

称号及び氏名 博士（工学） 李 強

学位授与の日付 2018年10月20日

論文名 「Research on wound-healing effect and anticancer effect in combination with radiation by nano-antioxidant substances
(ナノ性抗酸化物質の創傷治癒効果及び放射線との併用による抗がん効果に関する研究)」

論文審査委員 主査 古田 雅一
副査 川又 修一
副査 松浦 寛人
副査 田中 良晴

論文要旨

人体は常に酸化ストレス (Oxidative stress, OS) にさらされている。活性酸素種 (Reactive Oxygen Species, ROS) であるスーパーオキシド (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($HO\cdot$)、過酸化水素 (H_2O_2) やフリーラジカルが過剰に産生され、体内酸化還元 (Redox) システムがアンバランスとなり、多く生じた過酸化物がさまざまな細胞内器官やタンパク質、脂質、DNA に傷害を与える。その結果、ヒトの老化、がん及び多種多様な疾病が引き起こされる。ROS の除去に対して、ビタミンC、ビタミンE、グルタチオン、カロテノイド、ポリフェノールなどの伝統的な生体または天然由来の抗酸化剤が使用されているが、生体の中の水や酸素、金属がこれらの物質と反応して、強い還元性としての活性が損なわれ、また細胞膜脂質二重層に対する透過力も弱くなる。

一方、ナノテクノロジーの発達によりナノ粒子化した抗酸化素材はその微小性のために人体の奥深くの細胞まで届き、さらに疎水性物質ならば脂質二重層を透過し、容易に細胞内へ導入できることが期待される。本研究で使用したプラチナナノコロイド (Platinum nanocolloid, Pt-nc)、シリカ吸蔵固体水素 (Hydrogen-occluding silica, H₂-silica)、水素水 (Hydrogen water, HW) は、ROS と高い反応性を有し、水素を内包・吸蔵し、酸化還元反応の促進により、有効かつ標的指向性が高い抗酸化剤として最近開発されたものであり、その利用が拡大している。これらの強い還元力や発生する水素ガスの浸透性により、従来の抗酸化剤の弱点を克服できることは先行研究により確認されている。しかし、それらの素材の単独使用や放射線照射との併用によるがん細胞への殺傷効果・アポトーシス (一部の細胞があらかじめ遺伝子で決められたメカニズムまたは危険を察知した際に、なかば自殺的に脱落死する現象) 誘導効果・細胞遊走能の抑制効果、また正常細胞との比較観察、ヒト皮膚細胞の創傷治癒効果に関する研究は極めて不十分である。本研究ではこれらの点に着目して、ヒト食道扁平上皮がん細胞 (KYSE-70) とヒト正常食道上皮細胞 (HEEpiC) を用い、Pt-nc 投与とγ線照射との併用でがん細胞への殺傷効果や正常上皮細胞への毒性効果・アポトーシスの誘導効果を検証すること、H₂-silica が細

細胞の移動能力、細胞骨格の変化、アポトーシスに及ぼす影響を検証すること、HW がヒト表皮細胞ケラチノサイトと真皮細胞線維芽細胞に及ぼす影響、HW の投与による皮膚細胞の創傷治癒効果を検証することにより新規ナノサイズ抗酸化素材の新しい応用の可能性を検証することを目的とした。

本博士論文は全6章から成り、第1章では本研究の背景としてHW、Pt-nc、H₂-silicaを用いた細胞生物学及び医科学研究の必要性と背景を述べた。

第2章ではとりあげるPt-ncは全周をクエン酸ナトリウムでコーティングすることで均一に分散したコロイド化した、粒径2 nmのプラチナナノ粒子のものであり、抗酸化作用を持ちながらも、細胞分裂への抑制効果があることが知られている。Pt-ncの優れた抗酸化作用を生かし、発揮して、放射線との併用による体内の抗がん作用の有無と周囲の正常細胞に対する副作用の軽減効果について検証した。一般にがん細胞内のROS量が正常細胞より多く、このためがん細胞特有の増殖能力が生じるという説がある。これに着目して、Pt-ncをまずKYSE-70細胞に与え、3時間後、細胞内の過剰なROSを抑制して細胞の活性を低下させた状態でγ線照射を行うことにより、KYSE-70細胞に対する相乗的な殺傷効果、さらに正常細胞であるHEEpiCに対してがん細胞と同様または、逆に放射線防護効果について細胞の増殖能及びアポトーシスの誘導効果を指標として検証した。その結果、KYSE-70細胞増殖の阻害効果を有すること、さらに、Pt-ncまたはγ線が誘発した細胞形態学的なアポトーシス様変化を介して、KYSE-70細胞に相乗効果を発揮することを実証した。しかし、正常細胞HEEpiCにおけるアポトーシス様変化も線量及び濃度に応じて増え、がん細胞との明白な差異が見られなかった。

第3章では、H₂-silicaの抗がん効果を検証した。臨床において、がん細胞の移動は転移、浸潤というがんの悪性化に関わるため、がん細胞の増殖・移動を阻害し、アポトーシスを誘導することは治療手段の一つである。KYSE-70細胞とHEEpiCを実験対象にして、H₂-silicaの抗がん作用と治療効果の有無を検討した。H₂-silica投与48時間後KYSE-70細胞の増殖と移動に対する阻害効果が見出され、72時間を超えてもその阻害効果を持続したことが明らかとなった。ミトコンドリア媒介アポトーシスを誘導できる効果も確認された。HEEpiCにおいては高濃度のH₂-silicaで初めてアポトーシスを引き起こした。これらの結果は、H₂-silicaのがん細胞に対しての選択的阻害効果を示唆した。

第4章では、分子状水素に関する従来の先行研究が、創傷治癒の際に、細胞の移動能力及びアポトーシスと細胞骨格との間の関係を調べていない現状に鑑み、H₂-silicaが創傷治癒のモデルである、シート層状のHEEpiC培養細胞の中央部をプラスチックピペットチップにより掻き除いたものに及ぼす影響について検討した。残った細胞の移動能及び細胞骨格(F-アクチン)の変化を観察した。その結果、HEEpiCの100 ppmのスクラッチ群において、細胞移動が促進され、微絨毛の形成が活発であった。創傷治癒アッセイを行った後、10 ppm及び100 ppmの両群について48時間及び72時間後に移動を示し、創傷修復効果がH₂-silicaの抗酸化能力に起因し得ることが示唆された。またスクラッチ群では、高レベルのアポトーシスが起きたため、H₂-silicaがアポトーシスを誘導することを介して創傷修復効果を果たしたと考察した。さらに、100, 300及び600 ppm群において、スクラッチ/非スクラッチ対照群の両方でファスチンタンパク質(細胞分裂に関わるアクチン線維を束ねるタンパク質)の発現が増加したことから、H₂-silicaは正常細胞に対し、細胞分裂を活性化させ増殖させることが示唆された。

第5章では、HWのヒト皮膚培養細胞への影響及び褥瘡への臨床有効性について検証した。水素の溶解度は比較的低く、体内に吸収されることができず、生理的には不活性ガスであると考えられていたため、ヒトを含む高等生物における水素分子の役割はあまり注目されていなかった。2007年、太田らは水素ガスの吸入が抗酸化、抗アポトーシス特性を有し、動物実験においてショックに伴って生成

する HO• から選択的に保護できることを報告した。H₂ の分子量は最小であることから、強力な拡散能力を有し、容易に小腸上皮細胞を通過する。吸収された水素分子は、血液循環を通じて、皮膚に移動し、皮膚創傷巣の ROS を消去し、真皮の線維芽細胞やコラーゲンの構築促進、表皮の角化細胞の増殖により、血管形成及び組織修復に寄与すると考えた。そこで皮膚の線維芽細胞株である OUMS-36 及び皮膚の角化細胞株である HaCaT を用いて、HW が正常ヒト皮膚細胞の細胞遊走を促進する効果の有無、及びそれらの効果が ROS の消去及び皮膚細胞の修復機序にいかに関わるかを探索した。また HW の創傷治癒に対するメカニズムを高齡褥瘡患者に対する臨床有効性について考察した。上記二種類の細胞を用いた *in vitro* での検討では、HW で調製した培地で培養した OUMS-36 細胞での I 型コラーゲンの再構築、ROS 抑制能に有意な効果が得られた。UVA 照射で増加した ROS 量は HW 群で有意に抑制された。また、臨床観察の結果として、著効群（12 名）と低効群（10 名）の褥瘡面積は HW の併用前に比べ、各々 91%、49% に減少した。低効群より著効群の入院日数は 28% に短縮したため、HW 投与が高齡褥瘡患者に対し有効率を高めたことが明らかとなった。

第 6 章では、本研究で得られた成果を総括するとともに一連の限界点や今後の展望について述べた。本研究は新型抗酸化剤である HW、H₂-silica、Pt-nc に焦点を当てて、がん細胞と正常細胞に対する Pt-nc 単独投与または γ 線との併用に現れた生物学的抑制効果、とくにアポトーシスの差異を明らかにした。また、HW と H₂-silica のがん細胞の増殖／移動抑制効果と損傷を受けた正常細胞に対する増殖／移動促進効果を明らかにした。さらに、HW が酸化ストレスを作り出した組織や細胞による炎症を抑制し、褥瘡による創傷を治癒するメカニズムを推考し、独創的に新しい説を唱えた。

最近のがん治療研究方針は、周りの正常細胞をできるだけ傷つけずにがん細胞のみ選択的に殺傷する治療法の開発が主流であり、薬剤や放射線を用いた酸化反応によりがん細胞を不活化する戦略が用いられてきた。本研究においては、がん細胞の特性である酸化性に着目し、強い抗酸化力を持つナノサイズの化合物の抗がん性を実証することができた。これらの成果は制がん医学の発展に新たな方向性を示すとともに酸化により正常細胞に生じる褥瘡などの種々の疾患についても同様に対処できる複合的な治療法として、細胞生物学や放射線医学の研究及び応用に新しい理論と手法を提供するものと期待できる。

審査結果の要旨

活性酸素が過剰に産生されることで、がん及び多種多様な疾病が引き起こされる。がんの予防目的で活性酸素を消去するために、ビタミン C、ビタミン E などの抗酸化剤が使用されているが、生体の水や酸素、金属が反応して、強い還元性が損なわれやすく、細胞膜に対する透過力も弱い。またがんの治療目的で、シスプラチンなどの白金含有薬剤が使用されているが、それらは副作用が激しい。抗酸化力が安定で、細胞膜の透過力が優れかつ副作用が軽減されると期待される最近開発された 3 種類のナノ材料に着目し、すぐれた抗がん治療法およびがん患者で問題になっている褥瘡の軽減法に関する研究を行なった。

- (1) プラチナナノコロイドは粒径 2 nm のプラチナナノ粒子を含み安定した抗酸化作用を持つため、活性酸素濃度の高いがん細胞に与えて活性を抑制した状態で γ 線を照射することにより、抗がん作用（細胞増殖抑制、細胞死）の協同効果が発揮できた。プラチナナノコロイドはシスプラチンより径が小さいため、腎不全やアレルギーなどの副作用が少ないと期待

される。

- (2) 水と反応すると抗酸化物質の1種である水素アニオンを発生する水素吸蔵シリカ粒子を培養液に与えてがん細胞を培養すると、増殖・移動抑制が見られた。一方正常細胞に水素吸蔵シリカ粒子を培養液に与えて正常細胞を培養すると増殖・移動の促進効果が見られたため、水素吸蔵シリカ粒子は抗がん作用と、褥瘡の軽減という2つの優れた効果を持つことを示した。
- (3) 水素吸蔵シリカ粒子が正常細胞に対して創傷治癒効果も発揮することを示した。その際、細胞骨格タンパク質であるファスチンの発現増大が関与することを示した。
- (4) 水素ガスと水を原料に作成した水素水を褥瘡患者に与えたところ半数以上の患者に対して、褥瘡面積が小さくなり、また入院日数が短縮したことを示した。培養細胞を用いて、この褥瘡軽減が水素水のI型コラーゲンの再構築、ROS抑制能に原因することを推察した。

以上の3種のナノ材料（プラチナナノコロイド、水素吸蔵シリカ粒子、水素水）を用いた研究結果は従来の抗がん治療法よりもすぐれたものである可能性を示し、放射線と化学物質の併用作用によるより効果的ながん治療法の開発に新たな知見を与える。その上、がん患者に多く見られ問題になっている褥瘡に対する新たな軽減法にも適用できる可能性を示した。すなわち、本研究結果は、申請者が自立して研究活動を行うに必要な能力と学識を有することを証したものである。