

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18072

研究課題名（和文）神経芽腫における脱分化脂肪細胞由来exosomeを用いた分化誘導療法の新規開発

研究課題名（英文）New development of differentiation-inducing therapy using exosome derived from dedifferentiated adipocytes of neuroblastoma

研究代表者

星 玲奈（HOSHI, Reina）

日本大学・医学部・助手

研究者番号：20793772

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経芽腫細胞に脱分化脂肪細胞（DFAT）由来のエクソソームを加えて培養することで腫瘍細胞の増殖抑制効果を得ることはできなかったが、腫瘍細胞の分化を誘導することができた。これは以前から示されているDFATそのものの分化誘導効果と矛盾しない。DFATは細胞治療として用いるには解決しなければならない問題があるが、DFAT由来のエクソソームを分化誘導療法に用いることの可能性を確認できたことで、今後予後不良な高リスクの神経芽腫の新規治療法につながる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒトDFATから放出されたエクソソームが神経芽腫の分化誘導効果を持つことが示された。神経芽腫は小児悪性固形腫瘍の中で脳腫瘍を除き、最も高頻度に認められ、高リスク群の神経芽腫は未だ予後不良である。今後、既存の神経芽腫に対する分化誘導療法である、13-cis RA（レチノイン酸）による分化誘導療法に、ヒトDFAT由来エクソソームを併用することで、分化誘導効果を向上させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：By adding exosomes derived from dedifferentiated adipocytes (DFAT) to neuroblastoma cells and culturing them, the effect of suppressing the growth of tumor cells could not be obtained, but the differentiation of tumor cells could be induced. This is consistent with the previously shown differentiation-inducing effect of DFAT itself. Although DFAT has problems that must be solved before it can be used as cell therapy, using DFAT-derived exosomes for differentiation-inducing therapy has confirmed the possibility of using high-risk neuroblastoma with a poor prognosis in the future. We have found the possibility of leading to new treatments.

研究分野：小児外科

キーワード：神経芽腫 DFAT Exosome

## 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°Cで1時間処理し、脂肪細胞を単離する。孔径250 $\mu$ m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°C、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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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Tubβ3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)。

図1

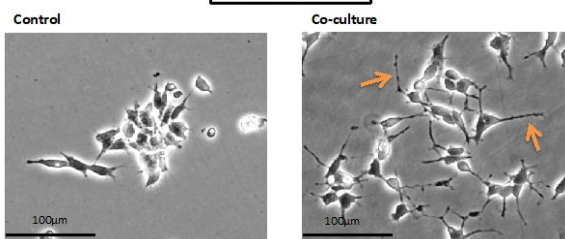


図2

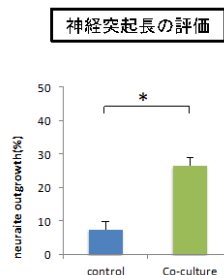
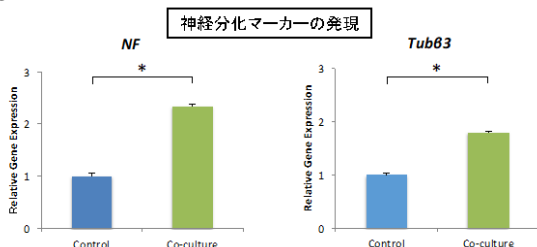


図3



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)。

図4

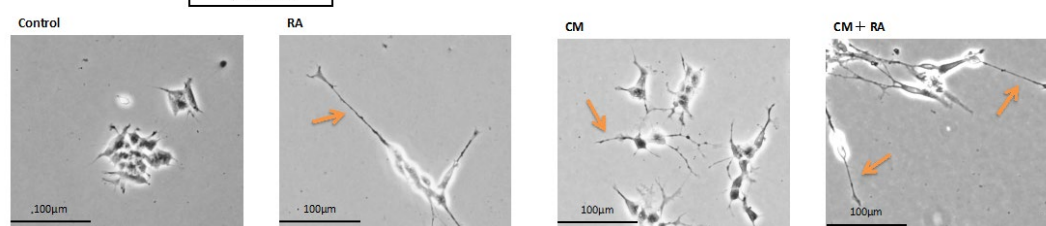


図5

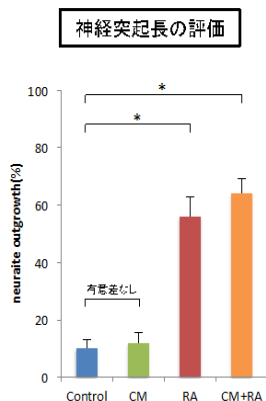
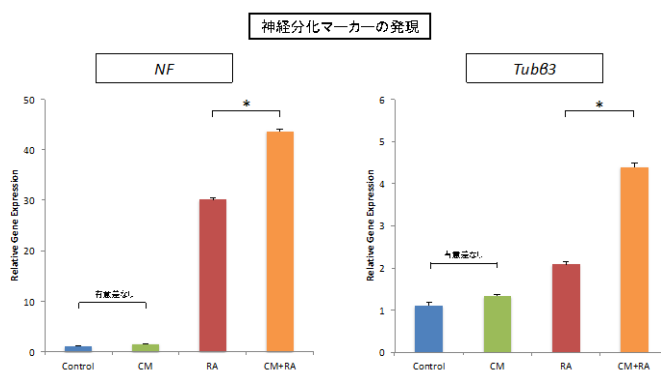


図6



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。

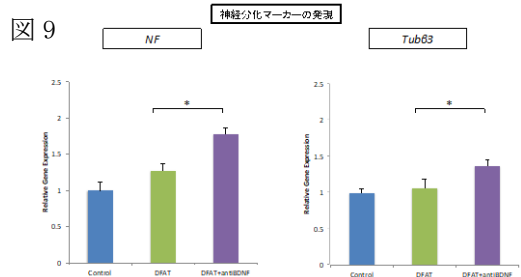
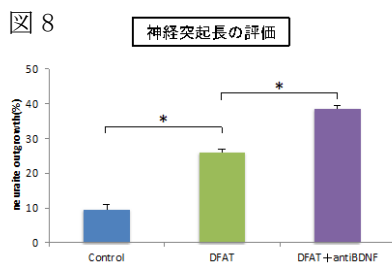
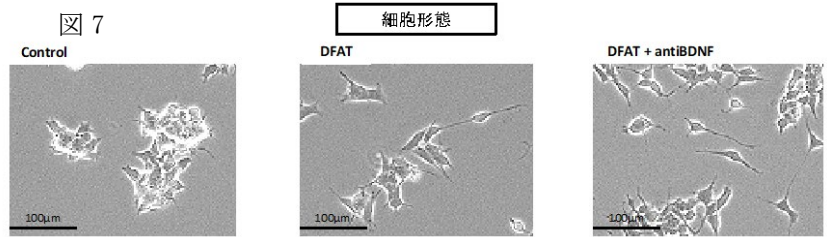
DFAT は様々な液性因子を放出しており、その液性因子のうち神経芽腫細胞の分化誘導に関わる因子を同定することが必要と考えられた。

(3)

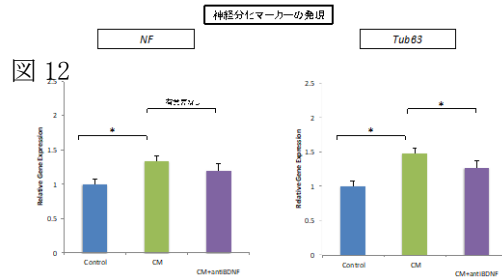
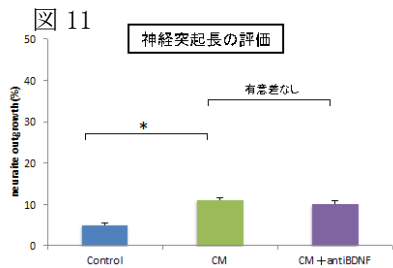
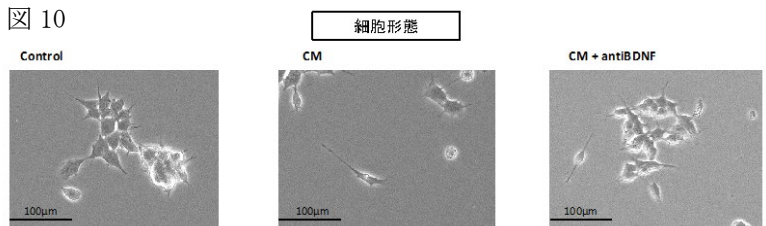
神経芽腫細胞と DFAT を共培養する際に BDNF を抑制すると、神経突起の伸長と神経分化マーカーの発現上昇を認めた(図 7、8、9)。

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 を共培養した条件、DFAT 培養上清を用いて培養神経芽腫細胞を培養した条件で各々 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

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ：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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------