

平成 26 年 2 月 14 日

崇城大学大学院

工学研究科委員会




研究科長 塩谷 捨明 殿

論文審査委員

主査 松本陽子



## 論文審査結果の報告 (甲)

論文提出者	曹 娥 (1119D01)
論文題名	天然素材を用いたがん治療に関する基礎研究
審査委員	主査 教授 松本陽子 
	副査 教授 後藤浩一 
	副査 教授 寺本祐司 

## 論文審査結果の要旨

がんは、日本において 1981 年より死因の第 1 位で、現在では、年間 35 万人以上が、がんで亡くなっている。2011 年の部位別のがん死亡者数は、男女とも消化器系のがん(胃、大腸、肝臓)と肺がんの割合が増加した。がん治療においては、外科療法では患部の痛み及び後遺症、放射線療法では食道炎、皮膚炎、肺炎等の副作用が発生する。手術後に、化学療法や放射線療法を併用する治療が行われているが、抗がん剤による嘔吐、下痢、肝臓または腎臓障害、骨髄抑制、間質性肺炎等の重篤な副作用が生じるため、多くの問題点が指摘されている。

一方、糖は細胞膜表面に存在し、細胞接着、情報伝達、ウイルス感染など重要な役割を果たしている。細胞の分化や悪性化に伴う膜表面の糖鎖の構造変化の解明は、がんの診断法の開発へと繋がっていった。ハイブリッドリポソーム(HL)は、担がんモデルマウスを用いた治療実験で、高い安全性及び顕著な治療効果が報告されており、臨床試験では、生命倫理委員会承認後の治験で高い安全性及び固形リンパ腫瘍の縮小効果が得られている。種々の糖系界面活性剤を第三成分として含有させた HL は、高い制がん効果及び安全性が報告されており、糖の水和及び糖の認識の関与が示唆されている。

本研究では、がん治療薬の開発を目指して、リン脂質(DMPC)及びトレハロース界面活性剤を構成成分とするトレハロース含有リポソーム(DMTreCn)を新規に創製し、種々のヒトがん細胞に対する増殖抑制効果及び制がんメカニズムについて検討した。

第 2 章では、DMTreCn の膜物性について検討した。トレハロース含有リポソーム DMTreCn (n=12, 14, 16)は、トレハロースの含有量により、膜直径が異なることが明らかと

なった。65~70mol% DMTreC12、40, 50, 70mol% DMTreC14、30~55mol% DMTreC16 の膜直径は、37°Cにおいて細網内皮系(RES)回避可能な 100nm 付近で、約一ヶ月間安定であり、臨床応用に適していることが示された。また、DMTreCn (n=12, 14, 16)の膜内部の流動性は、DMPC 単一リポソームよりも高いことが明らかとなった。さらに、DMTreC14 の固定水層は DMPC 単一リポソームよりも高く、TreC14 濃度依存的に DMTreC14 の固定水層が増大した。

第3章では、DMTreCn (n=12, 14, 16)の大腸がん(HCT-116)及び胃がん(MKN-45)細胞増殖抑制効果について検討した。DMTreCn (n=14, 16)はトレハロース濃度依存的にがん細胞の増殖抑制効果を示し、正常細胞に対しては影響を与えないことが明らかとなった。蛍光脂質含有リポソーム(DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC)の膜直径は RES を回避できる 100nm 以下であり、4°Cにおいて 1 ヶ月以上安定した膜を形成することが明確となった。また、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することを明らかにした。DMTreCn (n=14, 16)はトレハロース濃度依存的に DNA 断片化率の増大が見られ、各がん細胞に対してアポトーシスを誘導することが確認出来た。DMTreCn (n=14, 16)のがん細胞におけるアポトーシス誘導にカスパーズ-3, 8, 9 が関与することが明確となった。ミトコンドリア経路については、ミトコンドリア膜電位は低下せず、Bax の活性化によりミトコンドリアからシトクロム c が放出されることが確認出来た。RKIP 活性の測定結果より、DMTreC16 はがん細胞に対するアポトーシス誘導に RKIP の活性化が関与していることを明らかにした。

第4章では、DMTreCn (n=12, 14, 16)の肝臓がん(Hep-G2, HuH-7)細胞に対する増殖抑制効果について検討した。DMTreCn (n=14, 16)はトレハロース濃度依存的にがん細胞の生存率の減少が得られた。DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC は、正常肺細胞へ融合・蓄積せず、肝臓がん細胞膜及び細胞内に、特異的に経時的に蓄積することが確認出来た。また、DMTreCn (n=14, 16)は TreCn (n=14, 16)濃度依存的に DNA 断片化率が増大し、アポトーシスを誘導することが明確となった。DMTreCn (n=14, 16)の肝臓がん細胞に対するアポトーシス誘導メカニズムについては、カスパーズ-3, 8, 9 が関与することを明らかにした。ミトコンドリア経路に関しては、HuH-7 細胞の場合は、ミトコンドリア膜電位が低下したが、一方、Hep-G2 細胞では低下しなかった。しかし、Hep-G2 及び HuH-7 いずれの場合も Bax が活性化していた。さらに、DMTreC16 によるアポトーシス誘導には RKIP の活性化が関与していることが明らかとなった。

以上述べたように、65~70mol%DMTreC12、40, 50, 70mol%DMTreC14、30~55mol%DMTreC16 の膜直径は、37°Cにおいて RES 回避可能な 100nm 付近で、約一ヶ月間安定であり、臨床応用に適していることが明らかになった。DMTreCn (n=14, 16)は種々のがん細胞(HCT-116, MKN-45, Hep-G2, HuH-7)に対し、高い増殖抑制効果を示し、トレハロース濃度依存的な抑制効果が得られた。また、DMTreCn (n=14, 16)/NBDPC はがん細胞に選択的に融合・蓄積することが示された。がん細胞増殖抑制メカニズムについては、アポトーシスを誘導することが明確となった。アポトーシスシグナル伝達については、ミトコンドリアからシトクロム c の放出、カスパーズ-3, 8, 9 の活性化、Bax の活性化及び RKIP の活性化が関与することを明らかにした。以上より、トレハロース含有リポソームのがん治療薬としての可能性が示された。今後、担がんモデルマウスに対する治療効果及び安全性が確認されれば、がんに対して副作用の少ない、新しい薬剤となることが期待できる。

#### 最終試験結果の要旨

本論文において得られた知見は、新規に創製したトレハロース含有リポソームのヒトがん細胞に対する制がん効果及びアポトーシス誘導について明らかにしたものである。大腸がん、胃がん、肝臓がんなど種々のがんに対して、正常細胞には影響を及ぼさずに顕著な増殖抑制効果が示された。本研究は、医用工学の学際領域で重要な研究成果である。よって、本論文提出者は、博士(工学)の学位を得る資格があると認める。

提出論文について公開試験を行わせた後、論文内容及び関連する分野について口頭による試験を行い、専攻内会議にかけた結果、最終試験に合格したものと認めた。