

小豆由来の極小粒径の炭素の抗腫瘍効果についての研究

夏巨峰^{1, 2}、河村康之¹、末廣智明¹、佐藤邦道¹

- 1、新日本医学研究所
- 2、東京大学医学部附属病院肝胆膵外科

概要

異なる資源に由来する炭素は、さまざまな医療用途で広く研究されており、それらは、前立腺癌細胞の増殖を抑制することが可能であると報告されている。本研究では、「小豆由来の極小粒径の炭素」（以下、極小炭素という）を用い、肝癌細胞、膵臓癌細胞、肝内胆管癌細胞、および結腸直腸腺癌細胞を含む 16 種類の細胞株に対する効果を検証した結果、細胞生存率実験において、極小炭素は癌細胞に対するより高い抑制効果ならびに時間依存性、用量依存性を示した。

また、細胞遊走実験にて、極小炭素で処理された癌細胞は、対照群よりも癌細胞の回復レベルが低いことから、極小炭素は遊走阻害効果にも有効であることを示した。

更に、細胞生存実験にて、極小炭素とドキソルビシンの組み合わせは、各単剤療法よりも高い抑制レベルを示した。

上記の結果から、極小炭素は癌治療における代替的かつ補完的な医療になり得る可能性を示唆するものである。

キーワード： 小豆由来の極小粒径の炭素（極小炭素）、肝癌、膵臓癌、肝内胆管癌、結腸直腸腺癌、併用療法。

1、序論

癌は、異常な細胞増殖を伴う疾患の一群であり、身体のあらゆる部位に侵入または蔓延する疾患である（1）。2018年は、世界で1,810万の新たな癌の発症と960万の死亡が発生、その罹患率は男性の約20%、女性の17%であり、男性の13%、女性の9%が死亡している（2）。

治療法には多様な選択肢が存在し、外科手術、化学療法、放射線療法、分子標的療法などが代表的な治療方法であるが（3-7）、昨今、これら選択肢の限界に基づき、補完的かつ代替的な癌治療が注目を集めている（8）。

炭素系素材は、その独特の物理化学的特徴と細胞への進入能力により、生物医学的応用に大きな可能性を秘めており（9-11）、化学療法および他の生物活性化合物のための革新的なドラッグデリバリーとしての利用では、過去数年、広く研究されてきた。

また、炭素繊維、カーボンナノチューブ、およびCQDなどの炭素系素材は、アポトーシスを増強し、一連のシグナル伝達経路を介して癌細胞の増殖を阻害することを示唆している（15, 16）。

この様に異なる資源に由来する炭素系素材は、画像化、ドラッグデリバリーにおいて広く研究されてきたが、細胞内要素の活性、および抗癌剤としての可能性の根底にある、メカニズム領域の研究は稀有である（17）。

例えば、植物由来の炭素は、動物モデルにおいて腫瘍増殖の抑制に関与することを示唆している（17）。

また、他の研究グループでは、茶葉由来の炭素がARF上における特定のアミノ酸と結合し、核内でARFと共在し、癌細胞をラパマイシンに感受性することを報告している（18, 19）。

本研究では、いくつかの癌細胞株の増殖と移動を抑制し、併用投与による既存薬の抑制効果を促進する小豆由来の新素材、極小粒径の炭素（AC、オーストラリア特許番号：2005230336、図1）について報告するものである。

2、材料と方法

2. 1、試薬

高グルコースダルベッコ改良イーグル培地

ウシ胎児血清

細胞増殖キット

ドキソルビシン

小豆由来の極小炭素

2. 2、細胞株とメンテナンス

肝臓癌細胞株（HepG2、HepG2.2.15、PLC / PRF / 5、Huh-7、Huh-1、HLE、HLF、SK-Hep-1、Hep3B、BEL-7402）、膵臓癌細胞株（Panc- 1、CAPAN-1、MIA-Paca-2、SUIT-2）、肝内胆管癌細胞株（RBE）、および結腸直腸腺癌細胞株（DLD-1）を本研究に使用。これらの細胞株を、5% CO₂の加湿インキュベーター中、37℃で10%のウシ胎児血清、100単位 / ml ペニシリン、100 mg / ml ストレプトマイシンを補充したDMEM培地中で維持。

2. 3、極小炭素の分散

ヒト血清アルブミン（HSA）を用いて極小炭素の分散液を調製。

HSAをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で希釈、1：1の重量比で極小炭素に添加、続いて超音波チップにて超音波処理を実施。次に細胞培養培地にて異なる希釈液を調製。

2. 4、細胞生存率実験

細胞を1ウェルあたり 2×10^4 の密度で96ウェルプレートに播種、24時

間、48時間、および72時間毎に試薬で処理。製造業者のマニュアルに従い、Cell Proliferation Kit I を用い MTT [3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド]にて極小炭素の効果を分析。

2. 5、細胞の創傷治癒実験

細胞を6ウェルプレートに播種、コンフルエントになるまで培養。無菌の200 μ l ピペットチップを使用し創傷を模したまっすぐな引っ掻き傷を作製。細胞を(細胞シートが剥がれる可能性があるため穏やかに操作を行う)PBSで濯ぎ、試薬を含む1.5mlの培地と交換。40倍の位相差を使用し写真を撮影、その後24、48および72時間毎に撮影を実施。各時間毎の測定後、古い培地を極小炭素を含む新規の培地と交換。

2. 6、統計分析

実験は各3回行い、GraphPad Prism 4 を用いたANOVA (一元配置分散分析)、続いてMicrosoft Office Excel ソフトウェアを用いた Student's t 検定により分析した結果、 $p < 0.05$ と有意差を示した。

3、結果と考察

3. 1、極小炭素は癌細胞の増殖を阻害

肝癌細胞株に対する極小炭素の抗増殖効果 (HepG2、HepG2.2.15、PLC / PRF / 5、Huh-7、Huh-1、HLE、HLF、SK-Hep-1、Hep3B、BEL-7402) 、
膵臓癌細胞株 (P a n c - 1、C A P A N - 1、M I A - P a c a - 2、
S U I T - 2)、肝内胆管癌細胞株 (R B E)、および結腸直腸腺癌細胞株 (C

o1o-201)をMTT実験により推定。図2に示すよう、極小炭素はこれらの細胞株に対し有意な阻害効果を示した。次に、上記癌細胞を様々な濃度の極小炭素(5mg/mL、0.5mg/mL、0.05mg/mL)で処理し、24時間、48時間、および72時間毎に検出。

データは、極小炭素の抑制効果が用量依存的および時間依存的であり、5mg/mL濃度で細胞の増殖を最も明らかに抑制することを示した。これらの結果は、極小炭素が肝臓癌細胞、膵臓癌細胞、肝内胆管癌細胞、および結腸直腸腺癌細胞に対し増殖抑制効果を示すものであり、また、他の癌細胞に広範な抑制効果をもたらす可能性も同時に示した。

今後、抑制効果の分子メカニズムを解明するために、さらに研究を進めていく必要がある。

3. 2、小豆由来の極小炭素は癌細胞の遊走を阻害

癌細胞の遊走能に対する極小炭素への影響を調べるため、細胞の創傷治癒実験を採用。6つの肝癌細胞株(HLF、SK-Hep-1、Huh-7、HLE、HepG2、Hep3B)を本実験に使用。異なる試薬にて72時間処理後、細胞の著しい目視可能な治癒変化を認めた癌細胞において観察を実施(図3)。細胞の遊走定量的分析をさらに進めるため、我々は写真中の引っかかり領域の変化を分析。図3に示すように、極小炭素群は、対照群よりも癌細胞の回復レベルの低下を示した($p < 0.05$)。これらの結果は、極小炭素が肝臓癌細胞の遊走を減少することを示した。

上記、実験結果の普遍性を検証するため、他の癌細胞および分子機構に関し、引き続き研究を実施していく必要がある。

3. 3、併用療法は癌細胞に対しより高い抑制レベルを示唆

極小炭素およびドキシソルビシンの組み合わせにおける増殖抑制効果を検証するため、MTTアッセイを使用。6つの肝癌細胞株(HLF、SK-Hep-1、Huh-7、HLE、

HepG2、Hep3B) を実験に使用。4つの実験群、すなわち極小炭素群 (0.5 mg / mL)、ドキソルビシン群 (800 nM)、組み合わせ群 (0.5 mg / mL AC + 800 nM ドキソルビシン)、および対照群を確立。図4に示すよう、組み合わせ群は、極小炭素群およびドキソルビシン群双方よりも高い阻害レベルを示唆し ($p < 0.05$)、併用投与が既存薬の治療効果を促進することを示唆した。

4、まとめ

本研究では、小豆由来の新素材である極小粒径の炭素が、様々な癌細胞の増殖と移動を抑制し得ることを証明した。そして、この極小炭素と既存化学療法薬との組み合わせは、化学療法薬単独での療法よりも優れた抑制効果を示すことも判明。

この結果は、極小炭素が癌治療のための効果的な代替医療および補完医療になり得ることを示唆している。

参考文献

1. Cancer-Signs and symptoms. World Health Organization. 12 September 2018. Retrieved 19 December 2018.
2. Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. www.iarc.fr. Retrieved 5 December 2018.
3. Lind M.J., M.J. (2008). "Principles of cytotoxic chemotherapy". *Medicine*. 36 (1): 19–23.
4. Madan V, Lear JT, Szeimies RM (February 2010). "Non-melanoma skin cancer". *Lancet*. 375 (9715): 673–85.
5. Hill R, Healy B, Holloway L, Kuncic Z, Thwaites D, Baldock C (March 2014).

- "Advances in kilovoltage x-ray beam dosimetry". *Physics in Medicine and Biology*. 59 (6): R183–231.
6. Levy MH, Back A, Bazargan S, Benedetti C, Billings JA, Block S, Bruera E, Carducci MA, Dy S, Eberle C, Foley KM, Harris JD, Knight SJ, Milch R, Rhiner M, Slatkin NE, Spiegel D, Sutton L, Urba S, Von Roenn JH, Weinstein SM (September 2006). "Palliative care. Clinical practice guidelines in oncology". *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 4 (8): 776–818.
 7. Waldmann TA (March 2003). "Immunotherapy: past, present and future". *Nature Medicine*. 9 (3): 269–77.
 8. Cassileth BR, Deng G (2004). "Complementary and alternative therapies for cancer". *The Oncologist*. 9 (1): 80–89.
 9. Beg S, Rizwan M, Sheikh A M, Hasnain M S, Anwer K and Kohli K 2011 Advancement in carbon nanotubes: basics, biomedical applications and toxicity *J. Pharm. Pharmacol.* 63 141–63
 10. Lacerda L, Raffa S, Prato M, Bianco A and Kostarelos K 2007 Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics *Nanotoday* 2 38–43
 11. Liu Z, Tabakman S, Welsher K and Dai H 2009 Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery *Nano Res.* 2 85–120
 12. Arlt M et al 2010 Delivery of carboplatin by carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death *Nanotechnology* 21 335101
 13. Hampel S et al 2008 Carbon nanotubes filled with a chemotherapeutic agent: a nanocarrier mediates inhibition of tumor cell growth *Nanomedicine (Lond)* 3 175–82
 14. Tripisciano C, Krämer K, Taylor A and Borowiak-Palen E 2009 Single-wall carbon nanotubes based anticancer drug delivery system *Chem. Phys. Lett.* 478 200–5
 15. Erdmann K, Ringel J, Hampel S, Rieger C, Huebner D, Wirth MP, Fuessel S. Chemosensitizing effects of carbon-based nanomaterials in cancer cells: enhanced

apoptosis and inhibition of proliferation as underlying mechanisms. *Nanotechnology*. 2014 Oct 10;25(40):405102.

16. Xie Y1, Fan H2, Lu W3, Yang Q3, Nurkesh A4, Yeleussizov T4, Maipas A4, Lu J5, Manarbek L4, Chen Z6, Benassi E2. Nuclear MET requires ARF and is inhibited by carbon nanodots through binding to phospho-tyrosine in prostate cancer. *Oncogene*. 2018 Dec 19. doi: 10.1038/s41388-018-0608-2.
17. Li CL, Ou CM, Wu WC, Chen YP, Lin TE, Ho LC, et al. Carbon dots prepared from ginger exhibiting efficient inhibition of human hepatocellular carcinoma cells. *J Mater Chem B*. 2014;2:4564–71.
18. Xie Y, Filchakova O, Yang Q, Yesbolatov Y, Tursynkhan D, Kassymbek A, et al. Inhibition of cancer cell proliferation by carbon dots derived from date pits at low dose. *ChemistrySelect*. 2017;2:4079–83.
19. Xie Y, Sun Q, Nurkesh AA, Lu J, Kauanova S, Feng J, et al. Dysregulation of YAP by ARF stimulated with tea-derived carbon nanodots. *Sci Rep*. 2017;7:16577.

図1、STEMモデル試験結果。HAADF - STEM：高角度環状暗視野走査透過電子顕微鏡。BF - STEM：明視野走査透過電子顕微鏡。

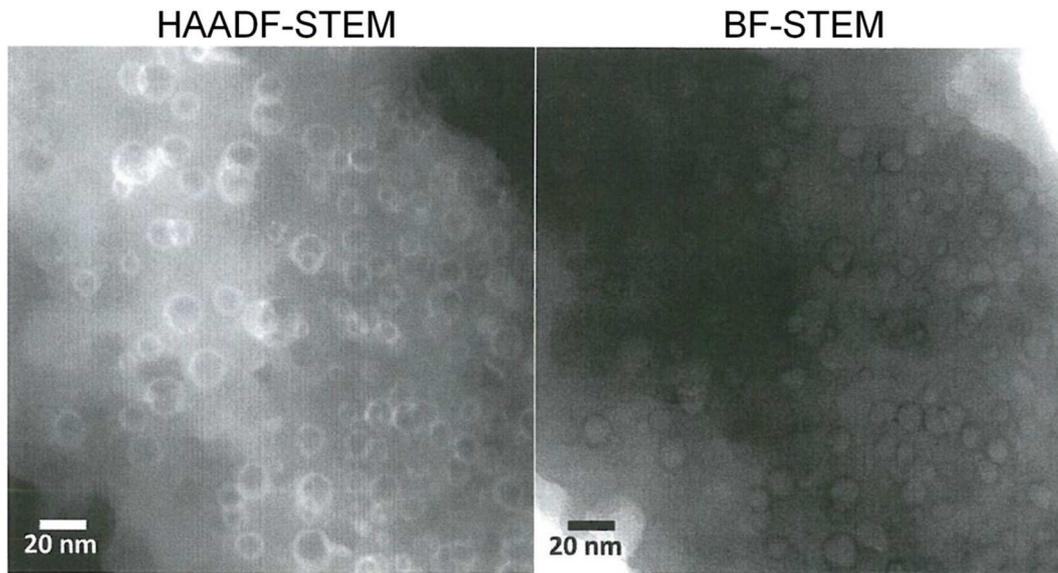


図2、癌細胞に対するAC（極小炭素）の増殖抑制効果の検出

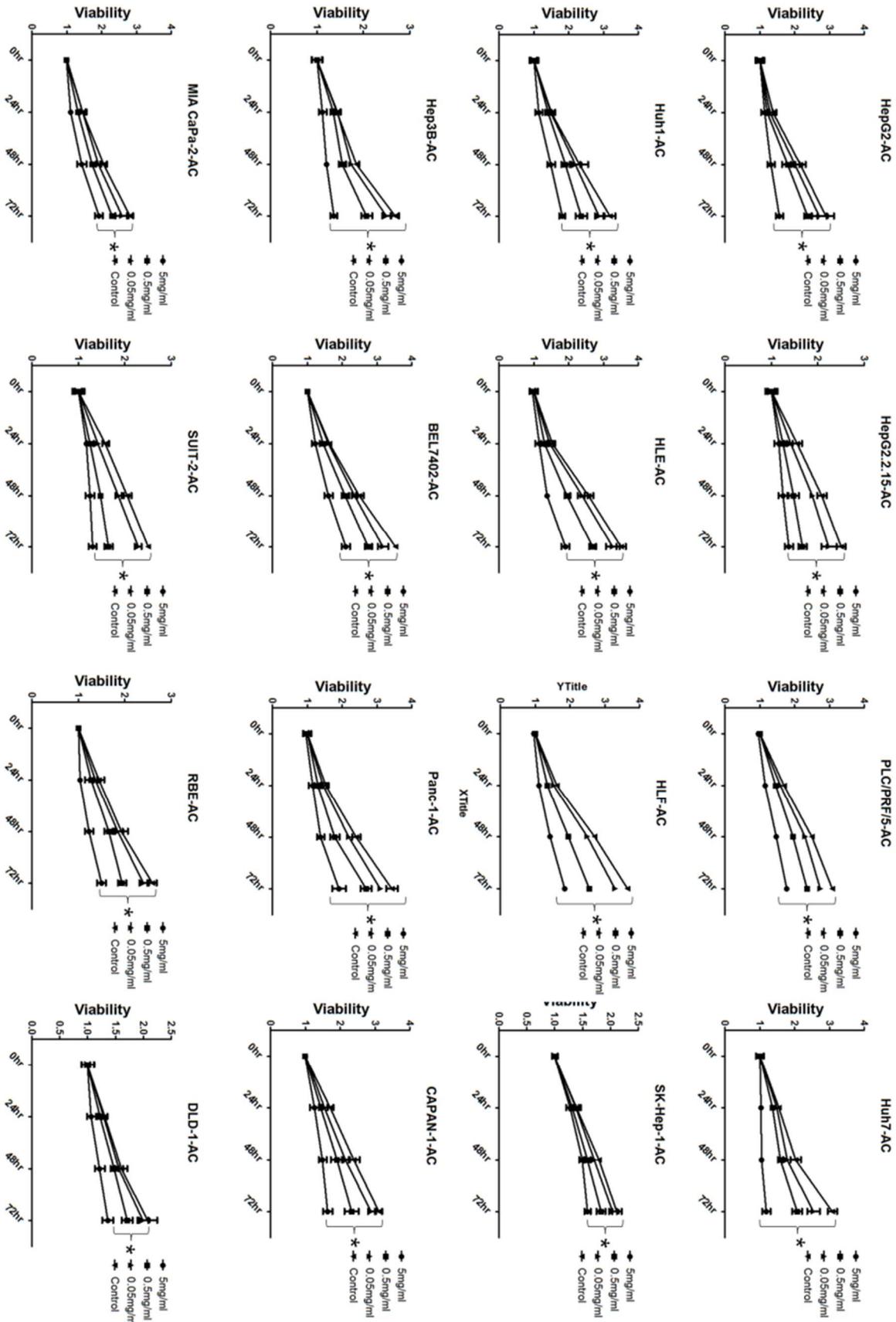


図 3、癌細胞の移動に対する AC（極小炭素）の抑制効果の検出

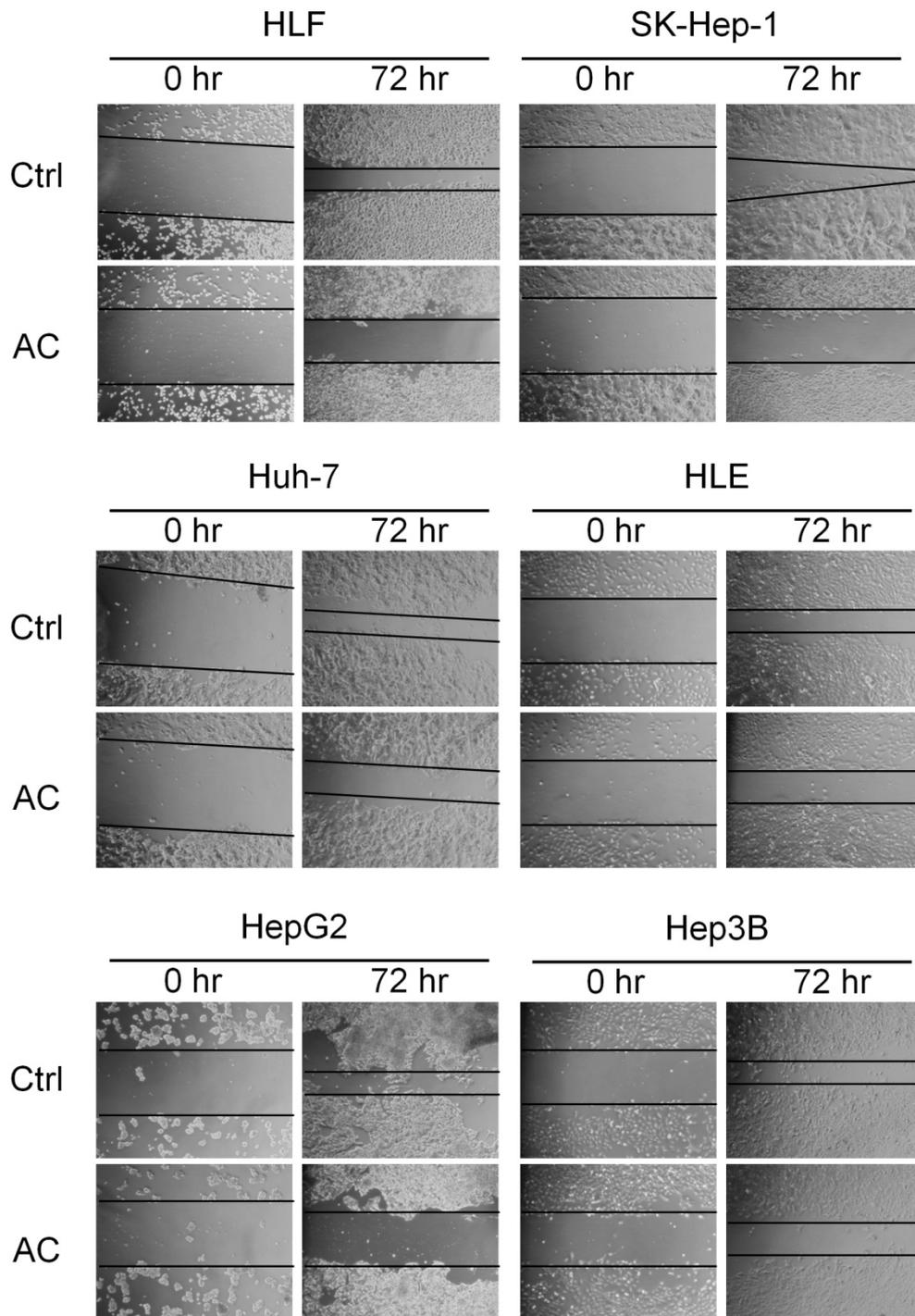


図4、癌細胞に対する併用試薬の抑制効果の検出。

