

## 論文要旨

区分	甲	氏名 稲村 恒亮
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		
論文の要旨		
<p>臨床において抗がん剤が効かなくなる耐性化の現象は広く認められている。この耐性は、がん患者の生体反応に原因がある場合と、がん細胞レベルの生化学的変化に原因がある場合がある。このうちがん細胞レベルの生化学的な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、薬剤耐性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、結果として耐性化が起こることが考えられる。</p>		
<p>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 <i>in vitro</i> での再現と、その <i>in vivo</i> 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。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の増殖抑制効果について検討を行った。</p>		
<p>がん細胞は、<i>in vivo</i> 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、市販されている三3D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 <i>in vitro</i> 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。そこで実際に、3D培養におけるDOXの細胞外排出について検討した。DOX 50 μMで1時間処理して細胞にDOXを取り込ませ、VRPの存在下または非存在下で経時的にDOXの排出を測定した結果、測定30分後からDOXの流出は明らかにVRPによって阻害されており、VRPのMDR1活性を阻害することによる薬剤耐性克服現象を、<i>in vitro</i> で再現することに成功した。</p>		

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ナノメディカル治療剤となりうることを示された。がん幹細胞は薬剤耐性も高いことが報告されており、これらの成果は、今後のがん化学療法課題の一つである薬剤耐性を解決する上で、大変有益な知見であると思われる。今後の普及と実用化が期待される。