

ヒト神経芽腫細胞株に対するセファランチンの抗腫瘍効果の検討

藤田医科大学大学院 医学研究科
小児外科学（指導教授：鈴木達也）

土屋 智 寛

I. 背 景

神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で脳腫瘍に次いで2番目に多く発生する固形腫瘍で、本邦での年間当たりの新規発症数は150-200人程度、出生約7,000人に1人に発生するとされる¹。

神経堤由来の細胞を起源とし交感神経-副腎系譜の細胞ががん化したものと考えられており¹、交感神経節や副腎髄質などから発生し、約80%は腹部で約20%は後縦隔で発生する。5歳未満の小児に多く見られ、18か月未満の小児での発生例は予後が良いとされている。

画像診断では超音波やCT、MRI検査で顆粒状の石灰化像を認めるほか、遠隔転移の検索には¹²³I-MIBGシンチグラフィや骨転移の検索に使われる^{99m}Tc-MDP骨シンチグラフィなどが有用である。

診断時の画像診断に基づいて、遠隔転移の有無や腫瘍と大血管及び主要臓器との位置関係を基にINRGSS (International Neuroblastoma Risk Group staging system) 病期分類で術前のリスク分類を行う。

神経芽腫症例の予後因子はINRGSSによる病期と月齢、病理、MYCN遺伝子増幅、11番染色体長腕の欠損、DNA ploidy (2倍体、4倍体)などを用い評価される。治療方針の決定のためこの予後因子を用いたINRG (International Neuroblastoma Risk Group) 病期分類を用いる。予後因子を評価した後にINRG病期分類を用い超低リスク、低リスク、中間リスク、高リスクに分類される。治療は前述のリスクグループ分類に従い、手術による腫瘍摘出と化学療法および放射線療法を組み合わせる。超低リスク群では神経芽腫が分化して自然縮小するため、摘出手術すら不要で経過観察のみでよい症例もある。一方高リスク群の治療は集学的治療が必要となり、手術に加えて多剤併用療法による化学療法が中心となるが、高リスク群の無イベント生存率 (FES: event-free survival) は、50%以下と予後不良である。

一方近年の研究では、様々な生薬に抗腫瘍効果があ

ることが報告されている。われわれも、ユリ科の多年草である七葉一枝花 (*Paris polyphylla*) の主成分である Polyphyllin D がヒト神経芽腫細胞株に対して抗腫瘍効果を持つことを以前に報告した²。さらに MYCN 遺伝子増幅を認めない細胞株ではアポトーシスが惹起され、MYCN 遺伝子増幅を認める細胞株ではネクロトーシスが惹起されたと考えられる結果を得た。しかしながら生薬由来の成分である Polyphyllin D は、現在本邦において通常臨床現場で使用可能な製剤の形では流通しておらず、ヒトへの安全性や副作用などは正確には分かっていない。したがってヒトへの臨床応用という点で考えると、現在臨床現場で製剤としてすでに使用されている薬剤の生薬由来成分についてのヒト神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討は、我々が行ってきた先行研究の成果を発展させ、臨床応用に近づけるため意義のある研究になると考えた。

II. 目 的

いまだに神経芽腫の中間リスク群ですら予後良好とはいいがたく、高リスク群では無再発生存率は50%以下と予後は不良である。これらの群の治療の中心である多剤併用化学療法に加えて、一般的に副作用の少ないとされる生薬由来の成分である薬剤の使用が可能となれば、神経芽腫に対する治療の一助となる可能性がある。そこで、すでにわれわれが報告している実験方法を用いて、ヒト神経芽腫細胞株に対して抗腫瘍効果を示す市販薬の生薬成分を見出すことを本研究の目的とした。

III. 対象と方法

1. 市販されている生薬成分を含む薬剤の選定

1) 選定理由

セファランチン (Cepharanthine) は、ツヅラフジ科の植物のタマザキツヅラフジの根の主要成分である。1934年に近藤平三郎によりツヅラフジより抽出分離され、1942年に医薬品として承認された。タマザキツ

ラフジの根から抽出されるアルカロイドは主に4成分であり、セファランチン、イソテトランドリン(Isotetrandrine)、シクレアニン(Cycleanine)、ベルバミン(Berberamine)である。セファランチンは当初は抗結核薬として使用されていた歴史のある薬剤であるが、現在はマムシ咬傷や円形脱毛症、放射線による白血球減少症、滲出性中耳カタルに対して保険適応があり臨床で使用されている。

本薬剤の副作用としては、過敏症として発疹や皮疹、浮腫、消化器症状としては悪心や嘔吐、食欲不振、胃部不快感、下痢、肝臓ではAST(GOT)、ALT(GPT)の上昇、内分泌では月経異常、その他では注射部位の疼痛や血管痛、発熱、頭痛、めまい、搔痒感などがある。重大な副作用としてはアナフィラキシーがある。しかしこれらの副作用はどれも頻度不明とされており、比較的副作用が起りにくく使用しやすい薬剤である。

また、近年ではセファランチンが白血病や乳がんに対して抗腫瘍効果を持つ事が報告され、その作用機序も明らかになってきている^{3,4}。

一方、勿論小児の固形腫瘍及び神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討はいまだになされていない。そこで、本研究の抗腫瘍効果を検証する薬剤としてセファランチンを選定した。

2) セファランチンの調整

セファランチンは分子量606.71、化学名は6',12'-Dimethoxy-2,2'-dimethyl-6,7-[methylenebis(oxy)]oxyacanthan、分子式は $C_{37}H_{38}N_2O_6$ のアルカロイドである(図1)。(cayman chemical company社、アメリカ) 薬剤はジメチルスルホキシド(DMSO: Dimethyl sulfoxide)で溶解したものを使用し、使用薬剤のDMSOの濃度は0.5%以下になるように調整を行った。

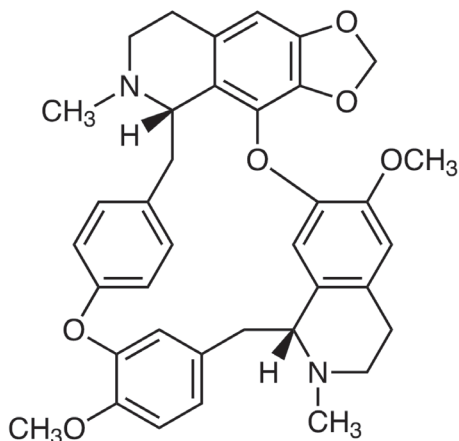


図1 Cepharanthineの構造式

2. ヒト神経芽腫細胞株

1) ヒト神経芽腫細胞株の選定

我々が以前報告したPolyphyllin Dの神経芽腫細胞株における抗腫瘍効果の検討では、*MYCN* 遺伝子増幅のある神経芽腫細胞株としてIMR-32とLA-N-2を、*MYCN* 遺伝子増幅のない神経芽腫細胞株としてNB-69を使用した。MTS assay(Methyl Thio - Sulfanate assay)で細胞生存率を検討したところIMR-32は25 μ M、LA-N-2は20 μ M、NB-69は5 μ MでIC₅₀を示す結果であった。加えてPolyphyllin Dのヒト神経芽腫細胞株における抗腫瘍効果に関して、*MYCN* 遺伝子増幅を認めない細胞株ではアポトーシスが惹起され、*MYCN* 遺伝子増幅を認める細胞株ではネクローシスが惹起されたと考えられた。

今回、我々は代表的なヒト神経芽腫細胞株であり、重要な予後不良因子の一つである*MYCN* 遺伝子増幅のあるIMR-32を本研究に用いることとした。IMR-32は、生後13か月の白人男性に発生した腹部腫瘍から確立されたヒト神経芽腫細胞株である。培養物は小さな神経芽腫様細胞と大きなヒアリン繊維芽細胞の混合物で、形態学的に異なる2つ細胞が含まれる。(JCR細胞バンク、日本)。

2) 細胞培養

細胞は、10%のウシ胎児血清(FBS: Fetal Bovine Serum)、1%の非必須アミノ酸(DS Pharma Biomedical、日本)、および2mMグルタミンを100units/mLを添加したEagle's minimal essential medium(EMEM: DS Pharma Biomedical、日本)を用いて、37°C、湿度95%、CO₂濃度5%の暗所でインキュベートし培養した。

3. 抗腫瘍効果の判定方法

以前われわれが報告した方法と同様に培地に薬剤を添加し培養した後、Cell Counting Kit-8 assays(CCK-8)(Dojindo laboratories、日本)を使用して、細胞生存率について測定した。CCK-8は水溶性テトラゾリウム塩(WST-8)を投与し細胞内脱水素酵素により還元されることにより水溶性ホルマザンを生成し、これを450nmで吸光度測定を行うことで生細胞数を測定する方法である。

実際の方法は、IMR-32ヒト神経芽腫細胞株(1 \times 10⁴細胞/mL)を96ウェルプレートに播種し、37°CおよびCO₂濃度5%の環境下で24時間インキュベートし前培養を行った。細胞に下記の各種濃度に調整を行ったセファランチン(5, 10, 15, 20, 30 μ M)、またはvehicleを投与し24時間反応させた。次に、WST-8を加えたのちに細胞を2時間インキュベートした。マ

マイクロプレートリーダー (Benchmark, Bio-Rad 社, アメリカ) で 450nm の吸光度を測定することにより, 細胞の生存率を定量化した。

細胞生存率は対照として vehicle との比を使用し, 対照と比較したパーセンテージとして評価し, 50% 阻害濃度 (IC₅₀: half maximal (50%) inhibitory concentration) を算出した。

4. 抗腫瘍効果の作用機序の検討

近年の研究では, 様々な生薬由来の成分に抗腫瘍効果があることが報告されている。MYCN は多くの固形悪性腫瘍が関係する p53 に特異的に結合する。Fu-Jen Huang らはヒト神経芽細胞腫である IMR-32 が大黃の主成分であるエモジン (Emodin, 1,3,8-trihydroxy-6-methylanthraquinone) により p53 を介したプログラムされた細胞死であるアポトーシスが誘導されることを報告している⁵。

通常アポトーシスが起る際には細胞内に存在するプロカスペーゼという前駆体が切断を受けることによって, カスペーゼといったプロテアーゼの活性化を起こし, これらが細胞の自己破壊を起こす。アポトーシスを引き起こすカスペーゼ経路はカスペーゼ 9 が活性化される内因性経路とカスペーゼ 8 が活性化される外因性経路が知られている⁶。

内因性経路は BCL-2 (B-cell lymphoma-2) ファミリータンパクである BAK (Bcl-2 homologous antagonist/killer) および BAX (Bcl-2-associated X protein) のオリゴマー化より活性化し, ミトコンドリアからシトクロム C の放出を行う。シトクロム C は Apaf-1 (apoptotic peptidase activating factor 1) に結合し

ポトソームを形成しこれによりカスペーゼ 9 が活性化されエフェクターカスペーゼであるカスペーゼ 3/7 を活性化させる。

外因性経路は Fas リガンド, TNF (Tumor Necrosis Factor) などのデスリガンドと呼ばれる細胞外タンパク質が, それぞれに対する細胞膜上の受容体と結合することで作用しカスペーゼ 8 が活性化され, これによりカスペーゼ 3/7 が活性化される経路である (図 2)。

1) アポトーシス経路の検討

アポトーシス経路の検討を行うため, まず始めにカスペーゼ 3/7, 8, 9 活性を Caspase-Glo™ 3/7 assay kit, Caspase-Glo™ 8 および 9 assay kit (全て Promega, 日本) を使用して測定を行った。

CCK-8 により測定した IC₅₀ の濃度のセファランチン (7.5 μM) を細胞に投与した。IMR-32 細胞 (1 × 10⁴ 細胞/90 μl) を 96 ウェルプレートに播種し, 暗所, 37°C, 湿度 95%, CO₂ 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。細胞に IC₅₀ の濃度に調整したセファランチンまたは vehicle を 10 μl ずつ投与し, カスペーゼ 3/7 は 24 時間, カスペーゼ 8, 9 は 12 時間反応させて処理をした。次に, 100 μl の測定試薬を各ウェルに加え, 細胞を暗所, 37°C 条件下で 2 時間インキュベートし, Nivo s dispencer (PerkinElmer, アメリカ) を用いて発光度を測定した。

2) アポトーシスの確認

アポトーシスの証明のため, DNA Fragmentation Assay (TUNEL 法) を用いた。MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Direct (MEDICAL & BIOLOGICAL

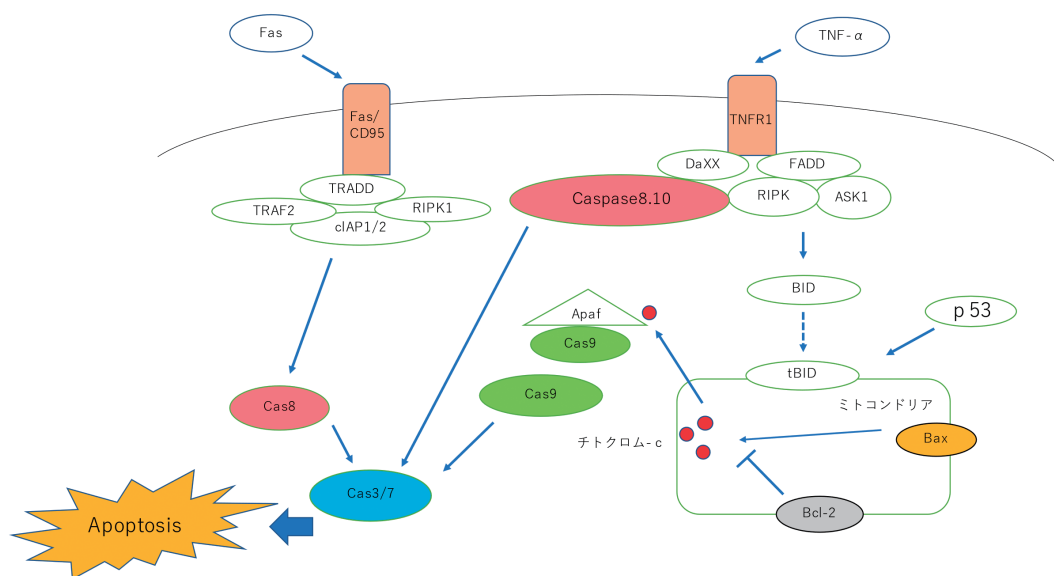


図 2 アポトーシスカスケード

LABORATORIES, 日本) を使用して, DNA の断片化を検出することで行った。

IMR-32 細胞 (2.0×10^5 細胞) を 6 ウェルプレートに播種し, 暗所, 37°C , 湿度 95%, CO_2 濃度 5% の条件下で 12 時間インキュベートした。細胞をセファランチン ($7.5 \mu\text{M}$) または vehicle で 12 時間反応させて処理し, PBS (0.2% ウシ血清アルブミンを含む) で洗浄し, 4% パラホルムアルデヒドで 30 分間, 4°C で固定した。細胞を PBS で洗浄した後, 70% エタノールで懸濁し, -20°C で 30 分間処理した。PBS で再度洗浄を行ったのちに, terminal deoxynucleotidyl transferase, dUTP-FITC, 緩衝液の混合物を加え, 37°C で 1 時間反応させた。

FITC を FL1 範囲で使用してフローサイトメトリー (Gallios : Beckman Coulter) によって蛍光標識された DNA 数を測定した。

5. 統計解析

Caspase 3/7, 8, 9 activity assay によるカスパーゼの活性化の評価にはスチューデント *t* 検定を用いた。データは平均 \pm 標準偏差 (mean \pm SD) で表した。統

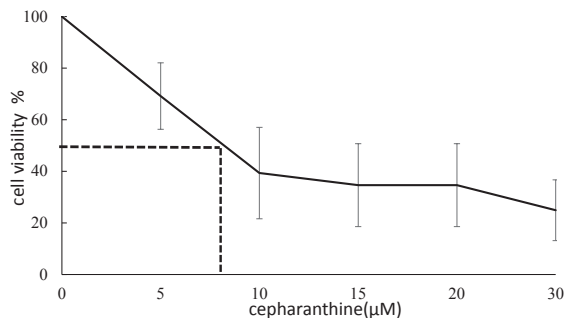


図3 ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 に対するセファランチンの細胞毒性
セファランチンの IC₅₀ は $7.5 \mu\text{M}$

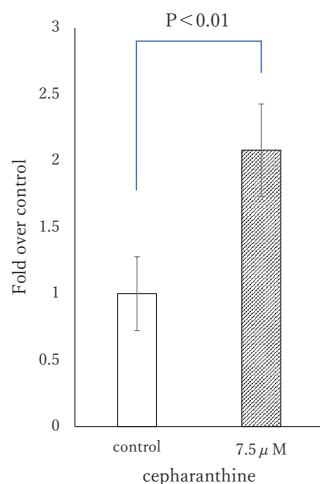


図4 ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 にセファランチン ($7.5 \mu\text{M}$) を 24 時間作用させたときの Caspase 3/7 活性

計解析は Microsoft Excel 2016 を使用した。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

IV. 結 果

1. セファランチンのヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 に対する抗腫瘍効果

MYCN 遺伝子増幅のあるヒト神経芽細胞腫である IMR-32 細胞にセファランチンおよび vehicle を加え培養し, CCK-8 により細胞生存率の評価を行った (図 3)。

セファランチンを 5, 10, 15, 20, $30 \mu\text{M}$ で濃度調整を行い投与し反応させ, IMR-32 の細胞生存率を評価した。上記各濃度のセファランチンを反応させたときの IMR-32 の細胞生存率は, $5 \mu\text{M}$ で $69.2 \pm 12.9\%$, $10 \mu\text{M}$ で $39.3 \pm 17.7\%$, $15 \mu\text{M}$ で $34.5 \pm 16.1\%$, $20 \mu\text{M}$ で $34.6 \pm 16.1\%$, $30 \mu\text{M}$ で $24.9 \pm 11.7\%$ であった。図 3 に示すように作用させたセファランチンにより濃度依存的に IMR-32 の cell-viability の低下を認め, セファランチンが IMR-32 に対して抗腫瘍効果を示すことが確認された。今検討では, セファランチンの IMR-32 に対する IC₅₀ は約 $7.5 \mu\text{M}$ であった。

2. セファランチンの IMR-32 に対する抗腫瘍効果の機序

1) カスパーゼ 3/7 の活性化の測定

セファランチンの抗腫瘍効果が以前の報告^{8,9)}と同様にアポトーシスを介するものであればカスパーゼによって調節されていると考えられる。そこで IC₅₀ である $7.5 \mu\text{M}$ のセファランチンを添加し培養した IMR-32 でカスパーゼ 3/7 の活性化の測定を行った。

結果はコントロール群 (1 ± 0.278), $7.5 \mu\text{M}$ 投与群 (2.08 ± 0.348) であり, セファランチン投与群でカスパーゼ 3/7 の活性化がみられた ($p < 0.01$) (図 4)。

この結果からセファランチンの細胞死は, アポトーシスを介した経路での細胞障害をきたしている可能性が考えられた。

2) カスパーゼ 8 及び 9 の活性化の測定

次にアポトーシス経路の詳細を検証するために Caspase-Glo™ 8, 9 Assay kit を用いてカスパーゼ 8 及びカスパーゼ 9 の活性化の測定を行った。

カスパーゼ 8 ではコントロール群 (1 ± 0.11) と比較しセファランチン群 (1.09 ± 0.1) との間には明らかな統計学的有意差は認めなかった (図 5) ($p = 0.10$)。

一方カスパーゼ 9 ではコントロール群 (1 ± 0.08) と比較しセファランチン投与群 (1.13 ± 0.11) では統計学的有意差を認め, セファランチン投与群でカスパーゼ 9 の活性化を示す結果であった ($p = 0.02$) (図 6)。

以上の結果より、ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 にセファランチンを加え培養した際に認められる細胞生存率の低下は、カスパーゼ 3/7 およびカスパーゼ 9 の活性化が認められる事から、内因性経路を介してアポトーシスが惹起されていることによると考えられた。

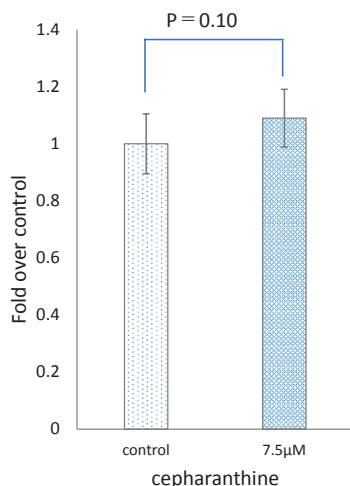


図5 ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 にセファランチン (7.5 μM) を 12 時間作用させたときのカスパーゼ 8 活性

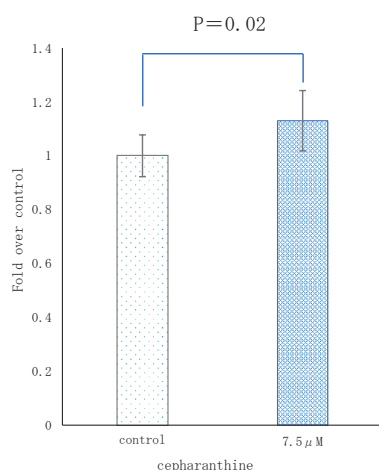


図6 ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 にセファランチン (7.5 μM) を 12 時間作用させたときのカスパーゼ 9 活性

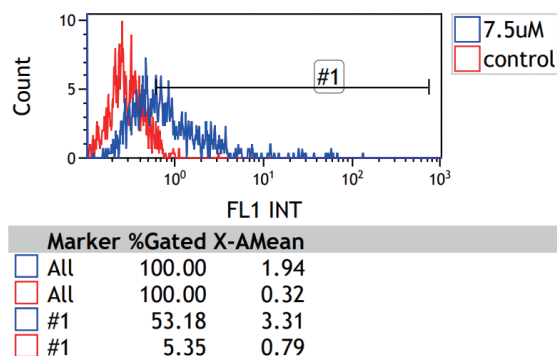


図7 ヒト神経芽腫細胞培養細胞株における TUNEL assay によるアポトーシスの検討

3) アポトーシスの確認

アポトーシスが起きていることの確認のため、TUNEL 法を用いたフローサイトメトリーによって、アポトーシスによる DNA の断片化を評価した。

コントロール群と比較してセファランチン群で FITC に蛍光を示す細胞数が多く、図 7 に示す様にフローサイトメトリーでセファランチンを作用させた細胞が右方にシフトしている所見を認め、DNA の断片化が示され、アポトーシスが起きていることが確認された (図 7)。

V. 考 察

小児がん全体において血液腫瘍である白血病が約 30% と最も多く認められる。次に脳腫瘍が約 15% であり、小児固形悪性腫瘍では一番多い。神経芽腫は小児がん全体では 7~8% を占め、小児固形悪性腫瘍の中では 2 番目に発生率が高く、小児外科領域の小児固形悪性腫瘍では最も重要なものである。

JCCG (Japan Children's Cancer Group, 日本小児がん研究グループ) 神経芽腫委員会によると、新生児の神経芽腫は 1901 年、Pepper により生後 4 週例の新生児における症例を含む 6 例報告「肝臓と副腎の先天性肉腫」が初めての報告であった。Robert Hutchinson が、副腎発生の腫瘍が、眼窩に転移させた 7 例を 1907 年に報告した。次第に 1 歳未満の児での発症は予後がよいことが明らかになり、1971 年に D'Angio により同腫瘍は自然縮小するという報告がされた¹⁰。

本邦では 1985~2004 年にかけて、神経芽腫の早期発見により適切な措置を講じることを目的とし、マススクリーニング検査を行った。これは生後 6, 7 ヶ月のすべての児を対象に尿によるスクリーニング検査を行うものであった。20 年間の調査で延べ 2,913 人の神経芽腫の患児を発見しスクリーニングが成果をもたらしたが、いくつかの問題点も指摘されるようになった。

1 歳未満の乳児期での発見は経過観察により自然縮小するため治療の必要性がないとされる症例が多数であるが、スクリーニングで発見されてしまうことにより本来必要のなかった化学療法が実施されてしまう可能性があった。また本来であれば自然縮小してしまうため、発見されることのなかった神経芽腫を発見することは保護者の不安を強めるだけの可能性があった。

一方本邦でのマススクリーニングによる調査開始の前後での比較で、1 歳以降に発症する神経芽腫の頻度や生存率に差を認めなかった。そのため 2005 年以降、神経芽腫はマススクリーニング検査から除外された。しかしながらこの本邦の生後 6, 7 ヶ月児の尿を用いたマススクリーニング事業により神経芽腫の自然経過や特徴が詳細に判明し多くの貴重な知見をもたらした。

診断にはこのマスマスクリーニングでも用いられた尿中バニリルマンデル酸 (VMA) やホモバニリン酸 (HVA) の測定が有用である。VMA や HVA はカテコールアミン (ドーパミン, ノルアドレナリン, アドレナリン) の代謝産物で神経芽腫に特異性が高く, 治療効果判定や再発の早期発見にも有用なマーカーである。また血液生化学検査所見ではNSE (neuron specific enolase) の上昇が特異的な所見であり, 進行症例ではフェリチン, LDH (lactate dehydrogenase) の高値を認める。

予後の指標としてはINRGSSと月齢, 病理, MYCN 遺伝子, 11 番染色体長腕の欠損, DNA ploidy などから治療前リスクグループを決定する。リスク因子の中でも MYCN 遺伝子増幅は神経芽細胞種の約30%で認め, 強力な予後不良因子である。

MYCN は Myc ファミリーのひとつであり転写因子をコードするがん原遺伝子である。Myc ファミリーは3つのヒト遺伝子があり, c-myc, l-myc, n-myc で構成されている。それ以外ではDNA ploidy も予後不良因子の一つであり, 予後良好な神経芽腫では異数倍体, 予後不良の神経芽腫としては2倍体, 4倍体を示す⁷。

リスクグループは4つに分けられ, 超低リスク, 低リスク, 中間リスク, 高リスクに分けられる。それぞれの無イベント生存率は, 超低リスクで85%以上, 低リスクで75%~85%, 中間リスクで50%~75%, 高リスクで50%以下といわれている¹。

なかでも MYCN 遺伝子増幅が認められる例では高リスクに分類され, 5年生存率は35%とされており予後不良であることが知られている²。

限局性の神経芽腫や低リスク群に対する外科療法では合併症なく摘出可能かどうかを肝要であり, 手術リスク因子であるIDRF (image-defined risk factor) の評価が重要である。

神経芽腫は後腹膜や後縦隔から発生するものが多数である腫瘍のため, 動静脈や周囲臓器を巻き込む形で増大, 進展することも多いことから術前のCT画像の読影が重要になる。特に血管系に関する判定が重要になり, 動脈管腔の半周以上の取り囲み, あるいは腫瘍圧迫により内腔の確認できない静脈がある際はIDRF陽性となる。IDRF陽性であれば無理な摘出術は行わず生検にとどめることが推奨されている¹。生検にて, 予後因子である MYCN 遺伝子, 11 番染色体長腕の異常, DNA ploidy などを検索し, リスクグループを決定し治療法を決定する。また, 手術後の微細残存病変や骨転移部へ局所療法として放射線治療を行うこともある。

超低リスク群では経過観察のみで自然縮小などもみ

られるが, 高リスク群では, 術前の化学療法, 摘出手術とそれに引き続き行われる化学療法など集学的治療が重要となる。化学療法は, ビンクリスチン, シクロホスファミド, イホスファミド, ドキソルビシン, ピラルビシン, シスプラチン, カルボプラスチン, エトポシドなどを中心に組み合わせた多剤併用療法で治療が行われるが, 前述のごとくいまだに予後不良な疾患である。

近年では13シス-レチノイン酸による分化誘導療法や, 抗GD2抗体 (ジヌツキシマブ)¹による免疫療法, MIBG内照射なども試みられている。

13シス-レチノイン酸による分化誘導療法は, もともと欧州や米国において重度の尋常性ざ瘡に高い推奨度で使用されている薬剤である。レチノイン酸はビタミンA誘導体であり神経芽腫に対して細胞増殖の抑制や未熟細胞の分化誘導, アポトーシスの誘導などを来たすとされているが, 明確な機序に関してはわかっていない¹¹。

神経芽腫に対しても造血幹細胞移植などを含んだ治療後の後治療として欧州などで承認, 使用されている。しかしながら副作用として妊娠への影響 (先天性奇形, 流産, 胎児死亡, 早期出産) や精神疾患 (うつ病, 自殺企図, 焦燥, 暴力行為) や頭痛, 視界不良, めまい, 嘔吐, 痙攣発作, 皮膚障害, 嚥下障害, 下痢など多彩な副作用があることもあり本邦では未承認である。

抗GD2抗体は世界で初めて神経芽腫に特化して開発された薬剤で, 2010年に米国の小児がん研究グループから抗GD2抗体を使用することで約20%無イベント生存率が向上することが発表された¹²。13GD2は神経細胞などの表面に存在する糖脂質で, GD2にこの抗体が結合することで顆粒球やNK細胞が抗体のFc部分に結合し, 神経芽細胞を攻撃する。しかしながら, 抗GD2抗体の使用はさまざまな副作用を呈すことでも知られており, 発熱, 悪心, 咳嗽, 蕁麻疹, 過敏症を含むinfusion reaction (100%), 骨髄抑制 (93.8%), 疼痛 (81.3%), 電解質異常 (75.0%), 感染症 (43.8%), 眼障害 (37.5%), 低血圧 (12.5%) など認められるため, 新たな治療薬の開発が求められる。

MIBG内照射治療はβ線を放出する¹³¹I-MIBG (3-isodobenzylguanidine) を投与することで, ¹³¹I-MIBGが腫瘍細胞に集積することにより殺腫瘍効果を発揮する治療である。体内の全ての腫瘍細胞に取り込まれ病変の部位にかかわらず効果を発揮し, 有害事象も軽微で単回投与で効果があり, 患児の負担も少ない治療法である。

一方近年の研究では, 様々な生薬に抗腫瘍効果があることが報告されている。MYCNは多くの固形悪性腫瘍が関係するp53に特異的に結合する⁸。Fu-Jen Huang

らはヒト神経芽腫細胞株である IMR-32 が大黃の主成分であるエモジンにより p53 を介したプログラムされた細胞死であるアポトーシスが誘導されることを報告している⁵。エモジンはタデ科ダイオウ属のルバーブの根の主成分である。エモジンが ROS 生成を直接促進し細胞内に Ca 流入を引き起こすことで NO 産生を刺激する。これにより p21Waf/Cip1, または BAX を介してアポトーシスシグナル伝達の調整に関わる p53 の活性化を来とし、ミトコンドリア膜電位の変化に伴う Caspase9 の活性化を来す。Caspase9 の活性化により内因性経路によるアポトーシスを来すとされている。

また近年プログラムされた細胞死にはアポトーシス以外にも、ネクローシスやオートファジーを伴う細胞死が報告されており、それぞれ以下のような細胞死の形態学的特徴があるとされている。クロマチンが凝縮して細胞核の凝集、DNA の断片化を引き起こす細胞死がアポトーシス、ネクロシス型のプログラムされた細胞死で細胞内小器官や細胞質膜の膨化を形態上の特徴とした細胞死がネクローシスと定義され、細胞質内にオートファゴソームと呼ばれる小胞が形成され細胞核の萎縮が見られるが、断片化はあまり見られないオートファジーを伴う細胞死も報告されている。

以前われわれは、神経芽腫に対する新たな治療の可能性を求め、Polyphyllin D の神経芽腫細胞株における抗腫瘍効果の検討を行った²。Polyphyllin D は乳がんや肝臓がん、肺がんを含む多くの腫瘍に対して抗腫瘍効果が報告されていたが、神経芽腫に対しての報告はなかった。

MYCN 遺伝子増幅のある神経芽腫細胞株として IMR-32, LA-N-2, MYCN 遺伝子増幅のない NB-69 を使用し Polyphyllin D の抗腫瘍効果の判定を行った。MTS assay で細胞生存率を検討したところ、Polyphyllin D はそれぞれ IMR-32 では 25 μ M, LA-N-2 では 20 μ M, NB-69 では 5 μ M で IC₅₀ を示す抗腫瘍効果を認めた。

これらの細胞死の経路の検討を行うためにカスパーゼ 3/7, 8, 9 の活性の評価を行った。カスパーゼ活性の結果は NB-69 ではカスパーゼ 3/7 および 8 で活性化を示唆する結果を示したが、IMR-32, LA-N-2 ではカスパーゼの活性化を示さない結果であった。このことは NB69 が Polyphyllin D によりアポトーシスをきたしている可能性を示唆し、また IMR-32 および LA-N-2 はアポトーシス以外の細胞死の経路をたどったことを示した。続いて外因性アポトーシスおよびネクローシスの経路にある RIPK1 の阻害剤であるネクロスタチン 1 を投与し MTS アッセイを行うと、すべての細胞で細胞死を認めなかった。ネクローシスの経路

では RIPK1 のリン酸化に引き続いておこる RIPK3 のリン酸化により、MLKL のリン酸化をきたしネクローシスをきたす。そのため RIPK3 の阻害剤である Necrosulfonamide を添加し MTS アッセイを実施したところ、IMR-32 および LA-N-2 では細胞死の抑制効果を認め、NB-69 では細胞死の抑制効果を認めなかった。

上記より Polyphyllin D の神経芽腫細胞株における抗腫瘍効果に関して、MYCN 遺伝子増幅を認めない細胞株ではアポトーシスが惹起され、増幅を認める細胞株ではネクローシスが惹起されたと考えられた。

しかしながら生薬由来の成分である Polyphyllin D は、現在本邦において製剤の形では流通していない。

神経芽腫はその約 80% が後腹膜を原発とする腫瘍であり無症状例が多く、腫瘍の増大による腹部膨満などで気づかれることが多く、診断時に約 70% の症例で骨や肝臓、皮膚、骨髄に転移巣を認める。これらの高リスク群では、前述の如く集学的治療を駆使しても予後は不良である。そこで、これらの症例の治療の中心となる多剤併用化学療法に加えて、一般的に副作用の少ないとされる生薬成分の薬剤の使用が可能となれば、神経芽腫に対する治療の一助となる可能性がある。

そこで、市販薬としてすでに臨床使用されているセファランチンを用いて、MYCN 遺伝子増幅を認めるヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 に対する抗腫瘍効果を検討することとし、CCK-8 にて生細胞数の測定を行った。セファランチンを 5, 10, 15, 20, 30 μ M で濃度調整を行い細胞生存率を評価したところ濃度依存的に cell-viability の低下を認め、セファランチンが IMR-32 に対して抗腫瘍効果を示すことが示された。今検討では、セファランチンの IMR-32 に対する IC₅₀ は約 7.5 μ M であった。以前我々が報告した Polyphyllin D の神経芽腫培養株に対する IC₅₀ は、IMR-32 に対して 25 μ M, LA-N-2 では 20 μ M, NB-69 では 5 μ M で、これらと比較してもほぼ同程度であった。

すなわち、我々はセファランチンによるヒト神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果をはじめで見出した。

セファランチンはマムシ咬傷や放射線による白血球減少、滲出性中耳カタル、などで使用される既存の薬剤であり、近年ではセファランチンの抗腫瘍効果について白血病や乳がんに対する有効での報告がされている^{3,4}。Jianghong Wu³ らはヒト T 細胞性白血病の細胞株である Jurkat 細胞株では低濃度 (1~5 μ M) で、慢性骨髄性白血病の細胞株である K562 細胞株はわずかに高い濃度 (5~10 μ M) でセファランチンによりアポトーシスが誘導され、両細胞でカスパーゼ 3, 9 の活性化を認め内因性経路によるアポトーシスを来しており、Jurkat 細胞ではカスパーゼ 8 の活性化も同時に

認めたと報告している。Sumei Gao⁴らはヒト乳がん細胞株である MCF-7 細胞株と MDA-MB-231 細胞株がセファランチンによりアポトーシスおよびオートファジーを誘導することにより細胞増殖阻害をきたすことを報告している⁸。

本研究でもセファランチンによる IMR-32 に対する細胞死の形態を評価するため、アポトーシスによる細胞死の可能性を検討した。

通常アポトーシスが起こる際には細胞内に存在するプロカパーゼという前駆体が切断を受けることによって、カパーゼといったプロテアーゼの活性化を起こし、これらが細胞の自己破壊を起こす。アポトーシスを引き起こすカパーゼ経路はカパーゼ9が活性化される内因性経路とカパーゼ8が活性化される外因性経路が知られている⁶。

内因性経路は BCL-2 ファミリータンパクである BAK および BAX のオリゴマー化より活性化し、ミトコンドリアからシトクロムCの放出を行う。シトクロムCは Apaf-1 に結合しアポトソームを形成しこれによりカパーゼ9が活性化されエフェクターカパーゼであるカパーゼ3/7を活性化させる。

外因性経路は Fas リガンド、TNF などのデスリガンドと呼ばれる細胞外タンパク質が、それぞれに対する細胞膜上の受容体と結合することで作用しカパーゼ8が活性化され、これによりカパーゼ3/7が活性化される経路である(図7)。

アポトーシスによる細胞死の経路は外因性、内因性ともにエフェクターカパーゼであるカパーゼ3/7の活性化を伴うことからまずアポトーシスのエフェクターカパーゼであるカパーゼ3/7の活性化を評価した。

本研究においてセファランチンを IMR-32 に対する IC₅₀ の濃度である 7.5 μ M 作用させると、アポトーシス経路のエフェクターカパーゼであるカパーゼ3/7の活性化を認めた。このことはセファランチンによる神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果にはアポトーシスの関与を示唆している可能性が考えられた。

次にアポトーシスの経路の確認のために内因性経路のイニシエーターであるカパーゼ9、および外因性経路のイニシエーターであるカパーゼ8の活性化について検討を行った。

Caspase 8, 9 activity assay を行ったところ、カパーゼ8では明らかな活性化を認めなかったが、カパーゼ9で vehicle と比較し有意な上昇を認め、カパーゼ9の活性化を示唆する結果であった。これはセファランチンが内因性経路を介したアポトーシスをきたしている可能性を示しているものと考えられた。

最後にアポトーシスが起きている検証として

TUNEL 法を用いて検証を行った。TUNEL 法によるアポトーシスの検出方法はアポトーシスをきたした細胞核内の DNA が断片化され、断片化された DNA の OH 基にターミナルトランスフェラーゼを用いフルオロセイン-dUTP で標識しフローサイトメトリーで検出する方法である。核の断片化をきたす細胞死であるアポトーシスの検出目的で使用されるポピュラーな方法である。

今研究での結果はコントロールと比較しセファランチン群で右側に変移をしていること示され、DNA の断片化を示唆する結果となり、アポトーシスをきたしていることが示唆された。

以上の結果より今回の我々の研究結果ではセファランチンは MYCN 遺伝子増幅をもつ神経芽腫細胞株の IMR-32 に対して、内因性経路を介するアポトーシスを惹起しているものと考えられた。

しかしながら本研究結果のカパーゼ9の結果は統計学的に有意差をもつものであったが、カパーゼ3/7の結果と比較すると活性化の程度に差がある結果であった。そのためカパーゼ3/7の活性化を来たすその他の経路がないか検討が必要と考えた。

近年報告されたプログラムされた細胞死に pyroptosis がある。Pyroptosis は炎症誘導性の細胞死であり炎症性カパーゼであるカパーゼ1, 4, 5, 11 に依存しておりエフェクター蛋白質である GSDMD の N 末端が細胞死に関わるとされている。Pyroptosis はその他の経路として ROS の刺激、あるいはカパーゼ3を介する内因性経路によりカパーゼ3が活性化され、下流に位置する GSDME (ガスダーミン E) が細胞膜に穴を開ける事により細胞死を来たすとされている。この炎症誘導性の細胞死は細胞の膨潤、膜のブレブ形成、DNA の断片化を来たすこととされている。このため pyroptosis は TUNEL assay で DNA の断片化を確認すると弱陽性を示すことがいわれている¹³。そのためカパーゼ1の活性化に伴う pyroptosis を来たしている可能性を検討するために、以下の追加の検討を行った。

検討方法は Caspase-Glo[®]1 Inframmasome assay (Promega, 日本) を用いて Caspase 3/7 assay の方法に準じた細胞播種及び12時間のセファランチン刺激を行った後に試薬を投与し90分反応させた後に発光度測定を行った。結果はコントロール群 (1 \pm 0.19) とセファランチン刺激群 (1.19 \pm 0.17) で比較し有意差を認めなかった ($p=0.12$) (図8)。これはセファランチンの刺激によりカパーゼ1の活性化を起こさないことが示されたと考えた。次に GSDME の出現を見るため、GSDME から分離する N 末端の抗体に標識してウェスタンブロットを用いてセファランチンの刺激に

よる出現を確認した。結果は明らかな検出を認めない結果であった。

上記の結果より現状 pyroptosis による細胞死の可能性は低く本研究での細胞死は Caspase9 による内因性経路に伴う細胞死のみで統計学的有意差を認めため、これによる細胞死を来たと考えた。

この結果は、Fu-Jen Huang らが示した大黃の主成分であるエモジンの IMR-32 に対する抗腫瘍効果がアポトーシスの誘導によるとする報告と合致する結果であった。一方、前述したわれわれの Polyphyllin D の抗腫瘍効果に対する検討では、MYCN 遺伝子増幅を認める IMR-32 ではアポトーシスではなくネクロトーシスが惹起されたと考えられた。すなわち、ヒト神経芽腫細胞株に対する生薬由来の成分の抗腫瘍効果を示す機序は、薬剤の種類によって異なる可能性が示唆された。今後さらなる他の生薬成分による抗腫瘍効果の検討、およびアポトーシス、ネクロトーシスだけではなく、様々な細胞死のメカニズムについての検討が必要であると考えた。

一方、セファランチンは前述のごとく内服薬および点滴製剤としてヒトへの臨床使用がされている薬剤で

ある。今回の神経芽腫細胞株を用いた実験の結果から換算すると、本実験の IC₅₀ は 7.5 μM であり、これモル濃度からグラム濃度に換算すると 4.55 μg/ml となる。

以前に Zan Chen¹⁴らはヒト骨肉腫細胞株である SaOS2 に対するセファランチンの抗腫瘍効果の検討を報告している。報告によればセファランチンで 48 時間反応させたのちに、抗腫瘍効果の検討には MTT assay を使用し濃度依存性に抗腫瘍効果を認める結果であり、IC₅₀ は 3.18 μM であった。また in vivo では腋窩に腫瘍を皮下注射したヌードマウスにセファランチンを 20mg/kg/day で腹腔内投与を行い、腫瘍重量の縮小効果を認め抗腫瘍効果を認める結果であった。

今回の研究での IC₅₀ は 7.5 μM であり、前述の研究の約 2.3 倍の投与量であることから考えると、マウスに必要な投与量は 46mg/kg/day になると考えられる。

マウスを 30g、ヒトを 60kg と仮定しこれをヒト等用量で換算すると、ヒトへの臨床用量は 3.739mg/kg/day であり、これは体重 10kg の小児例で換算すると約 37mg/day に換算される。成人におけるセファランチンの通常投与量は 10mg/日であり、10kg の小児例においても成人の通常投与量のも 3.7 倍もの投与量となった。この結果は細胞培養株に対する in vitro の検討結果であり、必ずしも生体内での濃度を反映しているわけではないが、常用量に比して大量の投与を必要とする可能性が高い結果と考えられた。

加えて今回の検討は in vitro の実験結果のみであり、マウスなどを用いた in vivo でのセファランチン単剤投与による効果、あるいは化学療法との併用による抗腫瘍効果などの検討が必要となると考えられる。

しかし、一方セファランチンは市販薬として使用されており、その常用量も設定されており、薬剤の血中濃度の推移や半減期、代謝経路、副作用などすでに既知の薬剤であり、人への臨床応用もしやすく今後の展望が期待されるものと考えられた。

様々な生薬成分の抗腫瘍効果が明らかとなってきており、本研究でも in vitro の結果ではあるがセファランチンの神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果が示された。神経芽腫の高リスク群、中間リスク群では、多剤併用化学療法が中心に行われるが、従来の化学療法と生薬成分を含む製剤を併用することで抗腫瘍効果が増強される可能性は十分に期待されると考えられる。

そのため、セファランチンの in vivo で神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討を行うため、われわれがマウスにおいて確立した神経芽腫細胞株肝転移モデルを用いた検討を行う予定である。また一方、セファランチン以外の抗腫瘍効果をもたらす生薬の検討のため、現在使用されている漢方製剤の抗腫瘍効果の検討を継続していくことにより、神経芽腫の長期成績の改

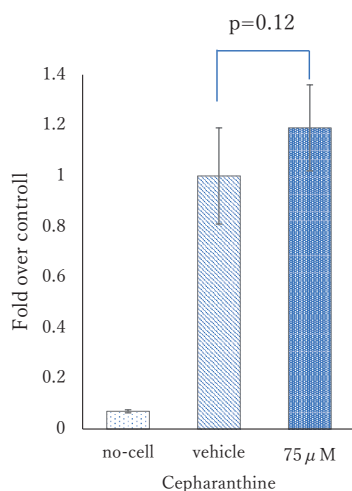


図8 ヒト神経芽腫細胞株 IMR-32 にセファランチン (7.5 μM) を 12 時間作用させたときのカスパーゼ 1 活性

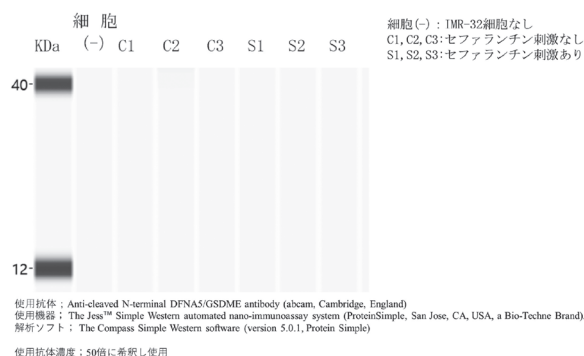


図9 GSDME-N 末端のウェスタンブロットによる検討

善に役立てていきたいと考える。

制 限

本研究で使用されたヒト神経芽腫細胞株は単一の MYCN (+) 神経芽腫細胞株であり、その他の MYCN (+) 細胞株や MYCN (-) 神経芽腫細胞株の検討をしていない。そのため既存の神経芽腫細胞株でも同様の調査をすることにより IMR-32 以外の LA-N-2 や NB-69 などの細胞株にも同様に抗腫瘍効果があるものなのか、抗腫瘍効果が認められた場合その作用機序はどういった細胞死のメカニズムなのかを検討する必要があり、さらなる研究の継続および追加が必要になる。

また本研究は神経芽腫細胞株の腫瘍細胞に対する効果のみで、生体内での薬剤の効果は検討していない。そこでわれわれがマウスにおいて確立した神経芽腫細胞株肝転移モデルを用い生体内におけるセファランチンの抗腫瘍効果を検討する必要性がある。

結 論

我々は、ツヅラフジ科の植物のタマザキツヅラフジの根の主要成分であるセファランチンが、ヒト由来の MYCN 遺伝子増幅のある神経芽腫細胞株である IMR-32 に対して抗腫瘍効果を示すことを初めて報告した。また本研究の結果からは in vitro でセファランチンはミトコンドリアを介した内因性アポトーシスによる抗腫瘍効果を示していることが考えられた。

すなわち本研究でセファランチンという現在製剤としてすでに臨床使用されている生薬成分に抗腫瘍効果がある可能性が見出された。従来の化学療法と生薬成分を含む製剤を併用することで抗腫瘍効果が増強される可能性は十分に期待される。この研究結果は、より臨床応用に近い生薬成分の発見という点でも意義深いものであると考える。

謝 辞

本研究の遂行に当たり、計画の構想から細胞培養、各種項目の測定方法の実際まで指導いただきました渡邊俊介博士に感謝を申し上げます。

また指導教授として、論文の校正等ご指導を頂きました小児外科学講座 鈴木達也教授に感謝を申し上げます。

文 献

- 1) 上野 滋, 仁尾正記, 奥本宏臣(編集): 標準小児外科学 第7版, 医学書院, 東京, 2017; pp.328-335.
- 2) Watanabe S, Suzuki T, Hara F, Yasui T, Uga N,

and Naoe A : Polyphyllin D, a steroidal saponin in Paris polyphylla, induces apoptosis and necroptosis cell death of neuroblastoma cells. *Pediatr. Surg. Int.* 2017 ; 33 : 731 - 719.

- 3) Wu J, Suzuki H, Zhou YW, Liu W, Yoshihara M, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Takeuchi K, Hossain K, Kurosawa M, and Nakashima I : Cepharanthine activates caspases and induces apoptosis in Jurkat and K562 human leukemia cell lines. *J. Cell. Biochem.* 2001 ; 82 : 200.
- 4) Gao S, Li X, Ding X, Qi W, and Yang Q : Cepharanthine Induces Autophagy, Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer Cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2017 ; 41(4) : 1633 - 1648.
- 5) Huang FJ, Hsuuw YD, and Chan WH : Characterization of Apoptosis Induced by Emodin and Related Regulatory Mechanisms in Human Neuroblastoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2013 ; 14 : 20139 - 20156.
- 6) Bertheloot D, Latz E, and Franklin BS : Necroptosis, pyroptosis and apoptosis : an intricate game of cell death. *Cell. Mol. Immunol.* 2021 May ; 18(5) : 1106 - 1121.
- 7) Vasudevan SA, Nuchtern JG, and Shohet JM : Gene profiling of high risk neuroblastoma. *World. J. Surg.* 2005, 29 : 317 - 324.
- 8) Chen L, Iraci N, Gherardi S, Gamble LD, Wood KM, Perini G, Lunec J, and Tweddle DA : p53 is a direct transcriptional target of MYCN in neuroblastoma. *Cancer Res.* 2010 Feb 15 ; 70(4) : 1377 - 1388.
- 9) D'Arcy MS : Cell death : a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* 2019 ; 43 : 582 - 592.
- 10) D'Angio GJ, Evans AE, and Koop CE : Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis. *Lancet.* 1971 May 22 ; 1(7708) : 1046 - 1049.
- 11) All trans retinoic acid and cancer. Siddikuzman, C Guruvayoorappan, V M Berlin Grace Immunopharmacol Immunotoxicol. 2011 Jun ; 33(2) : 241 - 249.
- 12) Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM : Children's Oncology Group. : Anti-GD2 antibody

- with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* 2010 Sep 30 ; 363(14) : 1324 – 1334.
- 13) Jiang M, Qi L, Li L, and Li Y : The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov.* 2020 : 6 : Article number : 112.
- 14) Chen Z, Huang C, Yang YL, Ding Y, Ou-Yang HQ, Zhang YY, and Xu M : Inhibition of the STAT3 signaling pathway is involved in the antitumor activity of cepharanthine in SaOS2 cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 2012 Jan : 33(1) : 101 – 108.