



# Identification and characterization of slow-cycling cells in Ewing sarcoma

八尋, 俊輔

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2023-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8511号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482259>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Identification and characterization of slow-cycling cells  
in Ewing sarcoma

Ewing 肉腫における slow-cycling cells の同定と特徴の探索

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
整形外科学

(指導教員： 黒田 良祐 教授)

八尋 俊輔

## はじめに

Ewing 肉腫は小児から若年成人に好発する骨原発悪性腫瘍である。手術、化学療法、放射線療法を組み合わせた集学的治療の発達により治療成績は向上し、局所発生例の5年全生存率は65～75%まで改善してきた。しかし、適切に根治的治療を行われたとしても、再発・転移が生じた患者では5年全生存率が25%未満と報告されており、非常に予後が悪いと考えられる。Ewing 肉腫の再発・転移のメカニズム解明やより効果的な治療法の開発が求められる。

がん細胞の集団には表現型に不均一性があると言われており、がんの治療抵抗性の原因として考えられている。例えば、細胞増殖速度の違いにおいてもがん細胞集団の不均一性はみられ、この細胞周期が緩やかな細胞集団である slow-cycling cells (SCCs)は、悪性黒色腫、結腸癌、乳癌、膠芽腫など様々な悪性腫瘍において再発・転移への関与が報告されている。Ewing 肉腫の腫瘍増大・進行、抗がん剤抵抗性、再発・転移においても SCCs が重要な役割を担っている可能性があるが、我々の渉猟しえた限りでは、未だにその報告はない。そこで、本研究の目的は Ewing 肉腫細胞株から SCCs を同定・分離し、その特性を調べることである。

## 対象と方法

今回、我々はヒト Ewing 肉腫由来細胞株中の SCCs を同定するために蛍光色素である carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)を使用したラベル保持システムを利用することとした。CFSE は細胞内に取り込まれると細胞内酵素と反応して蛍光を発するようになる。一旦 CFSE でラベルされた細胞は、その後分裂する度に細胞内の蛍光が娘細胞に分かれるため、分裂を繰り返す細胞においては蛍光が徐々に減弱していく。一方で、細胞周期が緩やかな SCCs は CFSE の蛍光強度が減弱することなく保持される。この CFSE の性質を用いて蛍光強度の違いを利用することで、分裂・増殖を繰り返す細胞 (non-SCCs) と SCCs とを区別することが可能になる。まず、この CFSE でラベルした細胞を5日間培養し、細胞集団の CFSE の蛍光状態を観察した。また、より in vivo に近い環境を再現するため、CFSE でラベルした細胞を超低接着プレート内でスフェアとして3次元培養を行い、培養開始5日目に蛍光顕微鏡で観察を行った。同細胞における CFSE 蛍光強度をフローサイトメトリーで解析し、蛍光強度の強い上位10%の細胞集団を細胞周期が緩やかな SCCs、残り90%の細胞集団を non-SCCs と定義した。

SCCs の特徴を評価するために、SCCs と non-SCCs をソーティングし、別々に超低接着プレート上で無血清培地を用いて6日間培養を行うスフェア形成能試験を行った。また、全細胞、SCCs、non-SCCs の細胞周期の分布についてフローサイトメトリーを用いて解析した。SCCs の抗がん剤抵抗性を評価するため、CFSE でラベルした細胞をスフェア培養し、培養開始3日目から5日目の2日間、抗がん剤(ドキシソルビシンとビンクリスチン)を投与した群と、コントロールとして培地交換のみをおこなった群を設定し、培養開始5日目のスフェアにおける CFSE 陽性領域の面積を算出し、比較検討した。さらに、フローサイトメトリーを用いて Annexin V と Propidium Iodide の二重染色後に全細胞、SCCs、non-SCCs のアポトーシス細胞の割合を評価し比較した。最後に、ソーティングした SCCs と non-SCCs の mRNA を回収し、RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析を行い遺

伝子発現の相違を調べた。

## 結果

細胞を CFSE でラベル後、スフェア培養を開始して5日目に、蛍光顕微鏡で観察するとスフェア内に少数の CFSE 陽性細胞がみられた。更に、フローサイトメトリーでも強い蛍光を保持している細胞集団を確認することができた。スフェア形成能試験では SCCs は non-SCCs より有意に高いスフェア形成能を示した ( $P < 0.05$ )。細胞周期解析において、SCCs は non-SCCs と比較して G0/G1期の割合が有意に高い特徴的な細胞周期の分布を示した ( $P < 0.05$ )。また、ドキソルビシンやビンクリスチンに曝露したスフェアでは、抗がん剤曝露を行わないコントロールのスフェアと比較して、スフェア内での CFSE 陽性領域の面積の割合が高かった ( $P < 0.05$ )。これは、抗がん剤曝露下で、細胞周期が緩やかな細胞の方がより多く生存していることを示唆していると考えられた。更に、抗がん剤曝露後のフローサイトメトリーによるアポトーシス試験では、SCCs でアポトーシスが誘導された細胞の割合が有意に低く ( $P < 0.05$ )、SCCs は抗がん剤抵抗性を有していると考えられた。RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析にて、SCCs で2倍以上の発現上昇を示した255個の遺伝子と SCCs で発現量が2分の1未満であった58個の遺伝子を同定することができた。さらに、2倍以上の発現上昇を示した255個の遺伝子を用いた Pathway 解析では、11個の Pathway が検出され、これらのパスウェイに関わる遺伝子の中には、G1期から S 期への細胞周期の進行を抑制する遺伝子や腫瘍の悪性度に関わる遺伝子などが含まれており、これらは本研究で同定・分離した Ewing 肉腫細胞株中の SCCs の特徴を支持する結果であった。

## 考察

今回、我々は CFSE を使用したラベル保持システムを用いて、Ewing 肉腫細胞株から SCCs を同定・分離することに初めて成功した。この SCCs は non-SCCs と比較して高いスフェア形成能、G0/G1 期の割合が高い特徴的な細胞周期の分布、抗がん剤抵抗性を示した。これらの特徴は、過去に他のがん種で報告されている SCCs の特徴と類似した結果であり、本研究で用いた Ewing 肉腫の SCCs の同定手法は、他がん種の研究と同様に有用であると考えられた。また、RNA シーケンスによる網羅的遺伝子解析では SCCs で 2 倍以上の発現上昇を示した 255 個の遺伝子を同定することができ、その中には SCCs の特徴を支持する遺伝子も含まれていた。以上から、本研究で同定・分離した Ewing 肉腫の SCCs は Ewing 肉腫の再発・転移に関する病態理解や新規治療法の開発に役立つ可能性があると考ええる。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3255 号	氏 名	八尋 俊輔
論 文 題 目 Title of Dissertation	Identification and characterization of slow-cycling cells in Ewing sarcoma  Ewing 肉腫における slow-cycling cells の同定と特徴の探索		
審 査 委 員 Examiner	主 査 野津 寛之 Chief Examiner 南 博之 副 査 Vice-examiner 宮西 正憲 副 査 Vice-examiner		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

**研究の背景**

Ewing 肉腫は小児から若年成人に好発する骨原発悪性腫瘍である。集学的治療の発達により局所発生例の5年全生存率は65～75%まで改善してきた。しかし、再発・転移例は未だに予後が悪く、再発・転移のメカニズム解明や新規治療法の開発が求められる。近年、がん細胞集団内に、細胞周期が緩やかな slow-cycling cells (SCCs) が存在し、がんの再発・転移への関与が報告されている。Ewing 肉腫の再発・転移にも SCCs が関与している可能性があるが、研究者らの渉猟しえた限り未だにその報告はない。本研究の目的は Ewing 肉腫細胞株から SCCs を同定し、その特徴を調べることである。

**方法**

SCCs の同定手法として細胞内で酵素と反応し蛍光を示す carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) を使用したラベル保持システムを用いた。CFSE でラベルされ



た細胞は蛍光を発するが、細胞分裂ごとにその蛍光が娘細胞に分かれるため、分裂を繰り返す細胞は蛍光が徐々に減弱する。一方で、細胞周期が緩やかな SCCs では強い蛍光が保持されるため、蛍光強度の違いから増殖細胞と SCCs の区別が可能となる。本研究では CFSE でラベルしたヒト Ewing 肉腫由来細胞株 SK-ES-1 を超低接着プレート内でスフェアとして5日間3次元培養し、フローサイトメトリーで蛍光強度の強い上位10%の細胞集団を SCCs、残り90%の細胞集団を Non-SCCs と定義した。まず、ソーティングした SCCs と Non-SCCs を無血清培地を用いて超低接着プレート上で別々に6日間培養し形成されたスフェア数をカウントしてスフェア形成能を比較した。次に、フローサイトメトリーで PI 染色を用いた細胞周期解析を行い、全細胞、SCCs、Non-SCCs の細胞周期の分布を比較した。また、スフェア培養開始3日目から2日間、抗がん剤（ドキソルビシン、ビンクリスチン）に曝露した群と抗がん剤に曝露していないコントロール群において、蛍光顕微鏡でスフェア内の CFSE 陽性領域の面積を計測し、Annexin V と PI の二重染色後にフローサイトメトリーで全細胞、SCCs、Non-SCCs のアポトーシス細胞の割合を比較し、抗がん剤抵抗性を評価した。最後に、RNA シーケンスで SCCs と Non-SCCs の網羅的遺伝子解析を行った。統計学的解析では、2群間の比較を unpaired t-test、3群間の比較を ANOVA により検定し、 $P < 0.05$  を有意水準とした。

## 結果

細胞を CFSE でラベリング後、5日間培養し蛍光顕微鏡で観察すると、形成されたスフェア内に少数の CFSE 陽性細胞がみられた。フローサイトメトリーでも強い蛍光を保持している細胞集団を確認できた。スフェア形成能試験で SCCs は Non-SCCs より有意に高いスフェア形成能を示した ( $P < 0.05$ )。細胞周期解析で SCCs は G0/G1 期の割合が有意に高い特徴的な細胞周期の分布を示した ( $P < 0.05$ )。ドキソルビシンまたはビンクリスチンに曝露するとコントロール群と比較して、SCCs では細胞周期が緩やかな細胞を反映するスフェア内の CFSE 陽性領域の面積の割合が高く ( $P < 0.05$ )、さらにフローサイトメトリーでもアポトーシス細胞の割合が有意に低く ( $P < 0.05$ )、SCCs における抗がん剤抵抗性が示された。RNA シーケンスでは SCCs で Non-SCCs と比較して2倍以上の発現を示した255個の遺伝子が同定され、これらの遺伝子を用いたパスウェイ解析では G1 期から S 期への細胞周期の進行を抑制する遺伝子や腫瘍の悪性度に関わる遺伝子などが含む11個のパスウェイが検出され、本研究の SCCs の特徴を支持する結果であった。

## 考察および結論

本研究は、初めて既存の Ewing 肉腫細胞株から SCCs を同定に成功した研究である。本研究で同定した SCCs は高いスフェア形成能、G0/G1 期の割合が高い特徴的な細胞周期の分布、

抗がん剤抵抗性を有しており、他がん種で報告されている SCCs と同様の特徴を有していた。本研究で得られた Ewing 肉腫中の SCCs は Ewing 肉腫の病態理解や新規治療法の開発に役立つ可能性があると考えられ、価値ある業績であると認める。

#### **【結論】**

以上、同分野において重要な知見を得ることに成功し、価値のある成果を排出したものと認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。