

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【要約】

日本大学大学院医学研究科博士課程

生理系機能生理学専攻

日高 綾乃

修了年 2020 年

指導教員 越永 従道

【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胎児性腫瘍であり、脳腫瘍を除く小児固形悪性腫瘍で最も高頻度に認められる。乳児期に発生する神経芽腫の大部分は自然退縮し、予後良好だが、1歳以降で発生する神経芽腫は予後不良となることがある。発症年齢を含む臨床像および腫瘍組織の分子生物学的マーカーが予後に密接に関係しており、低リスク群、中間リスク群、高リスク群に分類され、治療方針の決定に用いられている。特に *MYCN* 遺伝子の増幅は、強力な予後不良因子として知られている^{1,2,3}。

神経芽腫の高リスク群に対する標準治療は、化学療法、放射線療法、自家造血幹細胞移植などの集学的治療法である。最近10年間の治療法の発展により、自家造血幹細胞移植を併用した大量化学療法は、通常の化学療法と比べて無イベント生存期間が改善することが明らかになっている。しかし、自家造血幹細胞移植併用大量化学療法により臨床的寛解に達しても、微小の残存病変からの再発が起こり、3年無イベント生存期間は31~47%程度と依然として低いことが問題となっている^{4,5,6}。

近年、神経芽腫細胞において、脳由来神経栄養因子 (Brain derived neurotrophic factor: BDNF)、トランスフォーミング増殖因子- β (Transforming growth factor- β : TGF β)、神経成長因子 (Nerve growth factor: NGF) などの成長因子群によって、共通の中間キナーゼである Phosphoinositide 3 (PI3) キナーゼ、AKT、Anaplastic lymphoma kinase (ALK)、Focal adhesion kinase (FAK) を介した生存シグナル伝達経路が活性化され、その結果、神経分化や細胞増殖に関わる下流タンパクの活性化が起こることが明らかにされている⁷。その中でも、PI3 キナーゼ/AKT 経路は原発性神経芽腫細胞および神経芽腫細胞株の増殖に関係する主経路であることが報告されている^{8,9,10,11}。

急性骨髄性白血病 (Acute promyelocytic leukemia: APL) や神経芽腫のように分化障害・成熟障害が要因となって未分化な状態で悪性化した腫瘍細胞は、分化・成熟が促されると、自律性増殖能が抑制され、細胞死を誘導することができる。この原理に基づいて行われる治療が分化誘導療法である^{12,13}。神経芽腫細胞においてはレチノイン酸 (Retinoic acid: RA) が神経分化誘導作用を示し、同時に細胞増殖抑制が得られることが示されている¹⁴。実際に、RAの一種である 13-cis RA は、神経芽腫高リスク群に対する寛解導入後の維持療法として使用されてきた。しかし、骨髄破壊的大量化学療法後に自家造血細胞移植と

13-cis RA の併用を行っても、長期的には未分化な病変が残存するため、高リスク群神経芽腫の 5 年生存率は 59%と依然として低いことが指摘されている¹⁵。このため現在、より効果的な治療法の開発が望まれている。

近年、神経芽腫細胞に対して間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) による分化誘導作用が報告されている。MSC は、骨髄や脂肪組織、胎児付属組織から単離できる多分化能を持った細胞であり、再生医療や免疫治療などの幅広い可能性を持つ治療用細胞として期待されている^{16,17}。MSC の培養上清には様々な神経栄養因子が含まれており、神経芽腫細胞を分化誘導すると報告されている^{18,19}。

成熟脂肪細胞を天井培養することで調製される脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) は、MSC に類似した多能性細胞である。DFAT は MSC と比べると、低侵襲性に採取でき、より均一な細胞を得ることができるため、細胞治療に用いる細胞ソースとしてはより理想的である²⁰。また、DFAT から放出されるサイトカインも ASC や骨髄由来 MSC の発現プロファイルとほぼ一致し、そのサイトカインには、BDNF などの神経栄養因子も含まれていることが報告されている²¹。したがって、DFAT も MSC と同様に神経芽腫細胞に対して分化誘導作用を示すことが示唆される。

【目的】

MSC は、種々の神経栄養因子や成長因子を分泌し、神経芽腫細胞の神経細胞への分化を促進することにより治療効果を示す可能性が報告されている^{18,19}。一方、成熟脂肪細胞に由来する MSC 様細胞である DFAT が、神経芽腫細胞に対してこのような分化誘導作用を有するかは明らかになっていない。

本研究では DFAT が神経芽腫細胞の神経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、その上で RA との併用や PI3 キナーゼ阻害剤との併用で神経分化効果や細胞増殖抑制効果の向上が得られるか検討した。

【方法】

培養細胞

ヒト神経芽腫細胞株は SK-N-SH (*MYCN*非増幅株) と、NB9 (*MYCN*増幅株) を実験に使用した。ヒト DFAT は日本大学医学部附属板橋病院小児外科で行われる手術を受ける患者から 1~2 g の皮下脂肪組織を採取し、既報²⁰に従い天井培養法を用いて調製した。ヒト検体を用いた全ての実験は、日本大学医学部附属板橋病院臨床研究審査委員会の承認を受け実施した (承認番号: RK-160209-6)。

神経芽腫細胞と DFAT の共培養実験

6 well plate の各 well に SK-N-SH (1×10^5 /well) または NB9 (5×10^4 /well) を播種し、24 時間後に Co-culture 群と Control 群の 2 群に分けた (各群 3 well)。Co-culture 群は、DFAT (1×10^5 /well) をセルカルチャーインサート内に播種し、神経芽腫細胞株と共培養を行った。Control 群は神経芽腫細胞のみで培養を継続した。7 日目に神経芽腫細胞の分化能の評価として、神経突起が細胞体の 2 倍以上伸長している細胞の割合と神経分化マーカーである *Neurofilament (NF)* および β *III tubulin (TUB β 3)* の mRNA 発現量を Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (Real-time RT-PCR) 法にて評価した。

神経芽腫細胞株に対する DFAT -conditioned medium (CM) 添加実験

SK-N-SH または NB9 を Control 群、DFAT-CM 単独添加群、RA 単独添加群、DFAT-CM+RA 併用群に分けて培養を行った。神経芽腫細胞を播種した 24 時間後に DFAT-CM や RA ($5 \mu\text{M}$) を添加し、3 日目に WST-1 assay にて増殖能を評価し、7 日目に分化能を評価した。

神経芽腫細胞の増殖に対する中和抗体を用いた増殖因子阻害実験

NB9 を Control 群、DFAT-CM 単独添加群、中和抗体単独添加群、DFAT-CM + 中和抗体併用群に分けて培養を行った。細胞を播種した 24 時間後に、それぞれ DFAT-CM や各種中和抗体 (BDNF 中和抗体、TGF β 中和抗体、NGF 中和抗体 各 $10 \mu\text{g/ml}$) を添加し、3 日目に増殖能を評価した。

神経芽腫細胞に対する PI3 キナーゼ阻害実験

NB9 を Control 群、DFAT-CM 群、LY294002 群、DFAT-CM+LY294002 群に分けて培養を行った。細胞を播種した 24 時間後に、それぞれ DFAT-CM や PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 (10 μ M) を添加し、3 日目に分化能と増殖能を評価した。

統計学的解析

定量結果は、mean \pm SE で表した。2 群間の比較は、Mann-Whitney U test により有意差検定を行った。多群間の比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) および post hoc analysis として Turkey's multiple comparison test により有意差検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結果】

神経芽腫細胞株と DFAT の共培養実験結果

NB9 および SK-N-SH 共に、Control 群と比べて共培養群で神経突起伸長細胞の割合の増加を認め、神経分化マーカーである *NF* や *TUB β 3* も発現量の上昇を認めた。以上の結果より、DFAT は神経芽腫細胞に対する分化誘導作用を有することが示された。

神経芽腫細胞株に対する DFAT-CM 添加実験結果

NB9 では、神経突起伸長細胞の割合は、いずれの群間においても有意差を認めなかった。神経分化マーカーの発現は、DFAT-CM+RA 併用群では RA 単独添加群に比べ、*TUB β 3* 発現量の上昇を認めた。細胞増殖能は、DFAT-CM 単独添加群では Control 群に比べ上昇を認め、DFAT-CM+RA 併用群では DFAT-CM 単独添加群に比べ、低下を認めた。

SK-N-SH では、神経突起伸長細胞の割合は、RA 単独添加群と DFAT-CM+RA 併用群で Control 群に比べて増加していた。神経分化マーカーは、RA 単独添加群と RA+DFAT-CM 併用群で Control 群に比べ、*NF* および *TUB β 3* 発現量の上昇を認めた。細胞増殖能は、DFAT-CM 単独添加群では Control 群に比べて上昇を認め、DFAT-CM+RA 併用群では DFAT-CM 単独添加群に比べ、低下を認めた。

以上の結果より、RA に DFAT-CM を併用することで RA 単独よりも神経芽

腫細胞株の分化誘導効果が高まる可能性が示唆された。また DFAT-CM によって神経芽腫細胞の増殖能が促進するが、その増殖促進作用は RA 存在下に抑制されることが明らかになった。

神経芽腫細胞の増殖に対する中和抗体を用いた増殖因子阻害実験結果

NB9 において、BDNF に対する中和抗体の添加は、DFAT-CM による細胞増殖能の増加を抑制できなかった。同様に TGF β に対する中和抗体や NGF に対する中和抗体の添加によっても、DFAT-CM による細胞増殖能の増加を抑制できなかった。以上の結果より、BDNF、TGF β 、NGF の中和抗体による阻害は、DFAT-CM による細胞増殖能促進に対して明らかな影響を及ぼさないことが示唆された。

神経芽腫細胞の分化・増殖に対する PI3 キナーゼ阻害剤の効果

NB9 において、Control 群と比べて PI3 キナーゼ阻害剤 LY294002 添加群は *TUB β 3* の発現量の上昇を認めた。また DFAT-CM + LY294002 併用群は DFAT-CM 単独添加群や LY294002 単独添加群と比べても *TUB β 3* の発現量の上昇を認めた。以上の結果より、PI3 キナーゼ阻害剤は *TUB β 3* の mRNA 発現を上昇させ、この作用は DFAT-CM との併用により顕著となることが示された。

細胞増殖能は、LY294002 単独添加群と DFAT-CM + LY294002 併用群は、Control 群や DFAT-CM 単独添加群に比べ、低下した。以上の結果より、PI3 キナーゼ阻害剤は、DFAT-CM の細胞増殖促進作用に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。

【考察】

本研究にて、DFAT との共培養により、神経芽腫細胞の神経突起伸長細胞の割合が増加し、神経分化マーカーである *NF* と *TUB β 3* の mRNA 発現量が上昇したことから、DFAT が神経芽腫に対して分化誘導効果を持つことが示された。この神経芽腫細胞に対する分化誘導効果は、*MYCN* 非増幅株である SK-N-SH のみならず *MYCN* 増幅株の NB9 においても認められたことから、DFAT が悪性度の高い *MYCN* 増幅株においても治療効果がある可能性が見出せた。

次に DFAT による分化誘導効果が DFAT から放出されている液性因子によるものか確認し、さらに神経分化誘導因子である RA との効果比較および

DFAT-CM と RA との併用による効果について検討した。その結果、*MYCN* 非増幅株(SK-N-SH)で、DFAT-CM 単独では分化誘導作用を認めなかったが、RA との併用で RA 単独よりも神経分化マーカーの発現量が上昇したことから、DFAT 培養上清中の液性因子は、RA による神経芽腫細胞に対する分化誘導作用に対し、増強効果を持つ可能性が示唆された。*MYCN* 増幅株(NB9)では、RA 添加による神経突起の伸長や *NF*、*TUB β 3* 発現量の増加を認めなかったが、DFAT-CM と RA との併用で RA 単独よりも *TUB β 3* の発現量が増加した。これは、RA に反応しにくい *MYCN* 増幅株でも RA と DFAT-CM の併用で、ある程度分化誘導効果が得られていると考えられる。これらの結果から、臨床的には、RA による分化誘導療法を行う際に DFAT-CM を併用すると、より高い治療効果が期待できる可能性がある。

今回、RA や DFAT-CM が神経芽腫細胞の増殖能に与える影響を検討した結果、RA は既報¹⁴と同様に神経芽腫細胞の増殖能を抑制することが示された。また、DFAT-CM を加えることによって神経芽腫細胞の分化が誘導されるため、神経芽腫細胞の増殖能は RA と同様に抑制されることが期待されたが、実際は *MYCN* 増幅株、非増幅株ともに神経芽腫細胞の増殖は亢進することが示された。この結果より DFAT が放出する液性因子には、神経芽腫細胞を分化誘導させる因子だけでなく、神経芽腫細胞の増殖を促進する増殖因子も含まれる可能性が示唆された。そこで神経芽腫細胞の増殖に関与する増殖因子を同定するために、BDNF、TGF β 、NGF に対する中和抗体を添加する実験を行った。しかし、これらの中和抗体はいずれも DFAT-CM の NB9 に対する増殖能促進を抑制する効果は認められなかった。そこで神経芽腫細胞の増殖シグナルの中間キナーゼである PI3 キナーゼ/AKT 経路を阻害する目的で PI3 キナーゼの化学阻害剤である LY294002 を用いて神経芽腫細胞を DFAT-CM で培養した際の分化誘導能と細胞増殖能を評価した。LY294002 存在下で DFAT-CM で神経芽腫細胞を培養すると、DFAT-CM 単独で培養するよりも *TUB β 3* の発現量が増加した。また、細胞増殖能に関しては DFAT-CM による細胞増殖効果を LY294002 は抑制することが示された。つまり、PI3 キナーゼ阻害環境下では、神経芽腫細胞の増殖が抑えられつつ、DFAT-CM による神経芽腫細胞に対する分化誘導効果が効率的に得られる可能性が示唆された。

本研究において、DFAT-CM は RA と併用することで RA 単独投与するよりも神経芽腫細胞に対する高い分化誘導効果が得られること、DFAT-CM と PI3 キ

ナーゼ阻害剤とを併用することで、神経芽腫細胞の増殖が抑制されつつ分化誘導効果が得られることが明らかになった。これらのことから、RA や PI3 キナーゼ阻害剤と DFAT-CM を併用して投与することによって、神経芽腫患者の予後を改善できる可能性が示された。

今後の課題として、実際に神経芽腫モデルマウスを作成し、DFAT を投与することで神経芽腫に与える影響を確認し、DFAT と RA との併用で神経芽腫の分化誘導を促進させる効果が得られるか、DFAT と PI3 キナーゼ阻害剤との併用で神経芽腫の増殖を抑えるまたは縮小させる効果が得られるか検討する必要がある。

【結論】

本研究では、DFATは*MYCN*増幅株、*MYCN*非増幅株に係わらず、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神経分化誘導能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PI3キナーゼ経路が重要な役割を果たすことが示された。DFATは、RAやPI3キナーゼ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。

【参考文献】

1. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet*. 2007;369(9579):2106-2120. doi:10.1016/S0140-6736(07)60983-0
2. Park JR, Bagatell R, London WB, et al. Children's Oncology Group's 2013 Blueprint for Research: Neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer*. 2013;60(1):985-993. doi:10.1002/pbc
3. Jiang M, Hua Z, Dong Y, Liu Z, Thiele CJ, Li Z. Quantitative ubiquitylome analysis and crosstalk with proteome/acetylome analysis identified novel pathways and targets of perifosine treatment in neuroblastoma. *Transl Cancer Res*. 2018;7(6):1548-1560. doi:10.21037/tcr.2018.11.30
4. Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med*. 1999;341(16):1165-1173. doi:10.1056/NEJM199910143411601
5. Berthold F, Boos J, Burdach S, et al. Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidated treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomized controlled trial. *Lancet Oncol*. 2005;6(9):649-658. doi:10.1016/S1470-2045(05)70291-6
6. Pritchard J, Cotterill SJ, Germond SM, Imeson J, de Kraker J, Jones DR. High dose melphalan in the treatment of advanced neuroblastoma: results of a randomised trial (ENSG-1) by the European Neuroblastoma Study Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;44(4):348-57. doi:10.1002/pbc.20219
7. Satheesh NJ, Büsselberg D. The role of intracellular calcium for the development and treatment of neuroblastoma. *Cancers (Basel)*. 2015;7(2):823-848. doi:10.3390/cancers7020811
8. Megison ML, Gillory LA, Beierle EA. Cell survival signaling in neuroblastoma. *Anticancer Agents Med Chem*. 2013;13(4):563-575. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22934706>
<http://www.pubme>

- dcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3710698.
9. Johnsen JI, Segerström L, Orrego A, et al. Inhibitors of mammalian target of rapamycin downregulate MYCN protein expression and inhibit neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2008;27(20):2910-2922. doi:10.1038/sj.onc.1210938
 10. Abid MR, Guo S, Minami T, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Activates PI3K/Akt/Forkhead Signaling in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(2):294-300. doi:10.1161/01.ATV.0000110502.10593.06
 11. Opel D, Poremba C, Simon T, Debatin KM, Fulda S. Activation of Akt predicts poor outcome in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2007;67(2):735-745. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2201
 12. Jin X, Jin X, Kim H. Cancer stem cells and differentiation therapy. *Tumour Biol*. 2017;39(10):1010428317729933.
 13. de The H. Differentiation therapy revisited. *Nat Rev Cancer*. 2018;18(2):117-127. doi:10.1038/nrc.2017.103
 14. Teppola H, Sarkanen JR, Jalonen TO, Linne ML. Morphological Differentiation Towards Neuronal Phenotype of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells by Estradiol, Retinoic Acid and Cholesterol. *Neurochem Res*. 2016;41(4):731-747. doi:10.1007/s11064-015-1743-6
 15. Matthay KK, Reynolds CP, Seeger RC, et al. Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1007-1013. doi:10.1200/JCO.2007.13.8925
 16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
 17. Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells*. 2010;2(4):81-92. doi:10.4252/wjsc.v2.i4.81
 18. Crigler L, Robey RC, Asawachaicharn A, Gaupp D, Phinney DG.

- Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis. *Exp Neurol.* 2006;198(1):54-64.
doi:10.1016/j.expneurol.2005.10.029
19. Pires AO, Neves-Carvalho A, Sousa N, Salgado AJ. The secretome of bone marrow and wharton jelly derived mesenchymal stem cells induces differentiation and neurite outgrowth in SH-SY5Y cells. *Stem Cells Int.* 2014;2014:1-10. doi:10.1155/2014/438352
 20. Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008;215(1):210-222. doi:10.1002/jcp.21304
 21. Kikuta S, Tanaka N, Kazama T, et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Eng - Part A.* 2013;19(15-16):1792-1802. doi:10.1089/ten.tea.2012.0380