





崇城大学大学院  
工学研究科委員会  
研究科長 小 野 長 門 殿

論文審査委員  
主査 松 下 琢



論文審査結果の報告（甲）

論文提出者	稲 村 恒 亮 （1 6 1 9 D 0 1）
論文題名	がん化学療法の新たなアプローチに関する医用工学的研究
審査委員	主査 教授 松 下 琢 
	副査 教授 松 本 陽 子 
	副査 教授 友 重 竜 一 
	副査 准教授 古 水 雄 志 

論文審査結果の要旨

臨床において抗がん剤に対して耐性化が起こり、最終的には治療が困難になる現象は広く認められている。この現象は、がん患者のがん細胞レベルの生化学的変化に原因がある場合と、生体反応に原因がある場合がある。この内、がん細胞レベルの生化学的耐性メカニズムとしては、①細胞膜に存在する薬剤排出活性の向上、②薬剤標的タンパク質の増幅、③薬剤活性化機構の低下、④薬剤による障害修復機構の向上、⑤薬剤不活性化機構の亢進、などが知られている。また、近年がん患者の生体反応の変化の例として、がん組織中のがん幹細胞の存在が指摘され、高い薬剤耐性能と腫瘍原性能を有するがん幹細胞が、抗がん剤治療中に選択的にがん組織内で生存集積し、結果として治療困難になることが考えられる。

本論文では、これらのがん化学治療における抗がん剤の耐性化に対して、新しい医用工学的アプローチとして、肝がん細胞の三次元（3D）培養による薬剤耐性現象の *in vitro* での再現と、その *in vivo* での相関について検討し、新規な薬剤耐性克服薬の開発のための細胞アッセイ系を確立している。また、肝がん細胞中に存在する肝がん幹細胞に対し、副作用のない抗がん剤として研究が進んでいるハイブリッドリポソーム（HL）による増殖抑制効果について検討を行っている。

がん細胞は、*in vivo* では三次元的な細胞組織を形成し、その組織化が薬剤耐性の発現と関連していることが本研究室で解明されている。そこで本論文の第2章では、がん細胞の3D培養を普及させ、



薬剤耐性克服薬の開発のための細胞アッセイ系を確立するために、市販されている3D培養担体として、日本バイリン(株)の培養基材 Cellbed®を使用し、肝がん細胞 (HepG2 細胞) の *in vitro* での薬剤耐性の発現について検討した。その結果、HepG2 細胞の抗がん剤ドキシソルビシン (DOX) に対する50%増殖抑制試験 (IC<sub>50</sub> 値) は、Cellbed® 3D培養することで二次元 (2D) 培養の10倍以上増大し、薬剤耐性現象が示された。この DOX に対する薬剤耐性は、その排出活性を担う輸送タンパク質 MDR1 を阻害する既知の薬剤耐性克服薬 Verapamil (VRP) により有意に阻害されたため、MDR1 の関与が示唆された。また実際に、3D培養における DOX の細胞外排出が、明らかに VRP によって阻害されていることを生化学的に証明し、VRP の MDR1 活性の阻害による薬剤耐性克服現象を *in vitro* で再現することに成功した。

次に、Cellbed® 3D培養を用いた *in vitro* での薬剤耐性克服薬の細胞アッセイ系が、*in vivo* でのがん細胞の薬剤耐性現象を反映しているかどうかを確かめるため、同じ肝がん細胞 (HepG2)、抗がん剤 (DOX)、薬剤耐性克服薬 (VRP) を用いて、担がんモデルマウスに対する治療実験を行った。その結果、未治療群(Control)、VRP投与群、DOX投与群、VRP+DOX併用群において、未治療群での平均腫瘍体積は1564.9 mm<sup>3</sup>であったことに対して、VRP投与群およびDOX投与群では有意差が見られなかったが、VRP+DOX併用群での平均腫瘍体積は942.4 mm<sup>3</sup>であり有意な治療効果を示した。また、摘出した腫瘍重量についても同様な結果が得られた。この事実は、DOX投与群では薬剤耐性を示し、VRP+DOX併用では薬剤耐性克服現象が起きたものと考えられる。さらに、3D培養による培養担体 (*in vitro*)と摘出した腫瘍片(*in vivo*)を用いて、その断面をMDR1の免疫染色した結果、両サンプルにてMDR1陽性を示す細胞が明確に観察された。これらの結果から、Cellbed® 3D培養は、*in vivo* での薬剤耐性現象を予測できる *in vitro* の細胞アッセイ系として有効であることが示された。

肝臓がんにおける肝がん幹細胞はCD133およびEpCAMが両陽性の集団であることが知られている。そこで、第3章では、まずCD133(組織幹細胞マーカー)およびEpCAM(細胞接着分子、上皮系細胞の幹細胞マーカー)をマーカーとした肝がん幹細胞 (HepG2 細胞) のFCM解析手法を確立し、DOXおよびHL処理した際の肝がん幹細胞の割合の変化を検討した。その結果、通常用いられる抗がん剤であるDOX処理では、CD133(+)/EpCAM(+)集団が濃度依存的に増加しており、DOXでは肝がん幹細胞は治療困難であることが示された。一方で、HL処理では濃度依存的にCD133(+)/EpCAM(+)集団が顕著に減少したことが観察された。これらの結果は、HLがHepG2細胞中に存在するCD133(+)/EpCAM(+)集団を選択的に増殖抑制していることを示している。また、がん幹細胞の特徴として高い腫瘍原性があるため、DOXおよびHL処理した後に残存した細胞の腫瘍原性について軟寒天コロニー形成法で評価した。DOXで処理されたHepG2細胞は、非処理(Control)と比較して多くのコロニーを形成し、DOX処理によって肝がん幹細胞が残存して濃縮したことを示唆している。一方で、HL処理では濃度依存的にコロニーの形成を抑制し、コロニー数も有意に減少していた。さらに、HepG2細胞のCD133/EpCAMの各集団へのHLの蓄積について、蛍光脂質含有HL(HL/NBDPC)を用いてFCM解析を行った結果、HL/NBDPCはHepG2細胞のCD133(+)/EpCAM(+)集団に選択的に蓄積したことが示された。これらの結果より、HLは、高い腫瘍原性を有する肝がん幹細胞に選択的に蓄積し、その増殖を抑制することが明らかとなった。

本研究で得られた知見によって、薬剤耐性克服薬のスクリーニングにおいて、肝がん細胞 (HepG2 細胞) を Cellbed®で3D培養する方法は、*in vivo* での薬剤耐性を克服する可能性のある薬剤を、*in vitro* でスクリーニングする新規細胞アッセイ系として有望であることを示した。近年、動物実験の3R (Reduction ; 削減、Refinement ; 苦痛の軽減、Replacement ; 置換) が国際的な原則となっており、*in vivo* を予測できる本細胞アッセイ系は、動物実験代替法としても意義があると思われる。

また、HLはHepG2細胞中に存在するCD133(+)/EpCAM(+)の集団へ選択的に集積し、その増殖を抑制するために、肝臓がん治療における肝がん幹細胞を標的とする新規な治療剤となりうることを示された。これらの成果は、今後のがん化学療法の問題である薬剤耐性化、治療困難化を解決する上で、大変有益な知見であると思われ、今後の普及と実用化が期待される。

## 最終試験結果の要旨

本論文は、がん化学療法における二つの課題を解決するための新しいアプローチを示したものである。一つは、薬剤耐性現象を克服する新規薬剤をスクリーニングするための細胞アッセイ系を確立したものであり、動物実験との相関性をも示した。二つ目は、近年明らかとなっているがん幹細胞に対する新規薬剤として、本学で開発されたハイブリッドリポソームが有効であることを示したものである。これらの成果は、医用工学分野における重要な研究成果であると考えられる。よって本論文提出者は、博士（工学）の学位を取得する能力があることを認める。提出論文について公開試験を行わせた後、論文内容および関連する分野についての口頭による試験を行い、専攻内会議を行った結果、最終試験において合格したものと認めた。

なお、本研究内容は、以下の2編の学術雑誌（欧文誌）に公表されている。

1. K. Inamura, K. Emoto, H. Ichihara, K. Sasaki, T. Iwasa, R. Kojima, M. Kawabe, Y. Komizu, Y. Matsumoto, T. Matsushita  
Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis., Volume 9, Issue 2, 1000318 (2018).
2. K. Inamura, Y. Komizu, M. Yamakuchi, S. Ishida, Y. Matsumoto, T. Matsushita  
Biochemical and Biophysical Research Communications 509, 268-274 (2019)