

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09519

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いた神経線維腫症2型の病態解析と新規治療法の探索

研究課題名(英文) Analysis of disease mechanism and discovery of novel treatment for neurofibromatosis type 2 using patient-derived induced pluripotent stem cell

研究代表者

寺坂 俊介 (Shunsuke, Terasaka)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：10447055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経線維腫症2型(NF2)の患者5名から採取した末梢血単核球を用いて、iPS細胞の誘導を行った。樹立したすべての患者由来iPSC(NF2-iPSC)において、幹細胞マーカーの発現を認めた。体細胞モザイクの症例から樹立したNF2-iPSCではクローン毎にNF2遺伝子異常の有無が異なったが、NF2に関連するシグナル経路の遺伝子発現はこれらのクローン間で差を認めず、NF2遺伝子の両アレルの不活性化が腫瘍化に必要であることが示唆された。シュワン細胞への分化誘導による腫瘍モデルの樹立を試みたが、健康人由来iPSCを用いてneural crestからシュワン細胞へ分化させる条件が整わず断念した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では神経線維腫症2型(NF2)患者由来iPS細胞株の樹立を行った。体細胞モザイクの症例から樹立したiPS細胞ではNF2遺伝子の変異の有無がクローン毎に異なりドナーにおける遺伝子変異の分布が受け継がれていると考えられた。しかしNF2遺伝子に関連したシグナル経路の遺伝子発現はクローン間で差を認めず、NF2遺伝子の両側アレルの機能不活性化が、腫瘍発生に必須であることが示された。今後はシュワン細胞への分化誘導条件を検討することで、NF2における腫瘍発生のメカニズムや新規治療法を探索するためのソースとなりうる。

研究成果の概要(英文)：We established patient-derived iPSC cell using peripheral blood mononuclear cells harvested from 5 patients with neurofibromatosis type 2 (NF2). Expression of stem cell markers were observed in all of established iPSC lines. In a case with NF2 mosaicism, presence or absence of NF2 mutation differed between iPSC clones, while expression of genes in pathways associated with NF2 gene were not different between these iPSC clones, which suggested that biallelic inactivation of NF2 is necessary for tumorigenesis in NF2 patient. We tried to establish in vitro model of schwannoma by differentiation induction for schwann cell, but it was failed to differentiate neural crest to schwann cell using iPSC derived from healthy human.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経線維腫症2型 NF2 iPSC細胞 人工多能性幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 2 型 (neurofibromatosis type2, NF2) は NF2 遺伝子の異常に起因する常染色体優性遺伝疾患で、両側の第 8 神経鞘腫をはじめとして髄膜腫や頭蓋内外の神経鞘腫、上衣腫などが多発する。有効な内科的治療が存在せず外科治療による腫瘍摘出を繰り返し行わざるを得ないことが現状であり、新規の薬剤治療が望まれる疾患である。

2. 研究の目的

本研究では NF2 の患者から採取した末梢血単核球を用いて、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPSC) を誘導する。樹立した疾患特異的 iPSC を用いて、シュワン細胞への分化誘導により神経鞘腫発症前段階のシュワン細胞モデルを樹立する。得られたシュワン細胞の解析や腫瘍モデルの樹立を通して、NF2 における神経鞘腫における腫瘍化メカニズムや細胞維持機構を明らかとし、新規標的治療の開発を目指す。

3. 研究の方法

NF2 の患者から同意を得て採取した末梢血単核球に対し、センダイウイルスベクターを使用して KLF4、MYC、OCT3/4、SOX2 を導入して iPSC 細胞 (NF2-iPSC) の樹立を行った。樹立した iPSC 細胞の幹細胞マーカーによる多能性の評価や、NF2 遺伝子における変異の有無を末梢血単核と比較を行う。NF2-iPSC に対して neural crest への分化を経てシュワン細胞への分化誘導を行い、健康人由来 iPSC 細胞を使用した場合との比較を試みた。

4. 研究成果

a) NF2 患者由来 iPSC の樹立

5 名の NF2 患者から同意を得て末梢血単核球を採取し、全例で iPSC 細胞株の樹立を行った (図 1-A)。RT-PCR ではセンダイウイルスの消失を確認し、幹細胞マーカーの解析として NANOG、c-MYC、GDF3、KLF4、SALL4、OCT3/4、REX1、SOX2、DNMT3b の発現を全例で確認した (図 1-B)。さらに免疫染色による NANOG、OCT3/4、SSEA4、TRA1-60 の発現と Alkaline phosphatase 染色による陽性細胞を確認した (図 1-C)。以上より NF2 患者由来 iPSC 細胞は、多能性幹細胞としての性質を有していると考えられた。

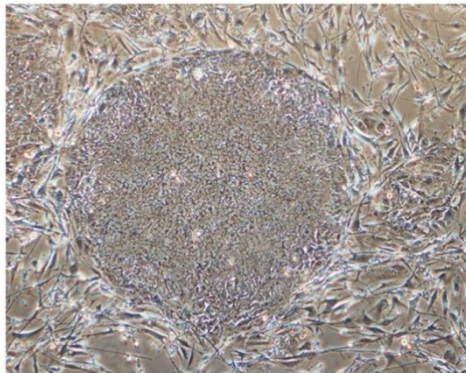


図1-A

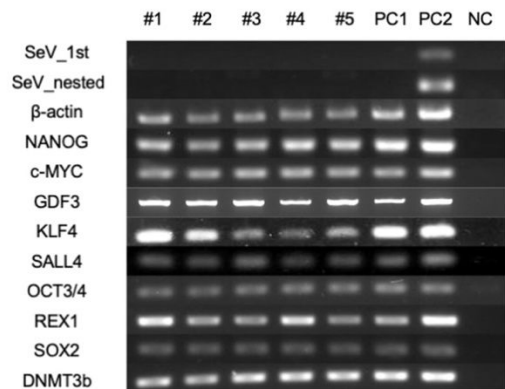


図1-B

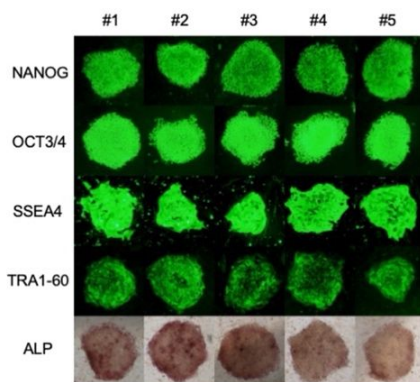


図1-C

b) 体細胞モザイク由来 iPSC の解析

本研究に参加した 5 例中 1 例では NF2 遺伝子の体細胞モザイクが認められ、末梢血の DNA シークエンスでは NF2 遺伝子に異常を認めなかったが、異なる部位の髄膜腫および神経鞘腫の手術検体では同一の NF2 遺伝子変異が認められた (図 2-A 左)。本症例から樹立した 5 つの iPSC クローンでは、同様の NF2 遺伝子変異は 1 つのクローンのみに認められ (図 2-A 右) 体細胞モザイクの状態が iPSC のクローン間でも受け継がれていることが確認された。また NF2 遺伝子に関連したシグナル経路である Rac1 経路、Hippo 経路、mTOR 経路における遺伝子の発現を定量 PCR により解析したところ、NF2 遺伝子変異の有無とこれらの遺伝子発現の相関は認められなかった (図 2-B)。これは NF2 遺伝子のがん抑制遺伝子であることを支持する所見であり、NF2 患者の腫瘍の発生においては NF2 遺伝子の両側アレルにおける機能不活性化が必須であることが示唆された。

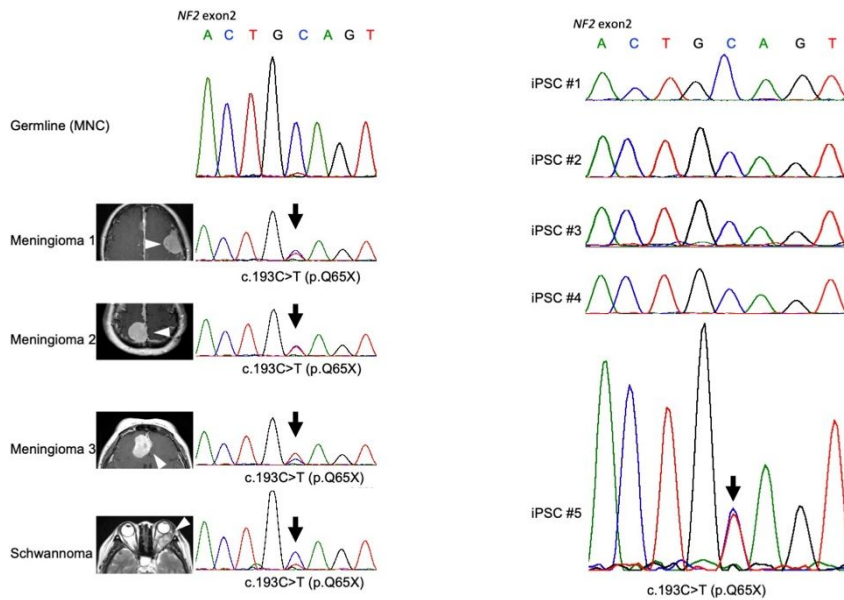


図 2-A

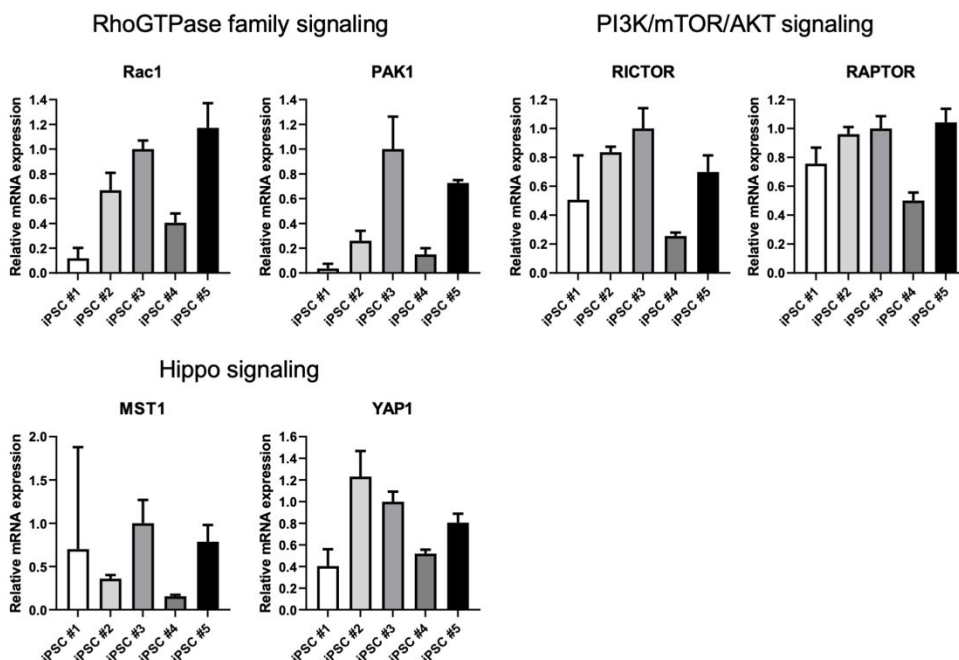


図 2-B

c) NF2-iPSC からシュワン細胞への分化誘導を行うにあたり、予備実験として健常人由来 iPSC 株 201B7 を用いて分化誘導条件の検討を行った。シュワン細胞は前段階として神経堤 (neural crest) から発生するため、まず neural crest への分化誘導を過去に報告されている GSK-3 β 阻害薬および TGF- β 阻害薬を用いた方法で行った。2 週間の培養後に得られた細胞の免疫染色では neural crest のマーカーである p75 の発現が認められ (図 3-A) 定量 PCR では neural crest マーカーの p75、PAX3、ZIC1 の発現が上昇した一方で多能性幹細胞マーカーの NANOG や OCT3/4 は低下していることから (図 3-B) neural crest への分化が得られていると考えられた。続いて neural crest に対して neuregulin-1 を用いた方法でシュワン細胞への分化誘導を試みたが、シュワン細胞のマーカーである S100 および GFAP の発現した細胞が十分に得られなかった。今後シュワン細胞への分化誘導条件を検討し、NF2-iPSC を用いて解析を行う予定である。

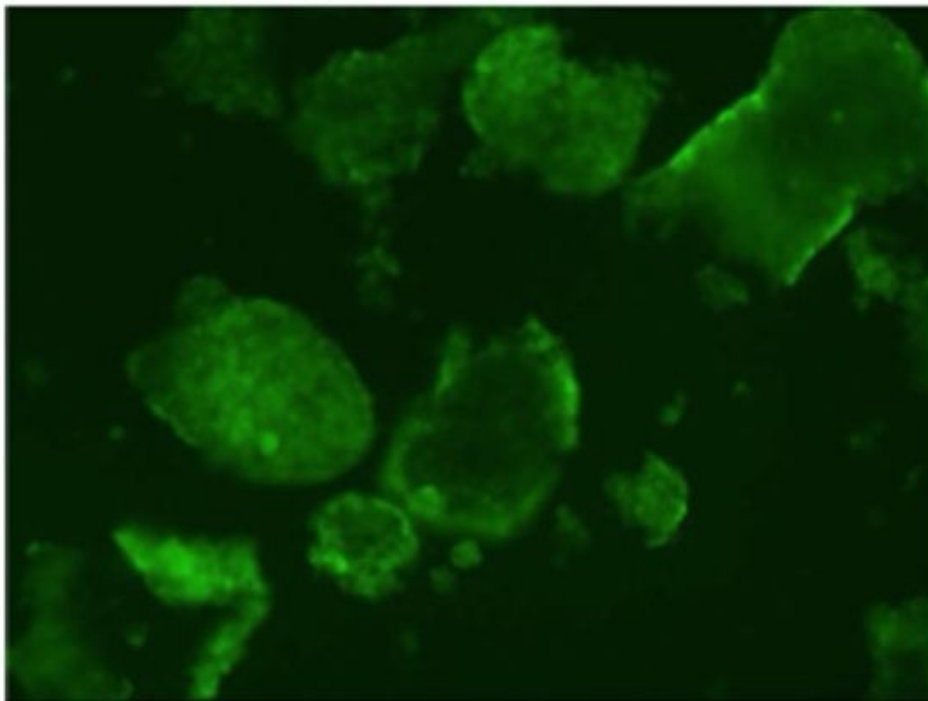


図3-A

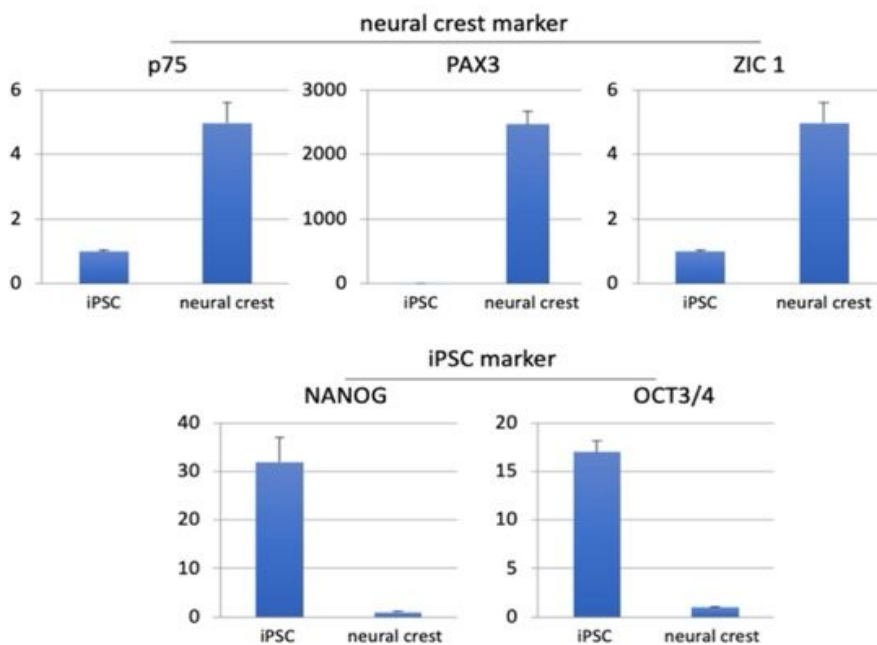


図3-B

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 Ishi Yukihiro, Era Takumi, Yuzawa Sayaka, Okamoto Michinari, Sawaya Ryosuke, Motegi Hiroaki, Yamaguchi Shigeru, Terasaka Shunsuke, Houkin Kiyohiro, Fujimura Miki	4. 巻 -
2. 論文標題 Analysis of induced pluripotent stem cell clones derived from a patient with mosaic neurofibromatosis type 2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Medical Genetics Part A	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ajmg.a.62700	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0件

〔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
研究分担者	江良 択実 (Era Takumi) (00273706)	熊本大学・発生医学研究所・教授 (17401)	
研究分担者	伊師 雪友 (Ishi Yukihiro) (30812284)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	
研究分担者	小林 浩之 (Kobayashi Hiroyuki) (70374478)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	山口 秀 (Yamaguchi Shigeru) (70399939)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	

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
---------	---------