

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07824

研究課題名(和文) 新規治療戦略の確立をめざしたラブドイド腫瘍幹細胞の同定と細胞学的特性の解析

研究課題名(英文) Identifying and analyzing biological characteristics of rhabdoid tumor stem cells to establish new treatment

研究代表者

勝見 良樹 (Katsumi, Yoshiki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：00808496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラブドイド腫瘍におけるがん幹細胞として、ラブドイド腫瘍細胞株におけるsphere細胞とHoechst33342陰性細胞(HN)を使用した。sphere細胞はCD44の発現が多く、SURVIVINとFOXM1の発現が低かった。HNは、CD44・FOXM1・cMYCの発現が高い一方SURVIVINの発現が低く、有意に高い増殖能がみられた。マウスラブドイド腫瘍ではFoxm1とcMycの高発現がみられた。当初上記の遺伝子発現について着目したが、RNA-seq解析でさらに発現の差異を認める複数の遺伝子が新たに見つかっており、今後もラブドイド腫瘍のがん幹細胞におけるこれら遺伝子の意義について検証していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラブドイド腫瘍はいまだに治癒が期待できない極めて悪性度の高い小児固形腫瘍である。希少疾患であり臨床的また基礎的な研究が少ないためにラブドイド腫瘍の細胞生物学的特性は不明な点が多く標準的な治療もない。手術・抗がん剤治療・放射線治療による集学的治療でも最終的に死亡する例が多い。本研究において着目したががん幹細胞はラブドイド腫瘍に限らず他の癌腫においても根本治療の標的となりうる細胞とされている。本研究において明らかにしたラブドイド腫瘍のがん幹細胞における各種高発現遺伝子の存在は、これらの蛋白をラベルとしたラブドイド腫瘍のがん幹細胞を標的とする新規治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We used either sphere cells or Hoechst33342-negative cells (HN) in human Rhabdoid tumor cell lines as cancer stem cells in Rhabdoid tumor. Higher CD44 expression was shown in the sphere cells, while SURVIVIN and FOXM1 expressed lower. In the HN, CD44, FOXM1 and cMYC were highly expressed, whereas low expression of SURVIVIN was shown. The HN was significantly and rapidly proliferated. Foxm1 and cMyc were highly expressed in mice Rhabdoid tumors. RNA-seq analysis showed extremely-high expressive genes in the HN group, compared with the 3 genes that we initially focused in this study. We will next study how the genes work in cancer stem cells of Rhabdoid tumor.

研究分野：小児がん

キーワード：ラブドイド腫瘍 幹細胞 FOXM1 survivin CD44

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性小児がんの代表であるラプトイド腫瘍は最も治りにくい小児悪性腫瘍であり、外科療法・多剤併用化学療法・放射線療法・支持療法の進歩にもかかわらず、ほとんどのラプトイド腫瘍例が治療開始後1年で死亡してしまい、標準的治療法も確立されておらず、極めて治療抵抗性であるため新規治療法の開発が緊急課題である。

一方、近年さまざまな悪性腫瘍においてがん幹細胞の存在が同定されてきており、がん幹細胞の自己複製能と多分化能に加えて、抗がん剤や放射線に耐性を示す細胞学的特徴も明らかになってきており、大腸がんではがん幹細胞を標的とした治療薬の開発も進んでいる。ラプトイド腫瘍においてがん幹細胞の存在は同定されていないが、ラプトイド腫瘍は他の悪性腫瘍に比べて特に未分化な悪性腫瘍であり、様々な臓器から出現すること、転移しやすく抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性のため治療中でも局所再発や遠隔転移再発をきたすこと、加えて細胞株においてその細胞形態がさまざまであることから、ラプトイド腫瘍は「がん幹細胞」様の特性が強い腫瘍であると推察した。

2. 研究の目的

ラプトイド腫瘍におけるがん幹細胞「ラプトイド幹細胞」の存在と細胞学的特性について解明し、将来のラプトイド腫瘍のがん幹細胞を標的とした治療戦略へ導くことを目的とする。

3. 研究の方法

- がん幹細胞採取の方法：ヒトラプトイド腫瘍細胞株から sphere 細胞および Hoechst33342 陰性細胞を回収する。sphere 細胞はそれ以外の通常ラプトイド腫瘍細胞株を対照、Hoechst33342 陰性細胞は Hoechst33342 陽性細胞を対照とする。Hoechst33342 染色の妥当性は Verapamil による ABCG2 抑制によってあわせて検証する。
- 増殖観察試験：Hoechst33342 陰性および陽性細胞を回収後、各々96well plate にて培養し WST8 assay で比較する。
- 造腫瘍性試験：Hoechst33342 陰性および陽性細胞を回収後、細胞数を調整し段階希釈を行いヌードマウス皮下に移植し、腫瘍発生の有無について検証する。
- INI1* 変異マウスから自然発生したラプトイド腫瘍検体で、実験 A) で着目した遺伝子の発現を蛋白レベルにて解析する。
- RNA-seq：Hoechst33342 陰性および陽性細胞を回収後、各々mRNA を抽出し RNA-seq 解析を行う。

4. 研究成果

< sphere 細胞における発現型 >

ヒトラプトイド腫瘍細胞株 NS 細胞と AN 細胞を幹細胞培養用培地で培養し、sphere 形成された浮遊細胞のみを回収した。control 細胞は通常培養中の接着細胞をおのおの用いた。qPCR で発現の差異を比較したところ、sphere 細胞は *CD44* の発現が多く、*SURVIVIN*、*FOXM1* の発現が低かった (図1)。

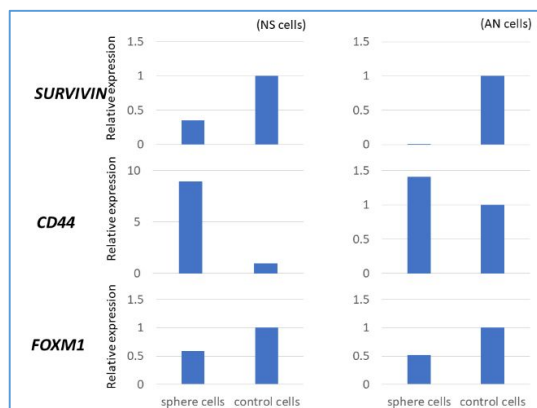


図1 sphere 細胞と通常細胞株における発現差異 (qPCR)

< Hoechst33342 陰性細胞における発現型 >

ヒトラプトイド腫瘍細胞株 G401 細胞を用いて検証した。Hoechst33342 陰性細胞は、*CD44*・*FOXM1*・*cMYC* において発現が高く *SURVIVIN* においては低かった (図2)。

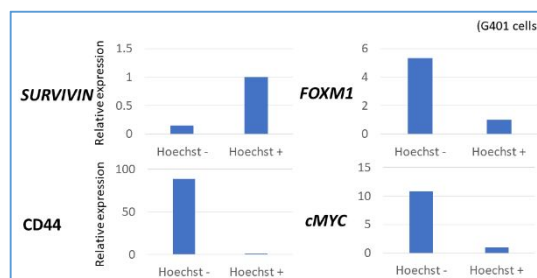


図2 Hoechst33342 陰性細胞と陽性細胞の発現差異 (qPCR)

< 増殖観察試験 >

ヒラブドイド腫瘍細胞株 G401 細胞を用いて検証した。Hoechst33342 陰性細胞は陽性細胞に比べ有意に増殖能がみられた (図 3)。

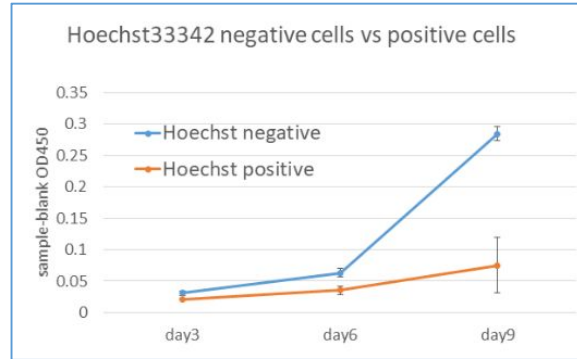


図 3 Hoechst33342 陰性細胞と陽性細胞の増殖能比較 (WST-8 assay)

< 造腫瘍性試験 >

Hoechst33342 陰性細胞と陽性細胞を回収後、PBS に浮遊し段階希釈したのちにヌードマウス皮下へ移植した。最大 75000 個の回収細胞を移植したがいずれの群も腫瘍発生は見られなかった。

< ラブドイド腫瘍における IHC >

マウスラブドイド腫瘍で cMyc と Foxm1 が高発現していた (図 4)。

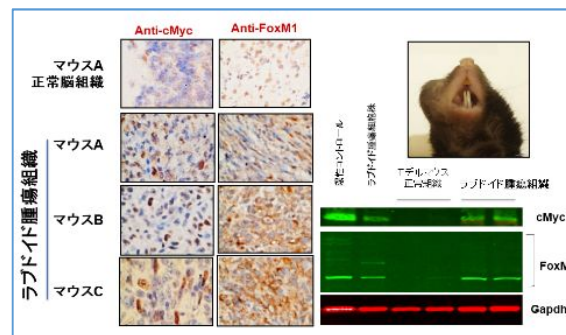


図 4 マウス由来ラブドイド腫瘍での cMyc と Foxm1 の発現 (免疫組織染色)

< RNA-seq >

G401 細胞から回収した Hoechst33342 陽性細胞と Hoechst33342 陰性細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、ABCG2 だけでなく複数の遺伝子で非常に有意な発現の差異がみられた (図 5) ため、今後「ラブドイド幹細胞におけるこれら遺伝子の意義」について追加検証していく予定である。

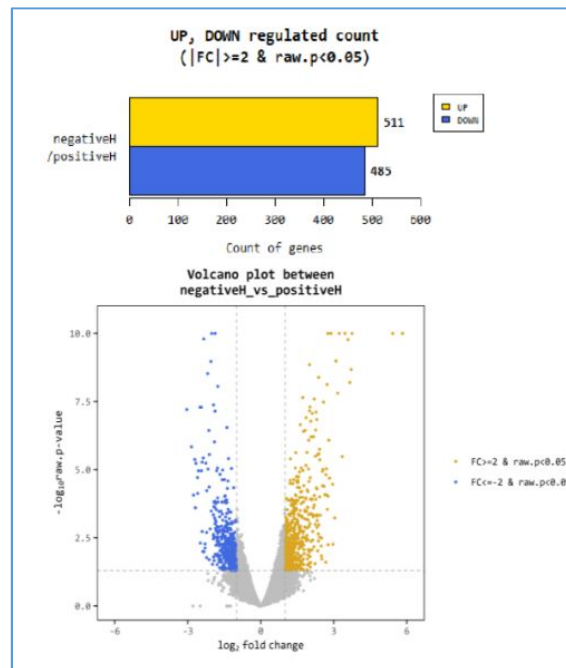


図 5 Hoechst33342 陰性細胞と陽性細胞の発現アレイ (RNA-seq)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	家原 知子 (Iehara Tomoko) (20285266)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (24303)	
研究分担者	桑原 康通 (Kuwahara Yasumichi) (30590327)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師 (24303)	
研究分担者	菊地 顕 (Kikuchi Ken) (40453104)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教 (24303)	

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