

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 日 野 元 貴 （ 1119D02 ）

論文題名 難治性疾患治療薬の開発に関する研究

審査委員 主査 教授 松本 陽子 

副査 教授 松下 琢 

副査 教授 友重 竜一 

副査 准教授 市原 英明 

論文審査結果の要旨

がんの治療法には、外科療法、化学療法、放射線療法など様々な方法が用いられている。初期段階では外科療法で治療できるが、転移した場合は化学療法や放射線療法が行われる。しかし、いずれの治療法でも副作用が伴うため患者の Quality of life (QOL) が問題であり、その軽減が課題である。

一方、関節リウマチ (RA) の治療は、薬物療法中心として、手術療法、リハビリテーションなど様々な方法が用いられている。しかし、薬によっては効き始めるまでに時間がかかる、効かなくなるなどの問題がありそれらを回避するのが課題である。

ハイブリッドリポソーム (HL) は、リン脂質と界面活性剤を緩衝水溶液中で超音波照射するだけで得られる生体適合性の医用素材である。これまでに、種々の培養がん細胞に対して制がん効果を示し、担がんモデルを用いた治療実験から治療効果や肝転移抑制効果、正常動物に対する安全性が確認されている。さらに、生命倫理委員会の承認後、悪性リンパ腫や肝臓がん患者に対する治療効果が得られている。

本研究では、難治性疾患であるがんおよび RA に対する新しい治療薬の開発を目的とし、新規に創製したカチオン性脂質含有 HL の *in vitro* におけるヒト大腸がん (HCT116) 細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムの解明を行った。また、*in vivo* における肝転移モデルマウスに対する治療効果について検討した。さらに、RA 滑膜細胞に対する HL23

の増殖抑制効果および関節リウマチモデルマウスに対する治療効果を検討した。

- (1) 双性リン脂質 (DMPC)、PEG 系界面活性剤 ($C_{12}(EO)_{21}$)、カチオン性脂質 ($2C_{14}EC1$) からなる HL/ $2C_{14}EC1$ を新しく創製し、膜物性について検討した。動的光散乱法から、 37°C 保存および血清存在下の条件で膜直径約 100nm で 1 ヶ月以上安定であることが明確となった。
- (2) HL/ $2C_{14}EC1$ の HCT116 細胞に対する制がん効果について検討したところ、50%増殖抑制濃度は、DMPC 単一リポソームの約 1/3、HL の約 1/2 以下と低く、低濃度で同等の制がん効果が得られることが明らかとなった。
- (3) 制がんメカニズムについて検討したところ、細胞膜に融合・蓄積後ミトコンドリアおよびカスパーズ-3 経由し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、正常ヒト大腸細胞に対しては、融合・蓄積しないことが確認された。
- (4) HCT116 細胞肝転移モデルマウスに対して肉眼的観察、臓器重量測定および組織学的解析結果より、アポトーシスによる肝転移抑制効果が明らかとなった。また、血球には蓄積しないことが明らかとなった。以上の結果から、HL/ $2C_{14}EC1$ は血球には作用せず腫瘍まで到達し、アポトーシスを誘導することで肝転移モデルマウスに対する治療効果を示したと示唆される。
- (5) HL25 は HCT116 細胞肝転移モデルマウスに対し延命効果を示した。また、組織切片観察から腫瘍への長時間の蓄積、縮小効果およびアポトーシス誘導が観察された。以上の結果から、HL25 は肝転移モデルマウスに対して、長時間腫瘍に特異的に蓄積し、アポトーシス誘導により治療効果を示すことが明らかとなった。
- (6) HL23 の RA 滑膜細胞に対する増殖抑制効果について検討したところ、アポトーシス誘導による高い増殖抑制効果が得られた。一方、正常滑膜細胞に対しては、低毒性であることが明らかとなった。
- (7) RA 滑膜細胞に対する増殖抑制メカニズムについて検討したところ、HL23 は膜流動性の高い RA 滑膜細胞膜に融合・蓄積後ミトコンドリアおよびカスパーズ-3 を経由するアポトーシス誘導経路であることが明らかとなった。また、正常滑膜細胞に対しては、融合・蓄積しないことが確認された。
- (8) HL23 を用いた関節リウマチモデルマウスに対する治療効果を検討したところ、肉眼的観察およびスコア法から、手指関節の変形・腫れの抑制効果が得られた。また、組織学的解析から浸潤性リンパ球および炎症性サイトカイン ($\text{TNF-}\alpha$) の減少が観察された。以上の結果から、浸潤性リンパ球および $\text{TNF-}\alpha$ を減少させることにより、手指関節の変形・腫れの抑制効果を示すことが示唆された。

以上の結果より、新しく創製した HL/ $2C_{14}EC1$ の HCT116 細胞に対する制がん効果および制がんメカニズムが明らかになった。また、*in vivo* においてアポトーシス誘導による治療効果が明確になった。さらに、HL23 の RA 滑膜細胞および関節リウマチモデルマウスに対する増殖抑制効果および治療効果が明確になった。今後さらに多くの知見を蓄積し、がんおよびリウマチなどのさまざまな難治性疾患に対する副作用のない治療薬としての臨床応用を目指す予定である。

最終試験結果の要旨

本論文において得られた知見は、難治性疾患であるがん・関節リウマチに対する制がん効果および増殖抑制効果について明らかにしたものである。モデル動物に対する治療効果が *in vivo* で確認され、難治性疾患治療薬としての可能性が示された。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、論文内容および関連す

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。