

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462778

研究課題名(和文) 神経芽腫病期4sのiPS細胞疾患モデルによる同時多発・自然退縮メカニズムの解析

研究課題名(英文) Neuroblastoma stage 4S: analysis of multifocal development and spontaneous regression mechanism using iPS cell disease model

研究代表者

文野 誠久 (Fumino, Shigehisa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40405254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：4s期神経芽腫のiPS細胞疾患モデルの作成のため、まずヒト線維芽細胞に山中4因子を導入し、iPS細胞への形質転換が行えることを確認した。各種成長因子を投与し、神経堤幹細胞への分化を試みたが、神経突起様構造を認めるものの、完全な分化は困難であった。

そこで、神経芽腫における分化機構の解明のため、ヒト間葉系幹細胞(hMSC)と既存の神経芽腫cell lineとの共培養を試みたところ、神経突起の延長が認められ、hMSCの神経芽腫分化作用が認められた。

この結果からhMSCの治療ポテンシャルが同定されたため、神経芽腫モデルマウスに対するhMSCの効果について、研究を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：For developing iPS cell disease model of Stage 4s neuroblastoma, we converted normal human fibroblast into iPS cells. Moreover, we tried to differentiate iPS cell to neural crest stem cell, but it failed.

Next, we tried to co-culture hMSC and human neuroblastoma cell line in order to clarify the differentiation of the neuroblastoma cells. Finally, we observed the neurite elongation of neuroblastoma cells.

From this results, we are going to analyze the therapeutic potential of hMSCs as novel differentiation therapy of neuroblastoma.

研究分野：小児悪性固形腫瘍

キーワード：4s神経芽腫 iPS細胞 神経堤幹細胞

1. 研究開始当初の背景

* 乳児期に発生する小児悪性腫瘍である神経芽腫は、他の腫瘍と異なる様々な特有の生物学的特性を有している。なかでも、肝、皮膚、骨髄などに転移があつて、予後が良好あるいは自然退縮または分化しうる乳児神経芽腫は病期 4s と定義され、そのメカニズムはアポトーシスが関連していると考えられているものの未だ不明のままである。

* 4s 期の典型的な自然経過として、初期は増殖しその後徐々に転移巣の腫瘍結節が退縮し、数ヶ月かけて消失する。その生存率は 70-90%とされ、明らかに遺伝子異常に帰因する発癌機構とは一線を画する性質を有する。しかし、なかには悪性度の高いと考えられる 4s も含まれ、治療強度の軽減を考慮するとともにこれらの予後不良例との生物学的差異を予測することがさらなる治療成績の改善のためには必要である。

* 4s 期神経芽腫の転移部位はすべて神経堤幹細胞 NCSC s の遊走部位と一致しており、4s 期は癌細胞の転移をみているのではなく、NCSC s 異常により胎生期におこるべき増殖およびアポトーシスと分化の遅延を表現している可能性がある。しかし、これらの 4s 発生に関しては、適切な疾患モデル作成が不可能であり、研究が進んでいないのがこれまでの現状である。

2. 研究の目的

* 近年、ヒト体細胞から人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; iPSCs) を樹立する技術が確立され脚光を浴びている。* 本研究では 4s 担癌患者体細胞から疾患特異的 iPSC 細胞を樹立し、神経堤幹細胞へ分化させることで、4s 期の発症過程を再現し、さらに genetic な解析を行って正常コントロールと比較することで、発生メカニズムの解析を行い、4s の同時多発発生、自然退縮および分化機構を解明することを目標とした。

3. 研究の方法

コントロールからの iPSC 細胞株の樹立
乳児患者の皮膚より線維芽細胞を採取し、iPSC 細胞株を樹立・継代する。

4s 担癌患者からの iPSC 細胞株の樹立
4s 担癌乳児患者の皮膚より線維芽細胞を採取し、iPSC 細胞株を樹立・継代する。

iPSC 細胞株からの神経堤幹細胞への分化誘導それぞれの株を、Lee らの方法 (Nature Protocols 2010) に準じて、MS5 細胞と共培養することで neural crest stem cell へと分化誘導させる。

コントロール検体および 4s 神経芽腫由来 iPSC 細胞分化細胞の DNA マイクロアレイによる比較解析を行う。

4. 研究成果

* コントロール検体として、ヒト線維芽細胞に山中 4 因子を導入し、iPSC 細胞への形質転

換が行えることを確認した。

* ついで、これに Noggin, SHH, FGF8, BDNF 等の各種成長因子を投与し、神経堤幹細胞への分化を試みたが、神経突起様構造を認めるものの、完全な分化は困難であった。

* そこで、神経芽腫における分化機構の解明および新規治療開発のため、ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) と既存の神経芽腫 cell line との共培養を試みたところ、神経突起の延長が認められ、hMSC の神経芽腫分化作用が認められた。

* この結果から hMSC の治療ポテンシャルが同定されたため、神経芽腫モデルマウスに対する hMSC の効果について、研究を進めていく予定である。

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 26 件)

- 1) 文野誠久, 田尻達郎: 消化器疾患 10 先天性胆道拡張症. 小児科診療 2015 年増刊号 診断と治療社, 東京: pp197-200, 2015 (査読なし).
- 2) 田尻達郎, 文野誠久: 第 2 章小児がん D 小児がんにおける治療法〔外科治療〕 3 内臓固形腫瘍. 小児血液・腫瘍学 日本小児血液・がん学会編 診断と治療社, 東京: pp158-161, 2015 (査読なし).
- 3) 田尻達郎: 日本における小児悪性固形腫瘍の治療とグループスタディの現状. チャイルドヘルス 18:21-25 2015(査読なし).
- 4) Fumino S, Kimura K, Tajiri T: Validity of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from two centers in Western Japan. J Pediatr Surg J Pediatr Surg 50: 2102-2106, 2015 (査読あり).
- 5) 米倉竹夫, 田尻達郎, 文野誠久, 他: 小児の外科的悪性腫瘍, 2013 年登録症例の全国集計結果の報告. 日小外会誌 51: 96-132, 2015 (査読なし).
- 6) 田尻達郎: 第 11 節 小児固形悪性腫瘍における遺伝子解析による悪性度診断と遺伝子治療. 遺伝子治療・診断の最先端技術と新しい医薬品・診断薬の開発. 348-353, 2014 (査読なし).
- 7) 樋口恒司, 文野誠久, 田尻達郎, 他: 胸壁悪性軟部肉腫に対する肋骨合併切除・胸郭再建術. 小児外科 46: 120-124, 2014(査読なし).
- 8) 文野誠久, 金 聖和, 田尻達郎, 他: 腸間膜リンパ管腫切除術. 小児外科 46: 143-147, 2014 (査読なし).
- 9) 文野誠久, 加藤久尚, 田尻達郎, 他: 胆汁うっ滞 先天性胆道拡張症. 周産期医学 44: 1343-1346, 2014 (査読なし).
- 10) 文野誠久, 坂井宏平, 田尻達郎, 他: 臍・胆管合流異常の診断の最前線: 臍・胆管合

- 流異常における DIC-CT の診断意義 . 胆と膵 35 : 897-900 , 2014 (査読なし) .
- 11) Hirakawa M, Nishie A, Tajiri T, et al: Efficacy of preoperative transcatheter arterial chemoembolization combined with systemic chemotherapy for treatment of unresectable hepatoblastoma in children. *Jpn J Radiol* 32: 529-536, 2014 (査読あり) .
 - 12) Sakai K, Fumino S, Tajiri T, et al: Prenatal administration of neuropeptide bombesin promotes lung development in a rat model of nitrofen-induced congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 49: 1749-1752, 2014 (査読あり) .
 - 13) 米倉竹夫, 田尻達郎, 文野誠久, 他: 小児の外科的悪性腫瘍 2012 年登録症例の全国集計結果の報告 . 日小外会誌 50 : 114-150, 2014 (査読なし) .
 - 14) 文野誠久, 辻 悠佑, 田尻達郎: 新生児編 CT 診断 B. その他 腹部の CT 診断 . 周産期医学 43 巻増刊 周産期の画像診断第 2 版 東京, 東京医学社 : 562-566, 2013 (査読なし) .
 - 15) 田尻達郎 . 小児がん . 日本癌治療学会誌 48 : 401-415, 2013 (査読なし) .
 - 16) 前田貢作, 田尻達郎, 日本小児外科学会悪性腫瘍委員会, 他: 小児の外科的悪性腫瘍, 2011 年登録症例の全国集計結果の報告 . 日小外会誌 49:70-105 2013 (査読なし) .
 - 17) 文野誠久, 木村 修, 田尻達郎, 他: 小腸不全に対する中心静脈カテーテル管理-venous sparing strategy . 小児外科 45 : 463-466, 2013 (査読なし) .
 - 18) 前田貢作, 田尻達郎, 日本小児外科学会悪性腫瘍委員会: 小児固形悪性腫瘍の予後追跡調査結果の報告 2001~2005 年登録症例について . 日小外会誌 49:1131-1159, 2013 (査読なし) .
 - 19) Iehara T, Hamazaki M, Tajiri T, et al: Japanese Infantile Neuroblastoma Cooperative Study Group. Successful treatment of infants with localized neuroblastoma based on their MYCN status. *Int J Clin Oncol* 18: 389-395, 2013 (査読あり) .
 - 20) Kohashi K, Nakatsura T, Tajiri T, et al: Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum Pathol* 44: 526-533, 2013 (査読あり) .
 - 21) Kimura O, Fumino S, Tajiri T, et al: Impact of our new protocol on the outcome of the neonates with congenital diaphragmatic hernia. *Pediatr Surg Int* 29: 335-339, 2013 (査読あり) .
 - 22) Fumino S, Higuchi K, Tajiri T, et al: Clinical analysis of liver fibrosis in choledochal cyst. *Pediatr Surg Int* 29: 1097-1102, 2013 (査読あり) .
 - 23) Teshiba R, Tajiri T, Sumitomo K, et al: Identification of a KEAP1 germline mutation in a family with multinodular goitre. *PLoS One* 28: e65141, 2013 (査読あり) .
 - 24) Hiyama E, Ueda Y, Tajiri T, et al: Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor. A cisplatin plus pirarubicin-based JPLT2 chemotherapy for hepatoblastoma: experience and future of the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT). *Pediatr Surg Int* 29: 1071-1075, 2013 (査読あり) .
 - 25) Rumbajan JM, Maeda T, Tajiri T, et al: Comprehensive analyses of imprinted differentially methylated regions reveal epigenetic and genetic characteristics in hepatoblastoma. *BMC Cancer* 13: 608, 2013 (査読あり) .
 - 26) 坂本謙一, 家原知子, 文野誠久, 他: 胎児超音波検査と胎児 MRI が有効であった新生児腫瘍性疾患の 4 例 . 日小血がん会誌 50 : 125-129, 2013 (査読あり) .
- [学会発表] (計 18 件)
- 1) Fumino S, Kimura K, Tajiri T, et al: Validity of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from two centers in Western Japan. 48th Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2015 May 17-21; Jeju Island, South Korea.
 - 2) 東 真弓, 文野誠久, 田尻達郎, 他: 神経芽腫細胞株に対する MAPK 阻害の効果 . 第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 18 日; 名古屋国際会議場, 名古屋 .
 - 3) 木村幸積, 文野誠久, 田尻達郎: 脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による神経芽腫に対する新規分化誘導療法の開発 . 第 52 回日本小児外科学会学術集会 2015 年 5 月 28 日; 神戸国際会議場, 神戸 .
 - 4) 文野誠久, 木村幸積, 田尻達郎, 他: 限局性神経芽腫に対する IDRF に基づいた外科治療ガイドラインの妥当性と有用性: 西日本における 2 施設からの報告 . 第 52 回日本小児外科学会学術集会 2015 年 5 月 29 日; 神戸国際会議場, 神戸 .
 - 5) 文野誠久, 坂井宏平, 田尻達郎, 他: 縦隔奇形腫に対する外科治療戦略 . 第 31 回日本小児外科学会秋季シンポジウム 2015 年 10 月 31 日; くまもと県民交流館パレア・鶴屋ホール, 熊本 .
 - 6) 東 真弓, 文野誠久, 田尻達郎, 他: Tumor suppression by JNK inhibition in neuroblastoma cells . 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015 年 11 月 27 日; 甲府富士屋ホテル, 山梨 .
 - 7) 木村幸積, 文野誠久, 田尻達郎, 他: 神経芽腫に対する新規分化誘導細胞療法としての hMSCs 投与の検討 . 第 57 回日本小児

- 血液・がん学会学術集会 2015年11月27日；甲府富士屋ホテル，山梨．
- 8) 田中智子，文野誠久，田尻達郎，他：新規神経芽腫治療薬としての MEK 阻害剤の in-vitro での治療効果検討．第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 2015年11月27日；甲府富士屋ホテル，山梨．
 - 9) Fumino S, Furukawa T, Tajiri T, et al: Surgical strategy for mediastinal neuroblastic tumors in children: a single institution experience. Advances in Neuroblastoma Research 2014 May 13-16; Koln, Germany.
 - 1) Fumino S, Kimura K, Tajiri T, et al: Validity and reliability of image-defined risk factors in localized neuroblastoma: A report from 2 territorial centers in Japan. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2014 Oct 21-26; Tronto, Canada.
 - 2) 田尻達郎，中川原章：JNBSG の現況と今後の展開．第 51 回日本小児外科学会学術集会 2014年5月9日；大阪国際会議場，大阪．
 - 3) 文野誠久，田尻達郎，日本小児外科学会悪性腫瘍委員会，他：日本小児外科学会の悪性腫瘍登録事業における倫理課題．第 30 回日本小児外科学会秋季シンポジウム 2014年11月1日；淡路夢舞台国際会議場，兵庫．
 - 4) 田尻達郎．神経芽腫に対する外科療法．第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月30日；岡山コンベンションセンター，岡山．
 - 5) 文野誠久，坂井宏平，田尻達郎，他：リスク分類に基づく縦隔原発神経芽腫群腫瘍に対する外科的治療戦略．第 51 回日本小児外科学会学術集会 2014年5月8日；大阪国際会議場，大阪．
 - 6) 文野誠久，木村幸積，田尻達郎，他：局所神経芽腫における IDRF に基づいた手術適応の妥当性の評価．第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014年11月30日；岡山コンベンションセンター，岡山．
 - 7) Fumino S, Kimura O, Tajiri T, et al: Clinical features and surgical intervention of primary mediastinal tumors in children: a 25-year single institution experience. 45th Congress of the International Society of Paediatric Oncology. 2013 Sep 25-28; Hongkong, China.
 - 8) 文野誠久，樋口恒司，田尻達郎，他：Cancer board を中心とした小児がん集学的治療における小児外科医の役割．第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013年4月13日；福岡国際会議場，福岡．
 - 9) 文野誠久，樋口恒司，田尻達郎，他：縦隔原発神経芽腫群腫瘍における外科治療戦

略．第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013年11月29日；ヒルトン福岡シーホーク，福岡．

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

文野 誠久 (FUMINO, Shigehisa)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40405254

(2)研究分担者

田尻 達郎 (TAJIRI, Tatsuro)

京都府立医科大学医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80304806