

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24010

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた褐色細胞腫に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a Novel Therapy for Pheochromocytoma Using Patient-Derived iPSC Cells

研究代表者

宮脇 良文(miyawaki, yoshifumi)

京都大学・医学研究科・研究員

研究者番号：10844714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：既報の分化誘導プロトコールと比較し、より短期かつ高効率にiPS細胞を副腎髄質、傍神経節様細胞に分化誘導できるプロトコールを新たに確立した。新たな分化誘導法で作成したクロム親和性様細胞は*in vitro*において未分化iPSと比較しMIBGを取り込む傾向にあることが確認できた。健康者iPSC、疾患iPSCをその手法を用いて分化させた細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。移植3か月後に、移植細胞を評価したところ、両iPS細胞由来の細胞はCgA, TH, FOX2Bが陽性なクロム親和性細胞であると考えられた。疾患iPSC由来の移植片は健康者iPSCと比較し増大する傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

褐色細胞腫・傍神経節細胞腫(以下PPGL)は副腎髄質または傍神経節のクロム親和性細胞から生じるカテコラミン産生を特徴とする神経内分泌腫瘍のひとつである。PPGLはカテコラミン過剰により頭痛、発汗過多、発作的な血圧上昇、便秘、動悸に加えて、不安感、疲労感の原因となりQOLを低下させる。また良・悪性の診断が困難であり、悪性例は抗がん剤治療(CVD治療)、¹³¹I-MIBGがあるが、効果は限定的であり新規治療薬、治療法の開発が望まれている。本研究の成果である疾患iPSCをクロム親和性細胞に分化誘導する手法やそれを用いたXenograftによる疾患再現モデルは新規治療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：We have established a new differentiation protocol that can induce iPSC cell differentiation into adrenal medulla and paraganglia-like cells more rapidly and efficiently than previously reported differentiation induction protocols. The chromaffin cells generated by the new differentiation method showed a tendency to take up MIBG compared to undifferentiated iPSC cells *in vitro*. The differentiated cells from healthy and patient-derived iPSCs were transplanted under the renal capsule of immunodeficient mice. Three months after transplantation, we evaluated the transplanted cells and found that both cells were considered to be chromaffin cells positive for CgA, TH, and FOX2B. The grafts derived from diseased iPSCs tended to increase in size compared to healthy iPSCs.

研究分野：iPS cell

キーワード：iPS cell PPGL 分化誘導 家族性腫瘍 副腎髄質

1. 研究開始当初の背景

褐色細胞腫・傍神経節細胞腫 (以下 PPGL) は副腎髄質または傍神経節の交感神経細胞から生じる腫瘍である。カテコールアミン産生による高血圧、頭痛などの臨床症状を特徴とする内分泌腫瘍の一つであり 40%以上の症例が遺伝性に発症することが知られている。悪性症例は抗癌剤や ¹³¹I-MIBG 内照射療法による治療を行うが効果が限定的であり、新規治療法の開発が実臨床において喫緊の課題となっている。PPGL は本邦においては約 3000 人が罹患していると報告されている。2017 年に WHO が発表した TNM 分類では全ての PPGL が潜在的に悪性との分類がなされている。転移症例に対しては、有効な根治治療法がなく新規治療薬、治療法の開発が望まれている。ヒト由来細胞株が存在しないことが研究における最大の問題点であることから、本研究では遺伝性 PPGL 患者由来 iPS 細胞を用いて世界初となるヒト由来 PPGL 細胞モデル、及び、モデル動物を確立し、新規治療法、治療薬の開発を目指す。

2. 研究の目的

PPGL はヒト由来細胞モデルがなく、原因遺伝子をヒトと同様に改変した KO マウスでは疾患が再現できない。従って、本研究では通常の手術標本組織からは不可能であった世界に先駆けて PPGL の *in vitro*, *in vivo* 両方のモデル樹立が可能となる優位性を有している。*in vitro* 実験系では新規樹立細胞株を樹立し従来は不可能であった既存薬、新規化合物ライブラリースクリーニングを本学創薬拠点コアラボが有する High-throughput screening 系を使用して行い治療薬の開発に繋げる予定である。また PPGL 細胞は noradrenaline transporter を発現していることが報告されている。同トランスポーターにより特異的に癌細胞内に取り込まれる物質として MIBG が知られていることから放射性物質である ¹³¹I と結合させた ¹³¹I-MIBG が内照射療法として実臨床において使用されている。しかし、その治療効果は限定的であり新規治療法開発が喫緊の課題となっている。近年照射技術の進歩により多くの疾患を対象として At-211 製剤の研究が進められている。At-211 標識の MABG (meta-211At-astato-benzylguanidine) は、¹³¹I 標識の MIBG (meta-¹³¹I-iodo-benzylguanidine) の ¹³¹I 部分を At-211 に置換した薬剤であり、対象疾患候補として MIBG と同様に転移性の褐色細胞腫が挙げられる。崩壊時に α 線を放射する既存の MIBG と比較して、MABG はより局所的かつ細胞傷害活性の高い α 線を放射することから治療成績の向上が期待されており、世界初のヒト褐色細胞腫 *in vivo* モデルが樹立できれば、At-211 標識の MABG の開発に大きく貢献できる。

3. 研究の方法

1、*in vitro* での分化誘導法の樹立

i) 疾患特異的 iPS 細胞を用いて腫瘍発生母地となる交感神経系クロム親和性細胞への分化誘導を行う。分化誘導法に関しては、これまで 2 つの方法 (K Krino., Sci Rep, 2018. Y Oh, cell stem cell, 2016) が報告されているが、これらを参考に独自のプロトコル方法を開発し新規細胞株の樹立を行う。

ii) 実臨床において患者は血中アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミンが高値を示す。分化誘導法の樹立においては、これらのカテコールアミン合成系に必須の酵素群 (TH, DBH) が特異的な分化マーカーとなることから、上記の遺伝子群の発現をメルクマールとしてプロトコルを完成させる。

2、*in vivo* での疾患再現

iii) 分化誘導細胞を免疫不全マウスの腎皮膜下へ同所移植を行うことにより、疾患再現を試みる。具体的には移植の約 1 ヶ月後にマウス腎臓を還流固定した後、凍結切片標本を作成する。免疫染色、RT-PCR により分化誘導細胞の生着の有無、分化マーカー発現検討を行う。

iv) 実臨床において患者はアドレナリン等の血中カテコールアミンが高値を示すが、ヒトでの臨床所見と同様に移植後のマウスにおいてカテコールアミンの産生能が増加するか測定を行う。

4. 研究成果

実臨床において褐色細胞腫を発症した、c-RET に病因遺伝子変異を有する MEN2B 患者の血液細胞から 6 因子 (OCT3/4, SOX2, KLF4, L-MYC, LIN28, shRNA-p53) を用いるエピソード法

により疾患特異的 iPS 細胞が、3 系統樹立できた。これらの細胞では、i) Karyotyping により、Reprogramming に伴う染色体異常等が生じていないこと ii) c-RET の mutation (c.2753T>C p.Met918Thr) を有していること iii) NOD-SCID マウス Testis への injection により 3 胚葉分化能 (多能性の維持) を有することが確認できた。

PPGL は副腎髄質、傍神経節より生じる腫瘍であり、副腎髄質、傍神経節の発生起源は trunkneuralcrest である。本研究では PPGL 患者由来 iPS 細胞を用いて疾患再現するためにヒトの胚発生を模倣し、適切な時期に適切な分化誘導因子を加えることにより iPS 細胞を副腎髄質、傍神経節に分化誘導できないか PAX3, FOXD3, SOX10, TH, DBH 等の分化マーカーをメルクマークとし検討を行った。Neural plate border から trunk neural crest に分化誘導するために背腹軸、前後軸の形成がそれぞれ Wnt, BMP-Shh, FGF-RA のシグナルにより形成させることが報告されているため、各シグナルの条件検討を行った。最後に副腎髄質、傍神経節が trunk neural crest が発生において背側から腹側に移動することから Factor X を分化誘導後期に加えたところ既報の分化誘導プロトコールと比較し、より短期かつ高効率に iPS 細胞を副腎髄質、傍神経節様細胞に分化誘導できることが明らかとなった。

新たな分化誘導法で作成したクロム親和性様細胞は invitro において未分化 iPS と比較し MIBG を取り込む傾向にあることが確認できた。健常者 iPS、疾患 iPS をその手法を用いて分化させた細胞を免疫不全マウスの腎被膜下に移植した。移植 3 か月後に、移植細胞を評価したところ、両 iPS 細胞由来の細胞は CgA, TH, FOX2B が陽性なクロム親和性細胞であると考えられた。重要な事として実臨床での組織マーカーである chromogranin A (CgA) も陽性であったことから、in vivo においてヒト PPGL の phenotype を再現できている可能性が高い。疾患 iPS 由来の移植片は健常者 iPS と比較し増大する傾向にあり、またマウス尿中のカテコラミン濃度の上昇傾向がみられた。

本研究では、RET (MEN2B) germline mutation を有する患者からの疾患特異的 iPSC を用いて実験を行っているが、これらの患者は PPGL の他に、甲状腺髄様癌、腎細胞癌なども発症する。従って、本研究でヒット化合物が得られた場合に PPGL のみならず、病因を同じくする他の癌腫においても有効性を示す波及効果が期待される。放射線内照射治療に関しては At-211 製剤の研究が進んでいるため、世界初のヒト褐色細胞腫 in vivo モデルにより同分野の研究が進展すれば、甲状腺癌や前立腺癌など、同治療法が有効とされる癌腫への応用が波及効果として十分に期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮脇良文
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いた褐色細胞腫株樹立に向けた新規分化誘導法の開発
3. 学会等名 日本分子生物学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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