

令和 6 年 5 月 5 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09123

研究課題名（和文）生体内ゲノム編集による小児脳幹膠芽腫モデルの開発と腫瘍発生増殖メカニズムの解明

研究課題名（英文）Development of glioblastoma model by in vivo genome editing

研究代表者

原 明（Hara, Akira）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10242728

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）：ヒストンH3K27M変異を導入したマウスグリア細胞（IG27細胞）を用いて、びまん性に浸潤する小児脳幹グリオーマのマウスモデルを作成した。このモデルは、腫瘍細胞の神経周囲浸潤と血管周囲浸潤を再現し、グリオーマの神経周囲浸潤を3次元で初めて撮影することに成功した。IG27細胞ではグルコーストランスporter-1（Glut1）の発現上昇を認め、Glut1が神経周囲浸潤を制御していることが示唆された。さらに、DNP-MRIによるレドックス代謝イメージングにより、びまん性浸潤の評価が可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、小児脳幹グリオーマの病態解明と治療法開発に大きく貢献する成果である。ヒストンH3K27M変異を導入したマウスモデルを作製し、腫瘍細胞の神経周囲浸潤と血管周囲浸潤を再現したことで、この難治性腫瘍の病態をより深く理解することが可能となった。さらに、グルコーストランスporter-1（Glut1）が神経周囲浸潤を制御していることを明らかにし、新たな治療標的としての可能性を示した。また、DNP-MRIによるレドックス代謝イメージングにより、びまん性浸潤の非侵襲的評価法を開発した。これらの知見は、小児脳幹グリオーマの診断と治療の進歩に寄与し、患者の予後改善につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：A mouse model of diffusely infiltrating pediatric brainstem glioma was established using mouse glial cells (IG27 cells) harboring the histone H3K27M mutation. This model recapitulated the perineuronal and perivascular invasion of tumor cells, and successfully captured the three-dimensional architecture of glioma perineuronal invasion for the first time. IG27 cells exhibited increased expression of glucose transporter 1 (Glut1), suggesting that Glut1 regulates perineuronal invasion. Furthermore, dynamic nuclear polarization (DNP)-MRI redox metabolic imaging enabled the assessment of diffuse infiltration.

研究分野：病理学

キーワード：グリオーマ びまん性浸潤

1. 研究開始当初の背景

小児脳幹グリオーマは予後不良な脳腫瘍であるが、その発生・増殖・浸潤のメカニズムはほとんど解明されていない。本腫瘍では、ヒストン H3F3A の変異を含む多彩な遺伝子異常が見られることが、主に死後の病理解剖で採取された標本解析から明らかとなっている。申請者の先行研究では、H3F3A-K27M 変異単独でマウス正常脳細胞から本腫瘍が発生し、in vitro で増殖能が亢進、in vivo で「びまん性」浸潤を示すことを見出した。この H3F3A-K27M 変異腫瘍細胞は、低酸素環境でも自律的に増殖可能であり、脳幹部という特殊な環境に適応した性質を有していた。しかし本腫瘍の多彩な遺伝子変異の組み合わせによる影響は不明である。一方、遺伝性疾患治療を目的に開発された"生体内"ゲノム編集技術は、アデノ随伴ウイルスベクターとゲノム編集ツールを用いて、生体内の細胞に直接ゲノム編集を導入できる画期的な手法である。本技術は、複数の遺伝子変異を同時に導入でき、腫瘍の不均一性も再現可能と考えられる。以上の背景から、"生体内"ゲノム編集技術を用いて小児脳幹グリオーマの多彩な遺伝子変異を再現する新規マウスモデルを樹立し、その病態解明と治療法開発を目指すに至った。

2. 研究の目的

- (1) "生体内"ゲノム編集技術を用いて、小児脳幹グリオーマの多彩な遺伝子変異を再現するマウスモデルを作製する。
- (2) 確立したマウスモデルを用いて、腫瘍発生から浸潤に至る過程の特性を経時的に解明する。特に、腫瘍および周囲環境の組織学的・分子生物学的変化に注目する。モデルから得られた腫瘍検体を用いて、新規バイオマーカーや治療標的を探索する。
- (3) 本モデルは、ヒト腫瘍の遺伝子変異と病理像を再現する世界初の小児脳幹グリオーマモデルとなる。更に、生体内ゲノム編集の技術基盤は、将来の遺伝子治療開発にも寄与しうる。また、本腫瘍の解析を通して、小児がんに共通する発生メカニズムの解明も期待できる。

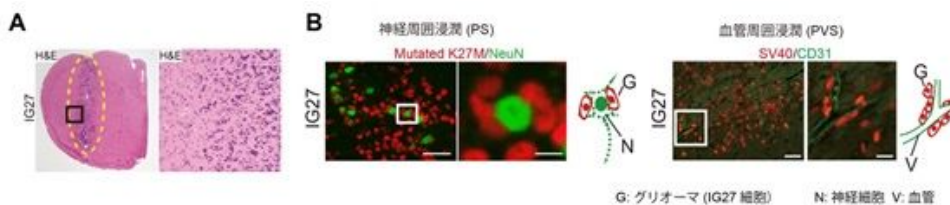
3. 研究の方法

- (1) 遺伝子変異に基づく小児グリオーマ細胞株の作製
申請者の先行研究で樹立した H3F3A-K27M 変異マウス脳腫瘍細胞に、ヒト腫瘍で見られる他の遺伝子変異を CRISPR-Cas9 システムで導入し、脳移植により表現型を解析する。
- (2) "生体内"ゲノム編集による新規小児グリオーマモデルマウスの作製
H3F3A-K27M 変異単独、あるいは他の変異と組み合わせたゲノム編集システムをアデノ随伴ウイルスベクターに搭載し、胎仔マウス脳室に投与することで"生体内"ゲノム編集を行う。経時的に脳組織を採取し、腫瘍の特性を病理学的・分子生物学的に解析する。
- (3) 小児グリオーマモデルでの腫瘍特性解析
研究計画 1、2 で確立したモデルの中からヒト腫瘍に近い形質を示すものを選択し、次世代シーケンス解析により新規バイオマーカー・治療標的を探索する。各研究計画においては、ゲノム編集の副作用防止やモデル作製の効率化など、様々な工夫を凝らす。ヒト検体を用いた多角的な検証も並行して進め、モデルの妥当性を担保する。

4. 研究成果

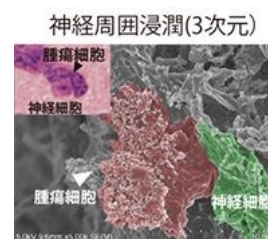
ヒストン H3K27M 変異を、マウスグリア細胞へ遺伝子導入した。確立できたマウス H3K27M 変異導入グリア細胞 (IG27 細胞) をマウス頭蓋内へ移植し、PS を伴うびまん性グリオーマのマウスモデル作成に成功した(図 1:右図:頭蓋内に移植したヒストン H3K27M 変異遺伝子導入マウスグリア細胞 (IG27 細胞))

A. 集塊を作らず、びまん性に浸潤するグリオーマを発生させた。B. 神経周囲浸潤と血管周囲浸潤を示した。IG27 細胞 (赤) と神経細胞 (NeuN、緑)、血管 (CD31、緑))



このモデルは 80 年前に提唱されたシェラーの 2 次構造を病理組織学的に再現した。腫瘍細胞と神経細胞の接着をより詳細に検証するために、電子顕微鏡を用いて観察したところ、グリオーマの PS を初めて 3 次元で撮影することに成功した(図 2:右図:走査型電子顕微鏡で撮影した神経周囲浸潤の 3 次元像。腫瘍細胞は、IG27 細胞) IG27 細胞の網羅的遺伝子解析のためマイクロアレイを行ったところ、

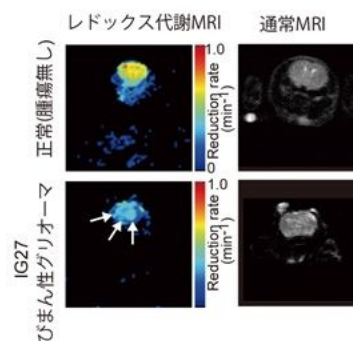
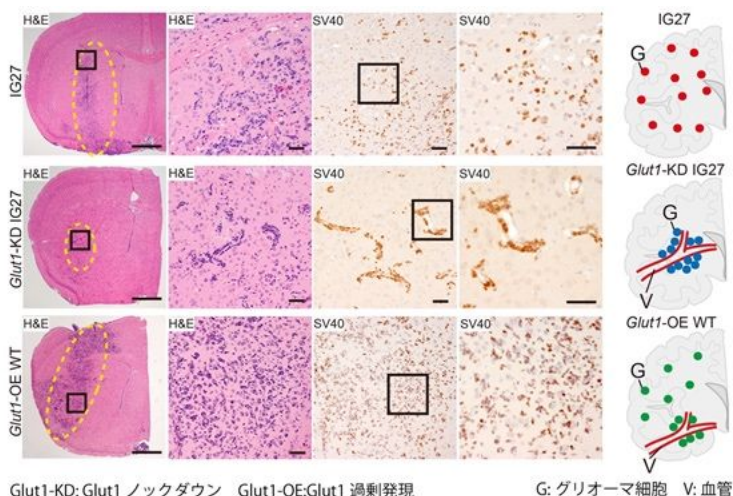
神経周囲浸潤(3次元)
腫瘍細胞
神経細胞
腫瘍細胞
神経細胞
5.0kV 2.0mm x5.00k 50.0um



IG27 細胞は野生型細胞と比較してグルコーストランスポーター1(Glut1)の上昇を認めた。shRNA を用いた Glut1 ノックダウン IG27 細胞、発現プラスミドを用いた Glut1 発現過剰野生型細胞を作製し、マウス脳に移植した結果、Glut1 抑制 IG27 細胞は通常 IG27 細胞と比較し、生着腫瘍細胞数が有意に減少し、PS の頻度が有意に減少した。さらに Glut1 発現過剰野生型細胞で PS の再現性を認めた。これにより Glut1 が PS を制御していることが示された。(図 3: 右図:グルコーストランスポーター-Glut1 によって制御されるびまん性浸潤 (IG27 細胞のグリオーマモデル))

また、ヒトグリオーマ組織 66 例で GLUT1 の発現を免疫組織化学で評価したところ、44 例 66.7%で陽性となり、多変量解析の結果、GLUT1 陽性症例で有意に無増悪生存期間が短縮した。

さらに、IG27 グリオーマモデルを用いて dynamic nuclear polarization (DNP) -MRI によるレドックス代謝の評価を行った。その結果、従来の MRI による形態的な診断では描出できなかったびまん性浸潤を DNP-MRI によるレドックス代謝で検出が可能となった(図 4: 右図: レドックス代謝をとらえた DNP-MRI 画像(左)と通常の MRI 画像(右)。レドックス代謝をとらえた DNP-MRI では、びまん性浸潤の広がりに基づく脳内レドックス代謝変動を描写している(白い矢印で囲んだ水色の範囲)。



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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyai Masafumi, Iwama Toru, Hara Akira, Tomita Hiroyuki	4. 巻 193
2. 論文標題 Exploring the Vital Link Between Glioma, Neuron, and Neural Activity in the Context of Invasion	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2023.02.018	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 -

〔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
研究 分 担 者	富田 弘之 (Tomita Hiroyuki) (50509510)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	

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