

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07750

研究課題名(和文) 神経芽腫のがん微小環境制御における間葉系幹細胞の役割に関する研究

研究課題名(英文) Role of mesenchymal stem cells in the regulation of neuroblastoma microenvironment

研究代表者

西村 範行(Nishimura, Noriyuki)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：00322719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高リスク神経芽腫患者の大部分は一旦治療に反応して寛解に達するが、その半数以上は再発して治療抵抗性を獲得し、長期生存は難しい。これは、神経芽腫の再発では治療後に体内に残存したがん細胞が再活性化し、遺伝子変異を伴わずに異なる形質を示すためだと考えられる。化学療法や放射線療法の治療後のがん微小環境には、亜致死となった(治療誘発細胞老化：TIS)細胞が存在し、サイトカイン等の分泌が亢進する(細胞老化随伴分泌現象：SASP)ことが知られている。そこで本研究では、がん微小環境の構成細胞で分泌活性の高い間葉系幹細胞(MSC)に注目し、MSCのSASPによって分泌される分子の同定と機能解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高リスク神経芽腫は、患者の半数以上が再発して治療抵抗性を示す代表的な難治性小児がんである。再発した高リスク神経芽腫患者の治療抵抗性獲得には、治療後に体内に残存したがん細胞が遺伝子変異を伴わずに異なる形質を示すことが重要で、がん微小環境中の細胞から分泌される因子の同定が必須だと考えられる。そこで本研究では、神経芽腫のがん微小環境の主要な構成細胞で分泌活性の高い間葉系幹細胞(MSC)の役割を明らかにすることを試みた。その成果は、高リスク神経芽腫患者に対する新たな治療法の開発、予後の改善に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Although most high-risk neuroblastoma (NB) patients initially respond to therapy and reach remission, more than half of them relapse and develop the therapy-resistance, making long-term survival difficult. This is because residual NB cells left in the body after therapy frequently show different characteristics without genetic mutations. After chemotherapy and radiation therapy, sub-lethally damaged (therapy-induced senescence: TIS) cells are known to increase the secretion of exosomes, cytokines, and other substances (senescence-associated secretory phenotype: SASP). In the present study, we focus on mesenchymal stem cells (MSCs) with high secretory activity and aim to identify and characterize the molecules secreted by SASP from MSCs.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：高リスク神経芽腫 微小残存病変 間葉系幹細胞 治療誘発細胞老化 細胞老化随伴分泌現象

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は、小児がん死亡の約 15%を占める代表的な小児難治性固形がんである。神経芽腫患者の転帰はリスクによって著しく異なっており、低・中間リスクの患者は殆ど亡くならず治療強度の軽減が図られているのに対して、高リスク患者の長期生存率は未だ 50%に満たず更なる治療強化、新規治療法の開発が求められている。高リスク患者では、その半数以上に再発・再増大がみられ、一旦再発・再増大した患者の 90%以上が亡くなっている。この再発・再増大は、治療終了後も残った微小残存病変 (MRD) の再活性化によると考えられ、世界中の多くのグループによって MRD の検出が試みられている。神経芽腫では、腫瘍細胞特異的なゲノム DNA の再構成や融合遺伝子が同定されていないため、正常細胞に比して腫瘍細胞での発現量が著しく多い遺伝子の mRNA (NB-mRNA) がマーカーとして選択されている。複数のマーカーを組み合わせた MRD 評価法が多数報告されてきたが、高リスク患者における MRD の変動を正確に把握することは未だ困難である。

近年のゲノム解析によって、がんは、遺伝子変異の違いに基づいた性質の異なるがん細胞から構成される不均一な集団であることが示された。さらに、自己複製能および多分化能を持ち少数の細胞からがんを形成できるがん幹細胞 (CSC) と呼ばれる細胞集団は、分化度の異なるその他のがん細胞 (non-CSC) を産み出している。このようながんの多様性は、がんの進展・再発に深く関与しており、特に、同一の遺伝子変異を有するがん細胞が微小環境の違いや治療によって異なる形質を示すようになった場合は、極めて治療困難になることが明らかになってきた。神経芽腫では、高リスク患者の大多数は、一旦治療に反応して寛解を達成するが、その半数以上が再発・再増大し、極めて治療困難になっている。

この異なる形質の発現は、がん細胞およびその微小環境から分泌されるエクソソーム、サイトカイン、成長因子、プロテアーゼといった様々な分泌因子によって制御されると考えられる。現状の化学療法や放射線療法は、がん細胞を選択的に全て死滅することは困難で、治療後に亜致死となったがん細胞および間質細胞に、不可逆的な細胞増殖停止 (細胞老化: cellular senescence) を誘導している (治療誘発細胞老化: TIS, therapy-induced senescence)。細胞老化を起こした細胞 (老化細胞) では、エクソソームや種々のサイトカインといったがんや炎症を促進または抑制する因子の分泌が亢進する (細胞老化随伴分泌現象: SASP, senescence-associated secretory phenotype) ことが知られている。臨床的には、CSC の集団、MRD に含まれる細胞集団、TIS 細胞の集団は、大部分がオーバーラップしていると予想されるが、それらの異同の詳細は未だ明らかになっていない。つまり、現状の高リスク神経芽腫の治療で再発・再増大して極めて治療困難になる患者を救済するためには、神経芽腫細胞とその微小環境の相互作用を担う分泌因子の同定とその機能解析が必須だと考えられる。

これまでに研究代表者らは、神経芽腫患者の腫瘍組織では、腫瘍関連マクロファージ (TAM) ががん関連線維芽細胞 (CAF) は近接して存在し、それらの数は病期分類およびリスク分類と相関していること、末梢血中のマクロファージ、骨髄中の間葉系幹細胞 (MSC) は腫瘍部位に集積してそれぞれ TAM、CAF に活性化され、神経芽腫のがん微小環境を形成すること、がん微小環境において MSC、CAF の分泌活性が高いことを示してきた。

2. 研究の目的

極めて治療困難な高リスク神経芽腫の病態理解を目指して、がん微小環境の主要な構成細胞で分泌活性の高い間葉系幹細胞 (MSC) の細胞老化随伴分泌現象 (SASP) によって分泌される分子を同定し、その機能を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 複製誘発細胞老化 (RS) した臍帯由来間葉系幹細胞 (RS-UC-MSC) の細胞老化随伴分泌現象 (SASP) によって分泌される分子 (RS-UC-MSC の SASP 分子) の単離・同定

正期産児の UC-MSC は 50 回以上の継代で RS が誘導されたので、継代数 50 回以上の UC-MSC (RS-UC-MSC) と継代数 5 回以下の UC-MSC (non-RS-UC-MSC) の培養上清を回収した。銀染色した SDS-PAGE ゲル上で non-RS-UC-MSC 上清に比して RS-UC-MSC 上清で濃いバンドを質量分析 (LC-MS/MS) で同定した。

(2) 治療誘発細胞老化 (TIS) した骨髄由来間葉系幹細胞 (TIS-BM-MSC) の SASP によって分泌される分子 (TIS-BM-MSC の SASP 分子) の同定

BM-MSC は 15 回以上の継代で RS が誘導されたが、継代数 5 回以下であっても (non-RS-BM-MSC) 高リスク神経芽腫患者の治療に用いられるシスプラチン (CDDP)、テモゾロミド (TMZ) 処理によって TIS が誘導されたので、30 μ M CDDP、3mM TMZ で 72h 処理した BM-MSC (TIS-BM-MSC) と無処理の BM-MSC (non-TIS-BM-MSC) の培養上清を回収し、培養上清中のタンパク質を Western blot で同定した。

(3) TIS-BM-MSC の SASP 分子の細胞増殖能評価

神経芽腫 BE(2)-C 細胞および BM-MSC の培養上清に TIS-BM-MSC の SASP 分子を添加して、それ

らの細胞増殖を cell count、MTS アッセイにて測定した。

(4) 高リスク神経芽腫患者検体における TIS-BM-MSC の SASP 分子の発現解析

高リスク神経芽腫患者の腫瘍検体における SASP 分子 mRNA の発現量と予後(無再発生存率)との関連を R2 データベース(<http://r2platform.com>)を用いて検討した。健常人コントロールの血清、高リスク神経芽腫患者の治療経過中骨髄および血清における TIS-BM-MSC の SASP 分子の濃度は ELISA で測定した。

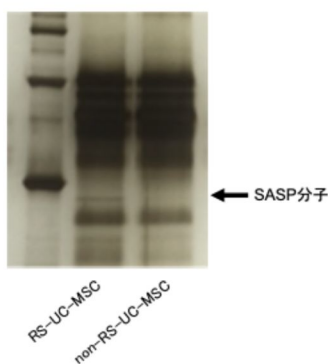
4. 研究成果

(1) RS-UC-MSC の SASP 分子の単離・同定

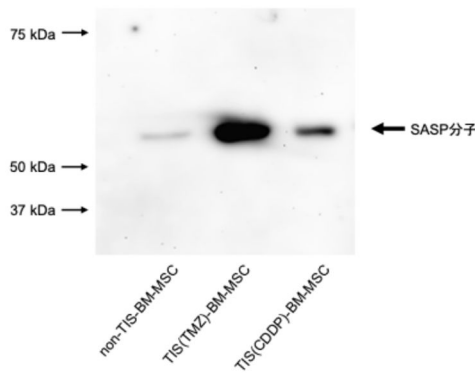
54 回継代培養した RS-UC-MSC と 4 回継代培養した non-RS-UC-MSC から培養上清を回収した。銀染色した SDS-PAGE ゲル上で non-RS-UC-MSC 上清に比して RS-UC-MSC 上清で濃いバンドを切り出し、質量分析(LC-MS/MS)で RS-UC-MSC の SASP 分子を同定した。

(2) TIS-BM-MSC の SASP 分子の同定

3 回継代培養した non-RS-BM-MSC を 30 μ M CDDP、3mM TMZ で 72h 処理した TIS-BM-MSC と無処理の non-TIS-BM-MSC の培養上清を回収し、RS-UC-MSC の SASP 分子に対する抗体を用いて Western blot した。RS-UC-MSC の SASP 分子は、non-TIS-BM-MSC に比して TIS-BM-MSC で著しい発現上昇を認め、TIS-BM-MSC の SASP 分子でもあることを明らかにした。



複製老化した臍帯由来間葉系幹細胞 (RS-UC-MSC) の SASP 分子

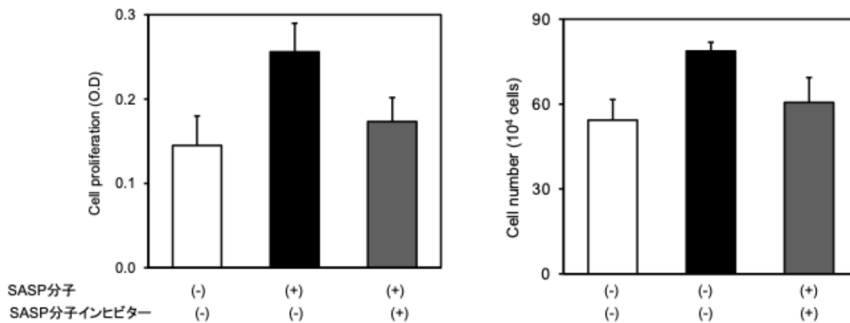


治療誘発老化した骨髄由来間葉系幹細胞(TIS-BM-MSC) における SASP 分子の発現

(3) TIS-BM-MSC の SASP 分子の神経芽腫細胞の増殖におよぼす効果

神経芽腫 BE(2)-C 細胞を 80nM SASP 分子タンパク質、12 μ M SASP 分子阻害剤の存在下または非存在下で 72h 培養し、それらの細胞増殖を MTS アッセイ、cell count にて測定した。

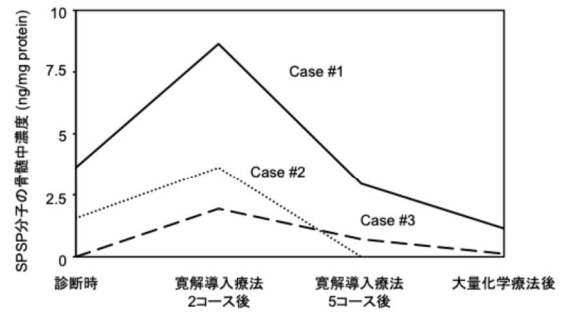
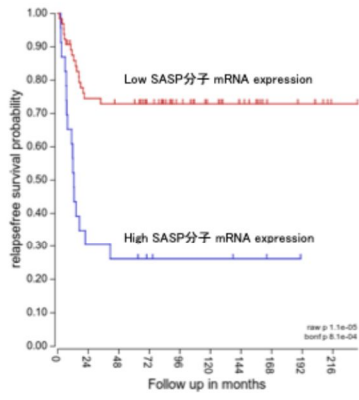
(4) 高リスク神経芽腫患者検体における TIS-BM-MSC の SASP 分子の発現



SASP分子の神経芽腫BE(2)-C細胞に対する細胞増殖促進効果

高リスク神経芽腫患者の腫瘍検体における TIS-BM-MSC の SASP 分子 mRNA の発現量と予後(無再発生存率)との関連を既存のコホートデータを用いて検討すると、TIS-BM-MSC の SASP 分子 mRNA の高発現腫瘍は低発現腫瘍に比して、統計学的有意差を持って予後不良だった。また、高リスク神経芽腫患者検体中の TIS-BM-MSC の SASP 分子の濃度は、血清に比して骨髄で高かった。TIS-BM-MSC の SASP 分子の骨髄中濃度を治療経過で比較すると、治療開始前に比して寛解導入療

法2コース後に上昇し、その後、治療開始前のレベル以下まで減少した。



高リスク神経芽腫患者の治療経過に伴うSASP分子の骨髄中濃度の変化

腫瘍検体におけるSASP分子mRNAの発現量と高リスク神経芽腫患者の無再発生存率との関連

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Lin Kyaw San, Uemura Suguru, Thwin Khin Kyae Mon, Nakatani Naoko, Ishida Toshiaki, Yamamoto Nobuyuki, Tamura Akihiro, Saito Atsuro, Mori Takeshi, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Nino Nanako, Nagano China, Takafuji Satoru, Iijima Kazumoto, Nishimura Noriyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 Minimal residual disease in high-risk neuroblastoma shows a dynamic and disease burden-dependent correlation between bone marrow and peripheral blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101019 ~ 101019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2021.101019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uemura Suguru, Lin Kyaw, Mon Thwin Khin Kyae, Nakatani Naoko, Ishida Toshiaki, Yamamoto Nobuyuki, Tamura Akihiro, Saito Atsuro, Mori Takeshi, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Nino Nanako, Nagano China, Takafuji Satoru, Iijima Kazumoto, Nishimura Noriyuki	4. 巻 15
2. 論文標題 Limited correlation between tumor markers and minimal residual disease detected by seven neuroblastoma-associated mRNAs in high-risk neuroblastoma patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2021.2299	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konno Saori, Yanagisawa Ryu, Kubota Noriko, Ogiso Yoshifumi, Nishimura Noriyuki, Sakashita Kazuo, Tozuka Minoru	4. 巻 117
2. 論文標題 Investigation of patient factors associated with the number of transfusions required during chemotherapy for high risk neuroblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vox Sanguinis	6. 最初と最後の頁 71 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vox.13128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nino Nanako, Ishida Toshiaki, Nakatani Naoko, Lin Kyaw San, Win Kaung Htet Nay, Mon Cho Yee, Nishimura Akihiro, Inoue Shotaro, Tamura Akihiro, Yamamoto Nobuyuki, Uemura Suguru, Saito Atsuro, Mori Takeshi, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Nozu Kandai, Nishimura Noriyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Minimal residual disease detected by droplet digital PCR in peripheral blood stem cell grafts has a prognostic impact on high-risk neuroblastoma patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e10978 ~ e10978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e10978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Shotaro, Nay Win Kaung, Mon Cho, Fujikawa Tomoko, Hyodo Sayaka, Uemura Suguru, Ishida Toshiaki, Mori Takeshi, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Nishimura Akihiro, Nakatani Naoko, Nino Nanako, Tamura Akihiro, Yamamoto Nobuyuki, Nozu Kandai, Nishimura Noriyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Higher levels of minimal residual disease in peripheral blood than bone marrow before 1st and 2nd relapse/regrowth in a patient with high?risk neuroblastoma: A case report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2023.13955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Noriyuki, Ishida Toshiaki, Yokota Isao, Matsumoto Kimikazu, Shichino Hiroyuki, Fujisaki Hiroyuki, Sarashina Takeo, Kamijo Takehiko, Takimoto Tetsuya, Iehara Tomoko, Tajiri Tatsuro, on behalf of the JCCG Neuroblastoma Committee	4. 巻 12
2. 論文標題 Minimal Residual Disease Detected by the 7NB-mRNAs ddPCR Assay Is Associated with Disease Progression in High-Risk Neuroblastoma Patients: A Prospective Multicenter Observational Study in Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1350 ~ 1350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biology12101350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 植村優, Lin KS, Thwin KK, 中谷尚子, 石田敏章, 山本暢之, 田村彰広, 齋藤敦郎, 森健, 長谷川大一郎, 小阪嘉之, 二野菜々子, 長野智那, 高藤哲, 飯島一誠, 西村範行.
2. 発表標題 高リスク神経芽腫における微小残存病変(MRD)と腫瘍マーカーの相関に関する臨床的検討.
3. 学会等名 第124回日本小児科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lin KS, Uemura S, Thwin KK, Ishida T, Yamamoto N, Nishimura N.
2. 発表標題 Disease burden-dependent correlation of neuroblastoma minimal residual disease between bone marrow and peripheral blood.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nishimura N, Ishida T, Yokota I, Matsumoto K, Shichino H, Fujisaki H, Sarashina T, Kamijo T, Takimoto T, Iehara T, Tajiri T.
2. 発表標題 Prospective multicenter observational study aimed at validating a prognostic value of minimal residual disease in high-risk neuroblastoma patients
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2023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
研究分担者	山本 暢之 (Yamamoto Nobuyuki) (20596043)	神戸大学・医学部附属病院・講師 (14501)	

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