

## 論 文 要 旨

### **Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells**

(横紋筋肉腫における FGFR3 陽性がん幹細胞の機能解析)

廣 津 匡 隆

#### 【序論および目的】

悪性腫瘍には少数のがん幹細胞が存在し、他のがん細胞より、腫瘍形成能力が高いという仮説が最近、論じられている。この研究の目的は、横紋筋肉腫の中に、そのようながん幹細胞が存在するのかわかることを解明し、さらにその細胞の特徴などを明らかにすることである。

#### 【材料および方法】

横紋筋肉腫の細胞株は KYM-1、RD、A204 を用い、臨床検体は横紋筋肉腫患者の生検時の組織を利用した。

- ① フローサイトメトリーにて、横紋筋肉腫細胞株での FGFR3 陽性細胞の存在を確認した。
- ② FGFR3 陽性細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を調査した。
- ③ FGFR3 陽性細胞における未分化細胞マーカーや分化細胞マーカーの発現量を realtime PCR を用いて調査した。
- ④ FGFR3 陽性細胞に、リガンドである bFGF を投与することによる腫瘍増殖能の変化を無血清培地で検討した。
- ⑤ 横紋筋肉腫患者の臨床検体において、FGFR3 陽性細胞が存在するかを realtime PCR や免疫染色を用いて検討した。

#### 【結 果】

- ① フローサイトメトリーにて、横紋筋肉腫細胞株 3 種類において、FGFR3 陽性細胞が少数存在することが確認できた。(1.6~2.6%程度)
- ② FGFR3 陽性細胞を少数ヌードマウスに移植しても腫瘍形成を認め、FGFR3 陰性細胞と比較して明らかに高い腫瘍形成能力を認めた。
- ③ 横紋筋肉腫細胞株において、FGFR3 陽性細胞では、FGFR3 陰性細胞と比較して未分化細胞マーカーの発現が多く、逆に分化細胞マーカーの発現が少なかった。これによって、FGFR3 陽性細胞がより未分化な細胞であることが確認できた。
- ④ 無血清培地で KYM1 に bFGF を添加して培養すると、腫瘍増殖能力が増加した。このことより、FGFR3 陽性細胞は高い腫瘍増殖能を持つことが確認できた。
- ⑤ 臨床検体においても、FGFR3 陽性細胞が存在することが、realtime PCR や免疫染色により、確認できた。

**【結論及び考察】**

最近、がん幹細胞という小集団の細胞が、悪性腫瘍において高い腫瘍形成能力を呈し、このがん幹細胞の存在が悪性腫瘍の治療抵抗性とも関係があるのではないかと論じられてきている。私の研究の中でも、横紋筋肉腫において、FGFR3 陽性細胞が小集団で存在し、高い腫瘍形成能力を呈していることが明らかとなった。この FGFR3 陽性細胞が今後の横紋筋肉腫の治療のターゲットとなる可能性があると考えている。そして、そのためには今後さらなる研究が必要と考える。

(British Journal of Cancer 2009;101(12) 掲載)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 91 号	学位申請者	廣津 匡隆
審査委員	主査	河野 嘉文	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査 秋山 伸一
	副査	坂本 泰二	副査 古川 龍彦

### Tumour formation by single fibroblast growth factor receptor 3-positive rhabdomyosarcoma-initiating cells

(横紋筋肉腫における FGFR3 陽性がん幹細胞の機能解析)

生体内には多くの幹細胞が存在するが、がんにおいても、自己複製能、多分化能を持ち、腫瘍形成能力の高いがん幹細胞が存在するといわれている。このがん幹細胞は、化学療法や放射線治療に抵抗性を示し、このためがんの再発や転移が起こるとも言われている。このがん幹細胞の同定に関しては、多くの悪性腫瘍で報告されているが、肉腫細胞の幹細胞 (sarcoma-initiating cell) に関する報告は無い。今回、申請者は、肉腫における sarcoma-initiating cell の同定とその機能解析を行った。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

- ① 横紋筋肉腫細胞株における fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3)陽性細胞の有無をフローサイトメトリーで解析し、少数の FGFR3 陽性細胞が存在することを確認した。
- ② この FGFR3 陽性細胞と陰性細胞を分離し、ヌードマウスに移植すると、FGFR3 陽性細胞からは、1 個でも 6 例中 2 例に腫瘍形成を認めた。さらに、これを再移植すると、FGFR3 陽性細胞では二次腫瘍形成も認めた。摘出した腫瘍を免疫染色すると、FGFR3 陽性細胞と陰性細胞が存在し、多分化能を示すことも明らかとなった。
- ③ FGFR3 陽性細胞中の未分化マーカー、分化マーカーの発現量を見ると、未分化マーカーの上昇を認めた。これらより、FGFR3 陽性細胞は未分化な特徴を持ち、かつ自己複製能、多分化能を持ち、腫瘍形成能の高い sarcoma-initiating cell と考えられた。
- ④ 横紋筋肉腫細胞株の増殖に必要な因子は何かということを調べるために、無血清培地に多種類の growth factor を投与して、腫瘍増殖能を観察した。bFGF が横紋筋肉腫細胞株の維持・増殖に必須な因子であり、EGF を加えると、さらに増殖が促進された。この無血清培地で培養した細胞の FGFR3 陽性細胞比率を見ると、bFGF 投与群では、陽性細胞の比率が増加し、CNTF を投与すると、逆に陽性細胞の比率が減少した。これらにより、bFGF-FGFR3 のシグナルが sarcoma-initiating cell の増殖に関与していることが明らかとなった。また、横紋筋肉腫臨床検体での FGFR3 の発現をみると、あきらかに発現が増加している腫瘍が存在した。

以上の結果により、申請者は FGFR3 陽性細胞が横紋筋肉腫の sarcoma-initiating cell となり得ることを明らかにし、今後この細胞を利用し、機能解析を進めることにより、新しい肉腫治療が可能になると考えられた。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 91 号	学位申請者	廣津 匡隆
審査委員	主査	河野 嘉文	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	中川 昌之	副査 秋山 伸一
	副査	坂本 泰二	副査 古川 龍彦

主査および副査の5名は、平成22年2月10日、学位申請者 廣津匡隆 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 正常幹細胞が cancer-initiating cell に変異すると考えるか。またその形質転換に関わる因子は何かあるか。

(回答) 双方とも未分化な細胞の性質を有しているため、正常幹細胞に何らかの変異が起これば、cancer-initiating cell になる可能性が高いと考える。しかし、今回の研究の中では、cancer-initiating cell の起源は同定できていないので、今後の課題と考える。

質問2) ABC トランスポーターの発現を見ているか。

(回答) SP cell に対しては、ABC トランスポーターの阻害剤を使用し、存在を確認しているが、今回の FGFR3 陽性細胞での発現は見えていない。

質問3) FGFR3 陰性細胞に FGFR3 を強制発現した細胞と、FGFR3 陰性細胞をマウスに移植して、腫瘍増殖能を見ているか。

(回答) 重要な実験と考えるが、今回は行っていない。

質問4) FGFR3 の発現は、将来的な予後予測因子となりうるか。

(回答) 現段階では回答は難しい。明らかにするためには、もっと臨床検体の症例数を増やし、FGFR3 の発現と治療効果、予後の調査を行う必要があると考える。

質問5) rhabdomyosarcoma で、他の cancer-initiating cell のマーカーの報告はあるのか。FGFR3 は十分なものなのか。

(回答) 現在、他のマーカーの報告は見られない。今後、FGFR3 陽性細胞の機能解析も必要だが、それ以外の要因についても検討が必要であると考えます。

質問6) rhabdomyosarcoma の組織型による予後の違いと、FGFR3 との関連はあるのか。

(回答) FGFR3 が重要な働きをしていると考えられるのは、細胞株でも臨床検体でも胎児型のものであった。FGFR3 は胎児型の cancer-initiating cell と考えられる。胎児型と胞巣型の予後の違いには FGFR3 は関与していないと推察される。今後更なる研究が必要と考える。

質問7) 他のがんや肉腫でも FGFR3 は cancer-initiating cell のマーカーとなりうるか。

(回答) そのような報告はないが、今後多くの細胞で研究することにより、マーカーとなりうる可能性はあると考える。

質問8) FGFR3 陽性細胞で CD34 の発現が多いが、CD34 陽性細胞で同様の実験をするとどうなるのか。

(回答) CD34 でも同様の実験を行ったが、CD34 陽性細胞と陰性細胞で腫瘍形成能の差は認めなかった。

質問9) CD34 陽性細胞と陰性細胞で腫瘍形成能に差が出なかった理由はどう考えるか。

(回答) FGFR3 陽性細胞に CD34 は強発現するが、CD34 陽性細胞の中に、cancer-initiating cell 以外の細胞も多く含んでいるので差が出なかったと考える。

質問10) 他の論文で、細胞1個で腫瘍ができた報告はないようだが、他の cancer-initiating cell との違いはあるのか。

(回答) FGFR3 陽性細胞の腫瘍形成能力が他の cancer-initiating cell より高いと考える。

質問 1 1) **FGFR**はいくつかあるが**FGFR3**をなぜ選んだのか。

(回答) 胎生期の筋組織に**FGFR3**が強発現し、成人になると発現が低下するとの報告がある。このように、未分化な状態の維持に**FGFR3**が関与する可能性が高いので、今回**FGFR3**を選択した。

質問 1 2) 臨床検体の症例数が少なく、なぜバイオプシーの検体しか用いていないのか。

(回答) 組織の選択において、化学療法や放射線療法などが行われる前の状態の組織でないと評価できないと判断したため、バイオプシーの検体だけ使用した。

質問 1 3) **cancer-initiating cell**は増殖能が高いと言われているが、化学療法や放射線治療が効きにくいのはなぜか。

(回答) 増殖能は高いが、細胞分裂のスピードはがん細胞と比較すると遅いということ、また ABC トランスポーターの存在により、化学療法、放射線療法が効きにくいと考えられる。

質問 1 4) **FGFR3**陽性細胞が細胞分裂スピードが遅いと考え、**FGFR3**陰性細胞の方が増殖能があるということになるのではないか。

(回答) **FGFR3**陰性細胞は、分裂スピードは速いが、分裂回数に限界があり、細胞数が少ないと腫瘍形成が起こらないと考えられ、**FGFR3**陽性細胞は、分裂スピードは遅いが、分裂した際に分裂スピードの速い progenitor を生み出す。この progenitor が腫瘍形成を促進する。また無制限に分裂することにより progenitor を生み続けるため最終的な腫瘍増殖能としては、**FGFR3**陽性細胞の方が優れていると考える。

質問 1 5) **cancer-initiating cell**の多分化能は免疫染色でのみ判断しているが、これは本当に他の細胞ができたのか、たまたま染まらなかったのか不明なので、もっと良い評価法はないのか。

(回答) *in vitro* で、**FGFR3**陽性細胞を培養し、時間経過とともに、分化した筋細胞のマーカーなどで染色するなど、分化した細胞の出現を評価することによって多分化能を評価することが重要だと考え、今後の課題としたい。

質問 1 6) **KYMI**で**FGFR3**陰性細胞 100 個で腫瘍形成があるのは、どう解釈するか。

(回答) 一般的ながん細胞もある程度の細胞数があれば腫瘍を形成するが、少数になると腫瘍形成能力の高い **cancer-initiating cell** のみで腫瘍を形成するということであると解釈している。

質問 1 7) **cancer-initiating cell**に高い腫瘍形成能力があることを、マウスに腫瘍を移植して証明しているが、もっと簡単に腫瘍形成能力は評価できるのではないか。

(回答) *in vitro* のレベルで**FGFR3**陽性細胞と陰性細胞を培養し、増殖能を観察することにより、比較的簡単に増殖能の差を見る事は出来ると考えるが、*in vivo* data がより重要であると考えている。

質問 1 8) 胎児型の **rhabdomyosarcoma** にだけ、**FGFR3**が強発現しているということにどういう意味があるのか。

(回答) すべての悪性腫瘍にがん幹細胞が存在するとは考えていない。胞巣型には **cancer-initiating cell** がない可能性がある。また、胞巣型では違うマーカーで **cancer-initiating cell** を同定できる可能性がある。

質問 1 9) **FGFR3**陽性細胞=**cancer-initiating cell**なのか。**FGFR3**陽性細胞の中に **cancer-initiating cell** は存在しないのか。例えば、**cancer-initiating cell** の resting form が **FGFR3**陰性細胞であり、active form が **FGFR3**陽性細胞である可能性はないか。

(回答) その可能性はある。**FGFR3**で **cancer-initiating cell** を濃縮はしていると考え、完全に分離できるとは考えていない。また、**FGFR3**陰性細胞が培養条件によって陽性細胞を生み出すこともありうる。

質問 2 0) **FGFR3**陽性細胞の腫瘍の中での局在はどうなっているのか。

(回答) 現在のところ、明らかになっておらず、今後の検討課題と考える。

質問 2 1) 正常な幹細胞と区別し、**cancer-initiating cell**にだけ効果のあるような治療法はできるのか。

(回答) 今後、この **cancer-initiating cell** の性質を究明し、正常幹細胞との相違点を探すことによって区別することは可能と考える。また、その性質の違いを明らかにすることにより分子標的治療などに応用できると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。