

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21111

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いたヒト遺伝性腫瘍疾患モデルの構築

研究課題名(英文) Novel disease model of human inherited cancer syndromes using patient-derived iPS cells

研究代表者

室伏 善照 (Murofushi, Yoshiteru)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：50448578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、様々な腫瘍を発症・併発する遺伝性腫瘍症候群であるvon Hippel-Lindau (VHL)病患者由来の疾患特異的iPS細胞を用い、ヒトVHL病疾患モデルの構築とVHL病の発症・進展の機序の解明を目的とした。NOD/SCIDマウスを用いたVHL病腫瘍の再現性のin vivo評価系とヒト細胞株のないVHL病腫瘍の発生源細胞への新規in vitro iPS細胞分化誘導実験系の確立・分化誘導を促進し得る候補分子の絞り込みに至る結果が得られた。以上のことから、本研究の基盤となるin vivo及びin vitro実験系の確立に至り、VHL病の発症・進展の機序の解明に近づく成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Von Hippel-Lindau (VHL) disease is inherited cancer syndrome, which develop several types of cancers and/or is complicated by them. The aim of this project is to establish novel disease model of human VHL disease, and to elucidate the mechanism of the onset and/or the development of VHL disease using patient-derived iPS cells. We developed the in vivo evaluation system to recapitulate VHL-associated cancers using NOD/SCID mice and new in vitro experimental method of the differentiation from iPS cells to the origins of VHL-associated cancers that there are no human cell lines. In addition, we selected some candidate target genes as useful for facilitating the differentiation to the origins of VHL-associated cancers. These results suggested that in vivo and in vitro experimental methods as a basis for this project were established and we progressed forward the elucidation of the mechanism of the onset and/or the development of VHL disease.

研究分野：分子腫瘍学、分子標的治療学

キーワード：腫瘍学 遺伝性疾患 がん抑制遺伝子 VHL 褐色細胞腫

1. 研究開始当初の背景

Von Hippel-Lindau (VHL) 病は、VHL 癌抑制遺伝子の germline mutation (mut) を原因とする常染色体優性遺伝性の家族性腫瘍症候群である。VHL 病は、腎細胞癌 (RCC)、褐色細胞腫 (Pheo)、血管芽腫、膵内分泌腫瘍など様々な腫瘍を発症・併発する。VHL 病の発症率は 36,000 に 1 人とされ、浸透率は 100% に近く、約 40% に併発する RCC が主な死因とされている (Maher E, et al., *Eur J Hum Genet.* 2011)。遺伝性 VHL 病は若年性に発症し、高リスクの場合 QOL の低下が問題となる他、再発や転移など悪性化した場合の根治療法が確立されていない。一方、i) *Vhl* knockout (KO) マウスによりヒト VHL 病の表現型が再現されない、ii) Pheo や血管芽腫などのヒト腫瘍由来細胞株は樹立されていないなど、最適な *in vivo* 及び *in vitro* のヒト VHL 病疾患モデルがないため、VHL 病の発症・進展のメカニズムは未だ不明な点が多い。

RCC は、全腎悪性腫瘍の約 85% を占め、罹患者数・癌死者数は増加傾向にある。約 20% に術後再発を認め、罹患者の約 1/3 が死亡に至る予後不良の疾患である。RCC による癌死者数は、本邦では 2012 年に 8,334 人 (がんの統計'13, がん研究振興財団)、全世界では 2006 年に 102,000 人になる (Rini BI, et al., *Lancet.* 2009)。VHL タンパク機能として Hypoxia-inducible factor (HIF) の制御が知られており、当研究グループを含めて HIF の制御が VHL 変異 RCC の発生に必須であると示された (Kondo K, et al., *Cancer Cell.* 2002; Maranchie J, et al., *Cancer Cell.* 2002)。この知見は、進行症例に対する抗 VEGF 療法の発展に繋がったが、殆どの症例が治療抵抗性を獲得するため、根治療法が未だにないのが現状であり、新規治療薬の開発が急務である。

Pheo は、VHL 病腫瘍の 1 つであり、交感神経系へ進展する神経堤細胞 (NCC) に由来する副腎髄質や傍神経節の Chromaffin 細胞 (CC) を発生源として発症する難治性腫瘍である。Pheo を分類指標として、VHL 病は I 型 (Pheo を伴わない) と II 型 (Pheo を併発) に大別される。遺伝性 VHL 病の約 20% を占める II 型患者の初診年齢は 20 代と若く、約

10% が悪性腫瘍である (Decker J, et al., *Eur J Hum Genet.* 2013)。本邦では 2009 年の推計患者数が約 3,000 人に達し、増加傾向にある (厚生労働省研究班調査)。悪性腫瘍は悪性高血圧を誘発し、不整脈及び心筋梗塞、さらに死に至ることもある。これまでに遺伝性 Pheo に関与する変異遺伝子が VHL 遺伝子を含め複数報告されている (Gimenez-Roqueplo AP and Tischler AS., *Endocr Pathol.* 2012)。この他に、当研究グループにおいては Pheo 発症のバイオマーカーを示してきた (Lee S, et al., *Cancer Cell.* 2005)。これらの知見は、遺伝子検査のリスク評価の向上に繋がったが、初回検査での悪性診断は未だ困難であり、また根治療法もないため、早期診断法と有効な治療法の開発が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、VHL 病の発症・進展のメカニズムの解明を目指し、VHL 病患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を用いて、以下の点を目的とする。

- i) <VHL 病疾患モデルの構築> 樹立した VHL 病患者 (*VHL mut*+) 由来の疾患特異的 iPS (*VHL iPS*) 細胞株を用いて、任意に *VHL mut*+ を *VHL mut*- に制御可能な iPS 細胞を新たに作製する。得られた細胞を用いて、Knudson の Two-hit theory による RCC や Pheo などの VHL 病腫瘍の発生を再現可能な *in vivo* 及び *in vitro* の VHL 病疾患モデルを作製し、有用性を評価・検討する。
- ii) <新規ヒト VHL 病腫瘍細胞株の樹立> *VHL mut*+ iPS 樹立細胞を用いて、分化誘導法などを駆使し、ヒト腫瘍由来細胞株が樹立されていない Pheo を *in vitro* で再現し、新規 Pheo 細胞株の樹立を目指す。目的細胞株が得られれば、Pheo の発生に関わる遺伝子あるいは下流標的遺伝子の探索・同定が可能となり、創薬を目指した治療標的分子の同定につながる。

3. 研究の方法

- 1) <VHL 遺伝子の Two-hit theory を任意に再現可能な *VHL mut*- を誘発するシステムの

構築> *VHL* mut/+ iPS 樹立細胞はすでに 1st hit に当たる遺伝的異常 (mut) を保有しているため、残る allele の wt-*VHL* 遺伝子に異常 (2nd hit) が生じると癌が発生すると予想される。任意に 2nd hit を誘発できる *VHL* mut/+ iPS 樹立細胞にするため、人工 nuclease によるゲノム編集技術を用い、*VHL* mut/+ iPS 細胞の wt-*VHL* の allele に Tet-On 発現 wt-*VHL* (Tet-On-wt-*VHL*) を組み込む。得られた *VHL* mut/Tet-On-wt-*VHL* iPS 細胞は、Tet (-) 環境下で 2nd hit を任意に誘発することが可能となる。

2) <VHL 病疾患モデルの構築> 得られた *VHL* mut/Tet-On-wt-*VHL* iPS 細胞を用いて、*in vivo* 及び *in vitro* の VHL 病疾患モデルの構築を進める。Tet (-) 環境下における *in vivo* Xenograft モデル/*in vitro* 分化誘導細胞からの VHL 病腫瘍の形成/VHL 病腫瘍様細胞の発生の再現性を評価・検討する。*VHL* mut/+ iPS 細胞の樹立にあたり Fibroblast を提供頂いた VHL 病患者のヒト腫瘍組織検体・データが保管されているので、実臨床の組織標本と比較した VHL 病腫瘍の再現性を評価・検討が可能である。

4. 研究成果

1. *VHL* mut/+ iPS 樹立細胞の評価：正常核型・iPS 化に用いた episomal vector のゲノム挿入がない・多分化能の指標である「三胚葉分化」の3点について最終的に確認された2つのクローンを樹立した。また、シークエンス解析及び制限酵素解析により、正常コントロール iPS (201B7 iPS) 細胞と比較した結果、樹立細胞において片側 allele の *VHL* 遺伝子に VHL 病II型特有の一塩基置換変異が確認された。このことから、VHL 病疾患特異的な遺伝子変異を保有した iPS 細胞 (*VHL* mut/+ iPS 細胞) の樹立に成功したことが示された。さらに、*VHL* mut/+ iPS 樹立細胞を NOD/SCID マウスに移植した結果、今回の実験条件下においては VHL 病腫瘍の発生は確認できず、当初予想した通り、片側 allele のみの *VHL* 遺伝子変異 (*VHL* mut/+) では VHL 病腫瘍の発生には不十分であることが示唆された。

2. *in vitro* 分化誘導法の確立 (*in vitro* 疾患モデルの構築)：VHL 病腫瘍である Pheo についてはヒト腫瘍由来細胞株が樹立されておらず、また *VHL* mut/+ iPS 樹立細胞は Pheo を併発する VHL 病II型特有の遺伝子変異を有することから、新規 Pheo 細胞株の樹立を目指し、Pheo の発生母地細胞である Chromaffin 細胞 (CC) 様カテコールアミン産生神経系細胞への iPS 細胞からの新規 *in vitro* 分化誘導法を確立し、その有用性を検証した。コントロール 201B7 iPS 細胞を用いて、新規分化誘導法の先行実験を行った結果、分化誘導細胞群において CC の発生母地である神経堤細胞 (NCC) の分化マーカー遺伝子の mRNA 発現及びカテコールアミン産生細胞の分化マーカー遺伝子のタンパク発現が認められ、分化誘導が確認された。また、分化誘導細胞培養の上清中に10倍高い濃度のドーパミン産生も検出された。さらに詳細な評価・検討の結果、分化誘導細胞群において CC の分化マーカー遺伝子の mRNA 発現が確認され、新規 *in vitro* 分化誘導法の有用性が示唆された (Fig. 1)。

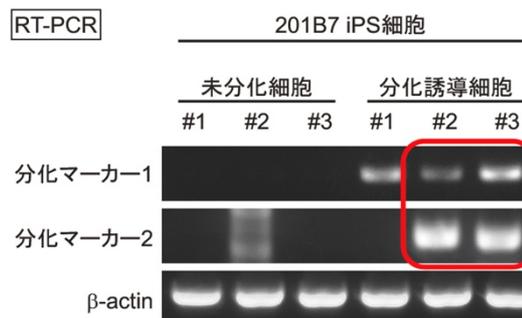


Fig. 1

3. 新規ヒト VHL 病腫瘍細胞 (新規 Pheo 細胞株) の樹立：新規 *in vitro* 分化誘導法を用いて得られた分化誘導細胞群は、培養条件ならびに分化マーカー遺伝子の発現パターンの結果から様々な細胞が混在している可能性が示唆された。新規 Pheo 細胞株の樹立に向けて、分化マーカー遺伝子を指標にした、Pheo の発生母地細胞である CC の単離・培養法の確立が新たな課題として考えられた。検討課題としては、1) CC への分化誘導率の向上、2) CC の単離の際の指標分化マーカー遺伝子の選択、3) CC 培養法の確立の3点を挙げた。課題1)と3)については、さらなる詳細な評

価・検討が必要であるが、課題の克服に至る結果が、新規*in vitro*分化誘導法の有用性の検討から得られている。また、課題2)については、複数の指標分化マーカー遺伝子の候補を検討中である。

4. *in vivo*疾患モデルの構築：新規*in vitro*分化誘導法の評価も兼ねて、201B7 iPS細胞を用いて、未分化細胞ならびに新規*in vitro*分化誘導法を用いて得られた分化誘導細胞群をNOD/SCIDマウスに移植し、得られた腫瘍様組織について、組織染色、免疫蛍光染色およびmRNA発現解析を行った。組織染色の結果、未分化細胞由来の組織と比較して分化誘導細胞群由来組織にて神経様細胞が多い傾向がみとめられた。また、分化誘導細胞群由来組織において、免疫蛍光染色の結果から一部の細胞でカテコールアミン産生細胞の分化マーカー (TH) と神経マーカー (HNK1) の共局在が示され、加えて、mRNA発現解析の結果からCCの分化マーカー遺伝子発現が確認された (Fig. 2)。これらの結果から、新規*in vitro*分化誘導法の有用性と*in vivo*疾患モデルの構築の可能性が示唆された。

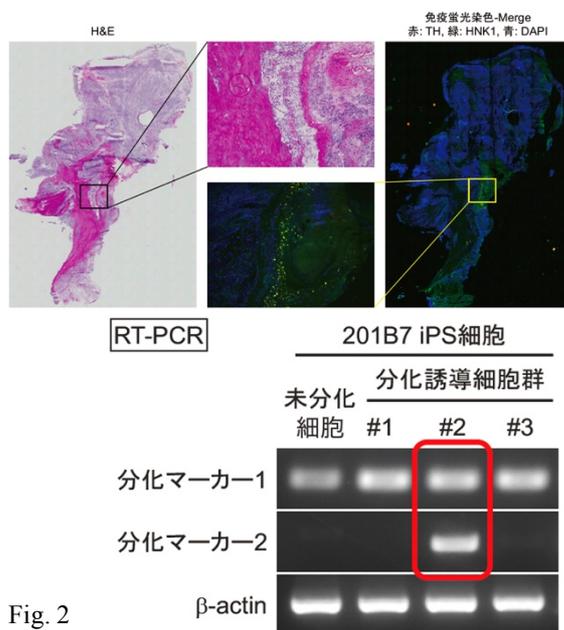


Fig. 2

5. *VHL* *mut*⁻ iPS細胞の作製：任意に*VHL* *mut*⁻の誘発を可能とする*VHL* iPS細胞の作製は本研究の最重要事項であり、ゲノム編集効率の改善・向上に向けて、様々な遺伝子導入法や複数のゲノム編集技術に用いる人

g nucleaseの検討を行ったが、残念ながら本研究計画内に目的細胞の作製には至らなかった。

以上のことから、任意に*VHL* *mut*⁻の誘発を可能とする*VHL* iPS細胞の作製には至っていないため最終的な評価・検討は必要であるが、本研究の基盤となる*in vivo*実験系ならびに*in vitro*分化誘導実験系については概ね確立に至る成果が得られた。また、分化誘導を促進し得る候補分子の選択に加え、新規Pheo細胞株の樹立に向けた発生母地細胞の単離・培養法の確立を期待できる成果も得られつつある。このことから、目的細胞が獲得できた際には、本研究成果よりヒト*VHL*病疾患モデルの構築が期待できる。今後は、本研究の最重要課題であった目的細胞の作製を行うとともに、*in vitro*分化誘導実験系の分化誘導効率の向上に向けた検討を行うことが重要である。

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1件)

1. 室伏善照, 木我敬太, 杉山愛子, 日高裕輔, 宮脇良文, 中村英二郎. iPS細胞による癌研究 - 遺伝性腫瘍疾患のモデル化と創薬研究 -. 実験医学, 34, 546-550, 2016

[学会発表] (計2件)

1. 室伏善照. 患者由来 iPS 細胞を用いた遺伝性腫瘍症候群 *VHL* 病の新規病態モデルの創成. 再生医療実用化研究事業 [難治性疾患創薬シーズの探索と薬剤安全性評価法開発]・[外来因子フリー難病由来 iPS 細胞のライブラリー構築とそれを使った疾患モデルと薬剤開発]・再生医療実現拠点ネットワークプログラム [疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究] 合同シンポジウム 科学者達による挑戦 iPS 細胞を用いた疾患・創薬研究, Dec 14, 2015 (Tokyo)
2. Nakamura E, Murofushi Y, Kiga K, Imamura K, Sugiyama A, Kinoshita K, Osawa M, Niwa A, Saito M, Shibasaki N, Kamba T, Inoue H, Ogawa O. Development of novel therapeutic strategy based on cancer genomics by using patient-derived iPS cells. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, Oct 8-10, 2015 (Yokohama)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

室伏 善照 (MUROFUSHI, YOSHITERU)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：5 0 4 4 8 5 7 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし