

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

2021

中西 賢太郎

Effect of vitamin C on tissue reactive oxygen species  
in cancer treatment

2021

Kentaro Nakanishi

## 目 次

緒論	1
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—	
第1節 緒言	4
第2節 実験方法	6
第3節 結果	10
第4節 考察	15
第5節 小括	17
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	
第1節 緒言	19
第2節 実験方法	20
第3節 結果	23
第4節 考察	26
第5節 小括	27
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	
第1節 緒言	29
第2節 実験方法	30
第3節 結果	33
第4節 考察	36
第5節 小括	37
結論	39
引用文献	41
謝辞	49
Abstract	50

## 略号一覧

VC: vitamin C

QOL: quality of life

NIH: National Institutes of Health

ROS: reactive oxygen species

CPT-11: irinotecan

MM: melanoma

VEGF: vascular endothelial growth factor

UV: ultraviolet

DSS: dextran sulfate sodium

gp91<sup>phox<sup>-/-</sup></sup>: glycoprotein 91<sup>phox</sup> knockout

PBS: phosphate buffered salts

DOPA: dihydroxyphenylalanine

TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase

DNA: deoxyribonucleic acid

BCA: bicinchoninic acid

LDS: lithium dodecyl sulfate

gp100: glycoprotein 100

MIP-2: macrophage inflammatory protein-2

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: hydrogen peroxide

SD: standard deviation

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

HIF: hypoxia inducible factor

PHD: prolyl 4-hydroxylase

Colon 26: murine colon carcinoma cell line

SN-38: 7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin

Glu: glucuronic acid

TEWL: Transepidermal water loss

HE: hematoxylin and eosin

BAX: Bcl-2-associated X protein

## 緒論

本邦の死因別における死亡率のトップは、悪性新生物であり、年々増加している。がんと診断された多くの患者は、がん治療を行うが、がんの病期に応じた治療が展開されており、手術療法、薬物療法、放射線療法、免疫療法などがある。その中でも薬物有害事象のないがん治療法としてビタミン C (VC) 療法が注目されている。

1970 年代、ライナス・ポーリング博士が、キャメロン博士らと共に、高用量 VC が末期がん患者の生活の質 (QOL) と生存期間に有益であると示唆している<sup>1,2)</sup>。一時期、VC に抗がん作用はないとポーリング博士の学説が否定されていたものの、投与経路の違いによることが示唆され、米国・公的機関／国立衛生研究所 (NIH) のマークレビンらによって、がん治療に対する高用量 VC の有用性が改めて見直された<sup>3-5)</sup>。以後、諸外国の一部の医師たちによって高用量 VC が実践され、それらの有用性に関する報告が増えてきている<sup>6)</sup>。本邦における高用量 VC 点滴療法は、現在自由診療で行われており<sup>7,8)</sup>、一度に数十グラムの VC が投与されている。

一方、VC はアスコルビン酸とも言われ、抗酸化性を有する水溶性ビタミンとして広く知られており、ヒトでは VC を内因的に合成することが出来ないため必須の食物成分 (essential dietary components) となっている<sup>9)</sup>。VC は、コラーゲン生成作用、抗貧血作用、メラニン生成の阻害作用など多くの生理機能が知られている。VC の体内動態は、小腸から吸収され血漿中へ移行し、グルコーストランスポーターやナトリウム依存性 VC トランスポーターによって細胞内に取り込まれ、各臓器に分布する<sup>10)</sup>。また一部は、腎臓からも再吸収される。in vitro における VC の抗腫瘍効果は、血漿中に 10 mM 以上の濃度が必要とすることが示唆されている<sup>11)</sup>。VC の経口投与は、許容範囲が制御されていることが示唆されているが<sup>3)</sup>、一部の文献では、5 g の VC を経口摂取することで、約 1.1 g が吸収されることが示唆されている<sup>12)</sup>。

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<sup>9,13)</sup>。高用量 VC における抗腫瘍効果は、ROS の関与が示唆されている<sup>5,14)</sup>。先行研究においても、大腸がんモデルマウスにおけるイリノテカン塩酸塩水和物 (CPT-11) 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が<sup>15)</sup>、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、CPT-11 と高用量 VC を併用した際、薬物有害事象に対する高用量 VC の効果は不明であった。そこで本論文では、がん治療における ROS に対する高用量 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にした。

第 1 章では、VC が 2 価鉄の存在下で ROS を発生させプロオキシダント作用によって、がん細胞への抗腫瘍効果を確認するため、メラノーマ誘発マウスにおける高用量 VC の効果を検討した。皮膚における VC の効果は、コラーゲン形成やメラニン生成の阻害に関与しているが、メラニン生成に関与するメラノサイトの悪性腫瘍 (メラノーマ: MM) に対して高用量 VC が及ぼす効果は不明である。メラノサイトは皮膚以外の部位にも分布しているため、さまざまな組織における MM に対する高用量 VC の効果について調べた。さらに、卵巣の MM における高用量 VC の抗腫瘍効果に対する ROS の関与についても検討した。さらに、がん細胞の増殖に血管新生が重要な役割を果たしているが、血管新生における高用量 VC の効果は不明である。VC は、コラーゲン生合成に不可欠だが、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を阻害する可能性がある XVIII 型コラーゲンの C 末端フラグメントのエンドスタチンに対する影響は不明である。そこで第 2 章では、がん細胞の増殖における血管新生に対する高用量 VC の抗腫瘍効果について検討した。

先行研究において、高用量 VC と CPT-11 の併用投与により大腸がんが奏効した際、VC による ROS の減少および I 型コラーゲンの増加がみられた<sup>15)</sup>。I 型コラーゲンは皮膚の支持組織において重要な役割を果たすことから、第 3 章では、CPT-11 投与で誘発される皮膚障

害に対して、高用量 VC の薬物有害事象軽減効果について検討した。

## 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—

##### 第 1 節 緒言

ビタミン C (VC) は、皮膚の真皮層、血管、骨や腱などの結合タンパク質であるコラーゲン生成に必須の化合物である。皮膚における VC の効果は、真皮に存在するコラーゲンや線維芽細胞以外でも、真皮に近い表皮の基底層におけるメラノサイトでのメラニン合成の阻害に関与することが知られている<sup>16)</sup>。

メラニンとは、チロシナーゼによりチロシンから生合成される。チロシンはチロシナーゼによりドーパとなり、さらに酸化されドーパキノンとなる。ドーパキノンは酸化によりインドール化合物に変化し、それらが互いに結合することで黒色～黒褐色のユーメラニンが産生される。またシステインの存在下では、ドーパキノンがシステインと結合し赤褐色～黄色のフェオメラニンが産生され、さまざまな割合で混じった混合型メラニンが形成される<sup>17)</sup>。またメラニンは、皮膚色のほかに生体に有害なフリーラジカルを吸収する役割も担っている。さらにメラニンの最も重要な役割は、皮膚を紫外線 (UV) から保護することであり<sup>18)</sup>、メラニン色素の少ない白色人種では、皮膚がんの発生率が高いことが示唆されている<sup>19)</sup>。メラノサイトの発がんによって引き起こされたものがメラノーマ (MM) である<sup>20)</sup>。ほとんどの MM は、皮膚で生じるが、メラノサイトの分布により口、腸および目にも見られる<sup>21)</sup>。本邦における MM の罹患率は、10 万人あたり 1～2 人であるが、近年、増加傾向にあるとされている<sup>22)</sup>。MM が発症する科学的根拠は明らかではなく、遺伝的素因と環境素因によって引き起こされると考えられている<sup>23)</sup>。環境素因の一例をあげると、高 UV 強度の地域に住む白人の MM 発生率は、UV 強度の低い地域に住む白人よりも高く、病因に UV が関



与することが示唆されている<sup>24)</sup>。本邦の MM 統計データでは、体幹や近位肢など、UV に曝されにくい部位で MM が発生することも記されている<sup>25)</sup>。さらに、まれに卵巣にも MM が見られる<sup>26-28)</sup>。MM の標準的な治療法には、手術療法、化学療法、放射線療法などが含まれる<sup>29)</sup>。しかし、婦人科分野における MM の予後は悪く、手術療法による MM の効果的切除に依存する<sup>30)</sup>。

VC は、メラノサイトで生成されたメラニン色素を還元し、黒色を淡色化することが知られている<sup>31)</sup>。さらに、VC は 2 価鉄などの存在下で、活性酸素種 (ROS) であるヒドロキシラジカルや過酸化水素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<sup>9,13)</sup>。このプロオキシダントの作用を利用したがん治療における VC 注入療法は、薬物有害事象を示さないことが示唆されているため<sup>5,6,32)</sup>、近年、注目を集めており、米国では既に臨床試験が行われている。この治療法は、体内における VC の血中濃度が高まると血管外に VC が移行し ROS を大量に発生させる。正常細胞は、カタラーゼによって ROS を中和するが、がん細胞は、カタラーゼなどの抗酸化酵素活性のレベルが低いいため、VC により発生した ROS が、がん細胞へ選択的に作用し、アポトーシスを引き起こすと考えられている<sup>33)</sup>。さらに、自然免疫応答における ROS は、好中球より放出され、がん細胞の抑制に関与することが知られている<sup>34)</sup>。先行研究においても、アゾキシメタンとデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) により誘発された結腸直腸がんマウスにおける高用量 VC の効果に対して、ROS と好中球の関与が示唆されている<sup>15)</sup>。

VC は、メラニン生成の阻害に関与しているが<sup>16)</sup>、高用量 VC がメラニン生成に関与するメラノサイトの MM に対する効果は不明である。さらに MM は各臓器にも発症することから、本章では、各臓器における MM に対する高用量 VC の効果について検討した。さらに、先行研究<sup>15)</sup>により、高用量 VC の抗腫瘍効果において、ROS や好中球の関与が示唆されたことから、本研究においても、ROS や好中球の関与も検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

本研究は、雌性のマウス (C57BL/6 J ; 7 週齢) を日本エスエルシー株式会社 (Shizuoka, Japan) から購入して行った。マウスに、B16-メラノーマを移植し、がんを誘発させた。さらに、好中球の効果を検証するために、glycoprotein 91<sup>phox</sup> ノックアウト (gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>) マウス (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) を用いた。購入したマウスは、温度 23±1°C、湿度 50±10%、12 時間の明暗サイクル (light: 8:00~20:00) の環境下、固形飼料および水を自由に摂取させた。1 週間の馴化後、マウスの体重が均等になるように分け、対照群、高用量 VC 投与群、MM 投与群、高用量 VC + MM 併用群の 4 グループに割り当てた (n = 6 / グループ)。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針 (承認番号: 第 66 号) に従って実施した。

### 2. MM および VC 試薬の投与

B16-メラノーマ細胞株は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター (Miyagi, Japan) から購入した。MM 細胞を次のように培養した<sup>35)</sup>。B16-メラノーマの細胞株は、5 ~ 15 継代し使用した。すべての細胞は、10%の総ウシ血清と L-グルタミンを添加した EMEM (Eagle's minimal essential medium) で増殖した。その後、細胞は定期的にテストされ、マイコプラズマやウイルスが存在しないことを確認した。マウスに静脈内注射を行うため、0.25%トリプシン-0.02%EDTA (Ethylenediamine-tetraacetic acid) で 1 分間処理した後、サブコンフルエントな単層を採取した。トリプシン処理した細胞を洗浄し、Phosphate buffered salts (PBS) に再懸濁した。培養した MM は、MM を誘発させるためにマウスの尾に静脈内注射 ( $1 \times 10^6$  細胞 / 100  $\mu$ L) した。

VC (Fuso Pharmaceutical Industries Ltd., Osaka, Japan) の用量を決定するために 1、4、8、または 12 g/kg の VC 溶液の効果を調べた。その結果、4 g/kg 以上の用量で高い同等の

有効性を確認したため、本研究では、VC 溶液の投与量を 4 g/kg とし、14 日間経口投与した。さらに対照動物には蒸留水を投与した<sup>15)</sup>。

### 3. 血液サンプルの採取と各組織の採取

細胞株及び試薬の投与開始から 15 日目にペントバルビタール (5 mg/mL) (Naclai tesque, Kyoto, Japan) を 50 mg/kg となるように腹腔内投与してマウスに麻酔した後、マウスの心臓から 1 mL の血液を採取したサンプルを 4°C、3,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清部分 (血漿) を測定に用いた。血液採取後に肺、肝臓、小腸、卵巣の組織サンプルを採取した。

### 4. 組織染色

採取した組織を縦 1.5 cm × 横 0.8 cm 四方の各組織サンプルとし、パラホルムアルデヒド溶液 (4%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) にて固定した。固定した組織は Tissue-Tek® optimum cutting temperature Compound (Sakura Finetek, Tokyo, Japan) を用いて凍結包埋し、5 μm の厚さでマイクロトーム (Leica Biosystems, Nussioch, Germany) にて薄切を行った。ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA) 陽性細胞は、各組織のチロシナーゼを豊富に含むメラノサイトのマーカーであり、次のように染色した。0.1% L-Dopa (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) を PBS に溶解させ、37°C にて 3 時間反応させた。その後、PBS で 3 回 × 5 分洗浄し、70%のエタノールで脱水させキシレンで透徹したあと、エンテランニューで封入したのち光学顕微鏡で観察した<sup>36)</sup>。さらに、各組織切片は、1 次抗体として、好中球特異的抗原 Ly-6C (1:100; Bio-Rad laboratories Inc., Hercules, CA, USA) に対する抗体で免疫染色したのち<sup>37)</sup>、2 次抗体として fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (1:30; Dako Cytomation, Glstrup, Denmark) を約 25°C にて 2 時間反応させた。アポトーシスは、アポトーシス検出キット (Takara Biomedicals, Tokyo, Japan) を用いて評価した。アポトーシス検出は、組織学的な局在や

個々の細胞の検出を可能にする TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法を用いて行った。TUNEL 法は、ターミナルトランスフェラーゼ (TdT) でアポトーシスをおこした細胞のデオキシリボ核酸 (DNA)断片化 (3'-OH DAN 末端) を検出するために使用される方法であり、標識後に蛍光顕微鏡で観察ができる。DOPA 陽性細胞、好中球、および TUNEL 陽性細胞の数は、画像処理ソフトウェア Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて計測し、無作為に 5 か所のエリアを抽出し、単位面積 (mm<sup>2</sup>) あたりの各細胞数の平均値を算出した。

## 5. ウェスタンブロッティングによる検出

各組織部分 100 mg を氷上にて剪刀で細かく刻んだのち、組織用懸濁試薬 (KURABO, Osaka, Japan) に浸漬し、ハンドミキサー (POLYTRON PT 1200 CL; Kinematica AG, Littau, Switzerland) を用いてホモジナイズ (20,000 × *g*, 60 秒) した後、懸濁液を 8000 × *g* で 10 分間遠心分離した。次に上清を取り出し、Bicinchoninic Acid (BCA) 法により蛋白量を測定し、蛋白含量を一定 (5 mg/mL) 調整したサンプルは、lithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および sample reducing agent (Thermo Fisher Scientific) に懸濁させて調整し、70°C で 10 分間加熱して、ウェスタン用のサンプルとした。その後、サンプルは 4-12% BIS-TRIS Bolt gel (Thermo Fisher Scientific) を用いて 200V の定電圧で 18 分間電気泳動を行った。電気泳動されたタンパク質は iBlot 2 Dry blotting system (Thermo Fisher Scientific) を用いて、25V の定電圧を 6 分間かけてニトロセルロース膜に転写し、5%スキムミルクでブロッキングを行った。ブロッキング後、洗浄し 25°C で 1 時間、1 次抗体として MM のマーカーである glycoprotein 100 (gp100) (1:1000; Abcam, Cambridge, U.K.) およびマクロファージ炎症性タンパク質-2 (MIP-2) (1:1000; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 、ローディングコントロールとしての β-アクチン (1:5000; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA) をそれぞれ反応

させたのち、horseradish peroxidase で標識された 2 次抗体 (1:1000; Novex, Frederick, MD, USA) で処理を行った。免疫複合体は、化学発光試薬であるイムノスターゼータ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) で処理したのち、膜の画像を Multi-Gauge Software Program ver3.0 (FUJIFILM, Greenwood, SC, USA) で取得した。

## 6. 各組織中の好中球数測定

各組織のホモジネートした上清は、組織中の好中球を調べるために、好中球分離キット (Neutrophil isolation kit; Cayman, AnnArbor, MI, USA) を使用して分離した。好中球数は、血球計算盤 (Sunlead Glass Corp., Koshigaya, Japan) を使用して 1 mm<sup>2</sup> の数を計算した。

## 7. 卵巣および分離した好中球における VC 濃度

卵巣上清および分離した好中球の VC 濃度は、市販の VC 測定キット (Ascorbate assay kit; Cayman) を使用し測定した。好中球の VC 濃度は、上記のように計算された細胞数に基づいて、固定数の細胞当たりの濃度として計算した。

## 8. 卵巣中の過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) と鉄の測定

卵巣中の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と鉄の濃度は、市販の Oxysselect™ in vitro ROS/RNS 測定キット (STA-347; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) およびメタロアッセイキット (Metallogenics, Chiba, Japan) をそれぞれ使用し測定した。

## 9. 統計分析

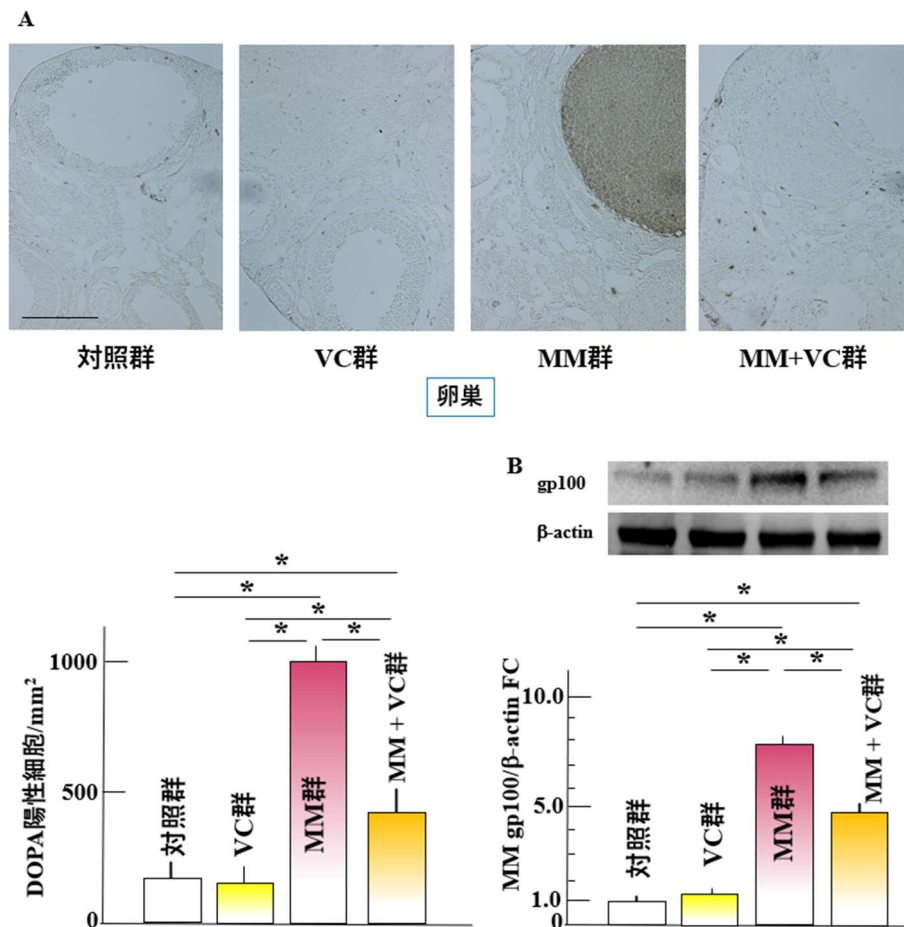
全てのデータは平均値±標準偏差 (SD) 値で示した。結果は、Microsoft Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA) を使用し分析した。各群間の統計的有意

性は、Tukey-Kramer test によって測定した。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析は SPSS version 20 software (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) にて実施した。

### 第3節 結果

#### 1. 卵巣における DOPA 陽性細胞、gp100 陽性 MM 細胞、好中球および MIP-2 の発現に対する高用量 VC の効果

卵巣における DOPA 陽性細胞、gp100 陽性 MM 細胞の数は、MM 投与群で有意に増加したが、高用量 VC + MM 併用群と比較して有意に減少した(Fig. 1A, B)。さらに、卵巣における好中球の数と MIP-2 レベルは、高用量 VC + MM 併用群で高い値を示した(Fig. 1C, D)。



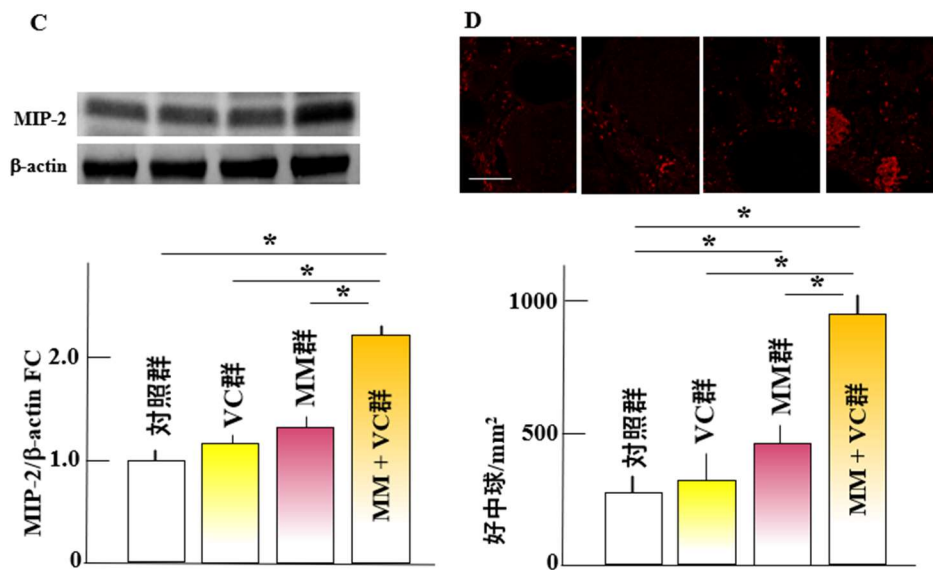


Fig 1. Effect of high-dose vitamin C on the invasion and proliferation of melanoma cells in the ovary.

The number of DOPA-positive cells (indicated by arrows indicate in the images) (A), the expression of gp100-positive melanoma cells (B), MIP-2 levels (C), and the number of neutrophils (D) in the experimental and control groups. The data are represented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) (n = 6 / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \* p < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

## 2. 肺、肝臓、小腸における好中球の数とMMの浸潤と増殖に対する高用量VCの影響

肺、肝臓、小腸におけるDOPA陽性細胞、gp100陽性MM細胞、および好中球の数は、MM投与群で有意に増加したが、高用量VC + MM併用群と比較して有意差はなかったため(Fig. 2, 3, 4)、卵巣に焦点を当てて、高用量VCの効果を検討した。

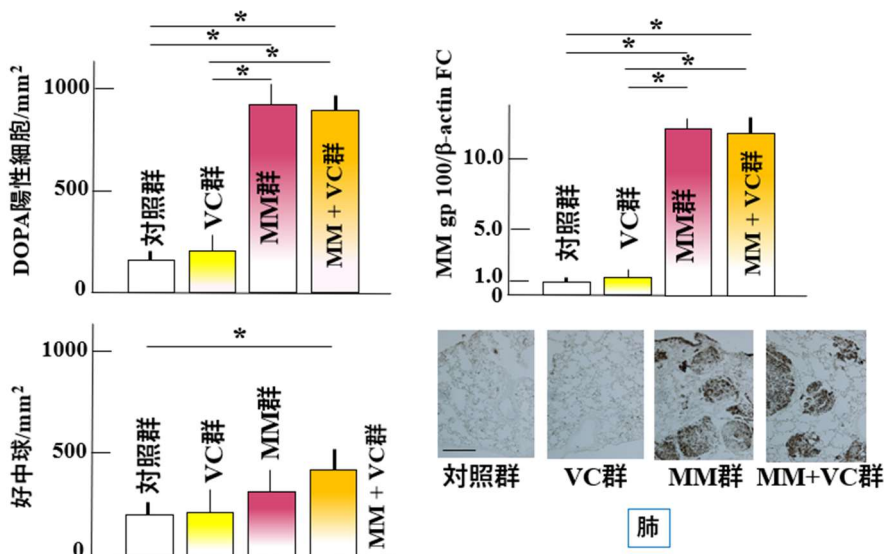


Fig 2. Effect of high-dose vitamin C on the invasion and proliferation of melanoma cells in the lungs.

The number of DOPA-positive cells, gp100-positive melanoma cells, and neutrophils in the experimental and control groups. The data are represented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 6$  / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \*  $p < 0.05$ . Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

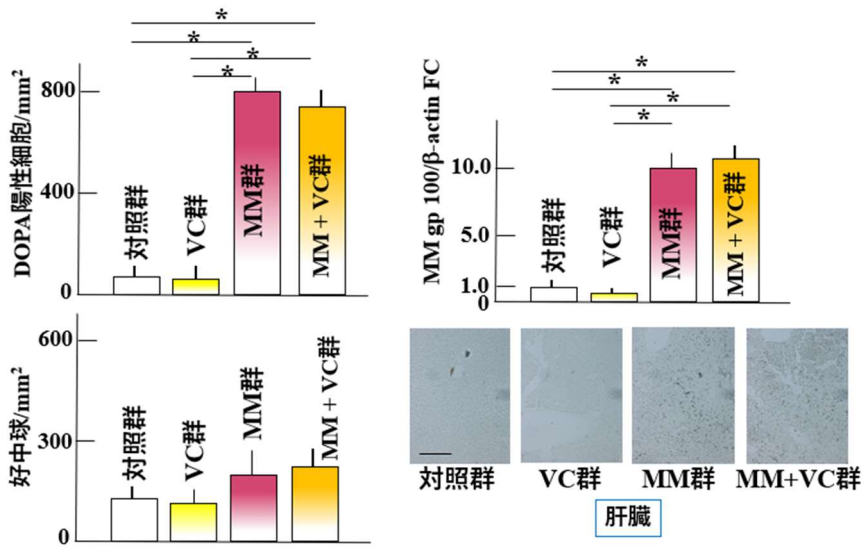


Fig 3. Effect of high-dose vitamin C on the invasion and proliferation of melanoma cells in the liver.

The number of DOPA-positive cells, gp100-positive melanoma cells, and neutrophils in the experimental and control groups. The data are represented as mean  $\pm$  S.D. ( $n = 6$  / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \*  $p < 0.05$ . Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.



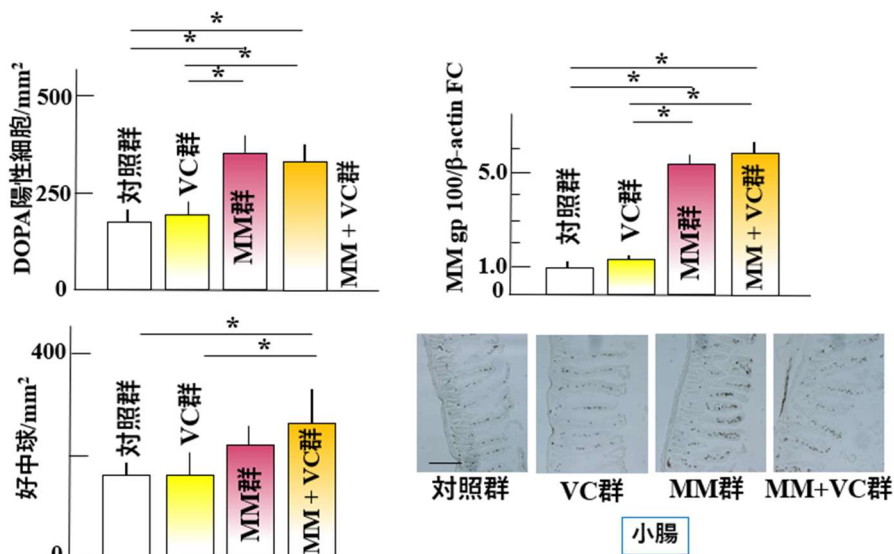


Fig 4. Effect of high-dose vitamin C on the invasion and proliferation of melanoma cells in the jejunum.

The number of DOPA-positive cells, gp100-positive melanoma cells, and neutrophils in the experimental and control groups. The data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \* p < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

### 3. 卵巣および分離した卵巣中の好中球における VC 濃度

卵巣ホモジネートおよび分離された好中球の VC 濃度は、MM 投与群の方が高用量 VC 投与群よりも低かったが、高用量 VC + MM 併用群では高い値を示した(Fig. 5A, B)。

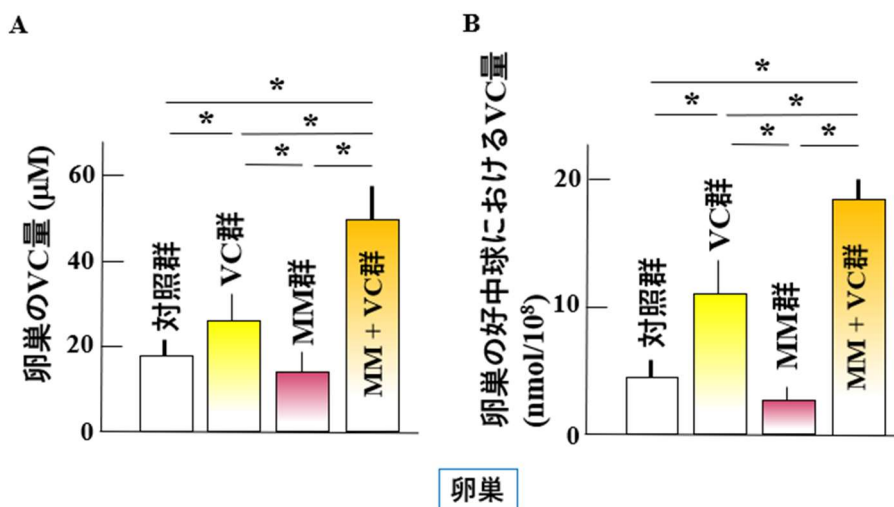


Fig 5. Effects of high-dose vitamin C administration on the VC concentration in the ovary homogenate (A) and in the neutrophils (B) in the ovary samples of the experimental and control groups.

The data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \* p < 0.05.

#### 4. 卵巣におけるMMのアポトーシスに対する高用量VCの影響

VCの抗腫瘍効果には、ROSの一つであるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>や鉄剤が密接に関連している。卵巣内のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と鉄の濃度は、MM投与群より高用量VC + MM併用群で増加した(Fig. 6A, B)。さらに、卵巣におけるTUNEL陽性細胞の数は、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と同様にMM投与群より高用量VC + MM併用群で増加した(Fig. 6C)。

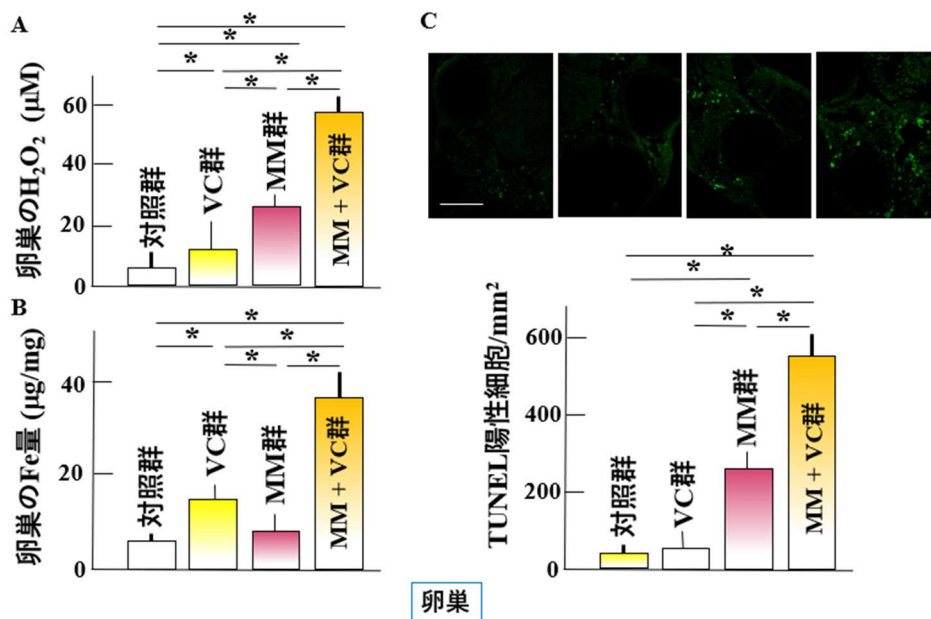


Fig 6. Effect of high dose VC administration on the concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) and iron (B), and number of TUNEL-positive cells (C) in the ovary samples of the experimental and control groups.

The data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \* p < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m.

## 5. メラノーマ誘発 $gp91^{phox^{-/-}}$ マウスの卵巣における好中球の数およびMMの浸潤および増殖に対する高用量VCの効果

メラノーマ誘発  $gp91^{phox^{-/-}}$ マウスの卵巣における DOPA 陽性細胞と gp100 陽性 MM 細胞の数は、MM 投与群と高用量 VC + MM 併用群で増加したが、これらの群間で大きく変化しなかった(Fig. 7A, B)。同様に、好中球の数は、MM 投与群と高用量 VC + MM 併用群の間で有意差がなかった(Fig. 7C)。

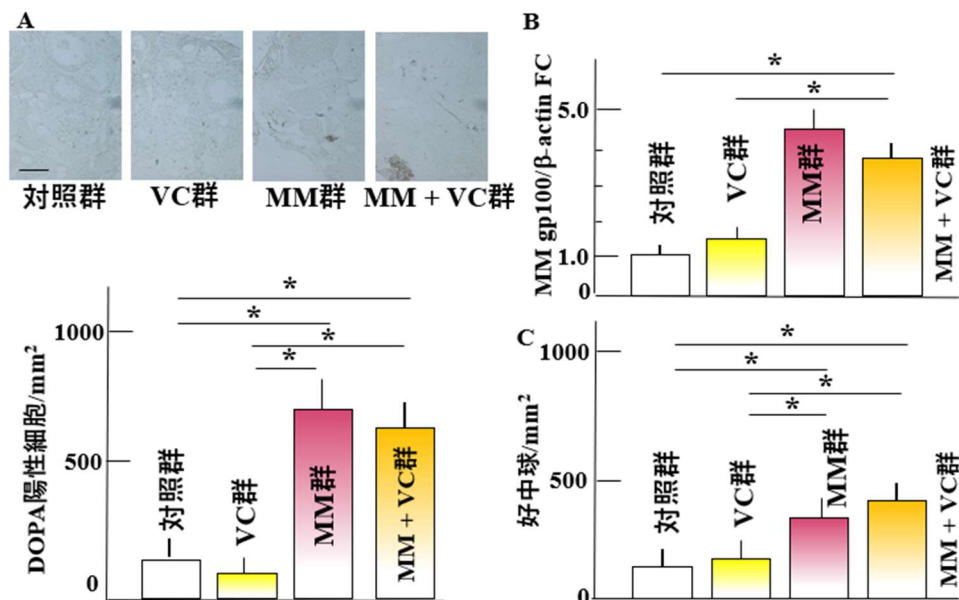


Fig 7. Effect of high dose VC administration on the invasion and proliferation of melanoma cells and the number of neutrophils in the ovaries of  $gp91^{phox^{-/-}}$  mice.

The number of DOPA-positive cells (A), gp100-positive melanoma cells (B), and neutrophils (C) in the experimental and control groups. The data are represented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). Tukey's post-hoc test was used to compare the differences between the groups. \* p < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

## 第4節 考察

各臓器 (肺、肝臓、小腸、卵巣) から得られた結果は、高用量 VC が卵巣における MM の浸潤を有意に減少させたことを明らかにした。好中球の数は、高用量 VC + MM 併用群で増

加した (Fig. 1D)。さらに、卵巣の  $H_2O_2$  と鉄の濃度は、高用量 VC+MM 併用群で有意に増加した (Fig. 6A, B)。しかし、gp91<sup>phox</sup><sup>-/-</sup>マウスでは、卵巣の DOPA 陽性細胞、gp100 陽性黒色腫細胞、および好中球の数は、MM 群と高用量 VC + MM 併用群の間で変化はなかった (Fig. 7)。

先行研究においては、アズキシメタン+ DSS 誘発性結腸直腸がんにおける高用量 VC に対する好中球と ROS の関与が示唆している<sup>15)</sup>。本研究においても、MM 誘発マウスの卵巣では、好中球が重要な役割を果たしており、がん細胞における高用量 VC の効果に対して好中球が重要であることが示唆された。

本研究では、MM の浸潤と増殖における高用量 VC の効果が臓器特異的であり、卵巣において最も顕著であることが示された。さらに、卵巣の好中球は、高用量 VC より増加した (Fig. 1D)。これは、好中球が卵巣に浸潤すると鎮痛ペプチドの 1 つ  $\beta$ -エンドルフィンを放出して性周期を維持していることや  $\beta$  エンドルフィンが卵胞の周囲の莢膜細胞や顆粒膜細胞に作用してそれらの細胞でのステロイドホルモン産生を制御しているためであると考えられる<sup>38-41)</sup>。つまり卵巣は、性周期を維持するために他の臓器よりも好中球が浸潤したと考えられる<sup>42)</sup>。このように卵巣においては、他臓器と違い炎症やアレルギーなどの疾患にかかわらず、好中球の浸潤が起きているため卵巣に特異的に作用したとも考えられる。VC は、好中球の産生<sup>43-46)</sup>および機能<sup>47,48)</sup>を刺激することも知られている。本研究では、卵巣における好中球数の増加に加えて、好中球走化性因子である MIP-2 も高用量 VC により上昇した (Fig. 1C)。しかし、卵巣以外他臓器では、高用量 VC により好中球の産生が誘発されなかった (Fig. 2-4)。したがって、高用量 VC は、卵巣における好中球の数を増やし、それらの貧食作用を刺激することにより、MM のアポトーシスを促進することが考えられた。正常なマウスにおける高用量 VC は、好中球の産生や機能に変化はなかったことから (Fig. 1D)、生体の免疫反応が働いている場合に VC が効果的に作用することが考えられる。卵巣における好中球の詳細なメカニズムは現在検討中である。

好中球は、がん細胞をアポトーシスするために ROS を放出するが、好中球自体が ROS により損傷を受ける傾向がある<sup>49)</sup>。しかし、好中球は一般に高濃度の VC を貯蔵し<sup>50)</sup>、酸化的損傷から身を守ることが知られている<sup>51,52)</sup>。VC は、その抗酸化作用によって好中球の自動酸化から保護し減少を防ぐ<sup>53,54)</sup>。本研究では、卵巣の高用量 VC + MM 併用群で、好中球が増加した (Fig. 1D)。このことは、高用量 VC により高濃度の VC が好中球に蓄積され、VC の抗酸化作用により好中球の酸化的損傷から防ぐ作用を示したと考えられる。さらに、高濃度の VC は、がん細胞の周囲にある鉄と反応を起こし、 $H_2O_2$  が生成される<sup>55)</sup>。本研究では、卵巣の高用量 VC + MM 併用群における  $H_2O_2$  と鉄の濃度が増加し、アポトーシスの増加が見られた (Fig. 6)。鉄は、腸管を通過する際に VC が存在することによって吸収が増える<sup>56)</sup>。さらに、がん細胞は過剰な鉄を含むため<sup>57)</sup>、組織内で VC が増えたことにより、鉄の濃度も増加したと考えられる。

加えて、好中球の効果を検証するために、*gp91<sup>phox</sup>* マウスを使用した。好中球は、ROS を生成し貧食作用を示す<sup>58)</sup>。ROS の生産を担う酵素は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) オキシダーゼと呼ばれる。*gp91<sup>phox</sup>* は、NADPH オキシターゼの触媒サブユニットであり、膜貫通タンパク質として存在する<sup>59)</sup>。本研究において、*gp91<sup>phox</sup>* マウスでは VC の効果が減弱された (Fig. 7)。このことは、好中球における *gp91<sup>phox</sup>* に対して高用量 VC が作用することで  $H_2O_2$  が生成され、MM のアポトーシスを引き起こしたことを示唆している。したがって、高用量 VC の抗がん作用における好中球の *gp91<sup>phox</sup>* は、がん細胞や好中球自体の作用を抑制する上で重要な役割を果たしていることが考えられた。

## 第5節 小括

本章の結果、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、他の臓器と比較して卵巣の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た。さらに、好中球の

gp91<sup>phox</sup>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 (Fig. 8)。

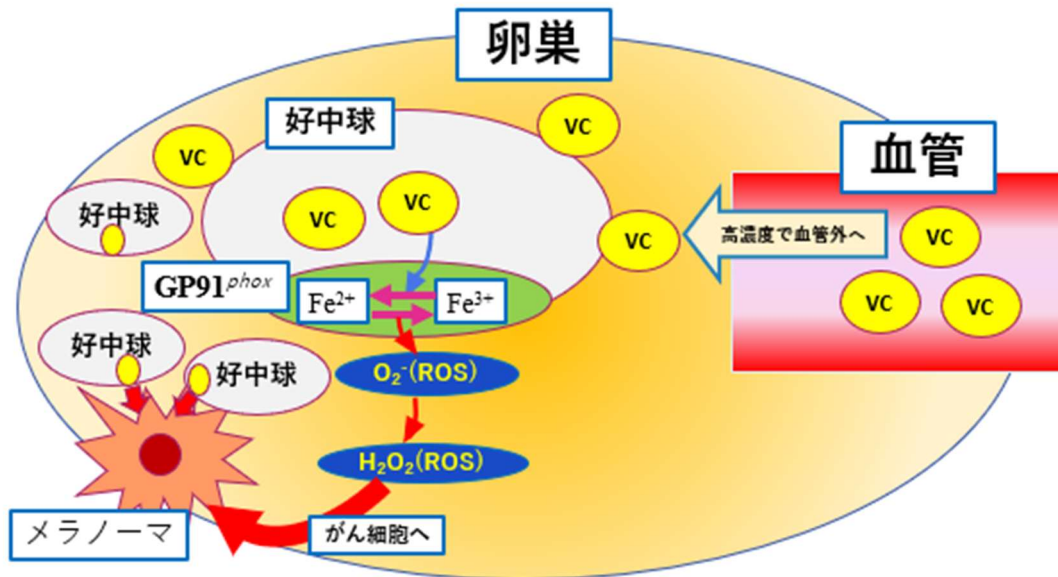


Fig. 8 高用量VCが卵巣の好中球にMMのアポトーシスを引き起こす仕組み

## 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

#### 第1節 緒言

第1章では、VCが卵巣の好中球を増加させ、がん細胞死を促進させることを述べた。さらに2価鉄の存在下でROSを発生し、プロオキシダント作用によりROSががん細胞へ選択的に作用し、アポトーシスに関与していることが示唆された。細胞内のROSの発生増加は、がん細胞のアポトーシスを促進する遺伝子p53に関与することが報告されている<sup>60)</sup>。p53による腫瘍抑制には、エンドスタチンが一部関与することも報告されている<sup>61-63)</sup>。XVIII型コラーゲンのC末端フラグメントであるエンドスタチンは、血管新生および腫瘍増殖の内因性阻害剤であり、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の作用を阻害する可能性がある<sup>64)</sup>。VCは、コラーゲン生合成に不可欠であるが、エンドスタチンに対しての影響は不明である。

血管新生は、がん細胞の増殖や抑制に重要な役割を果たしている<sup>65)</sup>。腫瘍によるVEGFおよび他の成長因子の産生は、腫瘍とその周辺で新しい血管形成をもたらすが、形成された血管は構造的および機能的に異常でありさらなる血管新生を誘導する<sup>66)</sup>。VEGFは、血管新生の主要な調節因子であり、固形腫瘍の発がん、浸潤および遠隔転移、ならびに血管新生に関与する<sup>67)</sup>。VEGFには、さまざまな特徴をもつサブタイプがあり、VEGFAは、内皮細胞の増殖と透過性の進行活性を効率的に誘導できる主要なVEGFサブタイプ<sup>68)</sup>、VEGFDは、進行性大腸がんにおいて強い血管新生作用を有するサブタイプとして示唆されている<sup>69)</sup>。またVEGFは、がんの発現や成長因子および低酸素によってアップレギュレートされる<sup>66)</sup>。低酸素刺激によるVEGF遺伝子の転写亢進は、転写因子である低酸素誘導因子-1 $\alpha$

(HIF-1 $\alpha$ ) によって制御される<sup>70)</sup>。

HIF は、サブユニット HIF-1 $\beta$  と酸素調節サブユニット HIF-1 $\alpha$  から構成される。HIF-1 $\alpha$  は、プロリル 4-ヒドロキシラーゼ (PHD) によってプロリン残基が水酸化されると、ユビキチン化されてプロテアソームに分解されるが、低酸素状態では、水酸化されず安定化された HIF-1 $\alpha$  が HIF-1 $\beta$  サブユニットと二量化することによって、転写活性因子を産生する<sup>71,72)</sup>。また酸素だけでなく 2 価鉄によっても活性化される。VC は 2 価鉄の状態を維持するために不可欠である。さらに、VC は PHD に影響を与えることが示唆されている<sup>73,74)</sup>。

これらのことから、血管新生に対する VC の投与は、抗腫瘍効果を示す可能性があると考えられるが、その詳細は明らかになっていない。したがって本章では、結腸がんのマウス細胞株 (Colon 26) を異種移植したマウスを用いて、結腸がんにおける高用量 VC に対する効果を検討した。さらにがんの増殖と密接な関係にある p53、VEGF、およびエンドスタチンレベルに対する高用量 VC の効果について検討した。

## 第 2 節 実験方法

### 1. 実験動物

本研究は、雄性のマウス (BALB/c; 5 週齢) を日本エスエルシー株式会社から購入して行った。マウスは、第 1 章と同条件で 1 週間の馴化期間を設けた。その後、マウスの体重が均等になるように分け、対照群、Colon 26 群、Colon 26 + 高用量 VC 併用群の 3 グループに割り当てた (n = 6 / グループ)。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針 (承認番号: 第 66 号) に従って実施した。

### 2. Colon 26 および VC 試薬の投与

Colon 26 は、東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター (Miyagi, Japan) から購入した<sup>75)</sup>。Colon 26 は、膨張性に増殖し浸潤性の増殖が少ない特徴的ながん細胞であり、



腫瘍効果の判定に評価しやすいため、本研究に用いた。等量のがん細胞 ( $10^5$ ) を含む 100  $\mu\text{L}$  のがん細胞懸濁液を右下肢に皮下投与した<sup>76)</sup>。

VC (Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.) は、第 1 章で使用した濃度を参考にし、有効な VC 溶液の投与量を 4 g/kg とした。VC は、蒸留水で希釈し 0.2 mL を経口投与した。

Colon 26 および VC は、それぞれ 1 日 1 回 14 日間連続投与した。

### 3. マウスの腫瘍測定

細胞株及び試薬の投与開始から 15 日目に、ペントバルビタールを第 1 章と同様の方法でマウスを麻酔したのち、マウスの右下肢腫瘍部分を測定した。腫瘍の体積は、式 (体積 =  $LW^2/2$ ) によって決定した。式の L は、皮膚表面に平行な最長の寸法であり、W は、L に垂直で表面に平行な寸法である。

### 4. エンドスタチンおよび ROS レベルの定量化

腫瘍測定後に、マウスの心臓から 1 mL の血液を採取したサンプルを 4°C、 $3,000 \times g$  で 10 分間遠心分離し、上清部分 (血漿) を測定に用いた。エンドスタチンの血漿レベルは、市販の酵素結合免疫吸着アッセイキット (Endostatin: Biomedica, Vienna, Austria) を使用し測定した。血漿および組織の ROS レベルは、市販の Oxysselect™ in vitro ROS / RNS 測定キット (STA-347; Cell Biolabs, Inc.) を使用し測定した。

### 5. 腫瘍組織染色

血液採取後に、右下肢腫瘍部分を採取し、腫瘍部分を縦 1.5 cm × 横 0.8 cm 四方の腫瘍組織サンプルとした。腫瘍組織サンプルは、パラホルムアルデヒド溶液 (4%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) にて固定した。固定した腫瘍組織は Tissue-Tek® optimum cutting temperature Compound (Sakura Finetek) を用いて凍結包埋し、5  $\mu\text{m}$  の厚さでミ

クロトーム (Leica Biosystems) にて薄切を行った。腫瘍組織切片は、1 次抗体として VEGFA (1:100; Bio Legend, San Diego, CA, USA) および VEGFD (1:100; Abcam, Cambridge, UK) に対する抗体で免疫染色したのち、2 次抗体として fluorescein isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (1:30; Dako Cytomation, Glstrup, Denmark) と tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated anti-rabbit (1:30; Dako Cytomation) を約 25°C にて 2 時間反応させた。免疫染色を実施した腫瘍組織切片は蛍光顕微鏡にて観察し、ソフトウェア Image J を用い、無作為に 3 か所のエリアを抽出して陽性細胞数の平均値を算出した。

## 6. ウェスタンブロッティングによる検出

採取した腫瘍部分100 mgを氷上にて剪刀で細かく刻んだのち、第1章と同様の方法でウェスタンブロッティングによる検出を行った。1次抗体としてp53 (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、HIF-1 $\alpha$  (1:1000; Abcam)、ローディングコントロールとしての $\beta$ -アクチン(1:5000; Sigma-Aldrich Corp.)をそれぞれ反応させたのち、horseradish peroxidaseで標識された2次抗体 (1:1000; Novex, Frederick, MD, USA) で処理を行った。免疫複合体は、化学発光試薬であるイムノスターゼータ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で処理したのち、膜の画像をMulti-Gauge Software Program ver3.0 (FUJIFILM, Greenwood) で取得した。

## 7. 統計分析

全てのデータは平均値 $\pm$ SD 値で示した。結果は、Microsoft Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft Corp.) を使用し分析した。各群間の統計的有意性は、Tukey-Kramer test によって測定した。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析は SPSS version 20 software (SPSS, Inc.) にて実施した。

### 第3節 結果

#### 1. 腫瘍組織に対する高用量 VC の効果

Colon 26 を異種移植したマウスは、腫瘍が観察された。高用量 VC は、腫瘍増殖を抑制した。Colon 26 + 高用量 VC 併用群の腫瘍体積は、Colon 26 群と比較して 28%減少した (Fig. 9A, B)。

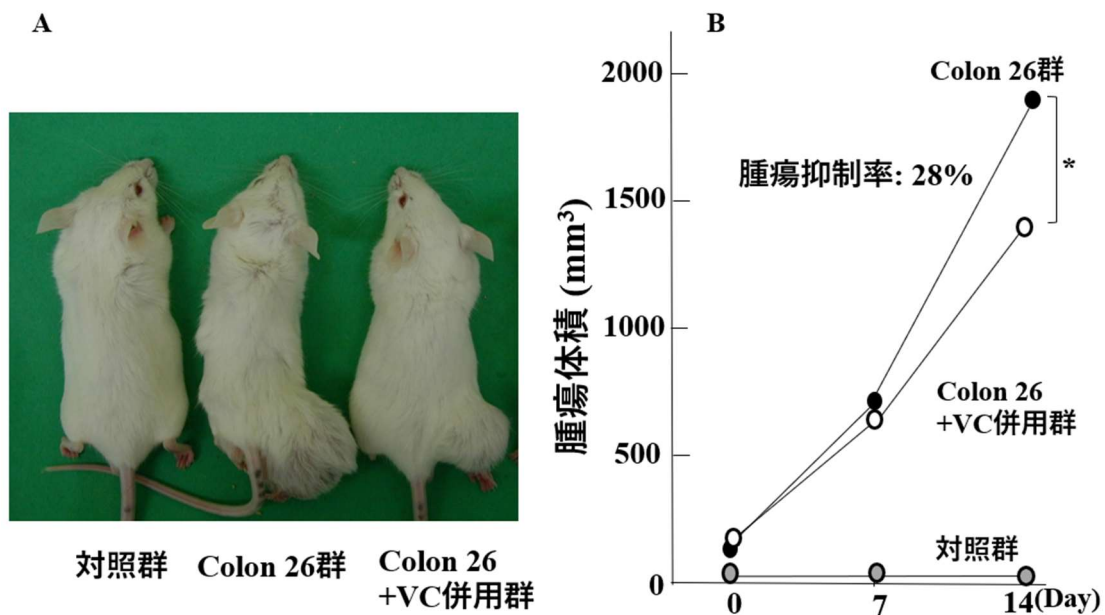


Fig 9. Effects of VC administration on the growth of Colon 26 tumors in mice. Macroscopic view of the tumor (A) and tumor volumes (B) are shown. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). \* p < 0.05 (Tukey's post-hoc test).

#### 2. p53、エンドスタチンレベルに対する高用量 VC の効果

p53 は、がん細胞のアポトーシスを促進する遺伝子である。腫瘍組織の p53 レベルは、対照群よりも Colon 26 群で有意に増加し、Colon 26 + 高用量 VC 併用群では、Colon 26 群よりもさらに増加した (Fig. 10A)。p53 による腫瘍抑制に一部関連がある血漿中のエンドスタチンレベルについても測定した。エンドスタチンレベルは、対照群より Colon 26 群で有意に増加し、Colon 26 + 高用量 VC 併用群では、Colon 26 群よりもさらに増加した (Fig. 10B)。

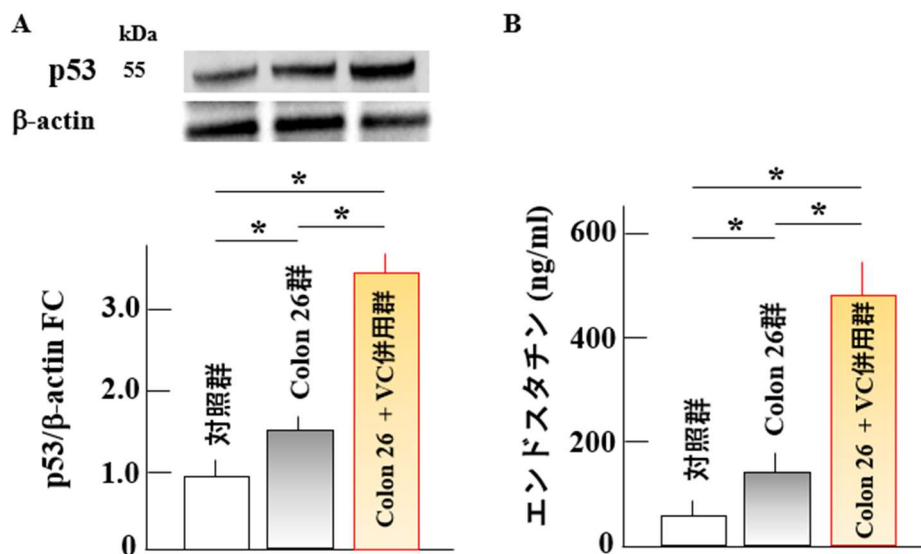


Fig 10. Effect of VC administration on the lower limb tumor tissues levels of p53 (A), and on plasma levels of endostatin (B). Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). \* p < 0.05 (Tukey's post-hoc test). FC: fold change.

### 3. 腫瘍組織における VEGFA および VEGFD の発現に対する高用量 VC の効果

VEGF は、血管新生の主要な調節因子である。VEGFA および VEGFD の腫瘍組織の発現レベルは、対照群と比較して Colon 26 群で有意に増加したが、Colon 26 + 高用量 VC 併用群では、Colon 26 群と比較して有意に減少した (Fig. 11)。

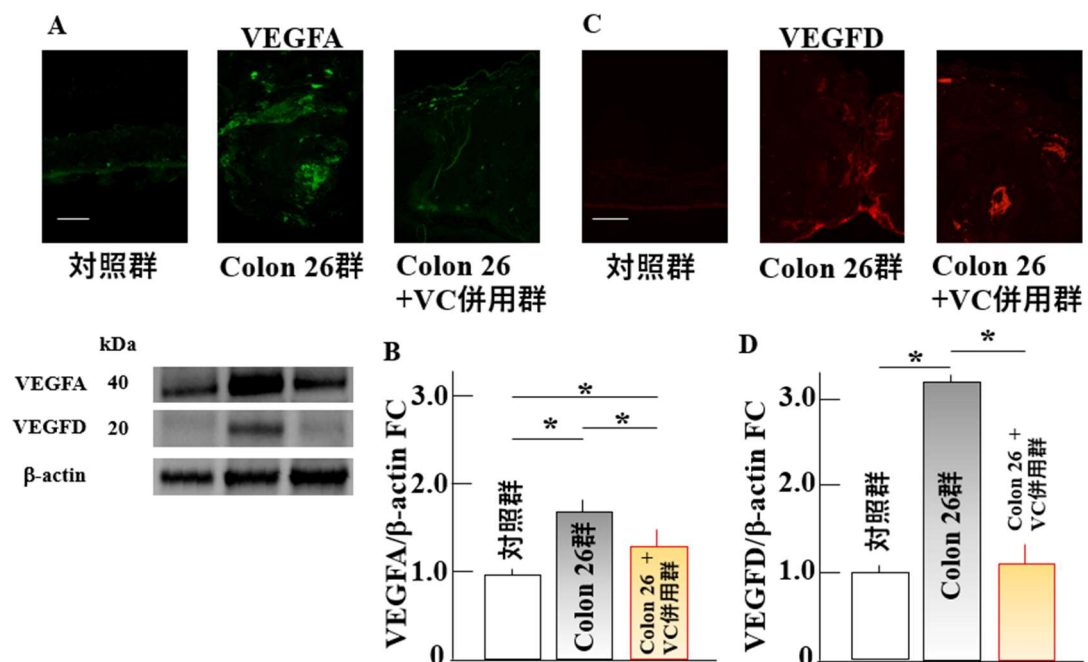


Fig 11. Effect of VC administration on VEGFA (A, B) and VEGFD (C, D) levels in the lower limb tumor tissues samples. Immunohistochemical analysis of VEGFA and VEGFD (A, C). Western blotting analysis of VEGFA and VEGFD (B, D). Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). \* p < 0.05 (Tukey's post-hoc test). Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

#### 4. HIF-1 $\alpha$ レベルに対する高用量 VC の効果

VEGF は、がんの発現や成長因子および低酸素によってアップレギュレートされる。低酸素刺激による VEGF 遺伝子の転写亢進は、転写因子である HIF-1 $\alpha$  によって制御される。腫瘍組織の HIF-1 $\alpha$  レベルは、対照群と比較して Colon 26 群で有意に増加したが、Colon 26 + 高用量 VC 併用群では、Colon 26 群に比べて有意に減少した (Fig. 12)。

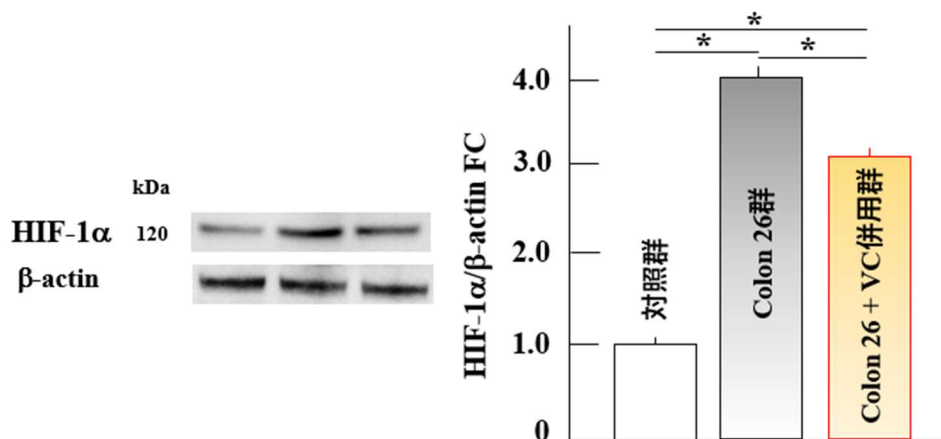


Fig 12. Effect of VC administration on the lower limb tumor tissues levels of HIF-1 $\alpha$ . Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). \* p < 0.05 (Tukey's post-hoc test). FC: fold change.

#### 5. 腫瘍組織内および血漿の ROS に対する高用量 VC の効果

腫瘍組織内および血漿の両方の ROS レベルは、Colon 26 群では、対照群と比較して増加したが、Colon 26 + 高用量 VC 併用では、有意に減少された (Fig. 13)。

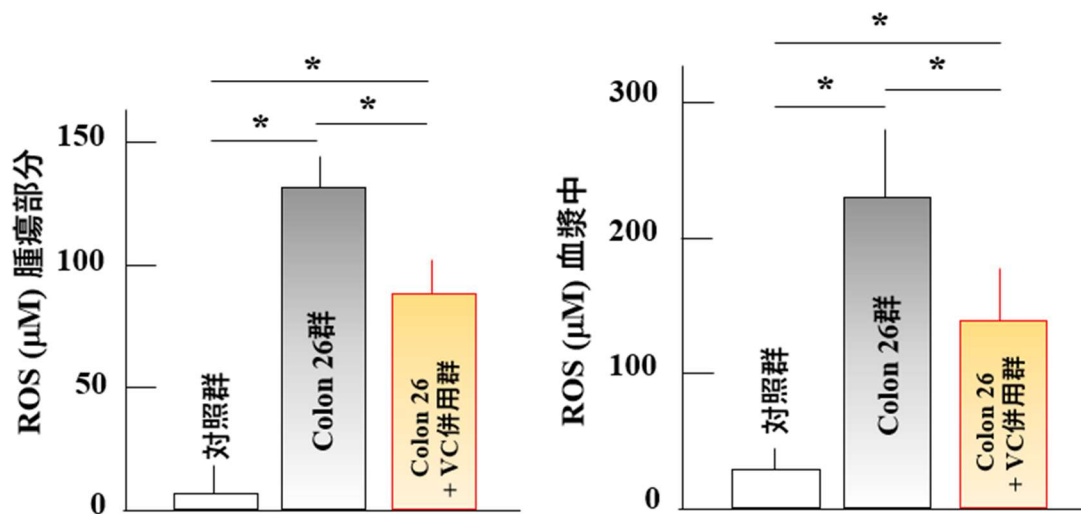


Fig 13. Effect of VC administration on the lower limb tumor tissues levels of ROS, and on plasma levels of ROS. Data are presented as mean  $\pm$  S.D. (n = 6 / group). \* p < 0.05 (Tukey's post-hoc test).

#### 第4節 考察

p53 は、腫瘍抑制の転写因子であり、がん遺伝子の多様なストレスによって活性化することにより、下流遺伝子の発現を調節することが知られている<sup>77)</sup>。さらに、細胞周期の停止やアポトーシス誘導などがコントロールされることにより、がん抑制機能を発揮することが知られている<sup>78,79)</sup>。最近の研究では、p53 が  $\alpha$ (II) コラーゲンプロリル-4-ヒドロキシラーゼ遺伝子の転写を活性化することにより血管新生を抑制することが示唆されている<sup>61)</sup>。これにより XVIII および IV 型コラーゲンに由来する強力な内因性血管新生阻害物質であるエンドスタチンおよびタムスタチンを細胞外に放出させる。これらの阻害物質が血管新生経路を抑制し、抗がん作用を示す<sup>61,64)</sup>。Colon 26 を異種移植したマウスで腫瘍が観察された(Fig. 9A)。高用量 VC を併用したマウスでは、腫瘍の増殖が抑制され (Fig. 9B)、p53 とエンドスタチンの発現レベルが増加した (Fig. 10A, B)。さらに、VEGFA と VEGFD のレベルは、高用量 VC 併用群で減少した (Fig. 11)。エンドスタチンは VEGF の作用を阻害することが示唆されていることから、VC が p53 / エンドスタチン / HIF-1 $\alpha$  / VEGF 経

路に関与している可能性が示唆された。一方で、VCはコラーゲンの産生と維持に関与しており、p53を介して作用することなくXVIII型コラーゲンに直接作用することも考えられる。

VCは、HIF-1 $\alpha$ を介してVEGFの発現を阻害することも報告されている<sup>80</sup>。HIF-1 $\alpha$ は、酸素依存性酵素であるPHDによって水酸化されるが、低酸素下のHIF-1は、安定化して転写活性化因子を産生する<sup>71,72</sup>。その後VEGFが分泌され、内皮細胞が増殖し新しい血管が形成される。酸素濃度の変化はROSにも影響する。本来、細胞内におけるROSは、酸化作用を示す。しかし、ROSが過剰に生成した状態においては、酸化作用を示し酸化ストレスを引き起こす。ROSレベルの増加は、低酸素症および再酸素化中のHIF安定化に関与することも報告されている<sup>81</sup>。Colon 26異種移植したマウスでは、HIF-1 $\alpha$ とROSの両方のレベルが増加したが、高用量VCによって両方が減少された (Fig. 12, 13)。このことから、高用量VCによるROSの減少が血管新生の抑制に関与していることが示唆された。

## 第5節 小括

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、VEGFの転写亢進因子におけるHIF-1 $\alpha$ は、高用量VCにより抑制された。HIF-1 $\alpha$ を安定化させるPHDは、VCによりROSが減少することで、HIF-1 $\alpha$ 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 (Fig. 14)。

このことから、本章では、結腸がん誘発マウスにおける高用量VCは、腫瘍の増殖を抑制し、血管新生を抑制することも抗腫瘍効果に関与していることが示された。

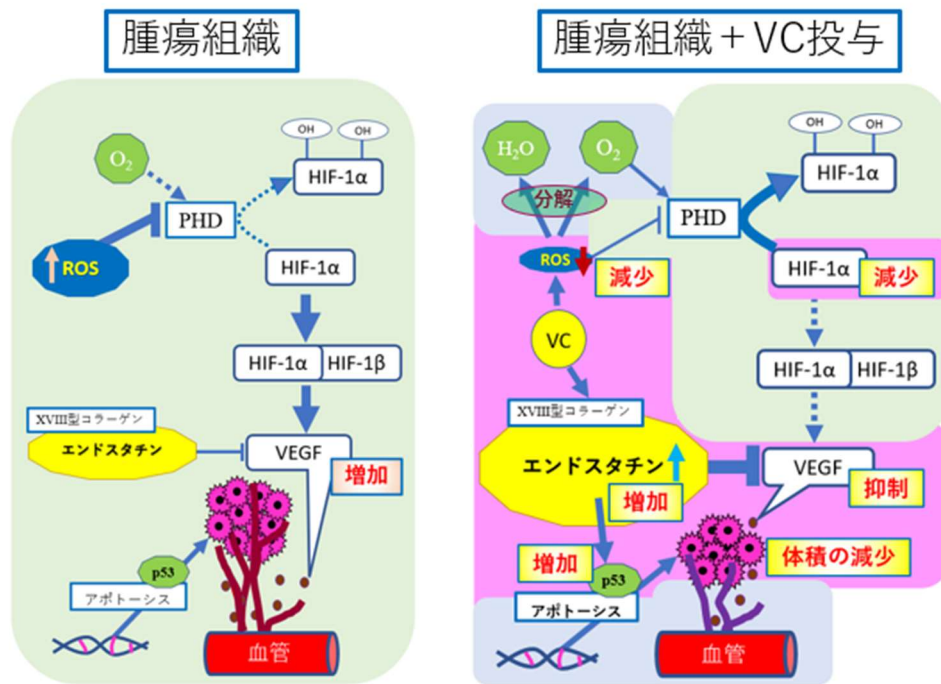


Fig. 14 高用量VCがp53、エンドスタチン、ROS、HIF-1α、VEGFに作用し血管新生の抑制に関する仕組み (Magenta color は、実験結果より得られたエビデンス)



## 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

#### 第1節 緒言

正常細胞のがん化は、生活習慣に起因し、発がん因子のばく露を受け、遺伝子に変異が起こることにより生じる。がん化した細胞は、細胞増殖が正常に制御できなくなり無秩序に増殖する。細胞増殖には、DNA複製が必要でありDNA複製が正常に進行するためには、DNA超らせん構造の解消や再形成をすることが必要である。このDNAの超らせん構造の制御に関わる酵素にトポイソメラーゼがあり、I型とII型のタイプがある。トポイソメラーゼIは、超らせん構造をとる2本鎖DNAの一方の鎖を切断し、切断（ニック）部分に他方の鎖を通過させてねじれを取る。その後DNAがより戻された後、1本鎖のDNAニック部が再結合される。イリノテカン塩酸塩水和物（CPT-11）はトポイソメラーゼI阻害薬であり、超らせん構造のDNA酵素複合体に結合し、再結合を阻害することで抗腫瘍効果を示す<sup>82,83</sup>。

CPT-11は、ヌマミズキ科キジユに含まれるカンプトテシンをリード化合物として開発されたプロドラッグ型の抗がん薬である。CPT-11は、細胞内で加水分解されて活性代謝物である7-エチル-10-ヒドロキシカンプトテシン（SN-38）に変換される。SN-38は肝臓でグルクロン酸（Glu）抱合を受け、SN-38-Gluとなり胆汁経路にて腸管内に移行する。日常臨床においてCPT-11は、肺がん、卵巣がん、胃がん、大腸がん、乳がんなどに広く使用されている。2018年における本邦での大腸がんの罹患者数は、男性3位、女性2位と増え続けていると共に<sup>84</sup>、CPT-11の使用頻度も増加しており、大腸がんの代表的なレジメンであるFOLFIRI療法に、CPT-11が使用されている。CPT-11の用量規制因子（Dose Limiting Factor）は、白血球減少と下痢である<sup>85,86</sup>。さらにCPT-11は、脱毛や乾燥皮膚の薬物有害

事象を引き起こすことが知られている<sup>87,88)</sup>。CPT-11による皮膚障害は、出現頻度が高いものの、重篤性の低いことが特徴的であり、数日で完治せず慢性的に症状が持続するため、患者の生活の質（QOL）に大きな影響を及ぼす。また場合によっては、がん治療に対する意欲が低下し、治療が中止に至る場合も多いとされているが、CPT-11による乾燥皮膚発現に対する研究は、ほとんどおこなわれていないのが現状である。

乾燥皮膚は、生体内の炎症、薬剤誘発性による腸管の炎症、外部環境の変化など、多様な要因が重なり皮膚バリア機能が脆弱になった結果、角層の水分保持ができず、角層からの水分喪失量が上昇することで引き起こされる<sup>89)</sup>。さらに、乾燥皮膚は、表皮における皮脂の欠乏や真皮に存在するヒアルロン酸やコラーゲンの減少により引き起こされるが<sup>37)</sup>、コラーゲンの合成には、VCが必要不可欠である。

コラーゲン合成におけるVCの役割は、プロリンやリシンを水酸化する酵素の補因子であり<sup>90)</sup>、3本のコラーゲン繊維が重合されなければ結合組織の形成が障害され、皮膚の脆弱化や骨形成の異常が起こる<sup>91)</sup>。さらに、VCは、抗酸化作用を有しており<sup>92)</sup>、先行研究において、高用量VCとCPT-11の併用投与により大腸がんが改善した際、VCによるROSの減少およびI型コラーゲンの増加がみられた<sup>15)</sup>。しかし、高用量VCにおける抗がん薬との併用に伴う薬物有害事象への有用性は明らかではない。

そこで本章では、CPT-11が乾燥皮膚を誘発するメカニズムおよび高用量VCの投与が乾燥皮膚に如何に有効であるかについて検討した。

## 第2節 実験方法

### 1. 実験動物

本研究は、雄性のヘアレスマウス（HR-1；7週齢）を日本エスエルシー株式会社から購入して行った。このマウスは、Second hair cycleの異常により、4週齢頃から毛が完全に抜け落ち、剃毛の必要がなく、皮膚に関する研究に広く用いられている。購入したマウスは、第

1 章と同条件で 1 週間の馴化期間を設けた。その後、マウスの体重が均等になるように分け、対照群、高用量 VC 投与群、CPT-11 投与群、高用量 VC + CPT-11 併用群の 4 グループに割り当てた (n = 5 / グループ)。すべての動物実験は、鈴鹿医療科学大学動物実験指針 (承認番号: 第 34 号) に従って実施した。

## 2. 試薬の投与

VC (Fuso Pharmaceutical Industries Ltd.) は、100 mg/day を蒸留水で希釈し、経口投与した<sup>15)</sup>。CPT-11 (Daiichi Sankyo Healthcare Co., Ltd., Tokyo, Japan) は、60 mg/kg/day を蒸留水で希釈し、腹腔内投与した<sup>12)</sup>。各溶液は、0.2 mL で 1 日 1 回、4 日間連続投与した。

## 3. 経表皮水分喪失量の測定

試薬投与開始から 5 日目にペントバルビタールを第 1 章と同様の方法でマウスを麻酔した後、背部皮膚の経表皮水分喪失量 (Transepidermal water loss: TEWL) を測定するために Tewameter<sup>®</sup> TM300 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Cologne, Germany) を使用した<sup>93)</sup>。TEWL は皮膚から時間あたりに体外喪失する水分の測定値であり、皮膚バリア機能を反映している。測定値は、測定開始後およそ 10 秒経過後、数値が安定した状態で読み取り、3 回測定による平均値で算出した。

## 4. 血漿中 ROS レベル測定

TEWL を測定後、心臓から 1 mL の血液を採取し 4°C、3,000 × g で 10 分間遠心分離し、上清部分 (血漿) を測定に用いた。ROS レベルは、市販の Oxiselect<sup>™</sup> in vitro ROS / RNS 測定キット (STA-347; Cell Biolabs, Inc.) を使用し、マイクロプレートリーダーにて励起 480 nm / 蛍光 530 nm の波長で測定した。

## 5. 皮膚組織染色

血液採取後、縦1.5 cm × 横0.8 cm四方の背部皮膚サンプルとして採取した。背部皮膚サンプルは、パラホルムアルデヒド溶液（4%, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）にて固定した。固定した皮膚組織はTissue-Tek® optimum cutting temperature Compound (Sakura Finetek) を用いて凍結包埋し、5 μmの厚さでマイクローム (Leica Biosystems) にて薄切を行った。薄切した切片はヘマトキシリン・エオジン (HE) によって染色した後、光学顕微鏡にて組織学的評価を行い、無作為に抽出した10枚の画像により表皮から皮下組織に至るまでの厚さを測定した。アポトーシスは、アポトーシス検出キット (Takara Biomedicals) を用いて評価した。アポトーシス検出は、組織学的な局在や個々の細胞の検出を可能にするTUNEL法を用いて行い、蛍光顕微鏡で観察した。TUNEL陽性細胞の数は、画像処理ソフトウェアImage Jを用いて計測し、無作為に3か所のエリアを抽出し、単位面積 (mm<sup>2</sup>) あたりのTUNEL陽性細胞数の平均値を算出した。

## 6. ウェスタンブロッティングによる検出

採取した背部の皮膚組織100 mgを氷上にて剪刀で細かく刻んだのち、第1章と同様の方法でウェスタンブロッティングによる検出を行った。1次抗体として線維芽細胞特異的マーカーであるS100A4 (1:1000; RB-1804-A0, Thermo Fisher Scientific) 、I型コラーゲン (1:1000; 234,167, Millipore, Billerica, MA, USA) 、cleaved caspase-3 (カスパーゼ3) (1:1000; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 、cleaved caspase-9 (カスパーゼ9) (1:1000; Cell Signaling Technology) 、ローディングコントロールとしてのβ-アクチン (1:5000; Sigma-Aldrich Corp.) をそれぞれ反応させたのち、horseradish peroxidaseで標識された2次抗体 (1:1000; Novex, Frederick, MD, USA) を25°Cで1時間反応させた。免疫複合体は、化学発光試薬であるイムノスターゼータ (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) で反応させたのちに、画像をMulti-Gauge Software Program (FUJIFILM, Greenwood) で

取得した。

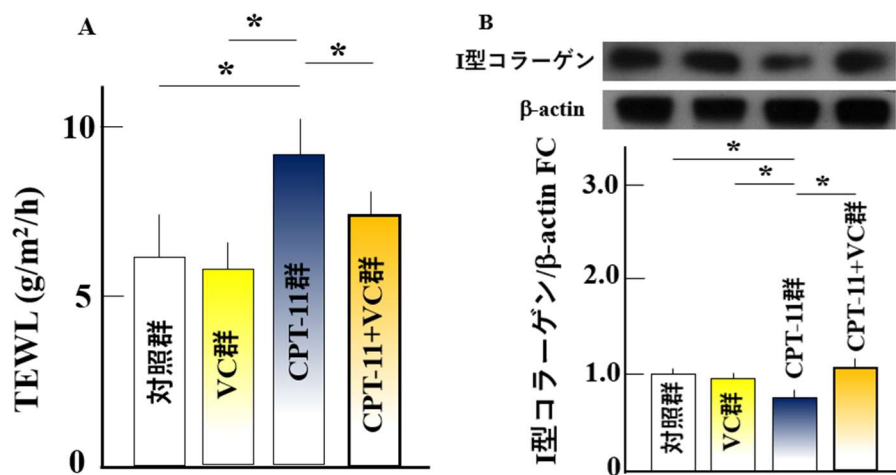
## 7. 統計分析

全てのデータは平均値±SD 値で示した。結果は、Microsoft Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft Corp.) を使用し分析した。各群間の統計的有意性は、Tukey-Kramer test によって測定した。危険率が 5%未満の場合を統計学的に有意と判断した。統計解析は SPSS version 20 software (SPSS, Inc.) にて実施した。

### 第3節 結果

#### 1. マウスの皮膚状態の変化に対する高用量VCの効果

背部皮膚の TEWL を測定して、乾燥皮膚を評価した。CPT-11 投与群で TEWL が大幅に上昇した。残りの 3 グループには変化が見られなかった (Fig. 15A)。一方、皮膚の支持組織である I 型コラーゲンの発現は、CPT-11 投与群で著しく低下したが、高用量 VC + CPT-11 併用群における I 型コラーゲンの発現は、対照群および高用量 VC 投与群と同程度であった (Fig. 15B)。さらに、皮膚の切片を HE 染色し、表皮から皮下組織に至るまでの厚さを評価した。CPT-11 投与群では、皮膚の厚さが縮小したが、高用量 VC + CPT-11 併用群の皮膚の厚さは、対照群と高用量 VC 投与群に比べて差はなかった (Fig. 15C)。



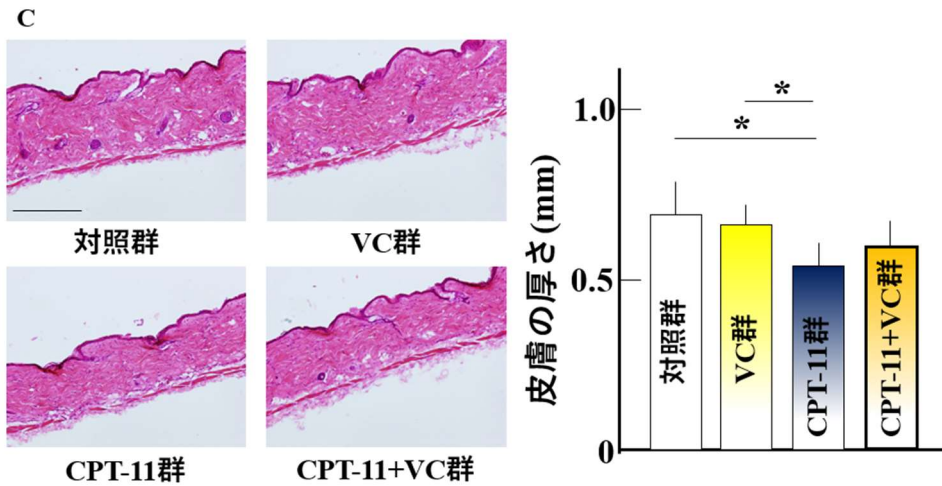


Fig.15 Effects of high-dose vitamin C administration on irinotecan-induced skin dryness. TEWL (A), the expression of collagen type I in the skin (B), and skin thickness (C). Values are presented as the mean  $\pm$  SD values of five animals. \*P < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m. FC: fold change.

## 2. TUNEL 陽性細胞の発現に対する高用量 VC の効果

TUNEL 反応は、アポトーシスにより生成された DNA 鎖-分解物を優先的に標識する。

TUNEL 陽性細胞の数は、CPT-11 投与群で著しく増加した。ただし、対照群、高用量 VC 投与群、高用量 VC + CPT-11 併用群のグループ間で数に違いがなかった (Fig. 16)。

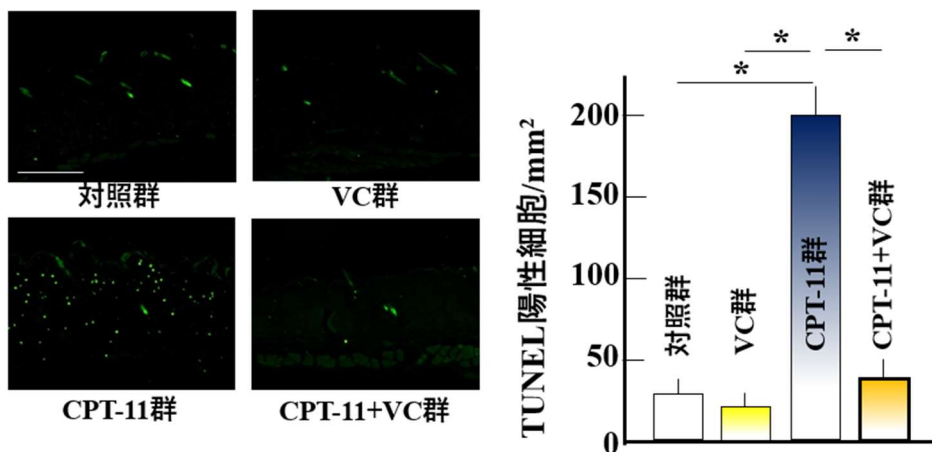


Fig. 16 Effects of high-dose vitamin C administration on TUNEL-positive cells. Values are presented as the mean  $\pm$  SD values of five animals. \*P < 0.05. Scale bar = 100  $\mu$ m.

### 3. アポトーシスの発現におけるカスパーゼ 3、カスパーゼ 9 および線維芽細胞に対する高用量 VC の効果

CPT-11 投与により、正常細胞が影響を受け、アポトーシスの誘導を引き起こすため、アポトーシスと線維芽細胞に関連するカスパーゼを測定した。カスパーゼは、プロカスパーゼと活性化カスパーゼが含まれる。プロカスパーゼ型は常に細胞内に存在し、そのレベルはアポトーシスとは関連しない。本研究では、活性化カスパーゼ 3 および 9 の発現を確認した。カスパーゼ 3 およびカスパーゼ 9 のレベルは、CPT-11 投与群で最も増加した。高用量 VC + CPT-11 併用群のレベルは、CPT-11 投与群のレベルよりも有意に低かったが、対照群および高用量 VC 投与群のレベルよりも高かった (Fig. 17A, B)。一方、皮膚の線維芽細胞の数は、CPT-11 投与群では減少したが、残りの 3 グループは、同程度であった (Fig. 17C)。

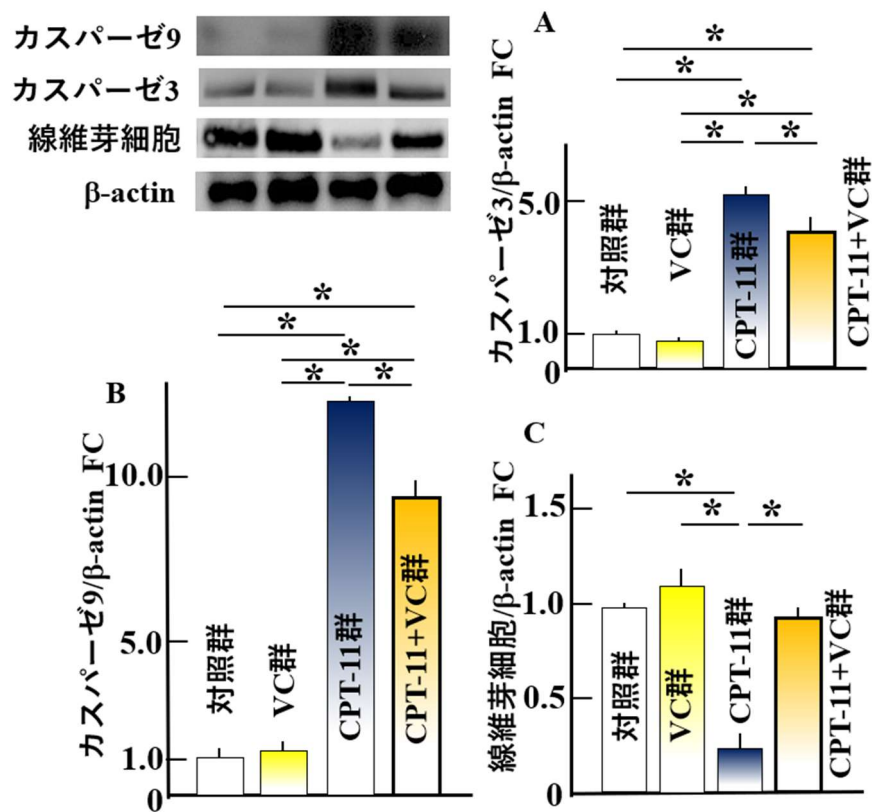


Fig. 17 Effects of high-dose vitamin C administration on caspase-3 (A), caspase-9 (B), and fibroblasts (C) in the skin. Values are presented as the mean  $\pm$  SD values of five animals. \* $P < 0.05$ . FC: fold change.

#### 4. 血漿中の ROS レベルの解析

活性化カスパーゼは、ミトコンドリアで ROS の生産を引き起こす<sup>94)</sup>。CPT-11 投与群は、ROS レベルは著しく増加した。高用量 VC + CPT-11 併用群の ROS レベルは、CPT-11 投与群よりも減少したが、対照群と高用量 VC 投与群よりも増加した (Fig. 18)。

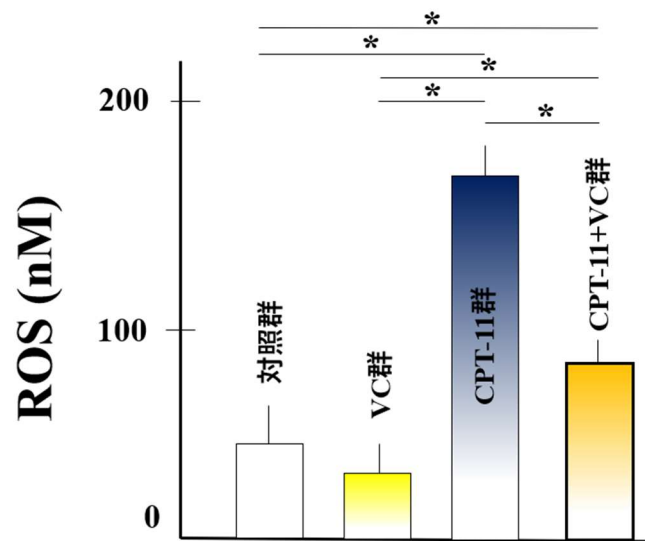


Fig 18 Effects of high-dose vitamin C administration on skin levels of ROS in the mice. Values are presented as the mean  $\pm$  SD values of five animals. \*P < 0.05.

#### 第4節 考察

本研究では、CPT-11 の投与により TEWL の上昇 (Fig. 15A)、I型コラーゲンの発現の減少 (Fig. 15B)、皮膚の厚さの減少 (Fig. 15C) が認められ、乾燥皮膚が誘発された。これらのレベルは、高用量 VC の投与後に対照群のレベルに近づき、乾燥皮膚以前の状態に近づいたことが示唆された。さらに CPT-11 の投与により、TUNEL 陽性細胞、カスパーゼ 3、カスパーゼ 9、および ROS レベルが増加され (Fig. 16, Fig. 17A, B, Fig 18)、線維芽細胞の数が減少しアポトーシスの誘導が観察された (Fig. 17C)。一方、高用量 VC は、これらのパラメーターを改善させた。

抗がん薬は、がん細胞だけでなく正常細胞にも影響を及ぼし、アポトーシスが誘導され最終的に細胞を破壊する<sup>95-98)</sup>。抗がん薬による細胞死のシグナルは、アポトーシス促進タン



パク質である Bcl-2 結合 X タンパク質 (BAX) を活性化させる<sup>99)</sup>。BAX は、ミトコンドリアへ移動し、ミトコンドリアの膜よりシトクロム C を放出させる。シトクロム C はアポトーシスプロテアーゼ活性化因子と結合してカスパーゼ 9 がカスパーゼ 3 を活性化させ、それにより DNA 断片化とアポトーシスを誘導することが示唆されている<sup>95-98,100)</sup>。さらに、抗がん薬におけるアポトーシスの誘導過程において ROS の生成が報告されている<sup>101-104)</sup>。本研究においても CPT-11 投与後、ROS やカスパーゼ 3 およびカスパーゼ 9 は増加し、線維芽細胞のアポトーシスが誘導された可能性がある。線維芽細胞は、皮膚の脆弱性の増強や損傷により、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を始める結合組織由来の細胞である。そのため、線維芽細胞が減少したことで、I 型コラーゲンも減少したと考えられた。

VC は、ROS が減少することで、抗酸化作用を示す<sup>105)</sup>。高用量 VC は、ROS の生成を減少することで、CPT-11 における線維芽細胞のアポトーシス誘導を抑制した。さらに、線維芽細胞の減少を抑えることにより、I 型コラーゲンの減少も抑えることが示唆された。したがって、高用量 VC は、抗がん薬における乾燥皮膚に有効であることが考えられた。

## 第 5 節 小括

CPT-11 投与は、乾燥皮膚を引き起こすことが示され、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 の経口投与は、CPT-11 によって生じるアポトーシスの誘導および ROS 生成を減少させた (Fig. 19)。

本章の結果から、高用量 VC は、CPT-11 による乾燥皮膚発現の抑制効果があることが示唆された。

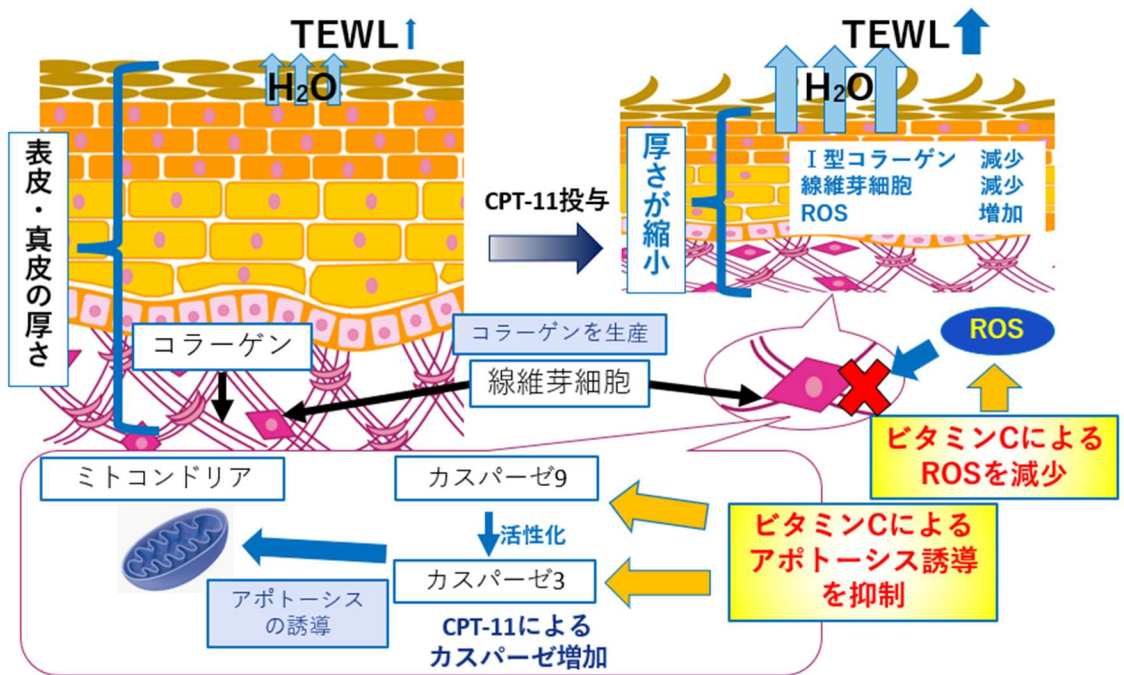


Fig. 19 CPT-11 の乾燥皮膚発現における高用量 VC の薬物有害事象軽減効果に関わる仕組み

## 結論

本論文では、がん治療における ROS に対する高用量 VC の抗腫瘍効果と薬物有害事象軽減効果について着目した。高用量 VC における抗腫瘍効果は、ROS の関与が示唆されているが、各組織やがん細胞の増殖における高用量 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 の併用による、薬物有害事象軽減効果は不明である。そこで本論文では、がん治療における ROS に対する高用量 VC の効果に関するメカニズムを検討した。

第 1 章では、MM 誘発マウスにおける高用量 VC は、臓器特異的作用を示し、卵巣における MM の浸潤と増殖を抑制させた。さらに、卵巣の好中球数を増加させ、好中球から生成された ROS の貧食作用により細胞のアポトーシスを促進させた。本章において、好中球における gp91<sup>phox</sup> に対して高用量 VC が作用することで ROS が生成され、MM のアポトーシスに関与していることが示された (Fig. 8)。第 2 章では、結腸がん誘発マウスにおける高用量 VC は、ROS が減少することで、HIF-1 $\alpha$  の安定化をもたらした。さらに、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。これらの結果から、高用量 VC は、腫瘍の増殖を抑制し、血管新生を抑制することも抗腫瘍効果に関与していることが示された (Fig. 14)。第 3 章では、CPT-11 の薬物有害事象による乾燥皮膚発現に対する高用量 VC の有用性を確認した。CPT-11 投与は、乾燥皮膚を引き起こすことが示され、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とあることが示唆された。さらに高用量 VC の経口投与は、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を明らかにした (Fig. 19)。

以上のことから、高用量 VC における抗腫瘍効果は、卵巣の好中球における gp91 に対して高用量 VC が作用することで ROS が生成し、プロオキシダント作用によってがん細胞に

選択的に効果を示した。さらに、血管新生における高用量 VC は、VC の抗酸化作用によって ROS が減少し、VEGF の作用が阻害されることで、腫瘍の縮小に繋がった。これらのことから、高濃度 VC は、プロオキシダント作用や抗酸化作用により抗腫瘍効果を示すことが示唆された (Fig. 20)。さらに、高用量 VC は、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 (Fig. 19)。

高用量 VC 療法は、すでに行われている治療法であるが、未だにエビデンスが乏しいとされている。本論文での成果は、今後の高用量 VC 療法が確固たる治療法になるための新たな可能性を拓く重要な知見であると考えられる。

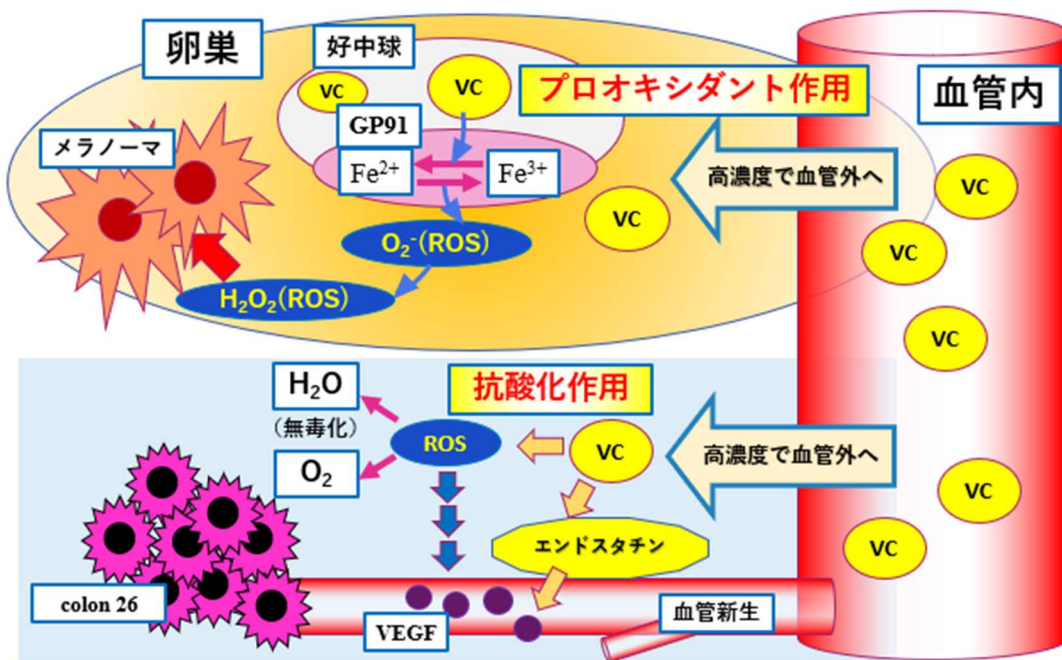


Fig. 20 高用量 VC におけるプロオキシダント作用や抗酸化作用により抗腫瘍効果を示す仕組み

## 引用文献

- 1) Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73, 3685–3689 (1976).
- 2) Cameron E, Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: reevaluation of prolongation of survival times in terminal human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75, 4538–4542 (1978).
- 3) Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M. Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. *Ann. Intern. Med.*, 140, 533–537 (2004).
- 4) Padayatty SJ, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Hoffer LJ, Levine M. Intravenously administered vitamin C as cancer therapy: three cases. *CMAJ*, 174, 937–942 (2006).
- 5) 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).
- 6) Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Soma G, Inoue M. High-dose vitamin C (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced cancer. *Anticancer Res.*, 29, 809–815 (2009).
- 7) Monti DA, Mitchell E, Bazzan AJ, Littman S, Zabrecky G, Yeo CJ, Pillai MV, Newberg AB, Deshmukh S, Levine M. Phase I evaluation of intravenous ascorbic acid in combination with gemcitabine and erlotinib in patients with metastatic pancreatic cancer. *PLoS One*, 7, e29794 (2012).
- 8) Takahashi H, Mizuno H, Yanagisawa A. High-dose intravenous vitamin C improves quality of life in cancer patients. *Pers. Med. Universe*, 1, 49–53 (2012).
- 9) Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.*, 137, 2171–2184 (2007).
- 10) Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. The Pharmacokinetics of Vitamin C. *Nutrients.*, 11, 2412 (2019).
- 11) 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).
- 12) Hornig D, Vuilleumier JP, Hartmann D. Absorption of large, single, oral intakes of ascorbic acid. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 50, 309–314 (1980).
- 13) Rose RC, Bode AM. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate.

FASEB J., 7, 1135–1142 (1993).

14) 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).

15) 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).

16) Wang K, Jiang H, Li W, Qiang M, Dong T, Li H. Role of Vitamin C in Skin Diseases. *Front Physiol.*, 9, 819 (2018).

17) d'Ischia M, Wakamatsu K, Napolitano A, Briganti S, Garcia-Borrón JC, Kovacs D, Meredith P, Pezzella A, Picardo M, Sarna T, Simon JD, Ito S. Melanins and melanogenesis: methods, standards, protocols. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 26, 616–633 (2013).

18) Godic A, Poljšak B, Adamic M, Dahmane R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxid Med Cell Longev.*, 2014, 860479 (2014).

19) Tadokoro T, Kobayashi N, Zmudzka BZ, Ito S, Wakamatsu K, Yamaguchi Y, Korossy KS, Miller SA, Beer JZ, Hearing VJ. UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin. *FASEB J.*, 17, 1177–1179 (2003).

20) Saida T. The concept of de novo origin of cutaneous malignant melanoma. *Eur. J. Dermatol.*, 4, 252–254 (1994).

21) Baderca F, Vincze D, Balica N, Solovan C. Mucosal melanomas in the elderly: challenging cases and review of the literature. *Clin. Interv. Aging*, 9, 929–937 (2014).

22) Saida T. Diagnosis and treatment of cutaneous malignant melanoma. *Skin Cancer*, 8, 161–186 (1993).

23) Berwick M, Wiggins C. The current epidemiology of cutaneous malignant melanoma. *Front Biosci.*, 11, 1244–1254 (2006).

24) Hu S, Ma F, Collado-Mesa F, Kirsner RS. UV radiation, latitude, and melanoma in US Hispanics and blacks. *Arch. Dermatol.*, 140, 819–824 (2004).

25) Ishihara K, Saida T, Yamamoto A, Japanese Skin Cancer Society Prognosis and Statistical Investigation Committee. Updated statistical data for malignant melanoma in Japan. *Int. J. Clin. Oncol.*, 6, 109–116 (2001).

26) Sabban F, Boukerrou M, Mubiayi N, Houpeau JL, Robert Y, Vinatier D. Malignant melanoma metastatic to the ovary. A case report. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 33, 409–411 (2005).

27) Gök ND, Yildiz K, Corakçı A. Primary malignant melanoma of the ovary: case report

- and review of the literature. *Turk. Patoloji. Derg.*, 27, 169–172 (2011).
- 28) Chiba Y, Ihata Y, Nakayama H. Two cases of malignant melanoma arising primarily in the female genital organ. *Skin Cancer (Japan)*, 21, 368–371 (2006).
- 29) Tsuchida T, Koga H, Uhara H, Kiyohara T, Takenouti T, Anzai S, Umebayashi Y, Kadono T, Kamiya H, Kouno T, Shikama N, Tsutsumida A, Nakamura Y, Namikawa K, Hatta N, Murata Y, Moroi Y, Iwatsuki K. Guidelines for the treatment of skin malignant tumors second edition. *JPN. J. Dermatol.*, 125, 5–75 (2015).
- 30) Ichimura T. Malignant melanoma. *Adv. Obstet. Gynecol.*, 69, 60–62 (2017).
- 31) Sanadi RM, Deshmukh RS. The effect of Vitamin C on melanin pigmentation - A systematic review. *J. Oral. Maxillofac Pathol.*, 24, 374–382 (2020).
- 32) Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta.*, 1826, 443–457 (2012).
- 33) Frei B, Lawson S. Vitamin C and cancer revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105, 11037–11038 (2008).
- 34) Jaganjac M, Cipak A, Schaur RJ, Zarkovic N. Pathophysiology of neutrophil-mediated extracellular redox reactions. *Front Biosci (Landmark Ed.)*, 21, 839–855 (2016).
- 35) Hiramoto K, Tanaka H, Katada T, Konishi H, Hayakawa R. Effect of 17 $\beta$ -estradiol on ultraviolet radiation-induced immunosuppression and carcinogenesis in mice. *Environ. Dermatol.*, 5, 147–154 (1998).
- 36) Jimbow K, Uesugi Y. New melanogenesis and photobiological processes in activation and proliferation of precursor melanocytes after UV-exposure: ultrastructural differentiation of precursor melanocytes from Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.*, 78, 108–115 (1982).
- 37) Yokoyama S, Hiramoto K, Koyama M, Ooi K. Skin disruption is associated with indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Exp. Dermatol.*, 23, 659–663 (2014).
- 38) Sasaki S, Tamaki Y, Nagata K, Kobayashi Y. Regulation of the estrous cycle by neutrophils via opioid peptides. *J. Immunol.*, 187, 774–780 (2011).
- 39) Machelska H, Stein C. Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. *J. Neuroimmune Pharmacol.*, 1, 90–97 (2006).
- 40) Kaminski T, Siawrys G, Bogacka I, Okrasa S, Przala J.. The regulation of steroidogenesis by opioid peptides in porcine theca cells. *Anim. Reprod. Sci.*, 78, 71–84 (2003).
- 41) Kaminski T, Siawrys C, Bogacka I, Okrasa S, Przala J.. The influence of opioid peptides on steroidogenesis in porcine granulosa cells. *Reprod. Domest. Anim.*, 39, 25–32 (2004).

- 42) Sonoda Y, Mukaida N, Wang JB, Shimada-Hiratsuka M, Naito M, Kasahara T. Physiologic regulation of postovulatory neutrophil migration into vagina in mice by a C-X-C chemokine(s). *J. Immunol.*, 160, 6159–6165 (1998).
- 43) Prinz W, Bortz R, Bregin B, Hersch M. The effect of ascorbic acid supplementation on some parameters of the human immunological defence system. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 47, 248–257 (1977).
- 44) Vallance S. Relationships between ascorbic acid and serum proteins of the immune system. *Br. Med. J.*, 2, 437–438 (1977).
- 45) Kennes B, Dumont I, Brohee D, Hubert C, Neve P. Effect of vitamin C supplements on cell-mediated immunity in old people. *Gerontology*, 29, 305–310 (1983).
- 46) Panush RS, Delafuente JC, Katz P, Johnson J. Modulation of certain immunologic responses by vitamin C. III. Potentiation of in vitro and in vivo lymphocyte responses. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Suppl.*, 23, 35–47 (1982).
- 47) Anderson R, Oosthuizen R, Maritz R, Theron A, Van Rensburg AJ. The effects of increasing weekly doses of ascorbate on certain cellular and humoral immune functions in normal volunteers. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 71–76 (1980).
- 48) Levy R, Shriker O, Porath A, Riesenberk K, Schlaeffer F. Vitamin C for the treatment of recurrent furunculosis in patients with impaired neutrophil functions. *J. Infect. Dis.*, 173, 1502–1505 (1996).
- 49) Alberts B, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Differentiated cells and the maintenance of tissues. *Molecular biology of the cell*. (3<sup>rd</sup> ed.), Garland Publishing, Inc., New York, pp. 1139–1193 (1994).
- 50) Washko P, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 268, 15531–15535 (1993).
- 51) Bergsten P, Amitai G, Kehrl J, Dhariwal KR, Klein HG, Levine M. Millimolar concentrations of ascorbic acid in purified human mononuclear leukocytes. Depletion and reaccumulation. *J. Biol. Chem.*, 265, 2584–2587 (1990).
- 52) Washko P, Rotrosen D, Levine M. Ascorbic acid transport and accumulation in human neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 264, 18996–19002 (1989).
- 53) Wolf G. Uptake of ascorbic acid by human neutrophils. *Nutr. Rev.*, 51, 337–338 (1993).
- 54) Jarwalla RJ, Harakeh S. Mechanisms underlying the action of vitamin C in viral and immunodeficiency disease. *Vitamin C in health and disease*. (Lester P, Jurgen F eds.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp 309–322 (1997).
- 55) Mojić M, Pristov BJ, Maksimović-Ivanić D, Jones DR, Stanić M, Mijatović S, Spasojević I. Extracellular iron diminishes anticancer effects of vitamin C: an in vitro study. *Sci. Rep.*, 4, 5955 (2014).



- 56) Ganasen M, Togashi H, Takeda H, Asakura H, Tosha T, Yamashita K, Hirata K, Nariai Y, Urano T, Yuan X, Hamza I, Mauk AG, Shiro Y, Sugimoto H, Sawai H. Structural basis for promotion of duodenal iron absorption by enteric ferric reductase with ascorbate. *Commun. Biol.*, 1, 120 (2018).
- 57) Torti SV, Manz DH, Paul BT, Blanchette-Farra N, Torti FM. Iron and Cancer. *Annu. Rev. Nutr.*, 38, 97–125 (2018).
- 58) Curi R, Levada-Pires AC, Silva EBD, Poma SO, Zambonato RF, Domenech P, Almeida MM, Gritte RB, Souza-Siqueira T, Gorjão R, Newsholme P, Pithon-Curi TC. The Critical Role of Cell Metabolism for Essential Neutrophil Functions. *Cell Physiol Biochem.*, 54, 629–647 (2020).
- 59) Belambri SA, Rolas L, Raad H, Hurtado-Nedelec M, Dang PM, El-Benna J. NADPH oxidase activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits. *Eur. J. Clin. Invest.*, 48, e12951 (2018).
- 60) Ostrakhovitch EA, Cherian MG. Role of p53 and reactive oxygen species in apoptotic response to copper and zinc in epithelial breast cancer cells. *Apoptosis*, 10, 111–121 (2005).
- 61) Folkman J. Tumor suppression by p53 is mediated in part by the antiangiogenic activity of endostatin and tumstatin. *Sci. STKE.*, 2006, pe35 (2006).
- 62) Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *EMBO J.*, 19, 1187–1194 (2000).
- 63) Soond SM, Kozhevnikova MV, Townsend PA, Zamyatnin AA Jr. Integrative p53, micro-RNA and Cathepsin Protease Co-Regulatory Expression Networks in Cancer. *Cancers (Basel).*, 12, 3454 (2020).
- 64) 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).
- 65) Zhao Y, Adjei AA. Targeting angiogenesis in cancer therapy: Moving beyond vascular endothelial growth factor. *Oncologist.*, 20, 660–673 (2015).
- 66) Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69, 4–10 (2005).
- 67) Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin. Sci. (Lond.)*, 109, 227–241 (2005).
- 68) Shintani S, Murohara T. Angiogenic cytokine: VEGF. *J. Jpn. Coll. Angiol.*, 46, 289–295 (2006).
- 69) Izawa N, Shitara K, Yonesaka K, Yamanaka T, Yoshino T, Sunakawa Y, Masuishi T,

Denda T, Yamazaki K, Moriwaki T, Okuda H, Kondoh C, Nishina T, Makiyama A, Baba H, Yamaguchi H, Nakamura M, Hyodo I, Muro K, Nakajima TE. Early tumor shrinkage and depth of response in the second-line treatment for KRAS exon2 wild-type metastatic colorectal cancer: An exploratory analysis of the randomized phase 2 trial comparing panitumumab and bevacizumab in combination with FOLFIRI (WJOG6210G). *Target Oncol.*, 15, 623–633 (2020).

70) Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 4604–4613 (1996).

71) Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.*, 70, 1469–1480 (2006).

72) Vetrovoy O, Rybnikova E. Neuroprotective action of PHD inhibitors is predominantly HIF-1-independent: An Editorial for 'Sex differences in neonatal mouse brain injury after hypoxia-ischemia and adaptaquin treatment' on page 759. *J. Neurochem.*, 150, 645–647 (2019).

73) Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Differ.*, 15, 635–641 (2008).

74) Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J. Biol Chem.*, 279, 40337–40344 (2004).

75) Shimizu T, Abu Lila AS, Nishio M, Doi Y, Ando H, Ukawa M, Ishima Y, Ishida T. Modulation of antitumor immunity contributes to the enhanced therapeutic efficacy of liposomal oxaliplatin in mouse model. *Cancer Sci.*, 108, 1864–1869 (2017).

76) Okamatsu A, Motoyama K, Onodera R, Higashi T, Koshigoe T, Shimada Y, Hattori K, Takeuchi T, Arima H. Folate-appended  $\beta$ -cyclodextrin as a promising tumor targeting carrier for antitumor drugs in vitro and in vivo. *Bioconjug. Chem.*, 24, 724–733 (2013).

77) Kaiser AM, Attardi LD. Deconstructing networks of p53-mediated tumor suppression in vivo. *Cell Death Differ.*, 25, 93–103 (2018).

78) Hu W, Chen S, Thorne RF, Wu M. TP53, TP53 Target Genes (DRAM, TIGAR), and Autophagy. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1206, 127–149 (2019).

79) Smith ND, Rubenstein JN, Eggener SE, Kozlowski JM. The p53 tumor suppressor gene and nuclear protein: basic science review and relevance in the management of bladder cancer. *J. Urol.*, 169, 1219–1228 (2003).

80) Zhao L, Wang J, Zhang Y, Wang L, Yu M, Wang F. Vitamin C decreases VEGF expression levels via hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  dependent and independent pathways in lens epithelial cells. *Mol. Med. Rep.*, 22, 436–444 (2020).

- 81) Chen R, Lai UH, Zhu L, Singh A, Ahmed M, Forsyth NR. Reactive oxygen species formation in the brain at different oxygen levels: The role of hypoxia inducible factors. *Front Cell. Dev. Biol.*, 6, 132 (2018).
- 82) Nitta K, Yokokura T, Sawada S, Kunimoto T, Tanaka T, Uehara N, Baba H, Takeuchi M, Miyasaka T, Mutai M. Antitumor activity of new derivatives of camptothecin. *Gan To Kagaku Ryoho.*, 14, 850–857 (1987).
- 83) Kawato Y, Aonuma M, Hirota Y, Kuga H, Sato K. Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.*, 51, 4187–4191 (1991).
- 84) 国立研究開発法人国立がんセンターがん対策情報センター：  
[https://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/summary.html](https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html), 2021年8月30日閲覧。
- 85) Tanaka Y, Katoh M, Fujioka M, Onishi K, Sakakibara Y, Hasegawa T, Nadai M. Effect of tacrolimus on the pharmacokinetics and glucuronidation of SN-38, an active metabolite of irinotecan. *Yakugaku Zasshi.*, 133, 463–471 (2013).
- 86) Araki E, Ishikawa M, Iigo M, Koide T, Itabashi M, Hoshi A. Relationship between development of diarrhea and the concentration of SN-38, an active metabolite of CPT-11, in the intestine and the blood plasma of athymic mice following intraperitoneal administration of CPT-11. *Jpn. J. Cancer Res.*, 84, 697–702 (1993).
- 87) Takahashi T, Emi Y, Oki E, Kobayashi K, Tsuji A, Shimokawa M, Tanaka T, Akagi Y, Ogata Y, Baba H, Yoshida K, Natsugoe S, Maehara Y; Kyushu Study Group of Clinical Cancer (KSCC). Multicenter phase II study of combination therapy with cetuximab and S-1 in patients with KRAS exon 2 wild-type unresectable colorectal cancer previously treated with irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines (KSCC 0901 study). *Cancer Chemother Pharmacol.*, 78, 585–593 (2016).
- 88) André T, Louvet C, Maindrault-Goebel F, Couteau C, Mabro M, Lotz JP, Gilles-Amar V, Krulik M, Carola E, Izrael V, de Gramont A. CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. *GERCOR. Eur. J. Cancer.*, 35, 1343–1347, (1999).
- 89) Ooi K. Onset Mechanism and Pharmaceutical Management of Dry Skin. *Biol. Pharm. Bull.*, 44, 1037–1043 (2021).
- 90) Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale. J. Biol. Med.*, 58, 553–559 (1985)
- 91) Canty EG, Kadler KE. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.*, 118, 1341–1353 (2005).
- 92) Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human

- blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 6377–6381 (1989).
- 93) Barel AO, Clarys P. Study of the stratum corneum barrier function by transepidermal water loss measurement: comparison between two commercial instruments: evaporimeter and tewameter. *Skin Pharmacol.*, 8, 186–195 (1995).
- 94) Kazama H, Ricci JE, Herndon JM, Hoppe G, Green DR, Ferguson TA. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity.*, 18, 21–32 (2008).
- 95) Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of the caspases. *Biochim Biophys Acta.*, 8, 17–31 (1998).
- 96) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science.*, 281, 1312–1316 (1998).
- 97) Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68, 383–424 (1999).
- 98) Sakamaki K, Satou Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J. Fish Biol.*, 74, 727–753 (2009).
- 99) Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr. Biol (Camb).*, 3, 279–296 (2011).
- 100) Mizutani H. Mechanism of DNA damage and apoptosis induced by anticancer drugs through generation of reactive oxygen species. *Yakugaku Zasshi.*, 127, 1837–1842 (2007).
- 101) Hiraoka W, Vazquez N, Nieves-Neira W, Chanock SJ, Pommier Y. Role of oxygen radicals generated by NADPH oxidase in apoptosis induced in human leukemia cells. *J. Clin Invest.*, 102, 1961–1968 (1998).
- 102) Tada-Oikawa S, Oikawa S, Kawanishi M, Yamada M, Kawanishi S. Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis. *FEBS Lett.*, 442, 65–69 (1999).
- 103) Varbiro G, Veres B, Gallyas F Jr, Sumegi B. Direct effect of Taxol on free radical formation and mitochondrial permeability transition. *Free Radic. Biol. Med.*, 31, 548–558 (2001).
- 104) Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic. Biol. Med.*, 37, 793–802 (2004).
- 105) Arrigoni O, De Tullio MC. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta.*, 1569, 1–9 (2002).

## 謝辞

本研究に際して、終始一貫して御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 大井一弥教授に深甚なる謝意を表します。

本学位論文の審査にあたり、種々の御助言と御指導を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 郡山恵樹教授、田口博明教授、中山浩伸教授、西田圭吾教授ならびに坂晋准教授に深く感謝いたします。

本研究をまとめるにあたり、貴重な御指導、御助言を賜りました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科 平本恵一助教に深謝の意を表します。

本研究を実施するにあたり、多大なるご協力を賜りました、鈴鹿医療科学大学大学院 薬学研究科 佐藤英介教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行において、有益な御助言と御教示を賜りました、(株)メディカルリンク 出口昌孝博士、ニチニチ製薬(株) 五藤健児博士に深く感謝いたします。

研究生活において様々のご助力をいただき、お世話になりました鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科の先生方および、事務面でサポートいただきました白子教務課課長 水井智子氏をはじめ鈴鹿医療科学大学の職員の方々、ならびに病態・治療学分野 臨床薬理学研究室の皆様に感謝いたします。

最後に、長年の大学院生活において、理解をもって応援し支えてくれた、両親をはじめとする(株)メディカルナカニシの関係諸氏に心から感謝いたします。

## Abstract

### Effect of vitamin C on tissue reactive oxygen species in cancer treatment

#### Introduction

Many novel cancer chemotherapies are being developed based on the cancer stage. Here, we focused on vitamin C (VC), which is an important factor for biological components. VC has an antioxidant effect to remove reactive oxygen species (ROS) and is also known to generate ROS in the presence of ferrous iron and to act as a pro-oxidant [1]. The use of VC in cancer treatment is suggested to require high concentrations in plasma [2]. Furthermore, ROS is considered to be involved in the antitumor effect of VC [1,3]. Previous research has also suggested the involvement of ROS and neutrophils in the antitumor effects from the combined use of anticancer drugs and high-dose VC [4]. However, the mechanism by which VC regulates ROS in the growth of tissues and cancer cells remains unclear. Furthermore, it is unclear whether the combined use of anticancer drugs and high-dose VC can reduce adverse drug events. In this study, therefore, we confirmed the antitumor effect and drug adverse event mitigation effect of high-dose VC in cancer treatment, and to examine the underlying mechanism of these effects.

#### Chapter 1: Effect of high-dose vitamin C on melanoma induced mice —The organ-specific effects and involvement of reactive oxygen species—

In this chapter, we examined the effect of high-dose VC on melanoma (MM) in each organ (lung, liver, small intestine, and ovary). We also examined whether ROS and neutrophils were involved in the effects of high-dose VC treatment. Using female mice (C57BL / 6 J; 7w old), the dihydroxyphenylalanine (DOPA)-positive cells and glycoprotein100 (gp100), were measured to confirm the expression of MM. Since VC is also known to stimulate neutrophil production and function, neutrophil and macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) cells were measured. When changes were observed in neutrophils, the amount of VC in the tissue as well as in the tissue neutrophils were measured. The amount of iron and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in the tissue were also measured. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)-positive cells were examined to confirm apoptosis in tissues. In addition, gp91<sup>phox</sup> knockout mice were used to verify the effect of neutrophils. As a result, the number of DOPA-positive cells and gp100-positive MM cells in the ovary increased substantially in the MM-administered group and decreased compared to the high-dose VC combination group. In addition, neutrophil

counts and MIP-2 levels in the ovaries were higher in the high-dose VC combination group. No significant difference was observed in the lungs, liver, and small intestine, so we focused on the ovaries. Intraovarian and neutrophil VC concentrations were lower in the MM group than in the high-dose VC group, but higher in the high-dose VC combination group. Concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and iron in the ovary were higher in the high-dose VC combination group than in the MM-administered group. The number of TUNEL-positive cells in the ovaries showed similar results. In contrast, the number of DOPA-positive cells and gp100-positive MM cells in the ovaries of gp91<sup>phox</sup> knockout mice increased between the MM-administered group and the high-dose VC combination group, but did not change significantly between these groups. Similarly, the number of neutrophils was not significantly different between the MM-treated and high-dose VC combination groups. From these results, high-dose VC showed an organ-specific effect and suppressed MM infiltration and proliferation in the ovary. High-dose VC administration promoted apoptosis of cancer cells by increasing the number of neutrophils in the ovary compared to other organs. Neutrophil gp91<sup>phox</sup> is thought to play an important role in the suppression of cancer cells.

## **Chapter 2: Effect of high-dose vitamin C on angiogenesis in colon cancer induced mice**

In this chapter, we examined the effect of high-dose VC on angiogenesis using mice xenografted with Colon 26 tumor cells. Male mice (BALB/c; 5w old) were xenografted with Colon 26 and tumors were observed. In addition, tumor tissue p53 and endostatin levels were measured. Since endostatin has been reported to suppress vascular endothelial growth factor (VEGF) [5], we also investigated VEGF and hypoxia inducible factor -1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), a transcription factor for VEGF. We also measured ROS. Tumors were observed in mice xenografted with Colon 26 tumor cells. Tumor volume after high-dose VC administration was reduced by 28% compared to that in the Colon 26 group, indicating suppressed tumor growth. p53 and endostatin levels were substantially increased in the Colon 26 group compared to the control group, and they were further increased in the high-dose VC combination group compared to the Colon 26 group. Tumor tissue expression levels of VEGF subtypes, VEGFA and VEGFD, were significantly increased in the Colon 26 group compared to the control group, but decreased in the high-dose VC combination group compared to the Colon 26 group. Similar results were obtained for HIF-1 $\alpha$  and ROS levels. Thus, VC is considered to be involved in the suppression of angiogenesis by increasing endostatin, which inhibits the action of VEGF. VC also suppressed HIF-1 $\alpha$  and ROS levels. It was concluded that the decrease in ROS caused by VC stabilizes HIF-1 $\alpha$ , leading to the inhibition of angiogenesis.

### **Chapter 3: Usefulness of high-dose vitamin C on dry skin caused by irinotecan hydrochloride hydrate**

In this chapter, we investigated the mechanism by which irinotecan hydrochloride hydrate (CPT-11) induces dry skin and how high-dose VC administration is effective for dry skin. Transepidermal water loss (TEWL), skin thickness and type I collagen were used to assess dry skin after CPT-11 administration using male hairless mice (HR-1; 7w old) Collagen expression was measured. In addition, caspases, fibroblasts, TUNEL-positive cells, and ROS, which are thought to induce apoptosis in normal cells, were measured. Administration of CPT-11 increased TEWL, decreased skin thickness, and decreased the expression of type I collagen, and induced dry skin. In addition, administration of CPT-11 increased ROS, caspase 3 and caspase 9 levels, TUNEL-positive cells, reduced the number of fibroblasts, and induced apoptosis. In contrast, high-dose VC administration improved these parameters. It has been suggested that mitochondria activate caspases and induce DNA fragmentation and apoptosis in response to cell death signaling triggered by anticancer drugs. This suggests that dry skin caused by CPT-11 is caused by cell destruction due to apoptosis of fibroblasts due to mitochondrial damage and ROS generation. Administration of higher doses of VC suppressed the induction of apoptosis and ROS production caused by CPT-11.

#### **Conclusion**

Based on the abovementioned results, high-dose VC suppressed MM infiltration and proliferation in the ovary. Furthermore, ROS produced by neutrophil gp91<sup>phox</sup> upon treatment with high-dose VC was shown to act directly on cancer cells to induce apoptosis. Furthermore, high-dose VC was found to suppress ROS as well as angiogenesis and to exhibit an antitumor effect in colon cancer. In addition, high-doses of VC inhibited the production of ROS in anticancer drug-induced dry skin after CPT-11 administration.

Overall, these results provide important insights into new possibilities in the future development of high-dose VC therapy.

#### **References**

[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).