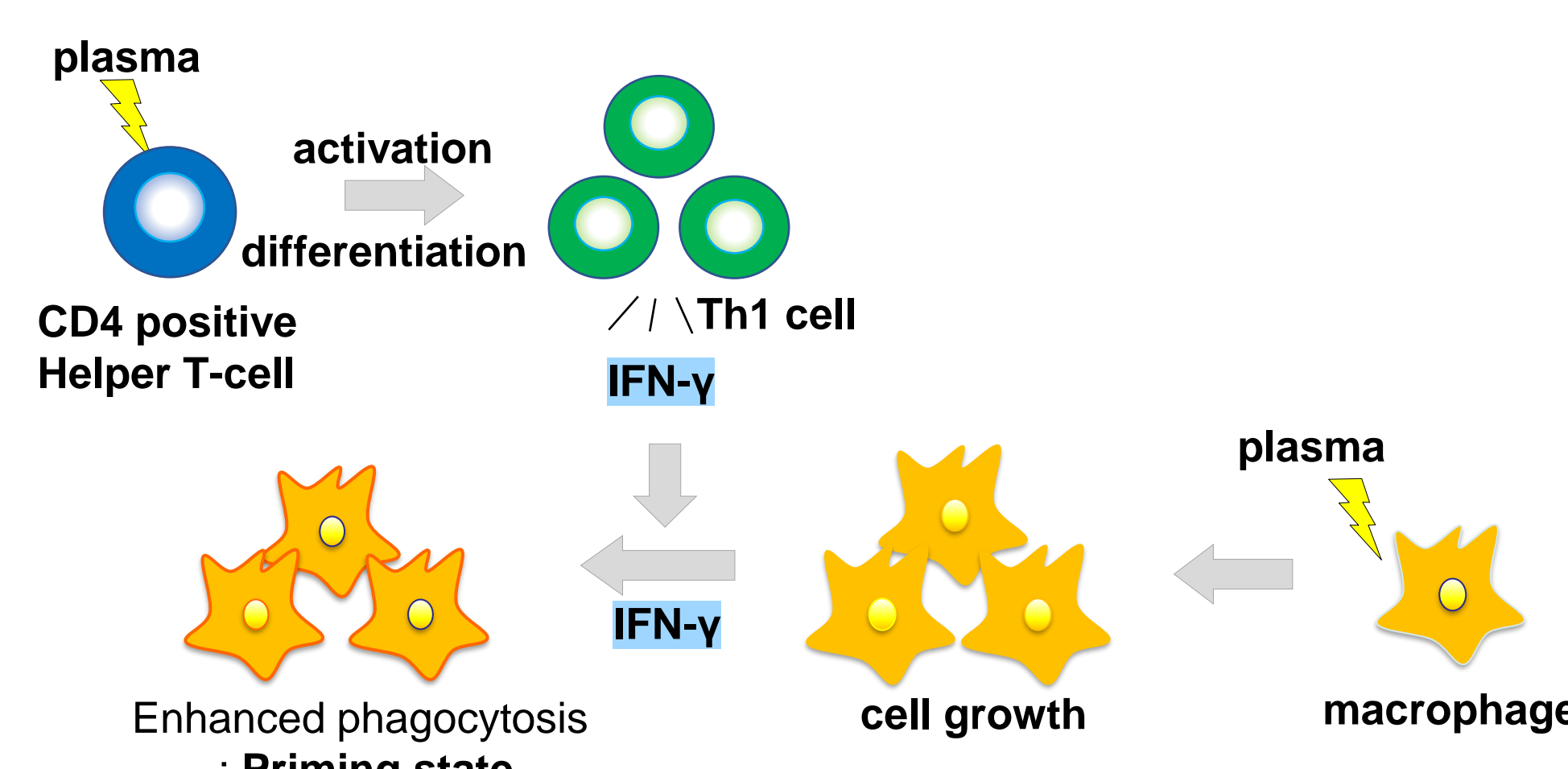


Fig.2 蛍光ビーズを加えた24時間後の蛍光顕微鏡画像
(a) マクロファージのみにプラズマ照射 10 ppm, 40 s.
(b) 拡大図

- 蛍光ビーズ (微粒子)
- Surface material: FITC
 - pH酸性条件で蛍光
 - 励起波長 / 発光波長: 509 nm / 533 nm

本研究でのプラズマ照射と細胞のシーケンス



プラズマによる効果

- 細菌に代わってT細胞をTh1細胞に分化誘導 ⇒ IFN-γの放出
- マクロファージの細胞数と食作用を向上させ, プライミング状態 (臨戦態勢) に誘導する

実験結果

細胞増殖能力と食作用: 酸素プラズマとT細胞により産出されるIFN-γがサイトカインがマクロファージに与える影響を評価する

(A)~(D)のグラフは, マクロファージへのプラズマ照射条件が異なる。グラフの横軸はT細胞のプラズマ照射条件を示す。

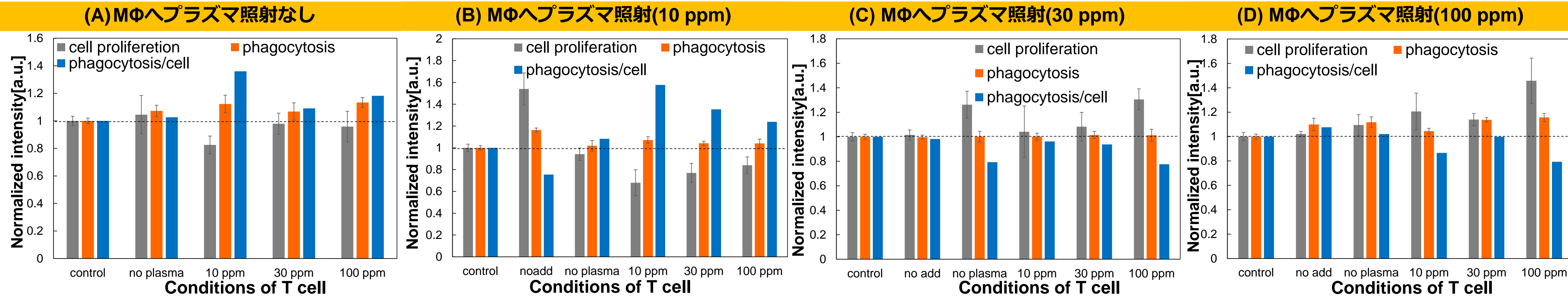


Fig.3 細胞数と食作用のプラズマ照射条件依存性

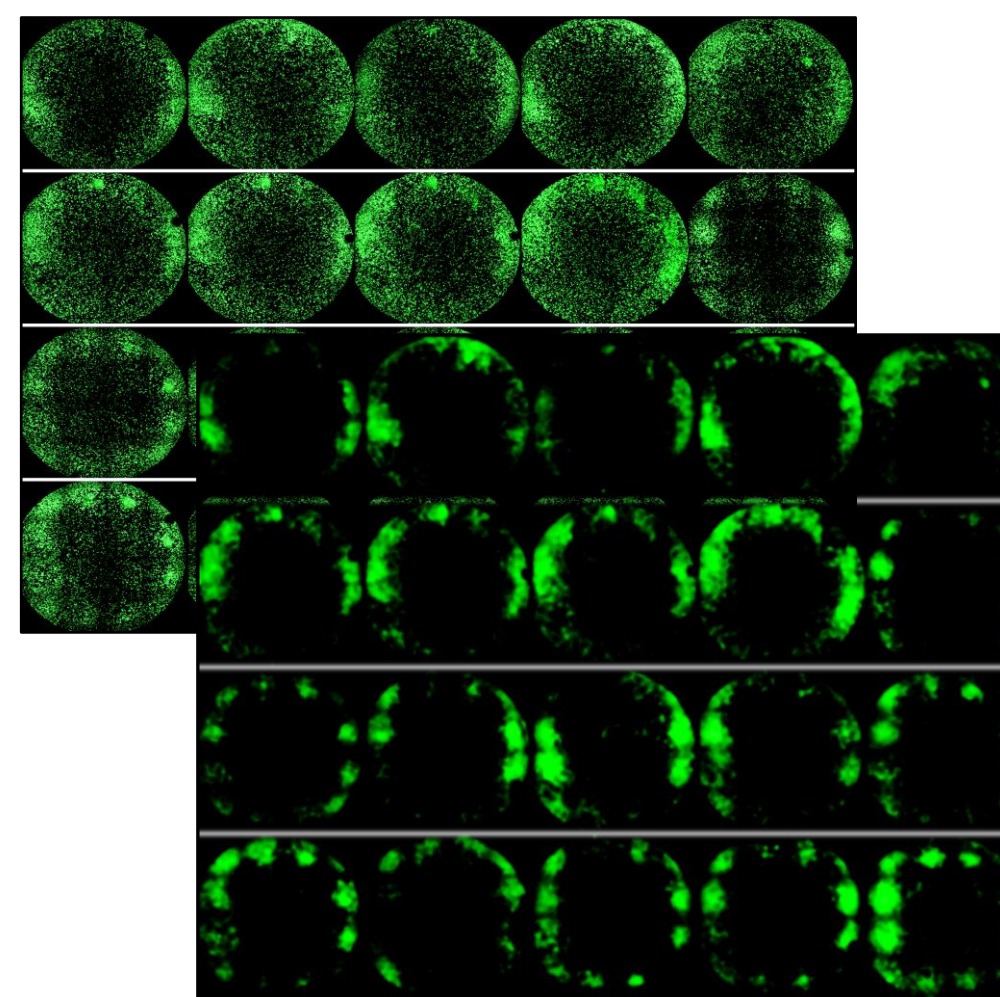


Fig.4 蛍光顕微鏡画像

- (A)より, プラズマ照射したT細胞を加えたことで細胞増殖能が低下し, 同時に食作用の向上が見られた。⇒ 食作用向上を促進し細胞増殖を抑制する一般的なIFN-γの機能を確認。
- (B)より, 細胞増殖はマクロファージのみの場合では54%に増加しているが, プラズマ照射したT細胞を加えたことで最大32%低下した。1細胞当たりの食作用は最大58%向上した。⇒ 低濃度のオゾンは食作用向上に適している。また, 細胞増殖能と食作用の向上はトレードオフの関係にある。
- (C),(D)より, より高濃度のプラズマを照射したT細胞を添加することにより, 細胞増殖能が向上することが明らかとなった。一方で, 食作用はほぼ変化しない結果が得られた。

M1マクロファージが放出するIL-1β: マクロファージの活性化度を評価する

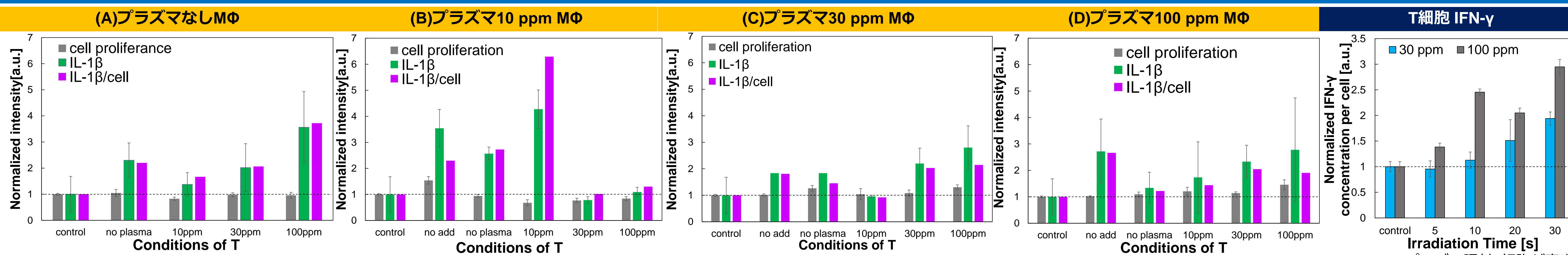


Fig.5 IL-1βのプラズマ照射条件依存性

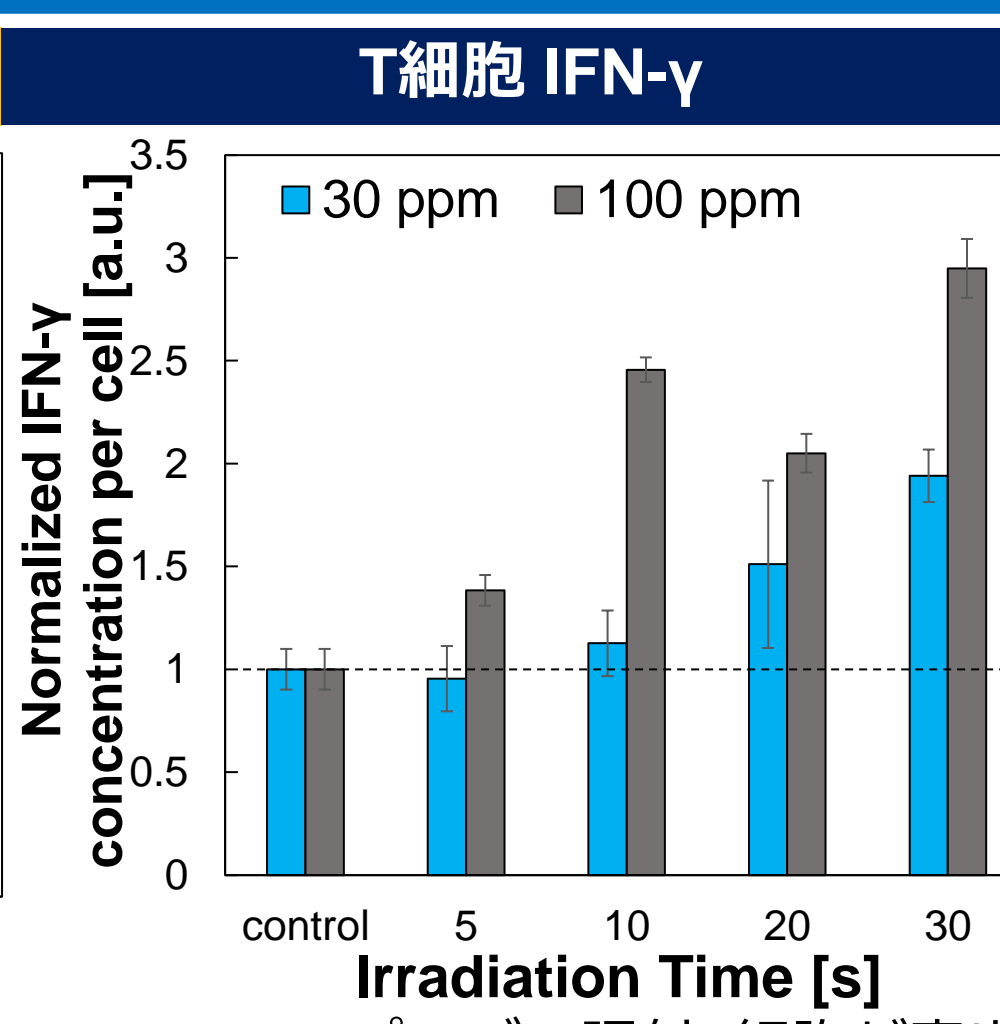


Fig.6 プラズマ照射T細胞が産出するIFN-γ量

- (A)より, T細胞の培養上清を加えるとマクロファージが産生するIL-1β産出量が増加した。100ppm, 30 secで照射したT細胞培養上清を加えたときIL-1βの産生量が2.8倍に向上した。⇒ CT値(ozone concentration[ppm]×irradiation time[min])が50のときFig.5が示すようにT細胞がTh1に分化してIFN-γを多く分泌し, M1マクロファージに活性化していると考えられる。
- (B)より, マクロファージとT細胞の両方に10 ppm, 40 secの条件で照射すると, マクロファージのIL-1β産出量は1ウェルで約4.3倍, 1細胞当たり換算すると約6倍まで向上した。⇒ IL-1β産出量増加よりM1マクロファージへの活性化が確認された。T細胞とマクロファージに適量のオゾンが作用するとマクロファージの食作用が飛躍的に向上することが分かった。
- (C),(D)より, マクロファージにプラズマを照射しない場合, または30, 100 ppmの条件でプラズマ照射した場合, T細胞培養上清中のIFN-γの増加とともにIL-1β産出量が増加した。一方で, 高濃度プラズマのマクロファージへの照射は, 未照射の場合よりもマクロファージの活性が抑制されることが分かった。

治療応用

- STEP1: 高オゾン濃度のプラズマを照射して細胞数を増加させる
STEP2: 低オゾン濃度のプラズマを照射してM1に活性化させる
⇒食作用向上を促進する



結論

- ✓細胞増殖能と食作用はトレードオフの関係である。
- ✓マクロファージとT細胞へのプラズマ照射条件を変更することで, 細胞増殖能向上かM1活性化(食作用向上)を選択することが可能である。
- ✓細胞増殖能を向上させるには高オゾン濃度のプラズマを, 食作用を向上させるには低オゾン濃度のプラズマを照射する。

謝辞

本研究の一部は, 日本学術振興会JSPS科研費23H00100の助成を受けたものです。