

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670726

研究課題名(和文) 表面抗原発現パターンの解析による網膜芽細胞腫の病型分類の試みと治療戦略への応用

研究課題名(英文) Analysis of expression of Cd antigens in retinoblastoma, and its application for disease classification and therapeutic strategy

研究代表者

渡邊 すみ子 (sumiko, watanabe)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60240735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：網膜のがんとして最も頻度が高い網膜芽細胞腫は、生存予後は高いがまだ眼球摘出に至ることが多い。網膜芽細胞腫は病理像が異なる表現型をしめす複数病型があるが、他のがんのような遺伝子レベルの知見を背景にした病型の分類は知られていない。本研究では、細胞表面にでている蛋白質である表面抗原の発現パターンを摘出網膜芽細胞腫について解析し、未分化型、分化型ではことなる表面抗原の発現パターンを示すことが明らかになり、病型分類に利用できる事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Retinoblastoma is the most frequent cancer in the eye. Retinoblastoma showed different pathological types, but there is no classification based on knowledge of gene information such as mutation, or translocation. Cell surface antigens are proteins that expressed in cell surface, and can be used for identification and purification of certain subset of cells. We analyzed expression pattern of Cd antigens in patient derived retinoblastoma clinical samples, and found that different expression patterns of Cd antigens in different pathological featured retinoblastoma. These results suggested information of expression pattern of Cd antigens can be used for diagnosis and planning of therapeutic strategy,

研究分野：分子生物学

キーワード：網膜 腫瘍 表面抗原

## 1. 研究開始当初の背景

網膜のがんとして最も頻度の高い網膜芽細胞腫(Retinoblastoma)は生後2,3歳で発見に至ることの多い小児のがんで、先進国においては生存率は90%以上と高いが、多くの場合、眼球摘出となる疾患である(5年眼球保存率は国立がんセンターの統計で、非進行例で約8割、進行例で約3割)。眼球摘出を回避するため選択的眼動脈注入などの試みが国立がんセンターを中心におこなわれているが、生命予後の重視から眼球摘出が選択される現状がある。治療法の選択は、がんの進行度を中心に判断されている。これは他のがんにおけるような、遺伝子変異との関連づけにおける病型の分類や治療法の選択の知見がないことに起因していると考えられる。網膜芽細胞腫には病理組織像から未分化型、分化型などの分類はあるものの、他のがんにみられるような、遺伝子レベルの知見にもとづいた病型分類はしられていない。一方、網膜芽細胞腫の原因遺伝子がRbであり、Rbがはじめて知られたがん抑制遺伝子として研究が集中、進展しているにもかかわらず、なぜRbの変異が網膜特異的に腫瘍を誘導するのか、という事は未だ明らかではない。またマウスではRb1の変異は他の遺伝子の代替的発現を誘導するため、それらの遺伝子の三重変異のマウスで検討せざるを得ないなどマウスでの研究には限界があり、網膜芽細胞腫の研究の進展の遅延の原因となっている。

## 2. 研究の目的

我々は網膜発生・分化を研究しているが、その過程で網膜の幹・プロジェニター細胞と細胞系譜を実体としてあきらかにするために、血液学的手法を用い、単細胞に分離したさまざまな発生段階のマウス網膜細胞を用いて、細胞表面の蛋白質(表面抗原)の発現パターンのスクリーニングを市販で入手可能なすべての抗原(約150種類)についておこないデータベースを構築した。特定のサブセットの網膜細胞に特異的に発現する表面抗原を多数同定し、それぞれの抗体で認識されるマウス網膜亜集団をセルソーターで純化し、その性質を検討した。これまでに網膜幹プロジェニター細胞、視細胞とその前駆細胞、グリア細胞とその前駆細胞に特異的な表面抗原を同定し、さらに多くの様々な細胞表面マーカーの網膜細胞での発現パターンを把握している。

我々はさらに霊長類での応用として、コモンマーモセットの網膜細胞を用いて、表面抗原の発現について検討し、その多くがマウスと発現パターンが共通であることを明らかにした。

以上の情報をヒトの病態に応用するために、網膜芽細胞腫の摘出臨床検体をもちいて予備的検討を行った。マウス、コモンマーモセットの網膜で得られた情報にもとづき、抗体を約20種類選択し、網膜芽細胞腫の摘出サンプルを染色しセルソーターで発現を検討した。その結果、約10種類の抗原が発現しており、また検体によって発現レベル、発現率などのパターンがことなることを見いだした。

この結果にもとづき、本提案では、網膜芽細胞腫の臨床サンプルについて表面抗原発現パターンの解析を行い、発現パターン、陽性細胞率などにより、網膜芽細胞腫の分類を試みる。一方で、細胞の培養をこころみ、株化可能であったものについて増殖能、増殖因子、抗がん剤への感受性などを検討する。

## 3. 研究の方法

網膜芽細胞腫の手術摘出サンプルについて表面抗原の発現パターン、増殖レベル、網膜細胞系列特異的タンパク質の発現パターンを解析しデータベースを構築していく。一方、摘出サンプルからの樹立細胞株の作成を試み、これができたなら、表面抗原発現パターン、増殖能、増殖阻害剤への感受性などの検討を行う。これらの情報と、臨床情報の表面抗原発現パターンとの相関関連を検討し、網膜芽細胞腫の病型分類を試み、治療戦略の検討に役立てる。また、受容体、接着分子などの発現パターンなども考慮し、試験管内の実験で新しい治療法樹立をめざした知見を得る。

## 4. 研究成果

網膜芽細胞腫の表面抗原発現パターンの解析：本研究は網膜芽細胞腫の臨床摘出サンプルをFACSにて表面抗原の発現を解析することが研究の中心となる。このため、計画では、網膜芽細胞腫摘出臨床サンプルについて、国立がんセンター、国立成育医療センターから提供をうけ解析する予定であった。しかしながら、全摘手術の減少傾向その他の理由により、適用となる提供が一例もなく、このため、他大学の眼科にも協力をもとめたが2年間の

間に臨床サンプルの入手が一例もなかった。このため、すでに予備実験で解析をおこなっていた4例について、発現している表面抗原をマウスの網膜で詳細に発現パターンを解析した。この結果、臨床像がaggressiveな一例については網膜プロジェニターで発現している表面抗原2種が強く発現しており、病理像的にはあまりaggressiveとは考えられない二例では、様々な分化網膜神経細胞に発現している表面抗原多数が発現していた。すなわち、未分化型と分化型では異なる表面抗原の発現パターンを示していた。このなかでも4例中3例で発現していたCXCR4についてマウス発生期の網膜で詳細な発現パターンを解析した。CXCR4はE15網膜で発現していたが、E18になると非常に強く発現レベルがあがり、生後数日間が最も強く発現している。この時期の網膜を視細胞(とその前駆細胞)とこの他の網膜神経細胞、グリア細胞にわけると、グリアの前駆細胞で非常に強く発現している事が明らかになった。視細胞では発現は極めて弱く、介在神経などの他の神経細胞では弱く発現していた。

細胞株樹立の試み：サイトカイン、フィーダー細胞などの様々な条件により細胞株の樹立をこころみだがバルクでの培養はできる例があるが、single cellからの株の樹立は不成功に終わった。表面抗原により細胞を単細胞に分離し、これらをさまざまな条件下で培養する、という試みも多数の条件でおこなったがやはり株の樹立にはいたらなかった。

CXCR4の網膜発生における役割の解析：CXCR4ノックアウトマウスの解析から、CXCR4が網膜プロジェニター細胞の増殖に関与することが示唆された。

タンパク質との共染色についての技術開発：細胞をdetergentで穴をあけ、細胞内タンパク質を抗体で染色し、表面抗原との共発現状態について様々な分画で検討し、基礎データベースを作成した。さらに、染色の条件検討をおこなって、細胞内蛋白質抗体で染めた後、セルソーターで細胞を分取し、その遺伝子発現を検討する事が可能になった。これにより、これまでマウス、マーモセットで発現の確認された表面抗原の多くは、発現が確認されただけで、どの系列のマーカーとなっているかはあきらかではない、という課題について、

遺伝子発現の検討により、明らかにすることが技術的に可能になった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Iida, A., Tabata, Y., Baba, Y., Fujii, T., Watanabe, S. (2014) Critical Roles of DNase1131 in Lens Nuclear Degeneration in Zebrafish, **Biochimie**, 106, 68-74

2. Iida, A., Iwagawa, T., Kuribayashi, H., Satoh, S., Mochizuki, Y., Baba, Y., Nakauchi, H., Furukawa, T., Koseki, H., Murakami, A., and Watanabe, S. (2014) Jmjd3 is required for the development of subsets of retinal bipolar cells, **Proc.Natl.Acad.Sci.,USA**, 111, 3751-3756

3. Kuribayashi, H., Baba, Y., Watanabe, S. (2014) BMP signaling participates in late phase differentiation of the retina, partly via upregulation of Hey2, **Developmental Neurobiology**, 74, 1172-1183

4. Koso, H., Tshako, A., Lyons, E., Ward, J. M., Rust, A. G., Adams, D. J., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Watanabe, S. (2014) Transposon mutagenesis identifies Foxr2 as a putative oncogene in medulloblastoma, **Can Res**, 74, 2351-2361

5. Mochizuki, Y., Iida, A., Lyons, E., Kageyama, R., Nakauchi, H., Murakami, A., Watanabe, S. (2014) Use of cell type-specific transcriptome to identify genes specifically involved in Müller glia differentiation during retinal development, **Dev Neurobiol**, 74, 426-437

6. Usui, A., Mochizuki, Y., Iida, A., Miyauchi, E., Satoh, S., Sock, E., Nakauchi, H., Aburatani, H., Murakami, A., Wegner, M., Watanabe, S. (2013) The early retinal progenitor-expressed gene Sox11 regulates the timing of the differentiation of retinal cells. **Development**, 140, 740-750

7. Iwagawa, T., Tanaka, Y., Iida, A., Itoh, T., Watanabe, S. (2013) Enhancer/promoter activities of the long/middle wavelength-sensitive opsins of vertebrates mediated by thyroid hormone receptor  $\beta$ 2 and COUP-TFII, **Plos One**, 8, e72065

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 すみ子 (WATANABE, Sumiko)  
東京大学・医科学研究所・特任教授  
研究者番号：60240735

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：