

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	檜山 洋子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
論文題目 In Vitro Transfection of Up-Regulated Genes Identified in Favorable-Outcome Neuroblastoma into Cell Lines (予後良好な神経芽腫で発現の高い遺伝子の細胞株への in vitro 導入)			
論文審査担当者			
主査	教授	檜井 孝夫	印
審査委員	教授	田代 聡	
審査委員	講師	山崎 文之	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>神経芽腫（Neuroblastoma，以下 NB）は，小児に発生する固形腫瘍の 1 つで，単独では固形腫瘍で最も多い。この腫瘍は生物学的に予後良好な群と予後不良な群に分けられ，予後不良群は年長児に多く，急速な進行と化学療法抵抗性を特徴とする。予後良好群は通常乳児に発生し，一部は自然に退縮または分化することさえある。分子生物学的な細胞の悪性度が患者の転帰に大きく影響するため，NB の悪性度に関連する分子生物学的因子は臨床的に重要であるが，まだ完全には解明されていない。そこで，以前の研究において生物学的に予後良好な NB と不良な NB の網羅的遺伝子解析を行い，オリゴマイクロアレイによって良好な腫瘍で発現レベルが有意に高い遺伝子を抽出した。そのうち，予後良好な腫瘍で高発現していた上位 3 つの遺伝子は，<i>DHRS3</i>，<i>NROB1</i>（<i>DAX1</i> としても知られる），<i>CYP26A1</i> であり，これらは神経系の分化や細胞分裂停止が関与する機能と相関していることが報告されていた。これらの遺伝子の発現レベルは，NB 細胞の退縮または分化を誘導する可能性があると考え，本研究では，発現プラスミド法を用いて，これら 3 つの遺伝子の各々を NB 細胞株（SK-N-SH，NH12，TGW）にトランスフェクトした。その後，細胞形態を評価し，成長，細胞周期，移動，および足場非依存性成長をモニターするためのコロニー形成のアッセイを行い，遺伝子発現プロファイルは，RNA シークエンシングにより検討した。これらの高発現遺伝子のトランスフェクションは細胞増殖を低下させ，単一クローンの誘導分化アッセイを確立することを困難にした。このため，これらの遺伝子のトランスフェクション過程の影響を除外するために Tet - On 発現系を用いた細胞においても検討を加え，またオールトランスレチノイン酸 (ATRA) による NB 細胞の分化誘導への影響も検討した。</p> <p>これらの遺伝子の導入により，細胞形態は扁平化や拡大を認め，同時にこれらの細胞については，Western Blot にて導入遺伝子の発現を確認した。<i>DHRS3</i>，<i>NROB1</i>，<i>CYP26A1</i> 導入細胞はともに増殖能が抑制され，蛍光観察にて <i>DHRS3</i> は主に細胞質や小胞体に認められ，一部は脂肪滴の形成を認めた。<i>CYP26A1</i> は核と細胞質に，<i>NROB1</i> は細胞質に認めた。siRNA 投与の細胞株では，細胞増殖能に有意な変化はなく，細胞の大きな形態学的変化を認めなかった。細胞増殖能を検討した Growth Curve では，SK-N-SH と NH12 では 3 種遺伝子のうちそれぞれを導入したものはベクターのみ導入した株に比べ有意に低下したが，TGW では <i>DHRS3</i> 導入株では抑制されず，他の 2 つの遺伝子導入では抑制を認めた。コロニー形成能では，3 つの遺伝子の導入細胞でベクターのみ導入した株に比べコロニーが小さくなる傾向にあったが，TGW では有意差はなく，SK-N-SH と NH12 では有意に形成能の低下を認めた。RNA 発現解析では，<i>DHRS3</i> 導入 SK-N-SH 細胞では，有意に上昇した遺伝子が 5 つ，低下した遺伝子が 109 抽出され，パスウェイ解析ではこれら増減した遺伝子群は細胞老化と分化，細胞接着に関連していた。転写活性の検索からは，JUN，SMAD3，EGR1，SMAD2，GLI1，CTNNB1，SMAD の関与，さらに ESR1 の活性化が示唆された。<i>CYP26A1</i> 導入細胞では肝線維</p>			

化、脂肪形成、増殖能関連の遺伝子、また、*NROB1* 導入細胞では神経分化、がん化、発生関連の遺伝子の変化を認めた。

遺伝子導入過程による影響を除外するために、Tet - On 誘導遺伝子発現系により検討した。ドキシサイクリン投与後 6 時間で遺伝子発現が誘導され、3-5 日間持続した。その結果においても、同様に顕著な細胞形態変化がみられた。細胞周期の検討では、*CYP26A1* は細胞増殖速度や細胞周期に影響を及ぼさなかったが、*DHRS3* と *NROB1* は G0-G1 arrest をきたして顕著な細胞増殖阻害と分裂停止を認めた。細胞老化マーカーである SA- $\beta$ -gal 発現を探索すると、*NROB1* 誘導細胞株が老化マーカーを発現し、一方、*DHRS3* 誘導細胞は老化マーカーを発現することが少なかった。さらに、*DHRS3* 誘導 SK-N-SH および NH12 細胞に 1-10  $\mu$ M の ATRA にて分化誘導すると、細胞は扁平化ならびに巨大化して細胞周期を停止し、分化と老化が誘導された。この時、p16<sup>INK4a</sup> の発現にはほとんど変化がなく、老化関連マーカーの p21<sup>Waf1/Cip1</sup> の発現が亢進し、*DHRS3* が老化と分化に関与している可能性が示唆された。

以上の結果より、*DHRS3*、*NROB1* 及び *CYP26A1* の 3 つの遺伝子の過剰発現は NB 細胞株の悪性度を低下させることが示され、高リスク神経芽腫の増殖を抑制し、分化と老化につながる可能性を示す新たな知見を得た。本論文は NB の悪性度をつかさどる機構の解明に重要な情報が提供され、これらの遺伝子を誘導する薬剤などの開発が新たな治療戦略につながる研究として高く評価される。

よって、審査委員会委員全員は、本論文が檜山洋子に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値のあるものと認めた。