

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19041

研究課題名(和文)新規遺伝子編集ツールを用いた遺伝病患者由来細胞がん細胞の作製

研究課題名(英文) Medulloblastoma generation in nevoid basal cell carcinoma syndrome-induced pluripotent stem cells.

研究代表者

長尾 和右 (NAGAO, Kazuaki)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60392487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年多くの腫瘍でヘッジホッグ(HH)シグナル伝達系の亢進が発症に関わっていることが明らかとなりつつあり、このシグナル伝達を標的とする分子標的薬の開発が待たれるところである。本研究では基底細胞癌、髄芽腫などの好発を特徴とする遺伝性疾患である母斑基底細胞癌症候群由来細胞からiPS細胞を作製し、免疫不全マウスの皮下に移植した。その結果得られた奇形腫内には正常iPS細胞では決して見られない髄芽腫様の組織が出現した。この髄芽腫様組織を使用することで、生体内での薬効解析や、薬剤スクリーニングが可能となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established iPSCs derived from patients with Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), and tried to generate disease models in order to perform drug screening for NBCCS and the syndrome-related tumors. NBCCS-iPSCs had characteristics of pluripotent stem cells. Growth and differentiation capabilities of iPSCs remained unaffected by mutations in the PTCH1 gene. Meanwhile, medulloblastoma was formed in all the teratomas generated from all NBCCS-iPSC clones established from 4 different patients. Sequencing analysis of the microdissected medulloblastoma specimen revealed a loss of heterozygosity of the PTCH1 gene. These results demonstrated that NBCCS-iPSCs can be a good model of NBCCS-derived medulloblastoma, and thereby used for drug screening to prevent or treat medulloblastomas. Further pathological and molecular analyses are expected to reveal the mechanisms for tumorigenesis of Hh-related tumors.

研究分野：癌

キーワード：母斑基底細胞癌症候群 髄芽腫 iPS細胞 CRISPR/Cas9システム

1. 研究開始当初の背景

近年多くの腫瘍でヘッジホッグシグナル (HH) 伝達系の亢進が発症に関わっていることが明らかとなってきた。特に基底細胞癌 (BBC) と髄芽腫 (MB) においては *PTCH1* をはじめとする HH シグナル伝達に関わる遺伝子に高頻度に変異が見つかり、このシグナル伝達を標的とする分子標的薬がオーダーメイド医療として注目されている。臨床応用が始まっている薬剤も存在するが、かなりの患者で副作用が強いため使用を中断せざるを得ない点、胎児に奇形が生じる懸念、あるいは耐性が生じる点などまだ問題点も多く、新たな薬剤、あるいは変異型に特化した標的薬の開発が待たれるところである。

2. 研究の目的

高発がん遺伝病患者由来細胞を用いて積極的にかつ部位特異的に遺伝子変異を導入することでがん化を誘導し、薬剤スクリーニングに利用できる系の確立を目指す。

3. 研究の方法

PTCH1 を疾患責任遺伝子とし、肋骨椎骨異常、合・多指症などの小奇形と BBC、MB、角化嚢胞性菌原性腫瘍などの好発を特徴とする常染色体優性遺伝疾患である母斑基底細胞癌症候群 (NBCCS) 患者由来細胞を材料として、CRISPR/Cas9 システムを用いて *PTCH1* 遺伝子にセカンドヒットに相当する付加的な遺伝子変異を生じさせた iPS 細胞を樹立し、これらの細胞を免疫不全マウスの皮下に移植することで腫瘍組織を作製した。

4. 研究成果

千葉大医学部小児科より提供された連結不可能匿名化された NBCCS 患者 4 症例に由来する線維芽細胞 (G11、G12、G36、G72) に 4 因子 (*KLF4*、*SOX2*、*OCT3/4*、*c-MYC*) を搭載したセンダイウイルスベクター感染させ、マウスフィーダー細胞上に播種した (図 1-A)。感染後 12 目頃に出現したヒト ES 細胞様コロニーの単離と継代を繰り返し、G11 で 2 クローン、G12 で 10 クローン、G36 で 6 クローン、G72 で 4 クローンの iPS 細胞を樹立した (図 1-B)。これらの iPS 細胞から RNA を抽出して RT-PCR を行い、使用したセンダイウイルスベクター由来ゲノムが除去されていることを確認した (図 1-C)。未分化マーカー遺伝子である *OCT3/4*、*NANOG*、*SOX2*、*hTERT*、*DNMT3B* の発現を RT-PCR で確認し (図 1-D)、多能性幹細胞表面マーカーである *SSEA-4*、*TRA1-60* と、未分化マーカーである *SOX2*、*OCT3/4*、*NANOG* に対して免疫組織化学染色を行い、発現を確認した (図 1-E)。胚様体形成を介した *in vitro* 分化多能性検定を行い、それぞれ外胚葉、中胚葉、内胚葉のマーカーである *Tuj-1*、 α -SMA、AFP の発現を免疫組織化学染色で確認した (図 1-F)。また、G-banding による核型

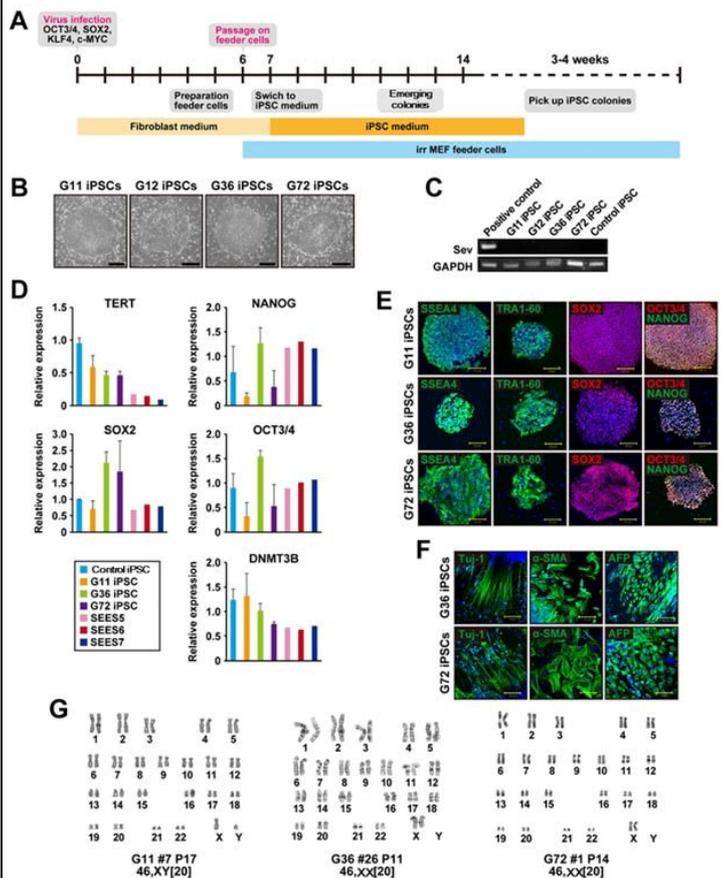


図 1 NBCCS 症候群患者由来細胞から樹立した iPS 細胞

解析を行ったところ、樹立した iPS 細胞が正常核型を有していることが確認された (図 1-G)。さらに 16 locus の Sort Tandem Repeat (STR) 解析を行ったところ、樹立した iPS 細胞はすべての locus で親細胞である患者由来線維芽細胞と同じ STR を有していた (data not shown)。以上のことから樹立した iPS 細胞が NBCCS 患者由来であり、多分化能を保持していることが確認された。

樹立した iPS 細胞からゲノム DNA を抽出し、*PTCH1* 遺伝子変異部位の塩基配列を解析したところ、親子関係である G11 iPS 細胞と G12 iPS 細胞で c.3130_3131dupGC、G36 iPS 細胞で *PTCH1* 遺伝子を含む約 1.1Mb の欠損、G72 iPS 細胞で c.274delT が確認され、由来となった NBCCS 患者と同一の変異を有することが確認された (図 2-A)。正常人由来 iPS 細胞を対照として樹立した iPS 細胞の HH シグナル伝達系関連遺伝子 (*PTCH1*、*PTCH2*、*GLI1*、*GLI2*、*GLI3*、*NMYC*、*HHIP*) 発現を定量的 PCR で解析したところ、これらの遺伝子の発現上昇は見られず、HH シグナル伝達系の亢進は認められなかった (図 2-B)。また、細胞増殖能を解析したが正常人由来 iPS 細胞と同程度であった (図 2-C)。

樹立した NBCCS 患者由来 iPS 細胞を免

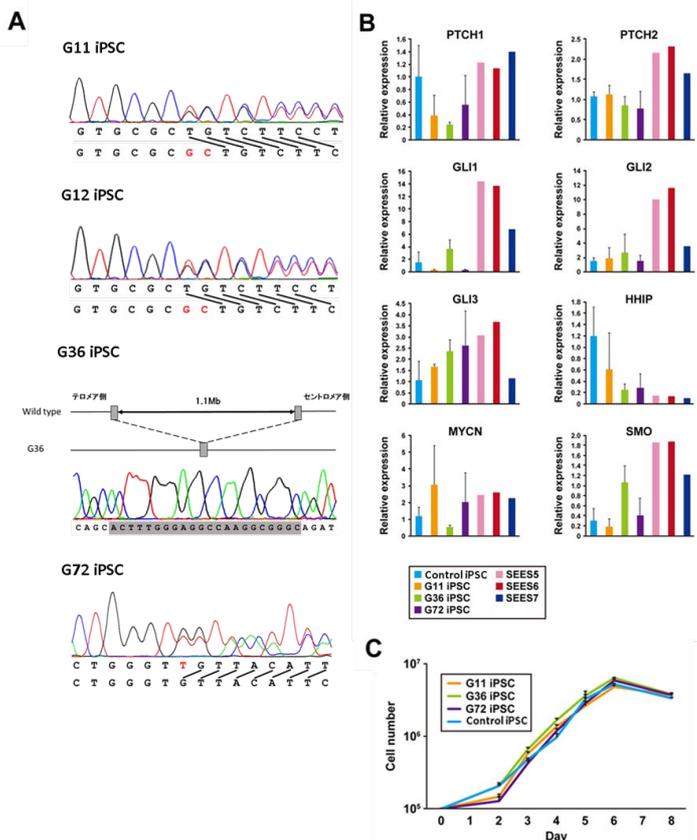


図 2 NBCCS 患者由来 iPSC 細胞における *PTCH1* 遺伝子解析とヘッジホッグ関連遺伝子の発現

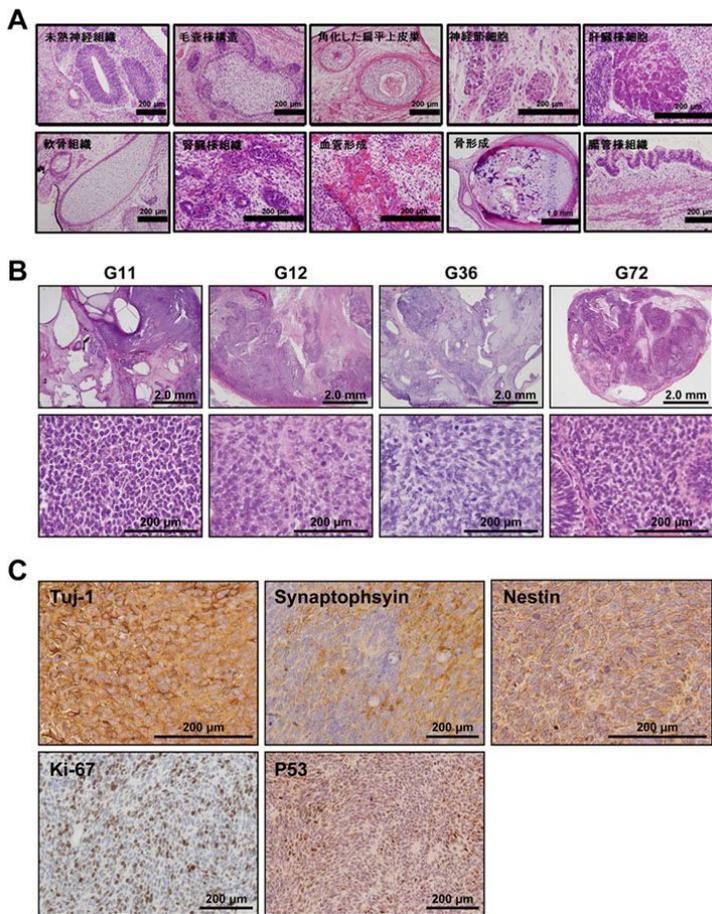


図 3 NBCCS 患者由来 iPSC 細胞から作製したテラトーマと髄芽腫

疫不全マウスの皮下に移植し形成された腫瘍の HE 染色組織標本を作製し、病理学的な評価を行ったところ、外胚葉 (神経、網膜色素上皮など)、中胚葉 (軟骨など)、内胚葉 (消化管上皮など) の組織形成を確認した (図 3-A)。また、独立した 2 機関の病理医による所見として、すべての症例 (G11、G12、G36、G72) 由来 iPSC 細胞で奇形腫の一部に髄芽腫が形成されていることが確認された (図 3-B)。この病変部について免疫組織化学染色を行ったところ、神経マーカーである Tuj-1、Synaptophysin、Nestin が陽性であり、かつ、細胞増殖マーカーである Ki67、癌マーカーである p53 が陽性であり、この病変部が免疫組織化学的にも髄芽腫であることが確認された (図 3-C)。

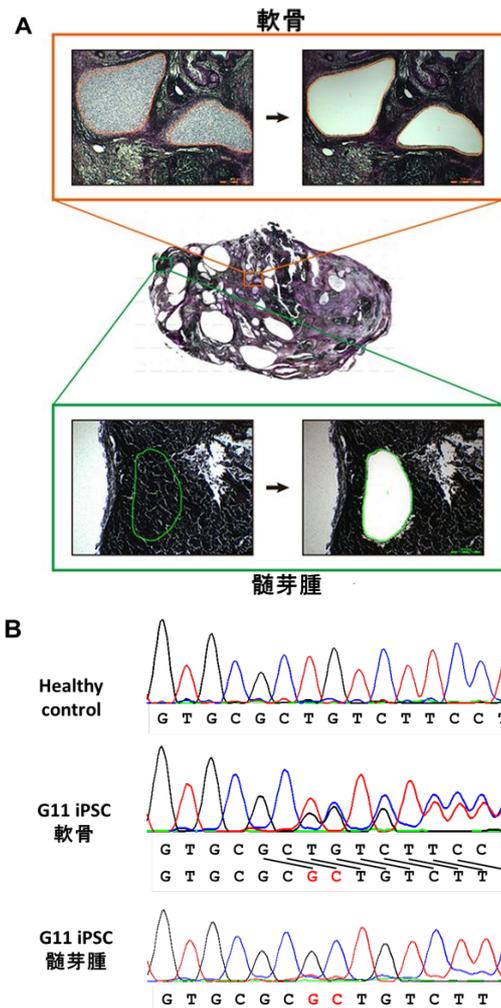


図 4 髄芽腫における *PTCH1* 遺伝子解析

G11 iPSC 細胞から得られた腫瘍の組織切片から髄芽腫様病変部をレーザーマイクロダイセクション法により単離し、同切片上の軟骨に分化した領域を対照として *PTCH1* 遺伝子の塩基配列を解析したところ (図 4-A)、軟骨領域では G11 iPSC 細胞と同様にヘテロ変異 (c.3130_3131dupGC) を有していたが、髄芽腫様組織ではヘテロ接合性の消失が認められた (図 4-B)。

作製した iPS 細胞のうちいくつかのクローンを由来細胞を対象として、*PTCH1* 遺伝子変異部位の周辺に CRISPR/Cas9 システムの標的配列を設計し、CRISPR/Cas9 システム発現ベクターを構築した。構築したベクターを電気穿孔法を用いて Puromycin 耐性遺伝子発現ベクターとともに遺伝子導入し、Puromycin 存在下で短時間選択後、得られた iPS コロニーを単離し、正常アレルに変異が導入されたクローンをスクリーニングした (図 5)。得られた iPS 細胞について SOX2、OCT3/4、NANOG に対する免疫組織化学染色を行い、発現を確認した。現在 *PTCH1* 両アレル変異 iPS 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、形成された腫瘍を解析中である。

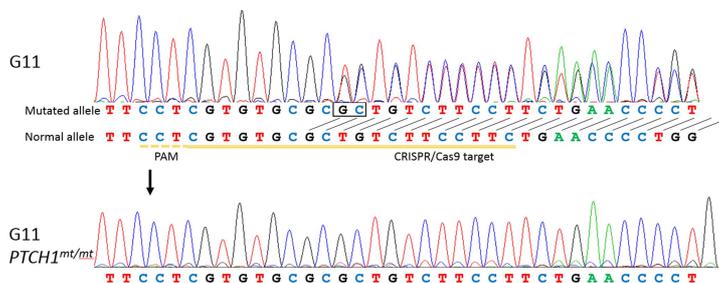


図 5 CRISPR/Cas9 システムを用いた NBCCS 患者 G11 由来 iPS 細胞の残存 *PTCH1* 正常アレルの破壊

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)

Ikemoto Y, Takayama Y, Fujii K, Masuda M, Kato C, Hatsuse H, Fujitani K, Nagao K, Kameyama K, Ikehara H, Toyoda M, Umezawa A, Miyashita T. Somatic mosaicism containing double mutations in *PTCH1* revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Med Genet.* 2017 (*in print*), 査読有り, doi: 10.1136/jmedgenet-2016-104490.

〔学会発表〕(計 1 件)

池本優、豊田雅士、那須道世、初瀬洋美、長尾和右、高山吉永、亀山孝三、梅澤明弘、宮下俊之、Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞を用いた髄芽腫の作製、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

〔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

<http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長尾 和右 (NAGAO, Kazuaki)
北里大学・医学部・講師
研究者番号：60392487

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

池本 優 (IKEMOTO, Yu)
加藤 千勢 (KATO, Chise)
荒井 佑斗 (ARAI, Yuto)