

## 論文の内容の要旨

氏名：日 高 綾 乃

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：ヒト神経芽腫細胞株における脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cells: DFAT)を用いた分化誘導の検討

【背景】神経芽腫は、神経堤由来の細胞が未分化な状態で悪性化した小児固形腫瘍である。高リスク群の神経芽腫に対するレチノイン酸(Retinoic Acid: RA)による分化誘導療法は、一定の有効性を示すものの、5年生存率は依然として低いことが知られている。近年、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)から放出される種々の液性因子が、RAとは異なる機序で神経芽腫細胞を分化誘導することが明らかにされている。成熟脂肪細胞を天井培養法で培養することにより調製される脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cells: DFAT)は、MSCに類似した多能性細胞である。DFATはMSCと比べ、より均質な細胞を低侵襲性に調製できるといった特長がある。本研究ではDFATが神経芽腫細胞の分化や細胞増殖に対してどのような効果を示すか検討し、さらにRAやPhosphoinositide 3-kinase (PI3K)阻害剤との併用効果について検討した。

【材料と方法】ヒト神経芽腫細胞株はMYCN非増幅株のSK-N-SHと、MYCN増幅株のNB9を使用した。ヒトDFATは外科手術を受ける患者の皮下脂肪組織から調製した。神経芽腫細胞株(NB9、SK-N-SH)とDFATの共培養を行い、7日後に神経芽腫細胞の神経突起長の測定と神経分化マーカー(Neurofilament: NF,  $\beta$ III tubulin: TUB $\beta$ III)のmRNA発現量をRT-PCR法にて評価した。また神経芽腫細胞(NB9、SK-N-SH)に対してRA(5  $\mu$ M)存在下または非存在下にDFAT培養上清(DFAT-CM)を添加し、培養3日後にWST-1 assayにて細胞増殖能を評価し、培養7日後に分化能を評価した。さらに神経芽腫細胞(NB9)に対してDFAT-CMと共に神経成長因子(Brain derived neurotrophic factor: BDNF、Transforming growth factor- $\beta$ : TGF $\beta$ 、Nerve growth factor: NGF)に対する中和抗体やPI3K阻害剤LY294002を添加し、神経芽腫細胞の分化能や増殖能に対する影響を評価した。

【結果】DFATとの共培養実験では、神経芽腫細胞の神経突起伸長細胞の増加と神経分化マーカーであるNFおよびTUB $\beta$ IIIの発現上昇を認めた。DFAT-CM添加実験では、RAにDFAT-CMを併用すると、RA単独よりも神経芽腫細胞の分化誘導効果が増強された。またDFAT-CM添加によって神経芽腫細胞の増殖能は促進するが、その増殖促進作用はRA存在下に抑制された。BDNF、TGF $\beta$ 、NGFの中和抗体による阻害は、DFAT-CMによる増殖促進作用に対して明らかな影響を及ぼさなかった。DFAT-CMとPI3K阻害剤を併用すると、神経芽腫細胞の神経分化は促進され、増殖は抑制された。

【結論】DFATは神経芽腫細胞の神経分化を促進することが明らかになった。またDFATが放出する液性因子は、RAによる神経芽腫細胞の分化誘導効果を増強させることが明らかになった。一方、DFATが放出する液性因子によって、神経芽腫細胞の増殖が促進することが示され、この責任経路としてPI3K経路が重要な役割を果たすことが示された。DFATは、RAやPI3K阻害剤との併用等によって難治性神経芽腫に対する新たな治療用ツールとなり得る可能性が示唆された。