

## 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：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670766

研究課題名(和文) 腫瘍幹細胞増殖制御に基づいた横紋筋肉腫治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of treatment strategy for rhabdomyosarcoma based on control of cancer stem cell proliferation

研究代表者

黒田 達夫 (Kuroda, Tatsuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60170130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：PAX3-FKHRまたはPAX7-FKHRキメラ遺伝子は胞巣型・混合型横紋筋肉腫の76%で陽性なのに対し胎児型では検出されず、生存率はキメラ遺伝子陽性の胞巣型で44.2%に対してキメラ遺伝子陰性の胞巣型では75.0%と有意に高く、胎児型の76.3%と同様だった。

幹細胞マーカー発現は全ての横紋筋肉腫細胞株でCD44陽性、CD44v陰性で、CD133表出率はRh30, KYM-1, RMS-YM株では2%以下、RD株では25%で、CD133陽性細胞は抗癌剤抵抗性で免疫不全マウスにおいて高い造腫瘍能を示した。Genotypeや腫瘍幹細胞のマーカー発現に基づく新治療戦略の可能性が検討された。

研究成果の概要(英文)：Either PAX3-FKHR or PAX7-FKHR gene was positive in 76% of alveolar type rhabdomyosarcoma, whereas never detected in embryonal type tumor. Survival rate was significantly lower in alveolar type cases with positive chimeric gene ( $44.2 \pm 7.3\%$ ) compared to those with negative chimeric gene ( $75.0 \pm 12.5\%$ ), which was similar to that of embryonal cases ( $76.3 \pm 4.9\%$ ). ALL mixed type cases were alive regardless of chimeric gene positivity.

CD44, a stem cell marker, was positive in all rhabdomyosarcoma cell line examined, whereas, CD44v was negative in all the cell lines. Positivity rate of CD133 was 25% in RD cell line, whereas, less than 2% in other cell lines such as Rh30, KYM-1, RMS-YM. However, CD133 positive cells are chemotherapy resistant, and rapidly formed tumor after administrated in mice. Novel treatment strategy may be stratified according to the genotype and expression of the stem cell makers in rhabdomyosarcoma.

研究分野：小児外科学

キーワード：小児外科学 小児腫瘍学 小児がん 腫瘍幹細胞 横紋筋肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は間葉系由来の小児がんで、ハイリスク例の生存率は30%程度に留まる。近年がんの難治化や再発の原因として、多分化能、自己複製能、高い増殖能を兼ね備えたがん腫瘍幹細胞(Cancer stem cell: CSC)の存在が明らかとなった。乳癌では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機能が維持され(Ishimoto T, Cancer Cell 2011)、xCTを阻害するスルファラジンの抗腫瘍幹細胞効果が証明された(Yae T, Nat Commun 2012)。われわれは小児がんにおける微小転移と腫瘍幹細胞の関連性に注目し、化学療法後の幹細胞の発現増強をみたほか、TERT遺伝子によるヒト間葉系不死化幹細胞株のがん化に成功した。小児がんにおいても分子標的など腫瘍幹細胞の増殖制御による新規治療の開発が求められている。

## 2. 研究の目的

間葉系細胞由来で代表的小児軟部肉腫の横紋筋肉腫に対する新たな分子生物学的リスク評価に基づいたプロトコール治療の臨床試験と連動して、統一プロトコールで治療された臨床検体のゲノム解析、免疫学的検討を行ない、基礎実験系の検討と合わせて腫瘍幹細胞の動態や増殖制御を調べる。ゲノム解析により腫瘍幹細胞増殖制御の分子標的を検索する。さらに間葉系幹細胞にTERT遺伝子を組みこんだ細胞株を用いて感受性薬剤スクリーニングシステムを開発する。これらから腫瘍幹細胞増殖制御を基軸にした新たな小児がん治療の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1)横紋筋肉腫に対する臨床試験(JRS)

腫瘍組織の転座型 PAX3,7-FKHR キメラ遺

伝子発現の有無をベースにした新たなリスク群分類を完成し、各群に対する臨床プロトコールを策定して臨床試験を開始する。この際に中央病理診断ならびに付随基礎研究の目的で腫瘍組織検体を収集する。臨床試験分担者と以下の基礎研究分担者の連携により、治療経過や重症度、リスク評価などの個体バイアスの少ない臨床検体の検討を可能にする。

### (2)臨床検体組織における腫瘍幹細胞の動態

初期診断時と根治手術時の腫瘍組織において腫瘍幹細胞表面マーカーCD44やそのバリエーション(CD44v)、CD114、CD13、EpiCAMなどの発現を、免疫組織化学手法、FACSならびに半定量RT-PCR法で計測する。FACS sortingにて腫瘍幹細胞候補マーカー(CD44v、CD114、CD13、EpiCAMなど)の陽性/陰性で腫瘍細胞を分離し、免疫不全マウスに移植して陽性細胞と陰性細胞の化学療法に対する抵抗性の解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究は、厚生労働省革新的がん医療実用化研究事業の一環として行われている横紋筋肉腫臨床試験と連動して、同研究事業に対する委託経費からの支出も合わせて進められた。

臨床試験の基盤構築と遺伝子型を重視した新規リスク分類に関する検証が漸次行われた。解析対象には、先行する横紋筋肉腫臨床試験の登録症例および非介入型の観察研究の対象として登録された新規発症症例が含まれた。腫瘍の特性と遺伝子型(genotype)、組織型(phenotype)の関連に関する解析では、キメラ遺伝子は胎児型ではやはり1例も検出されなかったのに対して、

胞巢型・混合型では PAX3-FKHR あるいは PAX7-FKHR キメラ遺伝子が 76%の症例で陽性であった。遺伝子型と予後の解析では、progression free survival はキメラ遺伝子陽性の胞巢型で  $44.2 \pm 7.3\%$ に留まったのに対してキメラ遺伝子陰性の胞巢型では  $75.0 \pm 12.5\%$ 群と有意に高く、胎児型の  $76.3 \pm 4.9\%$ と、生存曲線はほぼ完全に重なった。さらにキメラ遺伝子陽性、陰性に関わらず、混合型組織を持つ症例は全例が生きており、極めて予後良好の一群として同定された。これに基づき腫瘍組織の遺伝子型に基づいたリスク分類手順が漸次改訂された。

基礎研究では、横紋筋肉腫細胞株 (Rh30, KYM-1, RMS-YM, RD) について FACS により候補腫瘍幹細胞マーカー (CD44, CD44v, CD133) の発現を評価した。CD44 は全ての腫瘍株で発現が確認されたが、CD44v はいずれの横紋筋肉腫細胞株でも発現はみられなかった。CD133 は Rh30, KYM-1, RMS-YM 株において表出率は 2%以下であったが RD 株においては 25%が陽性で、CD133 陽性細胞は抗癌剤 (CDDP, VCR, Act-D) 抵抗性ならびに免疫不全マウスにおいて高い造腫瘍能を示した。

小児がんにおいて腫瘍幹細胞のマーカー発現が成人癌とは大きく異なっていることが本研究で明らかにされ、今後の幹細胞を標的にした小児がん治療戦略を考える上で重要な情報と考えられる。

本研究により、次世代の横紋筋肉腫治療の方向性として、従来の病理組織型ではなく遺伝子型や腫瘍幹細胞マーカー発現による層別化が有用である可能性が示唆された。

TERT 遺伝子導入により不死化した細胞を用いた薬剤感受性スクリーニングシステムに関する実験は研究期間中に報告すべき結果が得られなかったが、併せて継続してゆきたい。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6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 [ahead of print]

DOI:10.1007/s10147-015-0927-z

Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraiishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun*. Peer Reviewed. 2015;6:7557

DOI:10.1038/ncomms8557

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(6):896-901

DOI:10.1111/ped.12368

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

宇高徹、須佐美知郎、中山ロバート、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>

黒田達夫、森川康英、池田均、大植孝治、木下義晶、仁尾正記、檜山英三。小児悪性固形腫瘍の臨床研究グループの現状と今後。日本横紋筋肉腫研究グループ (JRSG)の展開と臨床試験の今後の課題。日本小児外科学会雑誌。査読有。2014; 50(3): 396

DOI:なし

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

黒田 達夫 (KURODA, Tatsuo)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：60170130

### (2)研究分担者

檜山 英三 (HIYAMA, Eisou)

広島大学・学内共同利用施設等・教授

研究者番号：00218744

滝田 順子 (TAKITA, Junko)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：00359621

池田 均 (IKEDA, Hitoshi)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：10326928

淵本 康史 (FUCHIMOTO, Yasushi)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：40219077

森川 康英 (MORIKAWA, Yasuhide)

慶應義塾大学・医学部・講師(非常勤)

研究者番号：90124958

### (3)連携研究者

なし