

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592695

研究課題名(和文) 小児悪性固形腫瘍に対する抗アポトーシス分子サバイピンを標的とした分子標的治療

研究課題名(英文) The molecularly-targeted therapy targeted at anti-apoptosis molecules Survivin for the pediatric malignant solid tumor

研究代表者

奈良 啓悟 (Nara, Keigo)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：00432477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：「背景」Survivinは、apoptosisを抑制するタンパク質である。YM155はサバイピン発現抑制剤である。小児悪性腫瘍である横紋筋肉腫において、YM155によるSurvivinの抑制効果を検討した。

「方法」ヒト横紋筋肉腫の細胞株RDを使用した。「結果」YM155投与にてmRNAの発現抑制、タンパク量の抑制を認め、さらにアポトーシスも亢進していた。RDの生存率も低下した。YM155と抗癌剤との併用で生存率のさらなる低下を認めた。ヌードマウスに作成した横紋筋肉腫はYM155の腹腔内投与にて縮小した。「結論」YM155にてin vitro, in vivoにおいて腫瘍抑制効果が示された。

研究成果の概要(英文)：[Background] Survivin, a member of the family of inhibitor of apoptosis proteins. YM 155, small molecule, selectively inhibit survivin. We investigated effect of suppression survivin by YM 155 in rhabdomyosarcoma (RMS) cell line. [Methods] Human RMS cell line RD was prepared. RMS tumor using RD was made in Node mouse (NS). [Results] Survivin was expressed in RD by RT-PCR. Survivin mRNA level was downregulated after YM155 was added. Survivin protein level was decreased with YM155. Enhancement of Apoptosis was confirmed. YM155 treatment resulted in inhibition of cell proliferation of RD in a dose-dependent manner. Enhancement of chemotherapy-induced cell regression by YM155 were confirmed. RD cell growth was suppressed with YM155, followed cisplatin added, compared to cisplatin mono treatment. RMS Tumor in NS was reduced by YM 155. [Conclusion] Our results indicate that RD cell line expressed survivin. YM155 can suppress survivin. YM155 sensitizes RMS cells line in vitro and in vivo.

研究分野：小児外科

キーワード：Survivin 横紋筋肉腫 YM155

1. 研究開始当初の背景

小児悪性固形腫瘍の一つである横紋筋肉腫の予後は、外科治療や化学療法、放射線療法などの集学的治療によっても、いまだ満足すべきものではない。近年では予後の改善を期待するあまり、集学的治療を強化した結果生じる患児への有害事象も懸念される。従ってこれまでの治療の枠組みを超えた新しいアプローチが必須と考えられる。そこで本研究では IAP (Inhibitor of apoptosis) family の Survivin に対する分子標的治療を横紋筋肉腫に導入する研究を計画した。

Survivin は、Caspase の活性化を阻害し Apoptosis を抑制することおよび細胞分裂の調節の二つの機能を有するタンパク質であることが知られている。

IAP タンパク質は、ヒトにおいて正常の胎盤、精巣、胸腺及び CD34 陽性骨髄幹細胞などを除いて、分化した正常ヒト組織では発現を認めない。従って癌組織特異的な発現といえる。その過剰発現の程度は各種固形癌で予後不良と相関していることが報告されており、また様々な癌腫で癌細胞に高発現する変異のない抗原として同定され、Survivin 特異的免疫療法の臨床試験も開発されている。これらのことから Survivin を標的とした治療法の確立は小児固形腫瘍に対しても可能であることが推察される。

実際に小児悪性固形腫瘍で腫瘍細胞における Survivin 発現の意義が検討された報告があり、脳腫瘍、腎腫瘍、神経芽腫で示されている(1)。しかし、小児肝芽腫と Survivin の関連に関してはいまだ報告がなく、我々の教室において小児肝芽腫の臨床検体を用い Survivin の発現を免疫染色で検討したところ、腫瘍細胞に一致して Survivin の強い発現を認めた。また RT-PCR 法により Survivin の mRNA の発現を検討したところ、Survivin の高発現を認めた。従って肝芽腫を含めた小児悪性固形腫瘍において Survivin は何らかの形で tumorigenesis に関与していると考えられた。

また、日本でも臨床試験中である新規 Survivin 発現抑制剤である YM155 は成人悪性腫瘍で臨床試験が行われており、安全で毒性が従来の抗腫瘍薬に比較してマイルドであるとされる(2)。

2. 研究の目的

肝芽腫組織での発現を免疫組織学的に検討し、化学療法前後での survivin 発現に関する組織学的変化に関して検討する。次に小児悪性腫瘍である横紋筋肉腫に対し、Survivin の発現が亢進し、その抑制により腫瘍細胞の増殖の抑制を検証する。すなわち、Survivin

発現抑制剤である YM155 を用いることで、腫瘍が抑制されるかを in vitro と in vivo で検討し、小児腫瘍における Survivin が分子標的治療のターゲットとなり得るかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 1995 年から 2010 年に当科で加療した肝芽腫患児 14 例を対象として免疫染色を行った。全例、生検により診断確定したのち、化学療法を施行し、摘出術を行っていた。その生検標本、摘出標本を対象とし、survivin の発現を免疫組織学的に検討した。染色結果は 0-3+での半定量法で評価する。

(2) ヒト横紋筋肉腫由来の細胞株である RD において Survivin の発現を Western blot 法にて確認する。Survivin の高発現を確認後、Survivin を特異的に阻害する YM155 により Survivin の発現の低下を Real time PCR 法及び Western blot 法により mRNA 及び蛋白レベルを確認する。YM155 の濃度は 10nM で行う。また、YM155 の Apoptosis の亢進作用の検証を行う。Apoptosis の評価は、Annexin V Assay を使用した。Annexin V とアポトーシスの誘導直後に細胞膜外面に露呈するホスファチジルセリンが結合することを利用し、細胞を蛍光染色して FACS を行い、Apoptosis を検出する。YM155 投与後の細胞において apoptosis に陥った細胞を検出し、陽性細胞の割合を計測する。

さらに Survivin 発現低下による腫瘍細胞増殖抑制効果を Cell Counting Kit を用いて WST-8 assay により検討する。96 well のプレートに RD 細胞を 60000/ml の割合で撒き、培養を行い、WST-8 assay を行う。YM155 の濃度別の添加(0.5~50nM)により用量依存的に細胞増殖が抑制されるか否かを検討する。(3) さらに、抗癌剤との相乗作用の検証を行う。すなわち YM155 の投与下で、横紋筋肉腫の治療に使用している抗癌剤である CDDP と VAC 療法の中の(CPA, DXR)の2剤の計3剤を投与することにより検討する。すなわち、96 well のプレートに RD 細胞を 60000/ml の割合で撒き、YM155(10nM)投与後、24 時間培養を行い、CDDP(10 μ M)を投与して、48 時間後に WST-8 assay を行う。CPA(10mM), DXR(2 μ M)も同様に行う。

(4) さらに、横紋筋肉腫細胞株をヌードマウス皮下に接種し、YM155 を腹腔内投与して in vivo での腫瘍増殖の抑制効果を検討する。In vivo の実験として、YM155 の RD 細胞株のヌードマウス接種モデルによる腫瘍効果の検証を行った。ヌードマウスに腫瘍を移植したのちに YM155 と CDDP を投与し腫瘍径を計測した。まず、NOD-SCID マウスに 5 \times 10⁶個の RD 細胞を皮下注することで、横紋筋肉腫が形成されることを確認し、その形成された

腫瘍を採取し、4mm角として、BALB/cヌードマウスの皮下に移植する。腫瘍径が約2倍の8mm大となった6週間後に、YM155およびCDDPを腹腔内に注入した。すなわち、YM155は5mg/kgを連日投与し、CDDPは2.5mg/kgを週2回投与した。経時的にマウスに形成された腫瘍径(cm)を計測し、腫瘍容積を0.5×短径2乗×長径にて計算し、腫瘍の抗腫瘍効果が得られるか否かを検討する。

4. 研究成果

(1) survivinは正常肝組織には認めなかったが、腫瘍組織一致して、survivin陽性細胞を認めた。生検組織における survivin 陽性組織は10/14(71%)であり、その腫瘍細胞内分布は細胞質が2例、核に8例に偏在していた。一方、化学療法後の摘出標本では残存腫瘍細胞に一致して、survivin 陽性組織を認めた。その陽性率は14/14(100%)であり、腫瘍細胞内分布は全例、核に認めた。また生検標本と化学療法後の摘出標本での survivin 発現強度を比較すると、生検標本での発現強度は平均1.07であったが、化学療法後の摘出標本では2.07であり、化学療法前に比較し、有意に survivin 発現強度の増強を認めた。アポトーシス抑制分子である survivin は、小児肝芽腫組織でも発現を認めた。また化学療法後の摘出標本では生検標本に比較し、有意に survivin の発現強度が増強していた。このことは化学療法後ではよりアポトーシスを回避しうる腫瘍細胞が残存していると考えられ、survivin 高発現細胞群に対する治療は再発、転移抑制の点から重要であると思われる。

この点について、European Journal of Pediatric Surgery に論文発表を行った。

(2) ヒト胎児型横紋筋肉腫の細胞株の RD で Survivin が高発現していることを確認した。次に RD に対して、YM155 の効果を、Real time PCR および Western Blot 法にて調べた。その結果、細胞株 RD では、YM155 にて mRNA の発現量は YM155 投与後 48 時間で 20% まで抑制されていた。また、48 時間でのタンパク量も Western Blotting にて抑制されていることを確認した。Apoptosis は、YM155 投与群では Annexin V の発現が増強しており Apoptosis が亢進していることが示された。次に、*in vitro* での YM155 による RD 細胞の増殖抑制作用として WST-8 Assay を用いた細胞の生存率の実験では、YM155 投与で RD 細胞の生存率は、YM155 の用量依存的に低下した。

(3) 次に YM155 と各種抗癌剤を投与では、YM155 と CDDP との併用時に生存率の低下を認め、YM155 が抗癌剤の作用を増強することが分かった。しかし、その他の 2 剤では、明らかな相乗効果は見られなかった。これは RD

細胞株が VAC 療法の抗癌剤に耐性があった可能性が考えられた。Apoptosis は、YM155 単独投与より、さらに CDDP との相乗作用で亢進することが分かった。

(4) さらに *in vivo* での実験として、YM155 の RD 細胞株のヌードマウス接種モデルによる腫瘍効果の検証では、YM155 単独でも腫瘍は縮小し、CDDP 併用で、さらに腫瘍の縮小を認めた。

Survivin は横紋筋肉腫株の RD で高率に発現され、Survivin の阻害剤である YM155 にて *in vitro*, *in vivo* において腫瘍抑制効果が示された。今後、小児悪性腫瘍における Survivin が分子標的治療のターゲットとなり得る可能性を示唆した。



(図1) マウスに形成された横紋筋肉腫
<引用文献>

- (1) Fangusaro JR, Caldas H, Jiang Y, Altura RA: Survivin: an inhibitor of apoptosis in pediatric cancer. *Pediatr Blood Cancer*. 47, 4-13, 2006.
- (2) Ikeda M, Okamoto I, Tamura K, Satoh T, Yonesaka K, Fukuoka M, Nakagawa K: Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G(2)-M arrest in A549 cells. *Cancer Lett*. 248, 292-298, 2007.

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1件)

Shuichiro Uehara, Takaharu Oue, Miyoko Kawatsu, Keigo Nara, Masahiro Fukuzawa: Increased expression of survivin in hepatoblastoma after chemotherapy. *European Journal of Pediatric Surgery* 46, 326-331, 2013.

〔学会発表〕(計2件)

Shuichiro Uehara, Miyoko Kawatsu, Takaharu Oue, Masahiro Fukuzawa: The expression of survivin and its increased expression

after chemotherapy in hepatoblastoma, XXV
International Symposium on Paediatric
Surgical Research, London, Sep 21-22, 2012
(Oral)

上原 秀一郎、大植 孝治、福澤 正洋、肝
芽腫組織における抗アポトーシス分子
survivin 発現の検討、第 112 回日本外科学会
定期学術集会、千葉・幕張、2012/4/12-14(サ
ージカルフォーラム)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

奈良 啓悟 (大阪府立母子保健総合医療セ
ンター・小児外科・副部長)

研究者番号: 00432477

(2)研究分担者

福澤 正洋 (大阪大学・名誉教授)

研究者番号: 60165272

大植 孝治 (兵庫医科大学・小児外科・准
教授)

研究者番号: 50314315

上原秀一郎 (大阪大学・医学系研究科・講
師)

研究者番号: 00448060

上野 豪久 (大阪大学・医学系研究科・助
教)

研究者番号: 10456957

銭谷 昌弘 (大阪大学・医学部附属病院・
医員)

研究者番号: 40643531

中畠 賢吾 (大阪大学・医学部附属病院・
医員)

研究者番号: 50643532