

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390397

研究課題名(和文)小児がん腫瘍幹細胞、循環腫瘍細胞ならびに微小転移細胞の細胞生物学的特性

研究課題名(英文)Biological characterization of pediatric cancer stem cell, CTC, and DTC

研究代表者

黒田 達夫 (Kuroda, Tatsuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60170130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：循環腫瘍細胞や播種腫瘍細胞と腫瘍幹細胞の類似性に着目した。肝芽腫、横紋筋肉腫、神経芽腫、ラブドイド腫瘍の細胞株や検体組織では、腫瘍幹細胞マーカー候補のCD44発現は全細胞株で確認されたが、CD44v発現は低かった。CD13陽性肝芽腫細胞株(HuH6)をSCID-NODマウスに移植しても腫瘍形成はみられなかった。肝芽腫細胞株ではtranilastによるsphere形成能の低下が観察され、CDDPとtranilastの併用群で腫瘍細胞障害の増強傾向が認められたが、他の腫瘍株では増殖抑制効果が得られなかった。これより腫瘍幹細胞増殖制御はがん種により異なる機序が働くことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Similarity between cancer stem cell and circulating tumor cell (CTC)/ disseminated tumor cell (DTC) was noticed in pediatric cancers. CD44, a stem cell marker candidate, was expressed on all cell lines and clinical tissue specimens including hepatoblastoma, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, and rhabdoid tumor, whereas CD44v expression was quite low. CD13 positive hepatoblastoma cell line failed to form tumors after administrated in SCID-NOD mice. Tranilast downregulated the sphere formation in hepatoblastoma cell lines, and also downregulated the stem cell proliferation when administrated with CDDP, whereas did not affect the proliferation of other cell lines. Expression of stem cell candidates is modified in a different manner in each molecule even in a identical cell line. Proliferation of cancer stem cell seems to be controlled in a different mechanism in each cancer.

研究分野：小児外科学

キーワード：小児外科学 小児腫瘍学 小児がん 神経芽細胞腫 腫瘍幹細胞 循環腫瘍細胞 微小転移細胞

## 1. 研究開始当初の背景

高リスクの小児がんの5年生存率は現在でも30-40%で、すでに化学療法の強化が極限に達しており、治療成績は頭打ちになっている。われわれは最も頻度の高い小児固形悪性腫瘍である神経芽細胞腫の微小転移を RT-PCR 法を用いて検出する方法を開発し、過去20年にわたり国立成育医療研究センターなどにおいて神経芽細胞腫症例の微小転移や腫瘍細胞動態を検討してきた。化学療法抵抗性の骨髄微小転移のある症例や CTC の検出される症例の Kaplan-Meyer 法による生存率が30%程度にとどまるのに対して、微小転移の検出されない症例の生存率は進行病期の症例でも90%近くに達し、有意な差がみられる (Kuroda T et al. J Pediatr Surg 2008, Kuroda T. Pediatr Surg Int 2011)。末梢血液中に存在する腫瘍細胞 (Circulating tumor cells; CTC) はアポトーシスへと誘導される細胞と dormant な状態の腫瘍細胞として存在するものとに分けられる。単独で存在する腫瘍細胞では細胞周期が休止しており、増殖しないと想定される。一方、骨髄や遠隔臓器において腫瘍細胞は生着し播種性腫瘍細胞 (disseminated tumor cell: DTC) として存在すると想定される。これまでの検討では一部のハイリスク症例において原発腫瘍の小さい早期の段階あるいは原発巣が退縮した症例でも末梢血中に腫瘍細胞が検出され、神経芽細胞腫では原発巣と独立した全身播種など特異な細胞動態と生物学的特性を示すことが示唆されている。さらに CTC や DTC の検出された症例の臨床的観察より、微小残存病変 (minimal residual disease; MRD) からは長い期間を置いて全身的な転移の形で再発が起こることが多く、化学療法抵抗性であるなどの知見が蓄積されており、これより MRD を構成する腫瘍細胞が腫瘍幹細胞に近い性質を持っていることが指摘されている。従来の化学療法は腫瘍幹細胞の増殖制御が

不十分で、CTC や骨髄に化学療法後も潜在する DTC から構成されると考えられる微小転移巣を制御する新治療の開発が必要であるが、これは世界的にも端緒に着いていない。したがって CTC や DTC の細胞生物学的特性を明らかにし、腫瘍幹細胞もしくはそれに近い性質の細胞が含まれることを確認できれば、進行神経芽細胞腫のみならず多くの小児がんの治療の方向に腫瘍幹細胞の制御を加えることにより飛躍的な生存率の向上が期待される。

腫瘍幹細胞は成人癌領域では血液、脳、卵巣などのがんで同定されており、Hoechst33342、CD13、CD44、CD133、EpCAMなどをマーカーとして FACS により神経芽細胞腫の腫瘍幹細胞を同定・分離する試みも近年報告される。神経芽細胞腫は腫瘍の heterogeneous な特性から腫瘍幹細胞仮説と良く一致し、さらには腫瘍幹細胞の関与により臨床的悪性度が良く説明できることが指摘されており、神経芽細胞腫などの小児がんの腫瘍幹細胞あるいはそれに近い性質をもった細胞の同定は近年注目を集め、色々な試みが報告されているが、微小転移と腫瘍幹細胞を結びつけた研究は報告をみない。

## 2. 研究の目的

本研究では小児がん腫瘍幹細胞の同定を図り、臨床的予後因子である末梢血液中腫瘍細胞 (circulating tumor cells; CTC) や骨髄微小残存腫瘍 (minimum residual disease; MRD) と腫瘍幹細胞の類似性を明らかにして、さらに腫瘍幹細胞の特性や増殖制御に関する基礎的知見を得ることを目的とする。肝芽腫、横紋筋肉腫などの小児がん腫瘍幹細胞マーカーの発現、生物学的特性や増殖制御を臨床腫瘍組織および培養細胞系で検討する。また各種小児がんにおいて CTC、骨髄 MRD などの臨床検体を集積し、その分子生物学的ならびに細胞生物学的な特性を解析し、CTC、DTC と腫瘍幹細胞との類似性を検討する。加えて腫瘍幹細胞を標的とした小児がんの新規治療開発の基盤的情報収集をも目指す。

### 3. 研究の方法

臨床検体の収集・解析、臨床検体からのCTC、MRD細胞の株化手順の構築と、既存の小児固形悪性腫瘍細胞株を用いた、腫瘍幹細胞マーカーの発現、腫瘍幹細胞増殖および造腫瘍の制御の検討を研究の中心とする。

(1)臨床検体の収集・解析(黒田、田口、淵本、狩野)

研究分担者の関連施設において匿名化臨床情報とともに小児がん腫瘍組織、血液、骨髄の臨床検体を収集し、新たなマーカーの利用も検討し、腫瘍細胞の株化や不死化を試みる。

臨床検体より循環腫瘍細胞、骨髄微小転移細胞を検索し、単離を試みる。これに対して3次元培養によるsphere-colony formation assayや腫瘍幹細胞の候補バイオマーカー遺伝子(Hoechst33342、CD13、CD44、CD133、EpCAM)、MYC遺伝子の発現を免疫組織化学やRT-PCR法により検索し、腫瘍幹細胞との分子生物学的特性の類似性、相違点を明らかにする。

原発巣、転移巣の腫瘍組織で原発巣、転移巣に関してもCD44 variantなど腫瘍幹細胞分子発現を免疫組織学的に検討し、化学療法との相関性などを培養細胞の結果と比較する。

(2)小児がん細胞株を用いた基礎的検討(淵本、狩野ほか)

これまでの本研究課題で知見の集積している横紋筋肉腫および肝芽腫の細胞株を中心に、培地に各種の化学療法剤を加えた際の幹細胞マーカーの発現の変化につき蛋白レベル、遺伝子レベルで検討を行う。培養細胞株よりCD13陽性細胞を単離し、これを増殖させてヒト化マウス(SCID-NODマウス)に移植して造腫瘍能を検討する。これにより腫瘍幹細胞移植の動物モデル確立を目指す。腫瘍形成が得られれば、in vitroで効果のみられた薬剤を投与して化学療法に伴う腫瘍組織中の幹細胞マーカー陽性細胞の変化などを調べ、その効果をin vivoで検討する。

### 4. 研究成果

小児がん細胞株(肝芽腫細胞株(HepG2, HuH6)、横紋筋肉腫細胞株(Rh30, KYM-1, RMS-YM, RD)、神経芽腫細胞株(LAN5)、ラブドイド腫瘍株(W4)など)、臨床検体組織における腫瘍幹細胞マーカー候補(CD13, CD44,

CD44v, CD133)の発現検索では、CD44は全ての腫瘍株で発現が確認され、CD133の発現も横紋筋肉腫株や神経芽腫株の一部では確認されたが、一部の成人癌で腫瘍幹細胞との密接な関係を指摘されるCD44vは小児がんでは多くのがん腫で、成人腫瘍とは異なり発現が低いことが明らかにされた。

肝芽腫細胞株(HepG2, HuH6)ではFACSにてCD13の表出がそれぞれ約50%,10%に認められた。そのためHuH6株でCD13陽性細胞をソーティングし、SCID-NODマウスにenrichして移植した。bulk細胞では腫瘍を形成したのに対して1/10( $1.0 \times 10^4$ ),1/100( $1.0 \times 10^3$ ),1/1000( $1.0 \times 10^2$ )のいずれのenrichに対しても16週経過しても腫瘍は形成されなかった。そのため肝芽腫の治療薬として期待されたCD13阻害薬(ウベニメクス)の効果の研究を進めることができなかった。

肝芽腫細胞株(HepG2, HuH6)において、非接着条件培養条件下におけるsphere形成により腫瘍幹細胞を選択的に培養する手技を固めた。これによりAHR agonistのtranilastによる腫瘍幹細胞マーカーの発現、sphere形成の変化を調べた。Sphere形成アッセイではtranilastの添加により肝芽腫株(HuH6, HepG2)ではsphere形成能の低下が観察された。

CDDPとトラニラストの腫瘍幹細胞増殖抑制効果を検討する研究では両株とも併用群で腫瘍細胞障害の増強傾向が認められたが、他の腫瘍株では予期した増殖抑制効果が得られなかった。

同一株でもtranilast添加によるCD44vとCD13、CD133の発現は定量PCR法で全く異なる傾向を示した。すなわちHepG2株ではtranilastによるCD44v,CD133発現の増強と同時にCD13発現の低下が見られ、同じ肝芽腫由来のHuH6株では全ての幹細胞マーカー候補の発現は低下した。これより細胞株により

異なる機序が働くことが示唆された。

臨床検体の検討と併行して、小児がん組織・細胞検体がインフォームドコンセントを取得の上、収集・保管された。

これらの結果より研究最終年度には研究計画の修正が検討された。その一環として、近年、組織幹細胞として Wnt signal のターゲット遺伝子である Lgr5 が注目されているが、Lgr5 を腫瘍幹細胞候補マーカーとして小児腫瘍株における発現や、in vivo での腫瘍造成能を網羅的に評価する予定である。また近年、エピゲノムの制御状態の改変研究において、初期化因子発現により異型増殖細胞が誘導され、小児がんに類似した病変が形成されることが明瞭となってきた。このような初期化因子発現により形成された腫瘍（小児がん類似）の既知の腫瘍幹細胞マーカーならびに体細胞幹細胞マーカーを評価することは小児がん特有の腫瘍幹細胞マーカーの発見につながる可能性があり、興味深いと思われる。今後の検討を予定している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 19 件)

Ishida Y, Qiu D, Maeda M, Fujimoto J, Kigasawa H, Kobayashi R, Sato M, Okamura J, Yoshinaga S, Rikiishi T, Shichino H, Kiyotani C, Kudo K, Asami K, Hori H, Kawaguchi H, Inada H, Adachi S, Manabe A, Kuroda T. Secondary cancers after a childhood cancer diagnosis: a nationwide hospital-based retrospective cohort study in Japan. *Int J Clin Oncol*. Peer reviewed. 2015 [Epub ahead of print] DOI:10.1007/s10147-015-0927-z

Hotta R, Fujimura T, Shimojima N, Nakahara T, Fuchimoto Y, Hoshino K, Morikawa Y, Matsufuji H, Kuroda T. Application of nuclear medicine to achieve less invasive surgery for malignant solid tumors in children. *Pediatr Int*. Peer reviewed. 2014;56:896-901 DOI:10.1111/ped.12368

宇高徹、須佐美知郎、中山口バート、渡

部逸央、堀内圭輔、星野健、黒田達夫、佐々木文、向井万起男、戸山芳昭、森岡秀夫. 横紋筋肉腫治療後 2 6 年で発症した放射線誘発性軟骨肉腫の 1 例. *臨床整形外科*. 査読有. 2014;49(8):723-728 <http://dx.doi.org/10.11477/mf.1408103128>

高橋信博、富田紘史、石濱秀雄、藤村匠、加藤源俊、藤野明浩、星野健、嶋田博之、高橋孝雄、黒田達夫. 当院での進行・再発神経芽腫に対する外科的治療の検討. *日本小児外科学会雑誌*. 査読有. 2014;50(3):645

DOI:なし

Yamamoto Y, Fukuda K, Fuchimoto Y, Matsuzaki Y, Saikawa Y, Kitagawa Y, Morikawa Y, Kuroda T. Cetuximab promotes anticancer drug toxicity in rhabdomyosarcomas with EGFR amplification in vitro. *Oncol Rep*. Peer reviewed. 2013;30(3):1081-1086 DOI:10.3892/or.2013.2588

黒田達夫. 若年発症のがん. *臨床外科*. 査読有 2013;68(5):564-568

<http://dx.doi.org/10.11477/mf.1407104572>

黒田達夫、星野健、藤野明浩、下島直樹、金森豊、淵本康史、森鉄也、正木英一、中澤温子. 固形腫瘍の治療の進歩 小児期の固形腫瘍治療における局所治療の役割. *日本小児血液・がん学会雑誌*. 査読有 2013;50(3):322-326

DOI:なし

Yoshida G. J., Fuchimoto Y, Osumi T, Shimada H, Hosaka S, Morioka H, Mukai M, Masugi Y, Sakamoto M, Kuroda T. Li-Fraumeni syndrome with simultaneous osteosarcoma and liver cancer: Increased expression of a CD44 variant isoform after chemotherapy. *BMC cancer*. Peer reviewed. 2012;12:444 DOI:10.1186/1471-2407-12-444

Fuchimoto Y, Morikawa N, Kuroda T, Hirobe S, Kamagata S, Kumagai M, Matsuoka K, Morikawa Y. Vincristine, actinomycin D, cyclophosphamide chemotherapy resolves Kasabach-Merritt syndrome resistant to conventional therapies. *Pediatrics International*. Peer reviewed. 2012;54(2):285-287

DOI:10.1111/j.1442-200x.2011.03414

Osumi T, Miharum M, Fuchimoto Y, Morioka H, Kosaki K, Shimada H. The germline TP53 mutation c.722 C>T promotes bone and liver tumorigenesis at a young age. *Pediatr Blood Cancer*. Peer reviewed. 2012;59(7):1332-1333

DOI:10.1002/pbc.24269

淵本康史.【臓器移植臨床における免疫寛

容導入の試みと現状】Mixed chimerism  
による免疫寛容誘導 大動物における前  
臨床研究と臨床応用． 総説 今日の移  
植 査読無 2012 ; 25 ( 4 ): 301-308

DOI:なし

Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga  
Y, Suminoe A, Hara T, Taguchi T.  
Implications of surgical intervention  
in the treatment of neuroblastomas:  
20-year experience of a single  
institution. Surg Today. Peer reviewed.  
2012;42(3):220-224  
DOI:10.1007/s00595-011-0053-0

〔学会発表〕(計 4 件)

狩野元宏、AHR agonist が肝芽腫細胞株  
HuH6 に与える影響についての検討 = 第一  
報、第 5 5 回日本小児血液がん学会、2013  
年 11 月 30 日、ヒルトン福岡シーホーク  
(福岡県福岡市)

黒田達夫、小児期の固形腫瘍治療におけ  
る局所治療の役割、第 5 4 回日本小児血  
液・がん学会(シンポジウム)、2012 年  
11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県  
横浜市)

Fuchimoto Y, Tanabe M, Hoshino K,  
Yamada Y, Kawachi S, Itano O, Obara H,  
Kitagou M, Shinoda M, Shimojima N,  
Matsubara K, Kitagawa Y, Ohdan O, Kuroda  
T、異なるクローンからなる神経芽腫 2 例  
から示唆された直視下生検の重要性、  
American Transplant Congress、2012 年  
6 月 4 日、ボストン(アメリカ)

狩野元宏、淵本康史、加藤源俊、藤村匠、  
有末篤宏、高里文香、富田紘史、下島直  
樹、星野健、大隅朋生、嶋田博之、中澤  
温子、黒田達夫、異なるクローンからな  
る神経芽腫 2 例から示唆された直視下生  
検の重要性、第 4 9 回日本小児外科学会  
学術集会、2012 年 5 月 14 日、パシフィ  
コ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 達夫 (KURODA, Tatsuo)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：6 0 1 7 0 1 3 0

### (2) 研究分担者

淵本 康史 (FUCHIMOTO, Yasushi)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：4 0 2 1 9 0 7 7

### 研究分担者

田口 智章 (TAGUCHI, Tomoaki)  
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・  
教授

研究者番号：2 0 1 9 7 2 4 7

### 研究分担者

狩野 元宏 (KANO, Motohiro)  
慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：0 0 5 7 3 4 0 3

### (3) 連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA, Hideyuki)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：8 0 2 6 4 2 8 2

### (4) 研究協力者

吉田 剛 (YOSHIDA, Tsuyoshi)  
慶應義塾大学・医学部・大学院生

高橋 信博 (TAKAHASHI, Nobuhiro)  
慶應義塾大学・医学部・大学院生