

## 明 細 書

発明の名称：抗癌剤キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、抗癌剤キットに関する。

### 背景技術

[0002] 本出願人は、電解水素水等の各種水素水やそれを含む混合物等の新たな用途や作用機能について種々検討している。例えば、特許文献1では、エタノール溶液と水素水とが混和され、エタノールの濃度が1～4%であり、溶存水素濃度が550～5600ppbであるアルコール性肝障害抑制用の水素水混合物を提案している。この水素水混合物は、安全性が高く、調製が容易かつ安価であり、さらにアルコール性肝障害を効果的に抑制することができる。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0003] 特許文献1：特開2022-126128号公報

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

[0004] ところで、従来、癌の治療法として、癌細胞のDNAに作用して、癌細胞の増殖を抑制することにより抗癌作用を示す抗癌剤を使用した薬物療法（化学療法）が用いられている。

[0005] 従来の抗癌剤においては、優れた抗癌作用を有するものの、吐き気や嘔吐、脱毛等の副作用が強いものがあり、また抗癌剤の投与量が増大すると、患者の経済的負担も増大するため、抗癌剤の継続使用ができない場合があるという問題がある。患者の副作用や経済的負担を軽減するために、抗癌剤の投与量は少しでも減少させたいという要望がある。

[0006] そこで、本発明は、かかる点に鑑みてなされたものであり、抗癌剤の投与量を増大させずに、抗癌剤の抗癌作用を増強することができる抗癌剤キット

を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0007] 上記の目的を達成するために鋭意検討した結果、本発明者らは、電解水素水（それに溶存する分子状水素）がオートファジーを抑制する活性を有すること、当該活性を利用して抗癌剤の抗癌作用を増強できることを見出し、本発明の抗癌剤キットを完成するに至った。
- [0008] 本発明の抗癌剤キットは、オートファジー抑制活性を有し、抗癌剤作用増強物質として分子状水素を含有する抗癌作用増強剤と抗癌剤とを備え、
- ・ 前記抗癌剤の基準有効成分濃度（ $1\ \mu\text{M}$ ）に対する前記分子状水素の濃度が $105\ \text{ppb}$ 以上 $2160\ \text{ppb}$ 以下であり、
  - ・ 適用対象となる癌細胞は、前記分子状水素によってオートファジーが抑制されるヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞及びヒト大腸癌由来HCT116細胞からなる群より選択される少なくとも一種であり、
  - ・ 前記抗癌作用増強剤は、電解水素水であり、
  - ・ 前記抗癌剤は、オートファジー活性化作用を有するドキソルビシン、ボサチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ、ニロテニブ及びフルオロウラシルからなる群より選択される少なくとも一種を有効成分として含有し、
  - ・ 前記分子状水素が前記抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、前記抗癌剤の抗癌効果を増強することを特徴とする。但し、本発明の抗癌剤キットは、前記適用対象となる癌細胞が結腸癌細胞であり、且つ、前記抗癌剤がフルオロウラシルを有効成分として含有する抗癌剤キットを除くものでよい。
- [0009] 本発明の抗癌剤キットは、オートファジー抑制活性を有し、抗癌剤作用増強物質として分子状水素を含有する抗癌作用増強剤と抗癌剤とを備え、
- ・ 前記抗癌剤の基準有効成分濃度（ $1\ \mu\text{M}$ ）に対する前記分子状水素の濃度が $105\ \text{ppb}$ 以上 $2160\ \text{ppb}$ 以下であり、
  - ・ 適用対象となる癌細胞は、前記分子状水素によってオートファジーが抑制

されるヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞及びヒト大腸癌由来HCT116細胞からなる群より選択される少なくとも一種であり、

- ・前記抗癌作用増強剤は、電解水素水であり、
- ・前記抗癌剤は、オートファジー活性化作用を有するドキソルビシン、ボサチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ピンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ及びニロテニブからなる群より選択される少なくとも一種を有効成分として含有し、
- ・前記分子状水素が前記抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、前記抗癌剤の抗癌効果を増強することを特徴とする。

### 発明の効果

[0010] 本発明によれば、抗癌剤の投与量を増大させずに、抗癌剤の抗癌作用を増強することができる抗癌剤キットを提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、マウス胎児線維芽細胞（MEF細胞）を用いた、Bafilomycin A1（Baf. A1）によるフラックスアッセイを利用したBaf. A1の存在下または非存在下におけるLC3タンパク質（LC3-II）の発現量を示す図である。

[図2]図2は、MEF細胞を用いた、Baf. A1の存在下におけるLC3-IIの発現量とBaf. A1の非存在下におけるLC3-IIの発現量との差分を示す図である。

[図3]図3は、MEF細胞を用いた、mRFP-GFP-LC3 tandem fluorescent probeを利用した蛍光顕微鏡観察による電解水素水のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図4]図4は、ヒト子宮頸癌細胞（HeLa細胞）を用いた、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比による電解水素水のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図5]図5は、HeLa細胞を用いた、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比によるドキソルビシン（Doxorubicin、抗癌剤）のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図6]図6は、HeLa細胞を用いた、ドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証

結果を示す図である。

[図7]図 7 は、HeLa細胞を用いた、ドキソルビシンのアポトーシス誘導の検証結果を示す図である。

[図8]図 8 は、HeLa細胞 (ATG7 WT) を用いた、電解水素水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図9]図 9 は、HeLa細胞においてATG7 (オートファジー関連遺伝子) を欠損させた細胞 (ATG7 K0) を用いた、電解水素水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図10]図 10 は、HeLa細胞を用いた、電解水素水と併用したときのドキソルビシンのアポトーシス誘導の検証結果を示す図である。

[図11]図 11 は、HeLa細胞を用いた、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比による、電解水素水と併用したときのドキソルビシンのオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図12]図 12 は、ヒト結腸癌細胞 (Caco-2細胞) を用いた、無血清培地又はBaf. A1を含む培地でのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図13]図 13 は、Caco-2細胞を用いた、浄水培地又は電解水素水培地でのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図14]図 14 は、Caco-2細胞を用いた、電解水素水の細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図15]図 15 は、Caco-2細胞を用いた、無血清培地又はBaf. A1を含む培地での電解水素水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図16]図 16 は、Caco-2細胞を用いた、電解水素水と併用したときのドキソルビシンのアポトーシス誘導の検証結果を示す図である。

[図17]図 17 は、Caco-2細胞を用いた、GFP-LC3-RFP probeを利用したGFP/RFP比による、電解水素水と併用したときのドキソルビシンのオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図18]図18は、Caco-2細胞を用いた、GFP-LC3-RFP probeを利用したGFP/RFP比による、各種水のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図19]図19は、Caco-2細胞を用いた、各種水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図20]図20は、HeLa細胞（ATG7 WT）を用いた、生成水素水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖の検証結果を示す図である。

[図21]図21は、HeLa細胞においてATG7を欠損させた細胞（ATG7 KO）を用いた、生成水素水と併用したときのドキソルビシンの細胞増殖の検証結果を示す図である。

[図22]図22は、ヒト大腸癌細胞（HCT116細胞）を用いた、GFP-LC3-RFP probeを利用したGFP/RFP比による電解水素水のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図23]図23は、HeLa細胞を用いた、GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比によるパクリタキセル（Paclitaxel、抗癌剤）のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図24]図24は、HeLa細胞を用いた、パクリタキセルの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図25]図25は、HCT116細胞を用いた、GFP-LC3-RFP probeを利用したGFP/RFP比によるフルオロウラシル（Fluorouracil、5-FU、抗癌剤）のオートファジー活性の解析結果を示す図である。

[図26]図26は、HeLa細胞（ATG7 WT）を用いた、電解水素水と併用したときのパクリタキセルの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図27]図27は、HeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を用いた、電解水素水と併用したときのパクリタキセルの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

[図28]図28は、HCT116細胞を用いた、電解水素水と併用したときのフルオロウラシルの細胞増殖抑制効果の検証結果を示す図である。

**発明を実施するための形態**

[0012] 本実施形態に係る抗癌剤キットは、抗癌作用増強剤と抗癌剤とを備える。  
抗癌剤キットの対象となる癌の種類は特に限定されないが、例えば、子宮頸癌、結腸癌、大腸癌等が挙げられる。

[0013] <抗癌作用増強剤>

抗癌作用増強剤は、抗癌剤作用増強物質の活性により、抗癌剤の作用経路そのものを増強する、または抗癌剤の作用経路とは違う経路を介して、相乗的に作用することにより、抗癌剤の効果（抗癌効果）を増強するものを意味する。ここで、本実施形態に係る抗癌作用増強剤は、後述の実施例の解析・検証結果より、オートファジーを抑制する活性（以下「オートファジー抑制活性」と称する）を有する抗癌剤作用増強物質を含有する。

[0014] オートファジーは、細胞内のリサイクリングシステム（リソソームによる分解系）であり、細胞内成分を分解することで細胞内成分の浄化や有害物を除去し、発がん等の様々な疾患の予防に働いている。またオートファジーは、細胞内成分の分解機構としての役割の他に、細胞内成分の分泌による生体機構の調節に機能している役割があることも分かっている。特に、分泌性オートファジー（エキソファジー、分泌物の細胞外放出）は、様々な疾患と関係する炎症の調節や代謝物のやり取り等に関与することが明らかになっている。

[0015] 本実施形態に係る抗癌作用増強剤は、オートファジー抑制活性を有する抗癌剤作用増強物質として分子状水素を含有する。換言すると、分子状水素は、オートファジー抑制活性の作用分子といえる。そして、抗癌作用増強剤は、分子状水素がオートファジーを抑制することで、癌細胞の細胞増殖を効果的に抑制するという、優れた癌細胞増殖抑制効果を有する。

[0016] 分子状水素を含有する抗癌作用増強剤の形態は、特に限定されず、例えば、分子状水素を含有する液体（以下「水素含有水」とも称する）、分子状水素を含有する気体（以下「水素含有ガス」とも称する）等が挙げられる。

[0017] 水素含有水は、分子状水素を溶存させた生体適用液である。生体適用液としては、例えば、水（浄水、精製水、滅菌水等）、生理食塩水、緩衝液（リ

ン酸緩衝液等、使用する抗癌剤と同じものが好ましい。）、輸液（点滴液、リンゲル液等、治療薬を含有していてもよい。）、注射液、飲料（緑茶、紅茶等の茶飲料、青汁、野菜ジュース、果汁等）等が挙げられる。水素含有水の具体例としては、水に対して電気分解処理を行うことにより生成した電解水素水；それ以外の方法で製造された生成水素水等が挙げられる。

[0018] 水素含有ガスは、分子状水素を含有していればよく、発明の目的を阻害しない範囲で、他の気体（酸素、窒素、不活性ガス等）を含んでいてもよい。水素含有ガスの具体例としては、分子状水素を含む空気、分子状水素と他の気体とを含む混合ガス等が挙げられる。

[0019] 水素含有水及び水素含有ガスは、一般に市販されている水素生成装置（電解水生成装置等）を用いて製造できる。

[0020] 抗癌作用増強剤の中では、水素含有水（電解水素水及び生成水素水）が好ましく、安全性が高く市販の装置で調製が容易かつ安価である電解水素水がより好ましい。

[0021] 抗癌剤キットにおける分子状水素の濃度の下限は、好ましくは550ppb以上、より好ましくは640ppb以上、より一層好ましくは688ppb以上、さらに好ましくは896ppb以上、さらに一層好ましくは1056ppb以上である。またその上限は、好ましくは5600ppb以下、より好ましくは4000ppb以下、より一層好ましくは2000ppb以下、さらに好ましくは1320ppb以下、さらに一層好ましくは1080ppb以下である。分子状水素の濃度範囲としては、例えば、550ppb以上5600ppb以下、800ppb以上1320ppb以下、640ppb以上1056ppb以下、1056ppb以上1080ppb以下等が挙げられる。なお、分子状水素の濃度は、抗癌作用増強剤が水素含有水（電解水素水等）である場合、溶存水素濃度を意味する。

[0022] 抗癌剤の基準有効成分濃度（1  $\mu$ M）に対する分子状水素の濃度（溶存水素濃度）は、105ppb以上2160ppb以下であることが好ましい。

[0023] <抗癌剤>

抗癌剤は、特に限定されないが、抗癌剤キットとして組み合わせる抗癌作用増強剤がオートファジー抑制活性を有するため、オートファジー抑制活性に対応する作用機能としてオートファジーを活性化作用（以下「オートファジー活性化作用」と称する）を有する有効成分を含有するものが好ましい。抗癌剤キットとして、オートファジー抑制活性を有する抗癌作用増強剤と、オートファジー活性化作用を有する抗癌剤とを共投与することにより、抗癌作用増強剤が抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、効果的に抗癌効果の増強を図ることが可能になる。その結果、抗癌剤の投与量の低減を図ることができ、患者の副作用及び経済的負担を軽減できる。

[0024] オートファジー活性化作用を有する抗癌剤としては、例えば、ドキソルビシン、ボスチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ、ニロテニブ、フルオロウラシル等を有効成分として含有するものが挙げられる。抗癌剤の有効成分は、ドキソルビシン、ボスチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ、ニロテニブ及びフルオロウラシルからなる群より選択される少なくとも一種であってもよい。即ち、抗癌剤は、上記の有効成分を、それぞれ単独で含有するものでもよく、2種類以上を含有するものでもよい。

[0025] なお、オートファジー活性化作用を有する抗癌剤は、例えば以下の論文に記載されている。以下の論文には、水素に関連した事項について記載されていない。

- 1) Ponatinib: Diana Corallo, et al. Autophagic flux inhibition enhances cytotoxicity of the receptor tyrosine kinase inhibitor ponatinib. J Exp Clin Cancer Res. 2020.
- 2) Cisplatin: Ji-Fan Lin, et al. Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. Drug Devel Ther. 2017.
- 3) Vincristine: ZhenZhen Zhan, et al. Autophagy-mediated HMGB1 releas

e antagonizes apoptosis of gastric cancer cells induced by vincristine via transcriptional regulation of Mcl-1. Autophagy. 2012.

4) Paclitaxel: Jian Wen, et al. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. Breast Cancer Res Treat. 2015.

5) Dasatinib: Xiao-Feng Le, et al. Dasatinib induces autophagic cell death in human ovarian cancer. Cancer. 2010.

6) Nilotinib: Hui-Chuan Yu, et al. Nilotinib induces autophagy in hepatocellular carcinoma through AMPK activation. J Biol Chem. 2013.。

[0026] 上述のとおり、電解水素水（それに溶存する分子状水素）は、オートファジーを抑制する。一方、例えばドキソルビシン等を有効成分として含有する抗癌剤は、後述の実施例の解析・検証結果より、オートファジーを活性化する。そして、本発明者らは、オートファジー活性化作用を有する抗癌剤では、オートファジー活性化が抗癌効果を減衰させるのではないかとの仮説を立て、さらに検討を進めた結果、分子状水素のオートファジー抑制という生理作用の活用の可能性を見出した。本発明の抗癌剤キットは、これら知見に基づいて完成されたものであり、分子状水素の活性を利用して、抗癌剤のオートファジー活性化作用を効果的に抑制することで、従来よりも抗癌効果が増強する。

[0027] 抗癌剤キットにおける（抗癌剤キットの成分総量に対する）抗癌剤の濃度（有効成分を2種類以上含有する場合は合計濃度）は、特に限定されず、対象の癌細胞の治療に適用される有効成分濃度が挙げられる。例えば、後述の実施例に記載のとおり、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞の場合、抗癌剤の有効成分濃度は0.5  $\mu\text{M}$ ～2  $\mu\text{M}$ 程度である。ヒト結腸癌由来Caco-2細胞の場合、抗癌剤の有効成分濃度は1  $\mu\text{M}$ ～4  $\mu\text{M}$ 程度である。ヒト大腸癌由来HCT116細胞の場合、抗癌剤の有効成分濃度は1  $\mu\text{M}$ ～10  $\mu\text{M}$ 程度である。

[0028] <抗癌剤キット>

抗癌剤キットの形態は、特に限定されず、抗癌作用増強剤及び抗癌剤の形態に応じて適宜決定すればよい。例えば、抗癌作用増強剤として水素含有水（電解水素水等）を備える抗癌剤キットは、水素含有水に抗癌剤を溶解させた液体の形態等が挙げられる。液体の抗癌剤キットの投与方法としては、例えば、経口投与；点滴等の注射や皮下、経皮等の非経口投与する方法等が挙げられる。一方、抗癌作用増強剤として水素含有ガスを備える抗癌剤キットの投与方法としては、例えば、水素含有ガスを吸入、吸引等による経肺投与し、抗癌剤を経口投与又は非経口投与する方法等が挙げられる。このように、抗癌作用増強剤と抗癌剤とは、その形態に応じて、投与方法を別にしてもよい（別々に投与してもよい）。この場合、投与のタイミングは、同時でもよく、異なってもよい。

[0029] 抗癌剤キットの適用対象となる癌細胞としては、分子状水素のオートファジー抑制活性を利用して、抗癌剤のオートファジー活性化作用を効果的に抑制することにより従来よりも抗癌効果を増強する観点から、分子状水素によってオートファジーが抑制される癌細胞であれば特に限定されない。換言すると、このような癌細胞であれば抗癌剤キットを効果的に適用することができ、実施例に記載の癌細胞に特に限定されない。

[0030] 抗癌剤キットは、抗癌剤の有効成分濃度が $0.5\mu\text{M}$ 以上 $10\mu\text{M}$ 以下であり、抗癌剤キット（成分の総量）における分子状水素の濃度が $1056\text{ppb}$ 以上 $1080\text{ppb}$ 以下であることが好ましい。なお、抗癌剤の有効成分濃度は、上記範囲に限定されず、上述のとおり、対象の癌細胞の治療に適用される有効成分濃度に応じて適宜決定すればよく、例えば、 $0.5\mu\text{M}$ 以上 $5\mu\text{M}$ 以下であってもよく、 $0.5\mu\text{M}$ 以上 $4\mu\text{M}$ 以下であってもよく、 $0.5\mu\text{M}$ 以上 $2\mu\text{M}$ 以下であってもよく、 $0.5\mu\text{M}$ 以上 $1\mu\text{M}$ 以下であってもよい。

[0031] 以上のように構成される抗癌剤キットでは、抗癌剤の抗癌効果を増強するという増強効果により、抗癌剤の投与量を減少でき、その結果、患者の副作用や経済的負担等の問題を一挙に解決できる。

## 実施例

[0032] 以下に、本発明を実施例に基づいて説明する。なお、本発明は、これらの実施例に限定されるものではなく、これらの実施例を本発明の趣旨に基づいて変形、変更することが可能であり、それらを本発明の範囲から除外するものではない。以下の図において、\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$ を示す。

[0033] <1. 電解水素水の製造>

電解水生成装置（日本トリム社製、商品名：TRIMION GRACE）を用いて、温度が $22^{\circ}\text{C}$ 、流速が $1.5\text{ L/min}$ の条件で、溶存水素濃度の異なるレベル1～4の電解水素水を得るとともに、マイクロカーボンによってろ過された浄水を得た。

[0034] 次に、上記各レベルの電解水素水のpH、及び溶存水素濃度の測定を行った。なお、pHの測定にはpHメータ（HORIBA社製、商品名：LAQUA act D-71）を用いて行い、溶存水素濃度の測定は、溶存水素計DH-35A（東亜DKK社製）を用いて行った。

- ・レベル1 :  $800\text{ ppb}$ 、 $\text{pH}7$ 。
- ・レベル2 :  $860\text{ ppb}$ 、 $\text{pH}8$ 。
- ・レベル3 :  $1120\text{ ppb}$ 、 $\text{pH}9$ 。
- ・レベル4 :  $1320\text{ ppb}$ （ $\sim 1350\text{ ppb}$ ）、 $\text{pH}10$ 。

[0035] <電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製>

粉体より調整した $5\times$ ダルベッコ変法イーグル培地（以下「DMEM」という）を、上述の浄水または各レベルの電解水素水で5倍に希釈し、電解水素水の処理用培地（すなわち、 $20\%$ の $5\times$ DMEMと、 $80\%$ の電解水素水または浄水を混和した水素水混合物である処理用培地）として用いた。各レベルの電解水素水培地における溶存水素濃度は、以下の通りである。

- ・レベル1 :  $800\text{ ppb} \times 4/5 = 640\text{ ppb}$ 。
- ・レベル2 :  $860\text{ ppb} \times 4/5 = 688\text{ ppb}$ 。
- ・レベル3 :  $1120\text{ ppb} \times 4/5 = 896\text{ ppb}$ 。

・レベル4：1320ppb（～1350ppb） $\times 4/5 = 1056$ ppb（～1080ppb）。

[0036] <2. 電解水素水のオートファジー抑制の解析（多面的なアプローチから解析）>

電解水素水はオートファジーを抑制するかどうか多面的なアプローチから解析を行った。

[0037] （2-1）Bafilomycin A1によるフラックスアッセイ

マウス胎児線維芽細胞（以下「MEF細胞」という）を6-well plateに $5.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養した（以下「前培養」とも称する）。前培養後、200nMのBafilomycin A1（以下「Baf. A1」という、阻害剤）の存在下または非存在下で、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、処理した細胞は溶解バッファーで溶解し、その溶解物をウェスタンブロッティングに供し、LC3タンパク質（以下「LC3-II」という）の特異的抗体でLC3-IIの発現量を解析した。その結果を図1に示す。

[0038] ここで、図1に示すLC3-IIの発現量は、オートファゴソームの数と相関する。しかし、ある時点のLC3-IIの発現量だけでは実際のフラックス量を示さず、オートファジーを活性化するか又は抑制するのかは分からない。そのため、Baf. A1の有無によるLC3-IIの発現量の比較により、リソソームに送られるLC3-IIの発現量を測定した。具体的には、Baf. A1の存在下におけるLC3-IIの発現量とBaf. A1の非存在下におけるLC3-IIの発現量との差分を算出することで、オートファジーフラックスを解析した。その結果を図2に示す。

[0039] なお、図1及び2において、

- ・MQ：上記<電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製>にて、超純水のみで希釈した、超純水を含むDMEM（超純水培地）、
- ・FW：上記<電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製>にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）、
- ・LV1-LV4：溶存水素濃度レベル1～4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水

培地)、

・ + Baf. A1 : 上記の各種DMEMに200nMのBaf. A1を溶解させた培地 (Baf. A1を含む培地) を示す。

[0040] 図1より、Baf. A1の非存在下では、電解水素水 (LV1-LV4) は、超純水 (MQ) 及び浄水 (FW) と比較して、LC3-IIの発現量が高く、溶存水素濃度に比例して増加することが確認された。一方、Baf. A1の存在下 (+ Baf. A1) では、電解水素水は、いずれの溶存水素濃度であっても、超純水及び浄水と同等のLC3-IIの発現量であることが確認された。

[0041] 図2より、Baf. A1の存在下におけるLC3-IIの発現量とBaf. A1の非存在下におけるLC3-IIの発現量との差分を比較すると、電解水素水 (LV1-LV4) は、超純水 (MQ) 及び浄水 (FW) よりも低く、溶存水素濃度が高くなるほど減少することが分かった。この結果から、電解水素水は、溶存水素濃度が高くなるほど、LC3-IIが蓄積する (オートファジーにおける分解量が減少する) ため、オートリソソームによる分解を抑制すると考えられる。

[0042] (2-2) mRFP-GFP-LC3 tandem fluorescent probeを利用した蛍光顕微鏡観察

mRFP-GFP-LC3 tandem fluorescent probe (以下「tf-LC3 probe」という) を発現するMEF細胞において、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、MEF細胞を、2%パラホルムアルデヒドを用いて固定化した。細胞内の蛍光は共焦点レーザー走査顕微鏡で観察し、オートリソソームの数を測定した。その結果を図3に示す。

[0043] なお、図3において、

・ FW : 上記<電解水素水の処理用培地 (電解水素水培地) の作製>にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM (浄水培地)、

・ EHW LV4: 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM (電解水素水培地) を示す。

[0044] なお、tf-LC3 probeは、オートファジーをモニターできる蛍光タンパク質を作り出す遺伝子をもつ環状DNA (プラスミド) であり、例えば以下の論文に

記載されている。tf-LC3 probeを発現するMEF細胞とは、上記プラスミドを細胞内に送り込み、プローブ遺伝子をMEF細胞のゲノムに組み込む（遺伝子組み換えをする）ことで、オートファジーをモニターできる蛍光タンパク質を作り出す（発現する）細胞をいう。また、tf-LC3 probeは、酸性度に対する感度の違いを利用するものであり、GFP蛍光は酸性条件（pH < 5.0）で消光する一方、mRFPの蛍光は比較的安定でリソソーム内でも保持される。換言すると、tf-LC3 probeにより、オートファゴソームから酸性オートリソソームへの移行を可視化できる。

Shunsuke Kimura, Takeshi Noda, Tamotsu Yoshimori. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescently-tagged LC3. *Autophagy*. 2007.3(5):452-60. doi: 10.4161/autophagy.4451.

[0045] 図3より、電解水素水（EHW LV4）では、オートリソソームの数が減少することが確認された。この結果から、電解水素水はオートリソソームによる分解を抑制すると考えられる。

[0046] （2－3）GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比によるオートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを発現するヒト子宮頸癌細胞（以下「HeLa細胞」という）を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図4に示す。

[0047] なお、図4において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）、
- ・LV1-LV4：電解水素水の溶存水素濃度レベル1～4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）、

- ・ T: 溶存水素濃度レベル 4 の電解水素水を含む DMEM (電解水素水培地) に  $1\mu\text{M}$  の Torin 1 を溶解させた培地 (Torin 1 を含む浄水培地)、
- ・ Baf.: 溶存水素濃度レベル 4 の電解水素水を含む DMEM (電解水素水培地) に  $200\text{nM}$  の Baf. A1 を溶解させた培地 (Baf. A1 を含む浄水培地) を示す。

[0048] なお、GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G probe (又は後述する GFP-LC3-RFP probe) は、例えば以下の論文に記載されている。GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G probe (又は GFP-LC3-RFP probe) は、ATG4 によって切断され、細胞質中に同じ数の GFP-LC3 と RFP-LC3 $\Delta$ G (又は RFP) が生成される。GFP-LC3 はオートファゴソームに局在し、その後オートリソソーム内で消光・分解される。RFP-LC3 $\Delta$ G (又は RFP) は細胞質に留まり、GFP-LC3 の量を反映する内部コントロールとして機能する。また、GFP/RFP 比は、オートファジーによる GFP-LC3 の累積分解量を定量することで得られる。GFP/RFP 比が減少する場合、オートファジー活性化を意味する。一方、GFP/RFP 比が増加する場合、オートファジー抑制を意味する。Takeshi Kaizuka, Hideaki Morishita, Yutaro Hama, Satoshi Tsukamoto, Takahide Matsui, Yuichiro Toyota, Akihiko Kodama, Tomoaki Ishihara, Toru Mizushima, Noboru Mizushima. An Autophagic Flux Probe that Releases an Internal Control. Mol Cell. 2016;64(4):835-849. doi: 10.1016/j.molcel.2016.09.037.。

[0049] 図 4 より、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞において、電解水素水 (LV1-LV4) では溶存水素濃度が高くなるほど、相対的に GFP が蓄積し、GFP/RFP 比が増加するから、電解水素水はオートファジーを抑制した。

[0050] (2-4) まとめ

上記 (2-1) ~ (2-3) の多面的なアプローチから解析した結果より、電解水素水はオートファジーを抑制する、即ちオートファジーを抑制する活性 (オートファジー抑制活性) を有すると考えられる。

[0051] <3. 抗癌剤ドキソルビシンのオートファジー活性化の解析と抗癌効果の検証>

抗癌剤ドキソルビシンはオートファジーを活性化するかどうか、オートフ

ァジーの活性化が抗癌効果に影響するかどうかについて検証を行った。

- [0052] (3-1) GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比によるドキソルビシンのオートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを発現するHeLa細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1, 2又は4 μM）のドキソルビシン（Doxorubicin, Sigma-Aldrich Co., LLC.）を含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、上記（2-3）と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図5に示す。

- [0053] 図5より、ドキソルビシンは、濃度が高くなるほど、電解水素水とは反対に（図4参照）、GFP/RFP比が減少するから、オートファジーを活性化する作用（オートファジー活性化作用）を有すると考えられる。この結果より、ドキソルビシンでは、オートファジー活性化が抗癌効果を減衰させると予測される。

- [0054] (3-2) 細胞増殖抑制効果の検証

HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を96-well plateに $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1, 2又は4 μM）のドキソルビシンを含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, CK04) 溶液を各wellに10 μL加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図6に示す。

- [0055] (3-3) アポトーシス誘導の検証

Cell Death Detection ELISAPLUS(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いて、マニュアルに従ってアポトーシス誘導を評価した。HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7を欠損させた細胞（ATG7 KO）を12-well

plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEM中にて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1又は2  $\mu$ M）のドキソルビシンを含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、細胞を溶解バッファーで溶解し、溶解液をELISAプレートの各ウェルに加え、抗ヒストンビオチンおよび抗DNA PODを含む免疫試薬バッファーで2時間インキュベートし、インキュベーションバッファーで洗浄した。その後、100  $\mu$ LのABTS基質バッファーと反応させ、405 nmと490 nmで吸光度を測定した。その結果を図7に示す。

[0056] 図6及び7において、ATG7 WTとATG7 KOとの比較より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によってドキソルビシンの抗癌効果（細胞増殖抑制効果・アポトーシス誘導）が濃度に比例して増強することが確認された。

[0057] （3－4）まとめ

上記（3－1）～（3－3）の結果をふまえて考慮すると、オートファジー活性化作用を有するドキソルビシン等の抗癌剤では、オートファジーを抑制する電解水素水との併用により、抗癌効果の増強が期待される。

[0058] <4. 電解水素水と抗癌剤ドキソルビシンの併用による抗癌効果増強の検証1>

電解水素水と抗癌剤ドキソルビシンの併用（抗癌剤キット）は、ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞に対する抗癌効果を増強するかどうかについて検証を行った。

[0059] （4－1）細胞増殖抑制効果の検証

HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を96-well plateに $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し、DMEM中にて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10  $\mu$ L加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図8（ATG7 WT）及び9（ATG7 KO）に示す。

[0060] なお、図8及び9において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）に所定濃度（0.5, 1又は2  $\mu$ M）のドキソルビシンを添加したもの、
- ・EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）に所定濃度のドキソルビシンを添加したものを示す。

[0061] 図8（ATG7 WT）より、電解水素水とドキソルビシンの併用は、ドキソルビシンの細胞増殖抑制効果を増強することが確認された。一方、図9（ATG7 K0）より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によって、上記併用による増強効果が消失することが確認された。

[0062] （4－2）アポトーシス誘導の検証

Cell Death Detection ELISAPLUS(Roche Diagnostics、Basel、Switzerland)を用いて、マニュアルに従ってアポトーシス誘導を評価した。HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 K0）を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、細胞を溶解バッファーで溶解し、溶解液をELISAプレートの各ウェルに加え、抗ヒストンピオチンおよび抗DNA PODを含む免疫試薬バッファーで2時間インキュベートし、インキュベーションバッファーで洗浄した。その後、100  $\mu$ LのABTS基質バッファーと反応させ、405 nmと490 nmで吸光度を測定した。その結果を図10に示す。

[0063] なお、図10において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は1  $\mu$ M添加（＋）したもの、
- ・EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は1  $\mu$ M添加（＋）したものを示す。

[0064] 図10に示すATG7 WTより、電解水素水とドキソルビシンの併用は、ドキソ

ルビシンのアポトーシス誘導効果を増強することが確認された。一方、図 10 に示す ATG7 K0 より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によって、上記併用による増強効果が消失することが確認された。

[0065] (4-3) オートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probe を発現する HeLa 細胞 (ATG7 WT) を 12-well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、DMEM にて 37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件下で 24 時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種 DMEM に培地交換し、4 時間培養した。その後、上記（2-3）と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにて GFP と RFP の蛍光強度を解析した。GFP/RFP 比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図 11 に示す。

[0066] なお、図 11 において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含む DMEM（浄水培地）に 1 μM のドキソルビシンを添加したもの、
- ・EHW：溶存水素濃度レベル 4 の電解水素水を含む DMEM（電解水素水培地）に 1 μM のドキソルビシンを添加したものを示す。

[0067] 図 11 より、電解水素水とドキソルビシンの併用によって、GFP/RFP 比が増加するから、電解水素水はドキソルビシンのオートファジーの活性化を抑制する。

[0068] (4-4) まとめ

上記（4-1）～（4-3）の結果をふまえて考慮すると、ヒト子宮頸癌細胞（HeLa 細胞）において、電解水素水は、ドキソルビシン等の抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、抗癌効果を増強することが期待される。

[0069] ＜5. 電解水素水と抗癌剤ドキソルビシンの併用による抗癌効果増強の検証 2＞

電解水素水と抗癌剤ドキソルビシンの併用（抗癌剤キット）は、ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に対する抗癌効果を増強するかどうかについて検証を行っ

た。

[0070] (5-1) 細胞増殖抑制効果の検証

ヒト結腸癌細胞（以下「Caco-2細胞」という）を96-well plateに $2.0 \times 10^4$  cells/wellで播種しDMEM中にて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, CK04) 溶液を各wellに10 μL加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図12～15に示す。

[0071] 図12において、

- ・ D0X + serum free : 無血清のDMEM（無血清培地）に所定濃度（1, 2又は4 μM）のドキソルビシンを添加したもの、
- ・ D0X : 血清を含むDMEMに所定濃度のドキソルビシンを添加したもの、
- ・ D0X + Baf. : 血清を含むDMEMに200 nMのBafilomycin A1 (Baf. A1) を溶解させた培地（Baf. A1を含む培地）に所定濃度のドキソルビシンを添加したものを示す。

[0072] 図13において、

- ・ FW : 上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）に所定濃度（1, 2又は4 μM）のドキソルビシンを添加したもの、
- ・ EHW : 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）に所定濃度のドキソルビシンを添加したものを示す。

[0073] 図14において、

- ・ FW : 上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）、
- ・ EHW : 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）を示す。

[0074] 図15において、

- ・ FW (Medium + Baf. A1) : 上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）

）の作製>に従い、浄水及び血清を含むDMEMに200 nMのBaf. A1を溶解させた培地（Baf. A1を含む浄水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 $\mu$ M添加（＋）したもの、

・ EHW（Medium + Baf. A1）：同様にして、溶存水素濃度レベル4の電解水素水及び血清を含むDMEMに200 nMのBaf. A1を溶解させた培地（Baf. A1を含む電解水素水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 $\mu$ M添加（＋）したもの。

・ FW（Serum free medium）：同様にして、浄水を含む無血清のDMEM（無血清浄水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 $\mu$ M添加（＋）したもの、

・ EHW（Serum free medium）：同様にして、溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含む無血清のDMEM（無血清電解水素水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 $\mu$ M添加（＋）したものを示す。

[0075] 図12より、ドキソルビシンとオートファジー阻害剤（Baf. A1）の併用（Dox + Baf.）では、ドキソルビシンの細胞増殖抑制効果が増強することが確認された。一方、オートファジー活性化条件下（Dox + serum free）では、むしろドキソルビシンの細胞増殖抑制効果が低減することが確認された。図13より、電解水素水とドキソルビシンの併用（EHW）によって細胞増殖抑制効果が増強することが確認された。この増強効果は、電解水素水のオートファジー抑制活性によるものか、以下でさらに検証する。

[0076] 図14及び15より、ドキソルビシンとオートファジー阻害剤（Baf. A1）の併用条件下（「Medium + Baf. A1」、オートファジー阻害条件下）では、浄水（FW）と電解水素水（EHW）とを比較して両者に有意な差はないため、電解水素水を併用しても細胞増殖抑制効果は変化しないことが確認された。一方、ドキソルビシンとBaf. A1を含まない無血清培地（serum free medium）におけるオートファジー活性化条件下では、浄水（FW）と電解水素水（EHW）とを比較して、電解水素水を併用することで細胞増殖抑制効果が増強することが確認された。この結果をふまえて考慮すると、ドキソルビシンの効果増強には、電解水素水のオートファジー抑制活性が関与していると考えられる。

## [0077] (5-2) アポトーシス誘導の検証

Cell Death Detection ELISAPLUS(Roche Diagnostics、Basel、Switzerland)を用いて、マニュアルに従ってアポトーシス誘導を評価した。Caco-2細胞を12-well plateに $2.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、細胞を溶解バッファーで溶解し、溶解液をELISAプレートの各ウェルに加え、抗ヒストンビオチンおよび抗DNA PODを含む免疫試薬バッファーで2時間インキュベートし、インキュベーションバッファーで洗浄した。その後、100 μLのABTS基質バッファーと反応させ、405 nmと490 nmで吸光度を測定した。その結果を図16に示す。

## [0078] なお、図16において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 μM添加（＋）したもの、
- ・EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2 μM添加（＋）したものを示す。

[0079] 図16より、ドキソルビシンと電解水素水を併用（EHW）によってアポトーシス誘導効果が増強することが確認された。

## [0080] (5-3) オートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP probeを発現するCaco-2細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、上記（2-3）と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図17に示す。

## [0081] なお、図17において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）、

- ・ EHW : 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM (電解水素水培地)、
- ・ + DOX : 上記の各DMEMに2 $\mu$ Mのドキソルビシンを添加したものを示す。

[0082] 図17より、電解水素水と抗癌剤ドキソルビシンの併用 (EHW + DOX) によって、GFP/RFP比が増加するから、電解水素水はドキソルビシンのオートファジー活性化を抑制することが確認された。

[0083] (5-4) まとめ

上記(5-1)～(5-3)の結果をふまえて考慮すると、ヒト結腸癌細胞 (Caco-2細胞) においても、ヒト子宮頸癌細胞 (HeLa細胞) と同様に、電解水素水は、ドキソルビシン等の抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、抗癌効果を増強することが期待される。

[0084] <6. 電解水素水の増強効果に寄与する物質の検証>

電解水素水の上記効果の作用分子について検証を行った。

[0085] (6-1) オートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP  $\Delta$ G probeを発現するCaco-2細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養 (前培養) した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、上記(2-3)と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図18に示す。

[0086] なお、図18において、

- ・ FW : 上記<電解水素水の処理用培地 (電解水素水培地) の作製>にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM (浄水培地)、
- ・ EHW : 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM (電解水素水培地)、
- ・ EHW (AC) : 上記<電解水素水の処理用培地 (電解水素水培地) の作製>にて、溶存水素濃度レベル4の電解水素水を二度オートクレーブ処理後の水のみで希釈した、オートクレーブに供した水を含むDMEM (オートクレーブ水培地)、
- ・ HW : 上記<電解水素水の処理用培地 (電解水素水培地) の作製>にて、TRIM

SEVEN WATER（（株）日本トリム製）のキットを用いて作製された生成水素水のみで希釈した、溶存水素濃度レベル4と同等の水素を含むDMEM（生成水素水培地）を示し、

・異なる符号間（aとb）は、統計的に有意な差（ $p < 0.05$ ）があることを示す。なお、二度オートクレーブ処理では、高圧、121℃の高温で20分間を1サイクルとして、それを2回処理した。

[0087] 図18より、電解水素水（EHW）と生成水素水（HW）は、GFP/RFP比が同等であることから、同等にオートファジーの活性を抑制することが確認された。一方、電解水素水を二度オートクレーブ処理すると（EHW（AC））、GFP/RFP比が浄水（FW）と同等となることから、オートファジー抑制活性を消失させると考えられる。この結果から、電解水素水中のオートファジー抑制成分はオートクレーブ処理により脱気してしまう分子状水素のような揮発性のものと想定される。

[0088] （6－2）細胞増殖抑制効果の検証

Caco-2細胞を96-well plateに $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10μL加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図19に示す。

[0089] なお、図19において、

- ・FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2μM添加（＋）したもの、
- ・EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2μM添加（＋）したもの、
- ・EHW（AC）：上記のオートクレーブに供した水を含むDMEM（オートクレーブ水培地）にドキソルビシンを無添加（－）又は2μM添加（＋）したもの、
- ・HW：溶存水素濃度レベル4と同等の水素を含むDMEM（生成水素水培地）にド

キソルピシンを無添加（－）又は2 $\mu$ M添加（＋）したものを示し、

・異なる符号間（aとb）は、統計的に有意な差（ $p < 0.05$ ）があることを示す

。

[0090] 図19より、電解水素水（EHW）と生成水素水（HW）は、同等に、ドキソルピシンの細胞増殖抑制効果が増強することが確認された。一方、電解水素水を二度オートクレーブ処理すると（EHW（AC））、上記の増強効果を消失させると考えられる。

[0091] （6－3）細胞増殖の検証

HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を96-well plateに $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10 $\mu$ L加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図20及び21に示す。

[0092] なお、図20及び21において、

・HW:溶存水素濃度0 ppm～4 ppmの生成水素水を含むDMEM（生成水素水培地）、

・HW + DOX:上記のDMEM（生成水素水培地）に0.5 $\mu$ Mのドキソルピシンを添加したものを示す。例えば、Sample1がa、Sample2がab、Sample3がbの場合、Sample1とSample2、Sample2とSample3には有意な差が無いことを示し、Sample1とSample3では有意な差があることを示す。

[0093] 図20（ATG7 WT）より、生成水素水と抗癌剤ドキソルピシンの併用（HW + DOX）では、生成水素水の溶存水素濃度の増加に従って、細胞増殖を抑制するから、ドキソルピシンの細胞増殖抑制効果を増強することが確認された。一方、図21（ATG7 KO）より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によって、生成水素水と抗癌剤ドキソルピシンの併用によるドキソルピシンの細胞増殖抑制効果が得られないことが確認された。

[0094] (6-4) まとめ

上記(6-1)～(6-3)の結果をふまえて考慮すると、電解水素水によるドキソルビシンの抗癌効果(細胞増殖抑制効果・アポトーシス誘導)増強に寄与する物質(作用分子)は溶存する分子状水素であり、分子状水素がオートファジーを抑制することで、癌細胞の細胞増殖を抑制していることが確認された。

[0095] <7. 他の細胞を用いた、GFP/RFP比によるオートファジー活性の解析>

GFP-LC3-RFP probeを発現するヒト大腸癌細胞(以下「HCT116細胞」という)を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養(前培養)した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、4時間培養した。その後、上記(2-3)と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図22に示す。

[0096] なお、図22において、

- ・FW: 上記<電解水素水の処理用培地(電解水素水培地)の作製>にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM(浄水培地)、
- ・EHW: 溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM(電解水素水培地)を示す。

[0097] 図22より、ヒト大腸癌由来のHCT116細胞において、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞(図4)と同様に、電解水素水(EHW)では浄水(FW)に比して、GFP/RFP比が増加するから、電解水素水はオートファジーを抑制した。

[0098] <8. 他の抗癌剤のオートファジー活性化の解析と抗癌効果の検証>

他の抗癌剤としてパクリタキセル又はフルオロウラシルはオートファジーを活性化するかどうか、オートファジーの活性化が抗癌効果に影響するかどうかについて検証を行った。

[0099] (8-1) GFP-LC3-RFP-LC3ΔG probeを利用したGFP/RFP比によるパクリタキセルのオートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP-LC3 $\Delta$ G probeを発現するHeLa細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1, 5又は10nM）のパクリタキセル（Paclitaxel、Sigma-Aldrich Co., LLC.）を含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、上記（2－3）と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図23に示す。

[0100] 図23より、パクリタキセルは、ドキソルビシン（図5）と同様に、濃度が高くなるほど、電解水素水とは反対に（図4、図22等参照）、GFP/RFP比が減少するから、オートファジーを活性化作用（オートファジー活性化作用）を有すると考えられる。この結果より、パクリタキセルでは、ドキソルビシンと同様に、オートファジー活性化が抗癌効果を減衰させると予測される。

[0101] （8－2）細胞増殖抑制効果の検証

HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を96-well plateに $1.0 \times 10^4$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1, 10又は50nM）のパクリタキセルを含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10 $\mu$ L加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図24に示す。

[0102] 図24より、ATG7 WTとATG7 KOとの比較より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によってパクリタキセルの抗癌効果（細胞増殖抑制効果）が濃度に比例して増強することが確認された。

[0103] （8－3）GFP-LC3-RFP probeを利用したGFP/RFP比によるフルオロウラシルのオートファジー活性の解析

GFP-LC3-RFP probeを発現するHCT116細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/

wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、所定濃度（1又は10 μM）のフルオロウラシル（Fluorouracil、5-FU、Sigma-Aldrich Co., LLC.）を含有する抗癌剤を添加したDMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、上記（2－3）と同様にして、細胞を剥離懸濁し、フローサイトメトリーにてGFPとRFPの蛍光強度を解析した。GFP/RFP比を求めることで、オートファジー活性の定量解析を行った。その結果を図25に示す。

[0104] 図25より、フルオロウラシルは、ドキソルビシン（図5）と同様に、濃度が高くなるほど、電解水素水とは反対に（図22参照）、GFP/RFP比が減少するから、オートファジーを活性化作用（オートファジー活性化作用）を有すると考えられる。この結果より、フルオロウラシルでは、ドキソルビシンと同様に、オートファジー活性化が抗癌効果を減衰させると予測される。

[0105] <9. 電解水素水と抗癌剤パクリタキセル又はフルオロウラシルとの併用による抗癌効果増強の検証>

（9－1）細胞増殖抑制効果の検証1

電解水素水と抗癌剤パクリタキセルの併用（抗癌剤キット）は、ヒト子宮頸癌由来のHeLa細胞に対する抗癌効果を増強するかどうかについて検証を行った。

[0106] HeLa細胞（ATG7 WT）又はHeLa細胞においてATG7（オートファジー関連遺伝子）を欠損させた細胞（ATG7 KO）を96-well plateに1.0×10<sup>4</sup> cells/wellで播種し、DMEM中にて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10 μL加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図26（ATG7 WT）及び27（ATG7 KO）に示す。

[0107] なお、図26及び27において、

・FW：上記<電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製>にて、浄

水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）に所定濃度（1, 10又は50nM）のパクリタキセルを添加したもの、

・ EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）に所定濃度のパクリタキセルを添加したものを示す。

[0108] 図26（ATG7 WT）より、電解水素水とパクリタキセルの併用は、パクリタキセルの細胞増殖抑制効果を増強することが確認された。一方、図27（ATG7 K0）より、ATG7（オートファジー関連遺伝子）の欠損によって、上記併用による増強効果が消失することが確認された。

[0109] （9－2）細胞増殖抑制効果の検証2

電解水素水と抗癌剤フルオロウラシルの併用（抗癌剤キット）は、ヒト大腸癌由来のHCT116細胞に対する抗癌効果を増強するかどうかについて検証を行った。

[0110] HCT116細胞を12-well plateに $1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、DMEMにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で24時間培養（前培養）した。前培養後、以下に示す各種DMEMに培地交換し、24時間培養した。その後、Cell Counting Kit-8（Dojindo, CK04）溶液を各wellに10μL加え、2時間、37℃でインキュベートし、420 nmの吸光度を測定した。その結果を図28に示す。

[0111] なお、図28において、

・ FW：上記＜電解水素水の処理用培地（電解水素水培地）の作製＞にて、浄水のみで希釈した、浄水を含むDMEM（浄水培地）に所定濃度（1, 5又は10μM）のフルオロウラシルを添加したもの、

・ EHW：溶存水素濃度レベル4の電解水素水を含むDMEM（電解水素水培地）に所定濃度のフルオロウラシルを添加したものを示す。

[0112] 図28より、電解水素水とフルオロウラシルの併用は、フルオロウラシルの細胞増殖抑制効果を増強することが確認された。

[0113] 上記（9－1）～（9－2）の結果をふまえて考慮すると、上記2種の抗癌剤キットは、電解水素水によるパクリタキセルやフルオロウラシル等の抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、抗癌効果を増強するこ

とが期待される。

#### 産業上の利用可能性

[0114] 本発明の活用例としては、抗癌剤作用増強物質と抗癌剤とを備える抗癌剤キットが挙げられる。

### 請求の範囲

- [請求項1]        オートファジー抑制活性を有し、抗癌剤作用増強物質として分子状水素を含有する抗癌作用増強剤と抗癌剤とを備える抗癌剤キットであって、
- 前記抗癌剤の基準有効成分濃度（ $1\ \mu\text{M}$ ）に対する前記分子状水素の濃度が $105\ \text{ppb}$ 以上 $2160\ \text{ppb}$ 以下であり、
- 適用対象となる癌細胞は、前記分子状水素によってオートファジーが抑制されるヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞及びヒト大腸癌由来HCT116細胞からなる群より選択される少なくとも一種であり、
- 前記抗癌作用増強剤は、電解水素水であり、
- 前記抗癌剤は、オートファジー活性化作用を有するドキソルビシン、ボスチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ、ニロテニブ及びフルオロウラシルからなる群より選択される少なくとも一種を有効成分として含有し、
- 前記分子状水素が前記抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、前記抗癌剤の抗癌効果を増強することを特徴とする抗癌剤キット。
- [請求項2]        但し、前記適用対象となる癌細胞が結腸癌細胞であり、且つ、前記抗癌剤がフルオロウラシルを有効成分として含有する抗癌剤キットを除くことを特徴とする請求項1に記載の抗癌剤キット。
- [請求項3]        オートファジー抑制活性を有し、抗癌剤作用増強物質として分子状水素を含有する抗癌作用増強剤と抗癌剤とを備える抗癌剤キットであって、
- 前記抗癌剤の基準有効成分濃度（ $1\ \mu\text{M}$ ）に対する前記分子状水素の濃度が $105\ \text{ppb}$ 以上 $2160\ \text{ppb}$ 以下であり、
- 適用対象となる癌細胞は、前記分子状水素によってオートファジー

が抑制されるヒト子宮頸癌由来HeLa細胞、ヒト結腸癌由来Caco-2細胞及びヒト大腸癌由来HCT116細胞からなる群より選択される少なくとも一種であり、

前記抗癌作用増強剤は、電解水素水であり、

前記抗癌剤は、オートファジー活性化作用を有するドキソルビシン、ボスチニブ、ポナチニブ、シスプラチン、ビンクリスチン、パクリタキセル、ダサチニブ、ボサチニブ及びニロテニブからなる群より選択される少なくとも一種を有効成分として含有し、

前記分子状水素が前記抗癌剤のオートファジー活性化作用を抑制することで、前記抗癌剤の抗癌効果を増強することを特徴とする抗癌剤キット。

[請求項4] 前記抗癌剤の有効成分濃度が $0.5 \mu\text{M}$ 以上 $10 \mu\text{M}$ 以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の抗癌剤キット。

[請求項5] 前記抗癌剤の有効成分濃度が $0.5 \mu\text{M}$ 以上 $10 \mu\text{M}$ 以下であり、前記分子状水素の濃度が $1056 \text{ ppb}$ 以上 $1080 \text{ ppb}$ 以下であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の抗癌剤キット。

[請求項6] 前記適用対象となる癌細胞が前記ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞の場合、前記抗癌剤の有効成分濃度は $0.5 \mu\text{M}$ ～ $2 \mu\text{M}$ であり、  
前記適用対象となる癌細胞が前記ヒト結腸癌由来Caco-2細胞の場合、前記抗癌剤の有効成分濃度は $1 \mu\text{M}$ ～ $4 \mu\text{M}$ であり、  
前記適用対象となる癌細胞が前記ヒト大腸癌由来HCT116細胞の場合、前記抗癌剤の有効成分濃度は $1 \mu\text{M}$ ～ $10 \mu\text{M}$ であることを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の抗癌剤キット。