

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22847

研究課題名（和文）Ewing肉腫におけるdormant cellの同定とその特性の探索

研究課題名（英文）Identification of Dormant Cells in Ewing sarcoma

研究代表者

竹森 俊幸（Takemori, Toshiyuki）

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20884456

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がんの再発・転移のメカニズムはまだまだ不明な点が多い。近年、がんの再発・転移には非常に少数の細胞集団であるdormant cellの関与が示唆されているが、Ewing肉腫におけるdormant cellの報告はない。我々は、既存のEwing肉腫細胞株からTet on systemを用いて同定・分離した細胞は細胞増殖能が低く、抗がん剤抵抗性を有するdormant cellの特徴を有することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの治療成績は向上しているものの、再発・転移はまだまだ制御困難であり、再発・転移のメカニズムはまだまだ不明な点が多い。様々ながん種でdormant cellの関与が示唆されているが、希少かつ治療困難であるEwing肉腫におけるdormant cellの報告はない。dormant cellは少数の細胞集団でありかつ、骨軟部腫瘍そのものが希少であることから、dormant cellが既存の細胞株から新たなTet on systemを用いて同定・分離可能となったことで、量的制約を解消でき、このdormant cellの特性を探索することで再発・転移のメカニズムの解明につながる事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of local recurrence and distant metastases of cancer remains unclear. Recently, dormant cell, which is a very small population, has been suggested to be involved in local recurrence and distant metastasis of cancer, but there are no reports of dormant cell in Ewing's sarcoma. We have demonstrated that cells identified and isolated from existing Ewing's sarcoma cell lines using the Tet on system have the characteristics of dormant cells with low proliferative capacity and resistance to anticancer drugs.

研究分野：腫瘍学およびその関連分野

キーワード：Dormant cell Ewing肉腫 Tet on system

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍(がん)に対しては手術・化学療法・放射線療法による集学的治療が行われる。近年、検査・治療技術の進歩により治療成績は向上しているものの、いまだ再発・転移は制御困難である。そのため、悪性腫瘍において再発・転移の制御が可能となる有効かつ副作用の少ない治療の確立が不可欠であるが、メカニズムの解析はいまだ発展途上である。

がんの再発・転移の原因として、治療後にも腫瘍細胞が残存し、長期間の休眠状態を経て増殖を再開する腫瘍休眠(tumor cell dormancy)の関与が報告されている。いくつかのがん種において既に研究がなされており、細胞レベルでの細胞周期静止状態 cellular dormancy や、細胞増殖と細胞死が平衡し、細胞塊として静止状態にある tumor mass dormancy が報告されている。

Ewing 肉腫は非常に稀な骨原発性悪性腫瘍であり、治療後の再発・転移率は 30-40%と高く、再発・転移後の 5 年生存率は 13%と非常に予後不良な疾患である。Ewing 肉腫を含む骨軟部悪性腫瘍においても、その再発・転移の原因として dormant cell の関与が示唆されているが、Ewing 肉腫の dormant cell が同定・分離された報告はない。

Dormant cell の性質や機能を解析することは、再発・転移のメカニズム解明につながる可能性がある。しかし、もともと骨軟部悪性腫瘍は稀な疾患であることから極めて少ない細胞集団である dormant cell を同定・分離することは非常に困難かつ労力を要するため、研究の進歩に大きな妨げとなっている。

本研究では目的遺伝子の発現を薬剤性に制御できる Tet on system を用いる。Tet on system を用いた、がん細胞から dormant cell を同定・分離する方法はこれまでに行われておらず、学術的・研究的にも非常に新規性が高い。Tet on system を用いることで効率的に既存の Ewing 肉腫細胞から dormant cell を同定・分離することができる可能性があり、骨軟部悪性腫瘍を代表する希少がんにおいてはその有用性はさらに高いものと考えられる。

さらに極めて少ない細胞集団である dormant cell の機能解明を行うことで、がんの再発・転移メカニズムの解明や新規治療法の開発につながることを予想される。

## 2. 研究の目的

がんに対する治療成績は向上しているが、いまだ再発・転移の制御は困難である。再発・転移のメカニズムはいまだ不明なことが多く、治療も確立されていない。

近年、がんの再発・転移の原因として、細胞周期が停止状態にあり、化学療法や放射線療法に抵抗性を示す休眠細胞(dormant cell)の関与が示唆されている。この dormant cell の機能解明を行うことで、がんの再発・転移メカニズムの解明や新規治療法の開発につながる可能性があり、様々ながん種で研究が進められている。Ewing 肉腫を含む骨軟部悪性腫瘍においても、その再発・転移に tumor cell dormancy の関与が示唆されているが、研究は進んでおらず、dormant cell が同定・分離されたとの報告はない。しかし、Dormant cell は極めて少ない細胞集団であり、dormant cell の同定・分離には非常に困難かつ労力を要するため、研究の進歩に大きな妨げとなっている。

既存の Ewing 肉腫細胞株から目的遺伝子の発現を薬剤依存性に制御できる Tet on system を用いることで、効率的に Ewing 肉腫細胞株から極めて少ない細胞集団である dormant cell の同定・分離が可能となり、サンプルの量的・時機的制約を解消でき、非常に希少な腫瘍である Ewing 肉腫においても研究遂行が可能となる。

さらに、Tet on system により同定・分離することができた dormant cell の特性を探索することで、Ewing 肉腫における tumor cell dormancy の再発・転移への関与について明らかとなる可能性がある。

そこで、本研究の目的は、薬剤依存性に目的遺伝子の発現を制御できる Tet on system を用いて Ewing 肉腫細胞株から dormant cell を同定・分離すること。また、同定・分離された dormant cell の特性を探索することで、Ewing 肉腫における tumor cell dormancy の再発・転移のメカニズムや新規治療法の開発につなげることである。

## 3. 研究の方法

本研究は、Ewing 肉腫における再発・転移、治療抵抗性に関わる因子の解明を目指すことを目的に、dormant cell 研究を遂行する手法として、Tet on system を応用して行う。基礎研究において広く用いられるヒト Ewing 肉腫細胞株 RD-ES から Tet on system を用いて dormant cell を同定・分離し、その細胞特性を *in vitro* にて評価・検討を行った。

ヒト Ewing 肉腫細胞株を用いた dormant cell の同定・分離

ヒト Ewing 肉腫細胞株 RD-ES に Tet on system 作動に必要なプラスミドを Lipofection 法にて導入する。導入後細胞に 2 日間ドキシサイクリン (Dox) 刺激を加えると、H2B-GFP の発現が誘導され、細胞は蛍光を発する。次に、Dox 刺激を除去すると、細胞分裂時に分解される特徴を有する H2B が分解されるため、細胞分裂した細胞は GFP 蛍光を失い (GFP 陰性細胞)、逆に分裂していない細胞は GFP を保持する (GFP 陽性細胞)。GFP 陽性細胞を dormant cell として同定・分離する (図 1)。

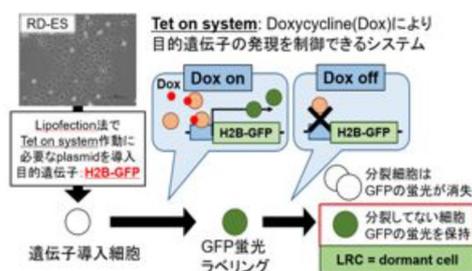


図1. Tet on system

### Dormant cell の細胞特性の評価

上記で同定・分離した GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞について、細胞増殖能と抗がん剤耐性能を評価する。

### 4. 研究成果

Flow cytometry を用いて GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の分離を行った。GFP 陽性細胞の割合は  $1.59 \pm 0.2\%$  と極めて少ない細胞集団であった (図 2)。

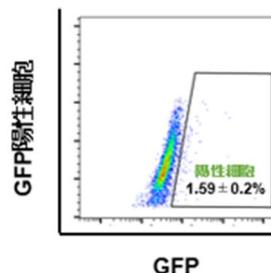


図2 GFP陽性細胞の分離

GFP 陽性細胞と GFP 陰性細胞の両細胞間で細胞増殖能の比較を WST-8 assay にて行った (図 3)。また、Flow cytometry を用いて両細胞間で抗がん剤 (ドキシソルビシン) 抵抗性を評価した (図 4)。

GFP 陽性細胞は GFP 陰性細胞と比較して、細胞増殖能が低く、ドキシソルビシンに対する抵抗性が高かった。

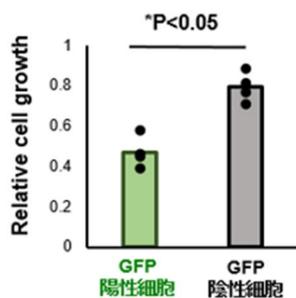


図3 細胞増殖能の比較

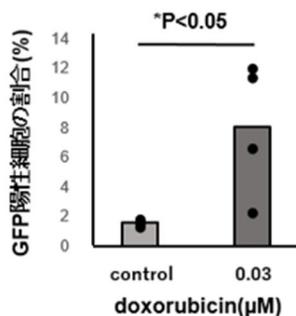


図4 抗がん剤耐性能

以上の結果から、同定・分離された GFP 陽性細胞は dormant cell としての特性を有していることが明らかとなった。

本研究は、はじめて既存の Ewing 肉腫細胞株から Tet on system を用いて dormant cell を同定・分離することに成功した。同定・分離された dormant cell の特性を探索することで、今後再発・転移のメカニズムの解明や早期診断、新たな治療の開発につながる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名	八尋俊輔、河本旭哉、川上洋平、原仁美、竹森俊幸、藤原周一、北山和道、宮本智弘、青井貴之、黒田良祐、秋末敏宏
2. 発表標題	Ewing肉腫におけるcellular dormancyの同定とその特性の探索
3. 学会等名	第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Shunsuke Yahiro, Teruya Kawamoto, Hitomi Hara, Yohei Kawakami, Toshiyuki Takemori, Shuichi Fujiwara, Kazumichi Kitayama, Tomohiro Miyamoto, Takashi Aoi, Michiyo Koyanagi-Aoi, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題	Identification of Dormant Cells in Ewing sarcoma
3. 学会等名	Orthopaedic Research Society 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	八尋 俊輔, 河本 旭哉, 川上 洋平, 原 仁美, 竹森 俊幸, 藤原 周一, 北山 和道, 宮本 智弘, 青井 貴之, 青井(小柳) 三千代, 黒田 良祐, 秋末 敏宏
2. 発表標題	Ewing肉腫におけるslow cycling cellsの同定
3. 学会等名	第54回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	八尋 俊輔, 河本 旭哉, 原 仁美, 竹森 俊幸, 藤原 周一, 北山 和道, 宮本 智弘, 青井 貴之, 青井 三千代, 黒田 良祐, 秋末 敏宏
2. 発表標題	Ewing肉腫におけるslow-cycling cellsの同定
3. 学会等名	第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年	2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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