

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591976

研究課題名（和文）神経芽腫のがん幹細胞を標的とする腫瘍融解ウイルスを用いた新規治療開発研究

研究課題名（英文）Establishment of a novel therapeutic approach targeting cancer stem cells of neuroblastoma using oncolytic virus

研究代表者

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60210712

研究成果の概要（和文）：がん幹細胞は多分化能と自己複製能をもち、がん発生の起点となる細胞と考えられている。神経芽腫では sphere culture 法によりがん幹細胞様の特徴をもつ細胞集団を抽出できることがこれまで明らかにされてきた。今回 sphere culture 法によって得られた細胞の抗がん剤耐性と腫瘍融解ウイルスの殺細胞効果について検討した。神経細胞株 IMR32 と、IMR32 をもとに sphere culture 法にて得られた細胞集団（sIMR32）の薬剤感受性を検討するとシスプラチンによる殺細胞効果は IMR32 においてより顕著であった。一方 HSV-1 による殺細胞効果は両群間で有意差はなかった。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells have potentials of self-renewal and differentiate. Cancer stem cell-like cells could be extracted through the sphere culture method. Neuroblastoma cell line IMR32 and sIMR32 (cells extracted through sphere culture) were compared for chemosensitivity. IMR32 were more susceptible to cisplatin treatment. However, there was no difference in the cytotoxicity by HSV-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：小児外科学

科研費の分科・細目：小児外科学

キーワード：神経芽腫、腫瘍融解ウイルス、がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

（1）神経芽腫はいまだ難治性の小児がんである。神経芽腫はわが国では白血病について多い小児癌であり、年間におおよそ 200 例前後の発症があるとされる。手術・化学療法・放射線療法を組み合わせた集学的治療の進歩にも関わらず、進行神経芽腫の治療成績はいまだ極めて不良である。本来神経芽腫

は化学療法に対する感受性が高く、初発時に遠隔転移を伴う神経芽腫であってもその 7 割近くで一旦は腫瘍がほぼ消失し、完全寛解となる。しかし後にその約半数が再発し不幸な転帰をたどる。

近年、がんの再発と難治性に強い自己複製能と多分化能といった幹細胞機能を有するごく少数の細胞群（がん幹細胞）の関与が注目されている。正常組織の幹細胞が組

織の形成と維持を担うように、がん幹細胞は癌の形成・維持を担うため、**tumor initiating cell** ともよばれる。がん幹細胞は抗がん剤排出能力、中和能力、DNA 修復能力などを有しており、さらに特殊な微小環境(ニッチ)内で休眠状態(**quiescence**)として存在しているため増殖する細胞を標的とする従来の抗がん剤や放射線療法をはじめとするがん治療法は効果がない。それゆえがん幹細胞はがん再発の責任細胞であると考えられており、がん幹細胞を標的とした従来と **modality** の異なる治療の開発はがんの治療成績向上のために必要とされている。神経芽腫のがん幹細胞を同定する試みも多く報告されており、幹細胞培養用の無血清特殊培地での **tumorsphere** 形成能あるいは **Hoechst33342** 排泄能を用いた **FACS** による細胞ソーティングの技術により癌幹細胞様の自己増殖能と多分化能を有する細胞が精製されている。これらの細胞は免疫不全マウスにおける造腫瘍能をもつだけでなく、抗がん剤への抵抗性を示し、芽腫の治療抵抗性と再発に寄与していると考えられる。現時点で神経芽腫の幹細胞を普遍的に精製できるマーカーは同定されていないが、上述の手法を用いて治療抵抗性神経芽腫の実験モデルとなる「幹細胞リッチ」な細胞群を得て新規治療法の効果を検討することは十分に妥当であると考えられる。

(2) 腫瘍融解ウイルス療法について  
腫瘍融解ウイルス療法は、正常組織を障害することなく腫瘍細胞の中でのみ選択的に増殖しうるウイルスまたはウイルスベクターの開発により、効果的かつ安全な治療として臨床応用に近づいてきている。さらに従来の化学療法や放射線療法と異なる機序の抗腫瘍効果を持つため、乳がん、脳腫瘍などで腫瘍融解ウイルスのがん幹細胞に対する殺細胞効果が示されている。腫瘍融解ウイルスは今後のがん幹細胞を標的とした新規治療法のもっとも有力な候補のひとつであると考えられる。われわれはこれまでに遺伝子改変のない **RNA** ウイルスである野生型シンドビスウイルス (**SIN AR339** 株)の神経芽腫に対する抗腫瘍効果について検討してきた。その結果 **SIN AR339** 株は神経芽腫似たいし強い腫瘍融解効果をもつことが明らかにされた(未発表データ)。**SIN AR339** 株は正常細胞にはほとんど毒性を持たず、また非常に強い腫瘍選択的感染性を持ち(**Unno et al. Clin Cancer Res 11, 4553-4560, 2005**)、腫瘍融解ウイルスとして望ましい条件をそろえている。さらに神経芽腫に特異的な効果として、増殖能を失った **SIN AR339** 株による神経芽腫細胞のアポトーシス誘導も確認されている(未発表データ)。つまり、**SIN**

**AR339** 株は感染/増殖による **CPE** 以外の殺細胞能も有しており、神経芽腫細胞を多角的に消滅させる能力をもつ。

また遺伝子改変をおこなった増殖型単純ヘルペスウイルス 1 型 (**HSV-1**) はもっとも広く研究されている腫瘍融解ウイルスのひとつであるが、神経芽腫に対しては二重変異 **HSV-I** の **G207**、三重変異 **HSV-1** の **G47Δ** が強い殺細胞効果を持つことが明らかにされている(**Todo et al. PNAS 98,6346-6401, 2001**; **Fukuhara et al. Cancer Res, 65, 10663-10668**)。現在われわれがおこなっている **G47Δ** の改良型 **T-01** のヒト神経芽腫細胞株を用いた研究においても、強い抗腫瘍効果を確認している(未発表データ)。

このように神経芽腫は腫瘍融解ウイルスの標的となりうる腫瘍であり、幹細胞機能を有する細胞集団に対してもその効果が期待される。

## 2. 研究の目的

1) 神経芽腫培養細胞株を用いた **tumorsphere** を作成し、**tumor initiating cell** を高頻度を含む細胞集団を安定して得る方法を確立する。

2) 上記手法により得られた細胞集団につき薬剤抵抗性の獲得と免疫不全マウスにおける造腫瘍能について検討する。

3) **in vitro**、**in vivo** における腫瘍融解ウイルスの殺細胞効果・抗腫瘍効果について検討する。

## 3. 研究の方法

1) 神経芽腫培養細胞株からがん幹細胞様の細胞を得る系の確立

① **Hoechst33342** 排泄能による細胞抽出

(**Side population** 法)

神経芽腫細胞株 (**MYCN** 増幅株: **IMR32**、**CHP134**、**LA-N-5**; **MYCN** 非増幅株: **SH-SY5Y**) を継代培養し  $1 \times 10^6$ /ml となるよう調整し、**Hoechst33342** (5ug/ml final) ± **Verapamil** (**ABC** トランスポーター阻害剤) で  $37^{\circ}\text{C}$  90 分染色し **FACS** にて **SP** 分画を同定しこれをソートする。

② **Sphere** 形成法

**Neural stem cell** の cloning に用いられる神経芽腫細胞株 (**MYCN** 増幅株: **IMR32**、**CHP134**、**LA-N-5**; **MYCN** 非増幅株: **SH-SY5Y**) を継代培養したのち、**proliferation medium** (**DMEM-F12**, 3:1, 100U/ml ベニシリン/ストレプトマイシン、2% **B27 supplement**、40 ng/mL **bFGF2**, 20 ng/mL **EGF**) にて 5% **CO2**,  $37^{\circ}\text{C}$  にて培養する(**Hansford LM et al. Cancer Res 67, 11234-11243, 2007.**)。週 1 回新鮮な **proliferation medium** を足し、継代の際は新鮮な培地と **conditioned medium** を半量ずつまぜて新たな培地とする。

## 2) がん幹細胞様細胞の薬剤耐性獲得の検討

上記手法により得られた細胞集団につき、抗がん剤に対する感受性を検討する。神経芽腫の治療に使用される cisplatin、doxorubicin をもちい、cytotoxicity の検討をおこなう。

3) がん幹細胞様細胞に対する腫瘍融解ウイルスの殺細胞効果  
同様に上記の細胞集団につき、遺伝子改変 HSV-1 (T-01) の効果を検討する。

## 4. 研究成果

### 1) がん幹細胞様細胞集団の同定

はじめに Side population 法による同定を試みた。数種の細胞株につき繰り返し検討を行ったが、神経芽腫細胞株における side population はきわめて少なく、FACS にて同定することは非常に困難であった。このため他グループですでに使用されている Sphere culture 法を採用した。神経芽腫培養細胞株 IMR32 を培養し、底面に接着させたところで培養液を DMEM:F-12=1:1 に B-27 supplement, bFGF, EGF を添加した無血清培地に交換し培養を継続した。これにより 7 日前後で底面に接着していた細胞が球状にまとまり sphere を形成した。Sphere 形成は IMR32 でもっとも安定しており、これ以降の実験は IMR32 を用いておこなった。

### 2) 薬剤耐性の検討

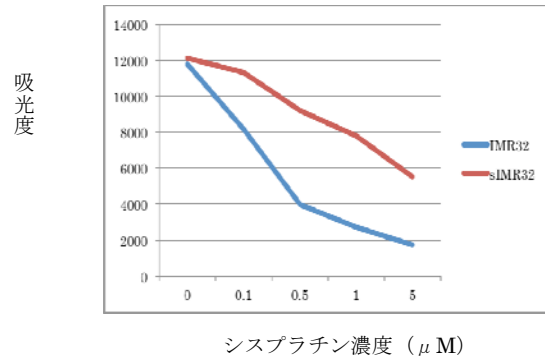
上記により得られた sphere と未処理の IMR32 を用いて cisplatin と doxorubicin に対する薬剤耐性の検討をおこなった。Viable cell の測定には Cell Titer Pro をもちいた。

1. 増殖曲線: IMR32 tumor sphere の増殖速度は親株に比べきわめて遅いが、浮遊した状態で確実に増殖し続ける。

### 2. Sphere 形成細胞の薬剤耐性:

Cisplatin 0~5 $\mu$ M による殺細胞効果を同様に検討した。シスプラチン添加後 24 時間、0.1%FCS 下に培養し生細胞数を検討した。sIMR32 (sphere 形成 IMR32) では抗がん剤に対する耐性を獲得していることが示唆された。(図 1)

(図 1) シスプラチンによる IMR32 と sphere 形成細胞の殺細胞効果



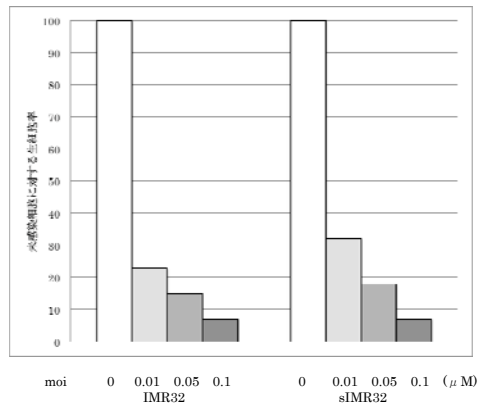
### 3) Tumor sphere 細胞に対する HSV-1 の効果

同様に 0.1%FCS 下で 24 時間後の生細胞数の検討を HSV-1 を moi 0.01, 0.05, 0.1 の濃度で感染させておこなった。

感染後 24 時間の生細胞数を非感染細胞に対する比で表した (図 2)

この結果 tumor sphere と IMR32 ではほぼ同等に HSV-1 への感受性がみられる結果が示された。

図 2 HSV-1 による IMR32 と sphere 形成細胞の殺細胞効果



以上の結果より、IMR32 においては sphere 形成細胞の抗がん剤に対する耐性は増強しているが、腫瘍融解ウイルスによる殺細胞効果は同等にみられることが示唆された。ただし、この現象は条件の違いにより安定して得られないことが経験された。今後さまざまな条件設定で検証を繰り返す必要がある。

## 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Hossain S, Takatori A, Nakamura Y, Suenaga Y, Kamiyo T, Nakagawara A. NLRR1 enhances EGF-mediated MYCN induction in neuroblastoma and accelerates tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 72:4587-4596, 2012. (査読あり)
- ② Kamiyo T. Role of stemness-related molecules in neuroblastoma. *Pediatr Res.* 71:511-515, 2012. (査読あり)
- ③ Kamiyo T, Nakagawara A. Molecular and genetic bases of neuroblastoma. *Int J Clin Oncol.* 17:190-195, 2012. (査読あり)
- ④ Hishiki T, Saito T, Terui K, Sato Y, Takenouchi A, Yahata E, Ono S, Nakagawara A, Kamiyo T, Nakamura Y, Matsunaga T, Yoshida H. Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high-sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. *J Pediatr Surg.* 45:2293-2298, 2012. (査読あり)
- ⑤ Hishiki T, Saito T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Matsuura G, Saito E, Shibata R, Mise N, Yokoyama Y, Yoshida H. Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner. *Pediatr Surg Int.* 27:225-230, 2011. (査読あり)
- ⑥ Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamiyo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene.* 30:97-105, 2011. (査読あり)
- ⑦ Shi Y, Takenobu H, Kurata K, Yamaguchi Y, Yanagisawa R, Ohira M, Koike K, Nakagawara A, Jiang LL, Kamiyo T. HDM2 impairs Noxa transcription and affects apoptotic cell death in a p53/p73-dependent manner in neuroblastoma. *Eur J Cancer.* 46: 2324-2334, 2010. (査読あり)
- ⑧ Ochiai H, Takenobu H, Nakagawa A,

Yamaguchi Y, Kimura M, Ohira M, Okimoto Y, Fujimura Y, Koseki H, Kohno Y, Nakagawara A, Kamiyo T. Bmi1 is a MYCN target gene that regulates tumorigenesis through repression of KIF1Bbeta and TSLC1 in neuroblastoma. *Oncogene.* 29: 2681-2690, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

- ① 菱木知郎 ほか. 小児悪性固形腫瘍に対する NKT 細胞系を用いた新規免疫療法の開発研究. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年12月01日 横浜
- ② 菱木 知郎 ほか. Review of surgical treatment in patients enrolled in the JNBSG high risk neuroblastoma clinical trial (A phase II study of multidisciplinary approach to establish standard treatment for advanced neuroblastoma) A report from Japan Neuroblastoma Study Group (JNBSG). 第54回日本小児血液・がん学会学術集会 2012年12月01日 横浜
- ③ 竹信尚典、上條岳彦、ほか. 神経芽腫/脳腫瘍スフェア特異的な CD133 発現調節機構第53回 日本小児血液・がん学会 学術集会 2011年11月 前橋
- ④ Hishiki T et al Reevaluation of trkA expression as a biological marker of neuroblastoma by high sensitivity expression analysis—a study of 106 primary neuroblastomas treated in a single institute. 42<sup>nd</sup> annual meeting of PAPS 2010年6月 神戸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 英生 (YOSHIDA HIDEO)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：60210712

### (2) 研究分担者

菱木 知郎 (HISHIKI TOMORO)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：00375776

上條 岳彦 (KAMIJO TAKEHIKO)  
千葉県がんセンター (研究所)・発がん研究グループ・部長  
研究者番号：90262708

白澤 浩 (SHIRASAWA HIROSHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：00216194

齋藤 武 (SAITO TAKESHI)  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：20406044