

令和元年6月7日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11355

研究課題名(和文) ヒト神経芽腫におけるDFATを用いた新規神経分化誘導療法の検討

研究課題名(英文) Examination of differentiation induction new therapy using DFAT in human neuroblastoma

研究代表者

金田 英秀 (KANEDA, Hide)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：30598967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト神経芽腫細胞をDFATと共培養を行うと、神経芽腫細胞の分化誘導が得られた。また、既存治療で使用されているレチノイン酸と比較検討を行うと、レチノイン酸単独よりも、レチノイン酸とDFAT培養上清を併用した方が、神経芽腫細胞の分化誘導が得られた。DFATと神経芽腫細胞を共培養する際にBDNF中和抗体を添加すると、神経芽腫細胞のさらなる分化誘導が得られ、DFATの培養上清にBDNF中和抗体を加えると、神経芽腫細胞の分化誘導は抑制されることから、神経芽腫細胞とDFATはBDNFを介するシグナル経路において相互作用をおよぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、DFATが分泌する液性因子は、神経芽腫細胞に対し直接的またはRAと協調的に作用し、分化誘導を促進することが新たに明らかになった。また、神経芽腫細胞の分化誘導に関わるDFATが分泌する液性因子の1つとしてBDNFの可能性が示唆された。

DFATは既存治療と併用することでさらなる治療効果の可能性を見出したことについて、社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Co-culture of neuroblastoma cells and DFAT induced differentiation of neuroblastoma cells. Treatment with retinoic acid and DFAT culture medium in combination resulted in induction of differentiation of neuroblastoma cells, rather than treatment with retinoic acid alone.

Addition of BDNF neutralizing antibody in neuroblastoma cells cultured with DFAT resulted in further differentiation induction of neuroblastoma cells. When addition of BDNF neutralizing antibody in neuroblastoma cells cultured with DFAT culture medium, differentiation induction of neuroblastoma cells is suppressed. It was suggested that factors secreted by DFAT may induce differentiation of neuroblastoma cells by a signaling pathway via BDNF.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 DFAT 分化誘導 BDNF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、胎生期の神経堤細胞が分化する過程で悪性化した、未分化な胎児性腫瘍である。一部の症例では、分化とアポトーシスによって自然退縮することが知られているが、高リスク群の神経芽腫では、手術療法・放射線療法・末梢血幹細胞移植併用大量化学療法などを組み合わせた集学的治療が行われているにもかかわらず、未だ予後不良である。また、完全寛解導入が困難で再発率も 50~60%と高いため、寛解導入療法後の維持療法も重要であると考えられる。

欧米では、高リスク群の神経芽腫に対して未分化な残存病変を良性転化させる目的で、維持療法として 13-*cis* retinoic acid (RA) を投与している。一方、13-*cis* RA を投与すると、3 年以内の死亡率を 35%減少させるが、5 年生存率は 50%未満であることが報告されており、より効果的な維持療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)は骨髄や脂肪組織などから容易に採取・分離できる未分化細胞であり、脂肪・骨・筋細胞など中胚葉系組織に分化する能力を持った細胞として、再生医療分野での応用が期待されている。MSC には、グリア細胞株由来神経栄養因子(Glial cell-line Derived Neurotrophic Factor: GDNF)、神経成長因子(Nerve Growth Factor: NGF)、脳由来神経栄養因子(Brain Derived Neurotrophic Factor: BDNF)など様々な神経栄養因子ファミリーが発現し、液性因子として機能している。腫瘍に対しては、MSC が腫瘍組織へ集積し p21 や Caspase3 を腫瘍細胞に発現させることでアポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果を持つことが報告されている。

当研究室では、脂肪組織から得られた DFAT を用いて、再生医療への寄与を目的に様々な研究を行ってきた。DFAT は脂肪由来幹細胞(Adipose derived Stem Cell: ASC)と同様に脂肪組織から単離される脱分化細胞である。また、MSC や ASC と表面マーカーのプロファイルの多くが一致していることから、DFAT は間葉系幹細胞として認識されている。ASC が平滑筋、血管、末梢神経などを含む雑多な細胞集団であるのに対し、DFAT は脂肪滴から作製されるモノクローナルな細胞であることを特徴としている。また DFAT は、MSC や ASC と同様に神経栄養因子の発現が高いことが報告されており、神経分化に対して促進的に機能する可能性が高い。

我々は、DFAT の幹細胞性と神経芽腫における分化誘導療法の機序に着目し、DFAT が神経芽腫に対して分化誘導活性を持つか否かを検討し、DFAT が分化誘導療法のツールとして利用できるかを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) DFAT の作製

日本大学医学部附属板橋病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得て、手術時に無菌的に採取した皮下脂肪組織を細切し、0.1%コラゲナーゼ溶液に入れ、37℃で1時間処理し、脂肪細胞を単離する。孔径 250 μm のフィルターで脂肪細胞を濾過し、低速遠心分離した後、最上層に浮遊した成熟脂肪細胞を採取する。フラスコ内で 37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件で天井培養し、その後継代培養を繰り返した細胞を DFAT として使用する。

#### (2) *In vitro* における神経芽腫細胞株に対する DFAT による分化誘導効果の検討

6well plate に神経芽腫細胞(SK-N-SH)を  $1.0 \times 10^5$  個/well 播種する。24 時間後に神経芽腫細胞株のみで培養する群(Control 群)とヒト DFAT と共培養する群(Co-culture 群)に分けて培養を開始し、7 日後に神経芽腫細胞の神経突起長を測定する。同日に、mRNA を回収し、Real-time RT-PCR 法を用いて、神経分化マーカーである *NF* と *Tub 3* の発現を確認する。

#### (3) *In vitro* における DFAT 培養上清による神経芽腫細胞の分化誘導を RA と比較検討

6well plate に神経芽腫細胞を  $1.0 \times 10^5$  個/well 播種する。24 時間後に Control 群、DFAT 培養上清単独添加群(CM 群)、RA 単独添加群(RA 群)、RA と DFAT 培養上清併用群(RA+CM 群)に分けて培養を開始し、7 日後に神経芽腫細胞の神経突起長を測定する。同日に、mRNA を回収し、Real-time RT-PCR 法を用いて、神経分化マーカーである *NF* と *Tub 3* の発現を確認する。

DFAT の培養上清は、5%FBS 含有 DMEM で DFAT を 72 時間培養した後の上清を用いた。

#### (4) *In vitro* における DFAT から放出される BDNF 抑制下での分化誘導効果の検討

6well plate に神経芽腫細胞を  $1.0 \times 10^5$  個/well 播種する。24 時間後に Control 群、DFAT と共培養する群(DFAT 群)、BDNF 中和抗体存在下に DFAT と共培養する群(DFAT+antiBDNF 群)に分けて培養を開始し、3 日後に神経芽腫細胞の神経突起長を測定する。同日に、mRNA を回収し、Real-time RT-PCR 法を用いて、神経分化マーカーである *NF* と *Tub 3* の発現を確認する。

また、6well plate に神経芽腫細胞を  $1.0 \times 10^5$  個/well 播種する。24 時間後に Control 群、DFAT の培養上清で培養する群(CM 群)、BDNF 中和抗体存在下に DFAT の培養上清で培養する群(CM+antiBDNF 群)に分けて培養を開始し、3 日後に神経芽腫細胞の神経突起長を測定する。同日に、mRNA を回収し、Real-time RT-PCR 法を用いて、神経分化マーカーである *NF* と *Tub 3* の発現を確認する。

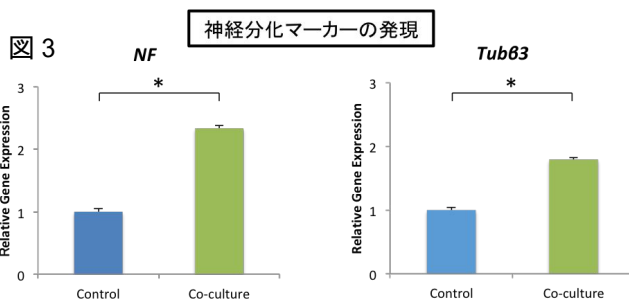
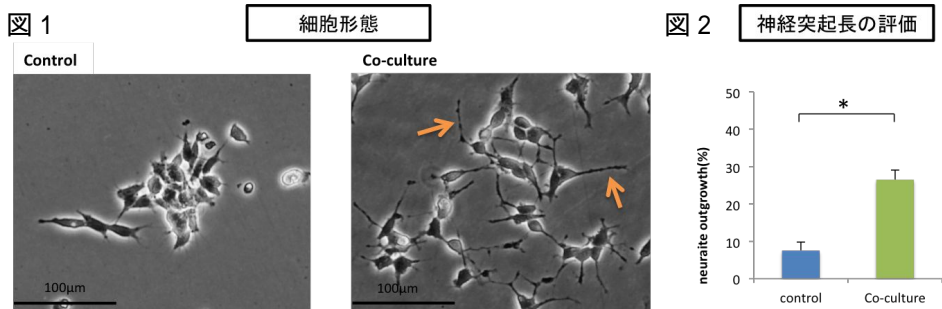
## 神経突起長の評価方法

神経突起が細胞体の 2 倍以上の細胞を、「神経突起が伸長している細胞」と定義する。ランダム 50 個の細胞中、神経突起が伸びている細胞の割合で神経突起が伸長しているかを評価する。

## 4. 研究成果

### (1)

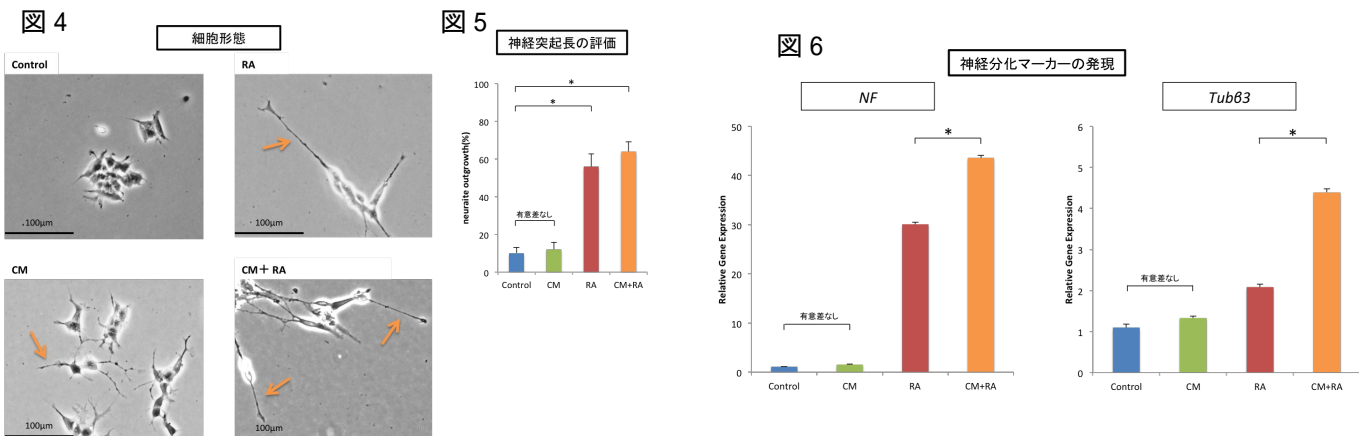
神経芽腫細胞と DFAT の共培養を 7 日間行くと、Control 群と比べて Co-culture 群で有意に神経芽腫細胞の神経突起の伸長が見られた(図 1、図 2)。また、Real-time RT-PCR で解析した結果、神経分化マーカーである *NF* と *Tub3* の mRNA 発現も Control 群と比べて Co-culture 群で有意に上昇を認めた(図 3)。



この結果から、DFAT は神経芽腫細胞を分化誘導することが示唆された。細胞間の接触がない状態で、神経芽腫細胞の分化誘導が得られたことから、DFAT が放出する液性因子が神経芽腫細胞の分化誘導に関わると考えられた。また、既存治療として確立されている RA と比較するために、DFAT との共培養系に RA を加えると、RA によって DFAT が分化誘導されてしまう可能性が懸念されたため、DFAT の培養上清を用いて RA との比較を行う必要があると考えられた。

### (2)

神経芽腫細胞を DFAT の培養上清で培養すると、Control 群と比べて神経突起は伸長する傾向にあり、神経分化マーカーも上昇傾向にはあったが、有意差は得られなかった。一方で、RA 存在下では、RA 単独群よりも RA+CM 併用群の方が有意に神経分化マーカーの発現上昇を認めた(図 4、5、6)。



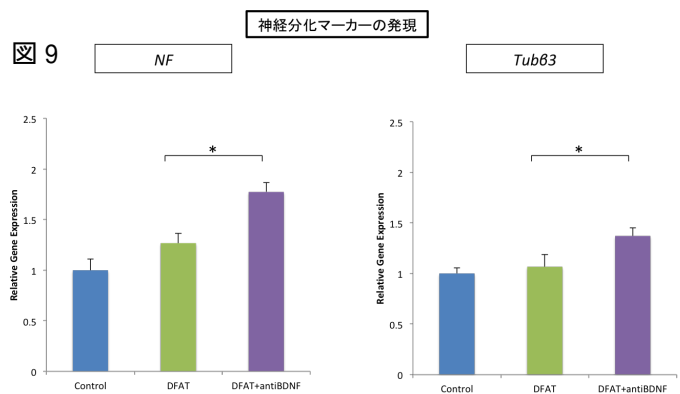
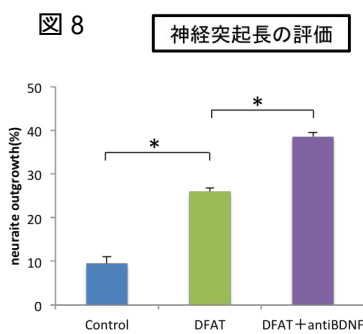
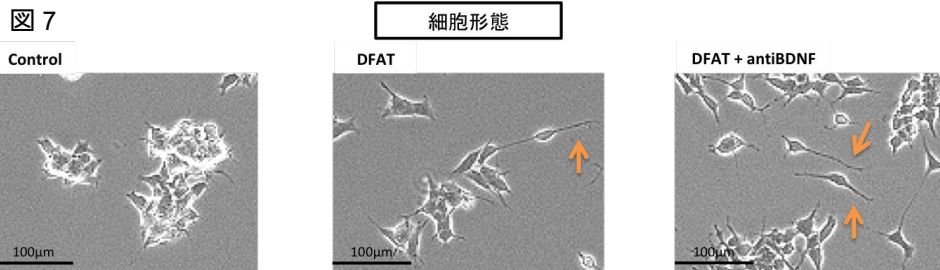
DFAT の培養上清中に存在する液性因子は、神経芽腫細胞の分化誘導において、RA に相乗または相加効果を持つ可能性が示唆された。DFAT は様々な液性因子を放出しており、その液性因子のうち神経芽腫細胞の分化誘導に関わる因子を同定することが必要と考えられた。

(3)

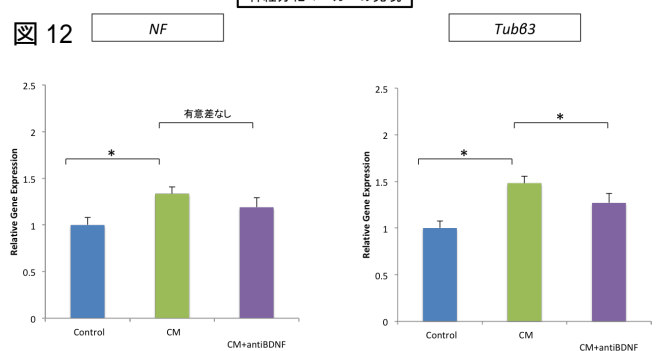
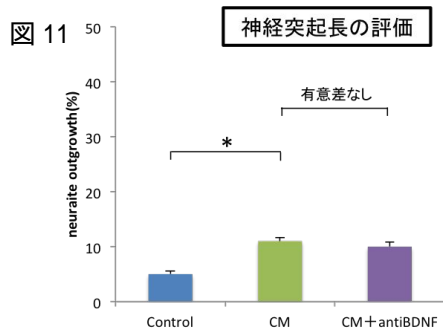
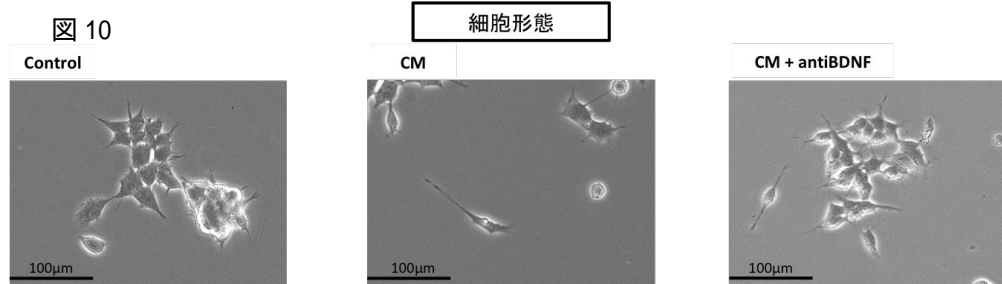
神経芽腫細胞と DFAT を共培養する際に BDNF を抑制すると、神経突起の伸長と神経分化マーカーの発現上昇を認めた(図 7、8、9)。

一方で、神経芽腫細胞を DFAT の培養上清で培養する際に BDNF を抑制しても神経突起は伸長せず、神経分化マーカーの発現は低下を認めた(図 10、11、12)。

神経芽腫細胞と DFAT を共培養した上で BDNF を抑制



神経芽腫細胞を DFAT 培養上清で培養した上で BDNF を抑制



神経芽腫細胞と DFAT の共培養での系と、DFAT 培養上清による神経芽腫細胞の培養系で各々 BDNF を抑制すると、抑制した群での分化誘導効果に差が出た原因としては、DFAT そのものが存在するか否かが考えられる。DFAT が存在下で BDNF を抑制するとフィードバックがかかって神経芽腫細胞をさらに分化誘導する方向に導く、または、BDNF を抑制することによって、神経芽腫細胞を分化誘導に導く他の液性因子が増強する可能性が考えられた。よって、神経芽腫細胞の分

化誘導には BDNF を介するシグナル経路が関与している可能性が示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

「ヒト神経芽腫細胞株におけるヒト脱分化脂肪細胞を用いた分化誘導の検討」

発表者：日高 綾乃、加藤 礼保納、土方 浩平、植草 省太、金田 英秀、上原 秀一郎、  
松本 太郎、越永 従道

学会名：日本小児外科学会学術集会

発表年：2019 年

「ヒト神経芽腫細胞株における脱分化脂肪細胞を用いた分化誘導の検討」

発表者：日高 綾乃、上原 秀一郎、植草 省太、土方 浩平、小野 賀功、石塚 悦昭、  
小沼 憲祥、越永 従道

学会名：日本小児血液・がん学会学術集会

発表年：2018 年

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：古屋 武史

ローマ字氏名：FURUYA Takeshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：研究医員

研究者番号(8桁)：20568539

研究分担者氏名：藤原 恭子

ローマ字氏名：FUJIWARA Kyoko

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：40595708

研究分担者氏名：越永 従道

ローマ字氏名：KOSHINAGA Tsugumichi

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：70205376

研究分担者氏名：植草 省太

ローマ字氏名：UEKUSA Shota

所属研究機関名：日本大学

部局名：医学部

職名：助手

研究者番号(8桁)：70746338

については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。