

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591541

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞を用いた小児難治性白血病に対する腫瘍選択的アポトーシス誘導効果

研究課題名(英文) The preferential anticancer effect on pediatric malignancies by mesenchymal stem cells

研究代表者

宮村 能子 (Miyamura, Takako)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：20379796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を有する幹細胞で、腫瘍細胞などの異種抗原を認識し細胞浸潤する能力(組織ターゲティング)を有する。近年これを利用して治療分子を腫瘍細胞へ送達する担体としての能力が報告されている。MSCによって抗腫瘍剤の効果の増強が得られないかin vitroで検討した。当初白血病で検討したが系の確立に難渋しMSC由来の小児難治性悪性腫瘍であるEwing肉腫について検討を行った。有意差は得られなかったが抗腫瘍効果は増強する傾向が得られた。またMSCの容量に依存して効果が増強する傾向がみとめられた。今後抗腫瘍効果とMSCとの関連やその機序についての検討を行いたいと考える。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSC) have the capacity to differentiate into several tissues. Furthermore, it has reported that MSC could target the injured part including cancer. We investigated the enhancement of anti-tumor effects of anticancer drugs for Ewing Sarcoma (EWS) by administration of MSC. We use the EWS cell line by coculture of MSC and anticancer drugs, and evaluate the enhancement of anti-tumor effects by apoptosis assay. It had the tendency to enhance the anti-tumor effects although there was no significant difference. The antitumor effects tended to enhance depending on the concentration of MSC. We should investigate the more detailed analysis of the mechanism of MSC and antitumor effects.

研究分野：血液悪性腫瘍

キーワード：間葉系幹細胞 小児 悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)とは、間葉系の細胞(骨細胞・軟骨細胞・脂肪細胞など)、内胚葉性の細胞(筋細胞、胃の上皮細胞など)、外胚葉性の細胞(上皮細胞・神経細胞など)への分化能を有する能力をもつ体性幹細胞である (Uccelli et al; Nature review immunology 2008 8)。MSC はその多分化能のみならずさまざまな能力が報告されている。MSC は炎症部位や組織障害部位を認識して特異的に細胞浸潤し集積する組織ターゲティング能力があるとされている (Dazzi et al; Blood 2006 20)。

また、MSC は腫瘍増殖を直接的に抑制する性質を有しているという報告がある (Khakoo AY et al; Exp Med 203 2006, Etheridge SL et al; Stem Cells 22 2004) が、その一方で腫瘍に集積し腫瘍の増殖を支持するという報告 (Studeniy M et al; J Natl Cancer Inst 96 2004) もあり、腫瘍に対する機能や作用機序には不明な点が多くある。

MSC は骨髄中に存在し培養技術は確立されており、さらに最近では移植片対宿主病 (GVHD) の治療手段として細胞性医薬品としての開発もすすんでおり実臨床にも応用できる手段である。今回我々は MSC の組織ターゲティング能力、悪性腫瘍に対する障害能力の報告から小児悪性腫瘍に対する抗腫瘍効果の増強が得られないか検討した。

当初は予後不良で、造血幹細胞移植の適応となる難治性白血病に対しての検討を計画していたが、再現性のある系の確立が困難であったため、MSC 由来の小児難治性悪性腫瘍であるユーイング肉腫について検討した。ユーイング肉腫は化学療法や放射線治療に対する感受性は高く集学的治療が行われるが、進行期例はきわめて予後不良であり新たな治療戦略の確立が求められている。難治性ユーイング肉腫は自家造血幹細胞併用大量化学療法を含む治療を行うことが多く MSC を利

用した治療戦略が実臨床でもとりやすいことも考慮した。

2. 研究の目的

MSC はその組織ターゲティング能力から、治療分子を腫瘍細胞へ送達するための担体としての働きが期待されている。今回、ユーイング肉腫細胞株を用いて、抗腫瘍効果の増強について検討を行った。

TRAIL(tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand)はアポト-シス誘導能をもつサイトカインで、細胞表面に発現し細胞内ドメインに death domain を持つ特異的な受容体と結合し腫瘍細胞にアポトーシスを誘導する (Weily et al. Immunity 1995)。また、TRAIL は正常細胞に対しては細胞毒性を示さず腫瘍選択的にアポトーシスを誘導する(Walczark et al. Nature Med 1999)ことから近年、治療薬として期待されている。MSC の組織ターゲティング能力と TRAIL の腫瘍選択的なアポトーシス誘導効果を利用し、間葉系幹細胞に TRAIL を組み込んだ vehicle としての幹細胞を作成し腫瘍選択的なアポトーシス誘導効果についての検討を計画した。

3. 研究の方法

1)細胞培養

ユーイング肉腫細胞株である RS-ES を使用した。MSC はヒト骨髄間葉系幹細胞 hMSC(TaKaRa PT-2501)、専用培地キット hMSC Bullet Kit(PT-3001)を使用した。

2)アポトーシスアッセイ

抗腫瘍効果を評価するためにアネキシン V を用いたアポトーシスアッセイによってアポトーシスを測定、評価した。ApoAlert Annexin-V FITC を用いてアネキシン V 陽性細胞をフローサイトメトリー(FCM)を用いて測定し評価した。

RS-ES に抗腫瘍剤を添加し、アネキシン V を使用してアポトーシスアッセイを施

行し至適濃度と抗腫瘍剤の種類を検討した。当初ユーイング肉腫をはじめとした小児固形腫瘍に効果の高いシクロフォスファミドについて濃度の検討をしたが、アポトーシス誘導が良好に得られず、シスプラチン (CDDP) に薬剤を変更して検討することとし、その濃度を増減することによって至適濃度を確定した。

RS-ES と MSC を共培養し、MSC の抗腫瘍効果の増強について検討した。

MSC は RS-ES に比較して増殖速度がゆるやかであるため、まず MSC の培養を開始し、6 日後に RS-ES を添加し共培養を開始した。その後、同様に抗腫瘍剤 CDDP を添加しアポトーシスアッセイを行った。抗腫瘍剤投与量の比率、MSC の比率を変更してその抗腫瘍効果の増減を検討し、MSC の効果について考察した。

3) TRAIL (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand)

TRAIL, human recombinant (Calbiochem Novagen) (hTRAIL) を使用した。TRAIL は TRAIL Receptor1 (DR4) や 2(DR5) と結合しアポトーシスを誘導する。RS-ES における TRAIL の発現を ELISA を用いて検討した (TRAIL, Human ELISA kit, Funakoshi)。次に TRAIL の可溶部位をクローニングし (sTRAIL) (Endofree Plasmid Maxi Kit, Quiagen 使用) アデノウイルスベクターに強制発現させ、MSC に TRAIL をくみこみ MSC の vector としての働きの検討を計画した。

4. 研究成果

1) ユーイング肉腫細胞株に抗腫瘍剤を投与し、アポトーシスアッセイを施行し、至適な濃度を決定する。当初、ユーイング肉腫に効果の高いシクロフォスファミド (CPM) を用いたが、上述したが有効なアポトーシスが得られず、薬剤を変更した。いくつかの抗腫瘍剤を投与してその効果を確認し、とくに感受性の高かったシスプラチン (CDDP) を選択

して行った。

ユーイング肉腫細胞株に CDDP を濃度を変更して添加し (20 μ M \rightarrow 100 μ M) アポトーシスアッセイを行った。dose dependent にアポトーシスが增強する傾向がみとめられた。80 μ M を至適としこの濃度で MSC の添加やそのほかのアッセイを行うこととした(図 1)。

ユーイング肉腫細胞株に MSC を添加し同様にアポトーシスアッセイを行った。MSC 添加のみではアポトーシスの進行はほとんどみとめられず、これは MSC の濃度を増減してもかわりなかった。

ユーイング肉腫細胞株に CDDP を添加しそれに MSC を追加することでアポトーシスの差が得られないか検討した。

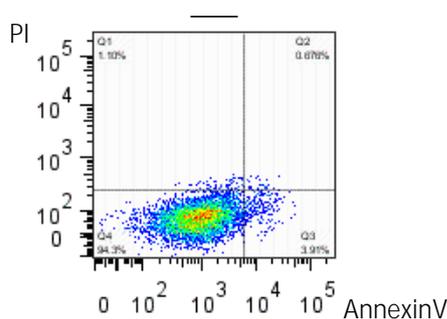
MSC を添加することによって、アポトーシスは進行する傾向があった(図 1)。

また MSC の濃度依存性にアポトーシスが增強する傾向がみとめられた。しかし一定の濃度以上はむしろ抗腫瘍効果の減弱がみとめられる傾向にあった(図 1、図 2)。

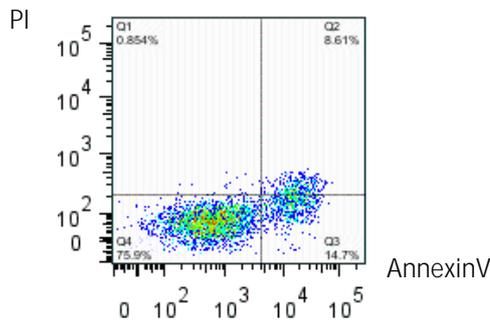
ユーイング肉腫細胞株における TRAIL 受容体の発現を ELISA (TRAIL, Human ELISA kit, Funakoshi) を用いて確認した。しかしその後の可溶性部位のクローニングの系が再現性をもって確立できず、TRAIL を MSC に導入し MSC の vector としての機能の評価は次期の検討課題とした。

図 1 ユーイング肉腫細胞株に対するアポトーシスアッセイ

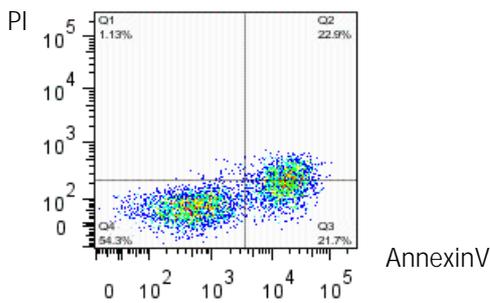
a) ES-RS のみ



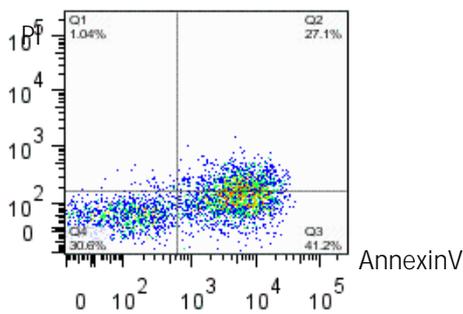
b) ES-RS+CDDP80μM



c) ES-RS+CDDP80μM+MSC1x10⁴

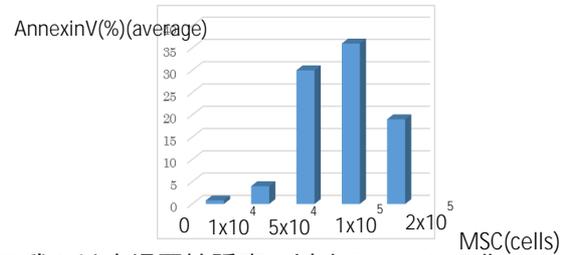


d) ES-RS+CDDP80μM+MSC1x10⁵



図の Q2 エリア(AnnexinV 陽性 PI 陽性) はアポトーシスを反映していると考えられ、Q3 エリア(AnnexinV 陽性 PI 陰性)は初期のアポトーシスをみているとされる。抗腫瘍剤である CDDP の添加によりアポトーシスが進行している (b)。次に MSC の濃度を変更して検討した。MSC の添加により Q2 エリア (AnnexinV 陽性 PI 陽性) は 8.6% だったが 21.7% まで上昇、アポトーシスの促進がみとめられた。MSC の dose を増加させることでアポトーシスの割合が上昇する傾向がみとめられたが 1×10^6 以上はむしろ減弱する傾向がみとめられた。初期アポトーシス (Q3 エリア) も添加する MSC の割合を増加させることで促進された(d)。

図 2



今回我々は小児悪性腫瘍に対する MSC の作用についての検討を行った。当初、今後の実臨床への応用を視野に入れて造血幹細胞移植の適応がある乳児白血病や薬剤耐性など難治性白血病を対象に検討を行うことを計画していた。しかし、系の確立が困難であったため、MSC 由来の悪性腫瘍であるユーイング肉腫細胞株での検討を行なった。難治性小児悪性腫瘍であるユーイング肉腫は集学的治療が行われても予後不良であり、新しい治療戦略が求められている。前述したように難治性ユーイング肉腫では自家移植併用大量化学療法が行われることが多く、MSC を用いた治療戦略にも期待がもたれる。

今回の結果からユーイング肉腫細胞株では MSC の添加のみでは抗腫瘍効果の増強は有意にはみとめられなかったが、MSC の添加によって抗腫瘍剤による抗腫瘍効果が増強する傾向が得られた。この結果から、MSC が何らかの機序で抗腫瘍剤の抗腫瘍効果の増強を引き起こす可能性が示唆される。MSC には異種抗原認識能力、組織ターゲティング能力が報告されていることから、MSC が vector として機能し薬剤の抗腫瘍効果を増強させているのではないかと考えられる。

TRAIL はアポトーシス誘導能をもつサイトカインであり、TRAIL 受容体と結合し腫瘍特異的にアポトーシスを誘導する。ユーイング肉腫細胞株で TRAIL 受容体の発現が確認できたため、MSC に TRAIL をくみこんだ媒体としての幹細胞を作成し、アポトーシスアッセイを行うことによって腫瘍選択的なアポトーシス効果が証明できると考えた。しかし TRAIL を MSC へくみこむために、TRAIL の

可溶性部位をクローニングし sTRAIL を作成することを目標としたが再現性をもって確立できなかった。MSC、腫瘍細胞株培養やそのほかの系は確立されており、ひきつづき検討を行い、MSC の腫瘍に対する機能や作用機序を明らかにしていきたいと考えている。また、in vivo で確認することを計画しており、これについても今回得られた結果をふまえて引き続き研究を続けたいと考える。

MSC は現在、造血幹細胞移植後の GVHD の治療の細胞性医薬品として欧米から多く報告があり、国内でも近々に臨床応用が期待できる。幹細胞移植と組み合わせることで効果的に抗腫瘍効果を得ることが可能なのではないかと考え、この点も視野に入れて検討を行っていききたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

・ Successful treatment of unresectable advanced hepatoblastoma: living liver transplantation after surgical removal of lung metastasis. Miyamura T, Washio K, Morishima T et al. *Pediatr Transplant*. 15(5):87-91: 2011.(査読有、10 名中 1 番目)

・ Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. Morishita N, Washio K, Miyamura T, Yamashita N, Morishima T et al. *Pediatr Blood Cancer*.59(1):83-9: 2012(査読有、9 名中 6 番目)

・ Low Serum Concentrations of Anti- Müllerian Hormone Are Common in 53 Female Childhood Cancer Survivors. Miyoshi Y, Ohta H, Namba N, Miyamura T, Hashii Y, Ozono K et al. *Horm Res Paediatr*. 2013;79 (1):17-21. (査読有、12 名中 5 番目)

・ ABL kinase mutation and relapse in 4 pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cases. Aoe M, Washio K, Miyamura T, Morishima T et al. *Int J Hematol*. 2014 ; 99 (5) :609-15. (査読有、15 名中 11 番目)

・ Early use of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for infants with MLL gene-rearrangement-positive acute lymphoblastic leukemia. Koh K, Tomizawa D, Miyamura T, Ishii E et al. *Leukemia*. 2015: 29 (2) 290-296. (査読有、19 名中 5 番目)

・ Outcome of children with relapsed acute myeloid leukemia following initial therapy under the AML99 protocol. Nakayama H, Tabuchi K, Miyamura T, Adachi S et al. *Int J Hematol*. 2014: 100(2) 171-9. (査読有、20 名 16 番目)

・ Mycobacterium avium complex-associated peritonitis with CAPD after unrelated bone marrow transplantation. Miyashita E, Yoshida H, Miyamura T, Hashii Y, Ozono K et al. *Pediatr Int*. 2014: 56(6) 96-98. (査読有、10 名 5 番目)

・ Perioperative management after high-dose chemotherapy with autologous or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for pediatric solid tumors. Uehara S, Miyamura T, Hashii Y et al. *Eur J Pediatr Surg*. 2015 25(1): 118-22. (査読有、9 名 8 番目)

〔学会発表〕(計 16 件)

・ 自家移植併用大量化学療法を含む集学的治療を施行し寛解を得た難治性腎明細胞肉腫 (CCSK) の 1 例. 宮村能子, 雑賀隆史, 森島恒雄ほか. 第 53 回小児血液・小児がん学会. 2011.11.25、群馬

・ 小児の血液疾患～日常遭遇する疾患から悪性疾患まで～. 宮村能子. 7th OMC Pediatric Open Meeting : 2012.9.14、岡山

・ MLL 陽性乳児 ALL に対する KIR リガンド不一致移植の有効性について : JPLSGMLL03 臨床試験より 宮村能子, 平山雅浩, 富澤大輔 ほか. 第 74 回日本血液学会学術集会 : 2012.10.19-21、京都

・ リコンビナントトロンボモジジュリン製剤を使用した小児悪性腫瘍 5 例 有効性と安全性についての検討. 宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか. 第 74 回日本血液学会学術集

会：2012.10.19-21、京都

- ・多発転移を有する治療抵抗性後頭骨原発ユーイング肉腫の1例。宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか。平成24年度JNBSG研究会：2013.1.26, 東京
- ・難治性ユーイング肉腫ファミリー腫瘍に対する同種造血細胞移植。宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか。第18回西日本小児がんセミナー：2013.3.30, 大阪
- ・I-BFM報告(B&D関連)。宮村能子。平成25年度第1回合同班会議・JPLSG全体会議；2013.6.21-23, 名古屋
- ・Efficacy and safety of high dose Topotecan in relapsed or refractory pediatric solid tumors. Miyamura T, Hashii Y, Ozono K et al. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology；2013.9.25-28, Hong Kong China
- ・再発・難治性小児悪性固形腫瘍患者に対する高容量トポテカンの効果と安全性についての検討。宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか。第55回日本小児血液・がん学会学術集会；2013.11.29-12.1, 福岡
- ・11q23転座型小児急性骨髄性白血病に対する造血幹細胞移植治療の検討。宮村能子, 田淵健, 工藤寿子ほか。第36回日本造血幹細胞移植学会総会；2014.3.7-9, 沖縄
- ・Effect of KIR Ligand Mismatched SCT for Infantile ALL with MLL gene Rearrangement: A Report From the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study Group (JPLSG). Miyamura T, Hirayama M, Horibe K, Tomizawa D et al. 9th Childhood Leukemia Symposium：2014. Apr.28-29, Prague
- ・移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)の臨床経過と予後についての検討。宮村能子, 橋井佳子, 福島教偉, 大園恵一ほか。第50回日本移植学会総会；2014.9.10-12, 東京
- ・Clinical characteristic and prognosis of post-transplant lymphoproliferative disorder:

A single institute experience in Japan. Miyamura T, Hashii Y, Ozono K et al. 46th Congress of the International society of Paediatric Oncology. 2014. Oct.22-25, Toronto.

- ・大量化学療法後にウイルス関連出血性膀胱炎を合併した神経芽細胞腫の2例。宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか。第56回日本小児血液・がん学会学術集会；2014.11.28-30, 岡山
- ・化学療法を変更し治療効果が得られた初期治療抵抗性Wilms腫瘍の1例。宮村能子, 橋井佳子, 大園恵一ほか。第56回日本小児血液・がん学会学術集会；2014.11.28-30, 岡山
- ・骨転移に対して手術、放射線治療を施行した難治性肝芽腫の1例。宮村能子, 橋井佳子, 奥山宏臣, 大園恵一ほか。日本小児肝癌スタディグループ(JPLT)研究会；2015.1.25, 東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮村 能子 (MIYAMURA TAKAKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20379796

(2)研究分担者

橋井 佳子 (HASHII YOSHIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60343258

H24～H26まで分担者として参画

(3)研究分担者

難波 範行 (NANBA NORIYUKI)
大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10379076

H24～H26まで分担者として参画

(3)研究分担者

山下 信子 (YAMASHITA NOBUKO)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40379798

H23～H24まで分担者として参画

(3)研究分担者

鷲尾 佳奈 (WASHIO KANA)
岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10379802

H23～H24まで分担者として参画