

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82402

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16759

研究課題名(和文) iPS細胞による神経芽腫発がんモデルを用いたALT陽性難治腫瘍の治療開発

研究課題名(英文) Development of a treatment for ALT-positive refractory tumors using iPS cells model of neuroblastoma tumorigenesis

研究代表者

迎 恭輔 (Kyosuke, Mukae)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：60793974

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)：Li-Fraumeni (Li-F) 症候群 iPS 細胞由来の頭部神経堤細胞 (cNCC) を軟寒天培地で培養し、ATRX欠損株を作製後、足場非依存的形質転換を獲得させたクローンを作製した。さらに、そのクローンの中からC-circle陽性かつAPB形成が見られる複数クローンを得ることができた。このクローンを用いて、免疫不全マウスの皮下および副腎近傍脂肪組織への移植を行い、腫瘍化を試みた。これまでの知見と同様に、TP53変異/ATRK欠損細胞はC-circle陽性を獲得しやすいことが示された。この細胞が、どのようにしてがん化するのか今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ATRX と ALT 経路の関係性に着目し、Li-F 症候群悪性形質転換 cNCC を利用して神経堤細胞におけるテロメア機構の一端を明らかにした。また、本研究のアプローチの意義は、iPS細胞を分化させ、発がんさせることにある。この方法が確立されれば、神経芽腫モデルに関わらず、その他のがんにも用いることができ、様々ながんにおける発生機構を追求することができるようになる。

研究成果の概要(英文)：Li-Fraumeni syndrome iPSC-derived neural crest cells were cultured in soft agar medium to generate an ATRX-deficient lines, followed by clones that acquired scaffold-independent transformation. Furthermore, clones showing C-circle positive and APB formation were obtained. Using these clones, we attempted tumorigenesis by transplantation into subcutaneous and periaxillary adipose tissue of immune-deficient mice. Consistent with previous findings, TP53 mutant/ATRK-deficient cells were shown to be prone to acquire C-circle positivity. How these cells become cancerous is a future question.

研究分野：がん

キーワード：iPS 神経堤細胞 ATRX ALT APB

1. 研究開始当初の背景

神経芽腫は小児にできる固形腫瘍では、脳腫瘍に次いで多く、日本で毎年 150 人前後の新しい患者が診断されている。神経芽腫は神経堤細胞 (Neural crest cell: NCC) という交感神経のもととなる細胞が起源であり、交感神経節や副腎などで発生する。神経芽腫では、これまで多数の生物学的特性が示されており、転写因子である MYCN 遺伝子の増幅、11 番染色体長腕のヘテロ接合性の消失、DNA ploidy などが重要な予後因子として報告されている (Riley et al. Clin Cancer Res 2004)。これに加えて、ATRX 遺伝子の欠損なども、予後に関わることが報告されている。

MYC ファミリーのひとつである MYCN は細胞周期の進行に関与し、がん細胞の増殖を促進する機能を持った神経芽腫の予後不良因子である。これまでの多数の知見で、神経芽腫において MYCN やその関連経路が細胞増殖に関与することが報告されてきた。その一方で神経芽腫 MYCN 非増幅に関する研究は MYCN 増幅に関する研究と比べて少ない。これまでの申請者による研究で、p53 変異をもつ Li-Fraumeni (Li-F) 症候群由来の iPS 細胞を NCC へ分化させ、レンチウイルス法を用いて NCC mock 株と NCC MYCN 過剰発現株を作製した。そこから、軟寒天コロニー形成アッセイを用いて、足場非依存的な悪性形質転換した細胞モデルを作製した。MYCN 高発現は予後不良とされているが、Li-F 症候群 NCC 株は MYCN 発現による悪性形質転換率の有意な差はなく、野生型 (WT) iPS 細胞由来 NCC mock 株と比較すると高いコロニー形成能を示した。そのため、Li-F 症候群悪性形質転換 NCC は、予後不良のステージ IV の MYCN 非増幅症例モデルになる可能性がある。神経芽腫 MYCN 非増幅に関する研究は少なく、本研究によってさらなる知見を展開することができる。

テロメア維持は腫瘍形成に重要であり、大部分のがんではテロメラーゼが活性化し、テロメアを維持している。この活性化はがんの 85~90% において見られる。残りの 10~15% のがんでは ALT 経路というテロメラーゼの活性化を必要としない別の機構によりテロメアが維持されている。これまでの研究で、ALT 経路活性化に ATRX 変異および p53 変異が関与していることが示唆されており、これらの関係性に ATM-Chk2 経路の活性化が関与することが報告されている (Chen et al. Cancer Res 2006, Watson et al. J Clin Invest 2013)。神経芽腫におけるテロメア伸長機構の研究で、ATRX 変異株は MYCN 非増幅であることが多い (Kurihara et al. J Pediatr Surg 2014)。また、神経芽腫細胞において 4 つの ALT 陽性細胞はすべて p53 機能不活性であった (Farooqi et al. J Neurooncol 2014)。神経芽腫以外にも、平滑筋肉腫や星細胞腫などの ALT 陽性細胞は ATRX 変異であり、p53 変異である傾向が高い (Killela et al. PNAS 2013, Yang et al. Am J Transl Res 2015)。これらのことから、MYCN 非増幅で p53 変異がある Li-F 症候群由来 iPS 細胞の悪性形質転換 NCC は、ATRX 変異を導入することで、ALT 経路を誘導できると期待される。MYCN 非増幅における予後不良な神経芽腫は ALT 経路との関係性が報告されており、この関係性を明らかにすることで MYCN 非増幅腫瘍の予後因子を見出すことと、神経芽腫発症の解明に近づくことができる (Peifer et al. Nature 2015)。

2. 研究の目的

過去の研究から、神経芽腫において ATRX 変異によって ALT 経路が誘導され、p53 変異を高頻度に伴うことが明らかになっている。また近年、神経芽腫におけるテロメアの長さが腫瘍内で多様性を持っていることが明らかにされており、その多様性のがんの進行に深く影響していると考えられている (Pezzolo et al. Oncotarget 2015)。本研究では、ATRX と ALT 経路の関係性に着目し、Li-F 症候群悪性形質転換 NCC を利用して神経芽腫におけるテロメア機構の一端を解明する。神経芽腫におけるがんとテロメアに関する研究は不明な点も多いため、より多くの知見を集める必要があることから、本研究では均一な細胞集団である iPS 細胞由来悪性形質転換 NCC を用いて ALT 経路の詳細な分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

Li-F iPS 細胞から分化させた NCC (Fukuta et al. PloS one 2014) を用いて、レンチウイルスベクターを用いた 3 種類の異なる ATRX 領域を欠損させる Single guide RNA による ATRX ノックアウト法によって ATRX KO Li-F NCC を作製した。この株を用いて、ソフトアガーコロニー形成を行った。十分なコロニー形成後、複数のクローンを単離し、足場被依存的形質転換株として培養を行った。ATRX ノックアウトをゲノム、タンパク質発現で確認し、ALT 経路活性化マーカーである C-circle アッセイおよび APB アッセイを行った。ATRX ノックアウト、C-circle 陽性、APB 陽性クローンを免疫不全マウスの皮下および左副腎近傍脂肪組織に移植した。

4. 研究成果

(1) 3 種類の sgATRX (sgATRX1, sgATRX2, sgATRX3) を用いて、Li-F 神経堤細胞から mock 株と 3 種類の sgATRX KO 株を作製した。薬剤選抜後、ソフトアガーコロニー形成アッセイを行い、各株において mock 株: 7 コロニー/1dish、sgATRX1 KO 株: 1482 コロニー/1dish、sgATRX2 KO 株:

265 コロニー/1dish、sgATRX3 KO 株: 830 コロニー/1dish という結果になった。このことから、p53 変異条件下において、ATRX KO は足場非依存的形質転換を獲得させやすくすることがわかった。

(2) sgATRX1~3 KO 株のコロニーを単離し、培養を行なった。それら培養に成功した sgATRX KO 株において、C-circle アッセイおよび APB アッセイを行った。C-circle 陽性を示したクローンは sgATRX1 株のみだった。これは、ATRX の欠損領域が影響しているのかもしれない。次に、C-circle 陽性を示したクローンに対して、PML タンパク質とテロメア DNA の共局在化を解析する APB アッセイを行い、C-circle 陽性を示したクローンはすべて APB 陽性を示した。このことから p53 変異細胞において、ATRX KO によって ALT 経路が活性化することが示された。

(3) ALT 経路活性化 Li-FNCC クローンを免疫不全マウスの副腎左近傍脂肪組織に移植すると、腫瘍のような塊の形成が見られた。本研究期間内では、その形成について解析できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akter Jesmin, Katai Yutaka, Sultana Parvin, Takenobu Hisanori, Haruta Masayuki, Sugino Ryuichi P., Mukae Kyosuke, Satoh Shunpei, Wada Tomoko, Ohira Miki, Ando Kiyohiro, Kamijo Takehiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Loss of p53 suppresses replication stress-induced DNA damage in ATRX-deficient neuroblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-021-00363-6	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 迎 恭輔、竹信 尚典、神田 浩明、大平 美紀、遠藤 悠紀、春田 雅之、戸口田 淳也、長船 健二、中畑 龍俊、上條 岳彦
2. 発表標題 Development of artificial tumorigenesis model from iPSC-based neural crest cells
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 迎 恭輔、竹信 尚典、杉野 隆一、大平 美紀、佐藤 俊平、遠藤 悠紀、岡田 龍、春田 雅之、戸口田 淳也、長船 健二、中畑 龍俊、上條 岳彦
2. 発表標題 Development of neuroblastoma model from iPSC-based neural crest cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 迎 恭輔、竹信 尚典、神田 浩明、大平 美紀、遠藤 悠紀、春田 雅之、杉野 隆一、佐藤 俊平、戸口田 淳也、長船 健二、中畑 龍俊、上條 岳彦
2. 発表標題 Development of a chondroblastic osteosarcoma model from iPSC-based neural crest cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸抽出方法、及び核酸抽出装置	発明者 武居 修、上條 岳 彦、迎 恭輔	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-047528	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------