

氏名	土屋 智 寛
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第 1334 号
学位授与の日付	2023年3月12日
学位論文題名	「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」
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 山 田 成 樹

論文内容の要旨

【背景】

神経芽細胞腫は小児固形悪性腫瘍で2番目に多く、小児がん全体の7-8%を占める疾患である。リスクグループ分類で超低、低、中間、高リスクに分類され、高リスク群は予後が悪く、なかでもMYCN遺伝子増幅は強力な予後不良因子である。化学療法は多剤併用療法が基本となるが、高リスク群ではいまだに予後不良である。

【目的】

以前に我々はヒト神経芽腫細胞株に対して、Paris polyphyllaの主成分であるPolyphyllin Dのapoptosis、およびnecroptosisによる抗腫瘍効果について報告した。しかしながらPolyphyllin Dは現在本邦で製剤としての流通はなく、ヒトへの臨床応用が困難であると考えた。

タマツヅラフジの根の主成分であるセファランチン(Cepharanthine)はマムシ咬傷や円形脱毛症、放射線による白血球減少症に対して臨床で使用される生薬由来の薬剤である。近年の研究では白血病や乳がん等に対する抗腫瘍効果が報告されているが、神経芽細胞腫に対する抗腫瘍効果の報告はない。そこで今回、市販薬であり生薬由来の成分からなるセファランチンのヒト神経芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果解析を目的とした。

【方法】

細胞はIMR-32(MYCN 遺伝子増幅のあるヒト神経芽腫細胞株)を用いた。抗腫瘍効果の測定にはCell Counting Kit 8 assays(CCK-8)を使用し、各濃度調整を行ったセファランチンおよびvehicleを投与し細胞生存率を評価した。結果はmean ± SDで表記し、IC₅₀を測定した。細胞死の経路の確認のために、Caspase-Glo™3/7 assay kit、Caspase-Glo™8および9 assay kitを使用してCaspase-3/7、8、9活性を測定した。DNA Fragmentation Assay (TUNEL法)を用い、MEBSTAIN Apoptosis TUNEL Kit Directを使用して、DNAの断片化を確認することでapoptosisを検出した。統計解析はMicrosoft Excel 2016を使用

した。p値<0.05を統計学的有意とした。

【結果】

セファランチンを5、10、15、20、30 μMで濃度調整し細胞生存率を評価した結果、濃度依存的にcell-viabilityの低下を認めた。セファランチンのIMR-32に対するIC₅₀は約7.5 μMであった。

Caspase-3/7は、コントロール群(1±0.278)とセファランチン群(2.08±0.348)とを比較すると、セファランチン群で有意な上昇がみられた(p<0.01)。Caspase-8はコントロール群(1±0.11)とセファランチン群(1.09±0.1)間に明らかな有意差は認めなかった(p=0.10)。Caspase-9はコントロール群(1±0.08)と比較しセファランチン群(1.13±0.11)で有意な上昇を認めた(p=0.02)。

TUNEL法では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、フローサイトメトリーにて右方にシフトしている所見を認め、DNAの断片化が示された。

【考察】

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を検討した結果、細胞生存率の評価にてセファランチンの濃度依存的に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があることが確認された。

細胞死にはapoptosis、necroptosis、autophagyなど様々な経路がある。Apoptosisはcaspase-9を介する内因性経路、caspase-8を介する外因性経路を通じてエフェクターカスパーゼであるcaspase-3/7を活性化させapoptosisを引き起こし細胞死に至る。そのためcaspase-3/7の活性化をまず評価したところ、コントロール群と比較し有意な上昇を認めた。続いてcaspase-8、9の活性を評価したところ、caspase-9については有意な上昇を認めた。以上から、内因性経路を介したapoptosisが起きていると考えられた。

またTUNEL法を行うとDNAの断片化を示唆する結果が得られ、apoptosisを来たしていると考えられた。

【結語】

セファランチンがMYCN増幅のある神経芽腫細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことを初めて報告した。抗腫瘍効果は、内因性経路を介したapoptosisによるものであると考えられた。今後は生体内における抗腫瘍効果の検討を進める必要がある。

論文審査結果の要旨

生薬由来の成分であるセファランチンについて、ヒト神経芽細胞腫に対する抗腫瘍効果を*in vitro*で解析した研究である。MYCN遺伝子増幅のあるヒト神経芽腫細胞株であるIMR-32細胞を用いてcell-viabilityアッセイを行った結果、セファランチンは濃度依存的に殺細胞効果を示し、IMR-32に対するIC₅₀は約7.5 μMであった。さらにそのメカニズムを解析するためにTUNEL法で解析したところ、これらの細胞死はアポトーシスによることが明らかになった。さらにアポトーシス経路を明らかにするためにカスパーゼ活性を測定した結果、カスパーゼ3/7、9はセファランチン群で有意に活性が上昇していたが、カスパーゼ8の活性化は認められなかったことから、内因性経路を介したアポトーシスによるものと考えられた。よって、本研究はすでに市販されているセファランチンのヒト神経芽細胞腫に対する抗腫瘍効果を証明した初めての成績で臨床的意義は高いと考えられた。審査委員から質疑ならびに考察等についていくつかのsuggestionsがあったが、それらについての対応も的確になされたことから、本thesisは博士論文として十分に値すると判断した。また、Clinical noteとして掲載されている副論文は、議論の結果小児外科的には臨床的有用性は高いと考えられ、副論文として問題ないと判断した。