

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09651

研究課題名(和文) ヒトES細胞からの分化誘導システムを用いた小児固形腫瘍発生モデルの開発

研究課題名(英文) Establishment of pediatric solid tumor development model using human embryonic stem cell differentiation induction system

研究代表者

梅田 雄嗣 (Umeda, Katsutsugu)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80397538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：未分化ヒトES細胞を無血清培養条件下でNodal/activinインヒビターを投与すると、分化6日目よりCD271強陽性の神経堤細胞が出現した。この神経堤細胞分化誘導過程で認められる種々の細胞表面抗原の発現レベルをフローサイトメトリーで解析すると、様々な小児固形腫瘍細胞株でCD146が発現していた。悪性ラブドイド腫瘍・神経芽腫細胞株を移植した免疫不全マウスへ抗ヒトCD146ウサギポリクローナル抗体を投与すると、著明なin vivo抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：CD271high neural crest cells developed during six-day differentiation induction of undifferentiated ES cells under a serum-free condition with Nodal/activin. FCM analysis of surface markers expressed during the neural crest differentiation revealed that various cell lines of pediatric solid tumors expressed CD146. Treatment with a polyclonal antibody against CD146 effectively suppressed in vivo tumor growth of malignant rhabdoid tumor and neuroblastoma cells in immunodeficient mice.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：ES細胞 小児固形腫瘍 神経堤細胞

1. 研究開始当初の背景

小児がんの治療成績は診断技術の進歩と積極的な集学的治療により向上しているが、神経芽腫・ユーイング肉腫・骨肉腫・横紋筋肉腫・悪性ラブドイド腫瘍等の固形腫瘍の予後は依然として不良であり、新規治療の開発が望まれている。多くの小児固形腫瘍の起源は胎児期に一過性に出現する神経堤(NC)細胞またはその分化細胞である間葉系幹細胞(MSC)や交感神経系細胞と推定されており、その発症に深く関与している遺伝子異常としてINI1(悪性ラブドイド腫瘍)やPhox2B(神経芽腫)などの遺伝子欠損や、EWS-FLI1(ユーイング肉腫)やPAX3/7-FOXO1(横紋筋肉腫)などのキメラ融合遺伝子が知られている。

最近、正常組織と同様に、様々ながん組織においてもその幹細胞から前駆細胞を経て成熟細胞に至る階層性が保たれており、がん幹細胞は種々の抗がん剤や放射線に耐性を示し、再発の主たる原因となっている事が報告されている(Zhou BB et al. Nature Reviews Drug Discovery 2009)。白血病等の血液悪性疾患ではその起源である造血幹細胞・前駆細胞が成体に存在し、正常造血幹細胞との細胞表面抗原発現の比較によりがん幹細胞が同定され、発生メカニズムの解明とともにがん幹細胞の根絶を目指した新規治療開発が盛んに行われている。

NC細胞は胎児期に一過性しか存在しないため、これらを起源とする小児固形腫瘍の細胞表面抗原の発現様式やがん幹細胞の存在について検討された報告はほとんどない。従来の報告では主に腫瘍細胞株を用いているが、既に株化された細胞では幹細胞の出現様

式を辿る事は困難である。また、成体由来MSCに遺伝子異常を導入する固形腫瘍発生モデルも試みられているが、得られた細胞は遺伝子発現プロファイル上の変化は認めるが*in vitro*増殖能の変化は少なく、*in vivo*腫瘍形成能を有するがん細胞は作成できていない。最近では固形腫瘍自然発生マウスに胎児期の幹細胞・前駆細胞を識別する遺伝子操作を加え、がん発生に関与する細胞の挙動をプロスペクティブに追跡可能ながん発生モデルが作成されているが、このようなモデルマウスではヒト腫瘍の発生を忠実に再現しない事が多い。以上より、小児固形腫瘍発生を詳細に解析できる新たな実験モデルが必要と考えられる。

2. 研究の目的

胎児期に一過性に出現する神経堤細胞またはその分化細胞を起源とする多くの小児固形腫瘍の予後は不良であり、新規治療の開発が望まれている。申請者はヒト多能性幹細胞であるES細胞から神経堤細胞およびその分化細胞を選択的に増殖する培養システムを開発した。本研究では、ヒトES細胞からの神経堤細胞分化誘導システムを応用し、小児固形腫瘍の発生モデルを開発する。さらに、本モデルを用いてがん幹細胞の出現様式を解析することによりがん発生メカニズムを解明し、新規治療開発の基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

本研究計画では(1)ヒトES細胞由来の神経堤(NC)細胞またはその分化細胞を用いた小児固形腫瘍発生モデルの確立、(2)ヒトES細胞からの小児固形腫瘍発生過程におけるNC

細胞の発生・分化に関連した細胞表面抗原発現の推移の解析、(3) がん幹細胞特異的に発現する細胞表面抗原に対する中和抗体を用いた新規治療法の開発、を並行して行い、ヒト ES 細胞を用いた小児固形腫瘍の発生モデルを開発し、その発生メカニズム解明や新規治療開発の基盤となる研究を行った。

(1)ヒト ES 細胞からの小児固形腫瘍発生モデルの確立

a) 未分化ヒトES細胞を無血清培養条件下で SB431542を投与し、NC細胞を選択的に分化誘導する。得られたNC細胞は

bFGF+SB431542存在下で培養して骨・軟骨前駆細胞を、SB431542 +GSK-3インヒビター (CHIR99021)存在下で培養して交感神経系前駆細胞を選択的に増殖させる。増殖した細胞についてはNC細胞の発生・生存(FOXD3、Snail1/2)、ニューロンやメラニン産生細胞への分化(SOX10、Phox2B)、軟骨や骨への分化(SOX9、NKX3.2)などに関連する遺伝子の発現レベルをPCRで解析し、NC細胞からの分化段階を検討する。

b) ヒト ES 細胞から選択的に増殖させた NC 細胞やその分化細胞に対して、INI1 や Phox2B などの遺伝子欠損はノックダウン、EWS-FLI1 や PAX3/7-FOXO1 などのキメラ融合遺伝子はノックインにて遺伝子異常の再現を試みる。導入された遺伝子異常はサザンプロット、PCR 法などで確認する。

c)コロニーアッセイ法を用いて、遺伝子導入した NC 細胞や分化細胞の *in vitro* 増殖能をスクリーニングする。コロニー形成率が高い細胞は腫瘍化したクローン候補として免疫不全マウス(NOD/SCID/ γ C^{null} マウス)の皮下へ移植し、*in vivo* 腫瘍形成能の検討を進める。

2~3 ヶ月後に腫瘍を摘出し、HE 染色による組織像や疾患特異性の高い免疫染色・FISH・PCR 検査などを用いて腫瘍の病型を確認する。腫瘍形成が認められたマウスについては肺・肝・脾・脳・骨髄など他臓器への転移の有無についても検討する。

(2)本モデルの小児固形がん幹細胞発生モデルとしての有用性の検討

(1)で確立した小児固形がん発生モデルで、遺伝子導入後に高い腫瘍形成能を示したヒト ES細胞由来のNC細胞またはその分化細胞が小児固形腫瘍の起源である可能性が高いと考えられる。この結果を前提にして、このモデルが小児固形腫瘍の起源から幹細胞が発生・分化する過程をプロスペクティブに解析するモデルとしての有用性を検討する。

a)ヒトES細胞からの分化モデルで形成された小児固形腫瘍のがん幹細胞を同定する。

ヒト ES 細胞由来の分化細胞の遺伝子導入前後における NC 細胞の発生・分化に関連した細胞表面抗原 (CD271・CD73・CD29・

CD73・GD2 など)の発現を継時的に解析し、候補となる細胞表面抗原を抽出する。候補の細胞表面抗原については遺伝子導入後に陽性・陰性細胞に選別し、*in vitro* 増殖能、*in vivo* 腫瘍形成能を比較検討する。腫瘍が発生した場合は2~3 ヶ月後に摘出し、病理組織検査・FISH・PCR 検査などを用いて病型を確認する。横紋筋肉腫、神経芽腫、ユーイング肉腫など小児固形腫瘍と類似した腫瘍が形成された場合は、マイクロアレイ解析にてその固形腫瘍の細胞株や臨床検体と遺伝子発現プロファイルを比較検討する。

b)2a)で同定された特異的細胞表面抗原陽性の小児固形腫瘍幹細胞が実際に細胞株や臨床検体にも存在するかをフローサイトメトリーまたは免疫染色で確認する。存在した場合は、陽性細胞・陰性細胞に純化して、2a)と同様に *in vitro* 増殖能、*in vivo* 腫瘍形成能を比較検討する。

(3)がん幹細胞特異的に発現する細胞表面抗原に対する中和抗体を用いた小児固形腫瘍の新規治療法の開発

(2)で同定されたがん幹細胞特異的な細胞表面抗原の細胞外ドメインを免疫原としてマウスモノクローナル中和抗体を作成する。小児固形腫瘍の細胞株や臨床検体に中和抗体を投与し、*in vitro*・*in vivo*における抗腫瘍効果を検討する。

4．研究成果

ヒトES細胞から多くの小児固形腫瘍の起源である神経堤細胞およびその分化細胞を選択的に増殖する培養システムを用いて、(1)小児固形腫瘍の発生モデルの開発(2)本発生モデルを用いたがん幹細胞の出現様式に基づくがん発生メカニズムの解明と新規治療開発を行った。

未分化ヒトES細胞を無血清培養条件下でNodal/activinインヒビターを投与すると、分化6日目にCD271強陽性の神経堤細胞が出現した。神経堤細胞に関連した様々な細胞表面抗原の網羅的スクリーニングの結果、悪性ラブドイド腫瘍、神経芽腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫などの小児固形腫瘍に共通してCD146が発現していた。悪性ラブドイド腫瘍細胞株をCD146陽性・陰性細胞に分離すると、CD146陽性細胞は

高い *in vitro* 増殖能および *in vivo* 腫瘍形成能を示した。さらに、悪性ラブドイド腫瘍・神経芽腫細胞株を免疫不全マウスへの皮下移植した後に抗ヒトCD146ウサギポリクローナル抗体を投与すると、著明な *in vivo* 抗腫瘍効果を示し、新規治療法として有用である可能性が高いことを明らかにした。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Nodomi S, Umeda K, Saida S, Kinehara T, Hamabata T, Daifu T, Kato I, Hiramatsu H, Watanabe KI, Kuwahara Y, Iehara T, Adachi S, Konishi E, Nakahata T, Hosoi H, Heike T. CD146 is a novel marker for highly tumorigenic cells and a potential therapeutic target in malignant rhabdoid tumor. *Oncogene*, 査読有、35 巻、2016、5317 - 5327. <http://www.nature.com/articles/onc20167> / DOI:10.1038/onc.2016.72.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ：
<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~pediatrics/group/pdf/ketsueki/09.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅田 雄嗣 (UMEDA, Katsutsugu)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号： 8 0 3 9 7 5 3 8

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

納富 誠司郎 (NODOMI, Seishiro)
京都大学・医学研究科・医員

甲原 貴子 (KINEHARA, Takako)
京都大学・医学研究科・大学院生