

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09097

研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞由来交感神経細胞を用いた神経芽腫発生モデルの作成

研究課題名(英文) Modeling oncogenesis of neuroblastoma using human pluripotent stem cell-derived sympathetic neurons

研究代表者

桐野 浩輔(Kirino, Kosuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00621707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽腫の発生機序については、散見される染色体異常ががんの発生・増殖・維持にどのように関与しているのかが不明である。

既に出来上がったがんの解析からは得られない腫瘍発生に関わるダイナミックな動態を捉えるために、ヒト多能性幹細胞由来交感神経にMYCN遺伝子増幅と1番染色体短腕の部分欠失を導入して、in vitro腫瘍発生モデルの開発を試みた。ヒト多能性幹細胞由来交感神経はMYCNの導入により速やかに細胞死をきたすことがわかった。また、染色体欠失の導入を行うシステム開発としてCRISPR/Cas9による染色体欠失導入システムを構築し、HeLa細胞における1p36領域28Mbpの欠失を導入し得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの小児悪性腫瘍は、遺伝子および染色体に生じた変化が観察されているにもかかわらず、その腫瘍発生メカニズムが十分に解明されていない。腫瘍発生における染色体に生じる変化は極めて重要であり、単一の遺伝子ではない、より広範な領域における染色体変化を人工的に模倣する方法は、がん発生を理解する上で極めて重要であると考えられる。

また、ヒト多能性幹細胞を用いたin vitroにおけるがん発生モデルは、腫瘍発生の各ステップで生じた種々の変化を正確にcaptureすることを可能にすると考えられる。

本研究で用いた種々のシステムは、多くの腫瘍に対して応用可能なプラットフォームとなりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Regarding the pathogenesis of neuroblastoma, it is unclear how the reported chromosomal aberrations are involved in the development, proliferation, and maintenance of the cancer.

To capture the dynamics involved in tumorigenesis that cannot be observed in the analysis of established tumors, we attempted to develop an in vitro tumorigenesis model by introducing MYCN gene amplification and partial deletion of the short arm of chromosome 1 into human pluripotent stem cell-derived sympathetic neurons.

We found that MYCN induces rapid cell death in human pluripotent stem cell-derived sympathetic neurons. We also developed a CRISPR/Cas9-based chromosomal deletion-inducing system, and succeeded in generation of a 28 Mbp deletion in the 1p36 region of HeLa cells.

研究分野：小児外科学

キーワード：神経芽腫 染色体異常 MYCN増幅 ヒト多能性幹細胞 交感神経細胞 小児外科学

1. 研究開始当初の背景

小児難治性固形悪性腫瘍である神経芽腫は交感神経や副腎髄質から発生するが、その発生機序について不明な点が多い。複数の比較的頻度の高い染色体異常が神経芽腫の生物学的特性として指摘されているが、染色体に生じた変化ががんの発生・増殖・維持にどのように関与しているのかについてはあまりよくわかっていない。既に出てきたがんの解析からは得られない、腫瘍発生に関わるダイナミックな動態を捉えるためには、何らかの新しいがん発生モデルの開発が不可欠である。

MYCN 遺伝子の増幅は神経芽腫の予後不良因子として良く知られており、交感神経特異的 *MYCN* トランスジェニックマウスでも神経芽腫様の腫瘍を発生する。しかしこのようなマウス個体の中で生じた腫瘍細胞には既に染色体異常が生じていることが多く、腫瘍細胞の発生のドライバーが何であったのかについて、十分な解析が困難である。

リアルタイムかつダイナミックな解析を可能にするために、私たちは *in vitro* 腫瘍発生モデルを提唱することを考えた。*MYCN* 遺伝子の増幅と同時に散見される 1 番染色体短腕の部分欠失 (特に 1p36 領域) をモデルケースとし、研究代表者がかつて発表したヒト多能性幹細胞由来交感神経細胞株 (文献 1) に人工的な遺伝子操作を加えることで、新しい腫瘍発生モデルを見出しえたと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍モデルの樹立、1p36 領域に存在する腫瘍関連遺伝子の同定、および神経芽腫発生メカニズムの解明である。

3. 研究の方法

- 1) ヒト多能性幹細胞から交感神経細胞およびその前駆細胞への分化
ヒト多能性幹細胞から交感神経およびその前駆細胞へは、研究代表者の考案した文化ブプロトコル (文献 1) を使用した。
- 2) アデノ随伴ウイルス (AAV1) ベクターを用いた、染色体部分欠失導入用 CRSPR/Cas9 dual-sgRNA ベクターの構築
構築済みの sgRNA 発現用レンチウイルスベクターをもとに遺伝子組み換えを行い、1p36 領域の複数のターゲットに対する sgRNA の鋳型 DNA 配列を人工 DNA 配列として準備し、これらをランダムに組み入れることで、dual-sgRNA ベクターライブラリーを構築した。
- 3) ヒト細胞における 1p36 領域の Mbp 規模の染色体部分欠失の導入
AAV1 dual-sgRNA ベクターによる、1p36 領域 28Mbp の欠失は、以下のように行った。まず、HeLa 細胞を適切な細胞密度で播種し、24 時間後に AAV1 ウイルスを種々のウイルス力価で感染させた。感染後 48 時間後に HeLa 細胞よりゲノム DNA を抽出し、欠失領域をまたぐ PCR を行うことで同領域の欠失の検出を行った。
ヒト多能性幹細胞およびヒト多能性幹細胞より分化誘導された交感神経細胞や前駆細胞においては AAV1 ウイルスの導入は浮遊培養において行い、種々のウイルス力価を用いて AAV1 ウイルスを導入して遺伝子導入効率を確認するとともに、HeLa と同様の方法により PCR を行った。
- 4) ヒト多能性幹細胞由来交感神経前駆細胞における *MYCN* 強制発現による発現型の観察
ヒト多能性幹細胞由来交感神経前駆細胞に、テトラサイクリン誘導強制発現系を用いて *MYCN* の強制発現を行い、観察した。

4. 研究成果

- 1) ヒト多能性幹細胞から交感神経細胞およびその前駆細胞への分化
ヒト多能性幹細胞から交感神経細胞およびその前駆細胞への分化誘導法を再現した。この誘導方法は自らが他研究機関 (京都大学 iPS 細胞研究所) において開発したものである。現在の研究室においても、同じ方法によってヒト多能性幹細胞の維持および分化誘導が再現可能であることを確認した。
- 2) アデノ随伴ウイルス (AAV1) ベクターを用いた、染色体部分欠失導入用 CRSPR/Cas9 dual-sgRNA ベクターの構築
- 3) ヒト細胞における 1p36 領域染色体部分欠失の導入
血清型 1 のアデノ随伴ウイルス (AAV1) ベクターを用いて、CRSPR/Cas9 の sgRNA を 2 つ同時に発現する dual-sgRNA ベクターを構築した。CRSPR/Cas9 によるターゲットとなる遺伝子配列の切断については、個々の sgRNA 配列を用いた予備実験により検証した。
1p36 領域の中の 5'側および 3'側にそれぞれ sgRNA 配列を設定した。この同時切断による 28Mbp の欠失を試みた。個々の配列による DNA 切断を確認後、HeLa において行った実験では、欠失領域をまたぐ PCR により染色体欠失の存在が示唆された。

続いてヒト多能性幹細胞およびヒト多能性幹細胞由来交感神経における同領域の欠失を試みたが、浮遊培養における AAV1 感染を最適化することができず、欠失の人工的な導入を再現することができなかった。

4) ヒト多能性幹細胞由来交感神経前駆細胞における *MYCN* 強制発現による発現型の観察

浮遊培養環境下においてヒト多能性幹細胞由来交感神経前駆細胞に *MYCN* の強制発現を行うと、*PHOX2B* 陽性・*MYCN* 陽性細胞を含むニューロスフィアを強制発現開始後 24 時間まで確認することができた。強制発現開始後 48 時間では、ニューロスフィアの *PHOX2B* 陽性・*MYCN* 陽性細胞群は消失し、わずかに *PHOX2B* 単独陽性および *PHOX2B* 陰性細胞が構成する小さなニューロスフィアが残存し、培養液中に多くの死細胞が同定された。

このように *in vitro* で発生した交感神経前駆細胞に *MYCN* を強制発現させた際には、何らかの原因により細胞死が起こることを繰り返し再現した。

<引用文献>

1. Kirino, K., Nakahata, T., Taguchi, T. et al. Efficient derivation of sympathetic neurons from human pluripotent stem cells with a defined condition. *Sci Rep* 8, 12865 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31256-1>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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