

Graduate School of Creative Science and Engineering  
Waseda University

博士論文審査報告書  
Doctoral Dissertation Review Report

論文題目  
Dissertation Title

Nanoparticles in the  $\text{MnO}_x\text{-SiO}_2$  system for the applications to the  
combinational anticancer therapies of immunotherapy and other therapies

$\text{MnO}_x\text{-SiO}_2$ 系ナノ粒子の免疫療法および他療法との併用療法への応用

申請者  
(Applicant Name)  
Xueping YU  
余 雪萍

Department of Earth Sciences, Resources and Environmental Engineering    Research on Applied  
Mineralogy

February, 2023

がん治療のために、さまざまな治療法が開発されてきた。通常、がん治療法は、外科手術、放射線療法、化学療法と実施される。しかし、これらのがん治療法の治療効果には限界があるため、近年、光力学療法、化学力学療法との併用など、多くの新しいがん治療法が開発されてきている。これらの療法は、臨床試験と前臨床試験の両方で多くの良い結果が得られているが、ほとんどの治療法は、腫瘍の増殖や転移に対する抑制効果、特にがんによる死亡の主な原因である腫瘍転移の免疫抑制効果について、複雑な腫瘍微小環境（TME）のために、様々な限界に直面しているのが現状である。最近登場した免疫療法は、免疫反応の活性化に着目した治療法として、注目されており、一部はすでに臨床応用されている。しかし、腫瘍微小環境は通常、免疫抑制的であるため、免疫療法の効果はまだ十分満足できるものではないのが現状である。したがって、腫瘍微小環境を制御し、免疫応答を活性化することで、腫瘍の増殖と転移の両方に対する既存の治療法の効率を向上させる治療の発見・開発が急務となっている。

本論文では、免疫療法と他の既存のがん治療法の併用療法の効果を高めるために、Mn系とSi系のナノ原料を用いて、3種類のMnO<sub>x</sub>-SiO<sub>2</sub>系ナノ粒子を合成した。これらの3つの異なる形態のMnO<sub>x</sub>-SiO<sub>2</sub>系ナノ粒子は、2つの側面から効果を発揮すると考えられる。まず第一に、腫瘍微小環境の低酸素状態を緩和するために酸素化を誘導し、活性酸素種を増加させるために、酸化還元バランスを破壊するなど、抗がん治療に適した状態に腫瘍微小環境を調整することが可能である。第二に、免疫反応を活性化し、免疫抑制状態を緩和する可能性がある。さらに、両側動物モデルを用いて、*in vivo*での抗がん作用を検討した結果、これらのMnO<sub>x</sub>-SiO<sub>2</sub>系ナノ粒子は、腫瘍の増殖や転移を抑制する効果を発現する可能性を有していることが示された。

本論文は、5章に分かれている。

第1章では、本研究の背景と目的を述べている。

第2章では、Mn被覆SiO<sub>2</sub>ナノ粒子（SM NPs）を合成し、免疫療法と放射線療法の併用による抗がん治療への応用を試みた。グルタチオン（GSH）枯渇、活性酸素種（ROS）生成、酸素供給、殺細胞効果、免疫活性化、分解促進を精査した結果、SM NPsは腫瘍微小環境に対して明らかな調節機能を示し、より高いDNA損傷レベルと殺細胞効果を誘発し、サイトカイン分泌を促進することがわかった。さらに、X線照射後の活性酸素レベル、DNA損傷、GPX-4（グルタチオンペルオキシダーゼ4）、LPO（過酸化脂質）レベルなどの細胞内変化を分析した。次に、両側動物モデルを用いた*in vivo*で、放射線とSM NPsの併用治療、および放射線、SM NPs、抗CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球抗原4）抗体の併用治療は、それぞれ放射線単独治療、放射線と抗CTLA-4抗体の併用治療よりも原発腫瘍および転移性腫瘍の増殖抑制効果が高いことを確認した。

第3章では、Mnをドーピングしたメソポーラスシリカナノ粒子（MMNPs）を合成

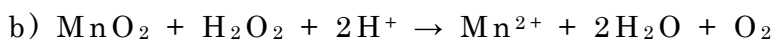
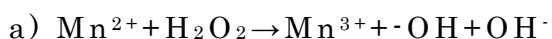
し、免疫療法と化学療法の併用による抗がん剤治療の強化を試みた。メソポーラスシリカナノ粒子 (MNPs) への Mn 添加により、MNPs に腫瘍微小環境の制御機能を付与し、免疫活性化能を向上させ、臨床応用の限界の一つである MNPs の分解を改善した。両側動物モデルを用いて、*in vivo* で腫瘍サイズのモニタリングや、脾臓細胞からのサイトカイン分泌量の測定などから、DOX (ドキソルビシン)、MM NPs、抗 CTLA-4 (細胞傷害性 T リンパ球抗原 4) 抗体の併用療法が、DOX と抗 CTLA-4 抗体の併用療法よりも、原発性腫瘍および転移性腫瘍の増殖抑制効果が高いことを確認した。

第 4 章では、近赤外領域における蛍光特性を有する IR 780 (IR 780 ヨウ化物、 $C_{36}H_{44}ClN_2 \cdot I$ ) を担持し、Mn ナノ粒子で被覆した IR780 担持 Mn ドープ・メソポーラスシリカナノ粒子 (IMM) を合成した。IR 780 単独と比較して、IR 780 を担持した IMM は優れた光安定性を示し、レーザー照射 4 回後、室温で 2 週間暗所に保存しても発熱する優れた光熱能力と、室温で 2 週間暗所に保存しても一重項酸素種を生成する優れた光線力学的能力を示した。さらに、IMM は腫瘍微小環境の酸素化、細胞毒性の高い活性酸素であるヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) の生成、GSH の枯渇など、明らかな調節機能を示した。両側動物モデルを用いた *in vivo* において、808 nm レーザー照射と IMM の組み合わせは、808 nm レーザー照射と IR 780 単独の組み合わせと比較して、明らかに原発性腫瘍と転移性腫瘍の両方に対して、優れた抑制効果を引き起こすことが示された。

すなわち、本研究で合成した 3 種類の  $MnO_x-SiO_2$  系ナノ粒子は、いずれも腫瘍微小環境に対して、酸素化、活性酸素生成、GSH 枯渇、免疫活性化などの調節機能を示すことがわかった。これらの結果から、以下の考察を行っている。

1) 3 種類の  $MnO_x-SiO_2$  系ナノ粒子中の  $MnO_2$  は、酸素化誘導能が顕著であった。 $MnO_2$  は、酸化還元活性な遷移金属酸化物ナノ粒子の一種であり、 $Mn^{2+}$  と  $Mn^{4+}$  との中間価数状態により発現する  $H_2O_2$  に対する高い反応性から、 $O_2$  を生成するなど、明らかな触媒能力を有していることを示している。

2) 3 種類の  $MnO_x-SiO_2$  系ナノ粒子から生成する  $Mn^{2+}$  イオンは、以下の式 (a) に示すように、 $H_2O_2$  との  $Mn^{2+}$  によるフェントン様反応により、細胞毒性の高い活性酸素である ( $\cdot OH$ ) の発生を誘導する。 $MnO_2$  は、 $H_2O_2$ 、 $H^+$ 、および GSH との反応により、以下の式 (b) ~ (d) 式のように  $Mn^{2+}$  に還元され、通常、正常組織よりも腫瘍微小環境中に、高濃度で  $Mn^{2+}$  イオンが放出される。



3) ここで  $MnO_2$  は、上式 (d) のように、GSH と反応して GSH を消費する。

4) 3 種類の  $MnO_x-SiO_2$  系ナノ粒子に含まれる Mn と Si は、両側動物モデルに

において、原発性腫瘍より転移性腫瘍に対する明らかな抑制効果および免疫反応の活性化を示した。一方、3つの異なる  $\text{MnO}_x\text{-SiO}_2$  系ナノ粒子は、通常は免疫系に影響を与え、腫瘍の免疫抑制環境を誘導する特殊な腫瘍微小環境を制御した。さらに、 $\text{MnO}_x\text{-SiO}_2$  系ナノ粒子の、免疫活性化に対する相乗効果は、免疫抑制環境を免疫活性化環境に転換することに寄与することが確認できた。

第5章では、結論を総括している。

以上要するに本論文は、合成した3種類の  $\text{MnO}_x\text{-SiO}_2$  系ナノ粒子が、*in vivo* で、既存の多くのがん治療法の効果を制限している腫瘍微小環境に対する制御機能を発揮し、既存のがん治療法による限られた免疫応答を活性化し、これが相乗的に原発腫瘍と転移性腫瘍の両方に対する増殖・転移抑制効果を向上させることを明らかにしたものである。この一連の成果は、生体鉱物学のみならず、再生医療学において、新たながん治療戦略を提供する可能性を示したものと考えられる。

よって、本論文は博士(工学)の学位を受けるに相応しいものであると認める。

2023年2月

審査員

主査 早稲田大学教授 工学博士 早稲田大学 山崎 淳司

早稲田大学教授 理学博士 東京大学 内田 悦生

早稲田大学教授 博士(工学) 東北大学 山口 勉功

(国法) 産業技術総合研究所上級主任研究員

工学博士(学術) 華南工科大学 王 秀鵬