

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590465

研究課題名(和文)新規脳腫瘍マウスモデルを用いた膠芽腫発生機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of gliomagenesis using novel mouse glioma model

研究代表者

丸本 朋稔(Marumoto, Tomotoshi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60363511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫(GBM)は、その治療が極めて難しい悪性脳腫瘍である。我々は最近、成体マウス大脳において、細胞種特異的かつ領域特異的に癌遺伝子を発現することのできる新規GBMマウスモデルを開発し、その発生機構、特にその細胞起源に関して検討を行った。図に示すようなレンチウイルスベクターシステムを用いて、さまざまな細胞種特異的にがん遺伝子Rasの活性化またはがん抑制遺伝子NF1の抑制とp53シグナルの抑制を同時に誘発したところ、未分化な神経前駆細胞だけでなく、分化したアストロサイトやニューロンからもGBMが発生した。これらの結果は、分化細胞を含む様々な細胞がGBMの発生起源となりうることを示している。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant primary brain tumor in adults. However the cellular origin of this tumor has not been well understood. We showed that GBM can originate from differentiated cells in the central nervous system (CNS), including cortical neurons. Transduction by oncogenic lentiviral vectors of neural stem cells (NSCs), astrocytes, or even mature neurons in the brains of mice could give rise to GBM. These data will help understand the gliomagenesis and contribute to the development of the new strategy of treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：脳腫瘍 膠芽腫

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(以下GBM)は成人原発性脳腫瘍の中でも発生頻度が高く、かつ最も悪性の腫瘍である。GBM患者に対する手術療法、化学療法、放射線療法を組み合わせたいわゆる標準的治療法での平均予後は約1年余りであることから新規治療法の開発が強く望まれている。

GBMの治療法の実現が進まない大きな理由として、その発生の起源となる細胞種が不明であり発生のメカニズムの理解が不足していること、進展の分子メカニズムの理解が不足していること、さらには、新規治療法の実現に適した動物モデルが存在しなかったことなどが挙げられる。

### 2. 研究の目的

筆者らは、成体マウス脳において、細胞種特異的かつ領域特異的に体細胞で遺伝子変異を誘導する Cre 制御レンチウイルスベクター発癌誘導システムを開発し、細胞種特異的かつ領域特異的に GBM を発生させるモデル系の実現に成功した<sup>1-4)</sup>。このモデル系ではゼノグラフィモデル系にはみられない腫瘍細胞の浸潤性を再現できるとともに、病理学的にも極めて腫瘍のヒト GBM に近い腫瘍をマウス脳で再現することができた。また、特筆すべきことは、このモデル系では細胞種特異的に発癌イベントを誘発するため、長らく議論の対象となっている GBM の細胞起源を探索する研究にも用いることが可能であるという点である。本研究では、筆者らが開発した Cre 制御レンチウイルスベクター発癌誘導システム GBM 発生の細胞起源となる細胞種を明らかにすることにより、GBM の発生メカニズムのより詳細に理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

筆者らは近年 Cre 制御レンチウイルスベクターを用いた新規脳腫瘍マウスモデルを開発した<sup>1)</sup>。Cre 制御レンチウイルスベクターを用いて、任意の遺伝子をアストロサイトのマーカーである GFAP プロモーター下に Cre を発現する p53 ヘテロ接合型トランスジェニックマウス脳に定位脳手術装置を用いて導入することにより、細胞種特異的かつ領域特異的な発癌イベントを誘発することが可能である(図1)。このシステムを用いて活性化型 H-Ras(H-RasV12)を発現するベクターを p53 ヘテロ型の GFAP-Cre マウス脳に導入すると、2-3 ヶ月後には、ほぼ 100%のマウスにヒト GBM と病理学的に類似した腫瘍が形成することができる<sup>1)</sup>。形成された腫瘍はヒト GBM の特徴である腫瘍内出血、壊死、腫瘍血管の増生、核の大小不同などが認められる(図1)。このような結果から Ras シグナルの活性化と p53 シグナルの不活性化が GBM の発生には重要であることがわかっている。本研究ではこのシステムをさらに発展させ、Ras シグナルの活性化と p53 の不活性化を同時に行うことのできるレンチウイルスベクターを開発し、さらに様々な種類の細胞種特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスの脳にベクターを導入することにより、アストロサイト、ニューロン及び神経前駆細胞特異的な発癌イベントを誘発することにより、どの細胞種に発癌イベントを誘発した際に GBM が高頻度で形成されるのかを検討することにより GBM の細胞起源について新規知見を得ようとした。

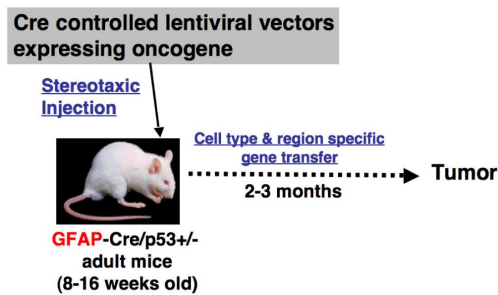


図 1 Cre 制御レンチウイルスベクターシステムを用いたマウス GBM モデル.

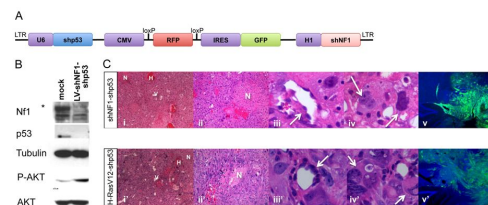
我々の開発した Cre 制御レンチウイルスベクターを用いて、マウス大脳アストロサイト特異的に Ras シグナルの活性化と p53 シグナルの抑制を誘導すると、GBM を発症させることができる。

#### 4. 研究成果

アストロサイトからの腫瘍形成を検討するため、Ras シグナルの抑制因子である Nurofibromatosis 1 (NF1) 遺伝子に対する short hairpin RNA (shRNA) を発現するとともに p53 に対する shRNA を発現することのできるベクターを開発し (Fig. 2A and 2B)、これをアストロサイトマーカーである GFAP のプロモーターから Cre を発現するトランスジェニックマウス (GFAP-Cre) に導入した。誘発された腫瘍は病理学的にヒト GBM と類似したものであり (図 2C)、green fluorescent protein (GFP) を発現して、Red fluorescent protein (RFP) を発現していなかった。腫瘍の形成効率が高く (>90%)、アストロサイトは GBM の細胞起源となりうることが示された。次にニューロンからの腫瘍形成を検討するため、上記と同じベクターをニューロンマーカーである Synapsin1 のプロモーターから Cre を発現するトランスジェニックマウス (Syn1-Cre) に導入した。驚くべきことにヒト

GBM と類似した腫瘍が高率に形成され、GFP<sup>+</sup>/RFP<sup>-</sup>の腫瘍細胞が認められた。従って、ニューロンもアストロサイト同様、GBM の細胞起源となりうることが示された。

さらには、神経先駆細胞マーカーである Nestin のプロモーターから Cre を発現するトランスジェニックマウス (Nestin-Cre) に導入した際もヒト GBM と類似した腫瘍が高率に形成され、GFP<sup>+</sup>/RFP<sup>-</sup>の腫瘍細胞が認められた。以上の結果より、Ras シグナルの活性化と p53 シグナルの不活性化を同時に誘発すれば、アストロサイトや神経前駆細胞だけでなく、驚くべきことにニューロンも GBM の細胞起源となりうることが示された。



#### NF1 抑制と p53 抑制と同時に行うことのできるレンチウイルスベクターを用いた GBM モデル.

(A) NF1 及び p53 に対する shRNA を同時に発現抑制するレンチウイルスベクター: Cre を発現する細胞に導入されると RFP がカットアウトされ、GFP のみが細胞で発現することとなる。(B) Western blotting: NF1 と p53 の発現が同時に抑制されていることを示す。(C) HE 染色: (A) に示すベクターを GFAP-Cre マウスに導入された際に形成されたヒト GBM 類似腫瘍 (上段)。下段は活性化型 Ras (RasV12) と p53shRNA を同時に発現することのできるレンチウイルスベクターを GFAP-Cre マウスに導入された際に形成されたヒト GBM 類似腫瘍。

1980年代までは、成人脳において細胞は増殖しないといわれ、脳腫瘍は単純に成熟し分化した細胞で遺伝子変異が生じて発生すると考えられていた。しかしながら、1990年代初頭、成人脳にも「自己複製能」と「分化能」を有する未熟な神経幹細胞が少なくとも嗅球 (olfactory bulbs) や傍脳室領域 (SVZ: subventricular zone) および海馬 (hippocampus) に存在することが明らかにされ、幹細胞と腫瘍細胞は「自己複製能」をもつという点で類似していることより、神経幹細胞や神経前駆細胞が腫瘍の起源細胞ではないかと考えられるようになった。我々の結果からは Nestin 陽性神経前駆細胞が GBM の起源となりうることを示され、上記の仮説を指示する結果となった。

我々の結果からは、神経前駆細胞だけでなく、アストロサイトからも GBM が形成されることが示されたが、形成された腫瘍は Nestin 陽性であり、アストロサイトは発癌シグナルにより腫瘍化する際に脱分化することが示唆された。

また、本研究で最も驚くべきことはニューロンも GBM の細胞起源となりうることを示されたことである。形成された腫瘍はやはり Nestin 陽性であり、ニューロンも腫瘍化の過程で脱分化されることが示唆された。

2006年、Induced pluripotent stem cell (iPS細胞) が報告されて以来、分化した体細胞が脱分化しうることは、もはや常識となっている<sup>5)</sup>。iPS細胞作製の際に用いられるリプログラミング因子の一つである c-Myc は有名な癌遺伝子であることから推察されるように、Rasシグナルの活性化と p53 の不活性化により GBM は形成される際、iPS細胞作製時に活性化されるリプログラミングシグナルと類似したシグナルが活性化されている可能性がある。

アストロサイトやニューロンも GBM の細胞起源をなりうることを考慮すると、このシグナルは、細胞種を選ばず、その活性化により危険な細胞の悪性を誘導しうるのではないかと予想される。

今後、この悪性化リプログラミングシグナルの詳細が明らかにされ、その知見が GBM に対する新たな治療戦略の開発に役立つことを期待したい。

#### 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 4件)

1. Friedmann-Morvinski D, Bushong E, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman M and Verma IM. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce glioblastomas. Science 338: 1080-4, 2012
2. Liao J\*, Marumoto T\*, Yamaguchi S, Okano S, Takeda N, Sakamoto C, Kawano H, Nii T, Miyamoto S, Nagai Y, Okada M, Inoue H, Kawahara K, Suzuki A, Miura Y, Tani K. Inhibition of PTEN tumor suppressor promotes the generation of induced pluripotent stem cells. Mol Ther. 6:1242-50, 2013  
\*: equal contribution
3. Yamaguchi S\*, Marumoto T\*, Nii T, Kawano H, Liao J, Nagai Y, Okada M, Takahashi A, Inoue H, Sasaki E, Fujii H, Okano S, Ebise H, Sato T, Suyama M, Okano H, Miura Y, Tani K. Characterization of common marmoset dysgerminoma like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. Cancer Sci., in press, doi: 10.1111/cas.12367. [Epub ahead of print], 2014. \*: equal contribution
4. Nii T, Marumoto T, Kawano H, Yamaguchi S, Liao J, Okada M, Sasaki E, Miura Y, Tani K. Analysis of essential pathways for self-renewal in common marmoset embryonic stem cells. FEBS Open Bio. 4:213-9, 2014. \*: equal contribution

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特記なし

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

丸本朋稔(MARUMOTO Tomotoshi)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：6 0 3 6 3 5 1 1

##### (2)研究分担者

谷 憲三郎 (TANI Kenzaburo)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：0 0 1 8 3 8 6 4

##### (3)連携研究者

なし