

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20790729

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞のユーイング肉腫に対する抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Antitumor effect of bone marrow mesenchymal stem cell to Ewing sarcoma

研究代表者

宮村 能子(MIYAMURA TAKAKO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：20379796

研究成果の概要(和文)：本研究では骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell:MSC)のアポトーシス誘導効果や組織ターゲティング能力に着目し、小児難治性悪性腫瘍であるMSC由来のユーイング肉腫に対する正常MSCの抗腫瘍効果、また治療分子を腫瘍細胞に効果的に到達させる担体としてMSCが機能する可能性を考え、抗腫瘍剤やビスフォスフォネートの抗腫瘍効果がMSCとの共存によって増強するか検討した。MSC単独では抗腫瘍効果の増強はみられなかったが、抗腫瘍剤との共培養で増強する傾向がみとめられた。MSCが抗腫瘍剤の担体として機能しより高い抗腫瘍効果が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that mesenchymal stem cell(MSC) could induce apoptosis in various cancer cells. Moreover, MSC can target injured part. We planned to investigate about the following; ①Antitumor effect to Ewing sarcoma of normal MSC ②Amplification of antitumor effect of anti-cancer drugs (including bisphosphonate) by coculture with MSC. It tended to obtain the higher anti-tumor effects to the Ewing sarcoma cell line by coculture of MSC and anti-tumor agents. We evaluated the ability of MSC as the delivery vehicles of the anti-cancer drugs to achieve the higher antitumor effects, and it is necessary to continue a further research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物系・医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：①移植・再生医療 ②間葉系幹細胞 ③細胞・組織 ④癌

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄中には造血幹細胞以外にさまざまな細胞に分化する能力を有する細胞が含まれる。そのひとつが骨髄間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)で、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨芽細胞のみならず血管内皮細胞や中枢神経細胞への分化が報告されている。MSCは、その多分化能のみならず再生能力や免疫効果 (T細胞機能の規制)、組織障害部位を認識しその部位に特異的に細胞浸潤する(組織ターゲティング)能力があると報告されており (Dazzi *et al.* *Blood* 2006 20)、in vitroにおいて大腸癌や白血病細胞にアポトーシスをもたらす能力が報告されている (Ramasamy R *et al.* *Leukemia* 2007. 21)。また、この障害された細胞に集積する性質を利用して、近年治療分子を腫瘍細胞へ送達するための担体としての利用が期待されてきている (Motaln H *et al.* *Cancer* 2010 116, Ozawa K *et al.* *J Autoimmun* 2008 30)。さらにMSCは骨髄中に存在し、その培養技術も確立されている。ユーイング肉腫は小児期にみられる悪性骨軟部腫瘍で、MSC由来の腫瘍である (Meltzer P, *Cell*, 2007 1)。本疾患は化学療法や放射線に感受性であるにもかかわらず、骨転移、骨髄浸潤をきたしやすく、進行期のものは集学的な治療を施行しても、難治で予後不良である。このため、本疾患においては新たな治療戦略の確立が求められている。MSCの組織ターゲティング能力、一部の腫瘍に対する障害能力の報告から、ユーイング肉腫細胞株とMSCを共培養し、その抗腫瘍効果に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究ではMSCの組織ターゲティング能力、

ならびに一部の腫瘍細胞に対するアポトーシス誘導効果に着目しとくにユーイング肉腫細胞株を利用した腫瘍細胞障害効果について検討する。さらに担体としてのMSCの働きにも注目しており、MMSCと抗腫瘍剤を共培養し抗腫瘍効果の増強が得られないか検討した。また、ユーイング肉腫細胞株ではNuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)活性化受容体リガンド (RANKL)の高発現がみとめられることが報告されている (LauYS *et al.* *Br. J. Can* 2007. 96)。このことからビスフォスフォネートを添加しその効果を検討し、さらにMSCとの共培養による効果を調べることを計画した。MSCによる抗腫瘍効果が、難治である本疾患の新たな治療戦略の確立の一助となることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1)Ewing肉腫細胞株 (RD-ES, HS-ES)を培養し、その技術を確立する。MSCについてはヒト骨髄間葉系幹細胞 hMSC (TaKaRa PT-2501)、専用培地キット hMSC BulletKit (PT-3001)を使用した。

### (2) Apoptosis assay

腫瘍細胞のアポトーシスを測定・評価し抗腫瘍効果を確認した。

① Annexin VによるApoptosis assayを施行する。ApoAlert AnnexinV-FITCを用いてannexin V陽性細胞をフローサイトメーターを用いて測定する。

② XTT assayを施行する。

③ トリパンブルー染色を行う。

### (3) 共培養

① Ewing肉腫細胞株に抗腫瘍剤を添加しアポトーシスアッセイを行い効果

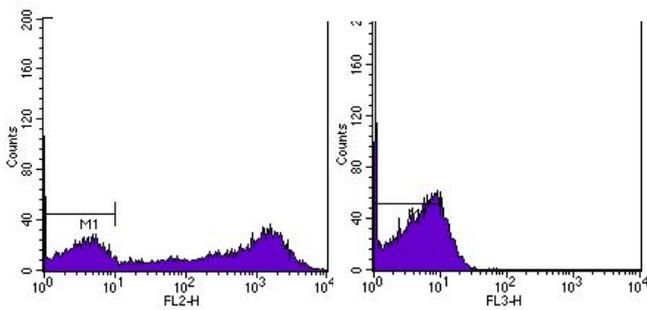
について評価する。また薬剤と腫瘍細胞との比率を増減して至適濃度を決定する。

- ② Ewing肉腫細胞株にhMSCを添加しアポトーシスアッセイを行う。
- ③ 抗腫瘍剤を添加した条件でhMSCとEwing肉腫細胞株を共培養し、アポトーシスアッセイを行う。抗腫瘍剤投与量の比率、MSCの比率を経時的に減し効果を検討する。
- (4) RANKL (NF- $\kappa$ B 活性化受容体リガンド) 測定

Ewing肉腫細胞株においてELISAを用いてRANKLの発現を測定(RANKL ELISA kit, BioMedica)する。この発現を確認した上で、ビスフォスフォネート(ゾメタ)をEwing肉腫細胞株に添加しアポトーシスを測定する。ゾメタ添加下でhMSCとEwing肉腫細胞株を共培養し、効果の差の有無を検討する。ゾメタ投与量とMSCの比率を増減し効果を検討する。

#### 4. 研究成果

- (1)Ewing肉腫細胞株に抗腫瘍剤を添加し、annexin Vによるアポトーシスアッセイを施行した(図1)。ならびにXTTアッセイを行った。

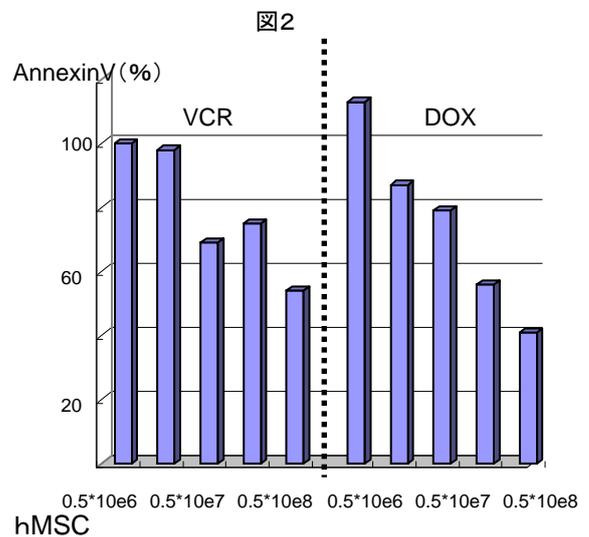


(用いる抗腫瘍剤はEwing肉腫に効果が高いといわれる薬剤を選択し、とくに感受性の高かったビンクリスチン(VCR)とドキソルビシン(DOX)を選択した)

- ①Ewing肉腫細胞株にVCR, DOXをdoseを変更して添加し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られた。

- ②Ewing肉腫細胞株にhMSCを添加し、同様にアポトーシスアッセイを行った。hMSCのみではやや腫瘍細胞は減少したが有意ではなかった。hMSCのdoseを経時的に増量しても同様の結果であった。
- ③Ewing肉腫細胞株にVCR, DOXを添加しさらにhMSCを添加し共培養を行った。hMSCはdoseを経時的に変更して添加し効果を確認した。dose dependentにアポトーシス効果が增強する傾向が得られた(図2)。



(共培養するhMSCは0.5\*10<sup>6</sup>~0.5\*10<sup>8</sup>/μLまでdoseを変更して投与している)

- (2)Bisphosphonateの添加について

①Ewing肉腫細胞株においてRANKLの発現がみとめられることが報告されている

(Zhou et al. Cancer104(8) 2005) 今回使用した細胞株においてRANKLの発現を確認した(RANKL ELISA kit, BioMedica)。

- ②Ewing肉腫細胞株にビスフォスフォネート製剤ゾメタ(zometa, Novartis)を添加しアポトーシスアッセイを施行、効果について評価すると同時に薬剤と腫瘍細胞との比率を増減して至適濃度を

決定する。ゾメタの投与によってアポトーシス効果は得られた。この効果はdose dependentであった。

③Ewing肉腫細胞株にゾメタを添加し、さらに抗腫瘍剤 (VCR, DOX) を添加し共培養を行った。ゾメタの投与によってアポトーシス効果が増強する傾向が認められた。

④Ewing肉腫細胞株にゾメタ、抗腫瘍剤の投与を行いさらにhMSCの投与を行った。hMSCの投与による抗腫瘍効果は増強傾向であった。

Ewing 肉腫細胞株に対して正常な MSC のみの投与では有意な抗腫瘍効果はみとめられなかった。しかし MSC の共存により抗腫瘍剤やビスフォスフォネートの抗腫瘍効果が増強する傾向がみとめられた。この結果から MSC は治療分子を腫瘍細胞へ効果的に到達させる担体として機能している可能性が示唆された。その機序については今後の検討課題となろう。また、今後はこの結果を確立したものとし、さらに近年ユーイング肉腫に対してもその効果が期待されているチロシンキナーゼインヒビターなどの分子標的薬と MSC の共培養を試みたい。さらに近年、注目度の高い脂肪細胞由来の MSC の樹立ができないかの検討を行っており、その技術はほぼ確立している。脂肪細胞由来の MSC は間葉系幹細胞としての機能は保たれており、安定して必要な細胞数が得られる注目度の高い細胞であり、臨床応用の点からも重要と考えている。また、今後は、当初より計画していた in vivo の系での検討を行いたいと考えている。

## 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)

### 1. 雑誌論文 (7 件)

① Miyamura T, Chayama K, Morishima T. et al. Successful treatment of unresectable advanced hepatoblastoma: Living liver transplantation after surgical removal of lung metastasis.; *Pediatr. Transplant.* 2010 Jan 11. Epub. 査読有 (10 人中 1 番目)

② Tomizawa D, Koh K, Miyamura T, Ishii E et al. Outcome of recurrent or refractory acute lymphoblastic leukemia in infants with MLL gene rearrangements: A report from the Japan Infant Leukemia Study Group; *Pediatr Blood Cancer.* 2009 Jul; 52(7) :808-13. 査読有 (7 人中 4 番目)

③ 国定俊之, 宮村能子, 尾崎敏文ほか: 悪性骨軟部腫瘍に対する治療の工夫 小児 (15 歳以下) Ewing肉腫/PNET の治療成績; 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 52 巻 4 号 839-840 2009 査読無 (6 人中 3 番目)

④ 鷺尾佳奈, 宮村能子, 小田慈, 森島恒雄ほか: リツキシマブ併用化学療法を行った再発急性リンパ性白血病の 2 例; 日本小児血液学会雑誌 査読有 23 巻 1 号 37-42 2009

⑤ Miyamura T, Chayama K, Morishima T et al. Two cases of chronic active Epstein-Barr virus infection in which EBV-specific cytotoxic T lymphocyte was induced after allogeneic bone marrow transplantation.; *Pediatr Transplant.* 2008 12(5):588-92 査読有 (11 人中 1 番目)

⑥ Ishida T, Miyamura T, Nakayama E et al. Identification of the HERV-K gag antigen in prostate cancer by SEREX using autologous patient serum and its immunogenicity. *Cancer Immun.* 2008 13;8:15. E pub. 査読有 (15 人中 8 番)

目)

- ⑦ 宮村能子, 茶山公祐, 森島恒雄ほか:  
胃原発パーキットリンパ腫の1例; 日  
本小児科学会雑誌 112 巻 8 号  
1271-1274 2008 査読有(9人中1番目)

2. 学会発表 (7件)

- ① 宮村能子ほか; 乳児急性リンパ性白血病再  
発症例の後方視敵検討—JPSLG MLL03 臨床  
試験より—第 52 回日本小児血液学会総会  
2010. 12. 19 大阪
- ② 宮村能子ほか; 自家移植併用大量化学療法  
を施行し放射線治療を行わず寛解を維持し  
ている乳児脈絡叢癌の2例 第26回日本小  
児がん学会 2010. 12. 17 大阪
- ③ Takako Miyamura et al. Nation-Wide Survey of  
Relapsed Infantile Acute Lymphoblastic  
Leukemia in Japan: Treatment and Outcome From  
the Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma  
Study Group (JPLSG) MLL03 Study. 52 nd  
American Society of Hematology (ASH)  
December 4, 2010 Orlando, USA
- ④ 宮村能子ほか; 発症時よりRSV感染をみとめ  
致死的経過をたどった乳児急性骨髄性白血病  
の1例 第51回日本小児血液学会 2009.  
11. 29 東京
- ⑤ Takako Miyamura et al.: Nation wide survey of  
infant leukemia in Japan. a report from the  
Japanese Pediatric Leukemia/Lymphoma Study  
Group (JPLSG). 50 th American Society of  
Hematology (ASH) December 6, 2008 San  
Francisco, USA
- ⑥ 宮村能子ほか; 乳児期発症の白血病につい  
て後方視的全国調査 第 50 回日本小児血液  
学会総会 2008. 11. 16 千葉
- ⑦ 宮村能子ほか; 肺転移巣切除後生体肝移植  
を施行した進行肝芽腫の1例 第24回日本  
小児がん学会 2008. 11 .15 千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮村 能子 (MIYAMURA TAKAKO)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号: 20379796