

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：84414

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15534

研究課題名(和文)成人低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異とグリオーマ幹細胞発生の関連性検証

研究課題名(英文)Examination of association between glioma stem cell generation and driver gene mutations identified in lower grade gliomas

研究代表者

金村 米博(KANEMURA, Yonehiro)

独立行政法人国立病院機構大阪医療センター(臨床研究センター)・先進医療研究開発部 再生医療研究室・室長

研究者番号：80344175

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文):低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子をTet-onシステムを用いてヒトiPS細胞に導入し、BRAF-V600E変異導入ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の樹立に成功した。BRAF-V600E変異はヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の増殖能を亢進させる作用を有し、それにはMAPK、PI3K、RAS pathway関連遺伝子発現が関与することが示唆された。ヒトiPS細胞およびヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を応用した低悪性度グリオーマ関連ドライバー遺伝子変異の機能解析を行った報告は殆ど無く、当該領域における新規性のある萌芽的研究成果が得られたと結論づけられた。

研究成果の概要(英文):We introduced driver gene mutations identified in lower grade gliomas (LGG) into human iPS cells using Tet-on system, and established human iPS cells derived neural progenitor cells (hiPSC-NPC) with BRAF-V600E mutation. BRAF-V600E mutation promoted cellular proliferative ability of hiPSC-NPC, and up-regulation of MAPK/PI3K/RAS pathway associated genes were involved with this gene effect. There are very few reports to do functional analysis of LGG associated driver gene mutations using hiPSC and hiPSC-NPC. It is concluded we achieved to obtain a novel and exploratory findings in the related scientific filed.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：低悪性度グリオーマ iPS細胞 神経前駆細胞 Tet-onシステム ドライバー遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

欧米を中心に近年大規模に実施された分子遺伝学的研究の結果、成人低悪性度グリオーマ (lower grade glioma: 以下 LGG) の発生に關与するドライバー遺伝子変異が同定され (Kannan K, *Oncotarget* 3:1194, 2012; Jiao Y, *Oncotarget* 3: 709, 2012; Liu XY, *Acta Neuropathol* 124: 615, 2012)、CpG island methylator phenotype(CIMP)形成を含む DNA メチル化パターン変化、クロマチンリモデリング障害等、細胞のエピゲノム状態変化を引き起こし LGG の発生につながるメカニズムが提唱されている (Turcan S, *Nature* ;483:479, 2012)。一方、グリオーマ発生において、正常神経幹細胞と類似特性を有するグリオーマ幹細胞の重要な役割が明らかになりつつあるが、その in vivo における発生母地細胞は未だ多くの議論があり、結論は出ていない。

研究代表者は、ヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞 (Kanemura Y, *J Neurosci Res* 69, 869, 2002)、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞 (Shofuda T, *Neuroreport* 24: 84, 2013) を各々樹立し、これら細胞の分子遺伝学的特性解析に關する数多くの先行研究を実施すると同時に、病理組織学的解析手法を用いたグリオーマ細胞と神経幹/前駆細胞との關連性解析研究 (Kanemura Y, *Differentiation* 68, 141, 2001; Nakamura Y, *Mod Pathol* 19, 974, 2006; Nakano A, *Pediatr Neurosurg* 43, 279, 2007) に加え、グリオーマ遺伝子解析 (Okita Y, *Clin Neurol Neurosurg* 125: 212, 2014, Izumoto S, *J Neurooncol* 53: 21, 2001) ヒトグリオーマ幹細胞樹立 (Bamba Y, *Biochem Biophys Res Commun.* 447: 683, 2014) 等のグリオーマ關連研究実績を有し、グリオーマの分子病態解析と分子遺伝学的解析に通じ、同時にモデル培養細胞樹立能力を有する。これら両研究を融合し、成人 LGG 発生に關与するドライバー遺伝子変異とグリオーマ幹細胞発生との關連性を検証する本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、成人 LGG 発生に關与するドライバー遺伝子変異が、正常ヒト神経幹/前駆細胞からの発癌とグリオーマ幹細胞発生に關与し得るかを検証し、成人 LGG の発生プロセスの全容解明と、in vivo における LGG 発生母地細胞同定に貢獻し得る新知見の発見を目指す。

3. 研究の方法

(1) 正常ヒト神経幹/前駆細胞への LGG 關連ドライバー遺伝子変異の導入

プラスミドベクターを用いたリプログラミング法で作製され、ゲノム DNA 上にリプログラミング用遺伝子が残留していない 2 種類のヒト iPS 細胞、(409B2 株; SNL フィーダー細胞上で培養、1210B2 株; 無フィーダー培養) に対して、TET3G vector (Clontech 社) を用いて Tet-On 3G transactivator protein

(Tet3G) 発現 vector を導入した。次に IDH1-R132H 変異、BRAF-KIAA1549 融合遺伝子、H3F3A-K27M 変異、BRAF-V600E 変異の 4 種類のドライバー遺伝子変異を gene of interest(GOI) としてクローニングし、pTRE3G-BI-ZsGreen ベクターへの組み込みを試みた。これら LGG 關連ドライバー遺伝子変異が組み込まれた pTRE3G-BI-ZsGreen ベクターの Tet3G 導入済ヒト iPS 細胞への導入を試み、LGG 關連ドライバー遺伝子変異が導入されたヒト iPS 細胞樹立を実施した。さらに LGG 關連ドライバー遺伝子変異が導入されたヒト iPS 細胞を、dual SMAD 阻害剤を用いた神経分化誘導とその後の neurosphere 法を用いた拡大培養法を用いて神経前駆細胞へ分化誘導させた。

(2) LGG 關連ドライバー遺伝子変異導入細胞の細胞特性解析

ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞に導入された LGG 關連ドライバー遺伝子変異を Doxycycline (DOX) 添加にて誘導して、細胞増殖能に及ぼす影響を生細胞 ATP 測定法を用いて検討した。また、DOX にて誘導された LGG 關連ドライバー遺伝子変異が、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の遺伝子発現に及ぼす影響を、nCounter Pan-Cancer Pathways Panel を用いて解析した。

(3) ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞とヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞の DNA メチル化状態の比較

LGG 關連ドライバー遺伝子変異の導入段階のヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞と、ヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞ならびに患者腫瘍組織から樹立されたグリオーマ幹細胞の各々から DNA を分離し、マイクロアレイ (illumina 社製) を用いて DNA メチル化データを取得し、比較検討を行った。

(4) グリオーマ幹細胞としての in vivo 細胞特性評価系の構築

樹立済グリオーマ幹細胞を用いて、免疫不全マウス (NOG マウス) の線条体への定位的細胞移植手法と必要移植細胞数の検討を実施した。また、マウス脳組織内で移植されたヒト細胞を同定するため、ヒト細胞を選択的に認識する抗体 (STEM121 抗体、抗ヒト核抗体) を用いた免疫組織学的手法の有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) 正常ヒト神経前駆細胞への LGG 關連ドライバー遺伝子変異の導入

外来遺伝子の誘導が任意のタイミングで可能となるシステムとして、Tet-on システムを用いたヒト iPS 細胞株への LGG 關連ドライバー遺伝子変異導入を試みた。代表的な 4 種類の LGG 關連ドライバー遺伝子変異の pTRE3G-BI-ZsGreen ベクターへの導入を試み、

3 種類の遺伝子 (IDH1-R132H 変異、H3F3A-K27M 変異、BRAF-V600E 変異) のベクター作製に成功した。これら 3 遺伝子の Tet3G 導入済ヒト iPS 細胞への導入を試み、BRAF-V600E 変異が導入されたヒト iPS 細胞 (1210B2 株) の樹立に成功し、DOX 誘導で 99% 以上の細胞で BRAF-V600E 変異を発現することが確認された。この BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞の神経分化誘導を行い、BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の作製に成功した。

ヒト iPS 細胞に LGG 関連ドライバー遺伝子変異を導入した報告、およびそこからヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の作製に成功した報告は未だ殆ど無く、当該領域における各種実験に応用可能な新たな研究リソースの樹立に成功した萌芽的な成果が得られたと考える。

(2) LGG 関連ドライバー遺伝子変異導入細胞の細胞特性解析

LGG 関連ドライバー遺伝子変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞として BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を用いて、DOX 添加にて BRAF-V600E 変異を発現させて細胞増殖能および遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。細胞増殖能に関して、初回 DOX 添加時には細胞増殖は DOX 濃度が上昇するにつれて有意に抑制される傾向が認められたが、3 継代後の細胞では逆に DOX 濃度の上昇に伴い細胞増殖は亢進することが明らかになり、その後 6 継代後の時点では DOX による BRAF-V600E 変異誘導にてヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の増殖は約 5 倍増加することが明らかになった。遺伝子発現に及ぼす影響としては、BRAF-V600E 変異誘導ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞においては、2-3 倍の BRAF 発現の上昇が認められ、MAPK, PI3K, RAS pathway 関連の遺伝子発現の上昇が確認された。

BRAF-V600E が培養細胞増殖に及ぼす影響は細胞腫と誘導時期によってその種々の報告がなされているが、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞においては、遺伝子誘導後一定期間経過後は、細胞増殖を亢進させる作用を有することが示唆された。また、これら細胞増殖能の上昇に関連すると推察される遺伝子 pathway に関する重要な知見が得られた。正常神経発生段階の初期に出現する神経前駆細胞において、BRAF-V600E 変異の細胞増殖に及ぼす作用を評価した報告は未だ殆どなく、BRAF-V600E 変異の発がん作用を評価する上で、有用な情報を提供する成果が得られたと考える。

(3) ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞とヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞の DNA メチル化状態の比較

正常状態のヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞とヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞の DNA

メチル化状態をグリオーマ幹細胞と比較し、各々の細胞特性を評価し、エピジェネティクスの観点からグリオーマ発生に関わる遺伝子群を解析した。DNA メチル化状態は 3 種類の細胞で大きな差異があり、グリア系細胞のマーカーの一つである GFAP に関しては、そのプロモータ領域のメチル化状態に 3 種類の細胞で差異が見られることが明らかになった。DNA メチル化状態は、グリオーマ幹細胞と正常細胞とで差異が認められることに加えて、ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞とヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞にも大きな差異が認められることが明らかになった。

今後、LGG 関連ドライバー遺伝子変異の発現メカニズムを評価する上で、これらヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞とヒト神経組織由来神経幹/前駆細胞の間に見られる DNA メチル化状態の差異が及ぼす影響を評価することは重要であると考えられ、BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の機能解析を更に進める上で、有用な情報取得に成功したと考える。

(4) グリオーマ幹細胞としての in vivo 細胞特性評価系の構築

LGG 関連ドライバー遺伝子変異導入されたヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の in vivo における機能評価系として、免疫不全マウス (NOG マウス) への細胞移植法の諸条件の検討を LGG 関連ドライバー遺伝子変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞作製と並行して実施した。グリオーマ幹細胞をモデル細胞として使用した検討において、線条体への細胞移植手技を定め、移植に必要な細胞数、移植後腫瘍形成まで必要な日数に関する情報を取得した。同時に、STEM121 抗体、抗ヒト核抗体を用いて、マウス脳組織内で移植されたヒト細胞を特異的に同定し、細胞分布、遊走能を評価することが可能であることを確認した。

当初計画では、本項で確立した実験系を用いて、BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の in vivo における細胞特性を評価し、その腫瘍形成能を明らかにする予定であったが、BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の作製が最終年度までずれ込んだ関係で、この部分に関しては十分な成果を得ることが達成されなかった。

(5) 総括

当初目的であった LGG 関連ドライバー遺伝子変異 (BRAF-V600E) を導入したヒト iPS 細胞と、それに由来する BRAF-V600E 変異導入ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞の樹立に成功した。BRAF-V600E 変異は hiPSC-NPC の増殖能を亢進させる作用を有し、MAPK, PI3K, RAS pathway 関連遺伝子発現が関与することが示唆された。ヒト iPS 細胞およびヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を応用した LGG 関連ドライバー遺伝子変異の機能解析を行った

報告は未だ殆ど無く、当該領域における萌芽的研究成果を得ることができたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Kijima N, Kanemura Y: Mouse Models of Glioblastoma. Glioblastoma [Internet] (Edited by De Vleeschouwer S), 査読無, Chapter 7:131-139, Codon Publications, Brisbane, AU, 2017
DOI:10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch7

Tsuyuguchi N, Terakawa Y, Uda T, Nakajo K, Kanemura Y: Diagnosis of Brain Tumors Using Amino Acid Transport PET Imaging with 18F-fluciclovine: A Comparative Study with L-methyl-11C-methionine PET Imaging. Asia Ocean J Nucl Med Biol, 査読有, 5(2):85-94, 2017
DOI:10.22038/aojmb.2017.8843.

Ishibashi K, Inoue T, Fukushima H, Watanabe Y, Iwai Y, Sakamoto H, Yamasaki K, Hara J, Shofuda T, Kanematsu D, Yoshioka E, Kanemura Y: Pediatric thalamic glioma with H3F3A K27M mutation, which was detected before and after malignant transformation: a case report. Childs Nerv Syst, 査読有, 32(12): 2433-2438, 2016
DOI:10.1007/s00381-016-3161-8

Kinoshita M, Sakai M, Arita H, Shofuda T, Chiba Y, Kagawa N, Watanabe Y, Hashimoto N, Fujimoto Y, Yoshimine T, Nakanishi K, Kanemura Y: Introduction of High Throughput Magnetic Resonance T2-Weighted Image Texture Analysis for WHO Grade 2 and 3 Gliomas. PLoS One, 査読有, 11(10): e0164268, 13pages, 2016
DOI:10.1371/journal.pone.0164268

金村米博: 脳腫瘍の分子生物学: 概論. 脳腫瘍学 - 基礎研究と臨床研究の進歩 - 日本臨牀 74 巻 増刊号 7, 査読無, P.103-111、日本臨牀社、大阪、2016

Arita H, Yamasaki K, Matsushita Y, Nakamura T, Shimokawa A, Takami H, Tanaka S, Mukasa A, Shirahata M, Shimizu S, Suzuki K, Saito K, Kobayashi K, Higuchi F, Uzuka T, Otani R, Tamura K, Sumita K, Ohno M, Miyakita Y, Kagawa N, Hashimoto N, Hatae R, Yoshimoto K, Shinojima N, Nakamura H,

Kanemura Y, Okita Y, Kinoshita M, Ishibashi K, Shofuda T, Kodama Y, Mori K, Tomogane Y, Fukai J, Fujita K, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Moriuchi S, Nonaka M, Suzuki H, Shibuya M, Maehara T, Saito N, Nagane M, Kawahara N, Ueki K, Yoshimine T, Miyaoka E, Nishikawa R, Komori T, Narita Y, Ichimura K: A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. Acta Neuropathol Commun, 査読有, 4(1): 79, 14pages, 2016
DOI:10.1186/s40478-016-0351-2

金村米博: 家族性腫瘍 (遺伝性腫瘍症候群) 第 4 版 EBM に基づく脳神経疾患の基本治療指針 (田村 晃, 松谷雅生, 清水輝夫, 辻 貞俊, 塩川芳昭, 成田善孝 編集), 査読無, P.197-209, メジカルビュー社, 東京, 2016

Okita Y, Nonaka M, Umehara T, Kanemura Y, Kodama Y, Mano M, Nakajima S. Efficacy of temozolomide and bevacizumab for leptomeningeal dissemination of recurrent glioblastoma. Oncol Lett, 査読有, 9(4):1885-1888, 2015
DOI:10.3892/ol.2015.2940

〔学会発表〕(計 8 件)

Kijima N, Kanematsu D, Shofuda T, Yoshioka E, Handa Y, Moriuchi S, Nonaka M, Okita Y, Tsuyuguchi N, Fukai J, Higuchi Y, Suemizu H, Kanemura Y: Characterization of patient-derived tumor spheres and xenografts for glioblastoma. 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, San Francisco, California, USA, 2017 年 11 月 18 日

Kinoshita M, Arita H, Takahashi M, Narita Y, Terakawa Y, Tsuyuguchi N, Okita Y, Nonaka M, Moriuchi S, Fukai J, Izumoto S, Ishibashi K, Kodama Y, Mori K, Ichimura K, Kanemura Y: Radionomic analysis of WHO grade 2 and 3 gliomas with genetic subgroup prediction. 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, San Francisco, California, USA, 2017 年 11 月 17 日

金村米博: グリオーマにおける化学療法感受性の遺伝子指標の探索とそれに基づ

づくテラーメイド治療法の開発 . 探索
医療薬物研究会第5回合同シンポジウム
『がんと創薬 - 基礎研究と臨床応用の
接点』, 大阪市, 2017年10月28日

金村米博, 正札智子, 埜中正博, 沖田
典子, 宇田武弘, 露口尚弘, 石橋謙一,
有田英之, 香川尚己, 橋本直哉, 木下
学, 深井順也, 西田南海子, 友金祐介,
森 鑑二, 関西中枢神経腫瘍 分子診断
ネットワーク: 小児脳腫瘍のクリニカル
シークエンス . 一般社団法人日本脳神経
外科学会第 76 回学術総会, 名古屋市
2017年10月13日

金村米博: 脳腫瘍の分子遺伝学 . 第 76
回日本病理学会近畿支部学術集会, 高槻
市, 2017年2月4日

Kinoshita M, Arita H, Yoshimine T,
Takahashi M, Narita Y, Terakawa Y,
Tsuyuguchi N, Okita Y, Nonaka M,
Moriuchi S, Fukai J, Izumoto S,
Ishibashi K, Nakajima Y, Takagaki M,
Shofuda T, Kodama Y, Mori K, Ichimura
K, Kanemura Y: IMPACT OF GENETIC
ALTERATIONS ON TUMOR LOCATIONS AND
LESION HETEROGENEITY FOR WHO GRADE 2
AND 3 GLIOMAS: A VOXEL-BASED LESION
MAPPING AND IMAGE TEXTURE ANALYSIS OF
201 GLIOMAS. 21st Annual Scientific
Meeting and Education Day of the
Society for Neuro-Oncology,
Scottsdale, Arizona, USA, 2016年11
月19日

Mori K, Shofuda T, Okita Y, Arita H,
Kinoshita M, Terakawa Y, Tsuyuguchi N,
Tomogane Y, Fukai J, Ishibashi K,
Nishida N, Taki T, Nonaka M, Izumoto
S, Moriuchi S, Nakajima Y, Hashimoto
N, Kodama Y, Kanemura Y: ACTIVITY
REPORT OF A REGIONAL MOLECULAR
DIAGNOSTIC NETWORK FOR CENTRAL
NERVOUS SYSTEM (CNS) TUMORS IN JAPAN.
21st Annual Scientific Meeting and
Education Day of the Society for
Neuro-Oncology, Scottsdale, Arizona,
USA, 2016年11月18日

金村米博: 小児脳腫瘍の遺伝子解析 . 第
20 回脳腫瘍レビュー, 東京都港区, 2015
年6月6日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金村 米博 (KANEMURA, Yonehiro)
独立行政法人国立病院機構大阪医療セン
ター(臨床研究センター)・先進医療研究
開発部 再生医療研究室・室長
研究者番号: 80344175

(2) 研究分担者

正札 智子 (SHOFUDA, Tomoko)
独立行政法人国立病院機構大阪医療セン
ター(臨床研究センター)・先進医療研究
開発部 幹細胞医療研究室・室長
研究者番号: 40450895