

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462705

研究課題名(和文) ヒトCD133陽性神経芽腫幹細胞を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic methods targeting human CD133-positive neuroblastoma stem cells

研究代表者

吉田 英生 (Yoshida, Hideo)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：60210712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫において、CD133はがん幹細胞様細胞の分化を抑制し、増殖を促進する。このことから、神経堤細胞や副腎でCD133が高発現することによって、神経芽腫の発がん誘導や転移などの悪性化を引き起こすと予想された。神経芽腫細胞株からCD133陽性細胞を分離し、神経芽腫細胞株と比較検討するとCD133陽性細胞は高い造腫瘍能を示した。また、CD133高発現モデルマウスとしてDBH(ドーパミン脱水素酵素)-CreマウスとCAG-lox-hCD133マウスを交配し、両アレルを有する二重ヘテロF1マウスは副腎でヒトCD133の高発現を示した。

研究成果の概要(英文)：In neuroblastoma, CD 133 suppresses the differentiation of cancer stem cell-like cells and promotes proliferation. Therefore, CD133 expressed highly in neural crest cells and adrenal glands was expected to cause malignant transformation such as carcinogenesis and metastasis of neuroblastoma. When CD133 positive cells were isolated from neuroblastoma cell line and compared with neuroblastoma cell line, CD133 positive cells showed high tumorigenic potential. In addition, DBH (dopamine dehydrogenase) -Cre mouse was crossed with CAG-lox-human CD133 mouse as CD133 high expression model mouse, and double hetero F1 mouse having both alleles showed high expression of human CD133 in the adrenal gland.

研究分野：小児腫瘍学

キーワード：小児腫瘍学 がん幹細胞 神経芽腫

1. 研究開始当初の背景

近年がん幹細胞が注目され、癌の再発・転移の起源になると考えられており、がん幹細胞を標的とする治療の開発が求められている。ヒト癌幹細胞は、表面マーカーを使用し、フローサイトメトリーによって分離、収集されてきた。大腸がんや肺がんなどの様々な腫瘍でがん幹細胞マーカーが同定されてきた。CD133 はがん幹細胞マーカーの一つで様々な腫瘍に発現し、正常幹細胞にも発現を認める。CD133 は、肝臓、肺、メラノーマからのがん幹細胞の同定にも使用されており、これらのCD133 を発現しているがん細胞は、自己複製能、増殖能、腫瘍形成能のような幹細胞の特徴を示すことがわかっている。

神経芽腫において、CD133 はがん幹細胞様細胞の分化を抑制し、増殖を促進する (Takenobu et al, 2011, Oncogene)。このことから、神経芽腫の起源である神経堤細胞および副腎においてCD133 が高発現することによって、神経芽腫の発がんが誘導される可能性が有る。また、神経芽腫が発生する際にCD133 が高発現することで、がん幹細胞の維持と増殖を促進することで、転移などの悪性化を引き起こすと予想される。

2. 研究の目的

CD133陽性神経芽腫細胞の分離・同定後、その機能解析およびモデルマウスによる神経芽腫の発がん誘導を行い、神経芽腫の発がん・再発・転移におけるCD133陽性細胞の役割を明らかにする。次の3点につき重点的に検討した。

- (1) 神経芽腫細胞株を用いてCD133陽性細胞を分離した。
- (2) 分離した細胞を免疫不全マウスに移植し腫瘍能を検討した。
- (3) 多くの神経芽腫の発生部位である神経節および副腎において、CD133を高発現するモデルマウスを作成し、機能解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) 神経芽腫細胞株からのCD133陽性細胞の分離：神経芽腫細胞株はMYCN増殖株：IMR32, CHP134, LA-N-5, MYCN 非増殖株:SH-SY5Yを使用した。sphere culture法で継代培養し、Hoechst排泄法にてFACSでside population (SP) 分画をソートする。SP分画をCD133抗体で標識し、auto MACSでCD133陽性細胞を分離する
- (2) CD133陽性細胞の生物学的特性：CD133陽性細胞と親株細胞 (IMR32, SH-SY5Y) のsphere形成能・増殖曲線を検討した。CD133陽性細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID) の皮下と尾静脈に接種し、局所における造腫瘍能と転移形成能をそれぞれ検討した
- (3) CD133高発現モデルマウス：CD133を高発現させるためのtransgenic (Tg) ベクターは、CAGプロモーター下にIox P配列と終止コドンを挿入し、ヒトCD133のcDNAと連結した、組織特異的に発現可能なものを使用した。ベクターは、マウスES細胞でのRosa26領域に相同組換えを行い、そのES細胞を用いてTgマウス (CAG-Iox-hCD133) を作出した。また、神経節および副腎において、Tgを発現させるため、ドーパミン脱水素酵素 (DBH) プロモーターにCreを連結したマウス (DBH-Cre) を理研から入手した。

4. 研究成果

- (1) 神経芽腫細胞株からのCD133陽性細胞の分離し、CD133陽性細胞の生物学的特性を検討した。CD133陽性細胞と親株細胞 (IMR32, SH-SY5Y) のsphere形成能・増殖曲線では各細胞群ともCD133分画で増殖能が有意に高い結果となった。また、免疫不全マウスを用いた実験ではCD133陽性細胞と親株細胞を免疫不全マウス (NOD/SCID) の皮下と尾静脈に接種し、局所における腫瘍増殖、肝臓・骨髄への転移形成を確認し、

神経芽腫細胞株の転移形成能に少なくとも CD133 陽性細胞は関与することが示された .

(2) CD133 高発現モデルマウス : DBH-Cre マウスと CAG-lox-hCD133 マウスを交配し , 両アレルを有する二重ヘテロF1マウスは , 神経節および副腎においてヒトCD133を高発現することが期待される . 作出したF1マウスを , 生後2ヶ月の段階において解剖し , 副腎 (Adrenal gland) を回収した . 副腎の外見からは , 大きさおよび構造に違いは見られていない . 回収した副腎での遺伝子発現を確認するため , RT-PCRとウェスタンブロットを行ったところ , ヒトCD133の高発現が確認された . 継続して同二重ヘテロF1マウスを飼育し , 自然発症腫瘍を検出していく . さらに , 神経芽腫の原因遺伝子であるMYCNを発現するCAG-lox-MYCNマウスとの掛け合わせによる神経芽腫癌幹細胞モデルマウス構築を検討したい .

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 14 件)

1. Hishiki T, Mise N, Harada K, Ihara F, Takami M, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Yoshida H, Motohashi S. Frequency and proliferative response of circulating invariant natural killer T cells in pediatric patients with malignant solid tumors. *Pediatr Surg Int*. 査読有, 2018 Feb;34(2):169-176. doi: 10.1007/s00383-017-4185-1
2. Hishiki T, Mise N, Harada K, Ihara F, Takami M, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Yoshida H, Motohashi S. Invariant natural killer T infiltration in neuroblastoma with

favorable outcome.

Pediatr Surg Int. 査読有, 2018 Feb;34(2):195-201.

doi: 10.1007/s00383-017-4189-x

3. 光永 哲也, 齋藤 武, 照井 慶太, 中田 光政, 小原 由紀子, 三瀬 直子, 川口 雄之亮, 吉田 英生 小児悪性固形腫瘍経験者のトランジションの現状 施設経験 *日本小児血液・がん学会雑誌*, 査読有, 2017, 53巻5号 Page448-452 Doi: 10.11412/jspho.53.448
4. Kawaguchi Y, Saito T, Mitsunaga T, Terui K, Nakata M, Matsuura G, Kouchi K, Yoshida H. Prediction of respiratory collapse among pediatric patients with mediastinal tumors during induction of general anesthesia. *J Pediatr Surg*. 査読有, 2017, Oct 2. pii: S0022-3468(17)30612-7. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.09.013
5. 小原 由紀子, 齋藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 照井 エレナ, 大野 幸恵, 三瀬 直子, 小林 真史, 吉田 英生 高血圧と高カルシウム血症を呈した間葉芽腎腫の1例 *日本小児外科学会雑誌*, 査読有, 2016, 52巻7号, Page1299-1302 Doi: 10.11164/jjsps.52.7_1299
6. Shiohama T, Fujii K, Hino M, Shimizu K, Ohashi H, Kambe M, Nakatani Y, Mitsunaga T, Yoshida H, Ochiai H, Shimojo N. Coexistence of neuroblastoma and ganglioneuroma in a girl with a hemizygous deletion of chromosome 11q14.1-23.3. *Am J Med Genet A*. 査読有, 2016

- Feb;170A(2):492-7.
doi: 10.1002/ajmg.a.37430
7. Mise N, Takami M, Suzuki A, Kamata T, Harada K, Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ikeuchi T, Nakayama T, Yoshida H, Motohashi S. Antibody-dependent cellular cytotoxicity toward neuroblastoma enhanced by activated invariant natural killer T cells. *Cancer Sci.* 査読有, 2016 Mar;107(3):233-41.
doi: 10.1111/cas.12882
8. Hishiki T, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Hayashi H, Yoshida H. Radioguided localization of neuroblastomas in laparoscopic surgery using (123)I- radiolabeled metaiodobenzylguanidine. *Pediatr Blood Cancer.* 査読有, 2015 Jul;62(7):1297-9.
doi: 10.1002/pbc.25488
9. Oita S, Terui K, Komatsu S, Hishiki T, Saito T, Mitsunaga T, Nakata M, Yoshida H. Malignant rhabdoid tumor of the liver: a case report and literature review. *Pediatr Rep.* 査読有, 2015 Mar 3;7(1):5578.
doi: 10.4081/pr.2015.5578
10. Takenouchi A, Saito K, Saito E, Saito T, Hishiki T, Matsunaga T, Isegawa N, Yoshida H, Ohnuma N, Shirasawa H. Oncolytic viral therapy for neuroblastoma cells with Sindbis virus AR339 strain. *Pediatr Surg Int.* 査読有, 2015 Dec;31(12):1151-9.
doi: 10.1007/s00383-015-3784-y
11. Saida S, Watanabe KI, Kato I, Fujino H, Umeda K, Okamoto S, Uemoto S, Hishiki T, Yoshida H, Tanaka S, Adachi S, Niwa A, Nakahata T, Heike T. Prognostic significance of Aminopeptidase-N (CD13) in hepatoblastoma. *Pediatr Int.*, 査読有, 2015 Aug;57(4):558-66.
doi: 10.1111/ped.12597.
12. Hishiki T, Horie H, Higashimoto Y, Yotsumoto K, Komatsu S, Okimoto Y, Kakuda H, Taneyama Y, Saito T, Terui K, Mitsunaga T, Nakata M, Ochiai H, Hino M, Ando K, Yoshida H, Iwai J. Histological features of primary tumors after induction or high-dose chemotherapy in high-risk, neuroblastoma. *Pediatr Surg Int.*, 査読有, 2014 Sep;30(9):919-26.
doi: 10.1007/s00383-014-3564-0.
13. Shiohama T, Ochiai H, Hishiki T, Yoshida H, Kohno Y. Coexistence of neuroblastoma detected on staging of Langerhans cell histiocytosis. *Pediatr Int.* 査読有, 2014 Aug;56(4):608-10.
doi: 10.1111/ped.12292.
14. 原田和明, 光永哲也, 菱木知郎, 齋藤武, 中田光政, 照井エレナ, 小松秀吾, 小原由紀子, 小林真史, 吉田英生 小児膵腺房細胞癌の1例, *日本小児外科学会雑誌*, 査読有, 2014, 50巻5号, Page939-945,
Doi: 10.11164/jjsps.50.5_939

1. Harada K, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Shibata R, Kobayashi M, Katsumata Y, Nishimura K, Katsumi D, Takami M, Motahasi S, Yoshida H,
神経芽腫細胞による樹状細胞への抑制効果の検討
第59回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017年10月・松山
2. Nakata M, Hishiki T, Saito T, Terui K, Komatsu S, Kakuda H, Ochiai H, Hino M, Shibata R, Harada K, Kobayashi M, Shinno Y, Oita S, Katsumata Y, Nishimura K, Ando K, Taneyama Y, Hurudate K, Yoshida H
肺転移を伴った肝芽腫に対する治療方針の妥当性の検討
第59回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017年10月・松山
3. 秦 佳孝, 春田 雅之, 杉野 隆一, 大平美紀, 中田 光政, 菱木 知郎, 吉田 英生, 上條 岳彦
再発神経芽腫に対してエクソーム解析を行った一例
第59回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017年10月・松山
4. 小松 秀吾, 齋藤 武, 照井 慶太, 中田 光政, 柴田 涼平, 小林 真史, 原田 和明, 勝俣 善夫, 西村 善夫, 西村 雄宏, 勝海 大輔, 吉田 英生
神経芽腫4S症例の検討
第59回日本小児血液・がん学会学術集会, 2017年10月・松山
5. 中田 光政, 岩井 潤, 幸地 克憲, 齋藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 武之内 史子, 松浦 玄, 小松 秀吾, 吉田 英生
胎児・新生児副腎嚢胞性病変30例の鑑別診断
第54回日本小児外科学会学術集, 2017年5月, 仙台
6. 中田 光政, 菱木 知郎, 上條 岳彦, 大平 美紀, 中澤 温子, 齋藤 武, 照井 慶太, 小松 秀吾, 小原 由紀子, 柴田 涼平, 原田 和明, 小林 真史, 秦 佳孝, 西村 雄宏, 文田 貴志, 吉田 英生
小児固形がん晩期合併症と治療緩和, 新戦略 局所腫瘍残存を許容した神経芽腫非遠隔転移症例の検討
第58回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016年12月, 東京
7. 小松 秀吾, 齋藤 武, 照井 慶太, 中田 光政, 小原 由紀子, 柴田 涼平, 原田 和明, 西村 雄宏, 文田 貴志, 吉田 英生
肺転移を伴った腎芽腫の治療経験
第58回日本小児血液・がん学会学術集会, 2016年12月, 東京
8. 三瀬 直子, 高見 真理子, 菱木 知郎, 齋藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 吉田 英生, 本橋 新一郎
神経芽腫細胞に対するNKT細胞によるADCC増強効果の検討
第53回日本小児外科学会学術集会 2016年5月, 福岡
9. 川口 雄之亮, 齋藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 中田 光政, 小原 由紀子, 三瀬 直子, 吉田 英生
小児縦隔腫瘍の臨床像と周術期管理に関する検討
第53回日本小児外科学会学術集会 2016年5月, 福岡
10. 中田 光政, 菱木 知郎, 齋藤 武, 照井 慶太, 光永 哲也, 三瀬 直子, 小原 由紀子, 柴田 涼平, 原田 和明, 小林 真史, 川口 雄之亮, 吉田 英生
横紋筋肉腫 膀胱温存治療を施行した膀胱頸部原発横紋筋肉腫の治療後の排尿機能
第57回日本小児血液・がん学会学術集会, 2015年11月, 甲府
11. 光永 哲也, 齋藤 武, 照井 慶太, 中田

光政, 小原 由紀子, 三瀬 直子, 川口
雄之亮, 吉田 英生

小児悪性固形腫瘍治療後患者のトラン
ジションへの課題

第 57 回日本小児血液・がん学会学術集
会, 2015 年 11 月, 甲府

12. 菱木 知郎, 東本 恭幸, 四本 克己, 勝
俣 善夫, 角田 治美, 落合 秀匡, 種山
雄一, 古館 和季, 齋藤 武, 照井 慶太,
光永 哲也, 中田 光政, 日野 もえ子,
安藤 久美子, 吉田 英生, 岩井 潤
マスキング前後における限局
性神経芽腫の臨床的・生物学的特徴の変
化と治療
第 57 回日本小児血液・がん学会学術集
会, 2015 年 11 月, 甲府

〔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

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 英生 (YOSHIDA, Hideo)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 60210712

(2) 研究分担者

齋藤 武 (SAITO, Takeshi)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20406044

上條 岳彦 (KAMIJO, Takehiko)

埼玉県立がんセンター (臨床腫瘍研究所)・

臨床腫瘍研究所・研究所長

研究者番号: 0262708

照井 慶太 (TERUI, Keita)

千葉大学・医学附属病院・講師

研究者番号: 0375773

中田 光政 (NAKATA, Mitsuyuki)

千葉大学・医学附属病院・助教

研究者番号: 9075775

(3) 連携研究

該当なし ()

(4) 研究協力

該当なし ()