

平成 31 年 5 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19583

研究課題名(和文) Rb1 遺伝子欠失ヒトiPSの網膜分化系を用いた網膜芽細胞腫発症機構の解析の試み

研究課題名(英文) Analysis of retinoblastoma using human iPS cells

研究代表者

渡邊 すみ子 (Watanabe, Sumiko)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60240735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：網膜芽細胞腫は、RB1遺伝子が原因遺伝子であるが、RB1遺伝子の変異が他のがんより網膜芽細胞腫に指向性が高いことについての分子基盤は不明である。その理由はマウスではRB1遺伝子変異により代償的な遺伝子発現があり、モデル化が困難であることがある。本研究では、human iPSから網膜分化誘導系を利用し、この課題を検討した。ヒトiPSの網膜への分化過程で、網膜分化に伴い、RB1の発現は強く上昇した。RB1遺伝子をCRISPRを用いて欠損させると、未分化なiPSでは、その増殖能は、影響がなかった。網膜の初期分化についてはRB1発現の抑制は影響を与えなかったが、増殖については、継続的に検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網膜芽細胞腫(Retinoblastoma)は、RB1遺伝子が原因遺伝子として知られながら、その発がんメカニズムはマウスの系を用いることができないため、いまだに大きな謎となっていた。今回、human iPSを用いることで、RB1遺伝子の変異がどうして、網膜で特に高い腫瘍誘導性を示す糸口が示され、human iPSの病態解析への利用、創薬研究、RB1研究と言った多方面に重要な知見や技術の提供が期待される。

研究成果の概要(英文)：Retinoblastoma is a retinal cancer of young children that is caused by the mutation of Rb1 gene. Mutation of Rb1 gene is observed many other cancers, but why retina is primary target of the mutation is not well understood. To approach this question, we used human iPS-retinal organoid model. We found the expression level of RB1 is constantly increased when human iPS was cultured to for retinal organoid. RB1 expression was suppressed by CRISPR/Cas9 mediated technology, and proliferation activity of immature RB1-minus human iPS was not affected. Early differentiation stage toward the retina of the RB1-minus human iPS cell was also not affected. We continue to analyze differentiation and proliferation activity of the cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：網膜芽細胞腫 網膜 iPS CRISPR/Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私の研究室は網膜発生と疾患の基礎研究を中心テーマとしており、その過程で網膜亜集団を標識する表面抗原を多数同定した。一方近年は、網膜がんである網膜芽細胞腫について、その分子機構をあきらかにすることを目的とした基礎研究を試みてきた。網膜亜集団を標識する表面抗原の知見と技術を利用して、摘出網膜芽細胞腫臨床検体を用いて、表面抗原で摘出網膜芽細胞腫を分画したのち *in vitro* で expand するために培養条件をさまざまに検討し、その表現型を検討しようとする研究 (がん特 2008-2009)、表面抗原の発現パターンを検討し病理像との対応をつけて病型の分類を試みる研究 (挑戦的萌芽 2013-2014) などを行ってきた。この結果、よりアグレッシブな病理像を示す網膜芽細胞腫は、網膜プロジェニターの初期のマーカーを強く発現しており、一方、よりおだやかとされる病理像を示す検体では、分化網膜細胞に発現している表面抗原が多数発現していることをみいだした。このことは、網膜芽細胞腫のなかに、起源細胞、あるいは他の遺伝子の変異などの関係で異なる病型を示す複数のタイプがあることを示唆していた。しかし、複数の病院との共同研究でおこなったが、症例数が少ないため摘出臨床検体の入手例数が少なく、また培養が極めて困難であり、得られた結果が統計学的に有意であるか検証できないまま研究は中断しており、全く異なるシステムを用いた研究手法による転換の必要性を痛感していた。

2. 研究の目的

網膜のがんとして最も症例数の多い網膜芽細胞腫(Retinoblastoma)は、多くの場合乳児期に発見され、胎児期にすでにがんが発症していると考えられている。網膜芽細胞腫は two hit theory が初めて提唱されたこと、また初めてのがん抑制遺伝子として RB1 遺伝子が原因遺伝子として単離されたことで極めてよく知られたがんである。RB1 遺伝子は、その後、多種類のがんでの変異が報告され、その細胞周期での役割についての詳細なメカニズム研究結果が多数蓄積されている。しかし、RB1 遺伝子の変異は他のがんより網膜芽細胞腫に指向性ははるかに高いこと、すなわち、網膜では RB1 遺伝子の欠損に対し他の組織より高い感受性がある事についての分子基盤は明らかではない。また、数種類の神経細胞やグリア細胞で構成される網膜のどの細胞が網膜芽細胞腫の起源なのか、というがんの本態についても不明であると言わざるをえない。その大きな理由はマウスでは RB1 遺伝子の変異により代償的に p107, p130 などが発現するために、これらの遺伝子との 3 重変異マウスにしないとがんが発生しないことから、マウスのモデルがヒトの網膜芽細胞腫の病態を反映しているか議論があることが一因である。すなわちヒトの系を用いた網膜芽細胞腫の研究が求められていたが、発生期の網膜を基礎研究に供することは困難で、また RB1 遺伝子に変異を入れることなど技術的にも困難があり実現は不可能であった。本研究では、human iPS から網膜分化を誘導する系を利用することにより、RB1 変異により、どのように網膜芽細胞腫が発症し、進展していくのか、またその網膜特異性が説明しうるのかを明らかにすることを目的として、新たな研究系をがん研究に導入する試みである。

3. 研究の方法

human iPS に CRISPR/Cas9 を用いて RB1 のノックアウトを作成し、増殖、腫瘍原性を親株と比較検討し、また腫瘍化に至る網膜細胞系列を同定する。サブタイプがある可能性も考慮し、腫瘍の initiation からの進展を観察する。

CRISPR/Cas9 技術を用いて、両アリアルに nonsense mutation がはいり RB1 の発現のないクローンを作成し、続いて樹立した RB1 欠損株について増殖能を検討する

未分化な iPS として培養している段階、および、網膜分化を誘導し、増殖能の変化を観察する。human iPS からの網膜分化は、*in vivo* 同様の順番で網膜亜集団が逐次的に分化していく、この過程も検討し、分化能への影響も観察する。

増殖の昂進が確認されたならば、その細胞種を種々のマーカーとの二重染色により同定するなどして、この系で形成された腫瘍がヒトの網膜芽細胞腫と同様の性格をもつのか検討を加える。

4. 研究成果

まずヒト網膜の分化過程での RB1 の発現パターンの報告がなかったため、ヒト iPS を網膜オルガノイドに分化させる過程における RB1 遺伝子の発現パターンを RT-qPCR により検討した。RB1 遺伝子は、網膜分化に伴い、発現レベルが強く上昇することを見出した。網膜分化が中盤に入った頃にレベルはプラトーに達しその後維持されていた。次に RB1 遺伝

子を CRISPR を用いて欠損させたヒト iPS 株を作成した。dCAS を用いた系が十分に Rd1 の発現を抑制しなかったため、二つの gRNA を用いて第一エクソンを飛ばして発現を落とす系を構築した。この系による効率について、樹立細胞株を用いて良好であることを確認した。未分化な iPS として RB1 欠損ヒト iPS を培養している段階で、細胞数の増加、EdU 取り込みなどの検討により、親株と増殖能に差があるか検討を行った。増殖能は、RB1 の発現を抑制しても影響を受けなかった。次に、網膜分化させた状態で RB1 の発現を抑制した場合の分化、増殖能への影響の検討を行った。網膜の初期分化について特異的遺伝子発現で検討したが、RB1 発現の抑制は網膜初期文化には影響を与えなかった。増殖については、継続的に分化の時間軸にしたがって検討を行った。

5 . 主な発表論文等

該当なし

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 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 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁) :

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。