

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24249084

研究課題名(和文)ゲノミクスとセロミクスを用いた小児腫瘍の分子標的探索 がん幹細胞を標的として

研究課題名(英文)Detection of molecular targets for childhood cancers using genomics and cellomics: targeting for cancer stem cells

研究代表者

檜山 英三(HIYAMA, Eiso)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授

研究者番号：00218744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：小児がん検体の初代培養細胞42検体、細胞株23株を用いて、セルソーターにて、6検体から幹細胞分画を濃縮した。分離した細胞をin vitroのコロニー形成能と腫瘍形成能を確認したところ、がん幹細胞分画と考えられる細胞分画が得られたと考えられた。そこで、これらの細胞を一細胞解析(セロミクス解析)での網羅的蛋白発現解析から特異的に発現する蛋白を約100程度抽出した。さらに、マイクロアレイや次世代シーケンサーにて遺伝子変化や発現を検索した。これらのパスウェイ解析からドライバ 遺伝子3個を治療の分子標的候補として抽出した。

研究成果の概要(英文)：Using 42 primary tumor culture cells and 23 cell lines derived from childhood cancer, 6 cancer stem cell fractions were isolated by cell sorting. These separated cells have an in vitro colony formation capacity and an in vivo tumor formation one. Single cell analysis (Cellomics) of these cell revealed approximately 100 proteins upregulated by Mass spectrometry. Genomic aberration and gene expression were also analyzed by microarray and next-generation sequencing. Pathway analysis of these data revealed 3 candidate driver genes as molecular targets in childhood cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：癌 遺伝子 ゲノム マイクロアレイ トランスレショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

小児腫瘍は胎児期芽細胞に由来し、乳児神経芽腫、間葉性腎症、純胎児型肝芽腫など自然退縮や化学療法不要な予後良好腫瘍がある一方、高頻度に再発する予後不良の一群があり、ラブドイド腫瘍、USC (未分化小細胞)型は極めて高率に再発する。従来、マイクロアレイを用いたゲノム解析や遺伝子発現から、後者の分子標的を探索してきたが、多彩な異常が見られ標的の探索には限界がある。一方、我々のテロメラーゼをマーカーとした幹細胞研究から、前者は、プログラムされた腫瘍細胞であり、後者はテロメラーゼが再上昇することからプログラムから逸脱したがん幹細胞 (Cancer stem cell) の存在が悪性度を規定していた。さらに、本邦の大規模な神経芽腫スクリーニング事業で予後良好な腫瘍を数多く治療した結果予後不良な腫瘍が減少したことを初めて報告し、小児がんは正常芽細胞の分化異常によって予後良好な腫瘍が発生し、その一部でプログラムを逸脱したがん幹細胞が生じ予後不良腫瘍と変化する経路が示された。そこで、正常幹細胞と、予後良好腫瘍の幹細胞、予後不良腫瘍から得たがん幹細胞の3者で比較することで、小児腫瘍の発生とさらにがん幹細胞を有する予後不良腫瘍へ形質転換の鍵を握る変化が明らかになる。できあがった腫瘍間の比較では、多彩な細胞の集団であることや様々な変化が生じていることから鍵となる変化にたどりつくには限界がある。そこで、がん幹細胞に焦点をあてて、広島大学が結集して開発した世界初の一細胞の蛋白解析法 Cellomics と近年の Deep sequence 法を本研究に应用することで、小児がんのがん幹細胞標的とした診断と治療法への画期的成果が期待して施行した。

2. 研究の目的

小児腫瘍は胚細胞や芽細胞に由来し、発生段階で分化異常を来した腫瘍の予後は良好であるが、異常ながん幹細胞が存在する腫瘍は化学療法抵抗性で高頻度に再発する。本研究では後者からがん幹細胞分画を分離し、前者由来の分化異常細胞、正常幹細胞の3者を対象として「ゲノミクス」で網羅的遺伝子異常、発現解析に加えて、ディープシーケンスによる全ゲノム解析を行った、さらに、セロミクスにて一細胞レベルの網羅的蛋白解析でがんの発生・進展機構の解明を試みた。上記で得た分子標的への薬剤の有効性と安全性を、臨床検体を用いた一細胞解析によるセルテスティングシステムと、アニマルテスティング (動物実験) にて検証し、小児腫瘍の新規治療法開発とオーダーメイド医療の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

既に病理分類と予後調査が完了した臨床例約 500 の神経芽腫と、250 例の肝芽腫、50

例の腎芽腫を含む約 1,000 の検体のうち、治療前の初代培養にて腫瘍細胞のみ選別されている 140 検体と樹立株 23 株と、これらが由来した凍結保存腫瘍検体を対象とした。

1) 幹細胞 (予後良好腫瘍細胞) とがん幹細胞 (予後不良腫瘍) の分離

この検討には、広島大学に保存された臨床検体から初代培養細胞 (4-5PDL) 200 検体と樹立神経芽腫細胞株 14 株・腎芽腫 4 株、肝芽腫 7 株を用いた。初代培養細胞、細胞株から細胞形態に加え、ヒトテロメラーゼの触媒部分である TERT (human telomerase reverse transcriptase) と表面抗原 CD133、CD44、CD34、UV の SP (side population) 分画を指標に、現有のセルソーターにて幹細胞分画を濃縮した。これらの分画細胞のコロニー形成能、免疫不全マウス (NOD/SCID, マウス) での少数からの腫瘍形成能の確認を試みた。幹細胞の豊富な分画、分化異常細胞から DNA、RNA を抽出し、遺伝子発現に関してマイクロアレイ、次世代シーケンサーにて下記に示す方法で検討した。また、細胞の個々の特性を評価するために、正常幹細胞、分化異常細胞 (予良好腫瘍の幹細胞)、がん幹細胞の3者で、細胞の形態を確認しながら、分担研究者の升島らと開発した世界初のセロミクス (single cell proteomics) の手技を用いて一細胞内液を代謝産物の発現解析をおこなった。これらの比較検討から、幹細胞に発現する分子、分化異常細胞、がん幹細胞に発現する特異的蛋白を同定してバイオマーカーを探索した。

2) ゲノム解析

マイクロアレイ解析としては、解析済みアレイデータ (Affymetrix SNPs アレイ、Human U133 Plus 2.0) に、幹細胞、がん幹細胞分画、新規例の解析を追加し、変異や異常の集積領域を抽出した。また、全エクソン領域と、がんの変異が集積する部位に設計されたプローブによるライブラリーを作成し、現有の次世代シーケンサー (Illumina HiSeq 2500, Miseq) でがん幹細胞に特異的な遺伝子変化の検出を試みた。また、RNA シーケンスを用いて miRNA を含めた非翻訳 RNA、splicing variant などの遺伝子発現変化、メチル化を見出し、各腫瘍や症例でがん幹細胞に特異的な分子標的の候補検出を試みた。

見出された候補遺伝子は、既存のワンセル PCR 装置を用いて、培養細胞の細胞一つ一つでこれらの特異的な候補に関しての遺伝子変化や遺伝子発現変化を再検討し、がん幹細胞の特性を確認した。

3) 分子標的の検討

上記のセロミクスとゲノミクスから得られたデータから、以下の検討を行った。

4) 臨床病理学的データとの検討

臨床病理因子と分子標的候補との相関を検討し、各がん種(神経芽腫、肝芽腫、腎腫瘍など)の癌化、進展すなわちがん幹細胞への転化に関わる因子を、臨床検体を用いて検証した。

候補因子を、臨床検体を用いて RT-PCR、免疫染色で検証し、有意差の出たものは、遺伝子ネットワーク/パスウェイソフト(GeneSpring、Partek、INGENUITY Pathway Analysis)や次世代解析ソフトにて解析したデータから、癌化や進展に関わるシグナルパスウェイを明らかにし、診断・悪性度の層別化あるいは治療に応用できる分子標的の選別を試みた。

5) がん幹細胞マーカー、分化異常マーカーの使用実験

in vitro では、培養細胞に得られたマーカー遺伝子の抗体あるいは siRNA を投与し、細胞の変化を観察した。また、がん幹細胞で特異的に発現抑制されている遺伝子の導入を行い、同様の検討を行った。セロミクス解析を行い、分子標的の抗体や阻害剤による細胞内代謝の変化を検討した。in vivo 実験として免疫不全マウスに作成した腫瘍に対して、抗体、阻害剤の投与を全身あるいは局所投与、または動注療法にて効果判定から、その有効性と安全性を検証した。これらのセルテストイングとアニマルテストイングから、臨床試験に用いる薬剤の選別システムを確立した。

6) 小児がんの悪性度を層別する尿中、血中、さらに骨髄中バイオマーカー探索

診断時、治療経過中に保存した血清、尿を用いて、分子標的遺伝子の産物あるいはセロミクス解析からえられた特異的な代謝産物を測定し、その中から診断、治療効果判定、さらに再発への有効なバイオマーカーを探索した。

4. 研究成果

既に病理分類と予後調査が完了した神経芽腫と、肝芽腫、腎芽腫を含む約 1,000 例余のうち、治療前の初代培養にて腫瘍細胞のみ選別されている 140 検体と樹立株 3 株とし、神経芽腫と肝芽腫を中心に解析した。

初代培養細胞 42 検体、細胞株 23 株を用いて、TERT と表面抗原 CD133、CD44、CD34、UV の SP(side population)分画を指標にしてセルソーターにて幹細胞分画を濃縮した。細胞株においては、SP 分画と CD44、CD134 の発現細胞と一致する株と一致しない細胞が存在し、細胞株のがん幹細胞に普遍的マーカーは見出せなかった。初代培養細胞の多くからは SP 分画の採取が困難であったが、6 検体から SP 分画を採取しえた。分離した SP 分画細胞を再度培養し、ソーティングを繰り返した。得られた細胞の in vitro のコロニー形成能を検討したところ、6 株から得られて細胞す

べてでコロニー形成を認めた。さらに、SP 分画細胞を 10・100・1000・10000 個ずつ、免疫不全マウスの皮下にマトリゲルにて注入して腫瘍形成能を確認したところ、細胞株 6 株と共に濃縮した SP 分画は 100 個の細胞でも腫瘍を形成し、がん幹細胞分画と考えられる細胞分画が得られたと考えた。そこで、これらの細胞を培養し、一細胞解析(セロミクス解析)で SP 分画のないがん細胞と SP 分画からの分離がん幹細胞の間で、細胞内液を直接吸引して直接試料分析にかけて網羅的蛋白発現を解析した。その結果、がん幹細胞に特異的に発現する蛋白を約 100 程度抽出した。さらに、マイクロアレイを用いたゲノム解析や次世代シーケンサーによるエクソーム解析で、がん幹細胞分画、変異や異常の集積領域を 19 番染色体に見出した。また、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンズ解析にて miRNA を含めた非翻訳 RNA を含めた解析では、Let7 などの 4 遺伝子、遺伝子発現変化では HiF1、Wnt シグナル遺伝子発現、メチル化では RA SSF1A、IGF1 遺伝子など数個遺伝子に多く認められた。そこで、これらのゲノム異常と抽出遺伝子のパスウェイ解析からドライバ 遺伝子 3 個を治療の分子標的候補として抽出した。これらの 3 遺伝子に対する抗体、および siRNA を作成して、細胞株に投与し、細胞内代謝変化の解明にセルテストイングを行った。その結果、1 遺伝子で明らかに細胞分裂が停止し、細胞内のアポトーシス関連遺伝子遺伝子の活性化およびそれらの蛋白の増加がみとめられ、今後の次期臨床試験への導入候補が抽出されたと考えられた。

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 40 件)

1. Fujii T, Matsuda S, Lorenzo Tejedor M, Esaki, Sakane I, Mizuno H, Tsuyama N, Masujima T, Direct Metabolomics for Plant Single Cells by Live Single Cell Mass Spectrometry, Nature Protocols, in press, 査読有, in press.

2. 升島 努, 1 細胞メタボローム, 細胞工学, 34, 査読有, 2015, pp273-277.

3. Tokumasu D, Sakuma T, Hayashi Y, Hosoi S, Hiyama E, Yamamoto T, FAST-id system for enrichment of cells with TALEN-induced mutations and large deletions, Genes to Cells, 19, 査読有, 2014, pp419-431, 10.1111/gtc.12142.

4. 升島 努, 一細胞質量分析法による in situ ダイレクト分子群動態追跡, 生体の科学, 65, 査読有, 2014, 404-405

5. 檜山英三, 上田祐華, 栗原 将, 肝芽腫の分子生物学, 小児外科, 47, 査読有, 2015, pp181-188.

6. Yamasaki S, Nabeshima K, Sotomaru Y, Taguchi Y, Mukasa H, Furue MK, Sato JD, Okamoto T, Long-term serial cultivation of mouse induced pluripotent stem cells in serum-free and feeder-free defined medium, The International Journal of Developmental Biology, 57, 査読有, 2013, pp715-724, 10.1387.

7. Kanawa M, Igarashi A, Sainik VR, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M, Saskianti T, Pan H, Kato Y, Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2, Cytotherapy, 15, 査読有, 2013, pp1062-1072, 10.1016/j.jcyt.

8. Kanawa M, Igarashi A, Ronald VS, Higashi Y, Kurihara H, Sugiyama M, Saskianti T, Pan H, Kato Y, Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2, Cytotherapy, 15, 査読有, 2012, pp1062-1072, 10.1016/j.jcyt.2013.03.015.

9. Tejedor ML, Mizuno H, Tsuyama N, Harada H, Masujima T, In Situ Molecular Analysis of Plant Tissues by Live Single-Cell Mass Spectrometry, ANALYTICAL CHEMISTRY, 84, 査読有, 2012, pp5221-5228, 10.1021/ac202447t.

10. Tsuyama N, Mizuno H, Masujima T, Molecular and functional analysis of cellular phenomena using single-cell mass spectrometry, BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, 35, 査読有, 2012, pp1425-1431.

11. Emara S, Masujima T, Zarad W, Kamal M, Bagary R EL, On-line solid-phase enrichment coupled to packed reactor flow injection analysis in a green analytical procedure to determine low levels of folic acid using fluorescence detection, CHEMISTRY CENTRAL JOURNAL, 6 査読有, 2012, 155, 10.1186/1752-153X-6-155.

12. Sasada S, Miyata Y, Tsutani Y, Tsuyama N, Masujima T, Hihara J, Okada M, Metabolomic analysis of dynamic response and drug resistance of gastric cancer cells to 5-

Fluorouracil, ONCOLOGY REPORTS, 29, 査読有, 2012, pp925-931, 10.3892.

[学会発表](計 109 件)

1. Esaki T, Date S, Mizuno H, Fujita A, Masujima T, Direct Mitochondrial Metabolites Detection in a HepG2 Cell by Live Single-cell Mass Spectrometry, 2nd ASMS Conference on Mass Spectrometry, 15-19 Jun 2015, Baltimore MD U.S.A.

2. Masujima T, Live single cell mass spectrometry, The 2nd International Symposium on Plant Environmental Sensing, 2015 年 3 月 13~15 日, 東京都.

3. Hiyama E, Molecular diagnosis of lung cancer, APSR2014, 13 Nov 2014, Bali Indonesia.

4. 檜山英三, 檜山桂子, 林 陽子, 森原なぎさ, 平野尚子, 福場郁子, 山岡絵美, 栗原 将, 小児固形腫瘍における循環遊離 DNA と循環がん細胞のがん診断への応用, 第 73 回日本癌学会学術集会, 2014 年 9 月 24 日, 横浜市.

5. Hiyama E, Telomere Biology in Neuroblastoma: Focusing on ATRX/DAXX Genes and Alternative-Strengthening of Telomere(ALT), ANR Congress 2014, 13-16 May 2014, Cologne Germany.

6. Hiyama E, Detection of Cancer Stem Cells in Childhood Cancers, BIT 'S 4th Annual World Congress of Molecular & Cell, 27 Apr 2014, Dailen, China.

7. 升島 努, 1 細胞質量分析システムによる 1 細胞創薬・1 細胞診断, 応用物理学会有機分子バイオエレクトロニクス分科会 3 月研究会, 2014 年 3 月 5 日, 東京都.

8. 檜山英三, 小児肝腫瘍に対する診断と治療, 第 39 回北海道小児がん研究会, 2014 年 2 月 28 日, 北海道札幌市.

9. 本多昌平, 岡田忠雄, 湊 雅嗣, 春田雅之, 金子安比古, 檜山英三, 武富紹信, 次世代シーケンサーを用いた肝芽腫のメチル化解析による予後予測マーカー確立の試み, 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2013 年 11 月 30 日, 福岡市.

10. 升島 努, 一細胞質量分析の薬物代謝研究への応用, 日本薬物動態学会, 2013 年 10 月 9~11 日, 東京都.

11. Hayashi Y, Hiyama E, Identification of Markers of Cancer Stem Cells in

Neuroblastoma Cell Line SK-N-SH. (和訳：神経芽腫細胞株 (SK-N-SH) における癌幹細胞同定のためのマーカー探索), 第 72 回日本癌学会学術集会, 2013 年 10 月 5 日, 横浜市.

12. Hiyama E, Ueda Y, Onitake Y, Ida K, Ogura K, Kondo S, Kamijyo T, Watanabe K, Oue T, Hishiki T, Tajiri T, Horie H, Inoue T, Tanaka Y, FURTHER STUDY: IDENTIFICATION OF NEW CANDIDATE GENES IN PROGRESSION OF HEPATOBLASTOMA USING GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY, 45th Congress of the International Society of Pediatric Oncology, 26 Sep 2013, Hong Kong, China.

13. 升島 努, 1 細胞みながら網羅分子探索による新しい創薬・医療展開, 日本分析化学会第 62 年会, 2013 年 09 月 10~12 日, 大阪府東大阪市.

14. 升島 努, 1 細胞質量分析による 1 細胞内リアルタイム分子追跡と創薬・個別化医療の未来, 第 10 回創薬コンソシアム, 2013 年 7 月 5 日, 東京都.

15. 檜山英三, 児島正人, 河島茉澄, 上田祐華, 鬼武美幸, 上松瀬新, 小倉 薫, 末田泰二郎, 血中 DNA を用いた神経芽腫の分子診断: 予後予測と治療効果判定, 第 50 回日本小児外科学会学術集会, 2013 年 5 月 30 日, 東京都.

16. Hiyama E, Ueda Y, Kamimatsuse A, Onitake Y, Ogura K, Hiyama K, Wnt Signaling and telomerase activation in hepatoblastoma, AACR Annual Meeting 2013, 9 Apr 2013, Washington U.S.A.

17. Ueda Y, Kamimatsuse A, Ogura K, Onitake Y, Hiyama K, Hiyama E, Mechanism of Wnt signal pathway activation in hepatoblastoma, SIOP2012, 6 Oct 2012, London GBR.

18. Hiyama E, Kamimatsuse A, Ueda Y, Ogura K, Sueda T, Hiyama K, Identification of new candidate biomarkers in progression of neuroblastoma cells using differential transcriptome and proteome analysis. ANR2012, 20 Jun 2012, Toronto Canada.

19. Hiyama E, Kamimatsuse A, Ogura K, Ueda Y, Hiyama K, Next-generation sequencing: Integrated exome analysis in human multiple neuroblastoma, ANR2012, 19 Jun, 2012, Toronto Canada.

20. Fukano Y, Tsuyama N, Mizuno H, Date S,

Takano M, Masujima T, Detection of Drug Metabolism Heterogeneity in Primary Human Hepatocytes by Live Single-cell Mass Spectrometry, 60th ASMS Conference, 23 May 2012, Vancouver BC Canada.

21. Matsuda S, Date S, Mizuno H, Tsuyama N, Harada T, Masujima T, In-situ Analysis of Plant Bioactive Molecules by Live Single-cell Mass Spectrometry, 60th ASMS Conference, 21 May 2012, Vancouver BC Canada.

22. Yamamoto Y, Mizuno H, Tsuyama N, Date S, Harada T, Masujima T, Microregional Analysis of Allergic Granule in a RBL-2H3 Cell by Live Single-cell Mass Spectrometry, 60th ASMS Conference, 21 May 2012, Vancouver BC Canada.

23. 升島 努, 1 細胞質量分析によるダイレクト分子追跡と創薬応用, アスピオファーマ(株)講演, 2012 年 5 月 8 日, 兵庫県神戸市.

24. Hiyama E, Fukuzawa M, Hosoi H, Yano K, Nakayama M, Yoneda A, Iehara T, Masujima T, Ohtaki M, Early detection for neuroblastoma: Japanese experience of screening and new strategies for early detection, The 7th SIOP Asia Congress, 22 Apr 2012, Yogyakarta Indonesia.

25. 升島 努, 質量分析法と細胞分析, 機器分析セミナー, 2012 年 4 月 19 日, 広島市.

〔図書〕(計 5 件)

1. 上條岳彦, 檜山英三, 日本臨牀社, 肝芽腫の診断と治療. 「最新肝臓学」, 2015, 7(pp805-811).

2. 升島 努, 南光堂, パートナー 分析化学, 2013, 328.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: ナノスプレーイオン化・チップの高機能化

発明者: 升島 努

権利者: 升島 努

種類: 特許

番号: 2014-247524

出願年月日: 2014 年 12 月 8 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜山 英三 (HIYAMA EISO)

広島大学・自然科学研究支援開発センタ

ー・教授
研究者番号：00218744

(2)研究分担者

金輪 真佐美(KANAWA MASAMI)
広島大学・自然科学研究支援開発センタ
ー・助教
研究者番号：00284208

升島 努(MASUJIMA TSUTOMU)
独立行政法人理化学研究所・生命システム
研究センター・チームリーダー
研究者番号：10136054

外丸 祐介(SOTOMARU YUSUKE)
広島大学・自然科学研究支援開発センタ
ー・教授
研究者番号：90309352

上松瀬 新(KAMIMATSUSE ARATA)
広島大学・大学病院・病院助教
研究者番号：90569881
(H24)

小倉 薫(OGURA KAORU)
広島大学・病院・講師
研究者番号：10346653
(H24-H25)

(3)連携研究者

中川原 章(NAKAGAWARA AKIRA)
地方独立行政法人佐賀県医療センター 好
生館・理事長
研究者番号：50117181