

氏 名 ぱらす じゃへど  
PARAS JAWAID

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 富医薬博甲第 190 号

学位授与年月日 平成 28 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教 育 部 名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学 位 論 文 題 目 SOD/catalase mimetic Platinum nanoparticles protects from  
X-irradiation and cold atmospheric plasma-induced apoptosis via  
suppression of ROS  
(SOD/カタラーゼ様白金ナノ粒子は ROS の抑制を介して X 線照射およ  
び常温大気圧プラズマ誘発アポトーシスに防護的に作用する)

論 文 審 査 委 員

|        |     |       |
|--------|-----|-------|
| (主査)   | 教 授 | 稲寺 秀邦 |
| (副査)   | 教 授 | 山本 善裕 |
| (副査)   | 教 授 | 野口 京  |
| (副査)   | 教 授 | 嶋田 豊  |
| (指導教員) | 教 授 | 近藤 隆  |

## 論文内要の要旨

### 〔目的〕

胃癌症例において末梢血中より CD44 発現を有する CTC を FACS を用いて検出し診断および治療に関するバイオマーカーとしての有用性を評価する

### 〔方法並びに成績〕

〔方法〕2014/4～12 月に当科にて加療した胃癌 26 症例を対象とした。男性 17 名：女性 9 名、平均 72.69 歳であり、UICC-TNM 第 7 版の分類で各々 stage IA：7、IIA：5、IIB：1、IIIA：3、IIIB：2、IIIC：3、IV：5 名であった。内 25 例に胃切除術（幽門側胃切除：15 例、胃全摘：8 例、胃局所切除：1 例、残胃全摘：1 例）を、1 例に化学療法（2<sup>nd</sup> line：weekly PTX 80mg/body）を施行した。また健常人 12 例（26-81 歳）を陰性コントロールとした。患者および健常人より末梢血 3ml×2 本をそれぞれ EDTA 入り 5ml 採血管にて採取し同量の 2%FBS 入り PBS にて希釈後、4ml の Lymphoprep<sup>TM</sup> 溶液を加え 800g×20min で遠心分離し赤血球除去を行った。洗浄後に EpCAM-APC/CD44-FITC, mouseIgG-APC/FITC 抗体を 200  $\mu$ L 加え 15 分間静置し再度洗浄施行、精製検体を FACS Canto II<sup>TM</sup> にて解析し EpCAM+/CD44+ 群、EpCAM+/CD44- 群の細胞数について解析した。

また、内 1 症例について FACS Aria<sup>TM</sup> にて末梢血中より EpCAM+/CD44+ 細胞を sorting し実体蛍光/透過光顕微鏡にて生細胞の状態を観察評価した。

さらに加療した胃癌症例に関して胃切除群においては治療前後、化学療法施行例においては治療前と治療中の合計 7 回末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞数を測定しその推移と臨床治療効果とを比較した。化学療法の効果判定に関しては治療前後に胸腹部 CT 検査を行い RECISTv1.1 に基づいて評価した。

また、原発巣切除し得た 25 例全例について組織標本中の EpCAM 及び CD44 発現の有無を免疫組織化学染色にて判定評価した。

〔成績〕①末梢血中 EpCAM+/CD44- 細胞数（平均±SD）は全例検出され健常人では  $9.83 \pm 9.91$  個、胃癌症例では  $59.1 \pm 88.0$  個であった（ $p=0.0313$ ）。一方で末梢血中 EpCAM+/CD44+ 細胞は健常人で 3 例（25.0%）のみに検出され  $0.91 \pm 2.10$  個、胃癌症例では全例（100.0%）検出され  $69.9 \pm 52.0$  個であった（ $P=0.0001$ ）。胃癌診断において EpCAM+/CD44- 細胞数の感度は 76.9%、特異度は 83.3%、EpCAM+/CD44+ 細胞数の感度は 92.3%、特異度は 100%であった。②EpCAM+/CD44- 細胞群ではいずれの病理学的因子とも相関が認められなかったのに対し EpCAM+/CD44+ 細胞群では pStage、pT、v 因子において進行例でその平均値が高く相関を認めた（ $p=0.0423$ 、 $0.0314$ 、 $0.0184$ ）。

- ③末梢血中 EpCAM+/CD44+陽性細胞を sorting 後に蛍光/透過光観察したところ EpCAM-APC/CD44-FITC 強陽性である直径 20  $\mu$ m 以上の N/C 比の高い異型細胞が観察された。
- ④原発巣の免疫組織化学染色では全 25 症例の癌部につき EpCAM/CD44 発現は全症例において認められた。
- ⑤胃切除症例において加療前後の EpCAM+/CD44+細胞数の平均値は  $74.2 \pm 10.8$  個から  $19.2 \pm 7.48$  個へ減少した。
- ⑥化学療法施行症例においては治療介入後、末梢血中の EpCAM+/CD44+細胞数が漸減し 1 コース終了時点で検出感度以下となった。胸腹部 CT 検査による RECISTv1.1 の評価では原発巣は 30%の腫瘍縮小を認め、臨床的な治療効果と関連していた。

#### 〔総括〕

末梢血循環癌細胞 (Circulating tumor cell:CTC) は主に上皮細胞接着因子 : EpCAM を用いて検出され、診断・予後・治療効果判定のバイオマーカーとして乳癌・前立腺癌・消化器癌で有用であると報告されている。近年ではそのなかでも特に cancer stem cell の性質を有する (Circulating tumor stem cell:CTSC) がより再発や治療効果に対してのバイオマーカーとして有用であると報告されてきている。

我々はこれまで胃癌幹細胞マーカーとして CD44 が有用であることを報告してきており、今回胃癌症例について EpCAM に CD44 を加えた CTC 検出を試みその臨床病理学的な背景と比較した。その結果末梢血中 EpCAM+/CD44-よりも EpCAM+/CD44+細胞が健常人よりも胃癌症例で優位に検出されること、胃癌手術症例において末梢血中 EpCAM+/CD44+細胞数がより壁深達度及び静脈侵襲と関連し EpCAM+/CD44-細胞数よりもより臨床病理学的進行度と関連していたことなどから、EpCAM+/CD44-よりも EpCAM+/CD44+がより有用な診断マーカーである可能性が示唆された。また、EpCAM+/CD44+細胞数は原発切除にて減少、および化学療法にて漸減を示し治療効果と関連していたことから治療効果のマーカーとしての有用性も示唆された。今後は再発・予後の診断マーカーとして有用であるか長期予後との比較を行い評価すること、またこの末梢血中 EpCAM+/CD44+細胞が CTSC の性質を有するか否かについてその生細胞を効率よく sorting し培養ならびに腫瘍増殖能の有無を検索する系の確立、検証が必要と考える。

# 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

## 〔目的〕

白金ナノ粒子は、抗酸化酵素であるSODやカタラーゼと同様の作用を有することが報告され、その臨床応用が期待されている。これまで、X線照射および常温大気圧プラズマ（Helium-based cold atmospheric plasma:以下He-CAP）は、がん細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。そこでPARAS JAWAIDさんは、X線照射およびHe-CAPにより誘導されるアポトーシスに及ぼす白金ナノ粒子の抗酸化作用およびその分子機構について、培養細胞を用いて検討した。

## 〔方法〕

培養細胞として U937、HeLa、HCT-116、Molt-4、Jurkat-T 細胞を用いた。研究 1 では、X 線照射により誘導されるアポトーシスについて、研究 2 では He-CAP によるアポトーシスに対して白金ナノ粒子が防護的に作用するかどうかについて検討した。培養細胞に X 線照射または He-CAP によりアポトーシスを誘導する際、白金ナノ粒子を添加した。アポトーシスの検出は、ギムザ染色による形態変化、DNA 断片化、AnnexinV-FITC/PI 染色により行った。さらにミトコンドリア膜電位の変化、細胞内カルシウム濃度、細胞内 Reactive oxygen species (ROS) 等の測定を行った。またアポトーシス関連タンパク質の発現変動をウェスタンブロット法にて検討した。

## 〔結果〕

### （研究 1）

U937 細胞に白金ナノ粒子を添加すると、白金ナノ粒子が細胞内に取り込まれることが電子顕微鏡により確認された。U937 細胞を白金ナノ粒子により 24 時間前処置を施すと、10Gy の X 線で誘発されるアポトーシスは白金ナノ粒子の濃度依存的に抑制され、500 $\mu$ M で最大の効果が確認された。白金ナノ粒子の前処置により、X 線により誘発される ROS の産生、Fas の発現、ミトコンドリア膜電位の低下が抑制された。ウェスタンブロットによる検討では、カスパーゼ 3 の活性化、tBid の産生、および細胞質中のチトクローム C の増加が抑制された。

### （研究 2）

U937細胞をHe-CAPにて60, 120, 180 および240秒処理すると、細胞の生存率は処理時間依存的に低下し、アポトーシスが誘導された。以後の実験では最もアポトーシスが誘導された240秒の処理を用いた。300 $\mu$ Mの白金ナノ粒子存在下で He-CAP処理を行うと、He-CAP単独処理で誘発されるアポトーシスは抑制された。白金ナノ粒子存在下では、He-CAP処理によるROS産生は抑制され、He-CAP単独処理によりおこるミトコンドリア膜電位の低下と細胞内カルシウムイオン濃度の増加も抑制された。ウ

ウェスタンブロットによりアポトーシス関連タンパクの発現を検討すると He-CAP単独処理でおこるBid およびカスパーゼ 3の活性化が抑制された。また He-CAP単独処理でおこる細胞内FASおよびカスパーゼ 8の発現増加は、白金ナノ粒子添加により抑制された。白金ナノ粒子によるHe-CAP誘導アポトーシスの抑制効果は、U937細胞以外のMolt-4, Jurkat, HeLa, HCT-116細胞でも認められた。

〔総括〕

PARAS JAWAIDさんは、白金ナノ粒子が抗酸化酵素SODやカタラーゼと同様の作用を有することに注目し、培養細胞を用いて、X線照射およびHe-CAPにより誘導されるアポトーシス抑制効果を有することを初めて明らかにした。さらにその分子機構として、ミトコンドリア膜電位の変化、細胞内カルシウム濃度、細胞内ROSおよびアポトーシス関連蛋白の発現等が関連することを示した。

本研究は、白金ナノ粒子がアポトーシス抑制効果を有することを明らかにした点で新規性があり、医学における学術的重要性は高いと判断される。今後、動物モデルを用いて同様の効果を検討することにより、臨床的发展性が期待できる。実験は論理的かつ注意深く行われている。

以上より本審査会は本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。