

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592630

研究課題名(和文)小児横紋筋肉腫における癌幹細胞の同定と免疫療法に向けた基礎的研究

研究課題名(英文)The identification of cancer stem cell in rhabdomyosarcoma in childhood.

研究代表者

上原 秀一郎(Shuichiro, Uehara)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00448060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：横紋筋肉腫細胞において癌幹細胞が存在し、治療対象となり得るかを検証するためヒト胚型横紋筋肉腫細胞株(RH30)を用い、無血清培地でCSCを誘導した。無血清培地で誘導した細胞はSphere形成能とコロニー形成能、造腫瘍能が上昇していた。さらに胎児型横紋筋肉腫細胞株(RD)を用い、ALDH1活性上昇細胞群が癌幹細胞の性格を有するかを検討した。ALDH1活性上昇群におけるコロニー形成能、多分化能、薬剤耐性能は活性低下群に比して、優位に上昇し、造腫瘍能も亢進していた。以上よりALDH1は胎児型横紋筋肉腫癌幹細胞のマーカーとなることが示唆され、新たな治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to determine the role of cancer stem cell(CSC) in rhabdomyosarcoma. CSC of alveolar rhabdomyosarcoma was induced under serum-free medium. These cells exhibited the increase of the abilities of sphere formation, colonization, and tumor formation. In embryonal type rhabdomyosarcoma cell(RD), we developed the hypothesis that the cells with high ALDH1 activity had the character of the cancer stem cell. The cells with high ALDH1 activity showed the increase of the abilities of sphere formation, colonization, drug resistance and tumor formation. These results suggest that ALDH1 is a relevant marker for alveolar type rhabdomyosarcoma cancer stem cell. Our conclusion is that ALDH1 may be a good candidate for the treatment of RMS.

研究分野：医歯薬系

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 小児外科 7311

キーワード：横紋筋肉腫 癌幹細胞 無血清培地 ALDH1

1. 研究開始当初の背景

最近、癌組織の一部に自己複製能、多分化能と腫瘍形成、維持能を示す癌幹細胞が存在し、腫瘍の形成にかかわると共に、この癌幹細胞が腫瘍における再発や転移のもととなり、抗癌剤や放射線に抵抗性を示すことが明らかとなってきた。抗癌剤や放射線に抵抗性を示す癌幹細胞が残存した場合に再発や転移を来すのは容易に説明が可能であり、癌幹細胞は癌治療の真の標的細胞と考えられる。成人領域の癌腫における癌幹細胞については近年、精力的に研究が行われている。しかし小児悪性固形腫瘍領域では最近、癌幹細胞の存在が細胞株を用いた実験系で示されたものの(Komuro H et al. J Pediatric Surg, 2007)、未だに治療に直結するような成果が示されたとは言い難い。横紋筋肉腫の高リスクに分類される患児の5年無病生存率は強力な集学的治療によってもなお、30%未満と著しく悪い。小児横紋筋肉腫においても、癌幹細胞が残存し、再発や転移を惹起していることが容易に想像され、その深い関与が示唆される。

以上から、腫瘍細胞の廃絶に向けた新しいアプローチ、すなわち癌幹細胞を治療のターゲットとした免疫療法の開発を本研究の目的とした。

2. 研究の目的

小児横紋筋肉腫に着目し、それらの癌幹細胞を同定し、その免疫原性と宿主免疫からの回避機構を検討した上で、癌幹細胞を標的とした新規治療法の可能性について追究する。

3. 研究の方法

小児横紋筋肉腫細胞株の培養と癌幹細胞の同定を行った上で、その知見をもとに実際の臨床検体による免疫組織染色を行い、癌幹細胞

の検出と臨床背景との相関について検討し、癌幹細胞の存在と予後や転移について明らかにする。続いて小児横紋筋肉腫幹細胞に対する免疫原性と免疫回避機構を明らかにし、癌幹細胞に対する免疫療法の確立のための基礎的研究を行う。

最終的には総括として国内・海外での学会発表、欧文論文投稿を予定した。

実際の方法

a. 無血清培養より抽出した aRMS-CSC の生物学的特徴について解析

まず CSC を標的とした新しい治療法を開発することを旨として、無血清培養より抽出した aRMS-CSC の生物学的特徴について解析した。aRMS 細胞株(RD30)を超低接着表面ディッシュ、無血清培地で継代培養を行った。Sphere 形成能は sphere を single cell とし、無血清培地、96 well plate に播種して培養し検討した。またコロニー形成能はアガロースゲル内のコロニー数を計測した。Sphere 形成細胞の造腫瘍能を検討するため、腫瘍細胞を段階希釈し、NOD-SCID マウスの皮下に接種して造腫瘍能の有無を検討した。さらに形成された腫瘍の性質を検討するため、腫瘍を摘出し、病理学的検討を行った。

b. 小児悪性固形腫瘍における ALDH1 活性と臨床背景との相関を明らかにし、細胞株における ALDH1 の役割を検討

まず「臨床検体での癌幹細胞の検出と臨床背景との相関」について、当科の横紋筋肉腫の検体を抗 ALDH1 抗体による免疫染色を行った。次に胎児型横紋筋肉腫において、ALDH1 活性上昇細胞群が癌幹細胞の性格を有するとの仮説に基づいて、活性上昇群におけるコロニー形成能、多分化能、薬剤耐性能を検討した。

4. 研究成果

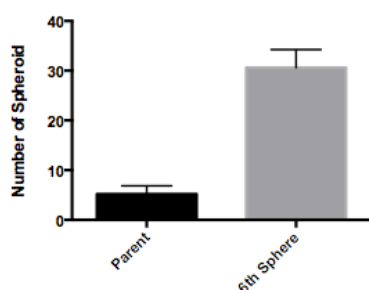
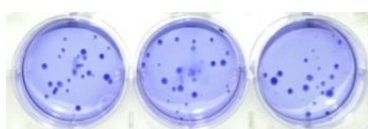
a. 無血清培養より抽出した aRMS-CSC の生物学的特徴について解析

Sphere 形成能は親株で 4.2%、sphere 細胞では 51.7%と著明に亢進していた。またアガロースゲル内コロニー生成能は親株で平均 5.2 個であったが、sphere 細胞は平均 30.6 個で有意に生成能は亢進していた。

親株



sphere 細胞



さらに造腫瘍能の検討では親株は 10 万個以上の細胞を接種せねば腫瘍が形成されないのに対し、sphere 細胞では 1000 個の細胞で腫瘍を形成した。

親株

1x10 ³	5x10 ³	1x10 ⁴
1/6 (day62)	ND	2/3 (day47)

sphere 細胞

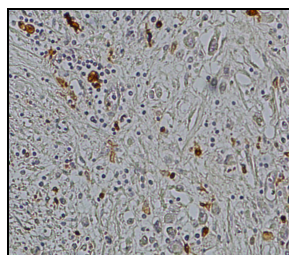
1x10 ³	5x10 ³	1x10 ⁴
6/6 (day50)	4/4 (day32)	3/3 (day25)

また 1000 個の sphere 細胞で形成した腫瘍は myogenin 陽性、desmin 陽性であり、aRMS の性質を有していた。

以上から、無血清培養より抽出した aRMS-CSC は癌幹細胞としての性質を持った細胞群であると考えられた。

そこで、平成 25 年度以降の研究計画として「小児悪性固形腫瘍における ALDH1 活性と臨床背景との相関を明らかにし、細胞株における ALDH1 の役割を検討する」ことを立案した。

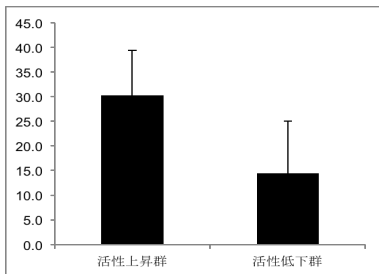
まず「臨床検体での癌幹細胞の検出と臨床背景との相関」について、当科の横紋筋肉腫の検体を抗 ALDH1 抗体による免疫染色を行った。その結果胎児型と胞巣型の検体において、ともに抗 ALDH1 抗体で染色された。特に化学療法後の検体では染色される細胞が増加しており、ALDH1 活性上昇細胞が高い薬剤耐性を持つ可能性が示唆された。



次に胎児型横紋筋肉腫において、ALDH1 活性上昇細胞群が癌幹細胞の性格を有するとの仮説に基づいて、活性上昇群におけるコロニー形成能、多分化能、薬剤耐性を検討した。胎児型横紋筋肉腫の細胞株 RD を用いてフローサイトメトリーにより ALDH1 活性上昇群と活性低下群に分離したところ、活性上昇群の割合は 5.8%であった。

コロニー形成能は、活性低下群では 1well (6 well plate) あたり平均 21.3 個であったのに対し活性上昇群では平均 36.3 個と亢進していた。

細胞 5000 個あたりのコロニー数



また脂肪細胞への分化を表す oil red O 染色細胞は、活性非上昇群に比べ活性上昇群で増加した。薬剤耐性能は、各薬剤ともに活性上昇群の生存率が有意に亢進した。造腫瘍能は、1000個および10000個の活性上昇群を皮下注射した NOD/SCID マウスでは腫瘍形成を認めしたが、活性非上昇群では10000個を皮下注射したマウスでも腫瘍形成を認めなかった。

以上より RD において、ALDH1 活性上昇群は高いコロニー形成能、薬剤耐性能、多分化能を持ち、さらに造腫瘍能の亢進を認めることから、癌幹細胞の性質を有する可能性が示唆された。

上記の通り、胎児型横紋筋肉腫の細胞株においては、研究はおおむね順調に進展したが、横紋筋肉腫におけるもう一つの組織型である胞巣型の細胞株においては、同様の結果は得られなかった。

今後も胎児型横紋筋肉腫の臨床検体を用いた研究を継続していくとともに、胞巣型の細胞株においても、ALDH1 活性上昇群の性質を解明していく予定である。

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10件)

1. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Oji Y, Fukuzawa M. Expression of Wilms tumor 1 gene in a variety of pediatric

tumors. *J Pediatr Surg*46:2233-8, 2011 (査読有)

2. Wang J, Que T, Uehara S, Yamanaka H, Oji Y, Fukuzawa M. The role of WT1 gene in neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 46:326-31, 2011 (査読有)

3. Yamanaka H, Que T, Uehara S, Fukuzawa M. Hedgehog signal inhibitor forskolin suppresses cell proliferation and tumor growth of human rhabdomyosarcoma xenograft. *J Pediatr Surg* 46:320-5, 2011(査読有)

4. Que T, Uehara S, Yamanaka H, Nomura M, Usui N. Hedgehog signal inhibitors suppress the invasion of human rhabdomyosarcoma cells. *Pediatr Surg Int* 2013;29:1153-8 (査読有)

5. Miyoshi Y, Ohta H, Namba N, Tachibana M, Miyamura T, Miyashita E, Hashii Y, Que T, Isobe A, Tsutsui T, Kimura T, Ozono K. Low serum concentrations of anti-Mullerian hormone are common in 53 female childhood cancer survivors. *Horm Res Paediatr*. 2013;79:17-21 (査読有)

6. Uehara S, Que T, Kawatsu M, Nara K, Fukuzawa M: Increased expression of survivin in hepatoblastoma after chemotherapy. *European Journal of Pediatric Surgery* 46, 326-331, 2013. (査読有)

7. Uehara S, Takama Y, Yoshida H, Hashii Y, Que T, Usui N: Abdominal neuroblastoma with inferior vena cava and right atrial extension, *Journal of Pediatric Surgery Case Reports*, 1(6), 119-121, 2013 (査読有)

8. Que T, Koshinaga T, Okita H, Kaneko Y, Hinotsu S, Fukuzawa M. Bilateral Wilms tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. *Pediatr Blood*

Cancer2014 Epub ahead of print (査読有)

9. 上原 秀一郎, 太田 秀明, 山本 佳史, 橋井 佳子, 大植 孝治, 福澤 正洋: 頬部横紋筋肉腫に対する集学的治療後4年で発生した耳下腺悪性腫瘍の1例. 日本小児血液・がん学会雑誌 50: 232-236, 2013 (査読有)
10. 大植 孝治, 高間 勇一, 上原 秀一郎, 中畠 賢吾, 臼井 規朗, 腫瘍内 heterogeneity を示した後腹膜原発 ganglioneuroblastoma の1例, 日本小児外科学会雑誌 50(1): 103-107, 2013 (査読有)

[学会発表](計 15件)

1. 上原 秀一郎, 野村 元成, 山中 宏晃, 大植 孝治, 橋井 佳子, 太田 秀明, 福澤 正洋: 当院における横紋筋肉腫 22 症例の臨床病理学的検討 特に再発・転移症例と大量化学療法について. 第 48 回日本小児外科学会 2011.7.20-22 東京
2. 山中 宏晃, 大植 孝治, 上原 秀一郎, 福澤 正洋: 横紋筋肉腫細胞株に対するヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤フォルスコリンの浸潤抑制効果の検討. 第 53 回日本小児血液がん学会 2011.11.25-27 前橋
3. 上原 秀一郎, 大植 孝治, 山中宏晃, 野村元成, 福澤 正洋: 肝芽腫組織における抗アポトーシス分子 survivin 発現の免疫組織学的検討. 第 53 回日本小児血液がん学会 2011.11.25-27 前橋
4. Oue T, Uehara S, Fukuzawa M, Miyoshi Y, Ohta H, Hashii Y: Problema of Childhood Cancer Survivors in Pediatric Surgical Clinic. 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London, UK, 2012
5. Oue T, Uehara S, Yamanaka H, Takama Y, Fukuzawa M: Hedgehog Signal Inhibitors Suppress the Invasion of Human Rhabdomyosarcoma Cells. 59th Congress of the British Association of Paediatric Surgeons, Roma, Italy, 2012
6. Uehara S, Kawatsu M, Oue T, Fukuzawa M: The expression of survivin and its increased expression after chemotherapy in hepatoblastoma. XXV International Symposium on Paediatric Surgical Research, London, UK, 2012
7. Uehara S, Oue T, Takenaka S, Hashimoto N, Adachi K, Matsumura R, Yoshida H, Hashii Y, Fukuzawa M: The use of tissue expanders to prevent the side effect of preoperative radiotherapy in pediatric malignant pelvic tumors. 44th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, London, UK, 2012
8. 大植 孝治, 奈良 啓吾, 山中 宏晃, 野村 元成, 上原 秀一郎, 福澤 正洋: 小児悪性固形腫瘍に対する新たな治療標的分子の検討. 第 112 回日本外科学会 2012.4.12-14 幕張
9. Oue T, Fukuzawa M, Okita H, Horie H, Saito M, Nozaki M, Chin M, Nakadate N, Hinotsu S, Koshinaga T, Kaneko Y, Tanaka Y: Bilateral Wilms' tumors treated according to the Japan Wilms Tumor Study Group protocol. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, Hong Kong, China, 2013
10. Nomura M, Uehara S, Oue T, Usui N: Novel strategy for neuroblastoma with the combination of 13-cis-retinoic acid and inactivated Sendai virus particle. 14th Congress of the European Paediatric Surgeons' Association, Leipzig, Germany, 2013
11. 上原 秀一郎, 川津 美代子, 野村 元成, 奈良 啓吾, 上野 豪久, 曹 英樹, 大植

- 孝治, 臼井 規朗: 無血清培養より抽出した胞巣型横紋筋肉腫幹細胞様細胞の生物学的特徴. 第 113 回日本外科学会, 2013.4.11-13 福岡
12. 大植 孝治, 上原 秀一郎, 野村 元成, 上野 豪久, 奈良 啓吾, 曹 英樹, 臼井 規朗, 山中 宏晃, 福澤 正洋: 横紋筋肉腫細胞の浸潤能における Hedgehog シグナル系の関与. 第 50 回日本小児外科学会 2013.5.30-6.1 東京
13. 上原 秀一郎, 太田 秀明, 山本 佳史, 橋井 佳子, 大植 孝治, 福澤 正洋: 頬部横紋筋肉腫に対する集学的治療後 4 年で発生した耳下腺悪性腫瘍の 1 例. 第 55 回日本小児血液・がん学会 2013.11.29-12.1 福岡
14. 上原 秀一郎, 中畠 賢吾, 川津 美代子, 大植 孝治, 臼井 規朗: 無血清培養から抽出した胞巣型横紋筋肉腫幹細胞の生物学的特徴 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013.11.29-12.1 福岡
15. 中畠賢吾, 上原 秀一郎, 太田 秀明, 山本 佳史, 橋井 佳子, 大植 孝治, 福澤 正洋: 小児悪性腫瘍に対する化学療法中に外科治療が必要な急性腹症をきたした 3 例. 第 55 回日本小児血液・がん学会 2013.11.29-12.1 福岡

〔図書〕(計 4 件)

1. 大植孝治, スタンダード小児外科手術(田口智章, 岩中 督監修) 腫瘍生検, 58-61、縦隔腫瘍の手術, 111-113、メジカルビュー社、2013
2. 大植孝治, 系統小児外科学第3版(福澤正洋, 中村哲郎, 窪田昭男編) 病理組織検査法, 72-74、分子標的治療, 327-330、再生医療, 331-336、腎芽腫, 712-718、肝腫瘍, 719-729、横紋筋肉腫, 730-736、脾腫瘍, 743-746、悪性リンパ腫, 754-756、永井書店、2013

3. 上原秀一郎, 小児外科診療ハンドブック(福澤正洋監修) 卵巣腫瘍, 471-475、医薬ジャーナル社、2014
4. 大植孝治, 小児外科診療ハンドブック(福澤正洋監修) 超音波検査, 58-6、腫瘍生検, 133-137, 肝芽腫, 438-445、腎芽腫, 446-452、横紋筋肉腫, 543-462, 精巣腫瘍, 476-481、医薬ジャーナル社、2014

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 秀一郎 (UEHARA, Shuichiro)

大阪大学・大学院・医学系研究科・助教

研究者番号: 00448060

(2) 研究分担者

福澤 正洋 (FUKUZAWA, Masahiro)

大阪大学・大学院・医学系研究科・名誉教授

研究者番号: 60165272

大植 孝治 (Oue, Takaharu)

大阪大学・大学院・医学系研究科・講師

研究者番号: 50314315

野村 元成 (NOMURA, Motonari)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 40546909

(平成 24 年度まで)

中畠 賢吾 (NAKAHATA, Kengo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 50643552

(平成 25 年度より)

(3) 連携研究者

なし