

博 士 論 文(2022年3月)内容の要旨および審査結果の要旨

鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科

氏 名 ^{なかにし けんたろう} 中西 賢太郎

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 博(薬)甲第10号

学位授与の日付 令和4年3月11日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目「がん治療における組織内活性酸素種に対するビタミン C の効果に
関する研究」

論文審査委員(主査)教 授 西田 圭吾 博士(医学)

(副査)教 授 中山 浩伸 博士(薬学)

教 授 田口 博明 博士(薬学)

教 授 郡山 恵樹 博士(医学)、博士(薬学)

准教授 坂 晋 博士(薬学)

論文要旨

氏 名	中西 賢太郎
-----	--------

論文の題名

がん治療における組織内活性酸素種に対するビタミン C の効果に関する研究

論文の要旨

緒論

がん化学療法は、がんの病期に応じた新規治療法が数多く展開されている中で、我々は生体機構成分に重要なビタミン C (VC) に着目した。

VC は、活性酸素種 (ROS) を除去する抗酸化作用を示し、また、2 価鉄などの存在下で ROS を発生させプロオキシダントとして作用することも知られている[1]。がん治療における VC は、血漿中に高濃度を必要とすることが示唆されている[2]。さらに、VC における抗腫瘍効果は、ROS の関与が示唆されている[1,3]。先行研究においても、抗がん薬と高用量 VC の併用により抗腫瘍効果を示した際に ROS や好中球の関与が示唆された[4]。しかし、各組織やがん細胞の増殖における ROS に対する VC のメカニズムについては明らかではない。さらに、抗がん薬と高用量 VC の併用により、薬物有害事象軽減効果を示すか否かは不明である。そこで本研究では、がん治療における高用量 VC の抗腫瘍効果と薬物有害事象軽減効果について確認し、そのメカニズムを検討することを目的とした。

第 1 章：メラノーマ誘発マウスにおける高用量ビタミン C の効果 ―臓器特異的効果と活性酸素種の関与―

本章では、各臓器（肺、肝臓、小腸、卵巣）におけるメラノーマ (MM) に対する高用量 VC の抗腫瘍効果について検討した。さらに高用量 VC の効果に ROS や好中球が関与するかについても検討した。

雌性のマウス (C57BL/6J; 7 週齢) を使用し、MM の発現を確認するために、ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) 陽性細胞、glycoprotein100 (gp100) を測定した。VC の効果における好中球の変化を調べるため、好中球およびマクロファージ炎症性タンパク質-2 (MIP-2) を測定した。好中球に変化が見られた際は、組織の VC 量および組織の好中球における VC 量を測定し、組織内の鉄量、過酸化水素 (H_2O_2)、および TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 陽性細胞も調べた。さらに、好中球の効果を検証するために、gp91^{phox} ノックアウトマウスを使用した。その結果、卵巣における DOPA 陽性細胞、gp100 陽性 MM 細胞の数は、高用量 VC 併用群 (VC 併用群) で減少した。さらに、卵巣における好中球の数と MIP-2 レベルは、VC 併用群で高い値を示した。肺、肝臓、小腸では、有意差がなかったため、卵巣に焦点をあてた。卵巣内および好中球の VC 濃度は、MM 群の方が高用量 VC の単独投与群よりも低下したが、VC 併用群では高い値を

示した。卵巣内の H_2O_2 、鉄の濃度、TUNEL 陽性細胞の数は、VC 併用群で増加した。一方で、gp91^{phox} ノックアウトマウスの卵巣における DOPA 陽性細胞、gp100 陽性 MM 細胞の数、好中球の数は、MM 群と VC 併用群で増加したが、これらの群間で有意差がなかった。これらの結果から、高用量 VC は臓器特異的効果を示し、卵巣における MM の浸潤と増殖を抑制させた。高用量 VC は、卵巣の好中球数を増加させることにより、がん細胞のアポトーシスを促進させた。さらに、好中球の gp91^{phox} は、がん細胞の抑制に重要な役割を果たしていることが考えられた。

第 2 章：結腸がん誘発マウスにおける血管新生に対する高用量ビタミン C の効果

本章では、結腸がんのマウス細胞株 (Colon 26) を異種移植したマウスを使用して、血管新生に対する高用量 VC の効果について検討した。

雄性のマウス (BALB/c; 5 週齢) を使用し、Colon 26 を異種移植した。その後、マウスの腫瘍組織の p53 およびエンドスタチンについて測定した。エンドスタチンは血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を抑制することが報告されているため[5]、VEGF、VEGF の転写因子である低酸素誘導因子-1 α (HIF-1 α) および ROS への影響についても調べた。その結果、高用量 VC 投与における腫瘍体積は、Colon 26 群と比較して抑制された。p53 およびエンドスタチンは、Colon 26 群よりも VC 併用群で増加が見られた。VEGF のサブタイプである VEGFA、VEGFD の腫瘍組織の発現レベルは、VC 併用群では、Colon 26 群と比較して有意に減少した。さらに、HIF-1 α および ROS も、同様の結果が得られた。このことから、高用量 VC は、VEGF の作用を阻害するエンドスタチンを増加させることにより、血管新生の抑制に関与することが示された。さらに、HIF-1 α および ROS は、高用量 VC により減少した。高用量 VC により ROS が減少することで、HIF-1 α の安定化をもたらし、血管新生の抑制に繋がったと考えられる。

第 3 章：イリノテカン塩酸塩水和物による乾燥皮膚発現に対する高用量ビタミン C の有用性

本章では、イリノテカン塩酸塩水和物 (CPT-11) が乾燥皮膚を誘発するメカニズムおよび高用量 VC の投与が乾燥皮膚の発現抑制に如何に有効であるか検討した。

雄性のヘアレスマウス (HR-1; 7 週齢) を使用し、CPT-11 投与における乾燥皮膚を評価するために、経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL)、皮膚の厚さおよび I 型コラーゲンの発現を測定した。さらに、カスパーゼ、線維芽細胞、TUNEL 陽性細胞および ROS を測定した。その結果、CPT-11 の投与により TEWL の上昇、皮膚の厚さの減少、I 型コラーゲンの発現の減少が認められ、乾燥皮膚が誘発された。さらに CPT-11 の投与により、ROS、カスパーゼ 3、カスパーゼ 9、TUNEL 陽性細胞が増加し、線維芽細胞の数が減少されアポトーシスの誘導が観察された。一方、高用量 VC 投与は、これらのパラメーターを改善させた。抗がん薬による細胞死のシグナルによってミトコンドリアがカスパーゼを活性化させ、アポトーシスを誘導する。さらに誘導過程において ROS が生成される。CPT-11 による乾燥皮膚は、ミトコンドリアへの損傷と ROS の生成によって、線維芽細胞のアポトーシスによる細胞破壊が原因であることが示唆された。さらに高用量 VC は、CPT-11 によって生じるアポトーシスの誘導および ROS 生成を減少させることにより、乾燥皮膚を軽減させることができた。

以上より、高用量 VC は、卵巣における MM の浸潤と増殖を抑制させた。さらに、高用量 VC により好中球の gp91^{phox} で生成された ROS は、がん細胞に直接作用しアポトーシスを誘導することが示された。結腸がんにおける高用量 VC では、ROS の減少と共に血管新生も抑制し、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。さらに、抗がん薬における乾燥皮膚では、高用量 VC が ROS の減少効果を示すことで、CPT-11 投与後の乾燥皮膚発現を抑制した。これらの成果は、今後高用量 VC 療法を展開していく上で、新たな可能性を拓く重要な知見であると考えられる。

引用文献

- [1] Chen Q, Espey MG, Sun AY, Pooput C, Kirk KL, Krishna MC, Khosh DB, Drisko J, Levine M. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 11105–11109 (2008).
- [2] Wilson MK, Baguley BC, Wall C, Jameson MB, Findlay MP. Review of high-dose intravenous vitamin C as an anticancer agent. *Asia. Pac. J. Clin. Oncol.*, 10, 22–37 (2014).
- [3] Cho S, Chae JS, Shin H, Shin Y, Song H, Kim Y, Yoo BC, Roh K, Cho S, Kil EJ, Byun HS, Cho SH, Park S, Lee S, Yeom CH. Hormetic dose response to L-ascorbic acid as an anti-cancer drug in colorectal cancer cell lines according to SVCT-2 expression. *Sci. Rep.*, 8, 11372 (2018).
- [4] Kondo K, Sano R, Goto K, Hiramoto K, Ooi K. Administration of High-Dose Vitamin C and Irinotecan Ameliorates Colorectal Cancer Induced by Azoxymethane and Dextran Sodium Sulfate in Mice. *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1797–1803 (2018).
- [5] Sasaki T, Larsson H, Tisi D, Claesson-Welsh L, Hohenester E, Timpl R. Endostatins derived from collagens XV and XVIII differ in structural and binding properties, tissue distribution and anti-angiogenic activity. *J. Mol. Biol.*, 301, 1179–1190 (2000).

※和文で作成すること。用紙サイズ A4、2500 字以内 (MS 明朝 10.5 ポイント)。

論文審査結果の要旨

【判定結果】

当委員会は、中西賢太郎氏による学位申請論文の審査及び口述による諮問を行った結果、博士（薬学）の学位を授与されるに相応しいと判断した。

【判定理由】

本論文で申請者は、ビタミン C によるがん抑制効果及び薬物有害事象軽減効果に関する分子機序を解析した。ビタミン C は抗酸化性を有する水溶性ビタミンとして知られており、生体内で合成することが不可能な栄養素の一つである。申請者は、1970 年代に高用量ビタミン C が末期がん患者の生活の質（QOL）や生存期間に有益であるという報告に着目し、担がんモデル動物を利用し、ビタミン C 単独投与による抗腫瘍効果と、そのメカニズムを検討した。また、抗がん薬イリノテカン塩酸塩水和物の薬物有害事象を高用量ビタミン C が軽減するメカニズムについても合わせて追究した。

第 1 章では、悪性黒色腫 B16（メラノーマ）細胞によるシンジェニック移植モデルを用い、高用量ビタミン C の腫瘍抑制効果と、そのメカニズムを解析した。メラノーマ細胞の臓器への浸潤と増殖が、高用量ビタミン C によって抑制され、その抑制効果は卵巣のみに観察され臓器特異性が認められた。高用量ビタミン C の卵巣における抗腫瘍効果は、卵巣における好中球数を増加させ、それらの食作用機能を刺激することによってがん細胞のアポトーシスを促進させていることが判明した。臓器特異的な抑制効果の詳細なメカニズムは不明であるが、卵巣における好中球走化性因子（MIP-2）の発現が高まっていることを示しており、他の臓器よりも好中球の数が相対的に多くなることが一つ考えられた。これらの結果から高用量ビタミン C のがん抑制効果の作用点として、自然免疫細胞活性化によるがん細胞の抑制作用を示した。

第 2 章では、結腸がんのマウス細胞株（Colon 26）を同種移植したモデルマウスを用い、高用量ビタミン C の腫瘍抑制効果、特に、血管新生に対する作用メカニズムを解析した。Colon 26 を移植したマウスにおいて観察された腫瘍体積の増加が、高用量ビタミン C を投与することで、有意に抑制されることを明らかにした。その抑制メカニズムとして、血管新生の主要な調節因子である血管内皮細胞増殖因子（VEGF）の作用を

阻害するエンドスタチンを増加させることにより、血管新生の抑制に関与することが示された。腫瘍の増殖には血管新生が不可欠であり、ビタミン C が血管新生の抑制を介して抗腫瘍効果を示すことを初めて示した。

第3章では、抗がん薬であるイリノテカン塩酸塩水和物（CPT-11）の薬物有害事象の一つである乾燥皮膚発現に着目し、高用量ビタミン C の役割について解析した。CPT-11 による乾燥皮膚発現は、ミトコンドリアへの損傷と活性酸素種（ROS）の生成によって、線維芽細胞のアポトーシスによる細胞破壊が原因であることを示した。ビタミン C は、CPT-11 によって生じるアポトーシスの誘導および ROS 生成を減少させることで乾燥皮膚を改善させる機序を明らかにした。

以上のように、本論文は高用量ビタミン C の抗腫瘍効果を複数のシンジェニック移植モデルを用いて示し、その作用機序としてビタミン C の自然免疫担当細胞の活性化機構及び、これまで知られていなかったがん組織内におけるビタミン C の血管新生抑制機序を明らかにした。加えて、抗がん薬投与による薬物有害事象の一つである乾燥肌改善効果と、そのメカニズムを示した。本論文の結果は、今後、がん治療における高用量ビタミン C 療法の科学的根拠を示す上で、重要な知見となる。よって、薬学において価値のある研究と認めた。博士の学位を授与することに値する。