

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462783

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞を標的とした難治性小児固形腫瘍に対する治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the treatment that target stem cells for the intractable pediatric solid tumor

研究代表者

瀧本 康史 (FUCHIMOTO, YASUSHI)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40219077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児腫瘍細胞株である、肝芽腫株、横紋筋肉腫株、神経芽腫株、ラブドイド腫瘍株における腫瘍幹細胞マーカーの発現検索では、CD44は全ての腫瘍株で発現が確認され、CD133の発現は横紋筋肉腫株や神経芽腫株では一部の株では確認されたが、CD44vは多くの小児がんで低発現であった。肝芽腫株HuH6株ではFACSにてCD13の表出が約10%に認められたため、CD13陽性細胞をソーティングし、免疫不全マウスにenrichして移植した。細胞数1/10,1/100, 1/1000のいずれのenrichに対しても16週にて腫瘍は形成されなかった。

研究成果の概要(英文)：In hepatoblastomas cell line, rhabdomyosarcoma cell line, neuroblastoma cell line, rhabdoid tumor cell line, the expression of tumor stem cells markers such as CD44 was confirmed with all tumor cell lines, and the expression of CD133 was confirmed with a rhabdomyosarcoma cell lines and the neuroblastoma cell lines, but CD44v was only a few expression in many childhood tumor. Because expression of CD13 was found in approximately 10% in FACS with the hepatoblastomas cell lines (HuH6), we performed sorting of CD13 positive cells and transplanted enrich them in immunodeficiency mice. Tumor was not formed for neither enrich of cell count 1/10,1/100, 1/1000 in 16 weeks.

研究分野：小児腫瘍、小児再生医療、免疫

キーワード：小児固形腫瘍 腫瘍幹細胞 CD44v CD13 肝芽腫

### 1. 研究開始当初の背景

小児がんは近年、化学療法、放射線療法、外科療法による集学的治療により著しい成績の向上がみられた。しかし進行小児固形腫瘍については、化学療法や放射線療法の強化という戦略のみではもはや治療成績の改善は得られなくなっている。現在も生存率 50%未滿の治療抵抗性小児固形腫瘍に進行性の神経芽腫、肝芽腫、軟部肉腫がある。

近年、腫瘍の heterogeneity から腫瘍中に微量に存在する腫瘍幹細胞 (tumor stem cell) が腫瘍細胞を生み出しており、腫瘍幹細胞は腫瘍細胞と比較して化学療法、放射線療法に対する耐性が高いと考えられている。難治性小児固形腫瘍が現在の集学的治療をもってしても、極めて治療抵抗性である原因として、このように化学療法、放射線療法に対する耐性が高い腫瘍幹細胞が遺残し、再発・転移をきたすためであると考えられている。胃癌、大腸癌では CD44v が膜のシスチントランスポーター (xCT) を安定化することにより ROS を抑制して腫瘍幹細胞としての機能を保っており (Ishimoto T, Cancer Cell 2011)、乳癌の肺転移モデルで xCT を阻害するスルファラジンにて肺転移が完全に抑制され抗腫瘍幹細胞効果が証明された (Yae T, Nat Commun 2012)、また肝臓癌では CD13 陽性細胞が高い腫瘍形成能と自己複製能を有していた。CD13 は、ROS の排泄をつかさどる機能を有しており、マウス担癌モデルにおいて、CD13 阻害剤に加え、ROS を誘導する抗癌剤を投与することにより、著明に高い抗腫瘍効果が認められた (Haraguchi N, J Clin Invest 2010)。このように腫瘍幹細胞関連マーカーである CD44v や CD13 を介した細胞内 ROS 蓄積抑制作用は腫瘍の化学療法、放射線療法に対する抵抗性に深く関わっていることが予想され、CD44v や CD13 の発現が高い腫瘍においては CD44v、xCT や CD13 を標的とした治療により腫瘍幹細胞を特異的に標的とした新規治療法が開発できる可能性がある。

我々は横紋筋肉腫細胞株において CD133 陽性細胞は陰性細胞と比較して、抗癌剤への耐性が強く、また免疫不全マウスへの移植モデルにて腫瘍形成能が高いことを示し、小児固形腫瘍にも腫瘍幹細胞が存在し、治療抵抗性を生じることを示した。また臨床検体においても、肝芽腫、骨肉腫の double cancer (重複癌) 症例における化学療法前後での肝芽腫、骨肉腫での CD44v の免疫組織染色による比較検討にて肝芽腫、骨肉腫ともに治療前には CD44v の発現が認められなかったが、化学療法後に CD44v8-10 の発現を認める腫瘍細胞を認め、これは化学療法に耐性機構のある腫瘍幹細胞が多く残存したためではないかと考えられ報告した (Yoshida G, Fuchimoto Y, BMC Cancer 2012。) 小児固形腫瘍は化学療法に反応するものが多く、時には外科治療前に自己血液幹細胞移植が必要なほど強力な

ネオアジュバンド療法を行う。そのような治療を行った後にも再発例の予後は非常に悪く、これには化学療法ならびに放射線療法に抵抗性の腫瘍幹細胞の残存に起因するものと考えられる。そのため腫瘍幹細胞マーカー (CD44v, CD13) を利用した腫瘍幹細胞マーカー阻害薬による生物学的特性、機能解析は腫瘍幹細胞を標的とした治療の開発に繋がり、難治性小児固形腫瘍治療成績を向上させるブレイクスルーとなる可能性も期待される。

### 2. 研究の目的

集学的治療によっても進行小児固形腫瘍の治療成績は依然生存率が低く治療抵抗性である。これら治療抵抗性小児固形腫瘍に対する化学療法、放射線療法の強化は極限であり、新規治療法の開発が喫緊の課題である。成人癌領域では癌幹細胞の概念が認められてきており、小児がんにおいても再発・転移にこの癌幹細胞が深く関わっているとの仮説をたてて以下の3点を明らかにして、難治性小児固形腫瘍の癌幹細胞に対しての新規治療の開発を考案する。

目的 1) 細胞株 (神経芽腫、肝芽腫、軟部肉腫) の癌幹細胞関連マーカー (CD44v, CD13) 発現評価。

目的 2) 細胞株での CD44v または CD13 阻害薬による腫瘍形成抑制の効果の評価 (移植モデル)。

目的 3) 臨床検体 (神経芽腫、肝芽腫、軟部肉腫) での CD44v, CD13 の発現評価。

### 3. 研究の方法

難治性小児固形腫瘍 (神経芽腫、肝芽腫、軟部肉腫) の細胞株で腫瘍幹細胞マーカー (CD44v, CD13) の発現を FACS にて評価する。マーカーの発現量と予後因子を付きあわせる (目的 1)。次に FACS sorting にて腫瘍幹細胞マーカー (CD44v または CD13) にてそれぞれのマーカーの陽性/陰性で腫瘍細胞を分離し、陽性細胞と陰性細胞の ROS の発現量の解析を行い、造腫瘍能を比較する。更には腫瘍幹細胞に対して腫瘍幹細胞阻害 (既存薬) にて抗癌剤による ROS の変化の検討、また造腫瘍能の変化の評価を行う (目的 2)。神経芽腫、肝芽腫、軟部肉腫の臨床組織検体にて化学療法前後の原発巣、転移巣の腫瘍細胞を採取し、上記の腫瘍幹細胞の解析と ROS の関連性、更には腫瘍幹細胞阻害による ROS の変化の検討、また造腫瘍能の変化の評価を行う (目的 3)。

### 4. 研究成果

小児がん細胞株 (肝芽腫細胞株 (HepG2, HuH6)、横紋筋肉腫細胞株 (Rh30, KYM-1, RMS-YM, RD)、神経芽腫細胞株 (LAN5)、ラブドイド腫瘍株 (W4) など)、臨床検体組織における腫瘍幹細胞マーカー候補 (CD13, CD44, CD44v, CD133) の発現検索では、CD44 は全ての腫瘍

株で発現が 20%程度確認され、CD133 の発現も横紋筋肉腫株や神経芽腫株の一部では確認された。しかし、一部の成人癌で腫瘍幹細胞との密接な関係を指摘される CD44v は小児がんでは多くのがん腫細胞株で、成人腫瘍とは異なり発現が低いことが明らかにされた。

肝芽腫細胞株 (HepG2, HuH6) では FACS にて CD13 の表出がそれぞれ約 50%, 10% に認められた。そのため HuH6 株を用いて CD13 陽性細胞をソーティングし、SCID-NOD マウスに enrich して移植した。bulk 細胞では腫瘍を形成したのに対して 1/10(1.0x10<sup>4</sup>), 1/100(1.0x10<sup>3</sup>), 1/1000(1.0x10<sup>2</sup>) のいずれの enrich に対しても 16 週間の経過では腫瘍の形成はみられなかった。そのため肝芽腫の腫瘍幹細胞を標的とした治療薬と期待された CD13 阻害薬(ウベニメクス)の効果の研究を進めることができなかった。

これらの結果より研究最終年度には研究計画の修正が検討された。近年、組織幹細胞として Wnt signal のターゲット遺伝子である Lgr5 が注目されているが、Lgr5 を腫瘍幹細胞候補マーカーとして小児腫瘍株における発現や、in vivo での腫瘍造成能を評価する予定である。また近年、エピゲノムの制御状態の改変研究において、初期化因子発現により異型増殖細胞が誘導され、小児がんに類似した病変が形成されることが明瞭となってきた。このような初期化因子発現により形成された腫瘍(小児がん類似)の既知の腫瘍幹細胞マーカーならびに体細胞幹細胞マーカーを評価することは小児がん特有の腫瘍幹細胞マーカーの発見につながる可能性があり、興味深いと思われ、今後の検討を予定している。

## 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 11 件)

Ishida Y, Qiu D, Maeda M, Fujimoto J, Kigasawa H, Kobayashi R, Sato M, Okamura J, Yoshinaga S, Rikiishi T, Shichino H, Kiyotani C, Kudo K, Asami K, Hori H, Kawaguchi H, Inada H, Adachi S, Manabe A, Kuroda T. Secondary cancers after a childhood cancer diagnosis: a nationwide hospital-based retrospective cohort study in Japan. *Int J Clin Oncol*. Peer reviewed. 2015 [Epub ahead of print]  
DOI:10.1007/s10147-015-0927-z

Hotta R, Fujimura T, Shimojima N, Nakahara T, Fuchimoto Y, Hoshino K, Morikawa Y, Matsufuji H, Kuroda T. Application of nuclear medicine to achieve less invasive surgery for malignant solid

tumors in children. *Pediatr Int*. Peer reviewed. 2014;56:896-901  
DOI:10.1111/ped.12368

宇高徹、須佐美知郎、中山口バート、渡部逸央、堀内圭輔、星野健、黒田達夫、佐々木文、向井万起男、戸山芳昭、森岡秀夫。横紋筋肉腫治療後 26 年で発症した放射線誘発性軟骨肉腫の 1 例。臨床整形外科。査読有。2014; 49(8): 723-728  
<http://dx.doi.org/10.11477/mf.1408103128>

高橋信博、富田紘史、石濱秀雄、藤村匠、加藤源俊、藤野明浩、星野健、嶋田博之、高橋孝雄、黒田達夫。当院での進行・再発神経芽腫に対する外科的治療の検討。日本小児外科学会雑誌。査読有。2014; 50(3): 645  
DOI:なし

Yamamoto Y, Fukuda K, Fuchimoto Y, Matsuzaki Y, Saikawa Y, Kitagawa Y, Morikawa Y, Kuroda T. Cetuximab promotes anticancer drug toxicity in rhabdomyosarcomas with EGFR amplification in vitro. *Oncol Rep*. Peer reviewed. 2013;30(3):1081-1086  
DOI:10.3892/or.2013.2588

黒田達夫。若年発症のがん。臨床外科。査読有 2013; 68(5): 564-568  
<http://dx.doi.org/10.11477/mf.1407104572>

黒田達夫、星野健、藤野明浩、下島直樹、金森豊、淵本康史、森鉄也、正木英一、中澤温子。固形腫瘍の治療の進歩 小児期の固形腫瘍治療における局所治療の役割。日本小児血液・がん学会雑誌。査読有 2013; 50(3): 322-326  
DOI:なし

Yoshida G. J., Fuchimoto Y, Osumi T, Shimada H, Hosaka S, Morioka H, Mukai M, Masugi Y, Sakamoto M, Kuroda T. Li-Fraumeni syndrome with simultaneous osteosarcoma and liver cancer: Increased expression of a CD44 variant isoform after chemotherapy. *BMC cancer*. Peer reviewed. 2012;12:444  
DOI:10.1186/1471-2407-12-444

Fuchimoto Y, Morikawa N, Kuroda T, Hirobe S, Kamagata S, Kumagai M, Matsuoka K, Morikawa Y. Vincristine, actinomycin D, cyclophosphamide chemotherapy resolves Kasabach-Merritt syndrome resistant to conventional therapies. *Pediatrics International*. Peer reviewed. 2012;54(2):285-287  
DOI:10.1111/j.1442-200x.2011.03414

Osumi T, Miharuru M, Fuchimoto Y, Morioka H, Kosaki K, Shimada H. The germline TP53 mutation c.722 C>T promotes bone and liver tumorigenesis at a young age. *Pediatr Blood Cancer*. Peer reviewed.

2012;59(7):1332-1333

DOI:10.1002/psc.24269

瀧本康史.【臓器移植臨床における免疫寛容導入の試みと現状】Mixed chimerismによる免疫寛容誘導 大動物における前臨床研究と臨床応用. 総説 今日移植 査読無 2012;25(4):301-308

DOI:なし

〔学会発表〕(計 3 件)

狩野元宏、瀧本康史、加藤源俊、藤村巧有末篤宏、高里文香、富田紘史、下島直樹、星野健、大隅朋生、嶋田博之、中澤温子、黒田達夫、異なるクローンからなる神経芽腫2例から示唆された直視下生検の重要性、第49回日本小児外科学会学術集会、2012年5月14日、パンフィコ横浜(神奈川県横浜市)

黒田達夫、小児期の固形腫瘍治療における局所治療の役割、第54回日本小児血液・がん学会(シンポジウム)、2012年11月30日、パンフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Fuchimoto Y, Tanabe M, Hoshino K, Yamada Y, Kawachi S, Itano O, Obara H, Kitagou M, Shinoda M, Shimojima N, Matsubara K, Kitagawa Y, Ohdan O, Kuroda T、異なるクローンからなる神経芽腫2例から示唆された直視下生検の重要性、American Transplant Congress、2012年6月4日、ボストン(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀧本 康史 (FUCHIMOTO, Yasushi)

国立成育医療研究センター・外科・医長

研究者番号: 40219077

### (2) 研究分担者

黒田 達夫 (KURODA, Tatsuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 60170130

### (3) 研究分担者

大喜多 肇 (Ohkita, Hajime)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号 50317260