

氏名	近藤靖浩
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第1303号
学位授与の日付	2022年9月29日
学位論文題名	Antitumor effect of polyphyllin D on liver metastases of neuroblastoma 「神経芽腫肝転移腫瘍に対するpolyphyllin Dの抗腫瘍効果について」 Pediatric Surgery International. 2022;38:1157-1163
指導教授	鈴木達也
論文審査委員	主査 教授 吉川哲史 副査 教授 守瀬善一 教授 塚本徹哉

論文内容の要旨

【目的】

神経芽腫は難治性で小児固形腫瘍において最も多い腫瘍である。高リスク群では5年生存率は50%以下と報告され、肝臓や骨やリンパ節などへの転移が主な問題点として存在する。我々は以前*Paris polyphylla*という漢方薬の主成分であるpolyphyllin Dがヒト神経芽腫培養細胞株に対し*in vitro*において、アポトーシスやネクロトーシスの経路による抗腫瘍効果を持つことを報告した。本研究の目的は神経芽腫の Maus 腫瘍モデルを作成し、それに対するpolyphyllin Dの抗腫瘍効果を評価することである。

【方法】

ヒト神経芽腫培養細胞株のIMR-32、LA-N-2、NB-69の3種類をBALB/c nudeマウスとBALB/c *Rag-2/Jak3* double-deficient (BRJ) マウスへ投与し皮下腫瘍、腹腔内腫瘍、肝転移腫瘍モデルを作成できるか検討した。

IMR-32を尾静脈投与し作成した肝転移腫瘍モデルを用いてpolyphyllin Dの効果を評価することとし、PBS投与群とpolyphyllin D投与群に分けて肝転移腫瘍の数や面積、マウスや肝の重量、核分裂像数、Ki-67やcaspase 3の陽性細胞数を測定し評価した。

【結果】

BALB/c nudeマウスへIMR-32とLA-N-2を投与し皮下腫瘍モデルを作成できたが、NB-69の投与では皮下腫瘍は形成されなかった。3種類のヒト神経芽腫培養細胞株をBRJマウスへ投与し、腹腔内投与により腹腔内腫瘍を、尾静脈投与により肝転移腫瘍モデルを作成できた。IMR-32とLA-N-2の尾静脈投与モデルにおいては肝腫瘍のほかに、肺や腎臓や膵臓に転移腫瘍を認めた。

IMR-32肝転移腫瘍モデルにおいて検討すると、polyphyllin D投与群は腫瘍数や腫瘍面

積や肝重量やcaspase 3陽性細胞数においてPBS投与群と比較し有意に低くなっていた ($p = 0.016, 0.020, 0.019, 0.043$)。マウス重量や肝転移腫瘍の核分裂像数やKi-67陽性細胞数においては両群で有意差を認めなかった。

【考察】

BRJマウスにおいて腹腔内腫瘍と肝転移腫瘍が3種類のヒト神経芽腫培養細胞株で形成された。一方でBALB/c nudeマウスにおいては、皮下腫瘍はIMR-32とLA-N-2にて形成されたが、腹腔内腫瘍や肝転移腫瘍の形成を認めなかった。BRJマウスはBALB/c nudeマウスと比較してNK細胞が欠損しているという特徴があり、2種類のマウスの免疫欠損の違いが影響しているものと考えられた。我々の今回作成した尾静脈投与モデルにおいては肝腫瘍だけではなく、肺や腎臓や膵臓へも転移を認めており、神経芽腫の様々な臓器へ転移する特徴を示したモデルとなっていた。

IMR-32肝転移腫瘍モデルにおいてpolyphyllin D投与群は腫瘍数や腫瘍面積や肝重量がPBS群と比較して有意に低くなっており、本研究で初めて抗腫瘍効果を持つことを示した。Polyphyllin Dは腫瘍数と腫瘍面積のどちらも抑制することから、肝腫瘍の生着と増殖のどちらにも抑制効果を持つ可能性があると考えられた。

また我々は以前の*in vitro*の報告でpolyphyllin DはIMR-32をアポトーシスではなくネクロトーシスの経路で抗腫瘍効果を持つことを報告した。本研究においてはcaspase 3陽性細胞数がpolyphyllin D投与群において有意に低くなっていることより、*in vivo*においてもアポトーシスよりもネクロトーシスが起きている可能性を示唆している。

【結語】

我々はヒト神経芽腫培養細胞株を用いて皮下腫瘍、腹腔内腫瘍、肝転移腫瘍のマウスモデルを作成できた。さらにpolyphyllin Dが初めて*in vivo*において神経芽腫肝転移腫瘍に対し抗腫瘍効果を持つことを証明した。腫瘍抑制の作用機序についてはさらなる検討が今後必要である。

論文審査結果の要旨

3種類の神経芽腫培養細胞株をBALB/c nudeマウスとBALB/c *Rag-2/Jak3* double-deficient (BRJ) マウスへ投与し肝転移腫瘍モデルを作成し、*in-vivo*でのpolyphyllin Dの抗腫瘍効果を評価した研究である。IMR-32、LA-N-2、NB-69の3種類の神経芽腫細胞株を、皮下、腹腔内、尾静脈投与した初期検討で、IMR-32株をBMJマウス尾静脈投与することで、適切な肝転移腫瘍モデルの構築に成功した。このモデルを用いてpolyphyllin Dの抗腫瘍効果を解析した結果、polyphyllin D投与群はPBS投与群と比較し肝重量が有意に低下し ($p=0.019$)、腫瘍数 ($p = 0.016$)、腫瘍面積 ($p=0.020$) も有意に低下していた。また、caspase 3陽性細胞数についても有意に低下していた ($p=0.043$)。しかしながら、マウス重量や肝転移腫瘍の核分裂像数、Ki-67陽性細胞数においては両群で有意差を認めなかった。以上から、本研究は、小児固形腫瘍の中では重要性の高い神経芽腫のマウス肝転移モデルを作製し、当該研究室の先行研究で*in-vitro*での腫瘍活性を認めていたpolyphyllin Dの抗腫瘍活性を*in-vivo*でも証明した重要な研究成果と考えられる。審査委員会での質疑応答も的確になされたことから、博士論文として十分に値すると判断した。