

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08731

研究課題名(和文) 正確なマウスモデルを用いた脳腫瘍の病態解明と治療開発

研究課題名(英文) Brain tumor research by using accurate mouse models

研究代表者

百田 洋之 (Momota, Hiroyuki)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・病院・医長

研究者番号：60469971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの脳に悪性脳腫瘍を発生させるRCAS/tv-aシステムを用いて、脳腫瘍を生体イメージングなどでモニターし、抗がん薬やウイルス治療の効果を調べる研究を行なった。このシステムは、癌遺伝子を組んだレトロウイルスベクター(RCAS)と、RCAS受容体(tv-a)を脳細胞に発現した遺伝子改変マウス(tv-aマウス)を用い脳腫瘍を作成するもので、癌遺伝子とtv-aマウスの種類や組み合わせを変えることで、新たな脳腫瘍モデルの作成も可能である。共同研究も複数行い、脳腫瘍発生機構の解明や、新たな脳腫瘍マウスモデルの開発などの研究成果を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RCAS/tv-aシステムによる脳腫瘍マウスモデルは、研究代表者が国内へ初めて導入した正確性の高い(ヒトの腫瘍に近い)モデルであり、脳腫瘍発生機構の解明から新たな治療薬の開発まで、幅広い用途に応用できる。本研究により、目標とした新規薬剤の開発はできなかったが、ウイルス療法などの新規性のある治療法の効果をマウスで試験することができた。また、共同研究により、脳腫瘍の新たな病態解明や、新規脳腫瘍マウスモデルの開発を行い、論文発表することができた。

研究成果の概要(英文)：We utilized the RCAS/tv-a system to create histologically accurate brain tumors in immune-competent mice. The RCAS viruses were injected into the brain of tv-a-expressing mice and malignant gliomas generated were monitored by using bioluminescence imaging. We tested new drugs for brain tumors in mice, elucidated the mechanism of tumor initiation and development using this system, and reported a novel brain tumor mouse model.

研究分野：脳腫瘍のマウスモデル、分子生物学、悪性脳腫瘍の治療

キーワード：脳腫瘍 マウスモデル 生体イメージング ウイルス療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍の疫学と治療上の問題点

悪性脳腫瘍は脳から発生する希少な癌の一群であるが、近年発生率は増加しており、特に小児癌の中で脳腫瘍は2番目に多く死亡数は最多である。成人では膠芽腫が、小児では髄芽腫が、最も多い代表的な悪性脳腫瘍であるが、どちらも治癒不能で生存期間が短く、治療成績の改善は社会的に喫緊の課題である。悪性脳腫瘍の治療が難しい原因として、脳腫瘍の根治切除が困難なこと、血液脳関門があり薬物移行性が悪いこと、遺伝子異常が複雑なこと、希少疾患のため大規模な臨床研究が難しいことなどが挙げられる。これらの問題点を克服するために、ヒト脳腫瘍の微小環境や遺伝学的背景を正確に反映した動物モデルを用いて治療法を開発することが必要である。

(2) 脳腫瘍マウスモデルの研究動向

脳腫瘍研究における過去の動物モデルの主流は、ヌードマウスの皮下や脳内にヒト腫瘍細胞株を移植する移植モデルであった。しかしこの方法は、免疫機能の異常な動物に対し異なる動物種の培養細胞株を移植したものであり、脳から自然発生するヒトの腫瘍を再現していなかった。近年、遺伝子改変マウスが開発され、ヒトと同じ遺伝子異常を用い、脳から腫瘍を発生させることが可能となった (Frese and Tuveson, *Nat Rev Cancer*. 2007)。現在、様々な遺伝子改変マウスが開発され脳腫瘍研究に用いられている。

(3) 研究者の研究背景と成果

研究者の用いる脳腫瘍マウスモデルは、1998年にアメリカで開発された RCAS/tv-a システムをベースにしている (Holland et al. *Genes Dev*. 1998)。このモデルは、神経膠細胞にのみウイルス受容体 (tv-a) を発現する遺伝子改変マウスを用い、癌遺伝子を組み込んだレトロウイルス (RCAS) をマウスの脳へ注入・感染させることで、脳腫瘍を発生させるものである。マウスや癌遺伝子の種類を変えることで、多様な脳腫瘍を発生させることができる (Dai et al. *Genes Dev*. 2001; Rao et al. *Neoplasia*. 2003)。このマウスモデルは、遺伝学的・組織学的に正確で、免疫能も保たれているため、マウス前臨床試験や腫瘍発生機構の解明において高く評価されている (図1)。研究者は、2004年から RCAS/tv-a システムを開発した米国の研究室で脳腫瘍マウスモデルの研究を行い、マウスモデルを使用した新薬の前臨床試験や (Momota et al. *Cancer Res*. 2005)、新たな脳腫瘍モデルの作成 (Momota et al. *Oncogene*. 2008)、ヒト膠芽腫の分子生物学的分類 (Momota et al. *PLoS One*. 2009) 等の成果を挙げてきた。帰国後も、科学研究費の補助を受けて脳腫瘍マウスモデルの研究を開始し、国内初の RCAS/tv-a システムによる膠芽腫と髄芽腫の作成に成功した。複数の共同研究も行っており、新規マウスモデルの開発と、脳腫瘍マウスモデルを用いた新規治療法の開発を目指している。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト脳腫瘍を正確に反映したマウスモデルを開発・使用し、脳腫瘍の病態解明を行うことと、そのマウスモデルを用いて新たな治療法を開発することを目的としている。RCAS/tv-a システムによる脳腫瘍マウスモデルは、代表的な膠芽腫と髄芽腫・PNET のモデルを既に開発しており、蛍光タンパクや発光タンパク酵素を発現する脳腫瘍モデルを作成してあるので、これらの脳腫瘍モデルを用いて、新薬やウイルス療法の治療効果を確認する。また、新たな RCAS ベクターを入手または作成して、新規の脳腫瘍マウスモデルの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 書類作成・申請手続き：本研究は、レトロウイルスベクターと遺伝子改変マウスを用いる遺伝子組替え実験であり、ウイルス受容体発現マウスを用いるため、大臣確認実験である。研究者は、2015年1月から東京大学医科学研究所で研究を開始しているが、本研究のための新たな機関承認と大臣確認が必要となるため、書類の申請作業を数ヶ月かけて行う。

(2) tv-a マウスの準備：本研究に用いる tv-a マウスは、前所属の名古屋大学にて飼育・保存されていたが、東京大学医科学研究所への所属変更にあたり、全てのマウスを凍結胚の形で名古屋大学から移送し、凍結胚の融解・移植・飼育を行う。また、ジェノタイピングにより遺伝子型を選別・抽出し、目的のマウスの安定的な飼育・供給を数ヶ月かけて行う。

(3) RCAS 産生細胞の準備：RCAS ベクターに蛍光・発光タンパクを入れたコンストラクトは既に作成しており、RCAS 産生細胞 (DF-1) へ遺伝子導入し、マウス脳内へ注入できるように、培養細胞の準備を行う。海外の研究者から入手した新たな RCAS ベクターは、ろ紙に染み込ませた状態から、大腸菌へ導入して増やした後、DF-1 細胞へ遺伝子導入する。

(4) イメージング用マウスの実用化：発光タンパク酵素を導入した RCAS ベクターを用いてマウスに膠芽腫を作成し、マウスが生きた状態で腫瘍をモニタリングできることを、生体イメージング機器 (IVIS) を使用し確認する。また、蛍光タンパクを導入した RCAS ベクターを用いて脳腫瘍を作成し、脳切片からの蛍光で腫瘍細胞を同定する。

(5) 新たな脳腫瘍モデルの作成：新たに入手した RCAS ベクターを使用して脳腫瘍を作成する。また、既に使用している様々なベクターを新規ベクターと組み合わせ、新たな遺伝子異常を持つ脳腫瘍マウスモデルを作成する。2種類以上の RCAS を組み合わせ、新たな髄芽腫モデルの作成を目指す。

(6) 単純ヘルペスウイルスの調整：研究室で使用している治療用の遺伝子組替え単純ヘルペス

ウイルスと、癌細胞で高発現する遺伝子 promoter 調節下にウイルスの増殖能と殺細胞効果が増強する次世代型単純ヘルペスウイルスを培養・調整する。

(7) 単純ヘルペスウイルスのマウス脳腫瘍への投与：治療用の単純ヘルペスウイルスを種々のマウス脳腫瘍へ投与し、腫瘍への感染率、腫瘍縮小効果、ウイルスの種類による治療効果の差などを観察する。

(8) データの解析と発表：マウス脳腫瘍に対する単純ヘルペスウイルスの治療効果を検証し、ヒト脳腫瘍への臨床応用の可能性を検討する。治療用ベクターとして特許申請できるものは早期に実行し、研究結果は英文論文として発表する。

4. 研究成果

機関承認と大臣確認を含む書類の申請は、数ヵ月を要する作業だったが順調に完了した。また、名古屋大学にて保存されていた tv-a マウスも、凍結胚の形で移送を行い、凍結胚の融解・移植、飼育、ジェノタイピングによる遺伝子型の選別までを、研究初年度中に行うことができた。tv-a マウスは p53 欠損マウスと交配したものをメインで使用したが、脆弱なマウスで増やすのに時間がかかったが、研究 2 年目以降は安定的に供給できるようになった。tv-a マウスの準備をしている間、海外の研究者から新たな RCAS ベクター (RCAS-PDGFA) の譲渡を受け、DF-1 へ導入した。また、治療薬として単純ヘルペスウイルス (G47) を準備し、tv-a マウス由来のグリア細胞へ感染させて、感染効率や細胞死の起こり方を確認した。

マウスの準備ができた研究 2 年目以降は、PDGFB と PDGFA による悪性 glioma の作成を行った。PDGFB には赤色発光タンパク (mKate2) や発光タンパク酵素 (luciferase) をレポーターとして付加していたので、IVIS による生体イメージングや解剖後の蛍光イメージングで観察することができた。この腫瘍に治療薬である G47 を注入し、治療効果を確認した。コントロール治療に比べ、G47 治療群は生存期間を延長する効果が見られ、2016 年の日本癌学会学術総会でその成果を発表した。また、p53 欠損マウスは悪性の肉腫 (sarcoma) が体部に自然発生するため、sarcoma にも G47 による治療を試みたが、明らかな効果は証明できなかった。

RCAS/tv-a システムによる脳腫瘍作成は、RCAS ベクターを DF-1 細胞へ導入後、DF-1 細胞を tv-a マウスの脳へ直接注射する方法をとるが、細胞の培養や回収など煩雑な操作を要するため、簡易な RCAS 注入方法の開発も行なった。RCAS レトロウイルスは DF-1 培養細胞の上清に含まれるため、上清を特殊な試薬とともに遠心し、ウイルスのみを分離して凍結することで、凍結ストックの RCAS をマウス脳へ注射し、腫瘍を作成することに成功した。しかし、腫瘍発生の効率は DF-1 細胞を直接注射する方が高かったため、本法は DF-1 の影響を除きたい場合等の特殊な場合にしか用いられなかった。

G47 による腫瘍細胞死の機序についても検討を行なった。G47 は、マウス glioma 培養細胞に対し、Akt の活性や細胞周期の停止を伴うような細胞死を発生させた。従来知られているアポトーシスとは一部異なる機序も見られたが、細胞死の詳細な発生機構は解明できなかった。

新たなマウスモデルの開発として、神経細胞に由来するプロモーター下に tv-a が発現するマウスの作成にも取り組んだ。プロモーターと tv-a 配列の下流に、レポーターとして蛍光タンパクと WPRE 配列を入れ、DNA コンストラクトを作成した。作成したコンストラクトをプラスミドへ入れ、脳腫瘍細胞へ導入すると、蛍光タンパクによる発光を確認できた。このコンストラクトを元に、新たな遺伝子改変マウスの作成をインジェクション法にて行なった。動物センターの技術支援を得て、2 回の作成実験を行い、生まれたマウスを蛍光イメージングとジェノタイピングにて確認したが、いずれの実験でも目的のマウスは得られなかった。

研究期間中に行なった共同研究では、RCAS/tv-a システムによる脳腫瘍での検討を行い、CD109 の glioma 進展における役割について、重要な知見を供与できた。また、Foxr2 が脳腫瘍発生を起こす新たなマウスモデルの開発にも参加し、病理組織学的知見の成果に貢献することができた。

2018 年からは、国立長寿医療研究センターへ移籍し、研究の継続を目指したが、再度の書類作成業務や、物品・マウス凍結胚の移動、研究場所の確保などに手間取り、1 年間の研究期間延長申請を行なったものの、移籍後はマウスを使用しての実験は行えなかった。研究期間終了後も、得られた知見についてデータを整理し、発表の準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwasawa T, Zhang P, Ohkawa Y, Momota H, Wakabayashi T, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Furukawa K, Furukawa K	4. 巻 52
2. 論文標題 Enhancement of malignant properties of human glioma cells by ganglioside GD3/GD2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 1255-1266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiraki Yukihiko, Mii Shinji, Enomoto Atsushi, Momota Hiroyuki, Han Yi-Peng, Kato Takuya, Ushida Kaori, Kato Akira, Asai Naoya, Murakumo Yoshiki, Aoki Kosuke, Suzuki Hiromichi, Ohka Fumiharu, Wakabayashi Toshihiko, Todo Tomoki, Ogawa Seishi, Natsume Atsushi, Takahashi Masahide	4. 巻 243
2. 論文標題 Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pathol	6. 最初と最後の頁 468-480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.4981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Poh B, Koso H, Momota H, Komori T, Suzuki Y, Yoshida N, Ino Y, Todo T, Watanabe S	4. 巻 21
2. 論文標題 Foxr2 promotes formation of CNS-embryonal tumors in a Trp53-deficient background	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro Oncol	6. 最初と最後の頁 993-1004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noz067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 百田洋之、稲生靖、藤堂具紀
2. 発表標題 RCAS/tv-aマウスモデルを用いた脳腫瘍研究
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 百田洋之、稲生靖、藤堂具紀
2. 発表標題 RCAS/tv-a mouse model system for the development of oncolytic virus therapy for brain tumors
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 百田洋之、稲生靖、伊藤博崇、金山政作、田中実、藤堂具紀
2. 発表標題 タンパク発現で見るグリオーマの分子異常とPDGFシグナルの関係
3. 学会等名 第34回日本脳腫瘍学会学術総会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考