

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09043

研究課題名(和文)新規肺転移モデルを用いた小児肉腫における癌幹細胞および転移の制御に関する研究

研究課題名(英文) Novel ex vivo pulmonary metastasis model toward effective suppression of chemotherapeutic-resistant pediatric sarcoma

研究代表者

野村 元成 (Nomura, Motonari)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40546909

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)：骨肉腫は、小児期の骨悪性腫瘍の中で最も多い腫瘍であり、転移を来す症例の予後は極めて不良である。骨肉腫の増殖には、Wnt/ カテニン経路の活性化が深く関与しているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。カテニン選択的阻害剤の1つであるテガビビントは、成人癌に対する抗腫瘍効果が報告されているが、小児悪性固形腫瘍に対する抗腫瘍効果の報告はなされていない。今回、我々は、骨肉腫に対するテガビビントの抗腫瘍効果を、細胞株および患者腫瘍組織移植モデルを用いて検証した。さらに、Wnt/ カテニン経路がどのように転移巣にて活性化するかをex vivo肺転移モデルを用いて、その可視化を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫などに代表される小児期に発生する肉腫は、多剤併用化学療法が進歩によって予後は大きく改善してきたが、転移を伴うものは、集学的治療をもってしても未だに予後が悪い。よって、転移に関わる因子の同定およびその制御が、予後改善のために非常に重要である。本研究では、肺転移巣内における肉腫の増殖過程およびWnt/ カテニン経路の関与をex vivo肺転移モデルにて可視化し、その制御が癌幹細胞に及ぼす影響についても検討した。これらの成果は、治療抵抗性を示す骨肉腫患者に対する新たな治療法の展望を拓くものであり、学術的意義および社会的意義は高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma(OS) is the most common bone cancer in children and adolescents, and patients with metastatic disease still have extremely poor prognosis. It has been reported that the activation of Wnt/ -catenin pathway is closely associated with OS development and metastatic progression. Tegavivint, a novel small molecule inhibitor of the Wnt/ -catenin pathway, has been reported to be active against multiple types of adult cancer cells in vitro, and antitumor efficacy has been published in animal models of acute myeloid leukemia and multiple myeloma. In this study, we investigated the antitumor activity of Tegavivint against metastatic OS both in vitro and in vivo using established human OS cell lines and patient-derived xenograft(PDX) models. Furthermore, we investigated how the Wnt/ -catenin pathway is activated in lung metastatic sites by employing 3D ex vivo pulmonary metastasis assay(PuMA) model using PDX tumors derived from the relapsed metastatic lung lesion after chemotherapy.

研究分野：小児外科、小児悪性固形腫瘍、分子標的治療

キーワード：Wnt/beta-cateninシグナル 癌幹細胞 抗癌剤抵抗性 小児悪性固形腫瘍 肺転移 Ex vivo肺転移モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

肉腫は、成人における悪性腫瘍の約 1%に過ぎないが、小児においては約 20%を占める。とりわけ、骨肉腫などの骨原発腫瘍、横紋筋肉腫やユーイング肉腫などの軟部原発腫瘍は、かつては極めて予後不良な疾患であったが、放射線療法、多剤併用化学療法や骨髄移植を併用した大量化学療法などの集学的治療の進歩によって飛躍的に予後が改善した。しかし、肺などへの転移を伴うものは、転移を伴わないものに比べて未だに著しく予後が悪い。よって、転移に關与する因子を同定し制御することは、予後改善のためには必要不可欠である。

近年、成人のみならず小児においても、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化と癌の転移との強い關連を示唆する報告がなされており、癌における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの治療標的としての可能性が期待できる。しかし、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルには、大別して canonical、non-canonical の 2 大本流が存在し、Dvl など双方に共通した上流因子も存在するため(Figure1 Kato M et al. Clin Cancer Res. 2007;13:4042-45.)、安全性の観点からは、canonical シグナルに特有の下流因子を分子治療標的の候補とすることが望ましい。とりわけ、 $\beta$ -catenin の細胞内蓄積は、核内における LEF/TCF などの転写因子の活性化を促進し、c-Myc, CD44, CyclinD, COX2, Survivin など Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル標的遺伝子の発現による腫瘍増殖や転移の引き金となるため、 $\beta$ -catenin と核内受容体との結合をいかに阻害するかが重要である。

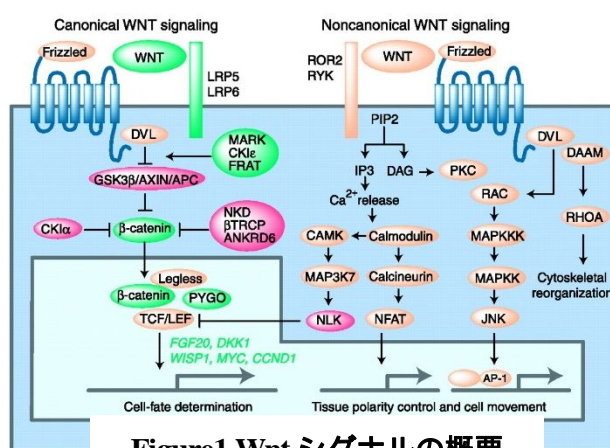


Figure1 Wnt シグナルの概要

さらに、近年、癌幹細胞の潜在的なマーカーの 1 つとして注目されているアセトアルデヒド脱水素酵素タイプ 1(ALDH1)の発現が、 $\beta$ -catenin の発現と強い正の相関を示すことが、数種類の成人がんにて報告されている。しかし、現時点では、小児がんにおけるそれらの相関を示す報告はなされていない。我々は、予備実験において、骨肉腫細胞株における ALDH1 の弱発現群と強発現群を比較して、ALDH1 強発現群の細胞の方が有意に $\beta$ -catenin およびその標的遺伝子のいくつかを高く発現しているデータを既に見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では、肉腫が肺転移巣においてどのように増殖するのか、それに伴って **Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルがいかに肺転移巣内で活性化するかを継時的に観察するとともに、癌幹細胞マーカーの 1 つである ALDH1 の発現がそれらの Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性とどのように相関するのか**を、既存のヒト腫瘍細胞株のみならず患者由来の腫瘍異種移植片(PDX; patient-derived tumor xenograft)を用いて *in vitro*、*in vivo* および *ex vivo* で検証することを目的とする。

なお、*ex vivo* 肺転移モデルには、**Pulmonary Metastasis Assay(PuMA)**を採用するが、この手法によって、蛍光標識された腫瘍細胞の挙動がマウスの肺組織内で継時的に観察できる(Mendoza A et al. J Clin Invest. 2010; 120: 2979-88.)。

以上の経緯を踏まえて、肉腫の肺転移巣では、原発巣よりも Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化している、*Ex vivo* 肺転移モデルにおいて、腫瘍内の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが継時的に増強する、ALDH1 発現と Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが強い正の相関を示す、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの

抑制が ALDH1 の抑制については癌幹細胞の増殖を抑制する、という仮説を立てた。

また、近年、アメリカ合衆国の Iterion Inc. が、 $\beta$ -catenin とその核内受容体の 1 つである TBL1 との結合のみを選択的に阻害し、TCF などの転写因子を負に制御する未承認新薬 Tegavivint(BC2059)を開発して、多施設共同研究で前臨床試験を開始した。Tegavivint は腫瘍選択的にアポトーシスを誘導し、急性白血病や多発性骨髄腫に対する *in vitro*、*in vivo* での十分な抗腫瘍効果を有することを報告している(Fiskus W et al. *Leukemia* 2015; 29; 1267-1278. Savvidou et al. *Mol Cancer Ther* 2017; 16; 1765-1778.)。本研究においても、各種実験系において、適宜 Tegavivint を用いてその抗腫瘍効果を確認する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 腫瘍原発巣と肺転移巣における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル活性の比較

まずは、*in vitro* において、ヒト骨肉腫細胞株 SaOS-2 と LM7(マウス内にて確立された SaOS-2 の肺転移 subline)における $\beta$ -catenin、TCF1、TCF4 および、c-Myc、CD44、CyclinD、COX2、Survivin などの Wnt/ $\beta$ -catenin 標的遺伝子の発現を Real time qPCR と Western Blot にて解析した。

続いて、NOD-SCID IL2R $\gamma$  null (NSG)マウスを用いて、SaOS-2 細胞( $1 \times 10^6$  cells)を脛骨内に注射することによって正所性モデルを作成し、10 週間後あるいは原発巣の直径が 1.5cm に達した時点で犠死せしめて原発巣と肺転移巣を摘出して、total RNA 用と total protein 用に腫瘍を分割し、それぞれ Real time qPCR と Western blot にて上記遺伝子およびタンパクの発現を解析して比較した。

#### 2) *Ex vivo* PuMA法を用いた転移性肺腫瘍の肺内での挙動の観察

GentleMACS dissociatorを用いて単離した骨肉腫PDX(肺転移巣)由来の細胞に、レンチウイルスベクターを用いて7TGC vector (Figure2 Fuerer C et al. *PLoS One*. 2010;5:E9370.)を導入し、3



Figure2 7TGC vector

日後にflow cytometryにてmCherry陽性細胞をsortingした。これによって、全ての細胞がmCherry(赤色)

にて、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル増強細胞のみGFP(緑色)にて標識されmergeすると黄色になるように設定されてある。これらの細胞( $1 \times 10^6$  cells)をNSGマウスに尾静脈注射し、15分以内に犠死せしめ、気管内にアガロース含有M-199培地を注入して肺内に充填させ、摘出した肺を冷PBSにて20分間冷却することによって肺内アガロースを固定させた。その後、厚さ1-2mmの肺スライスを複数枚作成して、M-199培地に浸したgel foam上に肺組織を乗せることで*ex vivo*培養を開始する。培地交換は2日毎に行い、Leica microsystemsの実体顕微鏡を用いて2-3日毎に肺内腫瘍の観察、画像撮影を行い、第28日まで観察を継続した。

#### 3) ALDEFLOURを用いたALDH1発現解析およびALDH1と $\beta$ -cateninの発現の相関性

ALDEFLOUR reagent にて上記細胞株および単離した骨肉腫 PDX(肺転移巣)由来細胞を処理し、flow cytometry にて FITC 強度の下位 30%の細胞を ALDH1<sup>low</sup>、上位 15%の細胞を ALDH1<sup>high</sup>として sorting し、sarcosphere assay にてスフィア形成能を確認・比較した。さらには、ALDH1<sup>high</sup>細胞( $1 \times 10^4$  cells)、ALDH1<sup>low</sup>細胞( $1 \times 10^4$  cells)それぞれを NSG マウスに尾静脈注射し、10 週後に犠死せしめて肺を摘出し、肺転移能を比較した。

#### 4) Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの制御とALDH1発現および癌幹細胞への影響

LM7 細胞において、TCF4 を siRNA によってノックダウンし、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル標的遺伝子の発現を Real time qPCR にてコントロール群と比較した。*In vitro* では MTS assay にて細胞増殖能をコントロール群と比較した。さらに、NSG マウスでの正所性モデルも 1)と同様に作成し、腫瘍増殖能および転移能を TCF4 ノックダウン群とコントロール群で比較した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 腫瘍原発巣と肺転移巣におけるWnt/ $\beta$ -cateninシグナル活性の比較

肺転移細胞株である LM7 の方が、TCF4、c-Myc、CD44 が有意に高発現していた。 $\beta$ -catenin の発現は、有意ではないものの、LM7 の方が高い傾向にあった。

また、SaOS-2 の脛骨内注射による肺転移モデルにおいては、肺転移巣の方が原発巣よりも  $\beta$ -catenin、TCF4、c-Myc、CD44 が有意に高く発現していた。

##### 2) *Ex vivo* PuMA 法を用いた転移性肺腫瘍の肺内での挙動の観察

肺内における腫瘍増殖過程のうち、第 0 日、7 日、14 日、21 日、28 日(最終日)の画像を示す (Figure 3)。第 7 日には肺組織への生着後に腫瘍増殖を認め、Wnt 活性の増強も認めた。ここで、肺組織をコントロール群、Tegavivint 群に分け、Tegavivint は第 7 日、10 日、14 日、17 日に培地内に投与した。第 14 日には Tegavivint にて腫瘍増殖は抑制されるとともに Wnt 活性も低下し、第 21 日には腫瘍はほぼ消失した。一方、コントロール群においては、継続的に腫瘍増殖と Wnt 活性増強を認めた。Scale bar; 100 $\mu$ m

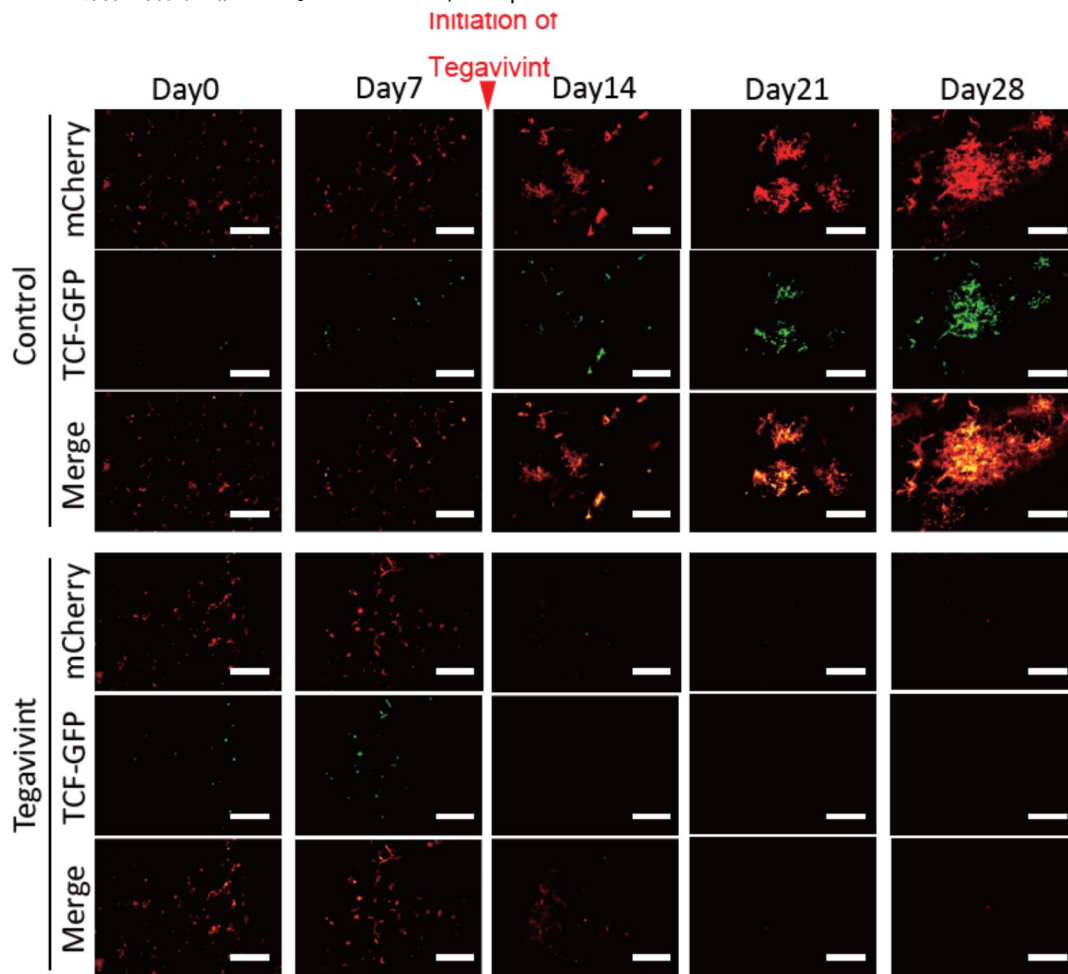


Figure3 PuMA 法による肺転移巣での Wnt 活性の継続的变化の可視化

##### 3) ALDEFLUORを用いたALDH1発現解析およびALDH1と $\beta$ -cateninの発現の相関性

Figure4 に示すように、ALDH1<sup>high</sup> 細胞の方が、ALDH1<sup>low</sup> 細胞よりも高いスフィア形成能を有す



ることを確認した。Scale bar; 100 $\mu$ m

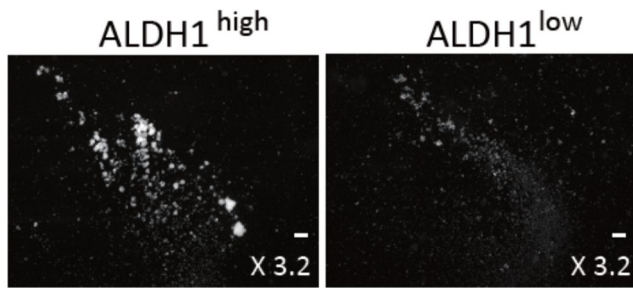


Figure4 ALDH1 発現とスフィア形成能の関連性

また、各々の細胞群を NSG マウスに尾静脈注射することで肺転移能を比較したところ、ALDH1<sup>high</sup> 細胞の方が有意に高い肺転移能を有していた。さらに、これらの肺転移は、Tegavivint 投与によって有意に抑制された(Figure 5)。TCCC-OS84：骨肉腫患者の肺転移巣由来の PDX

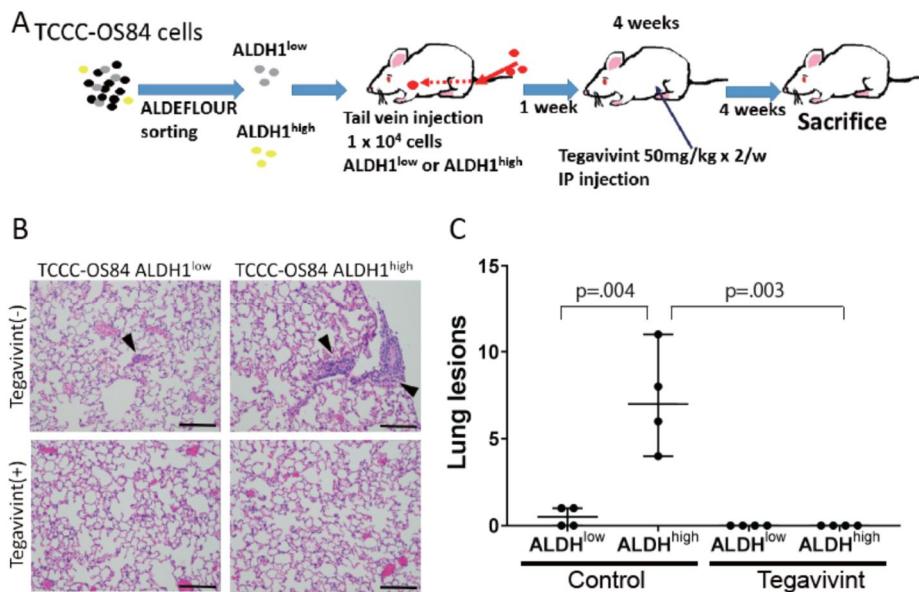


Figure5 ALDH1 発現と肺転移能の関連性

#### 4) Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルの制御とALDH1発現および癌幹細胞への影響

TCF4 ノックダウン細胞は非ノックダウン細胞と比較して有意に ALDH1 の発現が低く、細胞増殖能も有意に低かった。

また、脛骨内注射による肺転移形成モデルにおいては、TCF4 ノックダウン群の方が有意に原発巣の腫瘍増殖能が高かったが、肺転移巣に関してはコントロール群と比較して有意な差が見られなかった。コントロール群の原発巣における腫瘍サイズが第 20 日の時点で当施設の犠死適応基準に達してしまったため、マウスの苦痛除去目的で犠死せざるを得なかったことが一因と考え、今後のさらなる条件検討を要する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nomura Motonari, Rainusso Nino, Lee Yi-Chien, Dawson Brian, Coarfa Cristian, Han Ruolan, Larson Jeffrey L, Shuck Ryan, Kurenbekova Lyazat, Yustein Jason T	4. 巻 111
2. 論文標題 Tegavivint and the -Catenin/ALDH Axis in Chemotherapy-Resistant and Metastatic Osteosarcoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JNCI: Journal of the National Cancer Institute	6. 最初と最後の頁 1216 ~ 1227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnci/djz026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zuo Shogo, Sho Masayuki, Sawai Toshio, Kanehiro Hiromichi, Maeda Kosaku, Yoshida Makiko, Tsukada Ryo, Nomura Motonari, Okuyama Hiroomi	4. 巻 36
2. 論文標題 Potential role of the PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes on neuroblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 137 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-019-04616-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamichi Taku, Nishikawa Masanori, Takayama Keita, Takase Koki, Kim Kiyokazu, Umeda Satoshi, Tayama Ai, Tsukada Ryo, Nomura Motonari, Okuyama Hiroomi, Usui Noriaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Computed tomography-guided marking using a dye-staining method for preoperative localization of tiny pulmonary lesions in children	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1265 ~ 1272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-04930-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamichi Taku, Oue Takaharu, Irie Akemi, Inoue Masami, Takama Yuichi, Nomura Motonari, Yoneda Akihiro, Okuyama Hiroomi, Usui Noriaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Results of mass screening for neuroblastoma in 18-month-old infants in Osaka area, Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1645 ~ 1649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-04993-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukada Ryo, Nomura Motonari, Ueno Takehisa, Okuyama Hiroomi	4. 巻 47
2. 論文標題 Inhibition of cIAP1 in the effective suppression of chemotherapy-resistant hepatoblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2022.8290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野村元成、塚田遼、奥山宏臣
2. 発表標題 小児固形腫瘍の肺転移巣由来PDXを用いたex vivo肺転移モデル
3. 学会等名 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motonari Nomura
2. 発表標題 Novel ex vivo pulmonary metastasis model using high metastatic pediatric sarcoma
3. 学会等名 日本小児血液・癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Motonari Nomura
2. 発表標題 Innovative 3D ex vivo pulmonary metastasis model using high metastatic osteosarcoma PDX tumors
3. 学会等名 The American Society of Pediatric Hematology/Oncology (国際学会)
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
研究分担者	奥山 宏臣 (Okuyama Hiroomi)  (30252670)	大阪大学・医学系研究科・教授  (14401)	
研究分担者	田附 裕子 (Tazuke Yuko)  (10397698)	大阪大学・医学系研究科・准教授  (14401)	
研究分担者	塚田 遼 (Tsukada Ryo)  (70838747)	大阪大学・医学部附属病院・医員  (14401)	

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
---------	---------