

氏名	直江 篤 樹
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	甲第 1210 号
学位授与の日付	2020年3月8日
学位論文題名	Arctigenin induces apoptosis in human hepatoblastoma cells 「Arctigeninのヒト肝芽腫細胞株に対する抗腫瘍効果の検討」 Pediatric Surgery International. 2019;35:723-728
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 杉 岡 篤 教授 鈴 木 元

論文内容の要旨

【緒言】

肝芽腫は小児悪性固形腫瘍の代表的疾患の1つで、現在も最も有効な治療法は腫瘍の外科的完全摘出である。しかし、初診時に摘出不能と判断される例や遠隔転移を有する症例においては、化学療法も重要な治療法である。化学療法としては、シスプラチンやアントラサイクリン系抗がん剤が第1選択薬とされているが、これらの薬剤に抵抗性を示す症例もあり、選択薬剤の多様性が治療成績の向上につながる可能性がある。一方、近年様々な漢方成分に抗腫瘍効果があることが報告されているが、いまだ肝芽腫に対し効果のある漢方成分の報告はない。牛蒡子の成分であるArctigeninは、肺癌や乳癌などの抗腫瘍効果も報告されていることから、肝芽腫に対する抗腫瘍効果も期待される。

【目的】

肝芽腫に対するArctigeninの抗腫瘍効果を、ヒト由来肝芽腫細胞株HuH-6 clone5(以下HuH-6)を使用し検証する。

【材料と方法】

ArctigeninはTocris Bioscience社の製品を使用し、ヒト肝芽腫細胞株はJCRB細胞バンクより提供されたHuH-6細胞を用いた。24時間培養したHuH-6細胞にArctigeninを添加後48時間培養し、MTS assayでcell viabilityを測定した。cell viabilityの測定にはBio-Rad社のBenchmarkを使用して吸光度を測定、vehicle添加細胞をコントロールとした際の比(%)として示した。アポトーシスの評価には、Caspase 3/7、8、9の活性をPerkin Elmer社のARVOを使用し測定した。また、初期アポトーシスの確認のため、Annexin V/PI染色によるフローサイトメトリー解析を行った。

統計学的解析にはJMP14(SAS Institute Inc. USA)を使用し、MTS assayにはDunnett

検定を、Caspase 3/7、8、9 activity assayにはStudent t-testを用い実施した。

【結果】

MTS assayの結果、Arctigeninの濃度が2 μ M以上では濃度依存的に有意なcell viabilityの低下を認め、IC50の値は4 μ Mであった。更に細胞死の詳細を検証するためにCaspase 3/7、8、9活性を測定したところ、Arctigenin添加細胞ではCaspase 3/7(P<0.01)、8(P<0.01)の有意な活性上昇を認めたが、Caspase 9の活性上昇は認めなかった。また細胞をAnnexin V/PI 染色後フローサイトメトリー解析を行った結果、Arctigenin添加細胞ではAnnexin V陽性細胞の増加が確認された。

【考察】

肝芽腫細胞株HuH-6細胞に対し、牛蒡子の成分であるArctigeninが濃度依存的に抗腫瘍効果を持つことを初めて発見した。フローサイトメーターを用いたAnnexin V/PI 発現解析の結果から、Arctigeninの抗腫瘍効果はアポトーシスにより発揮されていることが推測され、またアポトーシスに至る経路として、Caspase 8及びCaspase 3/7活性化が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

本研究ではHuH-6細胞一種類のみの検討で、今後他の肝芽腫細胞株でも効果を検討する必要がある。また将来の臨床応用を念頭に、Arctigeninが生体内でも抗腫瘍効果を示すか動物実験モデルを用いて検証する予定である。

【結語】

Arctigeninは肝芽腫細胞株であるHuH-6細胞に対し、アポトーシスを誘導することにより抗腫瘍効果を発揮する。

論文審査結果の要旨

小児固形腫瘍の代表的疾患である肝芽腫に対する化学療法の選択肢として、これまで漢方成分についての検討はなされていない。そこで本研究では、牛蒡子の成分であるArctigeninの抗腫瘍活性を、肝芽腫細胞株HuH-6細胞を用いて解析した。MTS assayの結果、Arctigeninの濃度が2 μ M以上では濃度依存的にcell viabilityが低下し、IC50値は4 μ Mであった。その後細胞死のメカニズムを検証するためにCaspase 3/7、8、9の活性測定を行ったところ、Arctigenin添加細胞ではCaspase 3/7(P<0.01)、8(P<0.01)の有意な活性上昇が認められたが、Caspase 9の活性上昇は認められなかった。さらに細胞をAnnexin V/PI 染色後フローサイトメトリー解析を行い、Arctigenin添加細胞ではAnnexin V陽性細胞が増加していることを見出した。以上の研究結果から、申請者は肝芽腫細胞株HuH-6細胞に対し、牛蒡子の成分であるArctigeninが濃度依存的に抗腫瘍効果を持つことを初めて見出し、またそのメカニズムとしてcaspase 8及びcaspase 3/7経路を介したアポトーシスによる可能性を示した。本研究は臨床的に極めて重要性の高い研究であり、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。