

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 2 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K09505  
 研究課題名(和文) リプログラミング技術による非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍のエピゲノム解析と治療開発  
  
 研究課題名(英文) Epigenetic analysis and drug development with cell-reprogramming technology in atypical teratoid/rhabdoid tumor  
  
 研究代表者  
 荒川 芳輝 (Arakawa, Yoshiki)  
  
 京都大学・医学研究科・講師  
  
 研究者番号：20378649  
 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)：本研究では、樹立したhiPSCs TP53-/-, INI-1-/-細胞の解析を行い、AT/RT発生にINI-1遺伝子不活化から多能性幹細胞様遺伝子発現が関わること、その維持にRAD21が作用することを同定した。そこで、RAD21の特異的な阻害薬の開発するために、樹立したヒトAT/RT細胞株を用いたRAD21に対するドラッグスクリーニングシステムの開発したが、特異的なRAD21阻害剤の同定には至らなかった。また、AT/RTの全ゲノム解析により、INI-1遺伝子の体細胞変異からエピゲノム異常と遺伝子異常の蓄積がAT/RTの発生、悪性化機構に関わることを示した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

INI-1不活化によるがん化では、p16-RB経路、WNT経路、sonic hedgehog経路、Polycomb経路などの関連が報告されてきた。SWI/SNF複合体の機能解析からクロマチンを基盤とするINI-1の新しいエピジェネティックな機構が示唆されていた。本研究では、INI-1不活化による新しいエピジェネティックな破綻機構として多能性幹細胞様遺伝子発現の維持を提唱した。さらに、INI-1遺伝子の体細胞変異からエピゲノム異常と遺伝子異常の蓄積がAT/RTの発生、悪性化機構に関わることを示したことは、AT/RTの新たな治療開発研究に大きく寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop a novel therapy by elucidating the epigenomic abnormalities of atypical teratoma/rhabdoid tumors (AT/RT) using reprogramming technology. Analysis of established hiPSCs TP53-/- and INI-1-/- cells identified the need of pluripotent stem cell-like gene expressions from INI-1 gene inactivation in AT/RT development, which is maintained by RAD21. Therefore, drug screening system against RAD21 with the established AT/RT cells from hiPSCs was developed to find specific inhibitors of RAD21. However, a specific RAD21 inhibitor was not to be found. Whole genome analysis of AT/RT revealed that the accumulation of genetic abnormalities from epigenomic aberrations is involved in AT/RT development.

研究分野：脳神経外科

キーワード：非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍 リプログラミング ヒト人工多能性幹細胞 エピゲノム異常 INI-1 SMARCB1 RAD21

## 1. 研究開始当初の背景

非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍 (Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT)) は、小児期に発生する極めて悪性度の高い中枢神経系腫瘍である。AT/RT は、ラブドイド細胞に加えて未熟な神経上皮性細胞の増生、上皮性・間葉系・グリア系・神経細胞系など多彩な分化を示す組織学的特徴である (Louis, 2016)。多くの AT/RT では、INI-1 (SMARCB1, SNF5, BAF47) 遺伝子の不活化が認められるが、ゲノムの安定性でその他の遺伝子変異は少ない (Lee, 2012)。INI-1 遺伝子は、第 22 番染色体 22q11.23 に局在し、385 ないし 376 アミノ酸からなる蛋白質をコードしている。INI-1 は、SWI/SNF 複合体のコア・サブユニットであり、ATP 依存的にクロマチンリモデリングから転写活性を制御する (Wilson, 2011)。SWI/SNF 複合体は、様々な遺伝子発現調節からがん抑制として機能すると提唱される (Kohashi and Oda, 2017)。INI-1 の不活化が AT/RT 発生のドライバーとなるが、INI-1 不活化からの AT/RT 発生のメカニズムについては明らかでなかった。

INI-1 遺伝子を不活化したマウスモデルでは、AT/RT の発生は認められなかった。そこで、中枢神経系特異的な INI-1 不活化モデルが解析された。nestin 陽性特異的 INI-1 不活化・p53 欠失では早期致死するが、GFAP 陽性特異的 INI-1 不活化・p53 欠失では神経発生異常を来し AT/RT を形成することが確認された (Ng et al., 2015)。発生時期に応じた INI-1 不活化を行うマウスモデル実験から、胎生期 6-10 日に INI-1 不活化した際に AT/RT 形成を認めたが、胎生期 6 日以前、出生時、出生 2 ヶ月での INI-1 不活化では AT/RT 形成は認めず、それぞれ、致死、肝臓毒性、T 細胞性リンパ腫形成を呈し、AT/RT 発生は胎生期に制限された (Han et al., 2016)。また、マウスモデル腫瘍、ヒト腫瘍のトランスクリプトーム解析からは、AT/RT が神経幹細胞などの体性幹細胞を発生起源とする可能性が示唆されていた (Han et al., 2016)。これらの知見は、AT/RT の腫瘍発生に幹細胞制御機構が関わることを示唆していた。そこで、AT/RT は、胎生発生に特定の起源細胞に INI-1 不活化が生じることで発生する特異な腫瘍であると仮説を設定した。この仮説を解明するには、これまでのマウスモデルでは十分な解析は難しく、ヒト由来の新たな腫瘍モデルの開発が必要であった。

2006 年山中らにより開発された体細胞リプログラミング法は、Oct3/4、Sox2、Klf4、cMyc の 4 遺伝子を強制発現することでゲノム改変を行うことなく多能性幹細胞誘導を可能とした (Takahashi and Yamanaka, 2006)。発がんの過程は、多数の遺伝子変異が要因と考えられてきたが、近年の全ゲノム解析からドライバー遺伝子が転写ネットワークに異常を来すエピゲノム改変が発がんに関与する (Semi and Yamada, Cancer Science, 2015)。そこで、ヒト AT/RT 腫瘍モデルの解析から、AT/RT の起源細胞を特定し、エピゲノム改変に着目した腫瘍発生メカニズムの解明と新規治療開発に着手した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、AT/RT 発生に関わるエピゲノム異常の解明と新規治療開発の開発である。そのために、ヒト iPS 細胞から発生させたヒト AT/RT 腫瘍細胞を解析し、AT/RT 発生におけるエピゲノム異常とそれに伴う転写ネットワーク異常、治療ターゲットとなる新規標的分子の同定から新規治療開発を目指した。

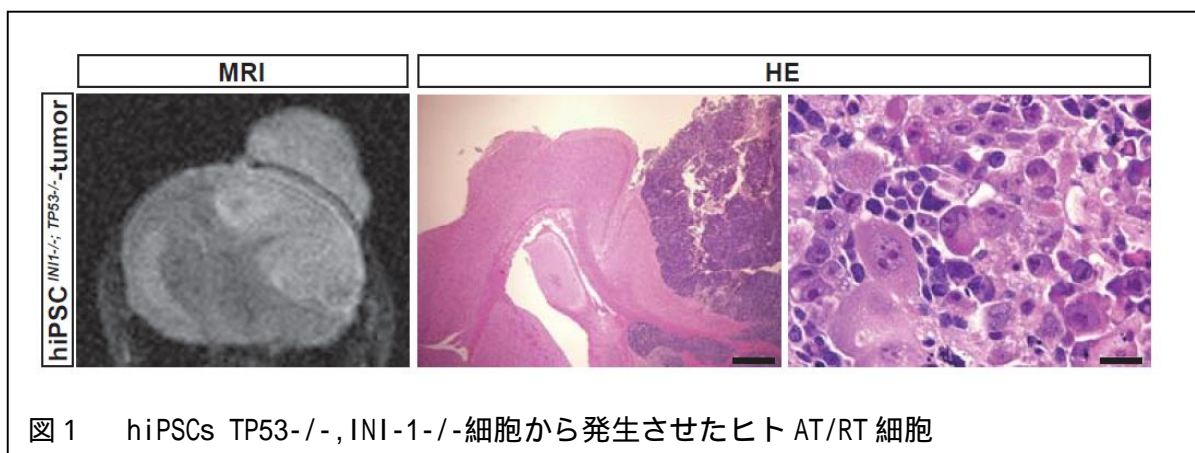
### 3. 研究の方法

- 1). ヒト iPS 細胞から発生させたヒト AT/RT 腫瘍細胞株の樹立  
TP53<sup>-/-</sup>, INI-1<sup>-/-</sup>-ヒト人工多能性幹細胞から誘導した腫瘍細胞の初代培養を行い、分化度に異なったヒト AT/RT 細胞株の樹立培養条件を設定した。
- 2). ヒト iPS 細胞由来 AT/RT の腫瘍形成に伴う転写ネットワーク解析  
樹立したヒト AT/RT 細胞株を用いてトランスクリプトーム解析する。これにより、AT/RT 形成に必要な転写ネットワークを解析した。
- 3). 腫瘍形成阻害標的分子の同定  
CRISPR/Cas9 レンチウイルスシステムによる網羅的な遺伝子阻害スクリーニングを行い、AT/RT 腫瘍形成に必須となる標的分子を解析した。
- 4). 新規治療開発に向けた新規治療開発  
AT/RT 細胞株を用いて標的分子に対するドラッグスクリーニングシステムを開発し、AT/RT の新規治療開発につながる薬剤同定を試みた。
- 5). AT/RT の全ゲノム解析  
AT/RT の INI-1 不活化後に生じるエピゲノム変化をもたらす未知のゲノム情報を AT/RT 腫瘍の全ゲノム解析から探索した。

### 4. 研究成果

INI-1 不活化によるがん化では、p16-RB 経路, WNT 経路, sonic hedgehog 経路、Polycomb 経路などの関連が報告されてきた。本研究では、下記の成果から、INI-1 不活化による新しいエピジェネティックな破綻機構として多能性幹細胞様遺伝子発現の維持を見出した。その維持に RAD21 が作用することを同定したが、特異的な RAD21 阻害剤の同定には至らなかった。また、AT/RT の全ゲノム解析結果から、INI-1 遺伝子の体細胞変異からエピゲノム異常と遺伝子異常の蓄積が AT/RT の発生、悪性化機構に関わることを示した。

- 1). ヒト iPS 細胞から発生させたヒト AT/RT 腫瘍細胞株の樹立  
TP53<sup>-/-</sup>, INI-1<sup>-/-</sup>-ヒト人工多能性幹細胞から誘導した腫瘍細胞(図 1)の初代培養を行い、



分化度に異なったヒト AT/RT 細胞株の樹立培養を確立した。

2). ヒト iPS 細胞由来 AT/RT の腫瘍形成に伴う転写ネットワーク解析

樹立したヒト AT/RT 細胞株のトランスクリプトーム解析から、AT/RT 形成に必要となる転写ネットワークが幹細胞に類似した状態に変化していることを同定した。

3). 腫瘍形成阻害標的分子の同定

CRISPR/Cas9 レンチウイルスシステムによる網羅的な遺伝子阻害スクリーニングから、AT/RT 腫瘍形成に必須となる分子として RAD21 を同定した。RAD21 の発現阻害で腫瘍増殖抑制を確認した。さらに、AT/RT 細胞株において EZH2 と RAD21 の共発現阻害で腫瘍増殖抑制の相乗効果を同定した。

4). 新規治療開発に向けた新規治療開発

樹立したヒト AT/RT 細胞株を用いた RAD21 に対するドラッグスクリーニングシステムを開発した。しかし、樹立したヒト AT/RT 細胞に対する特異的な RAD21 阻害剤の同定には至らなかった。

5). AT/RT の全ゲノム解析

Phelan-McDermid syndrome を有する AT/RT において、環状 22 番染色体異常に加えて、全ゲノム解析から腫瘍進展に伴った INI-1 遺伝子の体細胞変異(p.R201X) 、22 番染色体全欠失、BRCA2 遺伝子の変異、6 番染色体長腕欠失、14 番染色体長腕増幅を検出した。INI-1 遺伝子の体細胞変異からエピゲノム異常と遺伝子異常の蓄積が AT/RT の発生、悪性化機構に関わることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akazawa Ryo, Umeda Katsutsugu, Saida Satoshi, Kato Itaru, Hiramatsu Hidefumi, Sakamoto Akio, Arakawa Yoshiki, Sumiyoshi Shinji, Okamoto Takeshi, Moritake Hiroshi, Adachi Souichi, Takita Junko	4. 巻 50
2. 論文標題 Temozolomide and etoposide combination for the treatment of relapsed osteosarcoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 948 ~ 952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa070	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 -

1. 著者名 Natsume Atsushi, and Members of Japan Clinical Oncology Group Brain Tumor Study Group (JCOG-BTSG), Arakawa Yoshiki, Wakabayashi Toshihiko	4. 巻 148
2. 論文標題 Genetic analysis in patients with newly diagnosed glioblastomas treated with interferon-beta plus temozolomide in comparison with temozolomide alone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 17 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-020-03505-9	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 -

1. 著者名 Hiratsuka Takuya, Arakawa Yoshiki, Yajima Yuka, Kakimoto Yu, Shima Keisuke, Yamazaki Yuzo, Ikegami Masahiro, Yamamoto Takushi, Fujiwake Hideshi, Fujimoto Koichi, Yamada Norishige, Tsuruyama Tatsuaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Hierarchical Cluster and Region of Interest Analyses Based on Mass Spectrometry Imaging of Human Brain Tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-62176-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Terada Yukinori, Jo Norihide, Arakawa Yoshiki, Sakakura Megumi, Yamada Yosuke, Ukai Tomoyo, Kabata Mio, Mitsunaga Kanae, Mineharu Yohei, Ohta Sho, Nakagawa Masato, Miyamoto Susumu, Yamamoto Takuya, Yamada Yasuhiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Human Pluripotent Stem Cell-Derived Tumor Model Uncovers the Embryonic Stem Cell Signature as a Key Driver in Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 2608 ~ 2621.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.02.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamasaki Kai, Kiyotani Chikako, Terashima Keita, Watanabe Yuko, Kanamori Masayuki, Koga Yuhki, Hata Nobuhiro, Iwasaki Fuminori, Goto Hiroaki, Koh Katsuyoshi, Kurihara Jun, Tokunaga Shinya, Arakawa Yoshiki, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Hara Junichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Clinical characteristics, treatment, and survival outcome in pediatric patients with atypical teratoid/rhabdoid tumors: a retrospective study by the Japan Children's Cancer Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery: Pediatrics	6. 最初と最後の頁 111 ~ 120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2019.9.PEDS19367	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 荒川芳輝 溝田敏幸 福井彩香 川田将義 米澤淳 川内豪 山本悦子 山尾幸広 峰晴陽平 菊池隆幸 古川恵子 宮本享
2. 発表標題 第17回日本Awake Surgery学会全国アンケート調査から見えた覚醒下手術の現状と課題
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川芳輝 山崎夏維 寺島慶太 山本哲哉 中村英夫 五味玲 中野嘉子 金村米博 市村幸一 義岡孝子 瀧本哲也 平戸純子 坂本博昭 西川亮 原純一 JCCG脳腫瘍委員会
2. 発表標題 本邦における小児脳腫瘍診療の向上を目指す多角的アプローチ
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川芳輝 須賀淳子 寺田行範 丹治正大 峰晴陽平 武藤学 宮本享
2. 発表標題 京都大学病院におけるがんゲノムプロファイリング検査の現状
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒川芳輝 姜裕 中島公平 丹治正大 峰晴陽平 山尾幸広 菊池隆幸 宮本享
2. 発表標題 実質性脳腫瘍に対する内視鏡手術における術前シミュレーションの役割
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiki Arakawa, Yasuhide Makino, Takeshi Kawauchi, Masaharu Tanji, Yohei Mineharu, Yonehiro Kanemura, Susumu Miyamoto
2. 発表標題 Retrospective analysis of the combined treatment of vincristine, ACNU, carboplatin and interferon- plus radiotherapy (VAC-feron-R) in patients with diffuse astrocytoma
3. 学会等名 The 25th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshiki Arakawa, Yukinori Terada, Norihide Jo, Yohei Mineharu, Susumu Miyamoto, Yasuhiro Yamada
2. 発表標題 Embryonic stem cell signature drives atypical teratoid/rhabdoid tumor development in human pluripotent stem cell-derived tumor model
3. 学会等名 24th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺田 行範, 城 憲秀, 荒川 芳輝, 峰晴 陽平, 宮本 享, 山田 泰広
2. 発表標題 多能性ネットワークがAT/RTの形成と腫瘍の悪性度を促進している
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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	Thumkeo Dean  (Thumkeo Dean)  (40372594)	京都大学・医学研究科・特定准教授   (14301)	
研究 分担者	平田 英周  (Hirata Eishu)  (40761937)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授   (13301)	

	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
連携 研究者	山田 泰広  (Yamada Yasuhiro)  (70313872)	東京大学・医科学研究所・教授   (12601)	

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