

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07205

研究課題名(和文)新規遺伝子編集ツールを用いた癌細胞の作製

研究課題名(英文)Generating a cancer model using CRISPR/Cas9 system

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：母斑基底細胞癌症候群(NBCCS)はGorlin症候群とも呼ばれ、基底細胞癌、髄芽腫などの好発を特徴とする常染色体顕性の遺伝子疾患である。本研究では遺伝子編集により、NBCCSの原因遺伝子であるPTCH1両アレルに変異を有するiPS細胞を樹立し腫瘍形成能を解析した。変異iPS細胞は細胞増殖に働くシグナル伝達系が親株に比べて亢進していた。変異iPS細胞を免疫不全マウスの皮下に移植して形成されたテマトーマはそのほとんどが未分化な神経外胚葉細胞からなっており、髄芽腫マーカーを発現を広く発現していた。髄芽腫様組織を示す面積は親株のそれに比べて有意に広く、髄芽腫モデルとして有用であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は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のモデル細胞として利用するという、世界的に見てもこれまでに例のない極めて独創的かつ斬新的なものである。本研究が進展し、効率よく細胞のがん化が誘導できるようになればカウデン病、フォン・ヒッペル・リンドウ病などの他の高発がん遺伝病でも適用が可能であり、オーダーメイド医療の実践に向けて大きく前進するとともに、患者のQOL改善に大きく貢献できることが期待される研究である。

研究成果の概要(英文)：Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), also called Gorlin syndrome, is an autosomal dominant disorder with an increased incidence of tumors. The PTCH1 gene, responsible for NBCCS, suppresses the hedgehog signaling pathway, which is recognized as one of the important pathways in tumorigenesis. We generated PTCH1^{-/-} induced pluripotent stem cells (iPSCs) from NBCCS patient-derived iPSCs (PTCH1^{+/-}) by gene editing. The proliferation of PTCH1^{-/-} iPSCs was accelerated due to the activation of the hedgehog signaling pathway. When PTCH1^{-/-} iPSCs were subcutaneously injected into immunodeficient mice, the resulting teratomas almost exclusively contained immature ectodermal lineage cells expressing medulloblastoma markers, and the percentages of the area occupied by medulloblastoma-like tissue were larger in PTCH1^{-/-} teratomas than in PTCH1^{+/-} teratomas. These results support the suitability of these gene-edited iPSCs and PTCH1^{-/-} teratomas as models for the formation of tumors.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：母斑基底細胞癌症候群 髄芽腫 遺伝子編集 PTCH1 ヘッジホッグシグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

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ってきた。特に基底細胞癌 (BCC) 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。中でも Smoothened の抑制薬である vismodegib は FDA の認可が下りて、アメリカ合衆国では臨床応用が始まっている。しかし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。申請者が所属する研究室では以前より母斑基底細胞癌症候群 (Nevoid basal cell carcinoma syndrome、以下 NBCCS と省略) (別名 Gorlin 症候群) の遺伝子解析を行っている。NBCCS は、1960 年に Gorlin らによって報告された小奇形と遺伝性的高発癌性を併せ持つ常染色体優性遺伝疾患である。発達上の奇形には肋骨椎骨異常、合・多指症などがあり、腫瘍では基底細胞癌 (BCC)、角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT)、髄芽腫 (MB) の発生が有名である。NBCCS の責任遺伝子は *PTCH1* であり、既に当研究室で解析した症例数は百数十例に達し、そのうち大部分の症例で、EB ウイルスにより不死化リンパ芽球株 (LCL) を樹立している。また、NBCCS 患者由来の間質細胞および線維芽細胞も集積しつつある。これらの検体ではファースト・ヒットにあたる遺伝子変異が *PTCH1* 遺伝子に既に生じているので、セカンド・ヒットに相当する付加的な遺伝子変異を *PTCH1* (あるいはその関連遺伝子) に生じさせることができればがん化が可能であり、パッセンジャー変異が蓄積されていない多様な遺伝的背景の元で薬剤のスクリーニングを行うことが可能となる。

2. 研究の目的

NBCCS 患者から樹立した iPS 細胞に対して編集用 CRISPR/Cas9 ベクターと共に変異を起こしていない正常配列を標的として特異的に変異を導入し、セカンド・ヒットをもつ細胞を作製する。そして作製した細胞を免疫不全マウスに移植して腫瘍を形成させることを目的とする。それらの腫瘍を薬剤スクリーニングに使用することで、より *in vivo* での薬効を反映したスクリーニングが可能になると考えられる。上述のように NBCCS 患者では BCC、KCOT、MB の発生が著明であるが、患者由来線維芽細胞を用いて遺伝子編集を行いがん化させた場合には、これらのがんの性質を反映しないことが考えられる。そこで患者由来線維芽細胞を iPS 細胞化したのちに遺伝子編集を行い、その iPS 細胞を直接、あるいは *in vitro* での分化誘導後にマウスに移植して腫瘍形成を行わせ、薬剤スクリーニングを行うことを視野に入れる。

3. 研究の方法

申請者の所属する研究室では現在に至るまで百数十例の NBCCS 患者の遺伝子解析を行っている。原因遺伝子は *PTCH1* であるが、遺伝子の大きな欠損や重複は本研究の対象とせず、塩基置換によるミスセンス変異やナンセンス変異およびスプライス変異、1~数塩基の欠損、挿入によるフレームシフト変異を対象とした。上記の変異を持つ変異の中で、いくつかの症例において線維芽細胞もしくは間質細胞を保有し、一部の症例については *Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* を搭載したセンダイウイルスベクターを感染させることによって iPS 細胞を樹立済みであり、これらの iPS 細胞に対してセカンド・ヒット導入を目的とする CRISPR/Cas9 プラスミドを構築した。NBCCS は常染色体性優性遺伝病であるので、*PTCH1* 遺伝子変異の部位は正常配列とのヘテロ接合体になっているため、ヘテロ部位近傍のゲノム配列を組み込んだ CRISPR/Cas9 ベクターを作製した。作製したプラスミドを NBCCS 患者由来 iPS 細胞に電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、遺伝子導入後、限界希釈を行い、得られたコロニーからゲノム DNA を抽出し、塩基配列決定によって変異が導入された細胞をスクリーニングした。セカンド・ヒットを導入した細胞を胸腺欠損ヌードマウスに移植し腫瘍形成を解析した。

4. 研究成果

本研究では、それぞれ c.3130_3131dupGC、del_chr9:96766985-97885391 (*PTCH1* 遺伝子全体を含めた large deletion)、c.274delT を生殖細胞系列変異として有する NBCCS3 症例に由来する iPS 細胞に対して遺伝子編集を行い、残存する正常 *PTCH1* 遺伝子にセカンド・ヒットに相当する変異を導入した iPS 細胞 (*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞) を各 2 クローンずつ樹立した。また、large deletion を除く NBCCS 由来 iPS 細胞 2 株に対して、変異 *PTCH1* アレル特異的に遺伝子編集を行い、その結果変異 *PTCH1* 遺伝子が正常配列に変換された *PTCH1*^{+/+} iPS 細胞を樹立した。遺伝子編集によりヘテロ接合性の部位がホモ接合性に変換されたが、これがヘテロ接合性部位の欠失によるものでないことを、近接の一塩基多型 (SNP) の存在を PCR ダイレクトシーケンシング法により確認した (図 1)。遺伝子編集後、樹立した iPS 細胞が依然として未分化マーカーを発現していることを、免疫染色法及び、RT-PCR 法で確認した。

これらの iPS 細胞で HH シグナル伝達系が更新しているか否かを細胞増殖および HH シグナル伝達系の標的遺伝子である *PTCH1*、*GLI1*、*HHIP1* の発現量で解析した。*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞は親株である NBCCS-iPS 細胞に比べ、細胞増殖能が高く、また *PTCH1*^{+/+} iPS 細胞は NBCCS-iPS 細胞に比べ細胞増殖能が低かった。また、標的遺伝子の発現量も *PTCH1*^{-/-} iPS 細胞は親株に比べて有意に高く、*PTCH1*^{+/+} iPS 細胞では有意に低かった。これらの結果から、遺伝子編集 iPS 細胞では HH シグナル伝達系が亢進もしくは抑制されていることが確認された。

これらの NBCCS-iPS 細胞および *PTCH1* 遺伝子編集 iPS 細胞を免疫不全マウス C.B-17/Icr-scid/scidJcl の背側部に皮下移植してテラトーマを形成させ、腫瘍を摘出後、組織化学的に解析を行った。*PTCH1*^{+/+} iPS 細胞および NBCCS-iPS 細胞から形成されたテラトーマは神経管、軟骨、消化管様組織といった外胚葉・中胚葉・内胚葉に由来する組織を含んでいた。一方 *PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマは、形成されたテラトーマすべてで神経管が観察されたものの、軟骨および消化管様組織を含むテラトーマは一部のみであった。また、外胚葉に由来する高度に分化した組織の一つであるメラノサイトは *PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマでは一例も認められなかった。各胚葉のマーカ蛋白質の発現を免疫組織化学染色で解析したところ、*PTCH1*^{+/+} iPS 細胞および NBCCS-iPS 細胞由来テラトーマでは 3 胚葉のマーカ蛋白質全ての発現が認められたが、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマでは中胚葉マーカ α -smooth muscle actin の発現は血管周囲のごく一部の細胞でのみ認められ、内胚葉マーカである α -fetoprotein の発現は認められなかった。一方で外胚葉マーカである Glial fibrillary acidic protein の発現はテラトーマ全体で認められた。さらに未熟ニューロンマーカ Tuj-1 と成熟ニューロンマーカ synaptophysin に対する免疫組織化学染色を行ったところ、*PTCH1*^{+/+} iPS 細胞および NBCCS-iPS 細胞由来テラトーマでは両者の発現領域が明確に区別できたのに対し、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマでは両者の発現領域は区別できず、両者を発現している領域が広く存在した。さらに細胞増殖マーカである Ki67 の発現を解析したところ、*PTCH1*^{+/+} iPS 細胞および NBCCS-iPS 細胞由来テラトーマでは Tuj-1 陽性領域で主に発現が認められたのに対し、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマでは全体に Ki67 発現領域が散在していた。また、NBCCS-iPS 細胞および *PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマではヘマトキシリンエオシン染色切片上で髄芽腫様の組織像がしばしば観察された。Tuj-1、synaptophysin、Ki67 は髄芽腫マーカとしても使用されるタンパク質であるため、これらの発現領域と髄芽腫様の組織像の領域を連続切片を用いて解析したところ、NBCCS-iPS 細胞由来テラトーマでは平均 1.88% 標準誤差 0.82 の面積で髄芽腫が発生したのに対して、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマ平均 19.89% 標準誤差 8.19 と有意 ($p < 0.01$) に広い面積で髄芽腫が発生した (図 2)。これらの結果から、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞由来テラトーマは髄芽腫のモデルとして、また NBCCS 症例特異的な遺伝的バックグラウンドでの薬剤スクリーニングに有用であると考えられた。

一方で NBCCS に特徴的な腫瘍の一つであり、柵状配列などの病理像を示す基底細胞癌は本研究で行った方法では確認されなかった。髄芽腫および基底細胞癌の発症機序および本邦における NBCCS 症例におけるこれらの腫瘍の平均発症年齢を考慮に入れると、*PTCH1*^{-/-} iPS 細胞を一度ケラチノサイトに分化誘導するなどの工夫が必要であると考えられた。

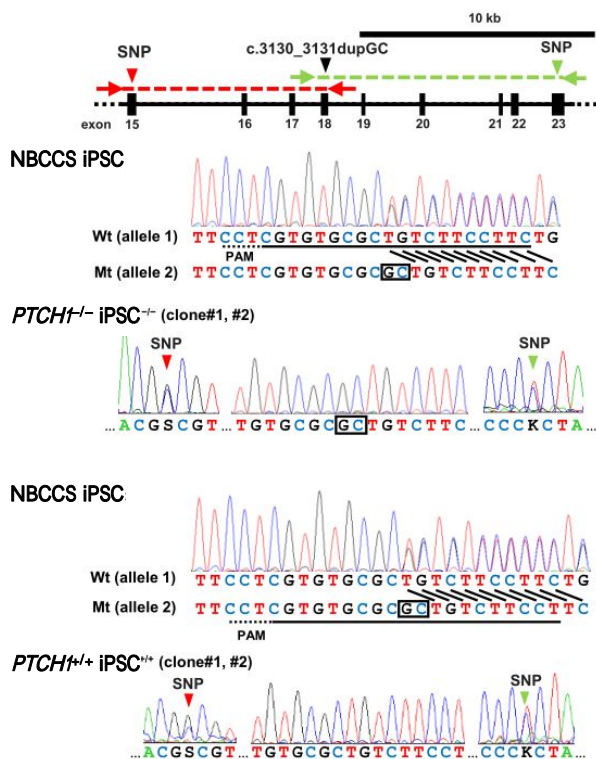


図 1 NBCCS-iPS 細胞の遺伝子編集

遺伝子編集の一例を示した。下線 (実線) は標的配列を、下線 (点線) はプロトSpacer近接配列を示す。

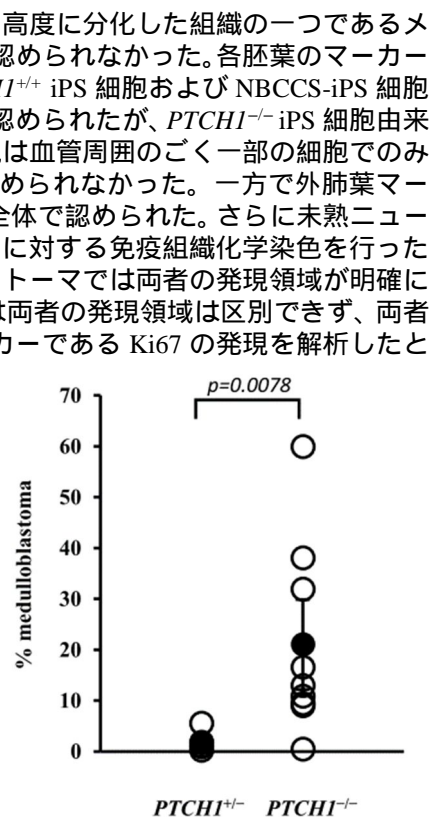


図 2 髄芽腫様組織のテラトーマに占める割合
黒丸は平均値を、バーは標準誤差を示す。白丸は個々の値を示す。(PTCH1^{+/+}: n=5, PTCH1^{-/-}: n=9)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hiroko Yanagisawa, Mohammad Arif Hossaina, Takashi Miyajima, Kazuaki Nagao, Toshiyuki Miyashita, Yoshikatsu Eto	4. 巻 126
2. 論文標題 Dysregulated DNA methylation of GLA gene was associated with dysfunction of autophagy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Genetics and Metabolism	6. 最初と最後の頁 460-465
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymgme.2019.03.003	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長尾 和右、高山 吉永、宮下 俊之
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いたNBCCSモデルiPS細胞の作製
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長尾 和右、加藤 千勢、初瀬 洋美、高山 吉永、亀山 孝三、梅澤 明弘、藤井 克則、宮下 俊之
2. 発表標題 母斑基底細胞癌症候群患者由来細胞を用いた腫瘍の作製
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村 茜里、福田 篤、長尾 和右、阿久津 英憲、宮下 俊之
2. 発表標題 マウスのインプリンティング型X染色体不活化においてRNF12はREX1の抑制によって父由来non-coding RNA Tsix を抑制する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼友 裕大、高山 吉永、初瀬 洋美、藤谷 和子、長尾 和右、亀山 孝三、宮下 俊之
2. 発表標題 次世代シーケンサーを用いたGorlin症候群患者に発症した各種腫瘍の遺伝子解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------