

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04328

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いたVHL病新規病態モデルの構築

研究課題名(英文)Development of new VHL disease models using patient-derived iPS cells

研究代表者

中村 英二郎(Nakamura, Eijiro)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：90293878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：VHL病は遺伝性腫瘍症候群であり腎細胞癌、褐色細胞腫、血管芽腫などを高率に発症する。マウスモデルが存在しないため患者由来iPS細胞を用いた新規病態モデル構築を行なった。複数の患者由来iPS細胞の樹立に成功しVHL-/- iPSを腎被膜下に移植を行ったところ、いずれの細胞も腫瘍を形成し一部の組織において患者の病型を反映していると思われる組織像が得られた。VHL腫瘍の一つであるccRCCの発生母地である近位尿管(PRT)である中胚葉への分化誘導を行なったところmesodermの分化マーカーとともに、ccRCCのマーカーとされる転写因子の発現が確認され分化誘導が成功していることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

VHL病は希少難病であり、また、様々な種類の腫瘍性病変を発症することから新規実験系の構築や治療法の開発に困難が伴う。今回、患者由来iPS細胞を用いた新規病態モデル構築に成功したことにより、患者の診断、治療に役立つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：VHL disease is a hereditary cancer syndrome and patients are suffered from various tumors such as RCC. Since there exist no mice model for this disease, we tried to explore new experimental model using patients derived iPS cells. We successfully develop several VHL-/- iPS. Importantly, when we differentiate those cells to renal proximal tubular cells, the tumor origin of RCC, some pathological features of the tumors were recapitulated. Moreover, the expression of tumor markers of RCC was also confirmed.

研究分野：泌尿器科腫瘍学

キーワード：VHL病 腎細胞癌 褐色細胞腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Von-Hippel-Lindau disease (VHL 病) は VHL 遺伝子の germline mutation に起因する遺伝性腫瘍症候群であり腎細胞癌、褐色細胞腫、血管芽腫などの腫瘍を高率に発症する。常染色体優性の遺伝形式をとり患者は *VHL*^{+/-} の genotype を有する。*VHL* KO マウスではヒト疾患の表現系が再現されないため腫瘍発生機構には不明な点が多い。そこで、本研究において VHL 病患者由来 iPS 細胞を用いた新規病態モデルを構築し in vivo における同機構解明を行う。

2. 研究の目的

VHL 病では、30-40%の症例で腎細胞癌 (Renal Cell Carcinoma: RCC) を発症し主要な死亡原因となっている (B. Maher et al. *Eur J Hum Genet* 2011)。Sporadic RCC においても 80%以上の症例で VHL 遺伝子変異を認めることから、患者 iPS 細胞を用いた新規疾患モデルの構築を行えば、孤発症例も含めた RCC に対する新規治療標的の同定や治療薬開発に繋がる可能性が高い。

3. 研究の方法

(1) VHL 病患者由来 iPS 細胞は、患者皮膚線維芽細胞、または、血球系細胞よりエピソーマル法を用いて樹立を行う。

(2) 患者由来 iPS 細胞を免疫不全マウスに移植し Xenograft を形成し得るか、また、その場合に患者が発症した腫瘍に類似の組織型を認めるか HE 染色を用いた病理学的解析により検討を行う。

(3) VHL 患者に発症する RCC は、wild type VHL が欠失、または、変異をきたした *VHL*^{-/-} の genotype を示す (Knudson's two-hit theory) ことから、遺伝子改変による *VHL*^{-/-} iPS の作製が必要となる。そのため、CRISPR/Cas9 system を用いた *VHL*^{-/-} iPS の樹立を行う。

(4) *VHL*^{-/-} iPS を用いた Xenograft 実験を行い、同所移植により RCC の臨床上的特徴が再現されているか検討を行う。

(5) *VHL*^{-/-} iPS を in vitro において腫瘍の発生母地である近位尿細管への分化誘導を行い腫瘍発症の再現実験を行う。

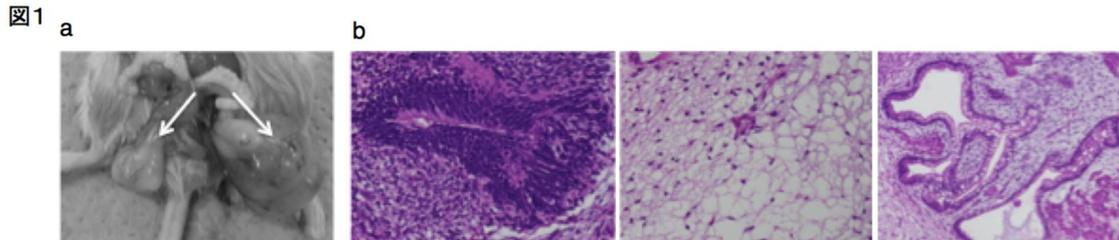
4. 研究成果

(1) 皮膚線維芽細胞、または、血液細胞からエピソーマル法により作製された患者由来の *VHL*^{+/-} iPS に関して

- 1、VHL の one allele に変異を有していること
- 2、Karyotyping により正常の核型を有していること

が確認された。

また、VHL^{+/-} iPS は NOD/SCID マウスの精巣へ Injection を行なった場合に腫瘍形成能を有していた (図 1 a)。次に、腫瘍組織より FFPE ブロックを作成し HE 染色を用いた病理組織学的検討を行なったところ腫瘍内に神経管、脂肪組織、腺管構造等を認めたことにより Mature Teratoma であることが確認された (図 1 b)。これら結果により、VHL^{+/-} iPS が in vivo において三胚葉への分化能を有することが確認された。

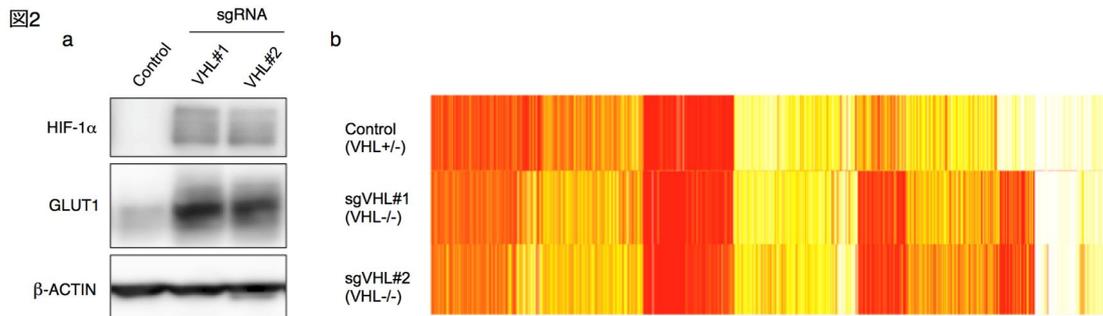


(2) wt-VHL allele の disruption による VHL^{-/-} iPS の作成

1、VHL 配列を認識する 2 種類の single guide RNA (VHL#1, VHL #2) を作成した。同配列を用いた CRISPR/Cas9 system により複数の VHL^{-/-} iPS を樹立することに成功した。

2、WB 解析により、VHL の inactivation に伴って HIF-1 alpha の安定化、及び、HIF の標的遺伝子の一つである GLUT1 の発現亢進が確認された (図 2 a)。

3、親株の VHL^{+/-} iPS と VHL^{-/-} iPS の expression profile の比較を行ったところ、複数の遺伝子において発現パターンが異なることが確認された (図 2 b)。



(3) VHL^{-/-} iPS を用いた in vitro、及び、in vivo での患者病型の再現実験

樹立に成功した VHL^{-/-} iPS を腎被膜下に移植を行い、患者の病型である RCC が in vivo において再現され得るか実験を行った。Control sgRNA を導入した VHL^{+/-} iPS が Mature Teratoma を形成したのに対して、VHL sgRNA が導入され wt-VHL allele が disruption された VHL^{-/-} iPS では一部に RCC 様の組織が確認された (図 3 a)。また、VHL^{-/-} iPS を腫瘍の発生母地である近位尿細管へ向けた Mesoderm への分化誘導を行なったところ、VHL^{+/-} iPS と VHL^{-/-} iPS を比較した場合に後者で特異的に上昇を来す遺伝子群を認めたことから、これらが RCC の新規治療標的となり得る可能性が示唆された (図 3 b)。

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 Chakraborty Abhishek A., Nakamura Eijiro, Qi Jun, Creech Amanda, Jaffe Jacob D., Paulk Joshiawa, Novak Jesse S., Nagulapalli Kshithija, McBrayer Samuel K., Cowley Glenn S., Pineda Javier, Song Jiayi, Wang Yaoyu E., Carr Steven A., Root David E., Signoretti Sabina, Bradner James E., Kaelin William G.	4. 巻 9
2. 論文標題 HIF activation causes synthetic lethality between the VHL tumor suppressor and the EZH1 histone methyltransferase	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 eaal5272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.aal5272	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 Kandori Shuya, Kojima Takahiro, Matsuoka Taeko, Yoshino Takayuki, Sugiyama Aiko, Nakamura Eijiro, Shimazui Toru, Funakoshi Yuji, Kanaho Yasunori, Nishiyama Hiroyuki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Phospholipase D2 promotes disease progression of renal cell carcinoma through the induction of angiogenin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13609	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 SK Flores, Z Cheng, AM Jasper, K Natori, T Okamoto, A Tanabe, K Gotoh, H Shibata, A Sakurai, T Nakai, X Wang, M Zethoven, S Balachander, Y Aita, W Young, S Zheng, K Takekoshi, E Nakamura, RW Tothill, RCT Aguiar, and PLM Dahia.	4. 巻 104
2. 論文標題 Synonymous but Not Silent: A Synonymous VHL Variant in Exon 2 Confers Susceptibility to Familial Pheochromocytoma and von Hippel-Lindau Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism	6. 最初と最後の頁 3826 ~ 3834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2019-00235	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 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村英二郎
2. 発表標題 VHL病患者由来iPS細胞を用いた腎細胞癌の発癌分子機構解明
3. 学会等名 日本癌学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村英二郎
2. 発表標題 iPS細胞を用いた低酸素下における細胞悪性化機構の解明
3. 学会等名 3. 学会等名 第55回日本臨床分子医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eijiro Nakamura
2. 発表標題 Development of innovative therapeutic strategy for ccRCC based on the molecular mechanism of tumorigenesis
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the Japanese Urological Association（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村英二郎
2. 発表標題 遺伝性褐色細胞腫に対する外科的治療の特徴
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター DSKプロジェクト http://www.tk.med.kyoto-u.ac.jp/</p>
--

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
研究分担者	杉山 愛子 (Sugiyama Aiko) (30642699)	京都大学・医学研究科・特定研究員 (14301)	
研究分担者	竹越 一博 (Takekoshi Kazuhiro) (40261804)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	