

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18412

研究課題名(和文)疾患特異的iPS細胞を用いたATRX変異神経膠腫におけるテロメア伸長機構の解明

研究課題名(英文)Research for mechanism of telomere lengthening in gliomas harboring ATRX mutation using patient-derived induced pluripotent stem cell

研究代表者

伊師 雪友(Ishi, Yukitomo)

北海道大学・大学院・医員

研究者番号：30812284

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):まず健康人由来のiPS細胞からアストロサイトを誘導する予備実験として、201B7細胞を用いてfeeder freeの状態Neural Induction Mediumでの培養を行った。得られた細胞は蛍光免疫染色でNestinおよびPAX6で陽性であり、神経幹細胞としての性質を有していると考えられた。次に神経幹細胞からアストロサイトを誘導するために、DMEM培地を基本として各種の分化誘導因子を加えて培養を行ったが、いずれも十分なGFAP陽性の細胞が得られなかった。今後は神経幹細胞からアストロサイトを誘導する条件をさらに検討し、ATRX症候群の患者由来iPS細胞でも同様の実験を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、予備実験として行った正常iPS細胞を用いたアストロサイトの分化誘導の段階で十分な誘導条件を確立できず、疾患特異的iPS細胞を用いた実験の段階まで進めることができなかった。よって目的としていたATRX症候群由来iPS細胞の分化誘導後の解析などは全く行えていない。より簡便かつ高い誘導効率をもったアストロサイトの分化誘導方法の確立が必要であり、今後の研究が望まれる。

研究成果の概要(英文):We cultured 201B7, an iPS cell line established from healthy human, with feeder free condition using Neural Induction Medium as a preliminary experiment. After culturing, cells indicated positive staining of Nestin and PAX6 on fluorescent immunohistochemistry, which suggested sufficient induction of neural progenitor cells. To induce astrocytes from neural progenitor cells, we cultured these cells with condition of DMEM as basal medium and with various induction factors. However, we could not obtain sufficient amount of cells with GFAP positive cells. We will further study the culturing condition to induce astrocytes from neural progenitor cells, and will perform similar experiments using iPS cell derived from patient with ATRX syndrome.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経膠腫 iPS細胞 ATRX症候群

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人に発生する神経膠腫の中で、WHO Grade 2-3 に相当するものでは IDH1/2 遺伝子の異常が高頻度に認められる。IDH 遺伝子変異を有するものはさらに星細胞腫と乏突起膠腫に分けられるが、特に前者では TP53 遺伝子や ATRX 遺伝子の変異を高頻度に合併する。ATRX 遺伝子の変異による ATRX 蛋白発現の消失は alternative lengthening of telomere (ALT) と呼ばれる腫瘍のテロメア伸長機構に関与するとされているが、そのメカニズムははっきりしていない。神経膠腫に対する治療は手術に加えて放射線治療やテモゾロミド化学療法など限られた補助療法しか存在せず、新規の治療法が望まれる疾患であるが、ATRX 変異神経膠腫におけるテロメア伸長機構を解明することにより新たな治療標的を同定できる可能性がある。

ATRX 遺伝子は、先天性の精神発達遅滞を特徴とする ATRX 症候群の原因遺伝子としても知られている。近年疾患の病態を再現する方法として、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) を用いた手法が広まりつつある。健常人から樹立した iPS 細胞は組織細胞への分化誘導を行うことにより再生医療への応用が期待されているが、一方で何らかの遺伝性疾患を有する患者から樹立した iPS 細胞はドナーである患者の遺伝子異常を受け継ぐため、適切な組織細胞への分化誘導により疾患の表現形を再現できる可能性がある。ATRX 症候群の患者から樹立した iPS 細胞はもともとの ATRX 遺伝子の変異を受けついでいるため、組織細胞への分化誘導を行うことで ATRX 遺伝子変異の機能解析を行うためのモデルになりうると考えられる。したがって ATRX 患者由来 iPS 細胞を分化誘導することで、ATRX 変異神経膠腫における ALT のメカニズムを解析できる可能性があり、さらに新規の治療標的に同定につながる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では ATRX 症候群の患者由来 iPS 細胞 (ATRX-iPSC) からアストロサイトへの分化誘導を通して、ATRX 遺伝子の変異を有する神経膠腫に認められる ALT によるテロメア伸長機構の再現、メカニズムの解明および新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

熊本大学発生医学研究所幹細胞部門幹細胞誘導分野より供与された ATRX-iPSC を用いて、以下の実験を予定した。

1) ATRX-iPSC からアストロサイトへの分化誘導および ALT の解析

ATRX-iPSC に対してアストロサイトへの分化誘導を行い、ALT によるテロメア伸長が認められるかどうかを fluorescent in situ hybridization (FISH) を用いて観察する。ATRX 症候群の患者において神経膠腫の合併率が高いという事実は報告されておらず、腫瘍化のためには IDH 変異の合併が必要である可能性が高いと考えられるため、ATRX-iPSC に対して IDH1 遺伝子の代表的な変異である R132H を electroporation などにより導入する (ATRX-IDH1-iPSC)。ATRX-IDH1-iPSC を同様にアストロサイトへ分化誘導し、ALT が観察されるかどうかを検討する。また細胞の増殖能に関して増殖アッセイを行い、腫瘍化をきたしているかどうかを検討する。

2) ATRX-iPSC のアストロサイトへの分化誘導に伴う遺伝子発現の変化

ATRX-iPSC、ATRX-IDH1-iPSC、健常人由来 iPS 細胞からそれぞれアストロサイトを誘導し、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行う。共通して発現の変化する遺伝子が腫瘍化に関連する可能性があり、候補遺伝子として解析を進める。ALT の出現に伴い発現の変化する遺伝子が存在すれば ALT に関与している可能性があり、この遺伝子に着目して解析を進める。具体的には候補遺伝子の発現の変化に対してノックダウンまたは過剰発現の実験を行い、細胞の増殖能や ALT 発現との関連が見られるかを検討する。また候補遺伝子に対する阻害薬が存在する場合、ATRX 変異神経膠腫における新規治療薬の候補として in vitro および in vivo での投与実験を行う。

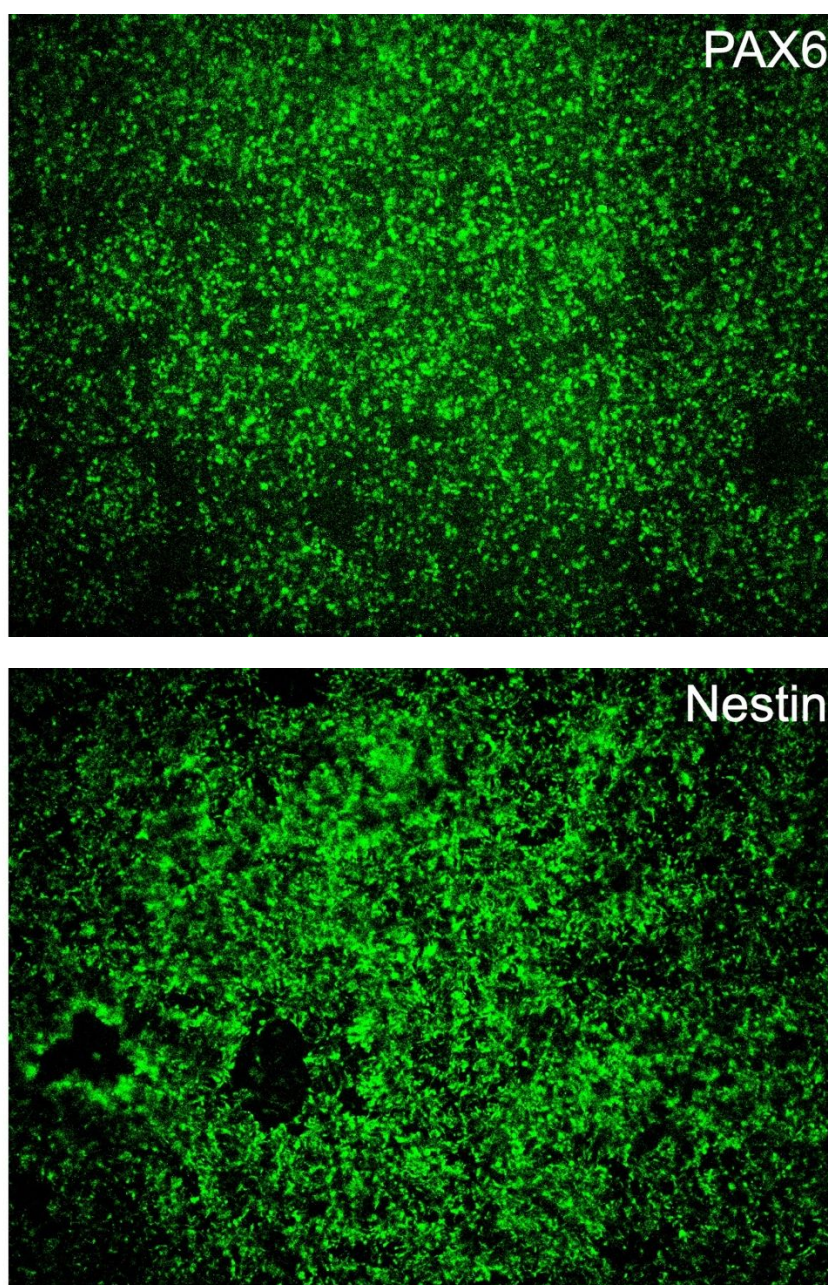
4. 研究成果

まず予備実験として、正常 iPS 細胞からアストロサイトへの分化誘導を試みた。健常人由来の iPS 細胞株として報告されている 201B7 細胞を用いて、feeder free の状態で 3 回の継代を行なって feeder 細胞を除去し、Neural Induction Medium での培養を行った。培養 14 日後の細胞は蛍光免疫染色で Nestin および PAX6 で陽性であり、神経幹細胞としての性質を有していると考えられた (図)。次に神経幹細胞からアストロサイトを誘導するために、DMEM 培地を基本として過去に報告されている epidermal growth factor (EGF) や ciliary neurotrophic factor (CNTF)、bone morphogenetic protein 2 (BMP2)、heregulin1b などの分化誘導因子を加えて培養条件の検討を行った。アストロサイトへの分化のマーカーとしては glial fibrillary protein (GFAP) の蛍光免疫染色を行った。しかし各種の因子の濃度や有無など条件を変えても、十分な

GFAP 陽性の細胞が得ることができなかった。本研究では GFAP 陽性のアストロサイトへの分化誘導条件の確立が必須であったが、最終的に目的とする分化誘導条件を決定することができず、ATRX-iPSC を用いた実験へ移行することができなかった。

今後の予定として、まずは神経幹細胞からアストロサイトへの誘導条件の確立を目指す。今回の実験では分化誘導因子の濃度の調整のみを行っていたが、基礎培地やディッシュのコーティング剤についても検討の余地があると考えられた。アストロサイトへの分化誘導法を確立した後に、ARTX-iPSC を用いての分化誘導も予定している。

またアストロサイトまでの分化誘導に至らずとも、神経幹細胞への分化誘導のみで腫瘍化が得られる可能性もあるため、アストロサイトへの分化誘導法の樹立に先立っての ATRX-iPSC および ATRX-IDH-iPSC を神経幹細胞への分化誘導を予定している。この場合、ATRX-iPSC、ATRX-IDH1-iPSC、201B7 それぞれを神経幹細胞へ分化誘導した時点で、FISH による ALT の有無や細胞の増殖アッセイ、RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を予定している。また IDH1/2 遺伝子の変異は 2-ヒドロキシグルタル酸の細胞内への蓄積が生じることが腫瘍化の原因と考えられるが、IDH1/2 の変異の種類により 2-ヒドロキシグルタル酸の細胞内の蓄積の程度が変わることが報告されている。神経膠腫に代表的な IDH1 R132H のみではなく、IDH1 遺伝子のコドン R132 の他のアミノ酸への変異および IDH2 の変異を導入した ATRX-IDH-iPSC も作成することで、2-ヒドロキシグルタル酸の蓄積の程度や腫瘍化の有無を比較することができ、ATRX 変異神経膠腫の発生に関するモデルとして有用な解析系になると考えられる。



図：201B7（健常人由来 iPSC 細胞）から誘導した神経幹細胞（PAX6 / Nestin 陽性細胞）

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