

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501324

研究課題名(和文) 散発性小脳髄芽腫発生モデルの構築とがん微小環境の作用

研究課題名(英文) Progression of the sporadic medulloblastoma and its interaction with the microenvironment in a mouse model system.

研究代表者

柳沼 克幸 (YAGINUMA, Katsuyuki)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 細胞生物部・研究員

研究者番号：40182307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：散発性髄芽腫のマウスモデルを構築し、がん抑制遺伝子であるPatched1(Ptc1)の遺伝子型の違いが腫瘍進展に影響を及ぼす現象に注目して、Ptc1遺伝子量の差異が腫瘍の発生だけでなく、腫瘍進展に関わる微小環境の形成においても重要な役割を果たすことを示した。遺伝子発現解析から、Ptc1(+/-)の小脳組織では免疫応答サイトカインCXCL9の発現が亢進しており、また、発生した髄芽腫組織内では、同様のCXCL10が発現亢進していることから、これらをリガンドとするCXCR3リセプターのシグナル経路活性化が、脳内免疫系のmicroglia細胞を介して、腫瘍微小環境を形成している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A mouse model for sporadic medulloblastoma has been successfully established. Progression of medulloblastoma in the cerebellum tissue was observed to be affected by the genetic background of a model mouse, implicating that the gene dosage of the tumor suppressor gene, Patched1 (Ptc1), has a critical role not only for tumor formation, but for tumor microenvironment. In the cerebellum of Ptc1(+/-) mice, expression of CXCL9 for immune response is elevated significantly, and CXCL10 is also highly expressed in the tumor tissue itself. These chemokines are specific ligands for activation of the CXCR3 receptor signaling pathway, and it was suggested that this pathway is critically involved in forming a microenvironment for tumor progression through the regulation of the microglia-mediated immune response.

研究分野：実験腫瘍学

キーワード：がん抑制遺伝子 Patched1 Medulloblastoma 腫瘍微小環境 CXCR3 receptor signaling 腫瘍モデル
マウス

1. 研究開始当初の背景

ヒトの腫瘍では、遺伝的要因による微小環境が腫瘍形成に不可欠であることを示唆する具体的な症例として、autosomal dominant cancer predisposition syndrome の典型である、Neurofibromatosis type1(NF1)が知られている。NF1 のモデルマウスの実験から、がん抑制遺伝子である Neurofibromin の両アレルの欠失が、腫瘍前駆細胞系列の増殖を活性化し、腫瘍前駆細胞のプールを形成するが、それだけでは、腫瘍の形成に不十分であり、腫瘍前駆細胞を取り囲む Neurofibromin のヘテロ接合体組織に由来する微小環境因子が腫瘍の進展に必要であることが報告されている()。

本研究代表者は、NF1 と同様に cancer predisposition syndrome である母斑様基底細胞腫症候群(Nevoid basal cell carcinoma syndrome:NBCCS)(別名、Gorlin's syndrome)の患者に発症する小脳髄芽腫(Medulloblastoma)においても、これまでのモデルマウスの研究から、原因遺伝子であるがん抑制遺伝子 Patched1 (Ptc1)の遺伝子型の違いによって、モデルマウスでの腫瘍の進展に差異がみられる予備的な結果を得ていたことから、Patched1 の遺伝子型に起因する組織環境因子が腫瘍の形成に影響を及ぼしている可能性があると考えた。また、他の研究者からも、Medulloblastoma について微小環境因子の関与が示唆されるとする報告がなされている()。

2. 研究の目的

ヒトがんに対応するマウスモデルを利用した、腫瘍の形成と増殖に対する周囲を囲む間質細胞の役割の研究は、腫瘍の生物学的側面に関する知見をもたらすし、新規の治療標的分子の同定にもつながる。本研究では、Ptc1 遺伝子の欠損をがん抑制遺伝子変異の一例として、それを原因とする非遺伝的な散発性

髄芽腫(Sporadic Medulloblastoma)発生モデルを構築し、腫瘍形成に至る過程とそれを囲む周辺組織の相互作用の組織学的解析と、腫瘍形成に対して促進的あるいは抑制的に働く周辺組織由来のがん微小環境因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

小脳組織の局所域への Tamoxifen 投与による遺伝子変異導入法、あるいは、Ptc1 変異細胞の移植法によって、散発性髄芽腫(Sporadic Medulloblastoma)発生モデルマウスを作製し、腫瘍の発生過程を解析できる実験システムを構築する。このモデルシステムを用いて、Medulloblastoma の腫瘍前駆細胞の出現から腫瘍形成に至る過程を組織学的に解析し、腫瘍進展に対する周囲組織の影響を解析する。がん微小環境の解析には、異なる遺伝的背景がもたらす周囲組織環境と腫瘍細胞の増殖との相互作用について、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現の解析から候補遺伝子を抽出して、腫瘍形成能との関連を検証する。

4. 研究成果

(1) 散発性 Medulloblastoma を発生するマウスモデルシステムの構築

散発性 Medulloblastoma を発生するマウスモデルシステムの構築を目的として、新たに作製した、野生型の Ptc1(S/S)/R26CreERT2 マウスの小脳組織に、腫瘍前駆細胞の Ptc1 遺伝子変異導入細胞を出現させる方法として、4OHT(Tamoxifen)を含む微小粒子を組織内に移植し、その周辺細胞の CreER を活性化する手法を行った。また、別の手法として、in vitro 培養で Ptc1 変異を導入した小脳外顆粒層細胞(EGL)を野生型マウスの小脳に局所注入する方法も採用した。二つの方法とも、移植直後には、小さな増殖巣が出現することが観察されたが、強いアポトーシスシグナルが検出されて腫瘍形成まで至らない現象の

みが観察された。免疫組織学的な解析からは、増殖巣への免疫細胞マイクログリアの激しい侵入現象がみられて増殖阻害が起きていることが判明し、腫瘍発生過程の解析を困難にしていた。

この腫瘍形成が持続されない原因としては、変異細胞の生存活性の低下が考えられたため、活性低下抑制の方策として、*in vitro* 培養過程を省略して、小脳組織から直接に変異細胞を調整する方法を考案した。具体的には、小脳摘出前の個体の段階で Tamoxifen 処理を行って Ptc1 変異を誘導し、その後摘出した小脳組織から細胞を調製してマウスの小脳に注入する方法をとった。結果は、注入後約 1 ヶ月以降から腫瘍の発生がほぼすべてのマウスで観察されることが判明し、散発性の腫瘍モデルシステムとしてはこれまでにない良好な経過を示した。この実験で発生した腫瘍には共通して特徴的な形態がみられたことから、腫瘍の周囲の微小環境との相互作用が影響している可能性が示唆された。

このマウスモデル実験系を構築できたことで、被移植マウスの Ptc1 アレルが野生型マウスと、変異型 Ptc1 をもつヘテロ接合体マウスを用いて、その異なる微小環境下における小脳腫瘍形成について検討することが可能となった。

(2) 腫瘍の進展過程と微小環境の相互作用

Ptc1 変異を導入した小脳顆粒細胞を小脳に注入する腫瘍進展モデルマウス実験系を、Ptc1 アレルに変異のない野生型マウスと、変異型 Ptc1 をもつヘテロ接合体マウスに適用して、異なる微小環境下における小脳腫瘍の進展過程を解析した。野生型マウスでは、強い炎症反応で増殖阻害が起きるために、小脳組織内での腫瘍増殖は観察されない。一方、Ptc1 ヘテロ接合体マウスでは、小脳組織内での増殖が高い確率で観察され、Ptc1 ヘテロ接合体性 (Ptc1 遺伝子量の半減) が腫瘍増殖を維

持する微小環境をもたらしている可能性が示唆された。免疫組織学的解析からは、Ptc1 ヘテロ接合体性の条件下で、腫瘍組織に浸潤してくる microglia 細胞に、炎症反応ではなく腫瘍増殖促進的に作用する M2 タイプの microglia 細胞への変化が起きている現象が観察された。

この微小環境の差異を明らかにする目的で、マイクロアレイによる遺伝子発現の比較解析をしたところ、Ptc1 ヘテロ接合体の小脳組織内で免疫応答に関与するサイトカイン CXCL9 の発現が亢進しており、また、発生した髄芽腫組織内では、同様のサイトカイン

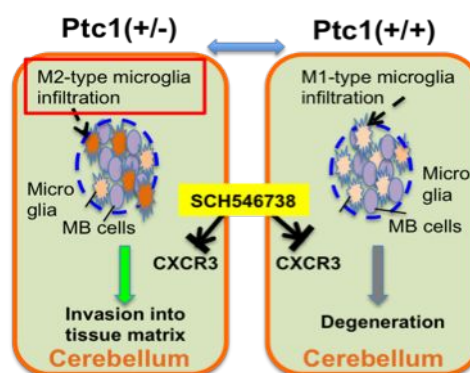


図1 髄芽腫形成における腫瘍微小環境

CXCL10 が発現亢進していたことから、これらのサイトカインを特異的なリガンドとする CXCR3 リセプターのシグナル経路の活性化が、脳内免疫系の microglia 細胞を介して、腫瘍進展のための微小環境を形成している可能性が示唆された。

さらに、モデルマウスを用いて CXCR3 リセプターの特異的阻害剤の投与実験を行った結果、小脳に移植された腫瘍の進展が抑制される現象がみられたことから、CXCR3 リセプターシグナル経路が、腫瘍の進展に直接関係していることが示唆された。

現時点では、Patched1 遺伝子と CXCR3 リセプター遺伝子の直接的な機能の関連を示す報告はなされていないが、Medulloblastoma と同様に、Ptc1 遺伝子を原因遺伝子とする

Basal cell carcinoma (BCC)では、腫瘍組織と腫瘍周辺組織において、CXCR3 リセプターとリガンドであるサイトカイン遺伝子の発現が亢進し、腫瘍増殖に関わる重要な役割を果たしているとする実験結果が報告されている()。

今回の研究は、Patched1 遺伝子が、Shh (Sonic hedgehog) シグナル経路の Shh レセプター因子としてだけでなく、生体内の組織環境制御ネットワークにおいても、がんの抑制遺伝子として作用する新規の機能とその分子機構の解明に至る端緒を開くものと考えている。

<引用文献>

F-C Yang, D. A. Ingram, S. Chen, et al. *Nf1*-Dependent tumors require a microenvironment containing *Nf1*^{+/-} and c-kit-dependent bone marrow. *Cell* 135, 2008, 437-448.

J.B.Rubin, Only in congenial soil: The microenvironment in brain tumorigenesis. *Brain Pathology* 19, 2009, 144-149.

Lo BK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ. CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol.* 176, 2010, 2435-46.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計3件)

柳沼 克幸、「小脳 Patched1 遺伝子の散発的不活化と髄芽腫の発生」第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道、札幌市)

柳沼 克幸、「モデルマウスの髄芽腫発生過程における免疫応答」第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

柳沼 克幸、「小脳髄芽腫の散発性マウスモデルを用いた腫瘍微小環境の解析」第

73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳沼 克幸 (YAGINUMA Katsuyuki)

(公益財団法人)がん研究会がん研究所・細胞生物部・研究員

研究者番号：40182307