

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：82611

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20853

研究課題名（和文）小児脳腫瘍におけるSRCシグナルによる発がん機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of Oncogenic Mechanism by SRC Signaling in Pediatric Brain Tumors and Development of Novel Therapy

研究代表者

足立 透真（Adachi, Toma）

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 病態生化学研究部・リサーチフェロー

研究者番号：70911973

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において申請者は電気穿孔法によって作出したそれぞれのモデルマウスを用いて、髄芽腫と小脳膠芽腫、それぞれの脳腫瘍の性質を分子レベルで解明することを目指した。胎生期のマウス小脳において遺伝子A、Bを同時に過剰発現した際に、神経芽細胞由来とされる髄芽腫ではなく、オリゴデンドロサイト由来と見られる膠芽腫の誘導が確認された。さらに申請者は、異なる細胞種特異的な遺伝子A、Bの活性化によって、異なる脳腫瘍である髄芽腫と小脳膠芽腫がそれぞれ形成されることを確認した。これらの結果を踏まえて、申請者は小脳の特に発生期において細胞が分化転換を引き起こす現象に着目し、研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児脳腫瘍は稀少癌であるが、小児のがんのうち最も死亡率が高く、効果的な治療法を探索・開発していくべき疾患のひとつである。小児脳腫瘍のうち小脳に生じる Group4 髄芽腫や小脳膠芽腫は非常に悪性度が高いが、適切な脳腫瘍モデルマウスが少なく、発がんシグナルの同定などの基礎研究が滞っているのが現状である。本研究では、世界で初めて Group4 髄芽腫や小脳膠芽腫を作出してきた研究チームに所属する申請者が、それぞれの脳腫瘍モデルマウスを用い、腫瘍形成の分子メカニズムの解明に取り組む新規性の高い研究である。

研究成果の概要（英文）：In this study, applicant sought to elucidate the nature of medulloblastoma and cerebellar glioblastoma at the molecular level using mouse models of each type of brain tumor generated by electroporation. Simultaneous overexpression of genes A and B in the cerebellum of embryonic mice induced oligodendroglial cell-derived glioblastomas rather than neuroblastoma-derived medulloblastomas. Furthermore, activation of different cell type-specific genes A and B induced the formation of distinct brain tumors, medulloblastoma and cerebellar glioblastoma, respectively. Based on these results, the applicant focused on the phenomenon of cell trans-differentiation in the cerebellum, especially during development.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：Group4 髄芽腫 小脳顆粒細胞前駆細胞 グリア細胞 分化転換

1. 研究開始当初の背景

小児脳腫瘍は稀少癌であるが、小児のがんのうち最も死亡率が高く、効果的な治療法を探索・開発していくべき疾患のひとつである。一方で、稀少癌であるがゆえに製薬企業の視点からみるとマーケットの規模が小さく、今後もアカデミアと企業が密に連携して小児脳腫瘍研究を推進していく必要がある。小児脳腫瘍のうち小脳に生じる **Group4** 髄芽腫や小脳膠芽腫は非常に悪性度が高い脳腫瘍である。これらの腫瘍は発生部位や形態学的な違いを基に病理学的に分類されてきたが、同じ腫瘍と診断された場合でも放射線治療や化学療法に対する感受性が異なることが多い。その理由として、個々の患者ごとに特徴的な様々な遺伝子変異が原因となり、異なる分子シグナルががんの増殖を制御している可能性が提唱されている。したがって個々の腫瘍の特徴を分子レベルで正しく理解し、腫瘍の特徴に応じた個別化治療を行う必要がある。分子レベルでの病態の解明のために、最も活用される方法の一つは、モデルマウスの作出と解析である。しかしながら、小児脳腫瘍においては、適切な脳腫瘍モデルマウスが少なく、発がんシグナルの同定などの基礎研究が滞っているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小脳で生じる **Group4** 髄芽腫と小脳膠芽腫において、腫瘍形成の分子メカニズムを解明することである。詳細は後述するが、申請者は本研究課題で実施した実験により、異なる胎仔小脳の細胞種において遺伝子 **A**、**B** を活性化させることで、髄芽腫と小脳膠芽腫という全く異なる腫瘍が形成されることを確認している。同一の発がんシグナルが異なる腫瘍を生み出す現象はいくつかの脳腫瘍で報告されていたが、その分子機構を詳細に評価したものはほぼ皆無であった。本研究においては、それぞれの腫瘍におけるタンパク質 **A**、**B** の結合分子、及びタンパク質 **A**、**B** の活性化により発現変動する下流分子を網羅的に調査することにより、それぞれの腫瘍形成や悪性化において重要な分子を同定し、新規の治療標的を見出すことを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、世界で初めて **Group4** 髄芽腫(Forget et al. *Cancer Cell* 2018)や小脳膠芽腫(Kratochvill et al. *Cell Rep.* 2015)のモデルマウスを作出してきた研究チームに所属する申請者が、それぞれの脳腫瘍モデルマウスを用い、腫瘍形成の分子メカニズムの解明に取り組む。以下の三つの方法によって研究を進めていく。

- ① 申請者は先行実験によって、胎生期のマウス第四脳室への遺伝子 **A**、**B** の導入が、異なる脳腫瘍である **Group4** 髄芽腫と小脳膠芽腫を生み出すことを見出ししていた。申請者はこの結果は、おそらく遺伝子導入された細胞種のうち、がん化する細胞種がその都度異なるためなのではないかと予想した。そこで、**Cre-LoxP** システムを用いて胎仔小脳の細胞種特異的に遺伝子 **A**、**B** を活性化させ(**Loxp-stop-Loxp-A**、**Loxp-stop-Loxp-B** の導入)、**Group4** 髄芽腫と小脳膠芽腫がそれぞれどの細胞由来で形成される脳腫瘍なのかを同定することを目指す。
- ② 第二に、申請者は遺伝子 **A**、**B** に **FLAG** タグと **HA** タグを融合させた融合遺伝子を用いて腫瘍形成を誘導したのち、腫瘍組織を採取して抗 **FLAG** 抗体と抗 **HA** 抗体を用いて免疫沈降法と質量分析法を組み合わせ、**A**、**B** の結合分子を同定する。同時に、腫瘍組織のリン酸化プロテオミクスを行い、両方の研究結果とヒト脳腫瘍における遺伝子発現を総合的に比較・検討することで、タンパク質 **A** の下流分子を同定する。次に、結合候補分子や下流分子に対しての抗体を用いた免疫沈降を行い、回収した産物におけるタンパク質 **A**、**B** のウェスタン・ブロッティング法による検出や、結合候補分子に対しての抗体と、抗 **FLAG** および抗 **HA** 抗体を用いた免疫組織染色によって、腫瘍組織における **A**、**B** と候補分子の共局在をヒト・マウス両方の腫瘍組織を用いて確認する。
- ③ **A**、**B** と共に、②で同定した新規結合分子、下流分子を標的とした **sgRNA** を導入することで、標的分子の **CRISPR-Cas9** ゲノム編集による遺伝子ノックアウト(KO)を行い、**A**、**B** の腫瘍誘導活性の変化を解析する。また、②で同定した **A**、**B** の下流因子がヒト脳腫瘍でも腫瘍増殖を担っているかを検証するために、ヒト **PDX** モデルに対し、レンチウイルスを用いた **CRISPR-Cas9** ゲノム編集により標的分子を **KO** したのち、免疫不全マウスに再移植して、腫瘍増殖における影響を生体内で解析する。

4. 研究成果

申請者は本研究において、胎生期のマウス小脳で遺伝子 **A**、**B** を同時に過剰発現した際に、神経芽細胞由来とされる髄芽腫だけではなく、グリア由来と考えられてきた膠芽腫が誘導されることを確認した。また、興味深いことに、小脳から単離した **GNP** を培養し、培養条件下においてウイルスによって遺伝子 **A**、**B** を活性化させたところ、わずか **48** 時間後に、培養している **GNP** がオリゴデンドロサイトおよび膠芽腫の分子マーカーである **OLIG2** を発現することを示した。詳細な解析から、この現象は **GNP** からのオリゴデンドロサイトへの分化転換であることがわかった。このことから、胎生期のマウス小脳で遺伝子 **A**、**B** を同時に活性化した結果形成された小

脳膠芽腫は GNP 由来の膠芽腫である可能性が示唆された。さらに申請者は、Cre-LoxP システムを用いて胎仔小脳の細胞種特異的に 遺伝子 A、B を 活性化させる実験によって、細胞腫特異的に遺伝子 A、B を活性化させることで、髄芽腫と小脳膠芽腫が異なる細胞種から生み出されていることを示唆する結果を得ている。これは、同一の組織内において、同一の発がんシグナルが異なる腫瘍を生み分ける稀な現象であると言える。これらの結果を踏まえて、申請者は小脳の、特に発生期において細胞が分化転換を引き起こす現象に着目し、A、B の結合タンパク質と下流分子に関して、がん原遺伝子を中心として着目し、研究を実施している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tuyu Zheng, , , , Toma Adachi, , , , Kristian W. Pajtler	4. 巻 Sep;11(9)
2. 論文標題 Cross-species genomics reveals oncogenic dependencies in ZFTA/C11orf95 fusion-positive supratentorial ependymomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 2230-2247
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-20-0963	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

1. 著者名 Dewa Ken-ichi, Arimura Nariko, , , Adachi Toma, , , Kaibuchi Kozo, Watanabe Masahiko, Koizumi Schuichi, Yuzaki Michisuke, Hoshino Mikio	4. 巻 15
2. 論文標題 Neuronal DSCAM regulates the peri-synaptic localization of GLAST in Bergmann glia for functional synapse formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-44579-z	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6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 足立透真, 一條研太郎, 大輪智雄, 長谷川生子, 井上由紀子, 中村卓郎, 井上高良, 星野幹雄
2. 発表標題 小脳アストログリア細胞の発生における転写因子MEIS1の機能解析
3. 学会等名 第16回神経発生討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足立透真, 一條研太郎, 大輪智雄, 長谷川生子, 井上由紀子, 中村卓郎, 井上高良, 星野幹雄
2. 発表標題 小脳グリア細胞に発現するMEIS1タンパク質の小脳発生期における機能解明
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Toma Adachi, Kentaro Ichijo, Tomoo Owa, Satoshi Miyashita, Ji Kaiyuan, Minami Mizuno, Ikuko Hasegawa, Yukiko Inoue, Takuro Nakamura, Takayoshi Inoue, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Function of transcription factor Meis1 in the differentiation of Bergmann glia from astroglial progenitor
3. 学会等名 17th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry (APSN2023), Invited Young Investigators' Colloquium 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足立透真, 一條研太郎, 大輪智雄, 宮下聡, Ji Kaiyuan, 水野美波, 長谷川生子, 井上由紀子, 中村卓郎, 井上高良, 星野幹雄
2. 発表標題 小脳アストログリア細胞の発生における転写因子MEIS1の機能解析
3. 学会等名 第46回日本神経科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Toma Adachi, Kentaro Ichijo, Tomoo Owa, Satoshi Miyashita, Kyoka Suyama, Ji Kaiyuan, Minami Mizuno, Ikuko Hasegawa, Yukiko Inoue, Takuro Nakamura, Takayoshi Inoue, Mikio Hoshino
2. 発表標題 Functional elucidation of the transcription factor MEIS1 during fate determination of cerebellar astroglial cells
3. 学会等名 Society for neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 足立透真, 一條研太郎, 大輪智雄, 宮下聡, 陶山京香, Ji Kaiyuan, 水野美波, 長谷川生子, 井上由紀子, 中村卓郎, 井上高良, 星野幹雄
2. 発表標題 小脳発生期のアストログリア生み分け機構についての研究
3. 学会等名 第46回日本神経組織培養研究会
4. 発表年 2023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
---------	---------