

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861668

研究課題名(和文) 小児悪性固形腫瘍癌幹細胞におけるアルデヒド脱水素酵素1の発現に関する研究

研究課題名(英文) The research on the expression of aldehyde dehydrogenase 1 on cancer stem cells of pediatric solid tumors

研究代表者

中畠 賢吾 (Nakahata, Kengo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50643532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年アルデヒド脱水素酵素1(ALDH1)が癌幹細胞マーカーとなることが報告されている。しかし小児悪性固形腫瘍における報告はないため、新たな癌幹細胞マーカーとしてALDH1に着目し、横紋筋肉腫におけるALDH1活性上昇細胞群のコロニー形成能、多分化能、薬剤耐性能を検討した。胎児型横紋筋肉腫の細胞株であるRDおよびKYM-1において、活性上昇群のコロニー形成能、脂肪細胞への分化能、薬剤耐性能は活性低下群に比べ全て亢進していたため、横紋筋肉腫においてALDH1活性上昇細胞群は癌幹細胞の性格を有する可能性が示唆され、新たな治療標的となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is a marker for cancer stem cells (CSCs) in adult cancers. We examined the characteristics of the cells with a high ALDH1 activity (ALDH1high cells) in rhabdomyosarcoma (RMS). We used the human embryonal RMS (ERMS) cell lines RD and KYM-1, and sorted the cells into two subpopulations: ALDH1high cells, and cells with a low ALDH1 activity (ALDH1low cells). To demonstrate that ALDH1high cells have stronger CSC characteristics than ALDH1low cells, we performed both in vitro and in vivo assays. ALDH1high cells comprised 3.9% and 8.2% of the total RD and KYM-1 cells, respectively. ALDH1high cells showed a higher capacity for self-renewal and tumor formation. With regard to chemoresistance, the survival rate of ALDH1high cells was higher following treatment with chemotherapeutic agents for RMS. We confirmed that ALDH1high RD and KYM-1 cells had characteristics of CSCs, and that ALDH1 is a potential marker of CSCs in eRMS.

研究分野：小児がん

キーワード：癌幹細胞 アルデヒド脱水素酵素1 横紋筋肉腫

1. 研究開始当初の背景

近年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ともに、この癌幹細胞が腫瘍における再発や転移、浸潤や播種の原因となり、抗癌剤治療や放射線に抵抗性を示すことが明らかとなってきた。癌が癌幹細胞を頂点とした階層性を持つ集団と考え、抗癌剤治療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、癌幹細胞が癌治療の真の標的細胞であると考えられる。

小児悪性固形腫瘍領域では 2007 年に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、未だに治療に直結するような成果が示されたとは言いがたい。小児悪性固形腫瘍の予後は集学的治療によりめざましい改善をみせているが、進行例や再発例は手術、化学療法や放射線療法などの集学的治療を行っても予後の劇的な改善は得られていない。これらのことから小児悪性固形腫瘍でも癌幹細胞の存在が再発・転移に多大に関与していることが示唆される。

アルデヒド脱水素酵素 1 Aldehyde dehydrogenase1 (以下、ALDH1) は、ほ乳類に共通した 19 種類の ALDH family の predominant isoform の一つである。ALDH1 は幹細胞の初期分化においてレチノールからレチノイン酸への変化を触媒し、細胞の分化や増殖、胚形成などに重要な役割を果たしており、血球系や神経系幹細胞は高い ALDH1 活性の上昇を認めることが報告されている。

2007 年にフローサイトメトリーを基礎とした方法を用いて、ALDH1 活性を有する生細胞をヒト正常乳腺および乳癌組織から分離し、ALDH1 の酵素活性が乳癌幹細胞のマーカーとなることが報告されて以来、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病、脳・肺・卵巣がんの癌幹細胞においてもその活性上昇が報告されており、ALDH1 活性の上昇は癌幹細胞の新規マーカーとして期待されている。

2. 研究の目的

小児悪性固形腫瘍においては癌幹細胞マーカーとして CD133 (Prominin-1: 造腫瘍能、増殖能を制御する) が注目されているが、現時点では治療対象とならない可能性がある。そこで新たな癌幹細胞マーカーとして ALDH1 に着目し、小児悪性固形腫瘍において、ALDH1 活性上昇細胞群が癌幹細胞の性格を有するとの仮説のもと、小児悪性固形腫瘍における ALDH1 活性を評価し、活性上昇群と活性非上昇群に分類し、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、造腫瘍能を評価することにより、小児悪性固形腫瘍の ALDH1 活性上昇群が癌幹細胞の性格を有することを検討した。

3. 研究の方法

小児悪性固形腫瘍の一つである横紋筋肉腫は、小児に発生する肉腫のうち約半数を占めているが、全体の 5 年生存率は 54% と予後の改善がみられていないのが現状であり、本研究では横紋筋肉腫に着目した。

(1) 横紋筋肉腫細胞株における ALDH1 活性の測定と選別

胎児型横紋筋肉腫細胞株である RD および KYM-1 を用いて、フローサイトメトリーにて ALDH1 活性上昇細胞群と活性非上昇細胞群を決定した。次にソーティングを行うことで、ALDH1 の活性上昇細胞群 (以下活性上昇群) と活性非上昇細胞群 (以下活性非上昇群) を分離した。

(2) コロニー形成能 (自己複製能) の評価

2.0% メチルセルロースゲルを用いて培地を作成し、6-well plate (ultra-low attachment) に RD の活性上昇群と活性非上昇群をそれぞれ 5000 個ずつ播種し、2 か月後にコロニー数を計測した。

(3) 多分化能の評価

① 脂肪細胞への分化

RD の活性上昇群と非上昇群を DMSO を添加した培地 (最終濃度 0.1%) で 3 日間培養した後、デキサメサゾン (10mM) ・インスリン (1 μg/ml) ・3-イソブチル-1-メチルキサンチン (0.5mM) を添加した培地 (脂肪細胞分化誘導条件) で 8 日間培養し、Oil Red O 染色を施行した。

② 神経細胞への分化

RD の活性上昇群と非上昇群を ATRA (100nM) を添加した培地で 3 週間培養した後、NCAM を用いて蛍光免疫染色を施行した。

(4) 薬剤耐性能の評価

RD および KYM-1 の活性上昇群と活性非上昇群を 96-well plate に 5000 cell/well とするように播種し、抗癌剤 (ビンクリスチン・シクロホスファミド・エトポシド) を添加し 3 日間培養した。その後 WST-8 assay を用いて生存率を検討した。

(5) リアルタイム PCR による遺伝子発現の評価

リアルタイム PCR を用いて、RD の活性上昇群と活性非上昇群との間で

- ・ALDH1 のアイソフォーム (ALDH1A1, A2, A3, B1, L1, L2)
- ・ABC トランスポーター (ABCG2, ABCB1, ABCA2)
- ・Stemness gene (Sox2)
- ・Oncogene (c-Myc)

の発現を比較した。

(6) 造腫瘍能の評価

NOD/SCID マウス (NOD. CB17-Prd^{scid}/J) に、RD の活性上昇群と活性非上昇群の細胞を

それぞれ 1×10^3 個、 1×10^4 個ずつ皮下注し、2 か月後に腫瘍の形成を評価した。

4. 研究成果

(1) 横紋筋肉腫細胞株における ALDH1 活性の測定と選別

フローサイトメトリーの結果を示す (図 1) ALDH1 活性が上昇している細胞は、RD で全細胞の $3.9 \pm 0.26\%$ 、KYM-1 で $8.2 \pm 0.14\%$ であり、両細胞株で ALDH1 活性上昇細胞を認めた。

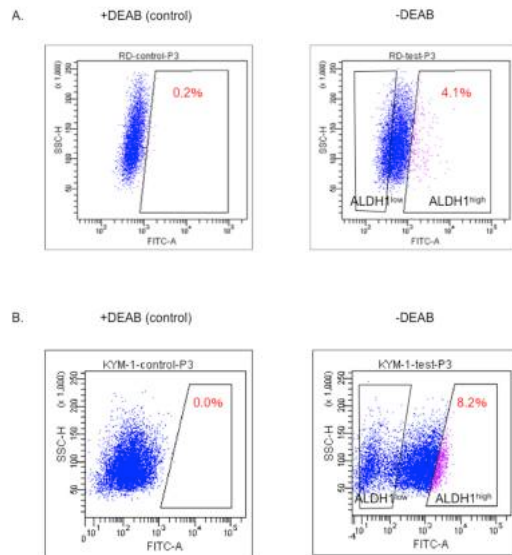


図 1 横紋筋肉腫に細胞株における ALDH1 活性上昇細胞の割合 (A:RD, B:KYM-1)

(2) コロニー形成能 (自己複製能) の評価

活性上昇群において、1well あたり平均 30.3 個のコロニーが形成されていたのに対し、活性非上昇群では平均 14.5 個と、活性上昇群においてコロニー形成能の有意な上昇を認めた (図 2)。

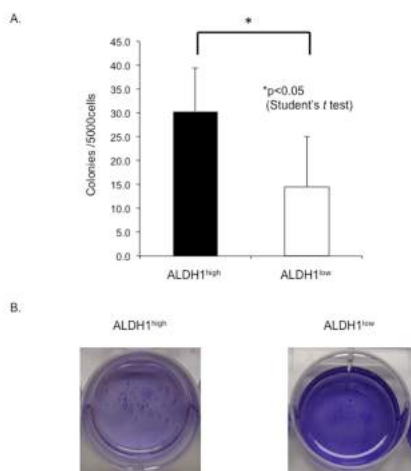


図 2 コロニー形成能の評価

(3) 多分化能の評価

Oil red O により染色される脂肪滴は活性上昇群において大型であり、数が増加していた。また NCAM により細胞膜が染色される細胞は活性上昇群で上昇傾向がみられた。以上より RD の活性上昇群において脂肪細胞および神経細胞への分化を認め、多分化能を有すると考えられた。(図 3)

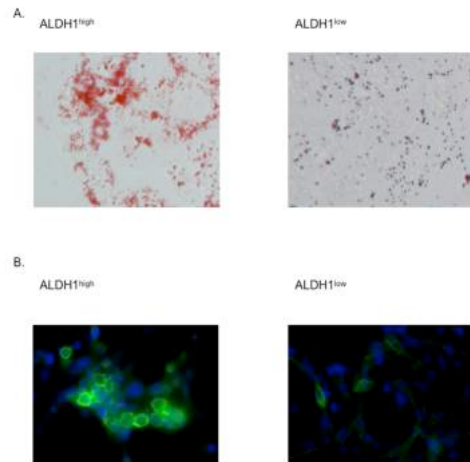


図 3 A: 脂肪細胞への分化
B: 神経細胞への分化

(4) 薬剤耐性能の評価

各薬剤ともに濃度依存的に生存率が低下した。活性上昇群と非上昇群の比較については、活性上昇群において生存率が有意に上昇していることから、高い薬剤耐性能を有すると考えられた (図 4)。

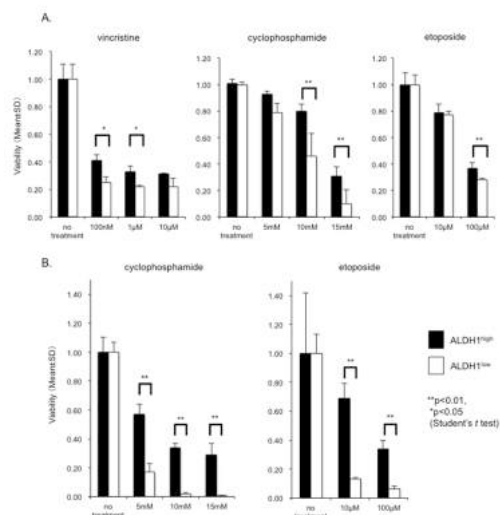


図 4 薬剤耐性能の評価

(5) リアルタイム PCR による遺伝子発現の評価

まず ALDH1 のアイソフォームを調べたところ、RD においては ALDH1A3・B1・L2 の発現上昇により、ALDH1 全体の活性が上昇していると考えられた。次に癌遺伝子である

c-Myc の発現に差は認めなかったが、活性上昇群において Stemness gene の一つである Sox2 の発現が上昇しており、幹細胞性の保持に寄与すると考えられた。ABC トランスポーターの発現については、薬剤排出に関わるとされる ABCG2 および ABCB1 において発現亢進がみられ、高い薬剤耐性能に寄与すると考えられた (図 5)。

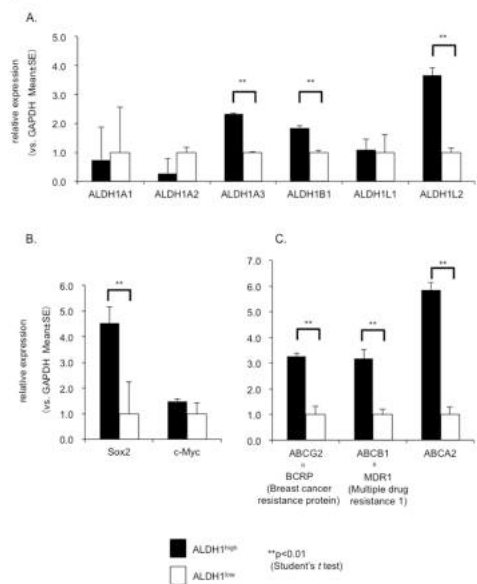


図 5 リアルタイム PCR
A: ALDH1 のアイソフォーム
B: Stemness gene
C: ABC トランスポーター

(6) 造腫瘍能の評価

活性非上昇群において 10000 個の腫瘍を皮下注しても腫瘍を形成したマウスは認めなかったが、活性上昇群では 1000 個の細胞でも腫瘍を形成しており、活性上昇群の細胞は造腫瘍能が有意に高いことが示された (図 6, 表 1)。

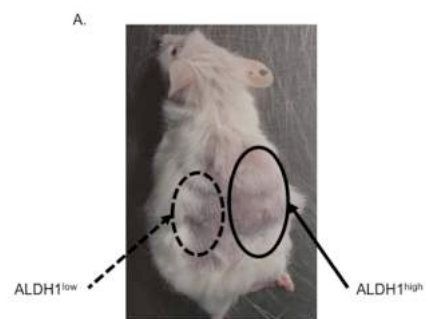


図 6 1 × 10⁴個の腫瘍を皮下注したマウス

	1×10 ³ 個	1×10 ⁴ 個	合計個体数
活性上昇群	2/7(匹)	5/6*(匹)	7/13**(匹)
活性非上昇群	0/7	0/6	0/13

*p<0.05, **p<0.01 (Fisher's exact test)

表 1 皮下注 2 か月後に腫瘍を形成した個体数

以上より、胎児型横紋筋肉腫細胞株において、ALDH1 活性上昇細胞群は高いコロニー形成能、薬剤耐性能および多分化能を持ち、造腫瘍能が高いことから、癌幹細胞の性質を有する細胞群である可能性が示唆された。ALDH1 が胎児型横紋筋肉腫における癌幹細胞マーカーとして臨床に応用できる可能性が示唆された。

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 1 件)

① Nakahata K, Uehara S, Nishikawa S, Kawatsu M, Zenitani M, Oue T, Okuyama H. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) Is a Potential Marker for Cancer Stem Cells in Embryonal Rhabdomyosarcoma. 査読有 10(4):e0125454, 2015
doi: 10.1371/journal.pone.0125454.

[学会発表] (計 5 件)

① 中島賢吾、上原秀一郎、川津美代子、銭谷昌弘、大植孝治、臼井規朗：胎児型横紋筋肉腫における癌幹細胞マーカーとしてのアルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) の発現. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月 3 日～5 日 京都市

② Nakahata K, Uehara S, Zenitani M, Oue T, Okuyama H. Aldehyde Dehydrogenase 1 (ALDH1) is a potential marker for cancer stem cells in embryonal Rhabdomyosarcoma. 46th Congress of the International Society of Paediatric Oncology 2014/10/22-25 Toronto, Canada

③ 中島賢吾、上原秀一郎、川津美代子、銭谷昌弘、大植孝治、臼井規朗：アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) は胎児型横紋筋肉腫において癌幹細胞マーカーとなりうる. 第 23 回日本がん転移学会学術集会 2014 年 7 月 10 日～11 日 金沢市

④ 中島賢吾、上原秀一郎、銭谷昌弘、奥山宏臣：アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) は胎児型横紋筋肉腫において癌幹細胞マーカーとなりうる. 第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 11 月 28 日～30 日 岡山市

⑤ 中島賢吾、上原秀一郎、川津美代子、銭谷昌弘、奥山宏臣：アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) は胎児型横紋筋肉腫において癌幹細胞マーカーとなりうる. 第 74 回日本癌学会学術集会 2015 年 10 月 8 日～10 日 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中島 賢吾 (NAKAHATA, Kengo)

大阪大学大学院医学系研究科

外科学講座小児成育外科・医員

研究者番号：50643532