

博 士 論 文

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

平成 30 年度

崇城大学 大学院工学研究科
応用生命科学専攻 博士後期課程
医用生体工学講座 松下研究室

1619D01

稲 村 恒 亮

目次

第1章 緒論	1
第2章 ヒト肝がん細胞に関する薬剤耐性克服薬の <i>in vivo</i> 効果予測のための 三次元培養を用いた <i>in vitro</i> アッセイ系の評価	
2-1 序	11
2-2 実験方法	
2-2-1 使用細胞および細胞増殖用培地の調製と滅菌	13
2-2-2 使用試薬および器具の滅菌	14
2-2-3 細胞培養に使用した試薬の調製と滅菌	19
2-2-4 細胞の融解と凍結方法	21
2-2-5 細胞の培養と継代および計数方法	22
2-2-6 Cellbed [®] の作製方法および特徴	23
2-2-7 Cellbed [®] の実験前処理および HepG2 細胞の培養	24
2-2-8 HepG2 細胞に対する抗がん剤(Doxorubicin)の 50%増殖抑制試験	25
2-2-9 HepG2 細胞に対する抗がん剤(Doxorubicin)の排出活性測定法	27
2-2-10 使用した実験動物(高度免疫不全マウス)	29
2-2-11 肝がん細胞皮下移植モデルマウスの作製および治療方法	30
2-2-12 <i>In vitro</i> と <i>in vivo</i> における MDR1 の免疫染色	32
2-3 実験結果	
2-3-1 二次元培養および三次元培養における DOX の IC ₅₀ 値	33
2-3-2 3D 培養による DOX の細胞外排出の測定	35
2-3-3 肝がん細胞皮下移植モデルマウスの作製	36
2-3-4 肝がん細胞皮下移植モデルマウスにおける DOX 投与濃度の条件設定	39
2-3-5 担がんモデルマウスにおける DOX の抗腫瘍活性評価 および VRP 併用による薬剤耐性克服の評価	42
2-3-6 <i>In vitro</i> と <i>in vivo</i> における MDR1 発現の比較	45

2-4 総括	48
第3章 ハイブリッドリポソームによる肝がん幹細胞の増殖抑制効果	
3-1 序	50
3-2 実験方法	
3-2-1 使用細胞および細胞増殖用培地の調製と滅菌	54
3-2-2 使用試薬および器具の滅菌	55
3-2-3 HL および HL/NBDPC の調製	58
3-2-4 細胞の融解と凍結方法	60
3-2-5 細胞の培養と継代および計数方法	60
3-2-6 DOX 処理および HL 処理のプロトコル	61
3-2-7 肝がん幹細胞(CD133+/EpCAM+)のフローサイトメーター解析	63
3-2-8 アポトーシス誘導細胞の検出	66
3-2-9 腫瘍原性評価法(軟寒天コロニー形成法)	67
3-3 実験結果	
3-3-1 正常肝細胞および肝臓がん細胞に対する DOX および HL の細胞増殖抑制効果	76
3-3-2 HL による HepG2 細胞のアポトーシス誘導	78
3-3-3 DOX および HL が肝がん幹細胞率に与える影響	80
3-3-4 DOX および HL が HepG2 細胞の腫瘍原性能に与える影響	82
3-3-5 HepG2 細胞中の CD133/EpCAM 発現の有無が HL の蓄積に与える影響	84
3-4 総括	87
第4章 総論	89
参考文献	95

第1章 緒論

がん治療の臨床において、化学療法に用いられる抗がん剤が次第にその有効性を失う現象は広く認められている。このような現象は薬剤耐性と呼ばれており、患者自体の生体反応(代謝や排泄を含む抗がん剤の体内動態、抗がん剤の到達性など)や、がん細胞レベルの生化学的変化(抵抗性を示す遺伝子の獲得、薬剤耐性細胞の選別など)に原因があると言われている¹⁻³⁾。後者の生化学的変化の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。さらに、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ている⁴⁻⁶⁾。これらのがん幹細胞は、他の非がん幹細胞と比較して薬剤耐性能が高いため、抗がん剤治療により選択的にがん組織内で生存し得る。結果として、抗がん剤に対して耐性を獲得したがん細胞が増殖し、再発および治療の困難さが大きくなる。

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*と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た。また、肝がん細胞中に存在する肝がん幹細胞のフローサイトメーター(FCM)による解析手法を確立し、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)による肝がん幹細胞への増殖抑制効果について検討を行った。

日本人にとって、「がん」という病気は割と身近なものである。1980年代以降で現在に至るまで日本人の死因第1位を維持し続けており、一生涯でがん罹患して死亡する確率は、男性で25%(4人に1人)、女性は15%(7人に1人)とまで言われている⁷⁾。今となっては、誰もが認知している「がん」という病気が、病態や治療方法について知られるようになったのは近年のことであるが、その存在は人類史と共にあった。そもそも、がん(Cancer)の言葉の由来は、古代ギリシャの医師であるヒポクラテス(BC460~375年頃)が乳がん患者のがん組織を観察中に「カニ(ギリシャ語: Carcinos)のようだ」と記述しており、ギリシャ語がラテン語訳されて「カニ(Cancer)」と呼ばれるようになったとされている⁸⁾。さらに日本では江戸時代の書物にがんのことを記載されている書物が存在しており、「岩(いわ・がん)のように固い塊ができる」との表現より、岩を表す「岳」の字に病垂を合わせて「癌」と呼ぶようになったとされている⁹⁾。加えて、最古のがんの症例としては南アフリカのスワートクランズ洞窟で発見

された 160~180 万年前のヒト足指の骨から骨肉腫の存在が確認されたことが挙げられる¹⁰⁾。この事実は、がん発症のトリガーは人類進化の歴史において初期から体に埋め込まれていることを示唆している。このように人類史において、しばしば顔を覗かせていた「がん」という病気は、その存在を示唆する記録はあっても病態や治療法が確立されるまでに長い時間を要し、今日に至っている。

がんの治療方法としては、三大療法と呼ばれるものがある。外科療法、放射線療法、化学療法である^{11,12)}。第1に外科療法は、手術によりがん組織そのものを物理的に排除する方法であり、病巣を摘出するために完治が望める一方で、患者自身への負担が大きいことや転移したがんへの対応が困難であるなどのデメリットも存在している。第2に放射線療法では、がん組織目掛けて局所的にがんを排除する方法であり、患部の切除することなく治療が期待される一方で、放射線障害や全身性のがん(リンパ腫など)や体の奥に存在するがんには使用できないデメリットが存在している。第3に化学療法では、固形がんから転移性および全身性のがんへ効果を発揮できる一方で、デメリットとして大きい副作用と薬剤耐性により徐々に効果が薄くなるといったことが挙げられる。また、化学療法単独では、副作用や薬剤耐性の存在から基本的には完治を目指せず、がんの進行を抑えて症状を和らげ、再発を防ぐ・遅らせるといった目的で使用されていることが現状である^{13,14)}。

化学療法の歴史は、他の外科療法や放射線療法と比較すると歴史が浅く、抗がん剤の起源は前述した第2次世界大戦中に生物兵器として使用されたナイトロジェンマスタードであり、1940年代のことである(第1世代薬)¹⁵⁾。その後、抗がん剤の開発が進み、1970~1980年代にはドキソルビシンやシスプラチンなど現在使用されるような薬剤の開発が進められてきた。現在ではより少ない副作用を目指した腫瘍への選択性が高い分子標的薬の開発・臨床にまで至っている(Table1-1)^{16,17)}。

抗がん剤は、経口または点滴により体内へ摂取することになる。抗がん剤としての使用実績が多いドキソルビシン(ドキソルビシン塩酸塩, 商品名: アドリアシン®)を例としてその一部を以下に示す¹⁸⁾。ドキソルビシンは、細胞障害性抗がん剤に含まれるアントラサイクリン系抗がん性抗生物質であり、土壌中の放線菌のストレプトミセス属から分離された多環系の芳香族化合物で、トポイソメラーゼIIを阻害する。トポイソメラーゼは二本鎖DNA分子の一方または両方を切断し再結合する酵素である。トポイソメラーゼIIはDNA二重らせん構造の両鎖の骨格の一部を開裂させ、その切れ目からDNA二重らせん構造の絡まりやねじれ解消し、開裂部を結合してDNA複製を行う。アントラサイクリン系化合物は、トポイソメラーゼIIによりDNA鎖の一部が開裂した箇所に結合し、DNAと複合体を形成してDNAの合成と複製を阻害する。そのほか

にフリーラジカル中間体の生成による細胞タンパク質、細胞膜障害作用も抗腫瘍作用に關与する。これらのアントラサイクリン系抗生物質は、副作用として心筋障害や骨髄機能抑制を引き起こす可能性がある¹⁹⁾。

○ ドキソルビシン塩酸塩通常療法

固形がん(肺がん、消化器系がん、乳がん、骨肉腫)の場合

下記1)~4)は患者のがんの進行状況等を見て医師が判断する。

- 1) 1日量、10 mg (0.2 mg/kg)を日局注射用水または日局生理食塩液に溶解させ、1日1回4~6日間連日静脈内への投与後、7~10日休薬する。この方法を1クールとし、2~3クール繰り返す。
- 2) 1日量、20 mg (0.4 mg/kg)を日局注射用水または日局生理食塩液に溶解させ、1日1回2~3日間連日静脈内への投与後、7~10日休薬する。この方法を1クールとし、2~3クール繰り返す。
- 3) 1日量、20~30 mg (0.4~0.6 mg/kg)を日局注射用水または日局生理食塩液に溶解させ、1日1回3日間連日静脈内への投与後、18日休薬する。この方法を1クールとし、2~3クール繰り返す。
- 4) 総投薬量は500 mg/m²(体表面積)以下とする。

悪性リンパ腫の場合

- 5) 上記1)~3)に従う。
- 6) 1日1回25~50 mg/m²(体表面積)を静脈内投与し、繰り返す場合には少なくとも2週間以上の間隔をあけて投与する。
- 7) 1日目は40 mg/m²(体表面積)、8日目に30 mg/m²(体表面積)を静脈内投与し、その後20日間休薬する。この方法を1クールとして投与を繰り返す、総投薬量は500 mg/m²(体表面積)以下とする。

乳がん(手術可能例)における術前、あるいは術後化学療法)に対する他の抗悪性腫瘍剤との併用療法の場合

- 8) シクロホスファミド水和物との併用において、標準的なドキソルビシン塩酸塩の投与量及び投与方法は、1日量60 mg/m²(体表面積)を日局注射用水または日局生理食塩液に溶解し、1日1回静脈内投与後、20日間休薬する。この方法を1クールとし、4クール繰り返す、総投薬量は500 mg/m²(体表面積)以下とする。

Table 1-1 抗がん剤の主な種類

	種類	作用機序	主な薬品
細胞障害性 抗がん剤	代謝拮抗剤	主に細胞周期の S 期において DNA や RNA の合成を阻害する	メトトレキサート ペレトレキセド
	アルキル化剤	DNA や細胞内タンパク質と結合して DNA の複製と RNA の転写を阻害する	イホスファミド メルファラン
	抗がん性抗生物質	DNA に結びつくことで DNA が鋳型になることを阻害する	ドキソルビシン 塩酸塩
	植物アルカロイド (微小管阻害薬)	細胞内のチューブリンなどの細胞内タンパク質に結びつき微小管形成を抑制する	ビンアルカロイド ビンクリスチン
分子標的治療薬	細胞表面抗原	腫瘍細胞表現マーカーを標的にした治療薬(CD33 など)	トラスツズマブ
	増殖因子・受容体、 シグナル伝達	腫瘍細胞の増殖や転移に関わる細胞内シグナルや分子を選択的に阻害し、増殖や転移を抑制する	エルロチニブ セツキシマブ
	細胞周期調節薬	CD20 やプロテアソームなどの細胞調節機構に働きかけ、細胞増殖を抑制する	リツキシマブ
	転移・血管新生	血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) に働きかけ、がん細胞の血管新生を抑制し、がん細胞に栄養が届かないようにする	ベバシズマブ

しかしながら、抗がん剤によるがんの完全克服に至っていない現状がある。白血病や悪性リンパ腫などの血液のがんであれば、複数の抗がん剤を組み合わせることで効果が期待されるが重篤な副作用が出現するリスクが高く、固形がんでは治癒自体が一般的には困難とされているため、延命・症状緩和のために使用される。その原因として、固形がんでは内因性または後天性の薬剤耐性能の獲得が挙げられる。特に、多剤耐性(Multidrug Resistance: MDR)の存在は大きな問題の1つとして挙げられる²⁰⁾。MDRは、がん患者の生体反応(肝臓における抗がん剤の不活化や代謝拮抗など)、がん細胞自体の生化学的変化に原因があるとされており、以下のようなメカニズムが考えられている^{1-3, 21)}。

- ① 薬剤排出活性の亢進²²⁾……抗がん剤の細胞内への流入は、受動拡散によるものだと考えられているが、細胞内へ取り込まれた薬剤を細胞外へ排出する機構が存在している(詳細は後述)。
- ② 薬剤標的タンパク質の増幅²²⁻²⁴⁾……DNAを直接の標的としない葉酸拮抗薬やトポイソメラーゼ阻害薬、微小管作用薬などでは、標的分子の量や質が変化することで薬剤耐性を示す場合がある。例として、ヒドロ葉酸レダクターゼ(dihydrofolate reductase, DHFR)遺伝子の増幅と高発現が、抗がん剤であるメトトレキサートに対して耐性を有する原因として知られている。
- ③ 薬剤活性化機構の低下^{22, 25)}……抗がん剤の一種にはプロドラッグとして投与され、体内で特異的な酵素によって代謝されて活性化するものがある。例として、マイトマイシンやシクロホスファミドなどがあり、肝代謝酵素 CYP 酵素群の活性低下により、薬剤が活性型にならず薬効に影響が出る。
- ④ 薬剤による障害修復機構の向上^{22, 26)}……アルキル化剤や代謝拮抗薬の多くは、DNAに直接作用する。しかし、これらの薬剤の耐性メカニズムとして、DNA修復の亢進(修復に関与する酵素の強化など)が進み感受性が低下する。アルキル化剤の例ではニトロソウレア、代謝拮抗薬では5-FUなどで修復酵素の活性が起きて耐性を示す。
- ⑤ 薬剤不活化機構の亢進^{22, 27)}……体内の解毒機構に関与する、グルタチオン(GSH)やグルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)などの解毒酵素により、アルキル化剤が基質となる。

- ⑥ アポトーシスへの抵抗^{22,28)}……がんは元々、アポトーシス抵抗性の強い細胞であるが、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ(PI3K)や Akt、mTOR を含むサバイバル経路の活性化が報告されている。

以上のようなメカニズムの中で、薬剤排出活性の亢進、特に MDR1 タンパク質(P-gp; MDR1)や MDR-associated protein(MRP)のような薬剤排出タンパク質によって、がん細胞内から外への薬剤排出が活性化している²⁹⁾。MDR1 は ATP-binding cassette(ABC)トランスポータータンパク質ファミリーの一種であり、ATPase 活性を有し^{30,31)}、ATP を加水分解することで構造変化を起こし、抗がん剤に対して高い親和性を得ることで抗がん剤を細胞外へ膜輸送している ATP 依存性ポンプである³²⁻³⁵⁾。薬剤排出活性タンパク質である MDR1 によって細胞外へ排出される薬剤は、ドキソルビシン(DOX)などのアントラサイクリ系抗がん剤、ビンクリスチンなどのビンアルカロイド系抗がん剤、エトポシドなどのポドフィロトキシン誘導体やタキソールなどの抗がん剤が報告されている³⁶⁾。このような現象は 1970 年代にはすでに見出されており、その後の研究により薬剤排出の阻害について研究が進み、1980 年代になると MDR について広く知られ、MDR1 タンパク質とその機能について判明した。1981 年に日本の鶴尾博士らにより、カルシウムチャネル阻害薬である Verapamil(VRP)が多剤耐性を有した白血病細胞において抗がん剤の能動輸送を阻害し、薬剤感受性を回復することが報告されている³⁷⁾。その後、他のカルシウムチャネル阻害薬やカルモジュリン阻害薬などが同様に薬剤耐性克服の作用を持つことが明らかとなったが³⁸⁻⁴²⁾、その標的は不明のままであった。その後、1989 年に解明され、そのメカニズムとして VRP が直接 MDR1(P-糖タンパク質)に作用して、その機能を阻害することが知られることとなった⁴²⁾。VRP のようなカルシウムチャネル阻害薬と化学療法を併用することで薬剤耐性を克服することは細胞レベルで証明され、予備的に臨床試験が実施された。結果として、難治性の急性リンパ性小児白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫など様々な進行性の固形がん、さらに小細胞肺癌などに対する治療の可能性が示唆されたが、カルシウムチャネル阻害薬に起因する低血圧や不整脈などの副作用が原因で、治療法として確立されるまでには至っていない。薬剤耐性克服薬の有用性が示される一方で、VRP を薬剤耐性克服薬の第 1 世代薬として、現在、第 3 世代薬まで見出されているが、同様に未だ治療法として使われていない。そのため、新たに副作用の軽い薬剤耐性克服薬を選定するためのスクリーニング系および評価系の開発が望まれている。

また、薬剤耐性などがんの悪性度に着目すると避けられない問題が、がん幹細胞の存在である。がん幹細胞は、通常のがん細胞と異なり、①高い腫瘍形成能力②不均等分裂③高い薬剤耐性能、といった性質がある。特に、不均等分裂とは、細胞が自己複製をしつつ、自身とは異なる性質の細胞を生み出す(分化)特殊な細胞分裂であり、これは幹細胞の性質でもある。このようながん幹細胞の発見は、カナダ・トロント大学の John E. Dick らのグループによってヒト急性骨髄性白血病細胞を免疫不全マウスに移植して白血病を発生させることができるのは、CD34(+)/CD38(-)の分画に存在する細胞(造血幹細胞マーカー陽性)だけであることを1994年に報告した⁴³⁾。さらに、1997年にはヒト急性骨髄性白血病のがん幹細胞が増殖と分化を繰り返す過程で、正常な造血幹細胞と同じように階層構造を有していることが、細胞表面マーカーの解析により証明した⁴⁴⁾。それから、2000年代に入って他の固形がんにもがん幹細胞の存在が見出されており、今日ではほぼ全てのがん種において、がん幹細胞の存在が示唆されている(Table1-2)^{45,46)}。また少なくとも、様々ながん種において一部に正常幹細胞マーカーの発現が認められている⁴⁷⁾。そして、がん幹細胞の存在が明らかと

Table 1-2 各組織のがん幹細胞マーカー

組織種類	マーカー
乳がん	CD44 ⁺ , CD24 ^{-low} ALDH ⁺
脳腫瘍	CD90 ⁺ , CD133 ⁺
大腸がん	CD133 ⁺ , EpCAM ⁺ CD44 ⁺ , CD166 ⁺
膵臓がん	CD44 ⁺ , CD24 ⁺ , ESA ⁺ CD133 ⁺ , EpCAM ⁺
胃がん	CD44 ⁺
肺がん	ABCG2, CD133 ⁺
肝臓がん	EpCAM(CD326) ⁺ , CD133 ⁺ CD13 ⁺ , CD44 ⁺ , CD90 ⁺
悪性黒色腫	CD20 ⁺ , ABCB5 ⁺
急性骨髄白血病	CD34 ⁺ , CD38 ⁻
卵巣がん	CD44 ⁺ , CD177 ⁺ CD133 ⁺
膀胱がん	CD44 ⁺ , CK5 ⁺ , CK20 ⁻
前立腺がん	CD44 ⁺

なったことで、既存の抗がん剤ではこれらのがん幹細胞を根絶することが困難であることも同時に判明した。抗がん剤の中でも、分子標的薬は従来の抗がん剤と比較して、創薬および治療方針設計の段階から分子レベルの標的を定めているため、副作用が少ないことがメリットであり、注目されていた⁴⁸⁾。しかし、分子標的薬ですら、がん幹細胞は薬剤耐性を示す報告が存在している⁴⁹⁾。そこで、がん幹細胞の根絶のためにも、増殖能や薬剤耐性を抑え(機能の抑制)、正常細胞へ作用せず(高い選択性)、がんの形質に関与したバイオマーカーをターゲットとした新しいメカニズムの抗がん剤の開発が今後求められてくると考えられる。

一方で、上岡・松本らによって開発されたハイブリッドリポソーム(Hybrid Liposome: HL)^{50,51)}は、ベシクル分子(リン脂質)とミセル分子をブドウ糖溶液中で超音波照射をするだけで容易に得ることができるナノ粒子医用素材である。従来のリポソームのように調製段階で有機溶媒を使用しないため、有機溶媒の混入がなく生体への悪影響が少ない。また、調製の段階で素材や組成比を変えることで、形態やサイズ・相転移温度・疎水性および膜流動性のコントロールが可能な生体適合性に優れた医療素材である⁵²⁻⁵⁶⁾。HLは元来、薬物伝達システム(Drug Delivery System: DDS)のキャリアーとして開発され、制がん剤含有HLをがん細胞に作用させることで増殖抑制効果を示しており⁵⁷⁻⁵⁹⁾、さらにHL単体のみで制がん効果があることも*in vitro*^{60,61)}と*in vivo*^{62,63)}で明らかとなっている。またHLは、生命倫理委員会で承認後、再発悪性リンパ腫の患者に対して臨床試験を実施したところ、血液検査・生化学検査から副作用が無く、高い安全性が確認され、固形腫瘍の顕著な縮小効果及び、明らかな延命効果が確認されている⁶⁴⁾。その制がんメカニズムとして、正常な細胞には作用せず、種々のがん細胞(形質転換細胞)膜に対して、選択的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することが明らかとなっている⁶⁵⁻⁶⁹⁾(Fig.1-1)。アポトーシス誘導のメカニズムについて、以下の4つの流れで進行することが明らかになっている(Fig.1-2)。これらの制がんメカニズムは、細胞膜流動性の高いがん細胞に作用し、HLの制がん効果は、がん細胞中のがん幹細胞にも抑制効果を示す可能性がある。そこで、臨床で使用されている抗がん剤とは別の制がんメカニズムと作用機序を有するHLを新規ながん幹細胞阻害薬として、その効果について検証を試みた。

- ① HLのがん細胞膜への特異的な融合・蓄積
- ② 膜タンパク質であるデスレセプター(Fas)及びミトコンドリアへのシグナル伝達
- ③ 一連のカスパーゼの活性化
- ④ DNAの断片化

本論文は、がん化学療法における医用工学的アプローチとして、①薬剤耐性現象の *in vitro* での再現と *in vivo* での相関について検証し、新規な薬剤耐性克服薬の開発のために用いる細胞アッセイ系の確立、②肝臓がん細胞中に存在する肝がん幹細胞へ有効な抗がん剤の検討を行い、以下の 4 章としてまとめたものである。第 2 章では、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* と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たことについてまとめた。第 3 章では、肝がん細胞中に存在する肝がん幹細胞のフローサイトメトリー解析手法を確立し、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)による肝がん幹細胞の増殖抑制効果について検討した。第 4 章は以上の研究の総論である。

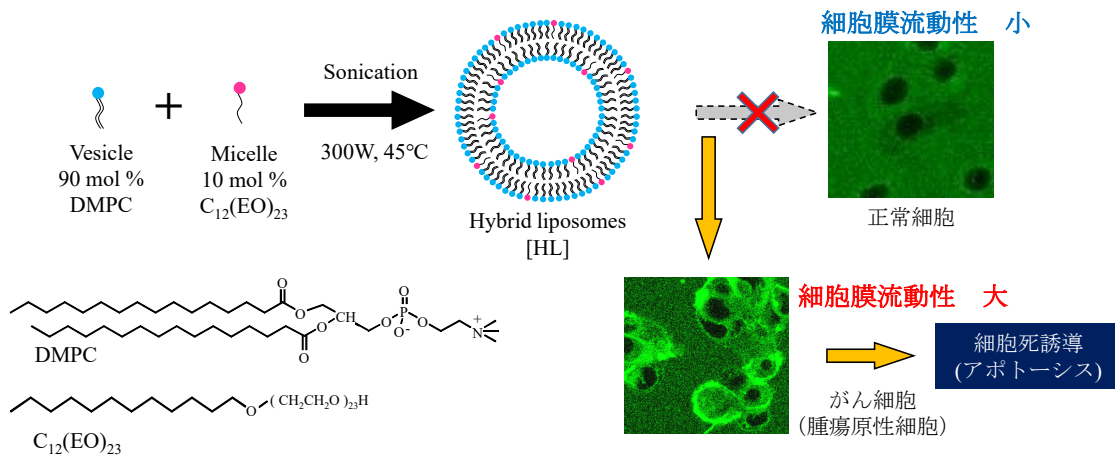


Fig.1-1 HL の正常細胞およびがん細胞に対する効果

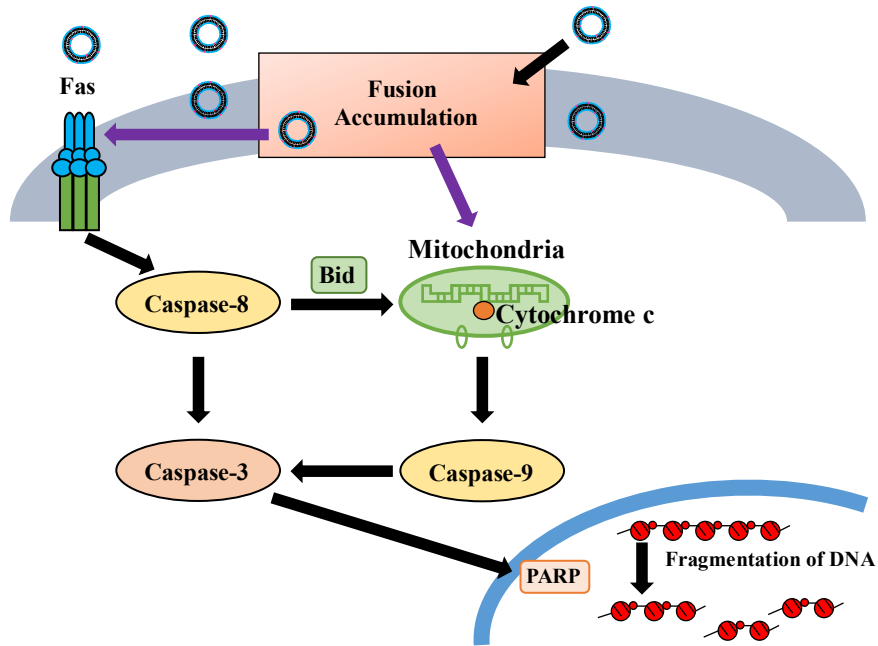


Fig.1-2 HL によるアポトーシス誘導メカニズム⁶⁹⁾

第2章 ヒト肝がん細胞に関する薬剤耐性克服薬の *in vivo* 効果予測のための 三次元培養を用いた *in vitro* アッセイ系の評価

2-1 序

様々な抗がん剤の開発が進んでいるにも関わらず、進行したがんへの化学療法は限られている。この理由として、抗がん剤に対して抵抗を示す薬剤耐性の存在が挙げられる¹⁻³⁾。薬剤耐性現象には様々な要因があるが、その一つにがん細胞からの能動的排出機構の亢進が挙げられ、ABCトランスポーター(ATP-binding cassette transporters; ATPのエネルギーを用いて物質の輸送を行う細胞膜上に存在する膜輸送体の一群)の存在が深く関与している。特に、ABCトランスポーターの一種であり、遺伝子名 ABCB1 として知られる MDR1 タンパク質は、主に小腸・肝臓・腎臓・血液脳関門などの上皮系細胞に発現している⁷⁰⁾。この MDR1 はアントラサイクリン系やビンアルカロイド系、タキサン系などの抗がん剤を細胞外へ排出することが知られている^{71,72)}。その一方で、従来のがん細胞単層培養では MDR1 の発現など薬物排出活性によるがん細胞の薬剤耐性が十分に発現できておらず⁷³⁾、この薬剤耐性を克服する薬剤(薬剤耐性克服薬)の開発には、*in vitro* で生体内での高い薬剤耐性現象を再現できるスクリーニング系が必要となる。また、薬剤開発において動物実験による副作用を含む薬物応答試験が行われるが、生物種差の観点で問題がある。例えば、薬剤代謝の中心である肝臓での CYP 酵素群はヒトとマウスではアイソザイムの種類が異なっており、代謝産物も異なる場合もある^{74,75)}。そのため、ヒトの細胞を用いて動物実験と同等の代謝活性が得られるスクリーニング系が必要であると考えられる。

これらのことを踏まえて、近年ではヒト由来の肝細胞を従来の 2D 培養ではなく、三次元的に細胞を培養し、新しいスクリーニング系として開発することが検討されている^{76,77)}。この理由として、2D 培養では生体内の機能や微小環境を再現できないため⁷⁸⁾、前臨床試験(*in vivo* 動物実験系)や臨床試験にて予想と異なる結果を生じさせることが挙げられる。そのため、細胞を三次元培養(3D 培養)する方法が考案されているが、現在では様々なものが存在している⁷⁹⁾。3D 培養を行う上で重要なものは、細胞を培養するための足場である。この足場となる素材は、コラーゲンやラミニンといった組織の足場ともいえる ECM を用いたもの、高分子化合物を用いたもの、電荷的作用を用いたもの、など多岐にわたる。様々な 3D 培養担体がある中、細胞の機能、細胞シグナルの亢進や良好な増殖などが 3D 培養で認められており、今後は、このような 3D 培養による細胞培養が主流になると考えられるけれども、この 3D 培養でのモデルが、*in vivo* の再現モデルであると検証した報告は極めて少ない。

本研究で用いた 3D 培養担体 Cellbed[®]は、シリカ系ナノファイバーであり、種々のがん細胞種において 3D 培養が可能であることも報告されている^{80, 81)}。これまでに我々は、Cellbed により、肝臓がん細胞(HepG2 細胞)を 3D 培養することで、高い薬剤耐性克服現象を生体外で再現することに成功している⁸²⁾。また、Cellbed を用いた 3D 培養では、2D 培養と比較して、低酸素誘導転写因子 (HIF1- α) とその因子の支配下にある MDR1 の発現が顕著に高まっていた。このことは、2D 培養よりも 3D 培養が癌細胞の薬剤耐性に関わる機能発現に有用であり、生体内を模倣できる可能性を示している(Fig.2-1)。以上の結果より、3D 培養担体 Cellbed は、薬剤耐性克服現象を再現する *in vitro* スクリーニング系として有用であることが示唆された。

そこで、本章では、この *in vitro* 3D 培養モデルで観測された薬剤耐性克服現象が *in vivo* でも同様に起こり得るか検討し、3D 培養モデルが、真の意味で *in vivo* の再現モデルになりうるかどうかを検証した。

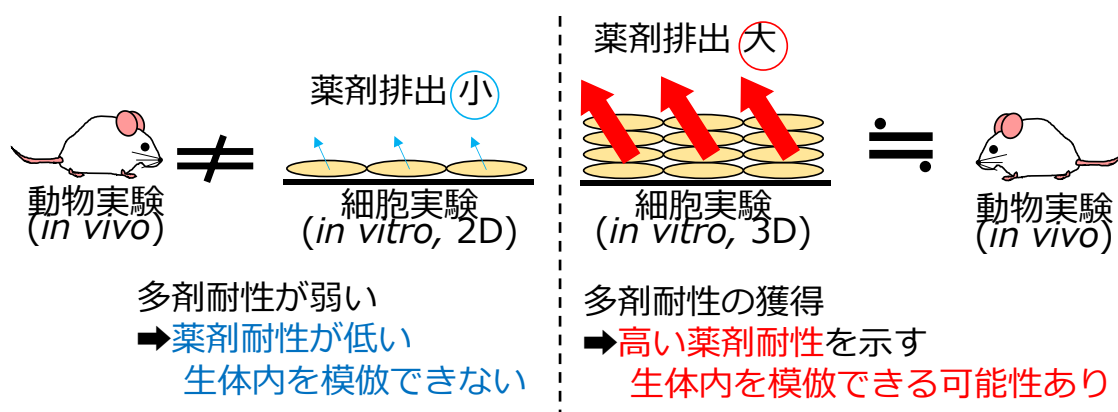


Fig.2-1 2D 培養と 3D 培養における生体模倣の可能性

2-2 実験方法

2-2-1 使用細胞および細胞増殖用培地の調製と滅菌

1) 使用細胞

ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞を理研バイオリソースセンターより購入したものを使用した。

2) 細胞増殖用培地

HepG2 細胞の培養は、増殖用培地として Minimum Essential Medium(MEM)に Table 2-1 に示す試薬を添加し、三角フラスコに超純水と共に加えてスターラーを用いて1時間程度攪拌させた後、無菌環境下で 0.22 μm フィルターにてろ過滅菌したものを使用した(以下 MEM 培地と呼ぶ)。実際の培養では、MEM 培地 90 %容量に対してウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS, Hyclone)を 10 %容量加えて培養した(MEM:FBS=9:1)。

Table 2-1 MEM 培地の組成

H ₂ O (超純水)	1 L
Minimum Essential Medium (MEM)	9.5 g/L (1 袋)
NaHCO ₃	2.2 g
HEPES	5.7 g
Penicillin	63 mg
Streptomycin	100 mg

2-2-2 使用試薬および器具の滅菌

1) 使用試薬

①細胞培養培地

Minimum Essential Medium (MEM)	GIBCO
炭酸水素ナトリウム<特級>(NaHCO ₃)	ナカライテスク
HEPES	DOJINDO
Penicillin	明治製菓
Streptomycin	明治製菓
Fetal Bovine Serum (FBS)	Hyclone

②細胞洗浄用：Ca, Mg free Phosphate buffer saline ; PBS(-) 調製用

塩化カリウム〈特級〉(KCl)	ナカライテスク
リン酸水素二ナトリウム・12水和物〈特級〉(Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O)	ナカライテスク
塩化ナトリウム〈特級〉(NaCl)	ナカライテスク
リン酸二水素カリウム〈特級〉(KH ₂ PO ₄)	ナカライテスク

③細胞分散

Trypsin	GIBCO
EDTA・2Na (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ ・2H ₂ O)	DOJINDO

④細胞計数用(色素排除法)

Trypan Blue	和光純薬株式会社
-------------	----------

⑤細胞凍結保存用

液体窒素	内村酸素
Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 〈特級〉 [(CH ₃) ₂ SO]	和光純薬株式会社

⑥器具洗浄用

次亜塩素酸ナトリウム(アンチホルミン) (NaClO)	ナカライテスク
洗浄液(Fine Clean CL)	東京硝子器械

⑦消毒用

20%グルコン酸クロロヘキシジン溶液	和光純薬株式会社
エチルアルコール〈一級〉(C ₂ H ₅ OH)	ナカライテスク

⑧消毒用

消毒用エタノール IP

健栄製薬株式会社

⑨抗がん剤 (Doxorubicin, DOX)

ドキソルビシン塩酸塩(MW: 579.99)

和光純薬株式会社

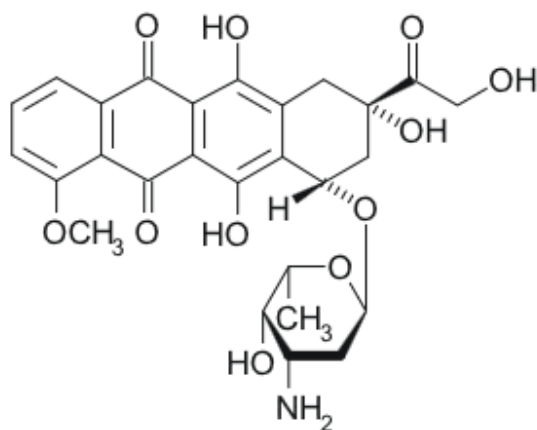


Fig. 2-2 DOX の構造式

⑩薬剤耐性克服薬(Verapamil, VRP)

ベラパミル塩酸塩 (MW: 454.602)

和光純薬株式会社

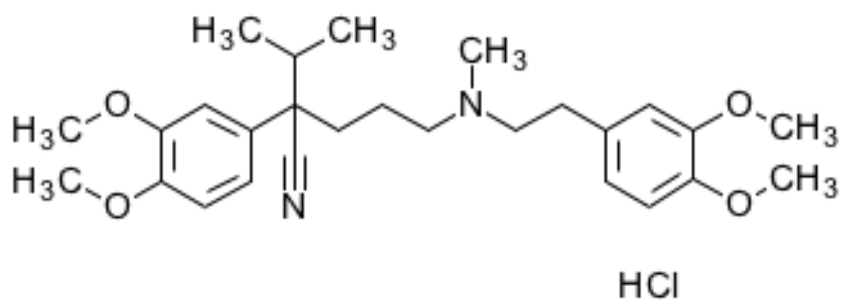


Fig. 2-3 VRP の構造式

⑪Cell Counting Kit-8

DOJINDO

⑫サンプル固定用

10%中性緩衝ホルマリン溶液

和光純薬株式会社

2) 使用器具

培養 dish (35mm, 60mm, 100mm)	BD FALCON
培養 plate (24 well, 96 well)	住友ベークライト株式会社
培養ピペット(1, 2, 5, 10, 20mL)	岩城硝子
パスツールピペット	岩城硝子
フタ付き培地瓶(30,50, 100, 200, 300, 500mL)	岩城硝子
フタ付き遠心管(30, 40 mL)	岩城硝子
スクリーバイアル瓶(9, 15, 20, 27mL)	岩城硝子
0.22 μ m 濾過滅菌フィルター(sterivex-SVGP 01050)	MILLIPORE
0.20 μ m 濾過滅菌フィルター(MILLEX SLFG 025LS)	MILLIPORE
0.22 μ m 濾過滅菌フィルター(MILLEX SLGS 033SS)	MILLIPORE
0.20 μ m 濾過滅菌フィルター(DISMIC-13cp020AS Cellulose Acetate)	ADVANTEC
ディスポーザブルシリンジ (1, 5, 10 mL)	TERUMO
テルモ注射針 (26, 27 G)	TERUMO
血球計算盤(Burker-Turk)	クライミング
カバーガラス	MATSUNAMI
計数カウンター	アズワン
セラムチューブ(1.2mL 用)	住友ベークライト株式会社
バイセル	日本フリーザー株式会社
Pipetman (10, 200, 1000 μ L)	GILSON
Finnpipette (10, 50, 200, 1000 μ L)	Thermo
8 連ピペット	Thermo
オートピペッター	Thermo
ディスポーザブル遠心管(15mL)	ビオラモ
ディスポーザブル遠心管(50mL)	Corning
ディスポーザブルピペット(5, 10, 25, 50mL)	Corning
キムワイブ	アズワン
キムタオル	アズワン
パラフィルム	アズワン
デュラシール	アズワン
石英角セル	アズワン
薬さじ	アズワン
パラピン	アズワン
シリコンチューブ	アズワン
ディスポーザブルबीカー	アズワン
ラッテクスグローブ(パウダーフリー)	日本ジェネティックス株式会社

3) 使用機器類

高圧蒸気滅菌機(HV110)	HIRAYAMA
バイオハザード対策用クラスⅡキャビネット(TYPE-A)	DALTON
簡易クリーンブース(PURE SPACE PS-100)	アズワン
倒立型顕微鏡(BH2-RFCA)	OLYMPUS
超低温フリーザ(MDF-392AT)	SANYO
CO ₂ インキュベーター(MCO-175)	SANYO
倒立型顕微鏡(TE300)	NIKON
恒温機ソフトインキュベーター(SLI-170D)	EYELA
pH メーター(MP-220)	METTLER TOLEDO
pH 校正液(錠剤; pH4, 7, 10)	アズワン
電子天秤(AB204-S)	METTLER TOLEDO
乾熱滅菌機(MOV-212F)	SANYO
定量送液ポンプ	EYELA
吸光度プレートリーダー	Molecular Devices
蛍光分光光度計(F-2000)	HITACHI

4) 滅菌方法

①乾熱滅菌

ガラスピペットはステンレスの滅菌缶に収納し、乾熱滅菌機中で 180℃、180 分間(昇熱時間 60 分、維持時間 120 分)滅菌した。

②高温、高圧滅菌(オートクレーブ)

フタ付き培地瓶、フタ付き遠心管、フタ付きサンプル瓶、マイクロピペット用チップ及び、乾熱滅菌が不可能な物は滅菌テープを貼り、アルミホイルで口を覆い、120℃で 45 分間(昇熱時間 30 分、維持時間 15 分)オートクレーブ滅菌した。滅菌時には超純水を 5 L 使用した。

③濾過滅菌

細胞培養用培地(MEM)、PBS(-)、0.05%Trypsin-EDTA は、定量送液ポンプを用いて、孔径 0.22 μm の濾過滅菌フィルター(sterivex-SVGP01050)で濾過滅菌を行った(送液の速さはフィルターから出る液の滴が見える程度)。その他、濾過滅菌が必要な試薬はディスポーザブルシリンジに充填させて、親水性の試薬は 0.22 μm フィルター(MILLEX SLGS 033SS)、疎水性の試薬は 0.20 μm フィルター(MILLEX SLFG 025LS)を用いて濾過滅菌を行った。

2-2-3 細胞培養に使用した試薬の調製と滅菌

①リン酸緩衝生理食塩水(Ca・Mg free Phosphate buffer saline: PBS(-))調製法

塩化ナトリウム(NaCl)8.00 g/L、リン酸水素二ナトリウム十二水和物($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.88 g/L、リン酸二水素カリウム(KH_2PO_4)0.20 g/L、塩化カリウム(KCl)0.2 g/L を精秤し、超純水(1L)に溶かし、約 3 時間静かに攪拌した。溶解後、0.22 μm フィルター(sterivex-SVGP 01050)により濾過滅菌を行った。

②0.05%Trypsin-EDTA 溶液の調製法

細胞剥離に使用する際の最終濃度は 0.05%Trypsin (0.5 g/L)、EDTA が 0.53 mM (0.1972872 g/L)であるため、40 倍濃度の 2%Trypsin-EDTA を調製してこれを原液とした。調製後この 2%Trypsin-EDTA 原液は 25 mL ずつ分注した後、 -80°C で保存した。

実験に使用した 0.05%Trypsin-EDTA は原液 25 mL に PBS(-)を 975 mL 加えて 1 時間攪拌した後、0.22 μm フィルター(sterivex-SVGP 01050)により濾過滅菌を行った。濾過滅菌後は -20°C に保存し、使用前に 4°C で保存した。

③0.3% (w/v)Trypan Blue 溶液の調製法

粉末のトリパンブルーを 0.3%になるように PBS(-)で溶解させ(一晚攪拌)、0.22 μm フィルター(MILLEX SLGS 033SS)により濾過滅菌を行った。

④DOX の調製 (Stock solution: 10 mM)

粉末の DOX を秤量し、滅菌水で 10 mM 濃度になるようにボルテックスおよびピペッティングにより溶解させた後、0.22 μm フィルター(MILLEX SLGS 033SS)でろ過滅菌して 100 μL ずつ小分けして -20°C で遮光して保存した。使用の際は、PBS(-)で希釈して使用した。

⑤VRP の調製 (Stock solution: 200 mM)

粉末の VRP を秤量し、DMSO で 200 mM 濃度になるようにボルテックスおよびピペッティングにより溶解させた後、0.22 μm フィルター(MILLEX SLFG 025LS)でろ過滅菌して 100 μL ずつ小分けして -20°C で遮光して保存した。使用の際は、PBS(-)で希釈して使用した。使用の際は、100 μM に希釈したため、DMSO の最終濃度は 0.05 %で使用した。

⑥70 %エタノール調製法

99.5 %エタノール 700 mL に超純水 300 mL 加えて調製した。

⑦ヒビテンアルコールの調製法

20%グルコン酸クロロヘキシジン溶液 5 mL を 70%エタノール 1 L に加えて調製した。

2-2-4 細胞の融解と凍結方法

1) 細胞の凍結方法

適当な量の血清入り培地を用意し、PBS(-)、0.05% Trypsin-EDTA とともに 37°C で保温した。培養ディッシュから、パスツールピペットを用いて、細胞を吸引しないように培地だけ吸引除去し、次に、培養培地と同量の PBS(-) で細胞を洗浄した後、PBS(-)のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するために、0.05% Trypsin-EDTA を加え、37°C で 3 分間インキュベーションした後、血清入り培地を加え Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面から細胞をピペッティングにより剥がした。これを遠心管に移し、1000 rpm で 3 分間遠心分離し、遠心後 0.05% Trypsin-EDTA を含んだ培地を吸引除去した。血清培地を沈降細胞の入った遠心管に加えて、よくピペッティングし、血球計算盤を用いて 0.3% Trypan Blue 溶液による色素排除法で懸濁液中の全細胞数(生細胞数+死細胞数)を計数した。計数後、生細胞数が 3.0×10^6 cells/mL になるように細胞懸濁液を残りの培地に分注し、予め氷中に保持しておいた 20 % DMSO(DMSO は室温で細胞に毒性を示すため温度が上がらないように注意が必要)の入った増殖用培地を、懸濁液と 1 : 1 で混合した(最終 DMSO 濃度 10%)。セラムチューブに懸濁液を 1mL 入れ、アンプルを -80°C で一晩静置し、その後に液体窒素(-210°C)中で保存した。

2) 細胞の融解方法

液体窒素中に保存してあるアンプルを取り出し、超純水で作った 37°C のぬるま湯の中に入れて、アンプル中の塊が溶け始めたら、すぐに安全キャビネットに移した。融解した細胞懸濁液を、約 10 倍量の培地に入れ、激しくピペッティングした。次に、1000 rpm で 3 分間遠心分離し、DMSO を含んだ培地を吸引除去した。その後、細胞塊が残っている遠心管に培地 10 mL を加えてピペッティングし、そこから無菌的に細胞懸濁液を採取し、血球計算盤を用いて 0.3% Trypan Blue 溶液による色素排除法で懸濁液中の生細胞数を計数した。計数後、播種密度が 5.0×10^4 cells/mL の濃度になるように、植え継ぎ用に用意した新しい培地に細胞懸濁液を分注し、よくピペッティングした懸濁液を、直径 100 mm の培養ディッシュに、10 mL ずつ播種した。

2-2-5 細胞の培養と継代および計数方法

1) 細胞増殖を目的とした継代

HepG2 細胞は増殖性があるため、播種後 6 日程度で継代を行った。継代の前準備として、適当な量の血清入り培地を用意し、PBS(-)、0.05% Trypsin-EDTA とともに 37°C で保温した。培養ディッシュからパスツールピペットを用いて、細胞を除去しないように培地だけを除去し、培養培地と同量の PBS(-) で細胞を洗浄した後、PBS(-) のみを吸引除去した。細胞を付着面から剥離するため Trypsin-EDTA を加え、37°C で 3 分間インキュベーションした後、血清入り培地を Trypsin-EDTA と同量加えて Trypsin の作用を止め、ディッシュ表面からピペッティングにより細胞を剥がした。これを遠心管に移し、1000 rpm で 3 分間遠心分離し、遠心後、上澄みを除去した。沈降細胞の入った遠心管に血清培地 1~2 mL を加えて、よくピペッティングし、その一部(25 μ L ほど)をマイクロチューブに移して無菌的に取り出し、血球計算盤を用いて 0.3% Trypan Blue 溶液による色素排除法で懸濁液中の全細胞数(生細胞数+死細胞数)を計数した。計数後、培養ディッシュ 1 枚あたり播種密度が 5.0×10^4 cells/mL になるように、継代用に用意した新しい培地に細胞懸濁液を必要量分注し、よくピペッティングした。この細胞懸濁液を直径 100 mm の培養ディッシュに 10 mL 播種した。培養ディッシュは、37°C、CO₂ 濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。

2) 細胞の計数法(色素排除法)

細胞懸濁液をピペットマンで取り、マイクロチューブに入れ、0.3% Trypan Blue 溶液を加えて希釈し、よくピペッティングした。その後、血球計算盤に流し込み、顕微鏡の対物レンズ 10 倍で、1mm×1mm の区画内の染色されなかった細胞数(生細胞数)と染色された細胞数(死細胞)を分けて計数を行った。以下に細胞計数に使用した計算式を示した。

$$\frac{\text{カウントした総生細胞数(cells)}}{\text{カウントした区画数} \times 10^{-4}(\text{mL}) \times \text{トリパンブルーによる希釈倍率}} = \text{細胞密度(cells/mL)}$$

2-2-6 Cellbed®の作製方法および特徴

1) 作製方法、材質

Cellbed®は、エレクトロスピンニング法により作製された高純度シリカファイバーからなる三次元培養担体である。

2) Cellbed®の特徴

Cellbed®は直径約 1 μm の生体適合性の高いシリカファイバーから成る不織布である。その重量は単位面積当たり 8 g/m^2 で、繊維径が 7~8 μm で 95%以上という高い空隙率を保持しており、広い表面積を持つことからより多くの細胞を保持するのに適している。また、化学的に安定性の高いシリカ 100%で構成されているため、培養担体の取り扱いが非常に容易で、なお且つ細胞の培養に悪影響を与えないという特徴を持つ。そして、Cellbed®はこれまでに種々のがん細胞やヒト成人肝細胞を積層させて三次元培養を可能としている⁸⁰⁻⁸³。

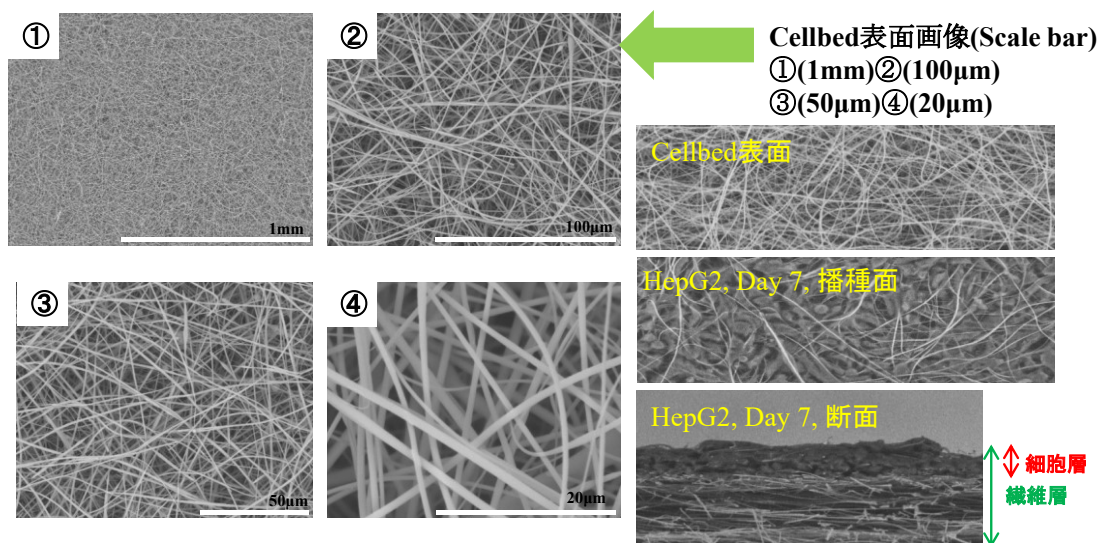


Fig.2-4 三次元培養担体 Cellbed®

2-2-7 Cellbed[®]の実験前処理および HepG2 細胞の培養

1) Cellbed[®]の実験前処理

安全キャビネット内で袋からプレート、担体を取り出す。担体をピンセットで個別包装から取り出し、24 well plate の well に落とし込み使用する (Cellbed[®] 96 well plate は元々 Cellbed[®] が細胞培養プレートに挿入されているものを使用)。培養担体の入った well に 70%エタノールを使用培地量と同量 well の壁面を伝わせながら添加した。(※このときチップの先端で担体を傷つけないよう注意する。)プレートを軽く揺すり、担体にエタノールが浸透したことを確認する。well 壁面にチップを当て、底に向かってゆっくりスライドさせながら 70%エタノールを除去した。その後、使用培地量の 1.5 倍の PBS(-)を添加し、洗浄した。この一連の手順を 2 回行った。

2) HepG2細胞の培養

細胞の播種は 2-2-5 の 1)の細胞増殖を目的とした継代の遠心操作まで同様にを行った。2-2-7 の 1)の実験前処理を行った Cellbed[®] 24 well plate に 3.0×10^5 cell/well で播種し(Cellbed[®] 96 well plate の場合は播種密度 5.0×10^4 cell/well)、37°C、CO₂ 濃度 5.0%、水蒸気飽和に保たれたインキュベーターに入れて、細胞を培養した。その後、48h ごとに増殖用培地 MEM で培地交換を行い、7 日間培養を行った。

2-2-8 HepG2 細胞に対する抗がん剤(Doxorubicin)の 50%増殖抑制試験

1) WST-8 assay の原理

Cell Counting Kit-8(WST-8) の原理図を Fig. 2-5 、 Fig. 2-6 に示した。WST-8(2-[2-methoxy-4-nitrophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-[2,4-disulfohenyl]-2H-5-tetrazolium, Monosodium salt)は、生細胞内のミトコンドリア等に存在する脱水素酵素(dehydrogenase)によって WST-8 Formazan に還元される。生細胞数と WST-8 Formazan の量は直線的な比例関係にあるので、WST-8 Formazan の吸光度($\lambda=460\text{nm}$)から、下記の式により細胞増殖抑制率を求めることが出来る。

$$\text{細胞増殖抑制率(\%)} = [1 - (A_{\text{mean}}/A_{\text{control}})] \times 100$$

A_{mean} : DOX が存在する条件における WST-8 Formazan の吸光度

A_{control} : DOX が存在しない条件における WST-8 Formazan の吸光度

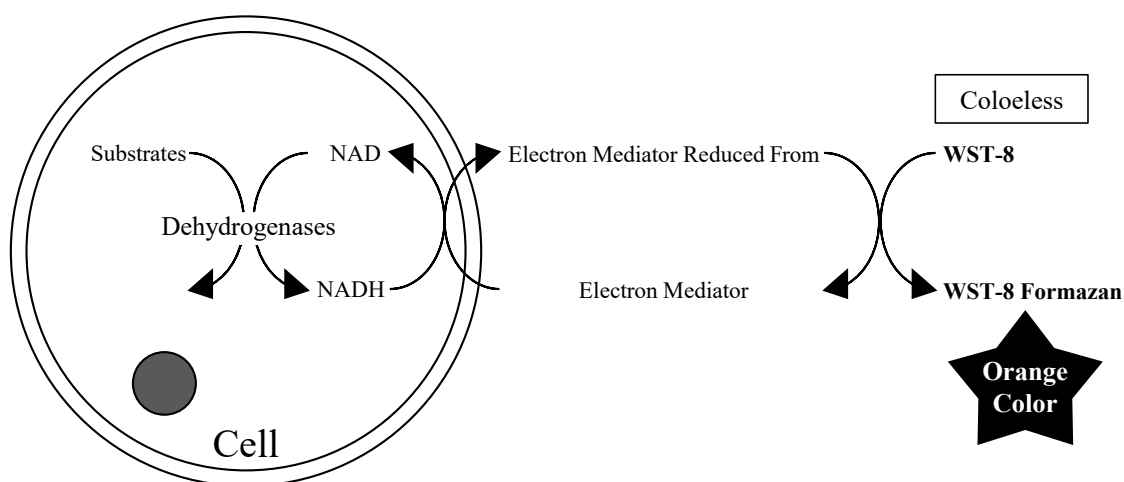


Fig.2-5 Cell Counting Kit-8 の原理

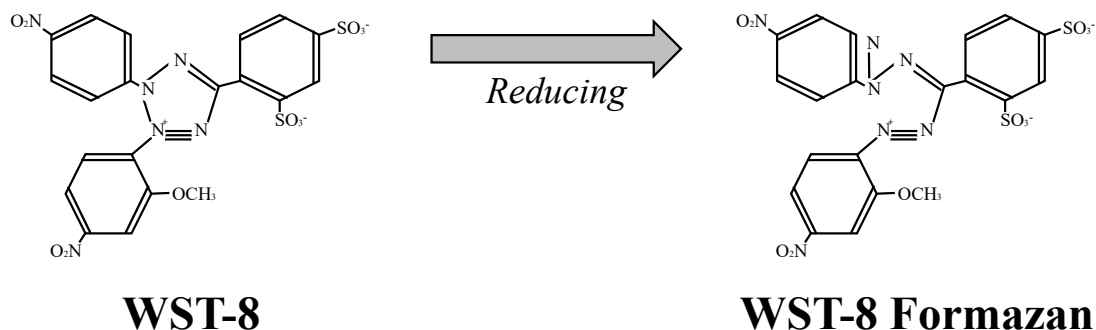


Fig.2-6 WST-8 の構造式

2) 培養条件

monolayer 培養では、細胞を細胞培養用マルチプレート 96 well に 2000 cell/well で播種し、Cellbed[®]培養は、Cellbed[®] 96 well plate に 5.0×10^4 cell/well で播種を行い、前培養を行った。Monolayer 培養及び Cellbed[®]培養の前培養はともに7日間培養とした。前培養後、DOX(0.1 μ M~100 μ M)及び 100 μ M Verapamil を添加し、48 時間処理後、培養培地の吸引除去を行い、新鮮培地：WST-8=180 μ L : 20 μ L を各 well へ添加し、反応時間 30 min で上澄みを 100 μ L/well 回収した。回収した上澄みを測定用の空の 96 well multi plate へ移し、吸光度の測定を行った。50%増殖抑制濃度(50% inhibitory concentration: IC₅₀)は、WST-8 assay により算出した細胞増殖抑制率から求めた。

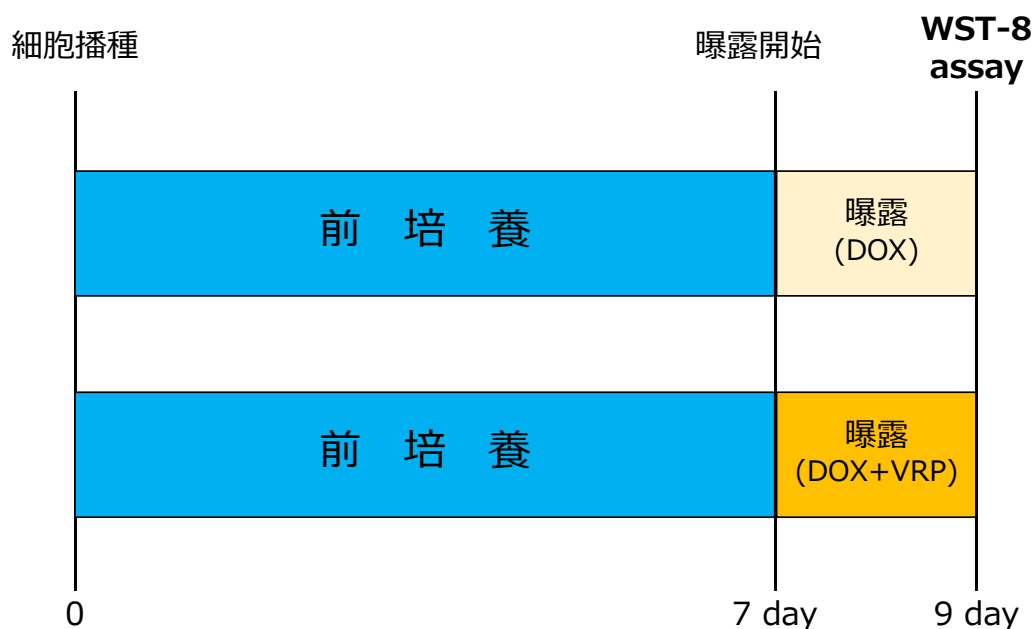


Fig.2-7 WST-8 assay における細胞培養スケジュール

2-2-9 HepG2 細胞に対する抗がん剤(Doxorubicin)の排出活性測定法

①細胞の培養と細胞数の計測

細胞の播種は 24 well plate に、3D (Cellbed)培養の場合は 3.0×10^5 cells/well (0.5 mL)で行い、7 日間培養を行った。細胞播種後、培地交換は 2 日に 1 回行った。培養 7 日目に DOX の排出活性測定を行い、その後に WST-8 assay によって well あたりの細胞数を算出した。

WST-8 assay による細胞数の算出にあたり、事前に検量線を作製した。検量線は HepG2 細胞を monolayer で播種密度の条件をいくつか用意して培養し、WST-8 assay による吸光度とトリパンブルー色素排除法にて細胞数を実際に計数することで検量線を作製した。

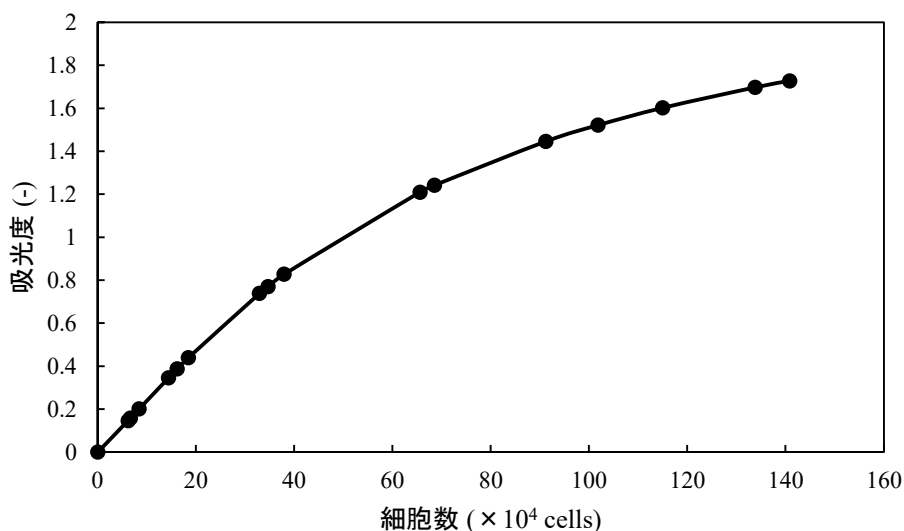


Fig.2-8 WST-8 による細胞数の検量線

②DOX の排出活性測定

既存の培地を除去し、DOX 50 μ M 含有培地(90% MEM: 10% FBS, 1% NEAA)を 24 well plate の 1 well あたりに 500 μ L ずつ添加し、1 hr 反応を行った(5% CO₂ インキュベーター内)。反応後、5% CO₂ インキュベーターから細胞を取り出して、PBS(-)で手早く洗浄した。洗浄後、VRP 100 μ M 含有培地を各 well に 600 μ L 添加して、30 分ごとに全量(約 600 μ L)回収した。なお、VRP 100 μ M 含有培地を入れてから 180 分まで(0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180 分)サンプリングを行い、その間は、排出された DOX が細胞表面に蓄積しないようにするため、インキュベーター内で振とう培養機を用いて振とうした。また、VRP を含まない通常の MEM 培地の場合も同様に行った。

測定は、石英セルに 500 μ L のサンプルを入れ、分光蛍光光度計(F-2000)により Ex= 448 nm、Em= 562 nm で、それぞれのサンプルを 5 回測定した。また、蛍光を測定する際に MEM 培地のフェノールレッドの色素の影響や細胞および Cellbed 存在下での影響が考えられるため、0 min (測定用培地を入れて直ぐ抜いたもの)を Blank として測定して、サンプルの蛍光量から差を引いた値を DOX の蛍光量とした。また、蛍光量から DOX の量を算出し、さらに細胞あたりの DOX 排出量を調べるため、サンプリングした well を洗浄して WST-8 assay を実施した。

2-2-10 使用した実験動物(高度免疫不全マウス)

実験に使用したマウスは、高度免疫不全マウスである NOD/ Scid/ Jak3-KO(NOJ)マウスの雌の 5 週齢を用いた。NOJ マウスは、NOD マウスに由来するマクロファージと樹状細胞の機能異常と補体欠如、Scid マウス由来の成熟 T 細胞・B 細胞・NKT 細胞欠損、Jak3 欠損マウス由来の NK 細胞欠損を併せ持つ複合型の免疫不全を示す^{83,84)}。

また、マウスは恒温恒室環境下(室温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、照明時間 12 時間)のクリーンルーム内にて飼育し、飲み水および餌はオートクレーブ滅菌したものを自由に摂取させた。



Fig.2-9 NOD/ Scid/ Jak3-KO(NOJ)マウス

2-2-11 肝がん細胞皮下移植モデルマウスの作製および治療方法

①肝がん細胞皮下移植モデルマウスの作製

クリーンルーム内で HepG2 細胞を MEM 培地(10 % FBS, 1 % NEAA 含有)で必要細胞数以上に達するように培養し、細胞を回収・遠心後に PBS(-)で懸濁した。懸濁後細胞計数を行い、細胞密度 $5.0 \times 10^7 \text{ cells} / 100 \mu\text{L}$ になるように細胞数を調整した。細胞数を調整後、マトリゲルと混合(900 μL : 100 μL = マトリゲル: 細胞懸濁液($5.0 \times 10^7 \text{ cells}$))し、速やかに動物実験棟内のクリーンルームへ運搬した(水中保存)。このとき、マトリゲルと細胞懸濁液を混合した溶液中の細胞数は、 $5.0 \times 10^7 \text{ cells} / \text{mL}$ とした。

実験動物である NOJ マウスの後背部をバリカンと除毛剤にて除毛し、マウスの右後背部にマトリゲルと混合した細胞懸濁液を 1 検体あたり 100 μL ($5.0 \times 10^6 \text{ cells} / \text{body}$)で針付きシリンジを用いて NOJ マウスへ皮下注射により移植を行った。皮下移植後は、体重の測定とノギスを用いて腫瘍の長径と短径のサイズを測定した(Fig. 2-10)。また、測定した腫瘍の長径と短径より以下の式を用いて腫瘍体積を算出した。さらに、細胞移植後 28 日目に麻酔下で腫瘍の摘出を行い、腫瘍の重量を測定した。

(長径×短径×短径)÷2 = 体積 …体積の算出

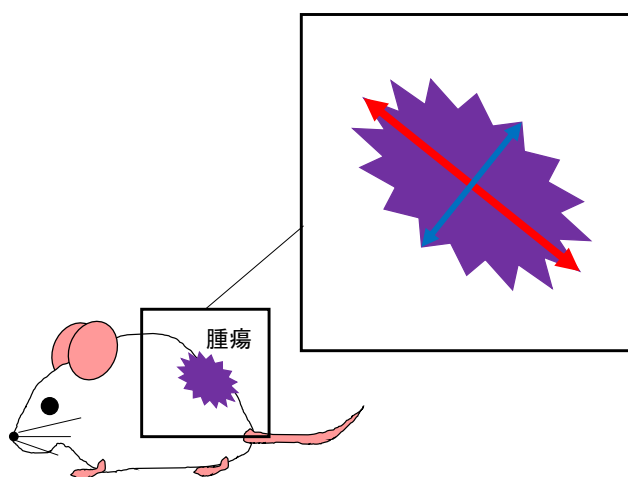


Fig.2-10 担がんモデルマウスの腫瘍体積測定
(赤: 長径、青: 短径)

②肝がん細胞皮下移植モデルマウスにおける

抗がん剤(DOX)および薬剤耐性克服薬(VRP)の治療効果

細胞移植後、全28日間の中で7, 14, 21日目に薬剤の投与を行った(Fig. 2-10)。条件としては、Table 2-2に示した。VRPを投与する場合は腹腔内投与(i.p.)で25 mg/kgの濃度でマウスに投与した(VRPを投与しない条件では生理食塩水を投与した)。また、DOXを投与する場合は尾静脈投与(i.v.)で1 mg/kgの濃度でマウスに投与した(DOXを投与しない条件では生理食塩水を投与した)。なお、DOX投与の濃度に関しては、DOX投与のみで1, 3, 5 mg/kgの条件を実施した。なお、VRPおよびDOXの投与濃度については文献を参考とした⁸⁵⁻⁹⁰⁾。

Table 2-2 薬剤投与の条件

群	条件	i.p.	i.v.
1	未治療群(Control)	生理食塩水	生理食塩水
2	VRP投与群	VRP 25 mg/kg	生理食塩水
3	DOX投与群	生理食塩水	DOX 1 mg/kg
4	VRP+DOX併用群	VRP 25 mg/kg	DOX 1 mg/kg

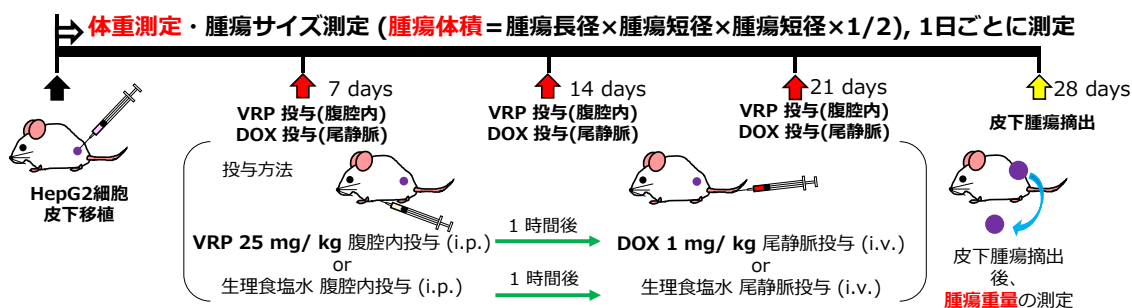


Fig.2-10 細胞移植後の薬剤投与

2-2-12 *In vitro* と *in vivo* における MDR1 の免疫染色

ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)と MDR1 の免疫染色は、日本バイリン株式会社 に依頼した。3D 培養した細胞を含む Cellbed(培養期間は 9 日間)と細胞移植後 28 日目の腫瘍を 10 %中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、それぞれのサンプルをパラフィン包埋後にマイクロトームを用いて切片を作製した。これらの切片を HE 染色および MDR1 を抗原とする免疫染色を実施(IgG Isotype 条件を含む)し、光学顕微鏡で観察を行った。

2-3 実験結果

2-3-1 二次元培養および三次元培養における DOX の IC₅₀ 値

肝がん細胞(HepG2 細胞)に対する DOX の IC₅₀ 値を算出するために、WST-8 assay を行った。条件は、二次元培養(2D 培養)と三次元培養(3D 培養, Cellbed 培養)において、VRP の存在下(VRP+)および非存在下(VRP-)で比較し、算出された IC₅₀ 値を Table 2-3 に示した。

結果として、VRP の非存在下での DOX に対する IC₅₀ 値は、2D 培養で 5.18 μM である一方で 3D 培養では 55.7 μM を示した。さらに、3D 培養による DOX の IC₅₀ 値は、既存の薬剤耐性克服薬である VRP の細胞増殖に影響を与えない濃度 (100 μM, Fig. 2-12)での処理により 1.0 μM に減少した。同様に、2D 培養でも VRP 非存在下で IC₅₀ 値が 0.6 μM に減少したが、3D 培養では 2D 培養に比べその現象効果が顕著であった。これらの結果は、HepG2 細胞において、MDR に依存した薬剤耐性が VRP により克服されたことを示している。以上の結果より、シリカ系ナノファイバーである Cellbed を用いた 3D 培養は、*in vitro* において薬剤耐性克服現象を再現したことが示唆された。

Table 2-3 VRP 処理が HepG2 細胞における DOX の IC₅₀ 値に与える影響

Culture	DOX IC ₅₀ (μM)
2D VRP (-)	5.18 ± 1.76
2D VRP (+)	0.60 ± 0.08
3D VRP (-)	55.7 ± 3.87
3D VRP (+)	1.00 ± 0.07

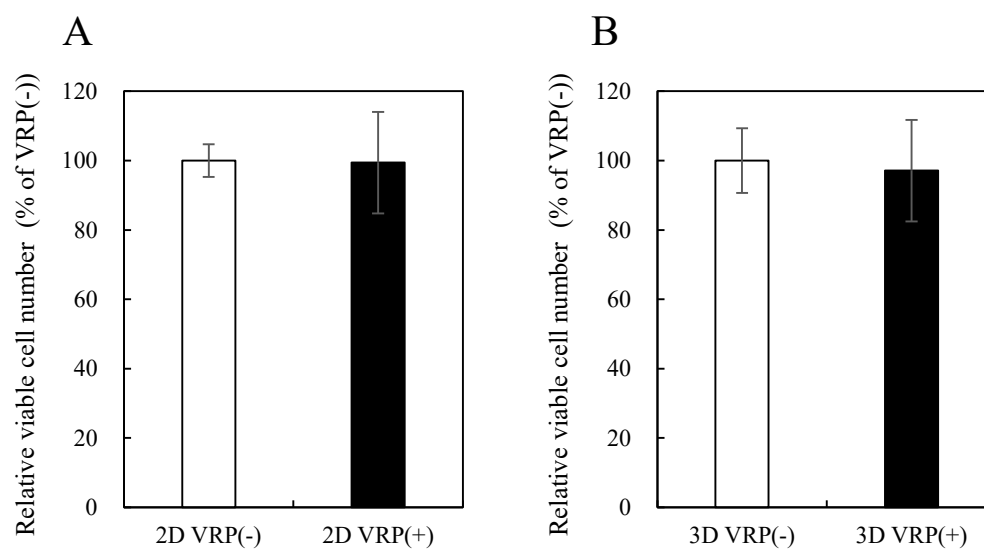


Fig. 2-12 VRP 処理が細胞増殖に与える影響

- (A) 2D 培養した際の VRP(-) の生細胞数を 100 % とした場合の相対細胞数 (n=4)
 (B) 3D 培養した際の VRP(-) の生細胞数を 100 % とした場合の相対細胞数 (n=4)

2-3-2 3D 培養による DOX の細胞外排出の測定

これまでに、先行研究として 2D 培養では薬剤耐性に関与する MDR1 の発現が低く、3D 培養することで MDR1 の発現が上昇することを見出している^{73,82)}。そこで、次に三次元培養(Cellbed 培養)における HepG2 細胞からの抗がん剤(DOX) 排出活性に対する薬剤耐性克服薬(VRP)の効果について検討を行った。

DOX 50 μ M を含む培地で 1 時間培養し、その後に VRP 存在下または非存在下で経時的な DOX の排出活性を測定した結果を Fig.2-13 に示した。測定開始 30 分後より、VRP 存在下では DOX の細胞外への排出が明らかに阻害され、VRP 非存在下ではほぼ時間依存的に DOX の排出が増加していた。

これらの結果が示すことは、VRP 存在下での Cellbed を用いた 3D 培養では、MDR1 による DOX の排出活性が VRP により阻害されたことを示唆していると考えられる。

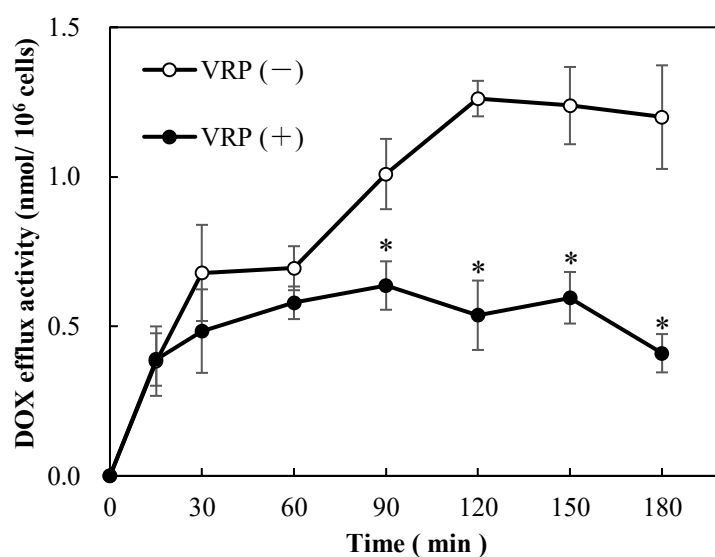


Fig.2-13 VRP 処理が HepG2 細胞の DOX 排出活性に与える影響
±S.D. (n=5), * $p < 0.05$ (vs. VRP(-))

2-3-3 肝がん細胞皮下移植モデルマウスの作製

HepG2 細胞を NOJ マウスに 500×10^6 cells/body で皮下移植を行い、体重変化(Fig.2-14)と腫瘍体積の変化(Fig.2-15)を記録した。皮下移植を行い、7 日間は移植した箇所で腫瘍は定着しておらず、腫瘍の顕著な体積増加は認められなかった。しかし、7 日目以降から腫瘍体積は増加していき、移植 13 日目あたりからマウスにできた腫瘍が視覚的にも大きくなった一方で、体重が減少する傾向が見られた。その後、マウスは衰弱しているように見られたが、移植 29 日生存して摂水・摂食障害は認められなかった。また、細胞移植後 29 日目(最終日)の腫瘍体積は平均 2143.5 mm^3 、摘出した腫瘍の重量は平均 1.16 g であり(Fig.2-16)、極端なバラつきは認められなかった(Fig.2-17)。

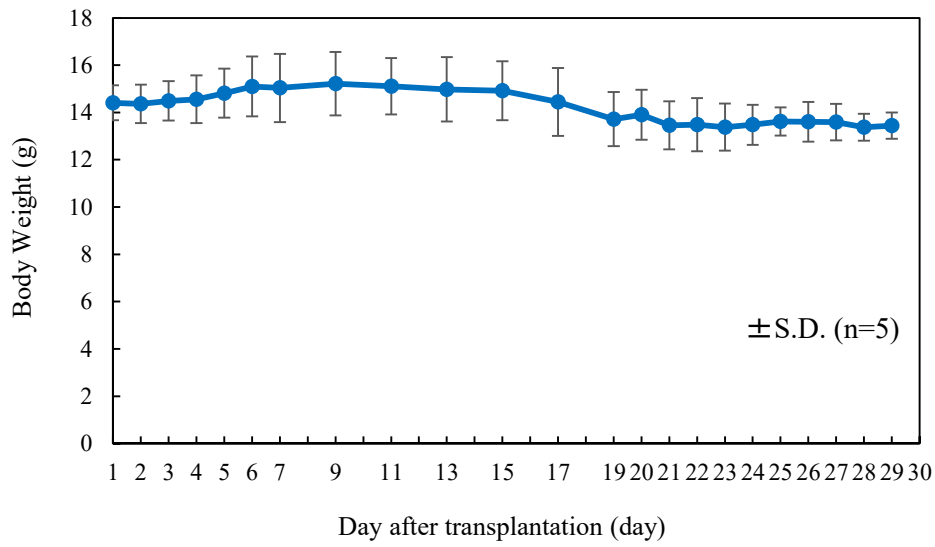


Fig.2-14 肝がん皮下移植モデルマウスの体重変化

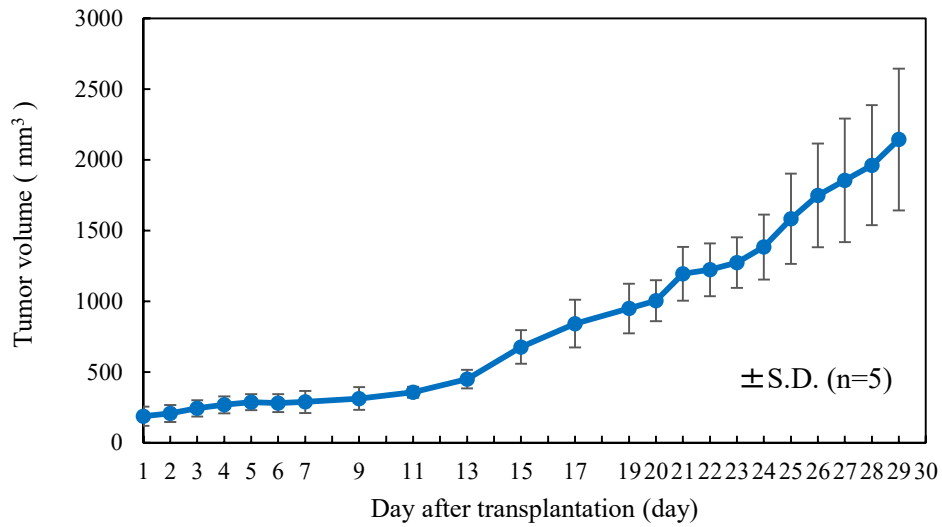


Fig.2-15 肝がん皮下移植モデルマウスの腫瘍体積の推移

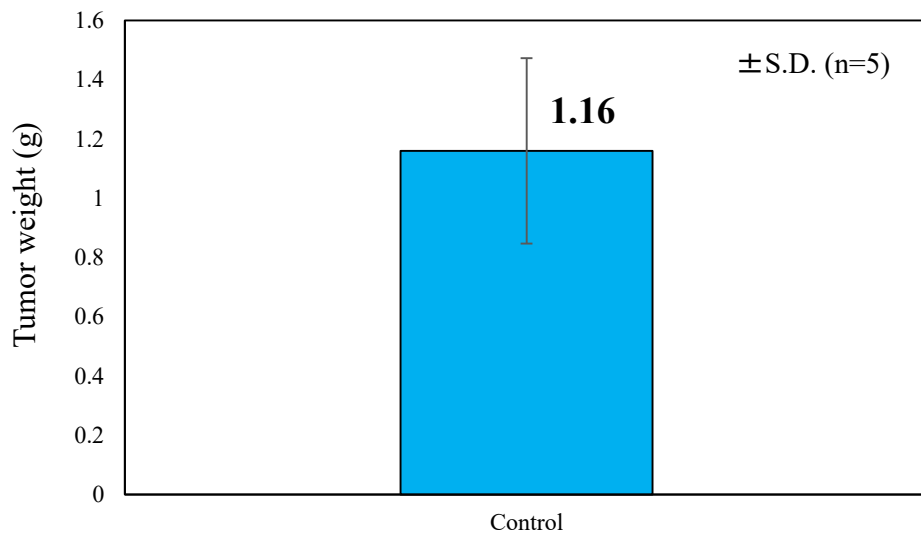


Fig.2-16 肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍重量

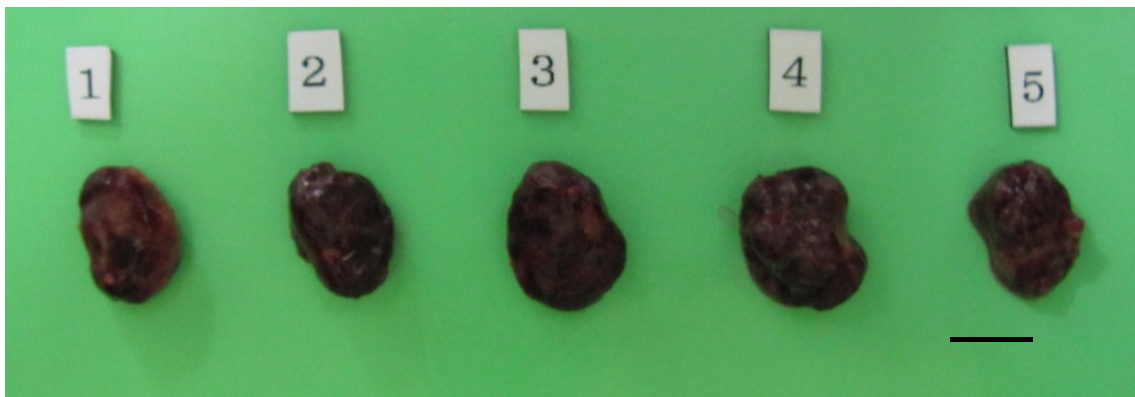


Fig.2-17 肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍

2-3-4 肝がん細胞皮下移植モデルマウスにおける DOX 投与濃度の条件設定

HepG2 細胞を NOJ マウスに皮下移植した後の体重変化を Fig. 2-18 に示した。また、皮下移植を行っていない Normal の条件(週 1 の生理食塩水の尾静脈注射は行った)も Fig.2-18 の紫色の線で示した。体重変化は、Control と DOX 1 mg/kg の条件ではほぼ同じ体重推移となっており、摂食摂水障害も見られなかった。一方で、DOX 3 mg/kg および DOX 5 mg/kg では DOX 投与後に顕著な体重減少が確認され、有意差検定(T 検定, 両側検定)を行ったところ「Control vs. DOX 3mg/kg」では細胞移植後 20 日目以降の一部(20 days, 22~26 days)で有意差が見られた。また、「Control vs. DOX 5mg/kg」では細胞移植後 9 日目以降全てにおいて Control と比べて有意に体重が減少したことが示されており、細胞移植 23 日目にはマウスの 1 匹が衰弱死していた。さらに、両条件ではマウスの体重減少と共に、摂食摂水障害が見られた。

HepG2 細胞を NOJ マウスに皮下移植した後の腫瘍体積の変化を Fig.2-19 に示した。皮下移植後 28 日目において、腫瘍体積の平均は Control > DOX 1mg/kg > DOX 3mg/kg > DOX 5mg/kg、となっており、DOX の濃度依存的に腫瘍体積の増加を抑制していた。また、Control と各 DOX 濃度での有意差検定(T 検定, 両側検定)を行ったところ、「Control vs. DOX 1 mg/kg」および「Control vs. DOX 3 mg/kg」では移植後 28 日目まで有意な差が見られなかった。一方で、「Control vs. DOX 5 mg/kg」において、移植後 17 日目以降で有意な差が見られ、DOX 単体で顕著な腫瘍体積の増加を抑制していた。また、DOX 5mg/kg の条件は細胞移植後 23 日目に衰弱死していたため、以降は n=2 で示している。

次に、細胞移植 28 日目に摘出を行った腫瘍を Fig.2-20 に示し、それらの重量の平均値を Fig.2-21 に示した。腫瘍重量の平均を Control(DOX 未投与)と DOX 投与群で比較するため、有意差検定(T 検定, 両側検定)を行った結果、「Control vs. DOX 3mg/kg」および「Control vs. DOX 5mg/kg」で有意な差があることが示された。このことより、DOX 3mg/kg および 5mg/kg では DOX のみで腫瘍の増殖抑制効果があることが示された。一方、両条件では、体重減少という副作用があることも判明した。

薬剤耐性克服薬による薬剤耐性克服現象を観測するためには、DOX 単独で薬毒性(副作用：体重変化)を示さず、治療効果がない(薬剤耐性の発現)条件が望ましい。そのため、以上の結果より、VRP を用いた薬剤耐性克服現象の試験での DOX 濃度は 1 mg/kg が適切であることが示された。

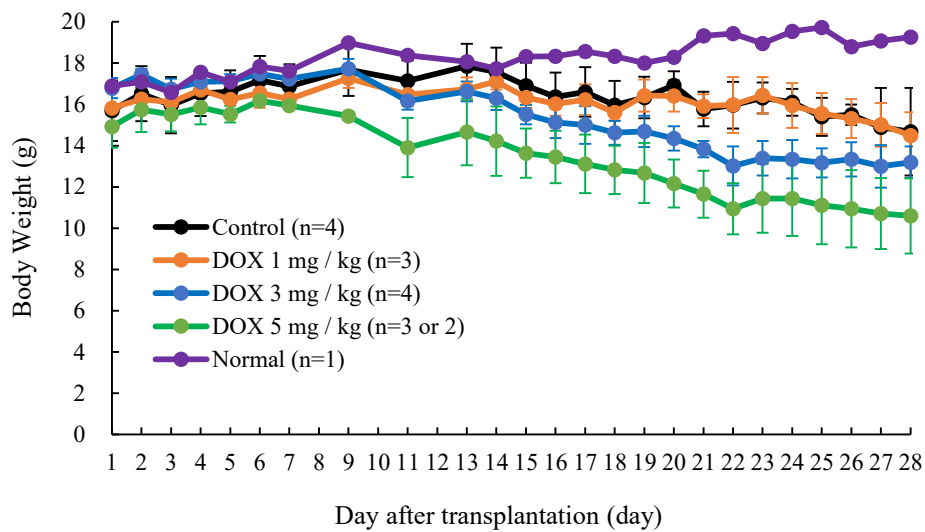


Fig.2-18 肝がん皮下移植モデルマウスに DOX を投与した際の体重変化

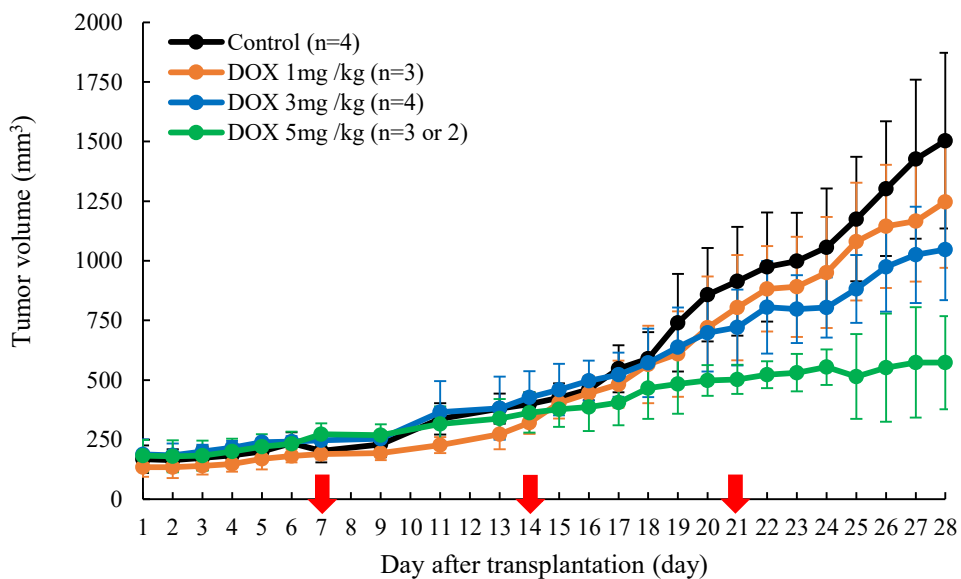


Fig.2-19 肝がん皮下移植モデルマウスに DOX を投与した際の腫瘍体積変化

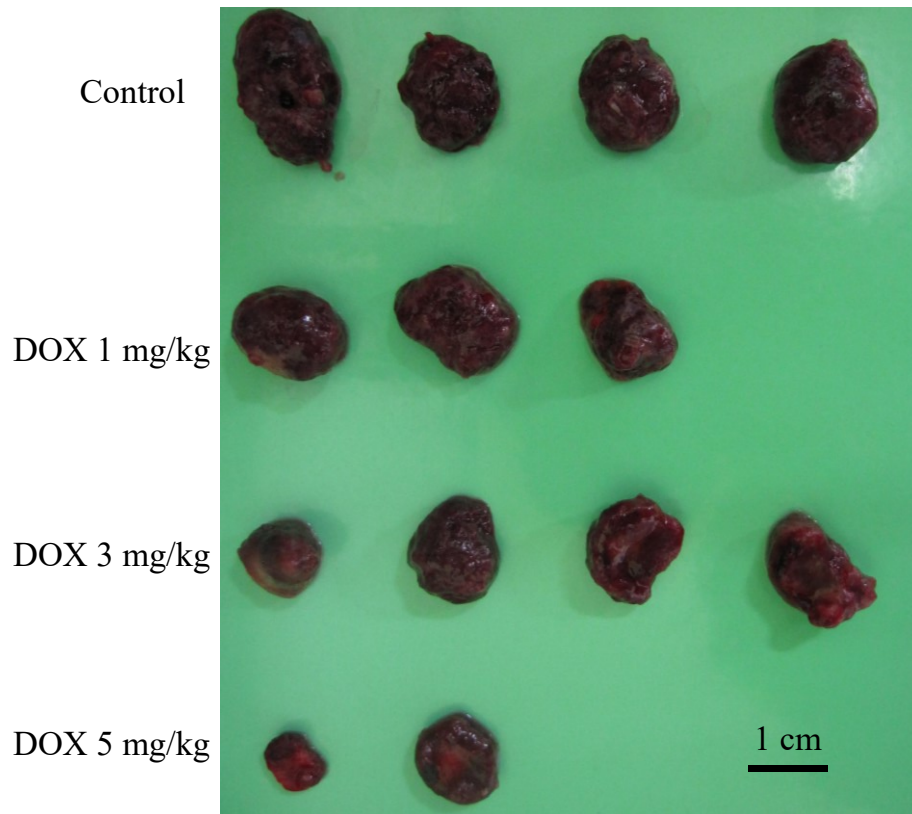


Fig.2-20 DOX を投与した肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍

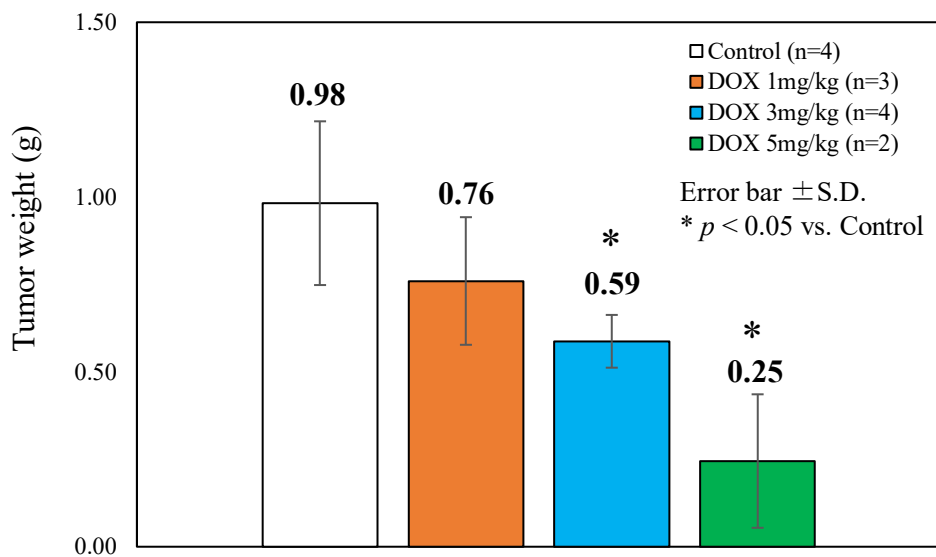


Fig.2-21 DOX を投与した肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍重量

2-3-5 担がんモデルマウスにおける DOX の抗腫瘍活性評価 および VRP 併用による薬剤耐性克服の評価

細胞移植後の 28 日間でのマウスの体重変化を Fig2-22 に示した。担がんモデルマウスにおいて、Control(未治療群)、VRP(25 mg/kg)投与群、DOX(1 mg/kg)投与群、VRP+DOX 投与群の全 4 群は、細胞移植後 28 日間で体重が徐々に減少しており、これは Control と薬剤投与群との有意差は無いため、薬剤による重篤な副作用を示さないことを示している。

次に、DOX および VRP の治療効果を調べるため、細胞移植後の腫瘍体積の変化を Fig.2-23 に示した。Control の平均腫瘍体積は $1564.9 \pm 370.5 \text{ mm}^3$ であり、VRP 投与群の $1571.5 \pm 390.5 \text{ mm}^3$ 、DOX 投与群の $1562.6 \pm 594.3 \text{ mm}^3$ と比較しても有意差は見られなかった。しかしながら、VRP+DOX 投与群では $942.4 \pm 264.4 \text{ mm}^3$ を示し、腫瘍体積の顕著な減少が観察され、Control と比べて腫瘍体積は 40%減少した。

最後に、細胞移植 28 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍重量を測定した。摘出した腫瘍を Fig.2-24 に示し、重量を Fig.2-25 に示した。摘出した腫瘍の観察からも、VRP+DOX 投与群は他の条件より腫瘍が小さいことが示された。また、実際の腫瘍重量は Control($1.55 \text{ g} \pm 0.36 \text{ g}$)と比較して VRP+DOX 投与群($1.07 \text{ g} \pm 0.26 \text{ g}$)は有意に腫瘍重量が減少していた。

以上の結果は、DOX 単剤では薬剤耐性を示して抗腫瘍活性が得られないのに対して、薬剤耐性克服薬である VRP と組み合わせることで抗腫瘍活性が得られたことを示している。

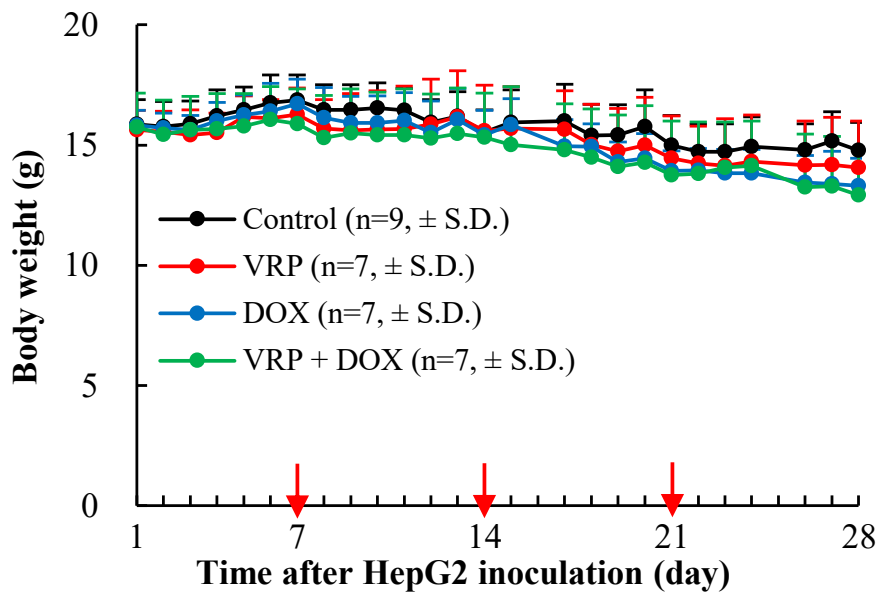


Fig.2-22 薬剤投与による肝がん皮下移植モデルマウスの体重変化

Dose: VRP 25 mg/kg, DOX 1 mg/kg

薬剤の投与日を赤矢印で示した

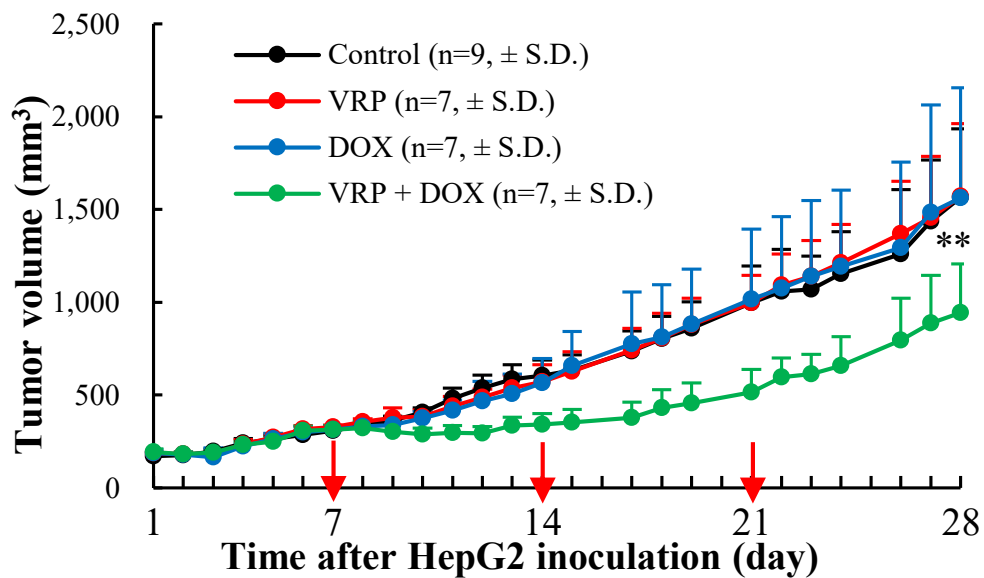


Fig.2-23 薬剤投与による肝がん皮下移植モデルマウスの腫瘍体積変化

Dose: VRP 25 mg/kg, DOX 1 mg/kg

薬剤の投与日を赤矢印で示した

** $p < 0.01$ (vs. Control)

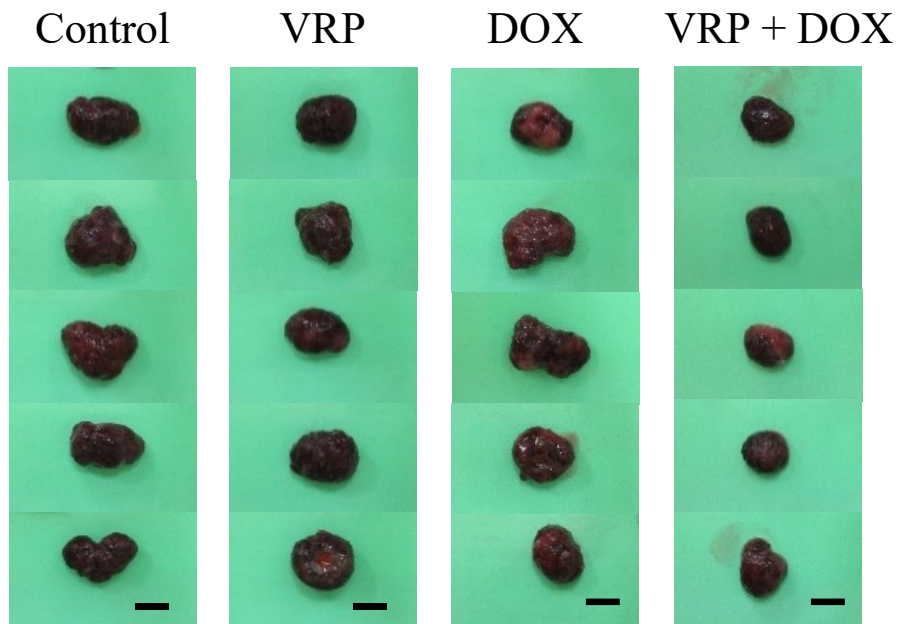


Fig.2-24 薬剤投与した肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍
Scale bars: 1 cm

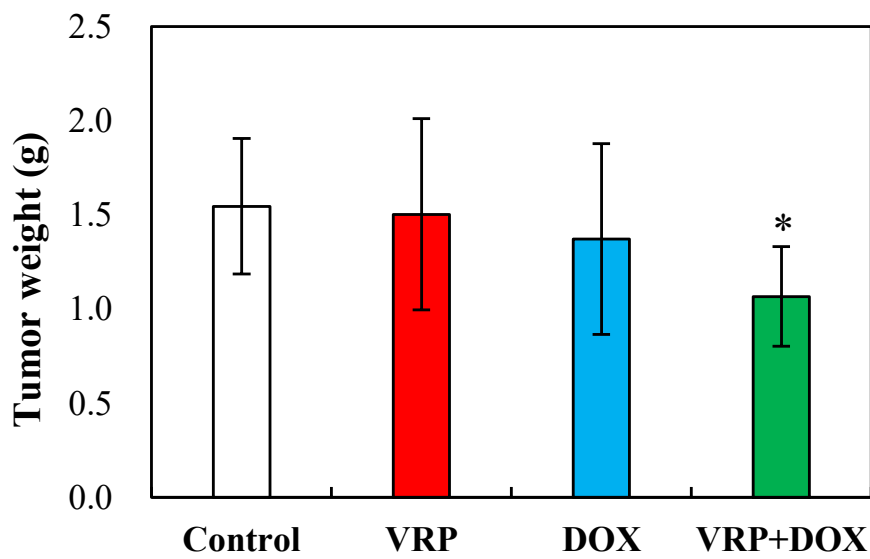


Fig.2-25 薬剤投与した肝がん皮下移植モデルマウスから摘出した腫瘍重量の
Dose: VRP 25 mg/kg, DOX 1 mg/kg
* $p < 0.05$ (vs. Control)

2-3-6 *In vitro* と *in vivo* における MDR1 発現の比較

免疫組織染色により、*in vitro*(3D 培養; Cellbed 培養)と *in vivo*(腫瘍)における MDR1 の発現について評価を行い、結果を Fig.2-26 に示した。ヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)の結果より、両サンプル中の細胞は生存していることが示され、*in vitro* の Cellbed 上では 3~4 つの細胞層が形成されていることが明らかとなった(A, E)。IgG Isotype 染色は、両サンプルにおいて MDR1 の免疫染色の非特異的バックグラウンドを示している(B, F)。そして、MDR1 染色により、MDR1 陽性細胞は両サンプルにおいて明確に観察された(C, G)。さらに、MDR1 は細胞と細胞の接着点に部分的に局在していたことが判明した(D, H の赤矢印、Fig.2-27)。MDR1 は生体内では細胞と細胞の間に形成される毛細胆管に発現されることから、これらの結果は、Cellbed を用いた 3D 培養(*in vitro*) が *in vivo* の微小環境を再現している可能性を示している。

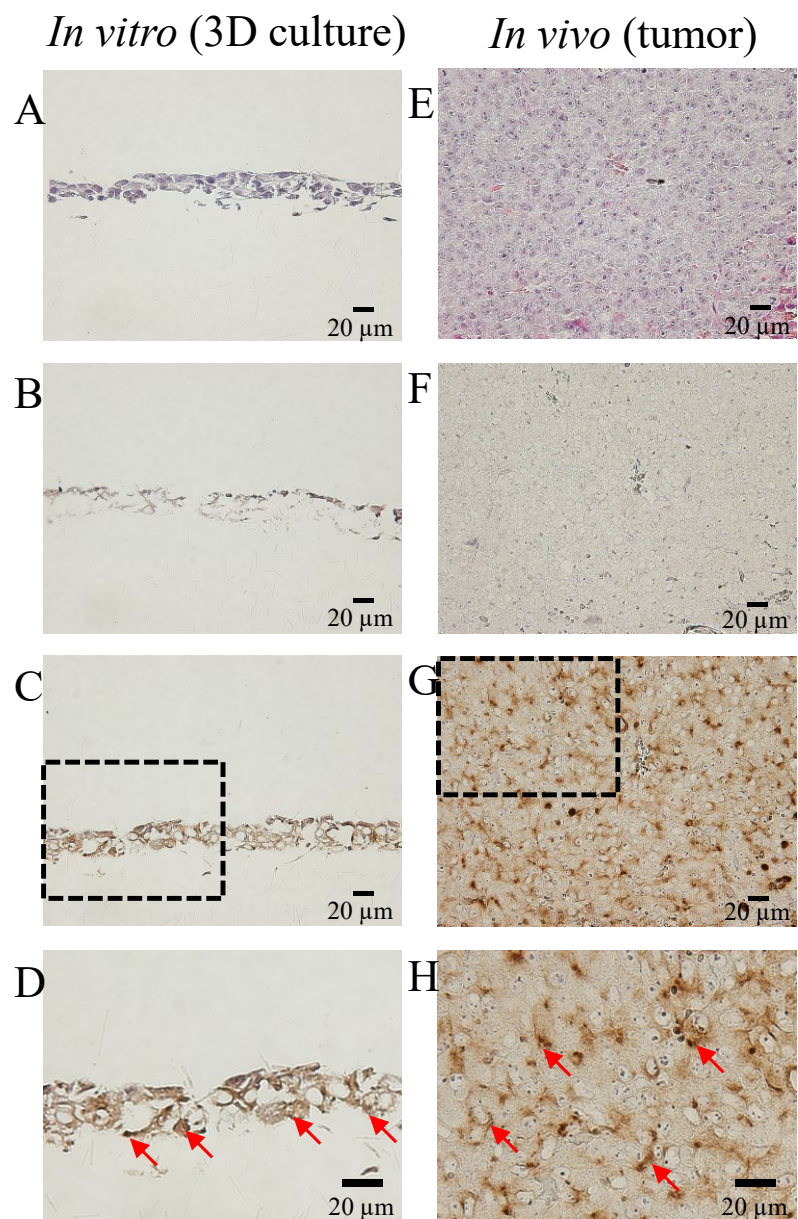


Fig.2-26 *In vitro* と *in vivo* における MDR1 発現の比較

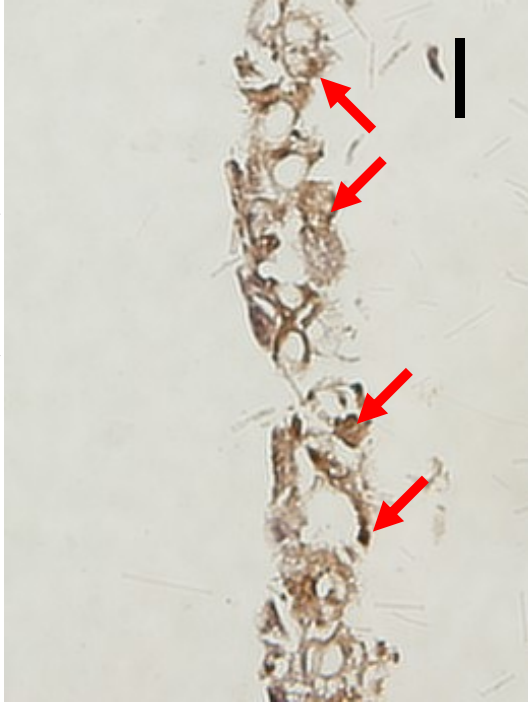
A, E: HE 染色

B, F: Isootype IgG

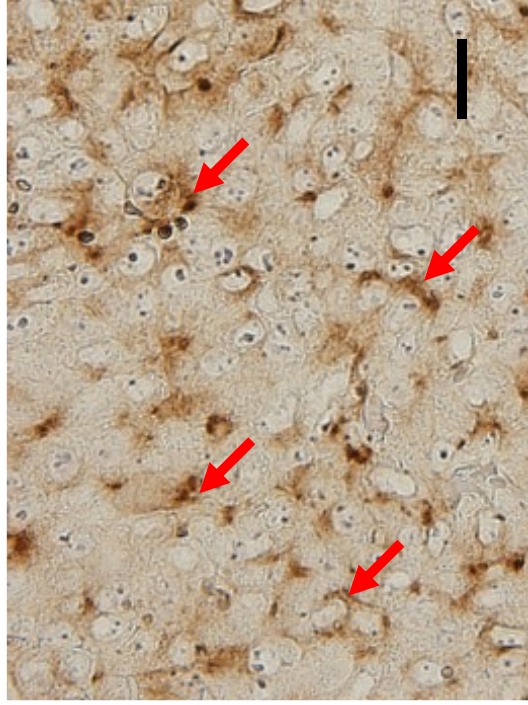
C, G: MDR1 の免疫染色

D, H: C および G の点線黒枠部分の拡大

***In vitro*(3D培養)**



***In vivo*(腫瘍)**



Scale bars: 20 μ m

Fig. 2-27 *In vitro* と *in vivo* における MDR1 の発現

左：3D 培養基材断面(*in vitro*)

右：腫瘍断面(*in vivo*)

赤矢印：MDR1 の強い発現箇所

2-4 総括

これまでに、本研究室では肝臓がん細胞(HepG2 細胞)を 3D 培養することで、2D 培養よりも高い MDR1 の発現が認められることを報告している^{73,82)}。さらに、Cellbed による 3D 培養システムは、HIF-1 α といった低酸素誘導因子すらも発現することを示しており、実際の生体がん組織における低酸素な微小環境も模倣していることが示唆される。

本章では、がんの化学療法における問題点の 1 つである、抗がん剤に対する薬剤耐性の発現とそれを克服する薬剤耐性克服薬の新規なスクリーニング法に関して論じたものである。三次元培養担体 Cellbed を用いた 3D 培養による *in vitro* アッセイ系が、*in vivo* で起こる薬剤耐性現象と薬剤耐性克服現象を再現し得るか既知の薬剤を用いて検証し、以下に内容をまとめた。

1. 肝がん細胞(HepG2 細胞)を 2D 培養すると抗がん剤(DOX)に対する IC₅₀ 値が低く、2D 培養では薬剤耐性克服薬のスクリーニングを行っても有効な薬物の選定が困難である可能性が示された。
2. Cellbed による 3D 培養により DOX に対する IC₅₀ 値が高まり、さらに細胞外排出活性も高くなることが示された。このことは 3D 培養により MDR1 の発現が多くなり薬剤耐性現象が再現できたものと考えられる。
3. 既存の MDR1 阻害薬である VRP 処理をすることで、DOX の IC₅₀ 値の低下と DOX の排出活性が抑制されたため、3D 培養により起きた高い DOX の IC₅₀ 値は、薬剤耐性克服現象の結果であると考えられた。
4. 皮下移植モデルマウスに副作用が見られない DOX 濃度(1 mg/kg)において、腫瘍体積が未治療群と比較して治療効果が見られなかった。これは DOX に対する薬剤耐性現象の結果起きたものと考えられる。
5. 皮下移植モデルマウスに VRP と DOX を併用して投与することで、未治療群と比較して顕著な腫瘍の増殖阻害が見られたため、薬剤耐性克服現象が観測されたものと考えられる。
6. MDR1 の免疫染色により、*in vitro*(3D 培養)および *in vivo* では MDR1 が細胞と細胞の接着部位に局在して発現しており、これが薬剤耐性を生じさせる原因であることが示された。

以上の *in vitro* と *in vivo* の結果は、三次元培養担体 Cellbed を用いた 3D 培養が、*in vivo* での薬剤耐性を克服することができる薬剤のスクリーニングのための細胞ベースのアッセイ系を提供できることを示唆している。

薬剤の開発において、このような前臨床試験(*in vivo*)を予測可能なヒト由来の細胞を用いたアッセイ系は、無用な大規模の前臨床試験を回避し、かつヒトへの臨床試験において有効な薬剤の選定を可能とすることが想定される。そして、その細胞ベースのスクリーニングでは、より簡便な方法で *in vivo* を再現可能なアッセイ系が求められる。そのため、今回実施したシリカ系ナノファイバーである Cellbed は、細胞積層型の 3D 培養を行って容易に層の厚みを均一に制御でき、*in vivo* で起こる MDR1 に依存した薬剤耐性を再現できることが判明したため、今後、がんを克服するための薬剤耐性克服薬の開発において有望な *in vitro* アッセイ系となり得るものと考えられる。

第3章 ハイブリッドリポソームによる肝がん幹細胞の増殖抑制効果

3-1 序

がんは世界的に見ても死亡原因の上位にある疾患の1つであるが、がんの完全克服には至っていない。その原因として、がん幹細胞の存在が挙げられる。がん幹細胞は、1990年代急性骨髄性白血病から初めて同定され^{43, 44)}、その後2000年代に入り、乳がん、神経膠腫、皮膚がん、肺がん、大腸がんなど様々な組織でがん幹細胞の存在が報告されている^{45, 46)}。がん幹細胞は幹細胞の性質(非対称分裂能)だけではなく、高い薬剤耐性能や高い腫瘍形成能も有するため、抗がん剤への治療抵抗性や再発といった治療の予後不良に深く関与していると推測される(Fig. 3-1)⁵⁾。その例として、がん幹細胞には幹細胞ニッチと呼ばれるいわゆる休眠状態があり⁹¹⁾、これは本来幹細胞自身の性質を維持するためのものである。抗がん剤はがん細胞の増殖期にあたる細胞に作用を持つ性質がある。そのため、休眠状態のがん幹細胞を撲滅することは出来ず、これががんの再発原因の一つとなっている。また、がん幹細胞の高い薬剤耐性能はABCトランスポーターの活性化に由来している^{5, 6)}。このABCトランスポーターは、薬剤の排出に関与しており、がん幹細胞はこのABCトランスポーターを用いて、細胞内に入り込んだ抗がん剤を排出し、抗がん剤に対して耐性を持つようになる。そのため、再発したがんには抗がん剤の効果が薄く、多量の抗がん剤や別の種類との抗がん剤同士の併用などが臨床では行われている。これによって正常な細胞にも影響し、白血球減少や、悪心、嘔吐、下痢、脱毛、肝機能障害等の強い副作用などが問題視されている。これらの副作用は患者のQOLを低下させ、場合によっては重篤な副作用によって患者が死亡することもある。

このようのがん幹細胞の存在とその特性が明らかになりつつあるが、がん幹細胞に対して特異的に作用する化学療法剤は開発中であり、未だ普及に至っていない。がん幹細胞を標的とする薬剤の開発で最も進んでいる例としては、Napabucasin (BBI608)が挙げられる⁹²⁾。この抗がん剤は、STAT3や β -カテニンなどの経路を阻害することで、胃、大腸、すい臓のがん幹細胞を抑制して単剤でがんの治療が期待されたが、第III相における臨床試験で有効性が認められず、さらに副作用も確認されたため、未だ一般普及には至っていない⁹³⁾。そのため現段階の化学療法による治療では、既存の抗がん剤を組み合わせる方法(併用療法)が取られているが、使用される抗がん剤の種類が増えるため重篤な副作用の懸念がある。

肝臓がんでも、がん幹細胞の存在が報告されており、フローサイトメトリー(FCM)解析では細胞表面マーカーである CD13, CD90, CD133, CD326 (EpCAM) などが肝がん幹細胞マーカーとして報告されている⁹⁴⁻⁹⁶。さらに、これらのマーカーで解析された肝がん幹細胞は、腫瘍原性評価である軟寒天コロニー形成法でコロニーを作りやすく、*in vivo* でも少ない細胞数で腫瘍を形成することが知られている⁹⁶。そして、腫瘍形成能だけではなく、薬剤排出に関与する ABC トランスポーターの高い発現に由来した抗がん剤(例：Doxorubicin, DOX)に対する薬剤耐性の報告も知られている⁹⁷。

様々な報告の中で有望なマーカーについて、CD マーカーを含む肝がん幹細胞マーカーの例を下記に示した^{94-96,98}。CD とは、Cluster of differentiation (CD) 分類と呼ばれるもので、元来はヒト白血球を主とした様々な細胞表面に存在する抗原に結合するモノクローナル抗体を国際的に統一して分類するために定められた。現在の CD マーカーは白血球を始めとする造血系だけでなく、細胞接着系やトランスポーターなど種々の細胞の特徴や性質を解析するために重要なものとなっている。がん幹細胞の研究でも、CD マーカーは重要であり、文献では様々なマーカーが提唱されているが、現在、国際基準のような普遍的なマーカーは定められていない。

① CD133

CD133 は肝がん幹細胞において、最も有力な細胞表面マーカーであると言われている。Prominin-1 の別称でも知られる、5 回膜貫通 1 本鎖糖タンパク質であり、造血幹細胞マーカーおよび組織幹細胞マーカーでもある。また、普遍的ながん幹細胞マーカーとしても有力であり、前立腺、結腸、卵巣、神経、膵臓など様々な組織のがん幹細胞マーカーとしても候補に挙げられている。肝がん幹細胞のマーカーとしては 2006 年に同定されており、CD133(+) を示す肝臓がん集団はより高い腫瘍原性能を有する結果を報告している。また、CD133 は薬剤排出機構や抗アポトーシスによる薬剤耐性能の獲得にも関与する報告もあり、本研究でも CD133 を肝がん幹細胞マーカーとして使用した。

② ALDH (Aldehyde dehydrogenase)

ALDH は、細胞内のアルデヒドの酸化に関与する解毒酵素であり、肝臓組織には特に多く存在している。ALDH の高い発現は神経幹細胞や造血幹細胞や未分化な細胞において認められ、正常組織では分化が進むと発現が無くなる。一方で、がん幹細胞マーカーとして見た場合、結腸、乳房、卵巣、膀胱、前立腺において認められ、肝がん幹細胞マーカーとしては CD133 の発現と正の相関性があることを報告している。

③ CD90

Thy-1 とも呼ばれる CD90 は、細胞間相互作用、アポトーシス、接着、遊走、組織の線維化の調節因子として機能する。正常組織中では、胸腺細胞、T 細胞、神経、内皮細胞、線維芽細胞など多くの細胞に発現しており、さらに間葉系幹細胞で高い発現が認められる。一方、上皮系のがんであれば上皮間葉移行(上皮系の細胞が接着機能を失い、間葉系様の細胞へ変化するプロセス)に関与しており、転移性の高いがんでの発現が多い。また、肝臓がん細胞中の CD90(+)を示す細胞は遠隔転移性が強く、腫瘍原性も高いことが報告されている。

④ CD44

CD44 は、細胞-細胞間基質の接着、細胞遊走、細胞増殖、血管新生に関与しており、ヒアルロン酸の受容体でもある。正常組織では造血幹細胞や間葉系幹細胞に発現が認められ、がん幹細胞マーカーとしては乳がん、胃がん、結腸がん、前立腺がん、膵臓がんなどで同定されている。また、肝がん幹細胞マーカーとしては、CD44(+)の細胞が免疫不全マウスにおいて全身転移性を示す他、CD133 との 2 重染色により CD133(+)/CD44(+)の肝臓がん集団は、幹細胞関連遺伝子の発現が高くなることが知られている。さらに、抗酸化ストレスの機構の獲得にも関与しており、CD44(+)細胞は酸化ストレスに由来するアポトーシスに抵抗を示す。

⑤ CD13

CD13 は、正常組織では腸、腎臓、肝臓、神経系などの組織に発現しており、栄養素の加水分解、エンケファリンやエンドルフィンなどの生理活性分子の分解に関与している。また、造血幹細胞にも発現があるが、多くのがん組織での発現が認められ、特に血管新生において重要なマーカーとして知られている(通常の血管は CD13 陰性)。肝臓がんにおいては、CD13(+)細胞は ABC トランスポーターを高発現する多剤耐性細胞分画として報告がある。さらに CD13(+)の肝臓がん細胞は増殖が緩やかで、休眠状態にあるため抗がん剤に対して抵抗を示すと考えられ、肝がん幹細胞マーカーとして使われている。

⑥ EpCAM (CD326)

EpCAM は上皮細胞接着分子(Epithelial cell adhesion molecule)であり、CD326 としても知られている。EpCAM は上皮系の細胞に発現が見られるが、前駆細胞および幹細胞で特に発現が高いとされている。肝臓では、胎児期の肝臓の発達段階で発現が高まり Wnt シグナルや β カテニンシグナルの活性化が

起こる。一方で、肝がん幹細胞でも発現が高まり、その場合は分化による細胞の階層性の複雑化や腫瘍形成能の増大が報告されている。さらに、CD133(+)/EpCAM(+)細胞は *in vitro* および *in vivo* で高い腫瘍形成能を有して、さらに抗がん剤への抵抗を示すことも明らかとなっており、本研究でも CD133 を肝がん幹細胞マーカーとして使用した。

本章では、ハイブリッドリポソーム (HL) ^{50,51)}の肝がん幹細胞へ及ぼす影響について検討を行った。比較対象として肝臓がんに対する抗がん剤であるドキソルビシン(DOX)を用いた。HL は、上岡・松本らによって開発されたナノ粒子医用素材であり、ベシクル分子とミセル分子を 5%グルコース溶液中で超音波照射することで容易に得ることができる。また HL は、*in vitro* で正常細胞とがん細胞を識別し、がん細胞のみに特異的に融合・蓄積し、*in vitro* および *in vivo* でアポトーシスを誘導していることが明らかになっている ^{60-63,65-69)}。さらに、臨床でもその有効性と安全性が確認されている ⁶⁴⁾。そのため、副作用のない抗がん剤としての研究が進められている。

DOX は代表的な抗がん剤であり、肝臓がんだけではなく、悪性リンパ腫や肺癌、胃がん、乳がんなど幅広く適応される。その作用機序は、がん細胞の DNA や RNA の間に入り込み、DNA や RNA 合成を阻害することで制がん効果を示す一方で、がん細胞への特異性がないため、正常な細胞にも作用し重篤な副作用を示すこともあるとされている。そこで、肝がん細胞(HepG2 細胞)に対して DOX と HL を処理し、残存細胞数が半分になる付近の濃度で、残存した細胞の肝がん幹細胞率(CD133+/EpCAM+)と軟寒天コロニー形成法による腫瘍原性評価を行った。さらに、HL の肝がん幹細胞への効果をより検証するために、蛍光脂質含有 HL(HL/NBDPC)を用い、肝がん幹細胞への選択的蓄積について FCM 解析を行った。

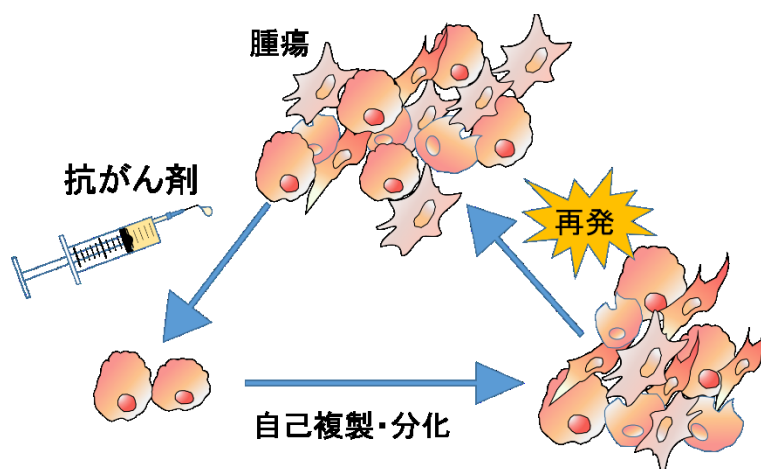


Fig.3-1 がん幹細胞の特性による抗がん剤への耐性と再発の流れ

3-2 実験方法

3-2-1 使用細胞および細胞増殖用培地の調製と滅菌

1) 使用細胞

ヒト肝臓がん由来の HepG2 細胞を理研バイオリソースセンターより購入したものを使用した。

2) 細胞増殖用培地

HepG2 細胞の培養は、和光純薬株式会社より購入した DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)にペニシリンーストレプトマイシン溶液(×100)を無菌操作下にて添加し、30 分間攪拌したものを使用した。実際の培養では、MEM を 90 %容量に対してウシ胎児血清(Fetal Bovine Serum: FBS, Hyclone)を 10 %容量加えて培養した(DMEM:FBS=9:1)。

3-2-2 使用試薬および器具の滅菌

1) 使用試薬

① 細胞培養培地

DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)

和光純薬株式会社

ペニシリン-ストربتマイシン溶液(×100)

和光純薬株式会社

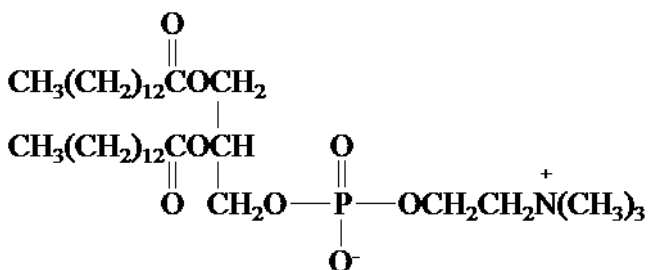
Fetal Bovine Serum (FBS)

Hyclone

② ハイブリッドリポソーム (HL) および蛍光脂質含有 HL リン脂質

L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)

日本油脂



DMPC

M.W. =677.9

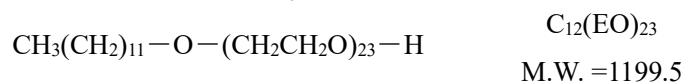
以下に構造式を示した。

界面活性剤

Polyoxyethylenelauryl ether (C₁₂(EO)₂₃)

SIGMA

以下に構造式を示した。



蛍光脂質

1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1, 3-benzoxadiazol-4-yl) amino] dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC)

Avanti Polar Lipids

5% グルコース溶液

大塚製薬

③ Caspase-3 活性測定

CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent

Invitrogen

④免疫染色 (肝がん幹細胞の同定)

Bovine Serum Albumin (BSA)	SIGMA
ハンクス平衡塩溶液(Ca, Mg, フェノールレッド不含, HBSS) ナカライテスク	
FcR Blocking Regent, human	Milteny Biotec
Anti-human EpCAM-FITC antibody	Milteny Biotec
Anti-human CD133-PE antibody	Milteny Biotec
Anti-human CD133-PE-Vio770 antibody	Milteny Biotec
Anti-human mouse IgG1-FITC antibody	Milteny Biotec
Anti-human mouse IgG2b-PE antibody	Milteny Biotec
Anti-human mouse IgG2b-PE-Vio770 antibody	Milteny Biotec

⑤軟寒天培地

Difco™ Agar Noble	和光純薬株式会社
軟寒天培養用 2.5 倍濃縮培地	GIBCO
FBS	Hyclone

⑤コロニー染色

Calcein-AM solution	DOJINDO
---------------------	---------

他、2-2-2 参照

2) 使用器具類

ナスフラスコ

岩城硝子

キュベット

アズワン

テストチューブ

Beckman Coulter

インナーキャップ

Beckman Coulter

低吸着サンプリングチューブ

SSI Bio

他、2-2-2 参照

3) 使用機器類

超音波照射機(WT-200M)

本多電子株式会社

電気泳動光散乱光度計(ELS-8000)

大塚電子

CytoFLEX

Beckman Coulter

他、2-2-2 参照

3-2-3 HL および HL/NBDPC の調製

1) HL の調製方法

HL はベシクル分子に 90 mol% の L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)、ミセル分子に 10 mol% の C₁₂(EO)₂₃ を秤量し、5% グルコース溶液に溶解させ、超音波照射(45°C、300W、1 min/mL)を行った(Fig.3-2)。超音波処理後、0.20 μ m 濾過滅菌フィルター(DISMIC-13cp020AS Cellulose Acetate)により濾過滅菌し調製を行った。調製後は暗所室温(25°C)で保管し、調製後 1 ヶ月以内のものを使用した。

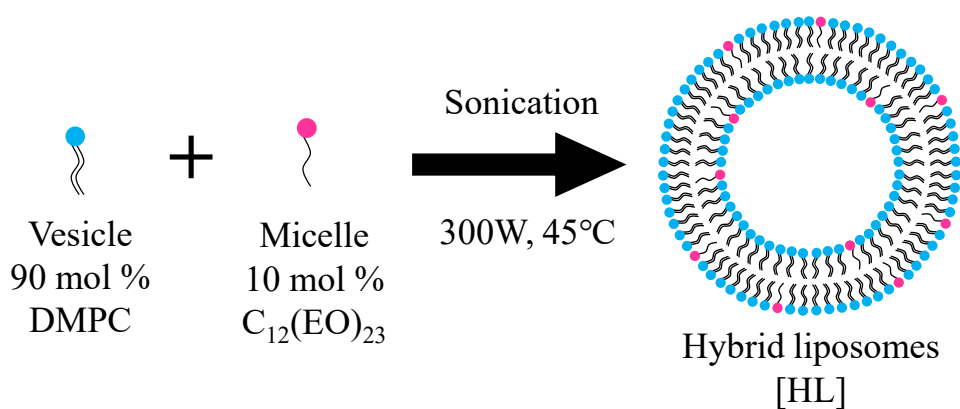


Fig.3-2 ハイブリッドリポソーム(HL)の調製

2) 蛍光脂質含有 HL (HL/NBDPC) の調製法

ベシクル分子は L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)、ミセル分子は C₁₂(EO)₂₃、蛍光脂質としては 1-palmitoyl-2-{12-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]dodecanoyl}-sn-glycero-3-phosphocholine (NBDPC) をそれぞれ 89 mol%: 10 mol%: 1 mol% になるように秤量し、5% グルコース溶液中で超音波照射し、0.20 μ m 濾過滅菌フィルター (DISMIC-13cp020AS Cellulose Acetate) により濾過滅菌し調製を行った。調製後は遮光して冷蔵 (4°C) で保存し、1 週間以内に使用した。(Fig. 3-3)

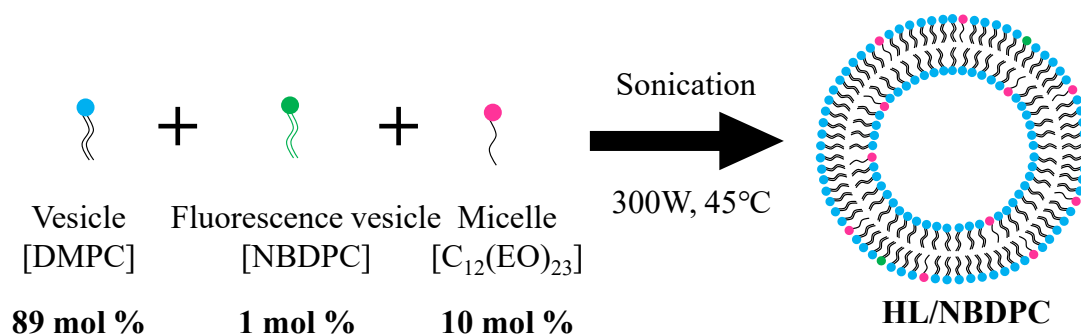


Fig. 3-3 蛍光脂質含有 HL (HL/NBDPC) の調製

3-2-4 細胞の融解と凍結方法

2-2-4 参照

3-2-5 細胞の培養と継代および計数方法

2-2-5 参照

3-2-6 DOX 処理および HL 処理のプロトコル

1) 肝がん細胞(HepG2 細胞)の培養

HepG2 細胞は、100 mm dish へ 2.0×10^4 cells/mL の播種密度で培地量 10 mL で播種した。播種後、37 °C・5 % CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養し、その後に培地交換と DOX または HL の処理を開始した。DOX または HL の処理はさらに 48 時間実施し、処理後に残存細胞数の計数・フローサイトメトリー(FCM)解析・軟寒天コロニー形成法による検討を行った(Fig. 3-4)。細胞の計数は、トリパンブルー色素排除法で行い、細胞の計数および計算により dish あたりの細胞数を算出した。

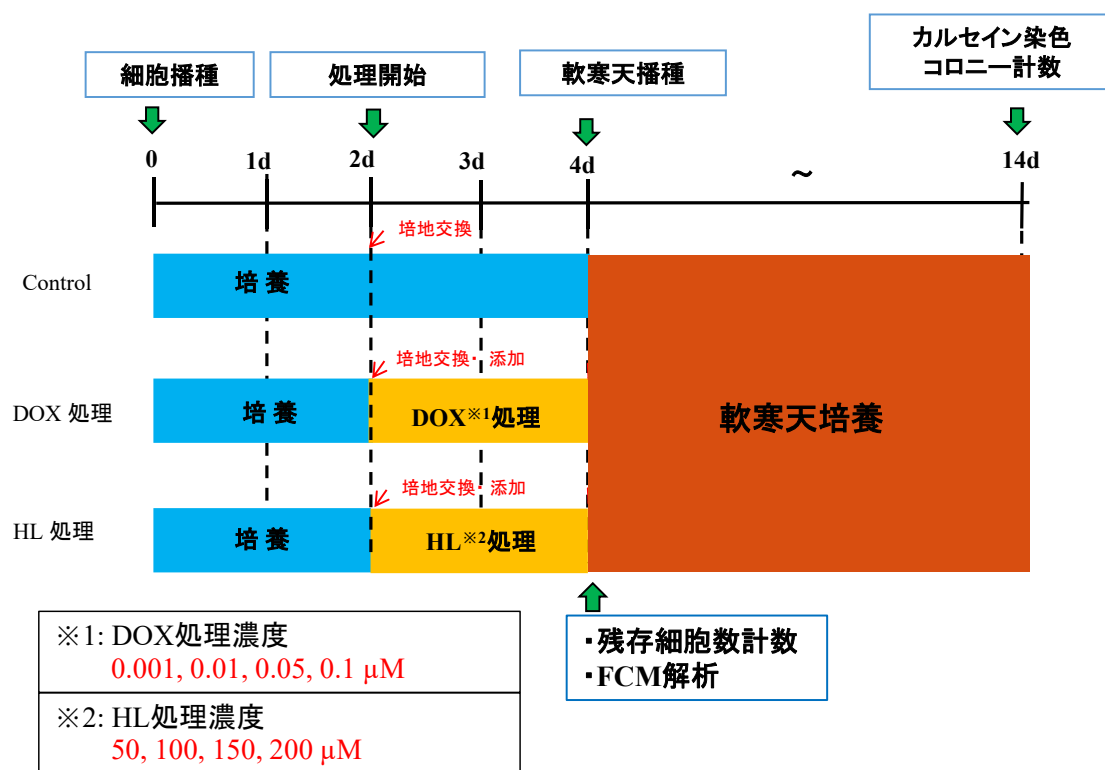


Fig. 3-4 HepG2 細胞における DOX および HL 処理のプロトコル

2) 正常肝細胞(Hc 細胞)の培養

Hc 細胞は、24 well plate へ 5.0×10^3 cells/well の播種密度で培地量 500 μ L で播種した。播種後、37 $^{\circ}$ C \cdot 5 % CO₂ インキュベーター内で 48 時間培養し、その後に培地交換と DOX または HL の処理を開始した。DOX または HL の処理はさらに 48 時間実施し、処理後に残存細胞数の計数を行った(Fig. 3-5)。細胞の計数は、トリパンプルー色素排除法で行い、細胞の計数および計算により well あたりの細胞数を算出した。

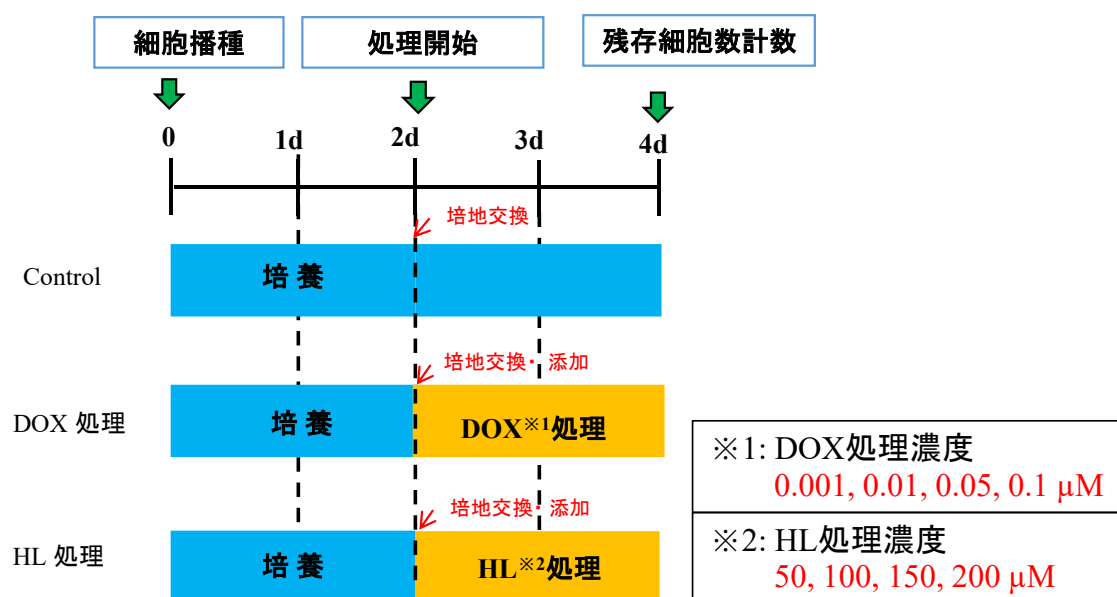


Fig.3-5 Hc 細胞における DOX および HL 処理のプロトコル

3-2-7 肝がん幹細胞(CD133+/EpCAM+)のフローサイトメーター解析

1) フローサイトメーターの原理⁹⁹⁻¹⁰¹⁾

フローサイトメーター(Flow Cytometer)は、FCM解析を行う際に使用する細胞解析装置である。FCM解析では、細胞1個1個が浮いている状態で1個1個にレーザー光を照射して得られる蛍光強度を検出し分析する手法である。細胞1個毎にレーザー光を当てて同一直線上で前方散乱光(Forward Scatter: FSC)を検出することで細胞の大きさに関する情報を得ることができる。これに対しレーザー光を集光レンズにより、光軸に対して垂直方向に散乱する光を側方散乱光(Side Scatter: SSC)と呼び細胞質内の顆粒(核やミトコンドリアなど)の多さ、つまり細胞内の構造に関する情報を得ることができる。また、SSCの検出を行う方向に蛍光強度を検出するため各蛍光波長領域に合った光電子増倍管(Photomultiplier Tube: PMT)が設置されている。それぞれの蛍光波長領域の光を検出するため、各蛍光波長領域に合う二方向性反射鏡(Dichroic Mirrors: DM)によりレーザー光を反射させ、一定の波長のみを選択するためにフィルター(Band Pass Filter: BP)を通過するとPMTで検出され、蛍光強度の情報が得られる(Fig.3-6)。

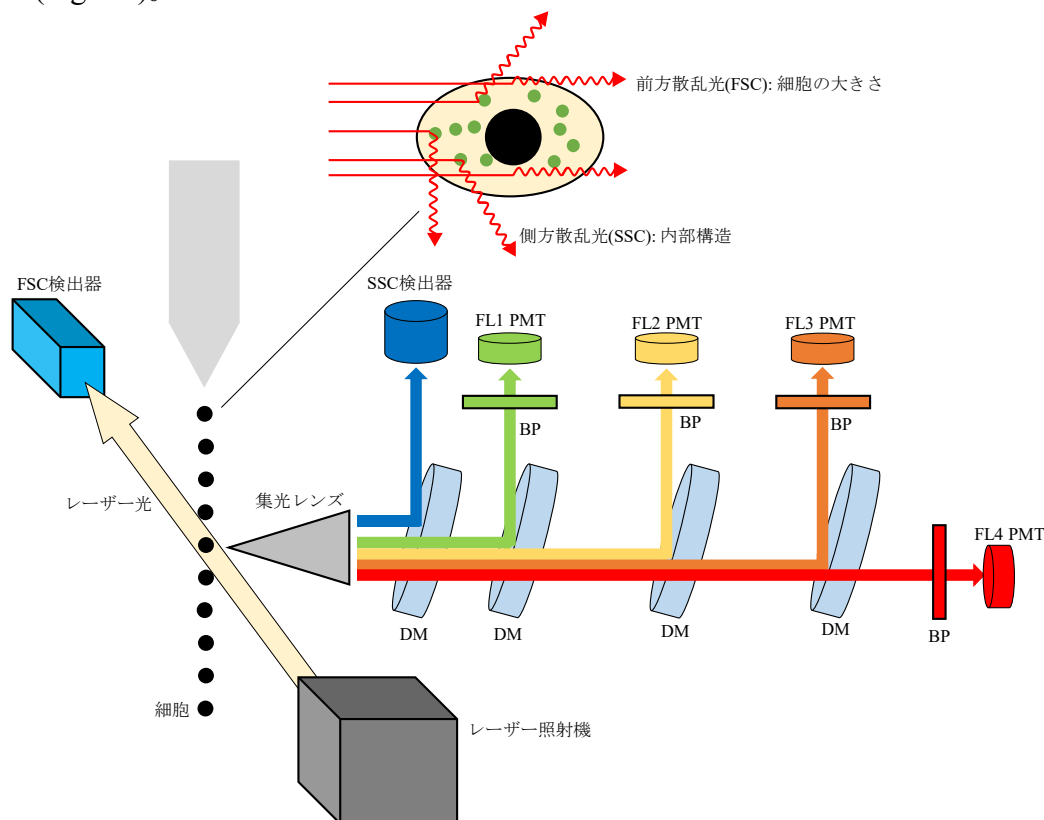


Fig. 3-6 FSC と SSC の原理およびフローサイトメーターの模式図

2) 肝がん幹細胞(CD133+/EpCAM+)同定のための免疫染色と FCM 解析

DOX および HL 処理した細胞を回収し、 1.0×10^6 cells に細胞数を調整して 0.5 % BSA/HBSS に再懸濁(1 mL)した。高速冷却遠心機を用いて 3000 rpm, 4 min, 4°C で遠心して上清の除去後、0.5 % BSA/HBSS を 90 μ L で懸濁し、FcR Blocking 溶液を 10 μ L 添加して氷上(4°C)で 10 min 反応させた。Blocking の後に、蛍光物質コンジュゲートモノクローナル抗体(抗原: EpCAM および CD133)を 10 μ L 添加して氷上(4°C)で 10 min 反応させた。抗体反応後、0.5 % BSA/HBSS を 1 mL 加えて、同様に遠心、上清の除去を行った。再度 0.5 % BSA/HBSS で 1 mL になるように懸濁し、ナイロンメッシュ(40 μ m 孔)を通してテストチューブに移した後に CytoFLEX(488 nm レーザー)により FCM 解析を行った。

また、抗体染色を行う過程で Isotype 抗体を用い、Isotype 抗体が 0.1 %未満となる領域を設定した。さらに、測定する際に二重染色を行ったため、蛍光補正を行った。蛍光補正(コンペンセーション)は、近接する 2 つの検出波長領域のフィルター(例えば、FITC と PE 領域の Band pass filter)を用いて蛍光を検出した際に起こる、目的外の蛍光検出器への入光(蛍光の漏れ)を補正することである。

3) HepG2 細胞中における CD133/EpCAM と HL/NBDPC の三重染色及び FCM 解析

HepG2 細胞を 100 mm dish へ播種(2.0×10^5 cells/ dish)し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で 48 時間培養した。培養後、調製した HL/NBDPC の最終濃度を各条件(25~200 μM)に合わせて DMEM (10 % FBS 含有)培地に添加し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ インキュベーター内で 1 時間反応させた。また、HL/ NBDPC を処理しない条件に関しては、同量の 5 %グルコース溶液を添加して同様に反応させた。その後、細胞を回収し、3-2-9 と同様のプロトコルで測定した。

測定の際には、HL/NBDPC の検出(HL の蓄積量)を FITC フィルター、CD133 を PE フィルター、EpCAM を PC7 フィルターで検出して 3 重染色を行った。また、抗体染色を行う過程で Isotype 抗体を用い、Isotype 抗体が 0.1 %未満となる領域を設定した。さらに、三重染色を行うため、FITC, PE, PC7 の蛍光検出波長領域で蛍光補正を行った。

解析では、i: CD133(+)/ EpCAM(+), ii: CD133(+)/ EpCAM(-), iii:CD133(-)/ EpCAM(-), iv: CD133(-)/ EpCAM(+)の 4 つの区画において、HL/NBDPC の蓄積の割合について比較し、どの条件がより HL が蓄積するか検討した(Fig.3-7)。

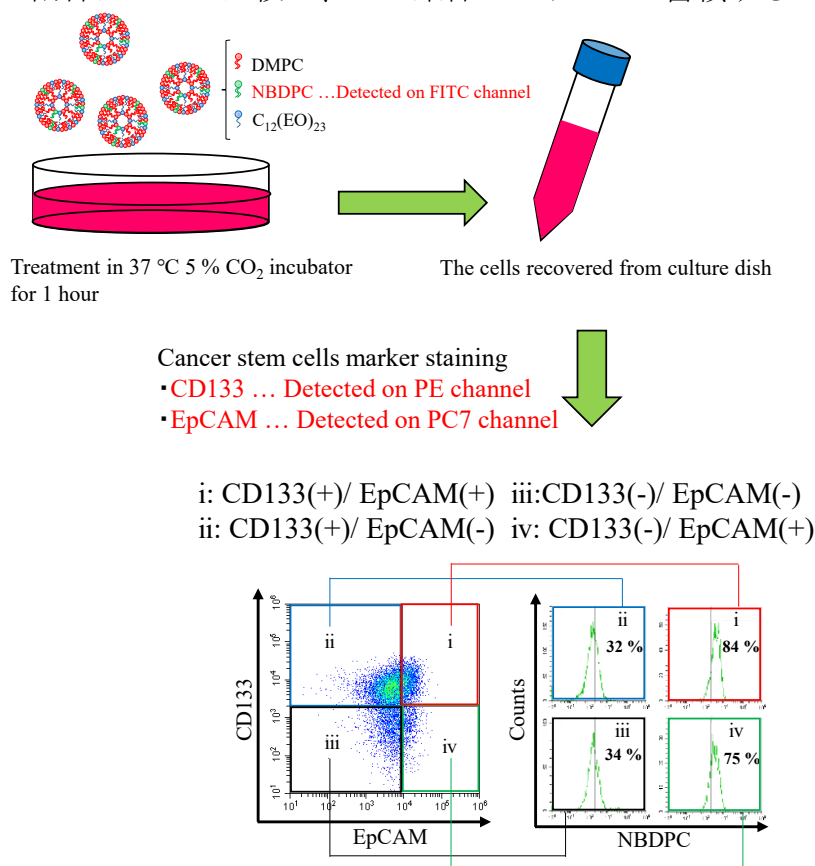


Fig.3-7 HL/NBDPC と CD133 および EpCAM の 3 重染色の工程

3-2-8 アポトーシス誘導細胞の検出

Caspase(Cysteine aspartic acid protease)は、一般的にプロテアーゼ活性を有しない前駆体(pro-caspase)として細胞内に存在し、アポトーシス誘導による刺激を受けた際に活性化される。Caspaseの種類はいくつか存在しており、Caspase-2, 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 がアポトーシス誘導に関与しているとされている。今回測定した Caspase-3 は、CellEvent® Caspase3/7 Green Detection Reagent (invitrogen) を用いて評価した。Caspase-3 は Caspase ファミリーの中でもエフェクター(アポトーシス実行型)に分類され、アポトーシスシグナルの最終段階(細胞内タンパク質の断片化の直前)にあたる。染色原理としては、細胞透過性 DEVD ペプチド(非蛍光)が細胞内で Caspase-3 の活性により切断され、色素が DNA に結合して蛍光を生じる(Fig.3-8)。

HepG2 細胞を 100 mm dish へ播種(2.0×10^5 cells/ dish)し、48 時間培養した。その後に、HL 処理を 24 および 48 時間で 50, 100, 150, 200 μ M で処理し、培地上清ごと細胞を回収した。3000 rpm, 3 min で遠心後、上清を除去して細胞数を 1×10^6 cells に調整して、CellEvent® Caspase3/7 Green Detection Reagent を添加した。染色は遮光・37°C・30 min で行い、洗浄した後に FITC チャンネル(525/40 Band pass filter)により FCM 解析を行った。

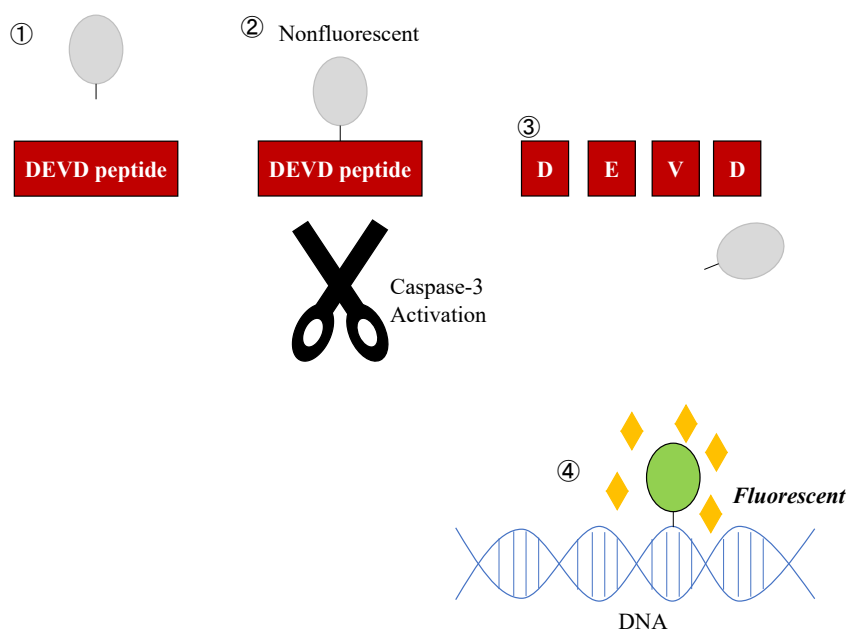


Fig.3-8 Caspase-3 活性の染色原理

3-2-9 腫瘍原性評価法(軟寒天コロニー形成法)¹⁰²⁾

1) 原理

軟寒天コロニー形成法(Soft agar colony formation assay)は、細胞の足場非依存性の増殖能に着目し、足場が存在しない軟寒天培地中で細胞の培養を行い、播種した細胞に足場非依存性の増殖が可能かどうか、つまり腫瘍を作り易い(腫瘍原性)能力を持つ細胞を検出する *in vitro* における腫瘍原性試験である(Fig.3-9)。通常、正常細胞では足場となる分子(細胞間接着分子や細胞外マトリックス)が存在することで様々な増殖因子の恩恵を受け増殖が可能となっている。そのため、足場の無い軟寒天中では細胞増殖できずコロニーは形成できない。しかし、再生医療において目的の細胞へ誘導を行う際に遺伝子的・エピジェネティック的変異が入り正常細胞が形質転換を起こしてしまうことがある。その結果、正常細胞由来の細胞でも足場非依存性の増殖を示し、軟寒天中で細胞が増殖しコロニーを形成する。以上のことより、軟寒天コロニー形成法では形成したコロニーの有無や形成率から形質転換(腫瘍原性)を評価することができる。

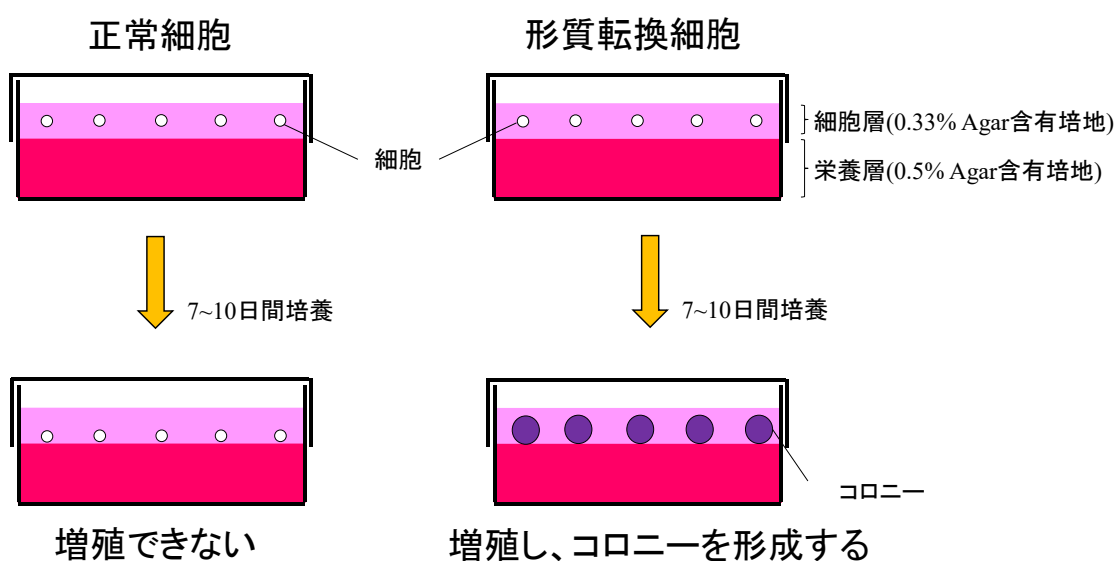


Fig.3-9 軟寒天コロニー形成法の原理

2)必要試薬の調製

①軟寒天培養用 2 倍濃縮 DMEM の調製法

超純水 450 mL に DMEM を 1 袋(12 g)加え、Penicillin 58.8mg、Streptomycin 100 mg、HEPES 3.57 g、NaHCO₃ 1.2 g 加え 3 時間攪拌した。攪拌終了後、pH7.2 ~7.4 に調整し、メスアップを行い全量 500 mL に調製した。その後、さらに 1 時間攪拌し、クリーンベンチ内で、孔径 0.22 μm の滅菌フィルターで濾過滅菌した後、培地瓶に分注した。調製後は 4°C で保存した。

②軟寒天培養用 2 倍濃縮増殖用培地の調製法

HepG2 細胞用の濃縮培地は、使用直前に、2 倍濃縮 DMEM と FBS が 4:1 の割合になるように調製し用いた。

③1 %(w/v) Agar 溶液

10 mL の 1 %(w/v) Agar 溶液を調製する場合、超純水 10 mL に 100 mg の Agar を加え、軽く振り混ぜ 15 分間、120°C でオートクレーブ処理を行った。その後、60°C まで冷やし、すぐに使用した。オートクレーブから取り出して以降は、冷めないようにお湯(超純水)で湯煎することで寒天が固まらないように温度管理を行った。

④0.5 % Agar 含有培地の調製

前述の軟寒天培養用 2 倍濃縮増殖用培地と 1 % Agar 溶液を等量混合し、調製を行った。調製後は 40°C 付近で固まらないように保持した(湯煎により温度を保持)。

⑤0.33%Agar 含有細胞懸濁液の調製

細胞懸濁液と 0.5 % Agar 培地の比率が 1:2 で混ぜて調製した(細胞懸濁液:0.5%Agar 培地=1:2)。細胞の密度は、細胞懸濁液を 1.8×10^4 cells/300 μL に調整し、0.5 % Agar 含有培地を 600 μL 加え、最終的に 1.8×10^4 cells/900 μL の 0.33 % Agar 含有細胞懸濁液とした。

⑤5 μM Calcein-AM 溶液

Calcein-AM solution(MW:994.86、1 mg/mL)の濃度を 5 μM に調整するため、1 mL 調製する場合、9.995 mL の HBSS に Calcein -AM を 5 μL 入れた。調製後は遮光し直ぐに使用した。

3) 軟寒天コロニー形成法のプロトコル

48 well plate に 0.5 % Agar 含有培地を 350 μ L 添加し、Base Agar として固化させた。その後、Top Agar として 0.33% Agar 含有細胞懸濁液を 50 μ L ずつ重層させ、1000 cells/ well で細胞の播種を行い、37°C・5 % CO₂ インキュベーター内で 9 日間培養した(Fig.3-10)。9 日間の培養後、Top Agar 中の生存した増殖性のあるコロニーを 5 μ M Calcein-AM 溶液で染色して、寒天培地中のコロニーを蛍光顕微鏡で観察および写真を撮影した。寒天培地中のコロニーは、imageJ ソフトウェアを用いて写真から解析した(詳細は後述)。また、その際のコロニーの定義は 20 個以上の細胞を示す、直径 80 μ m 以上および面積 5700 μ m² 以上の細胞塊を単一細胞から増殖したコロニーと定義した。

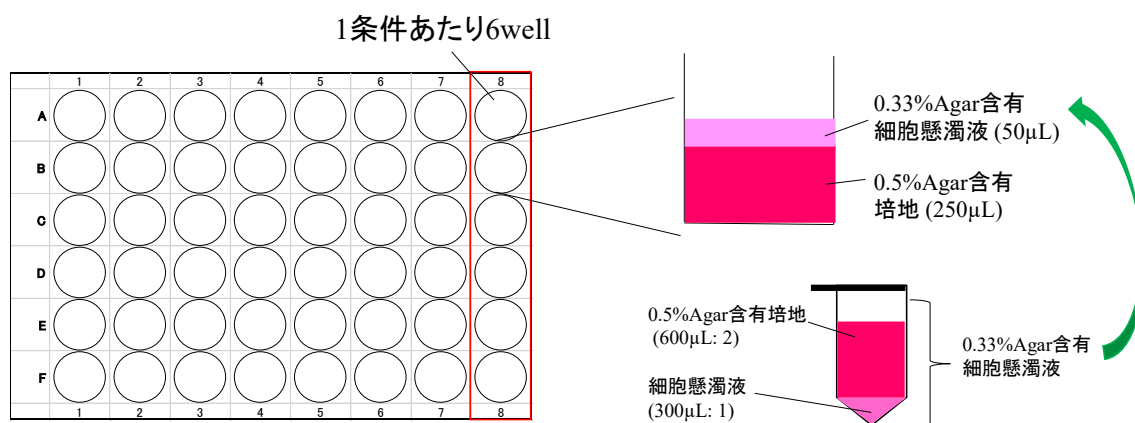


Fig.3-10 48 well plate への軟寒天播種

4) Calcein 染色の原理

Calcein-AMはCalceinの4つのカルボキシル基をアセトキシメチルエステル化(AM化)することによって細胞膜透過性を持たせたものである。このCalcein-AM自体は蛍光をほとんど示すことは無いが、細胞内に入り細胞内のエステラーゼによる加水分解によりCalceinとなる(生細胞のみ)。Calceinは細胞膜不透過性であり、さらに強い緑色蛍光($\lambda_{ex}=490\text{nm}$ 、 $\lambda_{em}=515\text{nm}$)を示す(Fig.3-11)。

それ故に、Calcein-AMで染色することで生細胞のみを染めて観察ができるため、蛍光顕微鏡の観察で緑色蛍光を示すコロニーは生きて未だ増殖性を有しているコロニーであると言える。

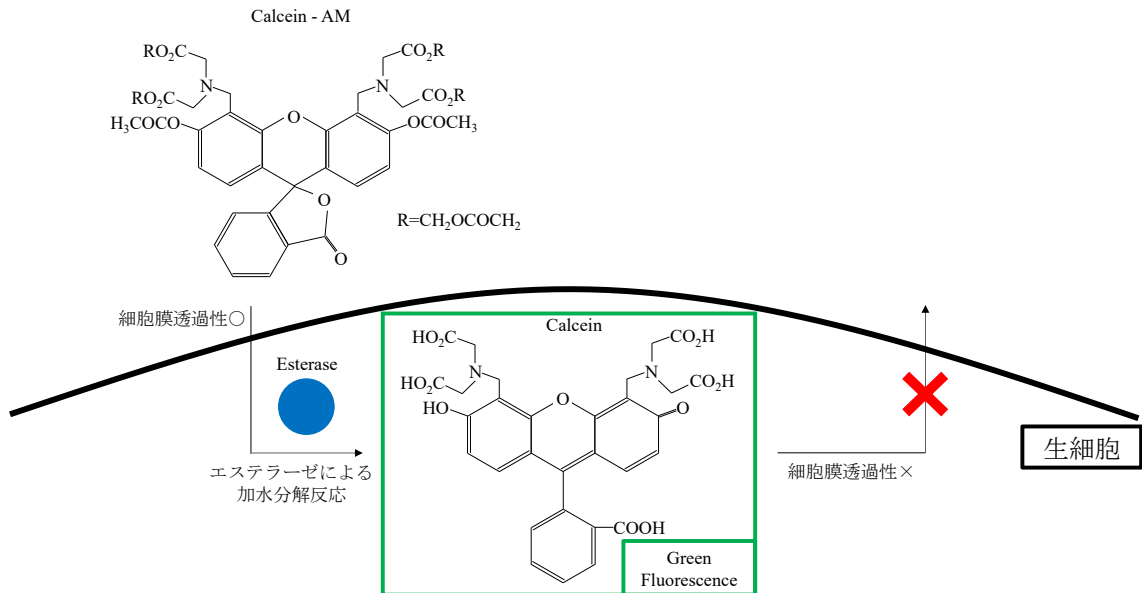
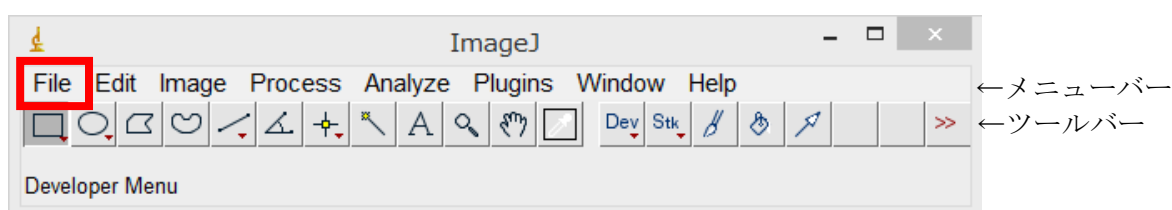


Fig.3-11 Calcein 染色の原理

5) imageJによる画像解析を用いたコロニー計数

①解析したい画像の開き方

1. **File** を開く
2. **Open** から目的の画像を選択する
※画像ファイルは事前にファイル形式を TIFF で保存しておく必要がある
※他のファイル形式でも読み込めるが適切でない
(例：JPEG では解析画像が小さくて画質が荒い)

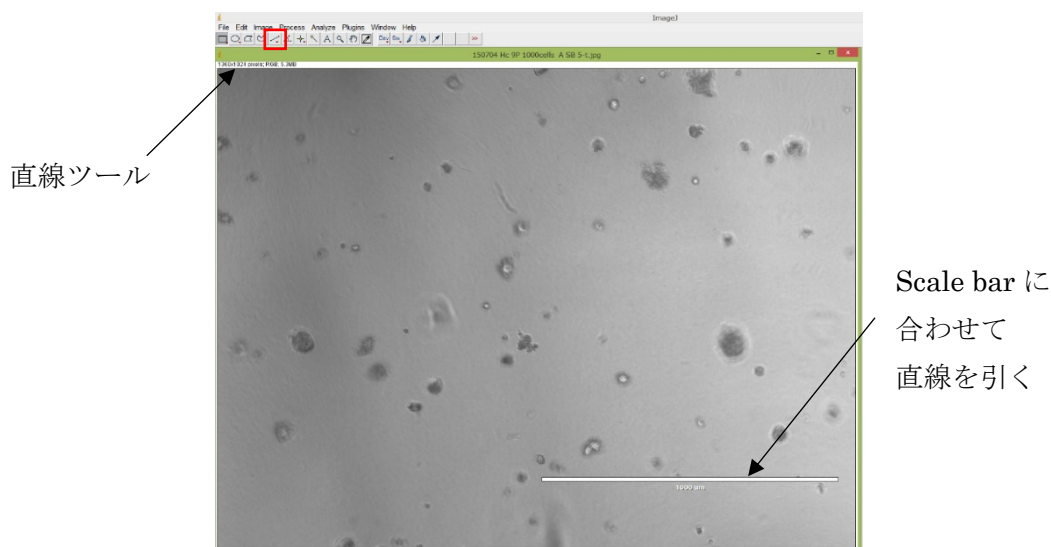


②長さの設定：サンプル画像上の長さ

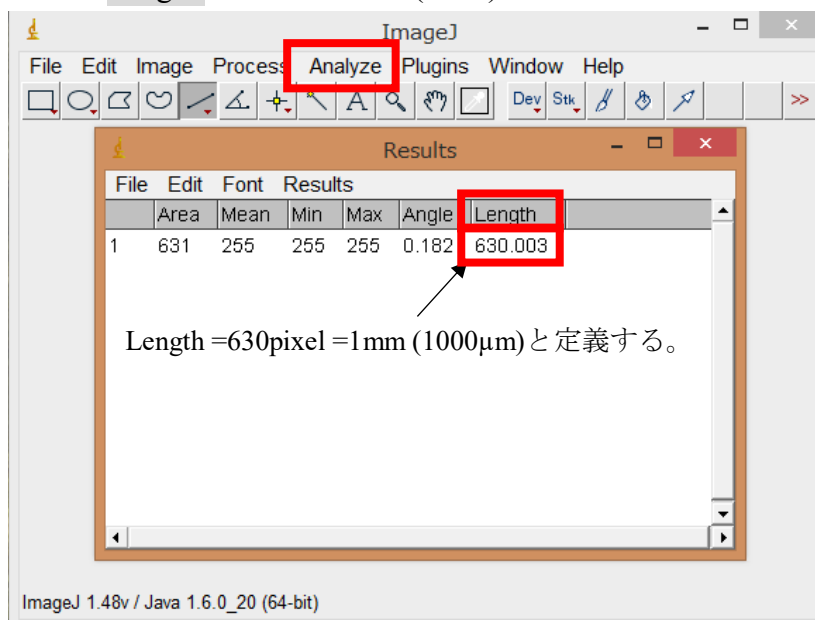
画像解析をするにあたり、画像上での長さを pixel から mm に変更する必要がある。この設定をすることで、染色したコロニーの直径や面積が算出される。

※サンプル画像と同倍率で長さが分かる画像が必要 (スケールバーが入ってるもの)

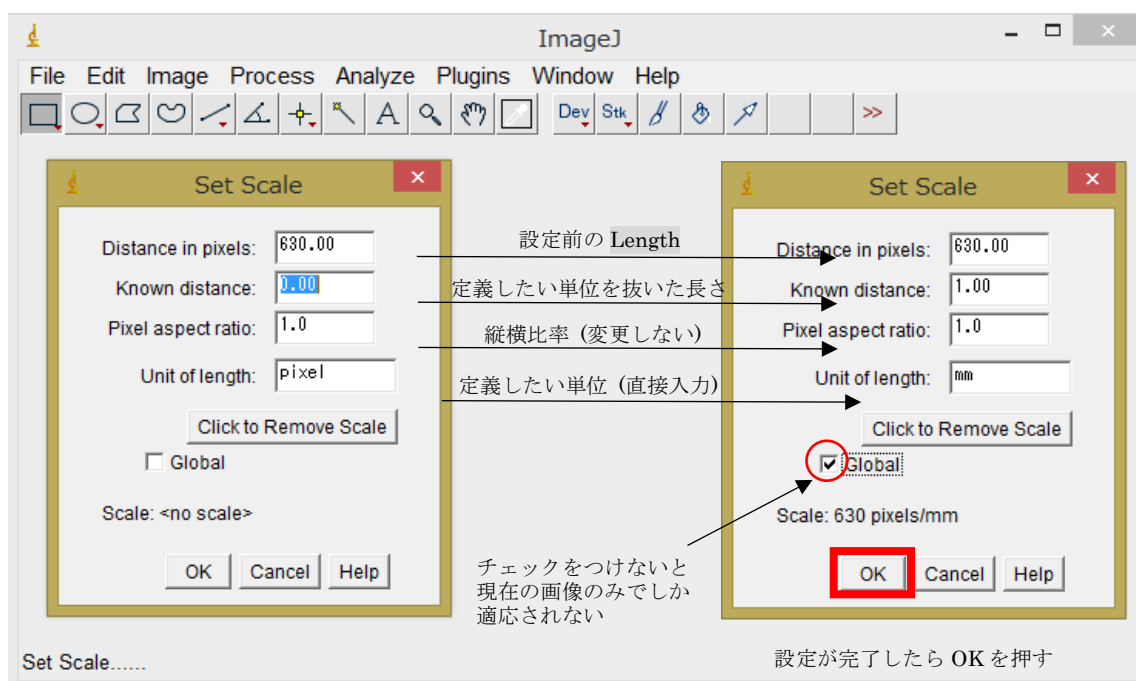
1. 画像サンプル(スケールバー入り)を **File** から開く
2. ツールバーの中から直線ツールを選択し、画像上のスケールの上に重なるように直線を引く。



3. メニューバーの中の **Analyze** を選択する。
4. **Analyze** メニューの一覧の 1 番上の **Measure** を選択することで、Results が別ウィンドウに表示される。
5. Results の中の **Length** より、この数値(距離)を 1mm と定義する必要がある。



6. 再度、**Analyze** メニューを開き上から 7 番目の **Set Scale** を選択する。
7. **Set Scale** の各項目を変更する。(下図参照)

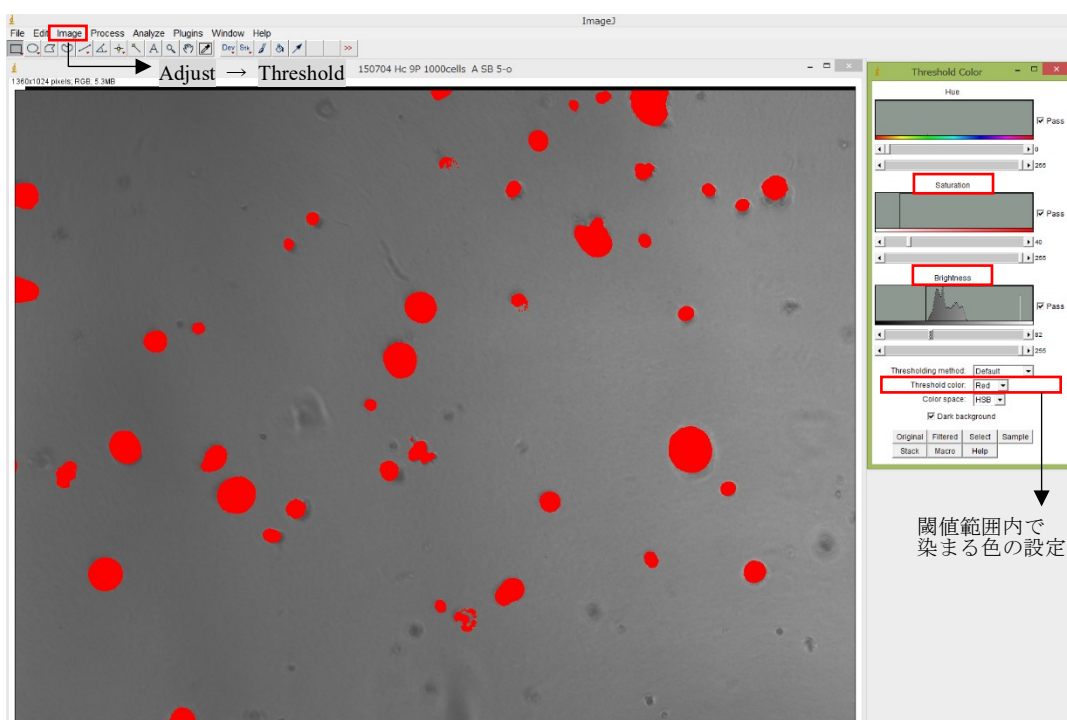


8. 以上で長さの設定が完了し、Results の画面では、**Length** では mm 表記、**Area** では mm² 表記となる。

③粒子解析

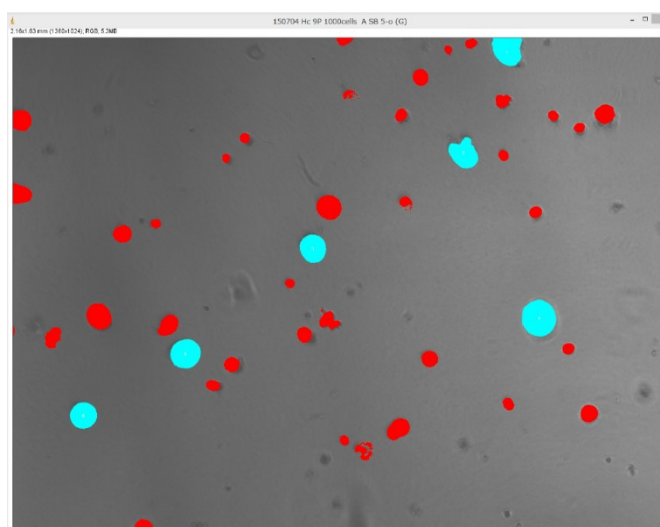
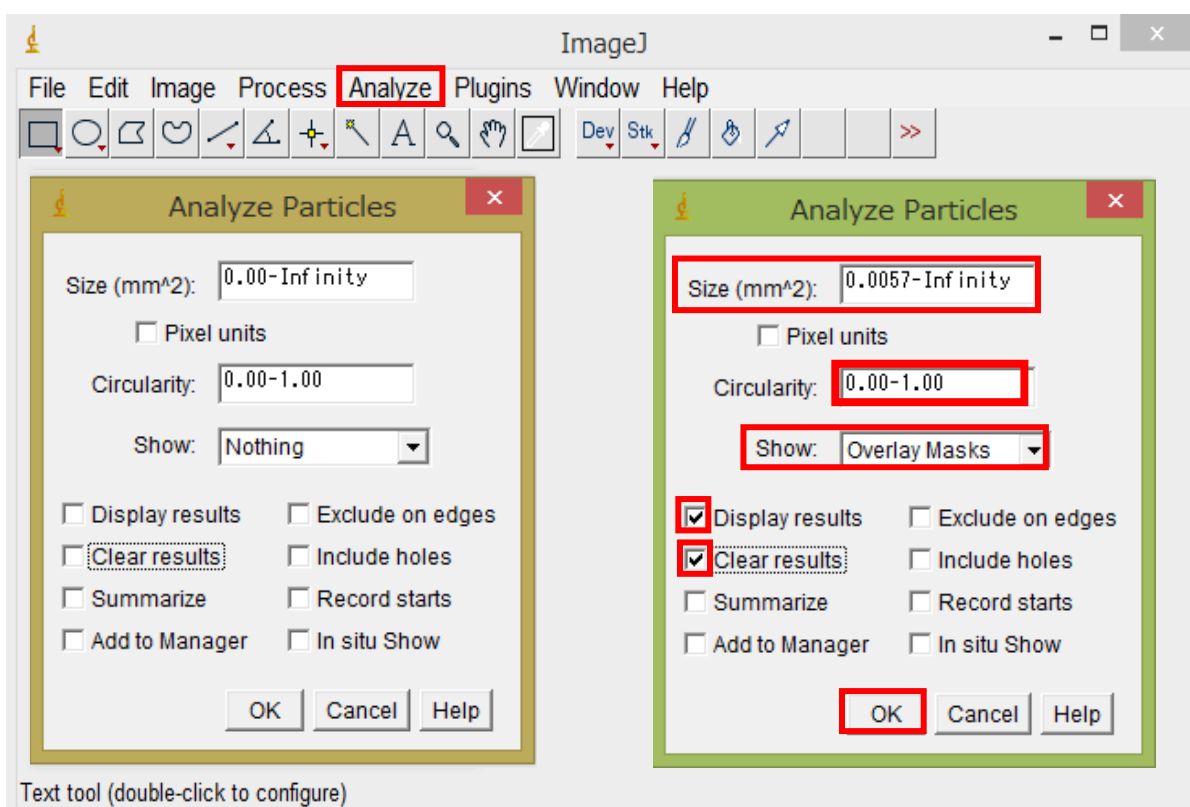
閾値の設定

1. メニューバーの **Image** を選択し、上から 2 番目の **Adjust** の中の上から 4 番目の **Threshold** を開く。
2. **Threshold Color** を開くとサンプル画像のコロニーが染まる。
※画像上では赤色に染まる
3. 画像上のコロニーの染まり具合を **Saturation** や **Brightness** で調整する。
※**Saturation** は値を 30~40 くらいで固定する
※**Brightness** は値をグラフの最小値に合わせる



④粒子解析

1. メニューバーの **Analyze** を選択し、上から 2 番目の **Analyze Particle** を選択する。
2. **Analyze Particle** が別ウィンドウに開き、各項目を変更入力する。(下図参照)
3. 各項目を入力すると面積が 0.0057mm² 以上のコロニーが青色に染め分けられる。



4. 別ウィンドウに表示された Results のメニューバーにある Results を選択する。
5. 上から 2 番目の Summarize を選択すると、Results のウィンドウに Mean (中間値)、SD (標準偏差)、Min (最小値)、Max (最大値)が表示される。
6. 上から 3 番目の Distribution を選択し、別ウィンドウ開いたら Parameter が Area にして OK を押す。
7. 面積別のコロニーの個数を List で確認する。

The screenshot displays three windows from a software application:

- Results Window:** A table with columns 'Label', 'Area', 'Mean', 'Min', and 'Max'. It contains 6 rows of data.
- Distribution Dialog:** A dialog box with 'Parameter: Area' selected in a dropdown. It shows '6 data points', a checked 'Automatic binning' option, and input fields for 'or specify bins: 6' and 'and range: 0-0'. 'OK' and 'Cancel' buttons are at the bottom.
- Area Distribution (G) Window:** A window showing a histogram. The x-axis ranges from 0.00605 to 0.0106. Below the plot, statistics are listed: Count: 6, Mean: 0.00748, StdDev: 0.00166, Bins: 2, Min: 0.00605, Max: 0.0106, Mode: 0.00605 (5), Bin Width: 0.00229. A 'List' button is highlighted in red.

Label	Area	Mean	Min	Max
1	0.007	145.666	101	178
2	0.007	143.654	101	166
3	0.006	143.956	92	180
4	0.011	149.842	123	180
5	0.008	139.532	93	152
6	0.006	136.999	91	154

3-3 実験結果

3-3-1 正常肝細胞および肝臓がん細胞に対する DOX および HL の細胞増殖抑制効果

肝がん細胞(HepG2 細胞)および正常肝細胞(Hc 細胞)の増殖に対する DOX または HL の影響について Fig.3-12 に示した。Fig.3-12A および Fig.3-12B に示すように DOX 処理をした場合、HepG2 細胞および Hc 細胞ともに濃度依存的(0.001~0.1 μM)に細胞数が Control (DOX 未処理)と比べて減少することが示された。このことは、DOX による処理は、正常肝細胞と肝がん細胞の選択性が無いことを示しており、DOX は制がん効果を有しながらも副作用が表れることを示唆している。しかしながら、HL では 50~200 μM の濃度範囲において Hc 細胞の増殖に悪影響を及ぼすことなく(Fig.3-12D)、HepG2 細胞のみに濃度依存的に増殖抑制を示した(Fig.3-12C)。これらの結果は、HL が正常な肝細胞の増殖を抑制することなく、肝臓がん細胞のみを選択的に阻害したことを示唆している。

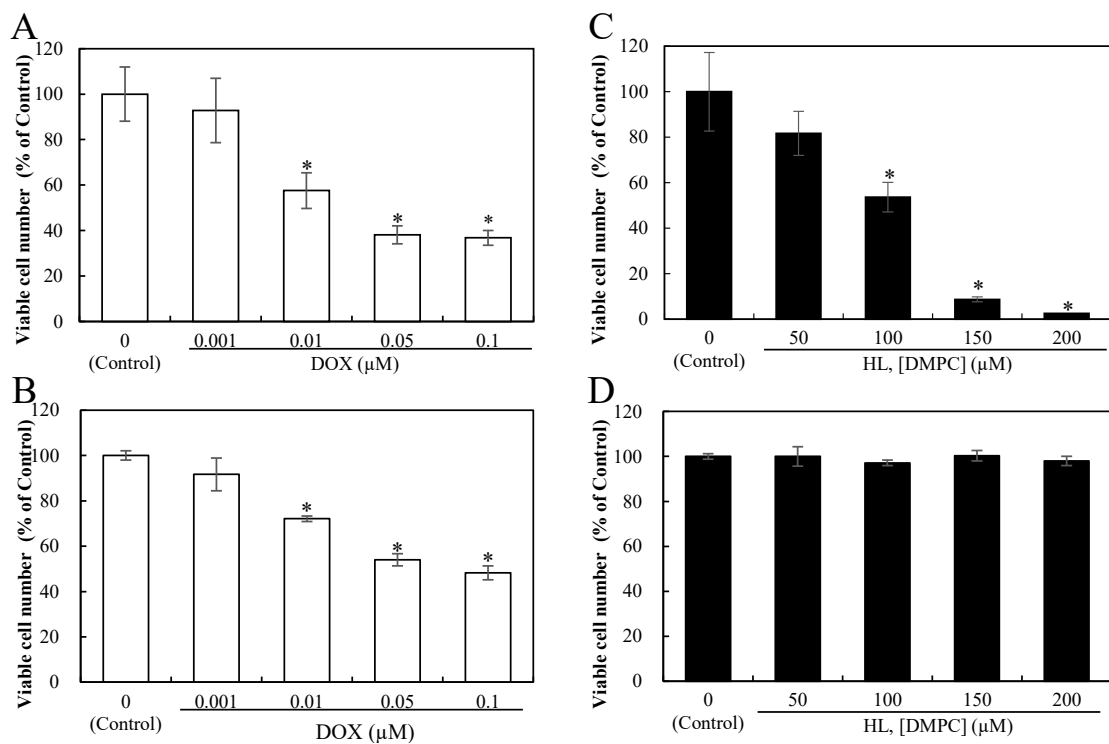


Fig.3-12 DOX および HL 処理による HepG2 細胞と Hc 細胞の増殖抑制効果

(A) HepG2 細胞に対する DOX 48 h 処理 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

(B) Hc 細胞に対する DOX 48 h 処理 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

(C) HepG2 細胞に対する HL 48 h 処理 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

(D) Hc 細胞に対する HL 48 h 処理 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

3-3-2 HL による HepG2 細胞のアポトーシス誘導

HL による HepG2 細胞に対する細胞死について調べるために Caspase-3 活性の測定を行った結果を Fig.3-13 に示した。細胞内の Caspase-3 の活性は、HL 処理した後に時間および濃度依存的に観察された。このことから、HepG2 細胞の増殖が HL 処理により抑制される理由は、アポトーシス誘導型の細胞死に起因することが明らかとなった。200 μ M の HL で正常肝細胞に 48 時間処理しても全く影響を与えないことから (Fig.3-12D)、HL 処理による HepG2 細胞のアポトーシス誘導は肝がん細胞に選択的であることが示された。

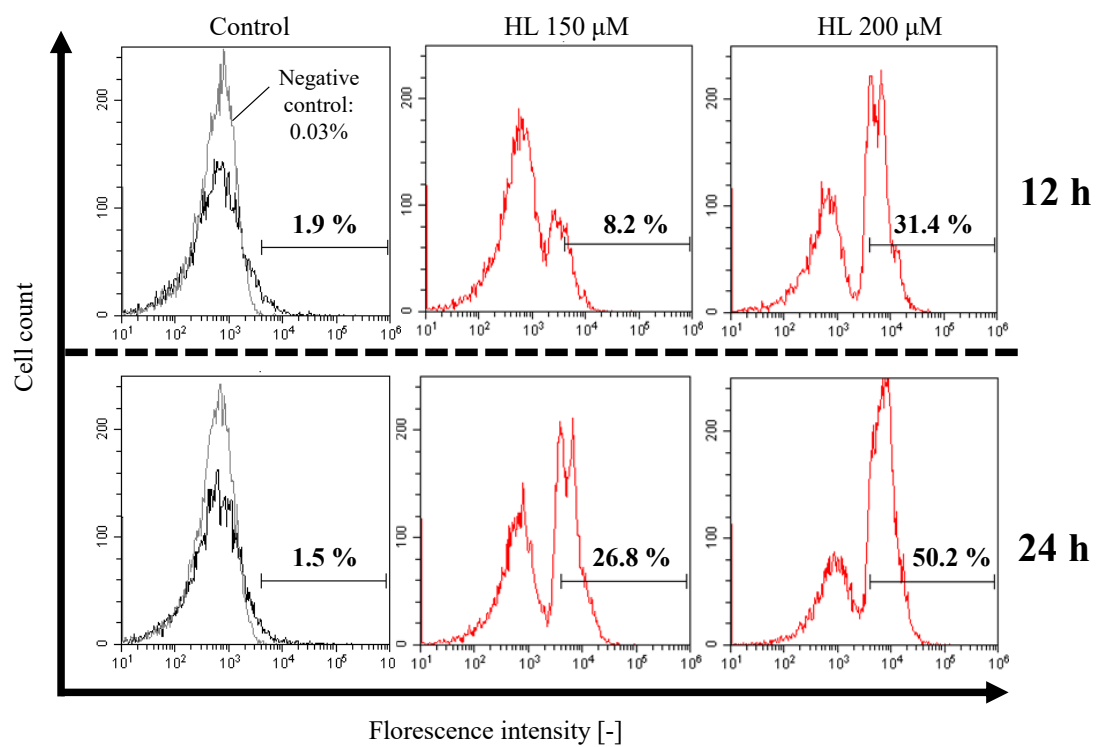


Fig.3-13 HepG2 細胞中の HL 処理による Caspase-3 活性細胞の割合

3-3-3 DOX および HL が肝がん幹細胞率に与える影響

肝がん幹細胞のマーカーとして、CD133 と EpCAM が両陽性を示す集団を肝がん幹細胞として同定し、DOX および HL 処理後に FCM 解析をした結果を Fig.3-14 に示した。結果として、DOX 処理することで濃度依存的に CD133(+)/EpCAM(+)の割合が増加することが示された。逆に HL 処理した場合は、濃度依存的に CD133(+)/EpCAM(+)の割合が減少することが示された。これらの知見は、肝がん細胞集団に存在する肝がん幹細胞が、従来のがん剤(DOX)に対して耐性を示して残存することを示している。また、DOX 処理では細胞増殖に抑制がかかるため、臨床では見かけ上は治療効果が認められるが、後に残存した肝がん幹細胞が増殖して再発する懸念がある。一方で、HL は肝がん細胞の増殖抑制効果に加えて、CD133(+)/EpCAM(+)を示す肝がん幹細胞集団を選択的に増殖阻害したと考えられるため、臨床治療において再発するリスクが抑えられると考えられる。

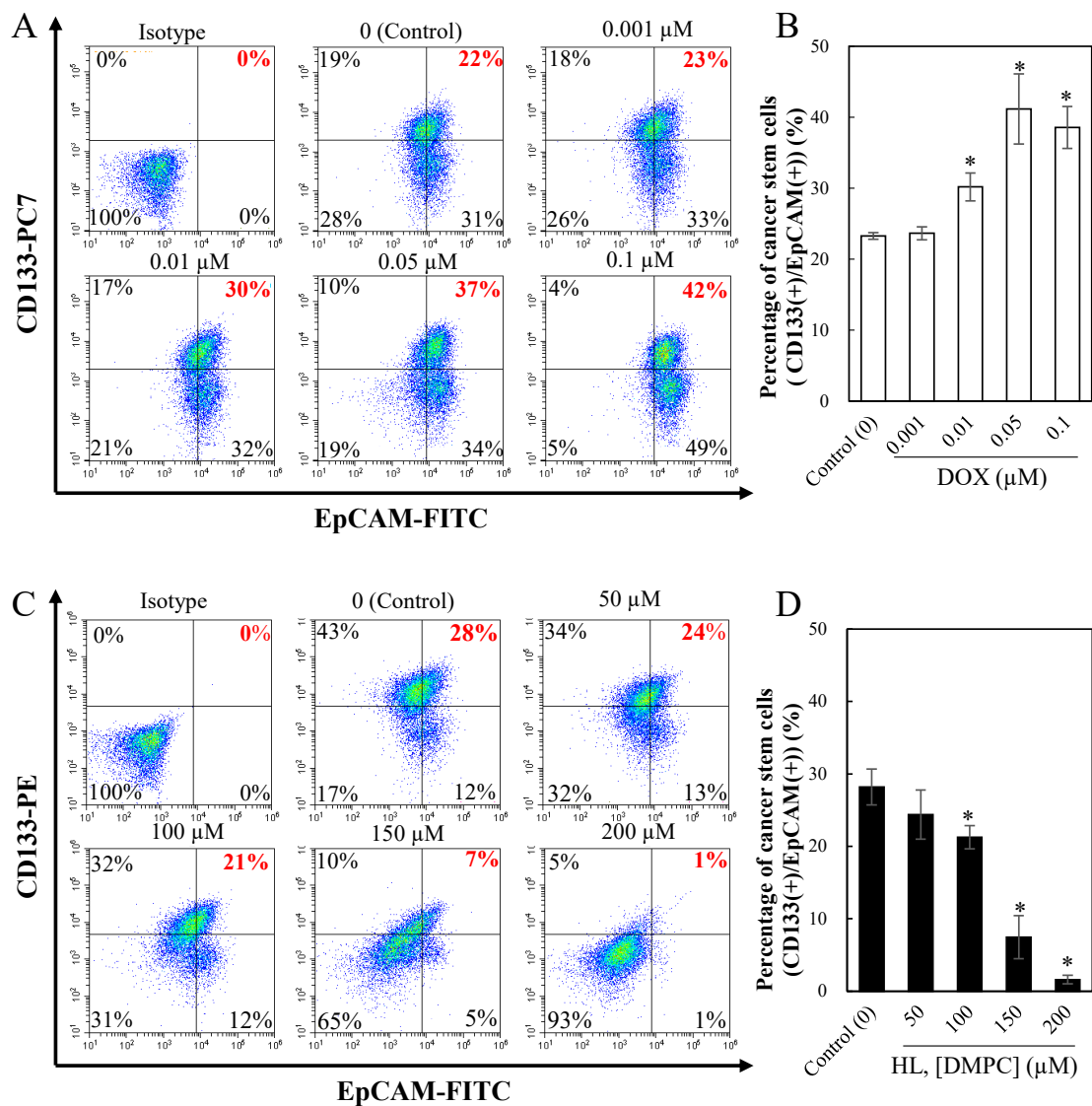


Fig.3-14 DOX および HL 処理後の HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)の割合

(A) DOX 48 h 処理による CD133/EpCAM の発現

(B) DOX 48 h 処理による CD133(+)/EpCAM(+)

細胞の割合(n=4)、

* $p < 0.05$ (vs. Control)

(C) HL 48 h 処理による CD133/EpCAM の発現

(D) HL 48 h 処理による CD133(+)/EpCAM(+)

細胞の割合(n=4)、

* $p < 0.05$ (vs. Control)

3-3-4 DOX および HL が HepG2 細胞の腫瘍原性能に与える影響

DOX および HL 処理した HepG2 細胞の腫瘍原性能について調べるために軟寒天コロニー形成法を行い、その結果を Fig.3-15 に示した。HepG2 細胞は足場非依存の増殖を行うため、軟寒天培地中でも増殖性を示し、DOX および HL 処理を行わない状態のコロニー形成の様子を Fig.3-15A の左側に Control として示した。Fig.3-15A および B から明らかなように、DOX 処理 0.001~0.05 μM の範囲でコロニー数が増加する傾向を示し、0.1 μM においては減少した。以降の濃度でも大きなコロニーが残存する結果となったと考える(Fig.3-15B)。このことは、DOX 処理により HepG2 中に存在する肝がん幹細胞が残存して濃縮されたことを示唆している。一方で、HL 処理した条件では濃度依存的に、Control と比較して形成したコロニー数を有意に減少させることが示された(Fig.3-15C)。この結果は、HL は HepG2 細胞中に存在する、肝がん幹細胞が有する高い腫瘍形成能も抑制できることを示唆している。

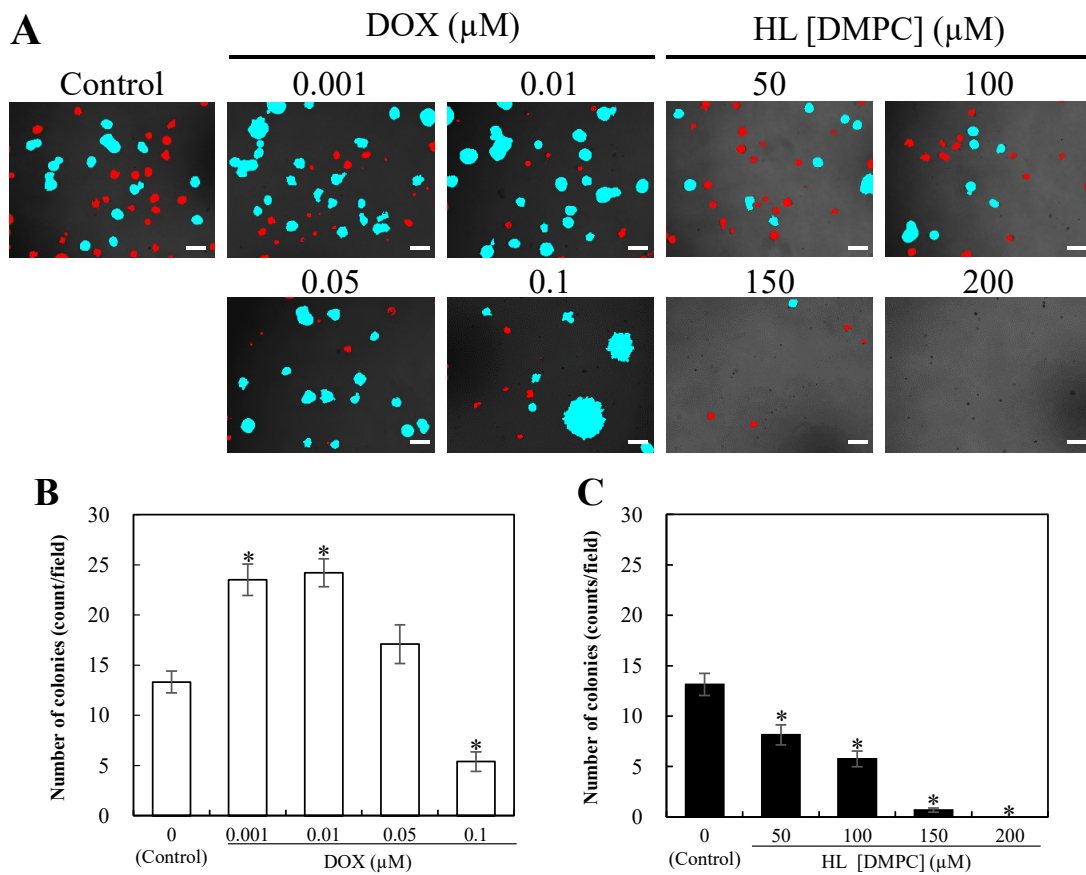


Fig.3-15 DOX および HL 処理後の HepG2 細胞の腫瘍原性能の比較

(A) 軟寒天培地中のコロニー形成写真 (青: コロニー、赤: 非コロニー)、

Scale Bars: 200 μm

(B) DOX 48 h 処理によるコロニー形成数 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

(C) HL 48 h 処理によるコロニー形成数 (n=4)、* $p < 0.05$ (vs. Control)

3-3-5 HepG2 細胞中の CD133/EpCAM 発現の有無が HL の蓄積に与える影響

HepG2 細胞中において、がん幹細胞マーカーである CD133 と EpCAM の発現が HL の蓄積に与える影響について調べるため、蛍光脂質含有 HL (HL/NBDPC) を用いて検証した。まず、肝がん細胞である HepG2 細胞へ HL/NBDPC は、Fig.3-16 に示すように濃度依存的に蓄積することが観察された。さらに、HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)、CD133(-)/EpCAM(+)、CD133(+)/EpCAM(-)、CD133(-)/EpCAM(-) を示す 4 集団に分画し (Fig.3-17A)、それぞれの集団への HL/NBDPC の蓄積量を比較したところ、Fig.3-17B に示すように CD133(+)/EpCAM(+) および CD133(-)/EpCAM(+) への蓄積が他 2 集団よりも明らかに多いことが示された。このことは、HL は CD133(+) を示す細胞よりも EpCAM(+) を示す細胞へより多く蓄積することを示唆している。特に、肝がん幹細胞と定義した CD133(+)/EpCAM(+) が最も蓄積が多いことから、HL は肝がん幹細胞集団へ選択的に蓄積することが明らかとなった。

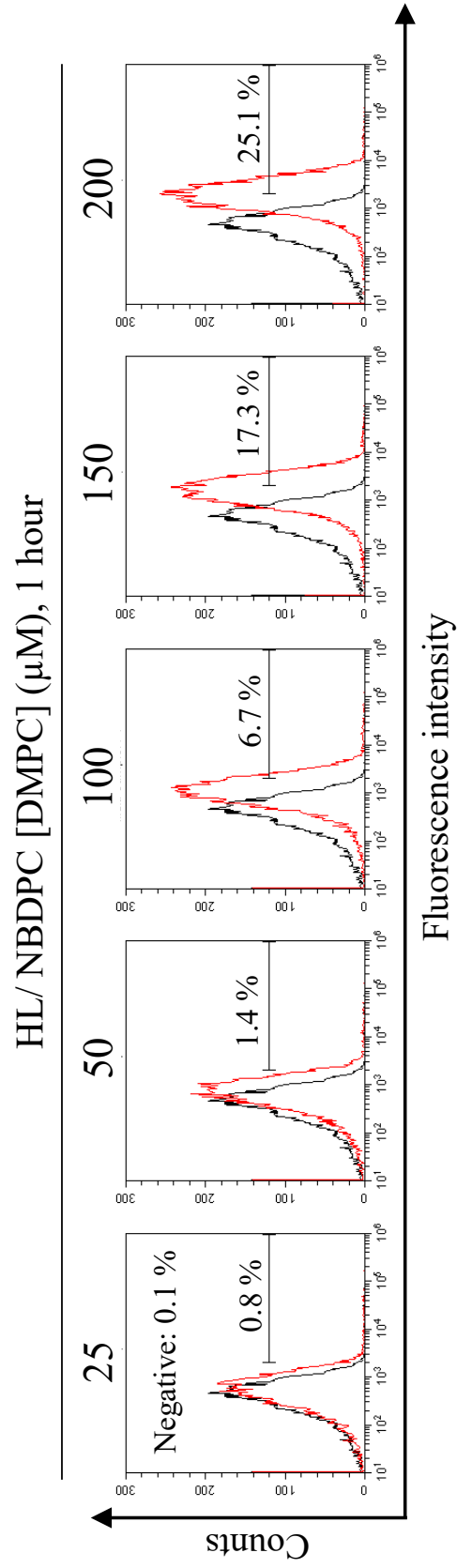


Fig.3-16 HepG2 細胞における HL/NBDPC 処理による蓄積の割合

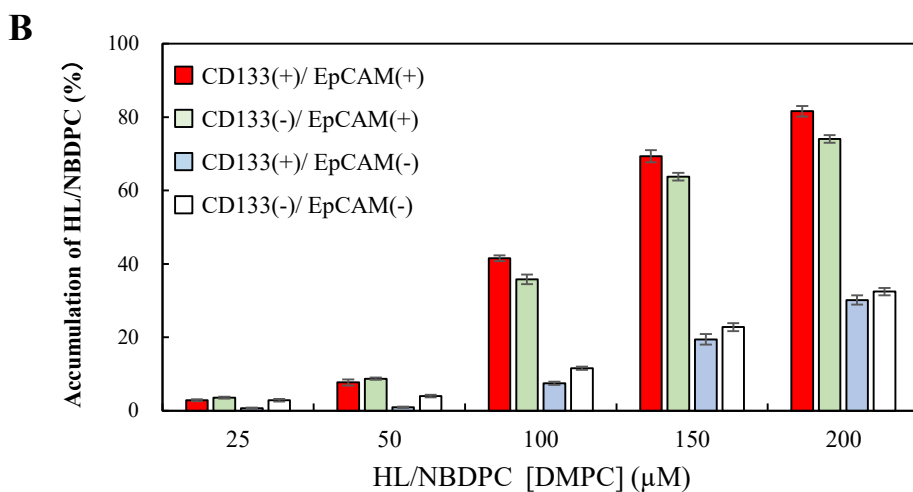
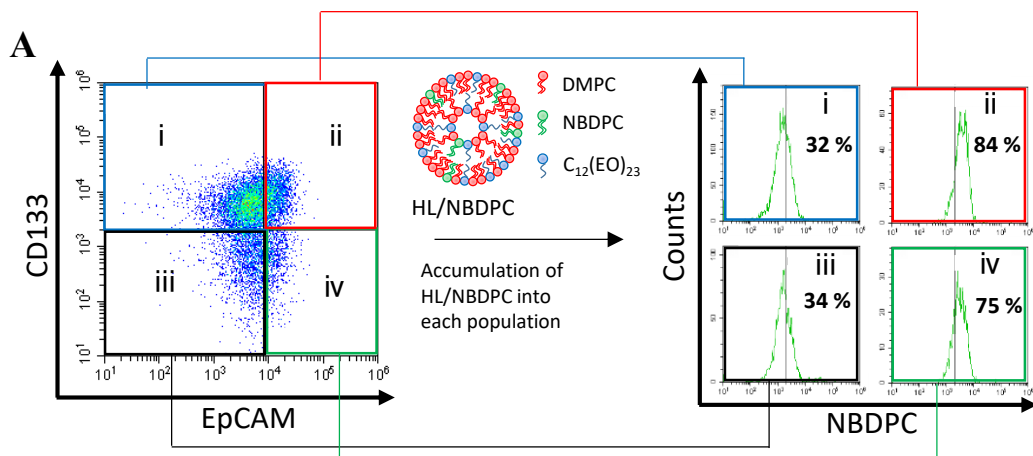


Fig.3-17 HepG2 細胞における CD133/EpCAM の発現が HL/NBDPC の蓄積に与える影響

- (A) HL/NBDPC で 1 h 処理し、(i):CD133(+)/EpCAM(-), (ii): CD133(+)/EpCAM(+), (iii): CD133(-)/EpCAM(-), (iv): CD133(-)/EpCAM(+)^{の 4 集団で HL/NBDPC 蓄積の解析を行い、例として HL/ NBDPC 200 μM, 1 h 処理のものを挙げた}
- (B) 各細胞集団における HL/NBDPC の蓄積の割合 (n=3)

3-4 総括

がん細胞中に存在するがん幹細胞の存在は、がんの治療において大きな障害となっており、がん幹細胞の根絶が重要なことであると考えられる。しかしながら、がん幹細胞は外科的療法では排除しにくく、さらに効果的な化学療法剤の開発も充分とは言えないことが現状である。本章では、肝がん幹細胞を選択的に排除するナノ粒子抗がん剤として HL を使用し、その効果について検証を行った。結論として、HL は肝がん細胞である HepG2 細胞中の肝がん幹細胞に対して選択的に増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。新しい知見は以下の通りである。

1. DOX は肝がん細胞(HepG2 細胞)と正常な肝細胞(Hc 細胞)共に増殖抑制効果を示して選択性が無い。一方、HL は HepG2 細胞に対してのみ Caspase-3 を介するアポトーシス誘導型の細胞死により選択的に増殖を抑制した。
2. HL は濃度依存的に、HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)を示す肝がん幹細胞集団を選択的に阻害した。一方、DOX は濃度依存的に CD133(+)/EpCAM(+)集団の割合が高まり、薬剤耐性を示した。
3. 腫瘍原性評価の結果では、DOX 処理では十分な腫瘍原性能の抑制効果が観測されなかったが、HL 処理によって HepG2 細胞のコロニー形成能を明らかに抑制した。
4. HL は HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)集団へ有意に蓄積し、肝がん幹細胞へ選択的に作用することが示唆された。

以上の結果は、HL が肝がん治療において肝がん幹細胞を標的とする新規なナノ粒子抗がん剤であることを示唆している。

HL ががん幹細胞に作用する機構の詳細について、未だ不明な点が多い。しかしながら、がん幹細胞の多様性やがん細胞の分化度、さらに正常細胞との物理的性質の違いなどが関与することが考えられる。これまでに判明している知見として、HL は正常細胞とがん細胞の細胞膜の流動性を区別し、細胞膜流動性の大きいがん細胞へ優先的に蓄積することが明らかとなっている¹⁰³⁾。また、他の研究では、正常な幹細胞の細胞膜は分化が進んだ細胞よりも流動性が大き

いことが報告されている¹⁰⁴⁾。これらのことを踏まえると、がん細胞でも分化度が低いがん幹細胞の方が高い流動性を示し、HLが作用しやすい膜環境にあることが推察される。そのため、今後のHLを用いたがん幹細胞抑制に関する研究の課題点として、作用メカニズムの解明のために、がん幹細胞と非がん幹細胞の流動性について検討する必要があると考えられる。

第4章 総論

がん治療において、三大療法と言われる外科療法・放射線療法・化学療法の中で、固形がんおよび全身性のがんへ効果が期待できる治療法は化学療法だと言われている^{11,12)}。しかしながら、がん化学療法において薬剤耐性の獲得とがん幹細胞の存在は、抗がん剤の効果が低下するため致命的な問題となる。さらに、薬剤耐性に対抗して抗がん剤の投与量や種類を増やすことで副作用が大きくなり、治療における患者のQOL(Quality of life)が低下することも考えられる。また、がんは高齢化と共にそのリスクが上昇する病気であり、日本は世界でも類を見ない超高齢化社会(国の総人口のうち65歳以上が21%を超える社会)に突入している¹⁰⁵⁾。そのため、今後も日本人にとって、がんは身近な病であることは依然として変わらないと予測される。

また、抗がん剤に限らず医薬品の開発は、新規候補化合物の選定から販売までを考えると、10年以上の長い開発期間と数百億円もの費用が掛かる一大プロジェクトである(Fig.4-1)。新薬を開発する製薬会社は、膨大な人員および開発費を費やし、文字通り社運をかけて取り組むことになるが、実際のところ新薬の市販化まで辿り着く医薬品はごく僅かであるため、医薬品開発は非常にリスクが高いものである¹⁰⁶⁾。その原因の一端は、候補化合物の選定を担う細胞実験で得られた知見と体内動態が反映される前臨床試験(動物実験)や臨床試験(ヒトへの治験)で得られる知見のギャップにあると考えられる。

まず、第1のギャップは、細胞レベルの候補化合物スクリーニングと動物実験の間に起こり得る。現在の候補化合物のスクリーニングでは、細胞をdish(またはplate)の上で二次元培養(2D培養)し、その細胞に候補化合物を曝露させている。2D培養によるスクリーニングは昔から実施されており、簡便であるが、近年では実際の生体内とは大きく異なることが明らかとなっている。例えば、抗がん剤のスクリーニングの際に培養するがん細胞を2D培養すると、薬剤耐

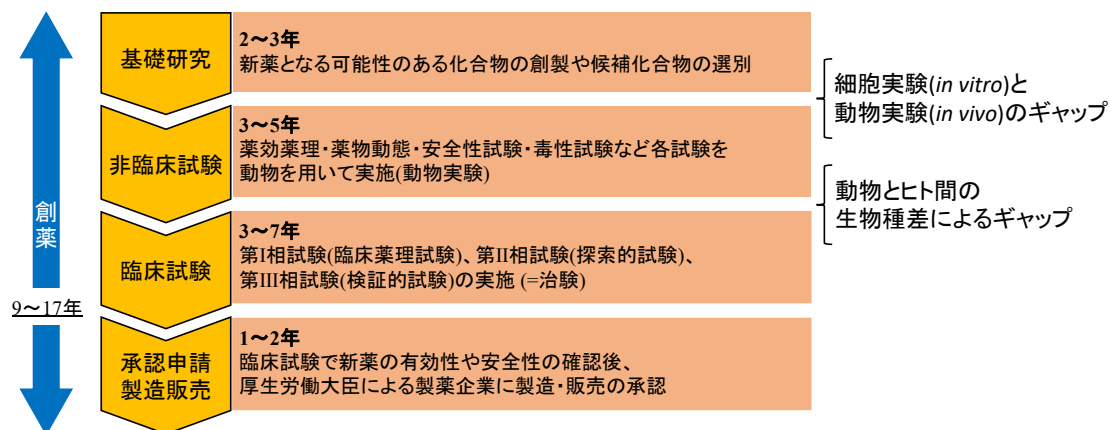


Fig.4-1 医薬品開発の流れと開発における問題点

性に関する MDR1 の発現が低く^{73, 82)}、細胞実験で有効性を示せても動物実験で有効性を示さない可能性が考えられる。そのため、近年では細胞実験(*in vitro*)でいかに生体内(*in vivo*)を正確に模倣できるかが重要な課題であり、*in vivo*の結果を予測評価可能な細胞ベース(*in vitro*)評価系の開発とその有用性を示す検証が必要である。

第 2 のギャップとして考えられることは、ヒトと他の動物で医薬品の体内代謝が異なることである。現在、ヒトと実験動物(例えば、マウスなど)では、薬物代謝の主たる臓器である肝臓に存在する代謝酵素の分子種や発現遺伝子種が異なることが判明しているが^{74,75)}、この実験動物を用いた試験法が主流で標準化されているために、多くの候補化合物が動物実験で有効性を示さず脱落する。そのため、前述した第 1 のギャップと第 2 のギャップを埋めるためにも、細胞ベースの評価系ではヒトの細胞を三次元培養(3D 培養)して生体内に近い環境を模倣して、その機能発現をもって有用な候補化合物を選定し、必要最低限の動物実験を実施して効果と安全性の試験を実施することが必要である。

また近年、主に動物愛護の観点から、化粧品材料の安全性試験に対して、動物実験代替法の促進が世界的な潮流となっている。動物実験代替法は、Replacement(動物を用いない代替法への置換)、Reduction(動物数の削減)、Refinement(動物に対する苦痛の軽減)から成る 3R の原則に則っている。動物実験における 3R は 1959 年にイギリスの研究者である Russell と Burch により提唱され、近年では実験動物福祉に関係する各国の法律や指針だけでなく、国際基準や国際指針に採用されている^{107,108)}。EU では 2013 年 3 月に発効した規制により、化粧品開発に動物実験を用いることが禁止され¹⁰⁹⁾、化学物質についても欧州の化学物質の登録、評価、認可及び制限に関する規則(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals : REACH)や米国の改正有害物質規制法(Toxic Substances Control Act : TSCA)に動物実験代替法の利用が明

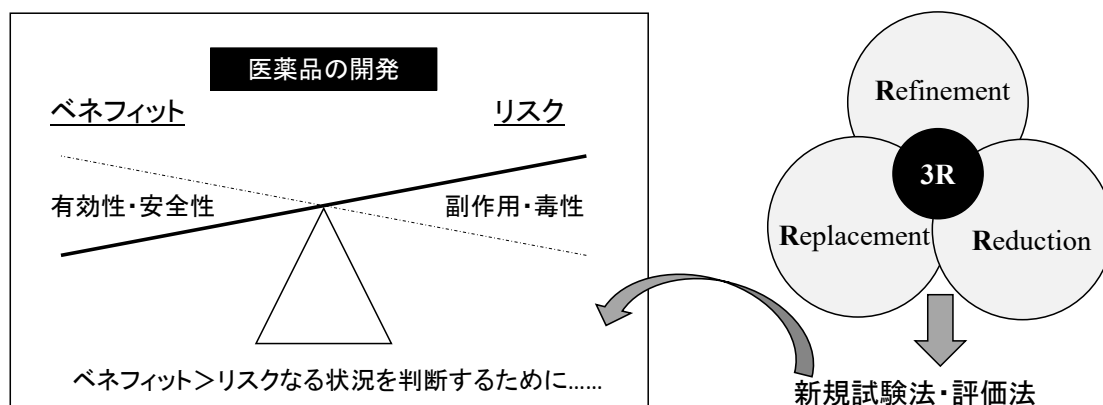


Fig.4-2 レギュラトリーサイエンスと 3R の原則

記されるなど、世界的にも実験動物を用いない試験法を利用せざるを得ない状況になっている^{110,111)}。日本でも、1973年に制定された「動物の愛護及び管理に関する法律」が2005年に改正された際に3Rの理念が明文化されており、国の方針となっている。しかしながら、ヒトが服用して薬効薬理を示す医薬品において、動物実験は医薬品の体内動態や効能を知る上で必要不可欠な道である。仮に動物実験を完全に根絶した場合、生体内で効果や副作用が不明瞭なまま、怪しい人体実験を行うことになるため、倫理感および科学的根拠が欠落してしまう。そこで、レギュラトリーサイエンスという考えがある。レギュラトリーサイエンスは、「科学技術の成果を人と社会に役立てることを目的に、根拠に基づいた確かな予測、評価、判断を行い、科学技術の成果を人と社会との調和の上で最も望ましい姿に調整するための科学」とされ、2014年に制定された健康医療戦略推進法においてレギュラトリーサイエンスの振興を図ることが決められた^{112,113)}。つまり、医薬品の開発には有効性(ベネフィット)と安全性(リスク)を天秤にかけ、その判断を科学的根拠に基づき評価する必要がある。上述した2つのギャップを埋めるためには、医薬品開発を進める上でも、このレギュラトリーサイエンスの考え方に則った動物実験代替法の推進が必要であると思われる。

さらに、がん化学療法で使用される抗がん剤は、いくつかの種類に分けられるが、共通の問題点として薬剤耐性の獲得が挙げられる。近年では、従来の抗がん剤とは異なる作用機序に着目し、2000年以降から分子標的薬が開発・使用されるようになり、副作用が低減され今となっては主流になりつつある⁴⁸⁾。選択性が高く、副作用の少ない分子標的薬が次々と開発される中、それに伴って判明したことがある。それは、やはり臨床での薬剤耐性の出現である⁴⁹⁾。しかも、新規な分子標的薬に対する薬剤耐性は、従来の抗がん剤で起きたメカニズムよりも膨大で複雑な耐性を生む可能性があり、より一層がん治療の困難さが生じることが懸念される。中でも、がん幹細胞の存在は重大であり、抗がん剤に対する耐性獲得の際に、分化(幹細胞の性質)というファクターが加わることが、より悪性度の高いがんを生む原因となる。そのため、臨床試験の前に基礎研究レベルにおいて先駆的かつ網羅的な新薬候補化合物の薬剤耐性メカニズムの解明や克服およびがん幹細胞を根絶し得る薬剤の選定が必要であると考えられる。

本論文では、がん化学療法において障害となる薬剤耐性について、医用工学的アプローチをもって検討したものである。以下に各章で得られた知見について総括する。

第2章では、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たことについてまとめた。その結果、まず *in vitro* において、肝がん細胞(HepG2 細胞)を二次元培養(2D 培養)すると抗がん剤(DOX)に対する IC₅₀ 値が低く、2D 培養による薬剤耐性克服薬のスクリーニングは有効な薬物の選定が困難である可能性が示された。一方で、シリカ系ファイバーである三次元培養担体 Cellbed を用いて三次元培養(3D 培養)することで、HepG2 細胞の DOX に対する IC₅₀ 値が高まり、さらに DOX の細胞外排出活性高くなることが示された。この事実は、2D 培養では MDR1 等の薬剤耐性に関与する薬剤排出タンパク質などの発現が小さいが、3D 培養により MDR1 等の発現が多くなり、*in vitro* で薬剤耐性現象が再現できたものと考えられる。加えて、既存の MDR1 阻害薬である VRP 処理により、薬剤耐性克服現象について *in vitro* で検討したところ、DOX の IC₅₀ 値が低下し、排出活性が抑制されたことが確認された。そのため、Cellbed による 3D 培養は *in vitro* で薬剤耐性克服現象を再現できる新規なスクリーニング法を提供できる可能性が示唆された。

次の段階として、この細胞ベースの *in vitro* のアッセイ系が *in vivo* で起こる薬剤耐性現象と薬剤耐性克服現象を再現し得るか検証するために、*in vitro* と同じ肝がん細胞(HepG2 細胞)を用いた皮下移植モデルマウスを作成し、同じ抗がん剤(DOX)と薬剤耐性克服薬(VRP)を用いて動物実験を実施した。その結果、皮下移植モデルマウスに副作用が見られない DOX 濃度(1 mg/kg, i.v.)において、腫瘍体積が未治療群と比較して治療効果が無く、DOX に対する薬剤耐性現象が起きたと考えられた。さらに、同様の皮下移植モデルマウスに VRP(25 mg/kg, i.p.)と DOX(1 mg/kg, i.v.)を併用して投与することで、未治療群と比較して顕著な腫瘍の増殖阻害が確認され、薬剤耐性克服現象が観測されたものと考えられる。

最後に、薬剤耐性に関与する MDR1 の免疫染色を *in vitro*(Cellbed による 3D 培養)と *in vivo*(腫瘍)で実施して比較した。結果として、*in vitro* と *in vivo* 共に細胞と細胞の接着部分に MDR1 の発現が局在して発現することが示された。このことは、Cellbed による 3D 培養(*in vitro*)と動物実験(*in vivo*)では、共に MDR1 に依存した薬剤耐性を発現するため、MDR1 阻害薬(薬剤耐性克服薬)のスクリーニングを実施する際に有効な薬物の選定が可能であると考えられる。結論として、がんを克服するための薬剤耐性克服薬の開発において、本細胞ベースの 3D 培養アッセイ系は非臨床試験の結果をも想定した有望なものになり得ると考えられる。

第3章では、肝がん細胞中に存在する肝がん幹細胞のフローサイトメトリー解析手法を確立し、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)による肝がん幹細胞の増殖抑制効果について検討した。まず、HL と臨床で

使われている抗がん剤(DOX)を、肝がん細胞(HepG2 細胞)対して処理し、がん細胞の増殖抑制効果、肝がん幹細胞率、腫瘍原性能について検証した。その後、肝がん細胞マーカーである CD133 と EpCAM の発現と HL の蓄積の選択性についての検討も行った。

最初に、DOX と HL 処理による HepG2 細胞と Hc 細胞(正常な肝細胞)に対する細胞増殖の抑制効果について検討した。DOX は 0.001~0.1 μM の濃度範囲において HepG2 細胞と Hc 細胞に対して共に濃度依存的な増殖抑制効果を示し、DOX には肝がん細胞と正常な肝細胞の選択性が見られなかった。一方で、HL は 50~200 μM の濃度範囲において HepG2 細胞に対してのみ濃度依存的な細胞増殖抑制効果をし、Hc 細胞には増殖抑制効果を示さなかった。さらに、HL による増殖抑制効果はアポトーシス誘導型の細胞死であることが示されたため、HL は正常な肝細胞に悪影響を及ぼすことなく、肝がん細胞のみに選択的な増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

次に HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)を示す肝がん幹細胞集団の割合について DOX および HL 処理後に FCM 解析を行い比較した。結果として、DOX 処理した HepG2 細胞は濃度依存的(0.001~0.1 μM)に肝がん幹細胞率が上昇し、HepG2 細胞中の CD133(+)/EpCAM(+)を示す亜集団は DOX に対する薬剤耐性が高いことが示唆された。一方で HL 処理した場合は、濃度依存的(50~200 μM)に肝がん幹細胞率が減少していたため、HL は肝がん細胞の増殖抑制効果だけでなく、肝がん幹細胞を選択的に阻害する薬剤として有望であることが示された。また、同様に HepG2 細胞へ DOX および HL 処理した後の細胞の腫瘍原性能を調べるために、軟寒天コロニー形成法にて評価を行った。DOX 処理した場合、0.001~0.01 μM の濃度範囲では DOX 未処理と比較して軟寒天培地中のコロニー数が増大し、腫瘍原性能が高い細胞が濃縮したことが示された。加えて、0.001 μM ではコロニー数は減少するが、大きなコロニーを形成する細胞が残存したことから、腫瘍原性の強い細胞が排除できていないことが推察された。しかし、HL 処理した条件では濃度依存的なコロニー数の減少が観測され、特に HL 200 μM 処理では軟寒天培地中のコロニー形成すらも抑制していた。

最後に、蛍光脂質含有 HL(HL/NBDPC)を HepG2 細胞に処理し、HL の蓄積と CD133 および EpCAM の発現の関係について 3 重染色を行い、FCM 解析を行った。結果として、HL/NBDPC は 25~200 μM で 1 時間処理すると濃度依存的に HepG2 細胞へ蓄積することが確認され、さらに、CD133(+)/EpCAM(+)と CD133(-)/EpCAM(+)の細胞集団へ HL は有意に蓄積することが明らかとなった。特に、CD133(+)/EpCAM(+)の集団への蓄積の割合が最も高く、HL は肝がん幹細胞へ選択的に作用することが示唆された。結論として、HL は肝がん治療において、肝がん幹細胞を標的とする新規なナノ粒子抗がん剤として有用であることを示唆して

いる。

がん化学療法において重大な問題である薬剤耐性を克服するにあたり、非臨床試験(*in vivo*)や臨床試験(ヒトへの治験)を予測可能な細胞ベースの評価系や副作用が少なく根治が期待できる抗がん剤の開発が望まれる。本論文では、がん化学療法において医用工学的観点からアプローチし、化学療法の問題点とされる薬剤耐性に着目して検討を行った。内容として、薬剤耐性克服薬スクリーニングのための非臨床試験(*in vivo*)を予測可能な新規な細胞ベースアッセイ系の開発、および肝がん幹細胞を標的とする新規な抗がん剤の開発について論じた。これらの新規な細胞ベースアッセイ系や抗がん剤の開発における知見は、医薬品開発の効率化やがんの根治に大きく貢献し、有益なものであると考えられる。

近年では、医療技術の発達や研究の進歩により、がんの完治が現実的なものになりつつある。しかしながら、全ての人にその恩恵が当てはまるものではない。そのため、少しでも早く、なるべく多くの人が、救われるために医療の発展と普及が進むことを切に願う。

参考文献

- 1) M. Rebutti, C. Michiels, *Biochem. Pharmacol.*, **85**, 1219-1226 (2013).
- 2) B. Mansoori, A. Mohammadi, S. Davudian, S. Shirjang, B. Baradaran, *Adv. Pharm. Bull.*, **7**, 339-348 (2017).
- 3) H. C. Zheng, *Oncotarget*, **8**, 59950-59964 (2017).
- 4) J. C. Chang, *Medicine*, **95**, S20-25 (2016).
- 5) S. Colak, J. P. Medema, *FEBS J.*, **281**, 4779-4791 (2014).
- 6) L. N. Abdullah, E. K. Chow, *Clin. Transl. Med.*, **2**, 1-9 (2013).
- 7) 国立がん研究センター がん情報サービス がんて死亡する確率～累積死亡リスク(2017年データに基づく), https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html, 2019年1月閲覧
- 8) A. Sudhakar, *J. Cancer Sci. Ther.*, **1**, 1-4 (2009).
- 9) 蘆川桂洲, 「病名彙解」 (1686).
- 10) E. J. Odes1, P. S. Randolph-Quinney, M. Steyn, Z. Throckmorton, J. S. Smilg, B. Zipfel, T. N. Augustine, F. Beer, J. W. Hoffman, R. D. Franklin, L. R. Berger, *S. Afr. J. Sci.*, **112**, 1-5 (2016).
- 11) M. Arruebo, N. Vilaboa, B. Gutierrez, J. Lambea, A. Tres, M. Valladares, A. Fernández, *Cancer*, **3**, 3279-3330 (2011).
- 12) 国立がん研究センター がん情報サービス がんの治療方法, https://ganjoho.jp/public/dia_tre/treatment/index.html, 2019年1月閲覧
- 13) Y. A. Luqmani, *Med. Princ. Pract.*, **1**, 35-48 (2005).
- 14) 国立がん研究センター がん情報サービス 薬物療法(化学療法), https://ganjoho.jp/public/dia_tre/treatment/drug_therapy.html, 2019年1月閲覧
- 15) V. T. DeVita, E. Chu, *Cancer Res.*, **68**, 8643-8653 (2008).
- 16) 中原 保裕, 「優しい薬理メカニズム」, *Gakken*, 159-164 (2015).
- 17) 赤池 昭紀, 石井 邦雄, 「最新薬理学」, 廣川書店, 601-622 (2012).
- 18) 抗悪性腫瘍剤 アドリアシン® 医薬品インタビューフォーム, 2017年9月改訂
- 19) J. V. McGowan, R. Chung, A. Maulik, I. Piotrowska, J. M. Walker, D. M. Yellon, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **31**, 63-75 (2017).
- 20) T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **79**, 285-296 (1988).
- 21) 中村祐輔, 稲澤讓治, 監修「がんの診断と治療」, 東京大学出版, 188-190 (2006).
- 22) T. Sakai, *Folia. Pharmacol. Jpn.*, **127**, 342-347 (2006).
- 23) R. Gorlick, E. Goker, T. Trippett, *Cancer Res.*, **335**, 1041-1048 (1996).

- 24) R. J. Schilder, L. Hall, A. Monks, *Int. J. Cancer*, **45**, 416-422 (1990).
- 25) C. M. Galmarini, J. R. Mackey, C. Dumontet, *Leukemia*, **15**, 875-890 (2001).
- 26) S. L. Gerson, J.K. Willson, *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, **9**, 431-450 (1995).
- 27) K.D. Tew, *Cancer Res.*, **54**, 4313-4320 (1994).
- 28) T. Tsuruo, M. Naito, A. Tomida, N. Fujita, T. Mashima, H. Sakamoto, N. Haga, *Cancer Sci.*, **94**, 15-21 (2003).
- 29) M. Gottesman, I. Pastan, *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 385-427 (1993).
- 30) H. Hamada, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1454-1458 (1988).
- 31) H. Hamada, T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **48**, 4926-4932 (1988).
- 32) M. Naito, H. Hamada, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, **263**, 11887-11891 (1988).
- 33) A.R. Safa, C.J. Glover, J.L. Sewell, et al., *J. Biol. Chem.*, **262**, 7884-7888 (1987).
- 34) M. Naito, T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **49**, 1452-1455 (1989).
- 35) M. Dean, Y. Hamon, and G. Chimini, *J. Lipid Res.*, **42**, 1007-1017 (2001).
- 36) 谷口直之, 大島明, 鈴木敬一郎 監訳, 「がんのベーシックサイエンス」 第3版, MEDSI社, 428-450 (2006).
- 37) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, Y. Sakurai, *Cancer Res.*, **41**, 1967-1972 (1981).
- 38) T. Tsuruo, H. Iida, S. Tsukagoshi, et al. *Cancer Res.*, **42**, 4730-4733 (1982).
- 39) A. Ramu, Z. Fuks, S. Gatt, et al. *Cancer Res.*, **44**, 144-148 (1984).
- 40) R. Ganapathi, D. Grabowski, *Cancer Res.*, **43**, 3696-3699 (1983).
- 41) T. Tsuruo, *Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells*, Plenum Press, New York (1990).
- 42) K. Yusa, T. Tsuruo, *Cancer Res.*, **49**, 5002-5006 (1989).
- 43) T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri, J. E. Dick, *Nature*, **367**, 645-648 (1994).
- 44) D. Bonnet, J. E. Dick, *Nat. Med.*, **3**, 730-737 (1997).
- 45) S. Dawood, L. Austin, M. Cristofanilli, *Oncology*, **28**, 1101-1107 (2014).
- 46) H. Qiu, X. Fang, Q. Luo, G. Ouyang, *Cell Mol. Life Sci.*, **72**, 3411-3424 (2015).
- 47) W. T. Kim, C. J. Ryu, *BMB Rep.*, **50**, 285-298 (2017).
- 48) 曾根三郎, 鶴尾隆, 「がん分子標的治療研究実践マニュアル」 第1版, KINPODO, 6-7 (2009).
- 49) K. Noguchi, *YAKUGAKU ZASSHI*, **137**, 151-160 (2017).
- 50) R. Ueoka, R. A. Moss, S. Swarup, Y. Matsumoto, G. Straus, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2185-2186 (1985).
- 51) R. Ueoka, Y. Matsumoto, R. A. Moss, S. Swarup, A. Sugii, K. Harada, J. Kikuchi, Y. Murakami, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588-1595 (1988).
- 52) Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **55**, 5797-5800 (1990).

- 53) R. Ueoka, H. Dozono, Y. Matsumoto, M. Cho, K. Kitahara, Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 219-220 (1990).
- 54) R. Ueoka, E. Yamada, O. Yamashita, Y. Matsumoto, Y. Kato, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 6597-6600 (1991).
- 55) K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *J. Org. Chem.*, **60**, 3342-3346 (1990).
- 56) O. Tanoue, M. Baba, Y. Tokunaga, K. Goto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Tetrahedron Lett.*, **40**, 2129-2132 (1999).
- 57) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Oyama, H. Takekuma, M. Ito, *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 4640-4643 (1998).
- 58) Y. Matsumoto, E. Yamada, J. Hirano, M. Iwahara, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 213-215 (1993).
- 59) I. Kitamura, M. Kochi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, J. Kuratsu, Y. Ushio, *Cancer Res.*, **56**, 3986-3992 (1996).
- 60) R. Ueoka, Y. Matsumoto, *Bio. Industry.*, **10**, 221-227 (1993).
- 61) Y. Matsumoto, C. Imamura, T. Ito, C. Taniguchi, R. Ueoka, *Bio. Pharm. Bull.*, **18**, 1456-1458 (1995).
- 62) A. Kanno, K. Tsuzaki, M. Miyagi, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013-1014 (1999).
- 63) H. Nagami, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **315**, 167-172 (2006).
- 64) R. Ueoka, Y. Matsumoto, H. Ichihara, T. Kiyokawa, *Am. Chem. Soc. Books*, **830**, 177-189 (2002).
- 65) K. Nakano, Y. Iwamoto, W. Takata, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251-3254 (2002).
- 66) C. Imamura, Y. Kemura, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Biol. Chem. Bull.*, **20**, 1119-1121 (1997).
- 67) Y. Matsumoto, T. Kato, Y. Kemura, M. Tsuchiya, M. Yamamoto, R. Ueoka, *Chem. Lett.*, **28**, 53-54 (1999).
- 68) Y. Iwamoto, Y. Matsumoto, R. Ueoka, *Int. J. Pharm.*, **292**, 231-239 (2005).
- 69) Y. Matsumoto, Y. Iwamoto, T. Matsushita, R. Ueoka, *Int. J. Cancer*, **115**, 377-382 (2005).
- 70) T. Tatsuta, M. Naito, T. Oh-hara, I. Sugawara, T. Tsuruo, *J. Biol. Chem.*, **267**, 20383-20391 (1992).
- 71) X. F. Hul, A. Slater, D. M. Wall, P. Kantharidis, J. D. Parkin, A. Cowman, J. R. Zalcberg, *Brit. J. Cancer*, **71**, 931-936 (1995).
- 72) K. Katayama, K. Noguchi, Y. Sugimoto, *New J. Sci.*, **2014**, 476974-1-10 (2014).
- 73) A. Oshikata, T. Matsushita, R. Ueoka, *J. Biosci. Bioeng.*, **111**, 590-593 (2011).

- 74) M. J. Graham, B. G. Lake, *Toxicology*, **254**, 184-191 (2008).
- 75) M. Martignoni, G. M. Groothuis, R Kanter, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**, 875-894 (2006).
- 76) R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, L. Yang, *Assay Drug Dev. Technol.*, **12**, 207-218 (2014).
- 77) K. M. Yamada, E. Cukierman, *Cell*, **130**, 601-610 (2007).
- 78) D. A. Senthebane, A. Rowe, N. E. Thomford, H. Shipanga, D. Munro, M. A. M. A. Mazeedi, H. A. M. Almazayadi, K. Kallmeyer, C. Dandara, M. S. Pepper, M. I. Parker, K. Dzobo, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, E1586 (2017).
- 79) M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, F. D. Solomon, *J. Cell Physiol.*, **230**, 16-26 (2015).
- 80) Y. Yamaguchi, D. Deng, Y. Sato, Y. Hou, R. Watanabe, K. Sasaki, M. Kaawabe, E. Hirano, T. Morinaga, *Anticancer Res.*, **33**, 5301-5310 (2013).
- 81) T. Horibe, A. Torisawa, R. Kurihara, R. Akiyoshi, Y. Hatta-Ohashi, H. Suzuki, K. Kawakami, *Integr. Cancer Sci. Therap.*, **2**, 291-299 (2015).
- 82) T. Mizutami, Y. Ohta, M. Nakamura, Y. Komizu, T. Iwasa, K. Sasaki, R. Watanabe, M. Kawabe, T. Matsushita, *Adv. Biochem. Biotechnol.*, **112**, 1-5 (2017).
- 83) S. Okada, H. Harada, T. Ito, T. Saito, S. Suzu, *Int. J. Hematol.*, **88**, 476-482 (2008).
- 84) S. Okada, *Cytometry Research*, **27**, 25-31 (2017).
- 85) F. Cundong, Z. Weijie, F. Xiaoyan, L. Xiaoling, W. Yum-Shing, C. Tianfeng, *Oncotarget*, **5**, 2853-2863 (2014).
- 86) C.-S. Hu, S.-L. Tang, C.-H. Chiang, H. Hosseinkhani, P.-D. Hong, M.-K. Yeh, *J. Nanopart. Res.*, **16**, 2672-z (2014).
- 87) M. Wei, X. Guo, L. Tu, Q. Zou, Q. Li, C. Tang, B. Chen, Y. Xu, C. Wu, *Int. J. Nanomedicine*, **10**, 5123-5137 (2015).
- 88) F. Formelli, L. Cleris, R. Carsana, *Cancer. Chemoth. Pharm.*, **21**, 329-336 (1988).
- 89) A-M. M. Osman, M. A. Mohamad, A-H. A. Abdel-Wahab, M. M. Sayed-Ahmad, *J. Egyptian Nat. Cancer Inst.*, **12**, 221-227 (2000).
- 90) H. Wang, X. Li, T. Chen, W. Wang, Q. Liu, H. Li, J. Yi, J. Wang, *Oncol. Res.*, **29**, 676-684 (2013).
- 91) M. Prieto-Vila, R. Takahashi, W. Usuba, I. Kohama, T. Ochiya, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2574-2596 (2017).
- 92) J. M. Hubbard, A. Grothey, *Drugs*, **77**, 1091-1103 (2017).
- 93) D. J. Jonker, L. Nott, T. Yoshino, S. Gill, J. Shapiro, A. Ohtsu, J. Zalcberg, M. M. Vickers, A. C. Wei, Y. Gao, N. C. Tebbutt, B. Markman, T. Price, T. Esaki, S. Koski,

- M. Hitron, W. Li, Y. Li, N. M. Magoski, C. J. Li, J. Simes, D. Tu, C. J. O'Callaghan, *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.*, **3**, 263-270 (2018).
- 94) T. Yamashita, S. Kaneko, *J. Gastroenterol.*, **49**, 1105-1110 (2014).
- 95) J. H. Sun, Q. Luo, L. L. Liu, G. B. Song, *World J. Gastroenterol.*, **22**, 3547- 3557 (2016).
- 96) Y. Chen, D. Yu, H. Zhang, H. He, C. Zhang, W. Zhao, R. Shao, *Int. J. Biol. Sci.*, **8**, 992-1004 (2012).
- 97) N. B. Vu, T. T. Nguyen, L. C. Tran, C. D. Do, B. H. Nguyen, N. K. Phan, P. V. Pam, *Cytotechnology*, **65**, 491-503 (2013).
- 98) Y. Xiao, M. Lin, X. Jiang, J. Ye, T. Guo, Y. Shi, X. Bian, *Anal. Cell Pathol.*, **2017**, 5108653-1-9 (2017).
- 99) 中内 啓光監修, 「細胞工学別冊 フローサイトメトリー自由自在」, 秀潤社, 3-5 (1999).
- 100) 天神 美夫, 「応用サイトメトリー」, 医学書籍, 20-24 (2000).
- 101) 日本サイトメトリー技術者認定協議会編, 「スタンダードフローサイトメトリー」, 医歯薬出版, 1-6 (2009).
- 102) 日本組織培養学会編, 「組織培養の技術 [基礎編] 第 3 版」, 朝倉書店, 61-62 (1996).
- 103) Y. Komizu, H. Ueoka, R. Ueoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **418**, 81-86 (2012).
- 104) P. Noutsis, E. Gratton, S. Chaieb, *PLoS One*, **11**, e 0158313 (2016).
- 105) 厚生労働省 平成 30 年 我が国の人口動態, <https://www.mhlw.go.jp/english/database/db-hw/dl/81-1a2en.pdf>, 2019 年 1 月閲覧
- 106) 八木 崇, 大久保 昌美, 医薬品開発の期間と費用, *JPMA News Letter*, 33-35 (2010).
- 107) W.M.S. Russell, R.L. Burch, “The Principles of Humane Experimental Technique”, http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc, 2019 年 1 月閲覧
- 108) CIOMS and ICLAS (Council for International Organizations of Medical Sciences and International Council for Laboratory Animal Science), International guiding principles for biomedical research involving animals, www.iclas.org, 2019 年 1 月閲覧
- 109) European Commission, Ban on Animal Testing, http://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/animal-testing_en, 2019 年 1 月閲覧
- 110) A. Menache, C. Nastrucci, *Medicolegal and Bioethics*, **2012**, 13-29 (2012).

- 111) N. Burden, C. Mahony, B. P. Müller, C. Terry, C. Westmoreland, I. Kimber, *Toxicology*, **330**, 62-66 (2015).
- 112) 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構, レギュラトリーサイエンス推進業務, <https://www.pmda.go.jp/rs-std-jp/outline/0001.html>, 2019年1月閲覧
- 113) K. Tsukamoto, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **148**, 4-8 (2016).

謝 辞

本論文は、崇城大学院 工学研究科 応用生命科学専攻 医用生体工学講座 松下研究室において、松下琢教授、古水雄志准教授のご指導の下、博士後期課程 3 年間で行った研究をまとめたものである。

本研究の遂行にあたり、終始御親切な御指導ならびに御鞭撻を賜り、本論文を作成する上でも始終御指導下さいました松下琢教授に謹んで感謝致します。また、同研究室で終始御親切な指導並びに多大な御助力を承りました古水雄志准教授に深く感謝致します。

本研究の遂行および論文作成にあたり、終始な御親切な御指導ならびに御鞭撻を賜りました松本陽子教授に心より深く感謝致します。

本論文を作成するにあたり、友重竜一教授に貴重な御教示ならびに御助言を賜りました。ここに心より深く感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、貴重な御教示ならびに御助言を頂きました後藤浩一教授に謹んで感謝致します。

本研究を遂行および論文を作成するにあたり、適切な御教示ならびに御助言を頂きました市原英明教授に心より感謝致します。

本研究は、日本バイリーン(株)との共同研究です。Cellbed[®]の作製および御提供、切片サンプルの作製と染色、第 2 章の内容について御助言を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究は、厚生労働省国立医薬品食品衛生研究所の石田誠一博士との共同研究です。第 3 章の内容について御助言および御意見を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

講義またはセミナー等を通じて、本学応用生命科学専攻の諸先生方には多大な御教示ならびに御助言を頂きましたことを謹んで感謝を申し上げます。

優れた研究成果を残していかれた先輩方をはじめ、苦楽を共にしてきた同研究室の学生諸氏や協力して頂いた松本研究室の学生諸氏、に深く感謝致します。特に、水民敬浩博士研究員、桑原啓司博士研究員、奥村真樹君、元村宗誠君、山口茉未さん、白木明日香さん、中村茉耶さん、長崎花佳さん、柄本和実さん、我那覇一冨君、坂田望君には、実験面ならびに私事的に大変お世話になり、厚く御礼申し上げます。

最後になりますが、長い間勉学に努める機会と多大なる経済的支援を与えてくれた祖父、祖母、母、弟に心より感謝致します。