

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460398

研究課題名(和文) 多能性幹細胞の分化異常機構を標的とする結節性硬化症の治療薬開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic drugs targeting the mechanism of differentiation abnormality for tuberous sclerosis complex

研究代表者

小林 敏之 (Kobayashi, Toshiyuki)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40260070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝性難病である結節性硬化症(TSC)の新規治療標的分子の特定を目指し、細胞分化異常に着目して研究を進めた。まず、TSCの病態発生の動物モデルであるEkerラット(TSC原因遺伝子であるTsc2に変異を持つ)より、ES細胞を樹立することに成功した。さらに、Tsc2が完全に欠失している(ホモ変異)ES細胞も、通常のES細胞と同様に多様な細胞種に分化する能力を保持すること、しかし一部に野生型等では観察されない組織の様相を示すことを明らかにした。Tsc2遺伝子欠損による遺伝子発現異常と、その基盤となる後生的な発現制御機構(エピゲノム)の異常について、今後の治療標的の同定に有用な基礎データを得た。

研究成果の概要(英文)：To develop novel therapeutic target molecules for tuberous sclerosis complex (TSC), a hereditary intractable disease, we focused on the abnormal differentiation caused by deficiency of TSC gene (TSC1, TSC2). As a new cellular differentiation model, we established ES cell lines from the Eker rat (Tsc2 mutant). We confirmed that Tsc2-deficient (homozygous mutant) ES cells had an ability to differentiate into various cells from three different germ layers. However, we found that Tsc2-deficient ES cells developed abnormal tissue structures in teratoma formation experiments. We also identified differential gene expression between Tsc2-deficient- and wild-type ES cells. As a candidate for the molecular basis of aberrant differentiation and gene expression in Tsc2-deficient ES cells, we identified difference in epigenetic modification between Tsc2-deficient- and wild-type ES cells. These will be clues to find new target molecules for TSC therapy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：結節性硬化症 モデル動物 ES細胞 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

結節性硬化症(TSC)は、脳や腎臓など全身性に腫瘍性病変を発生し、常染色体優性遺伝形式をとる難病である。異なる2つの原因遺伝子である *TSC1* と *TSC2* は腫瘍抑制遺伝子の特徴を示し、いずれかの遺伝性の変異に加え、体細胞における野生型アレルの変異(セカンドヒット)により腫瘍発生が進行する。一方TSCは、てんかん・自閉症様症状などを高頻度に併発することでも知られており、その発生には、原因遺伝子のセカンドヒットを伴わない、ハプロ不全の機序が示唆されている。

我々がTSCモデルとして用いている Eker (*Tsc2* 変異)ラットやTSC遺伝子KOマウスのヘテロ変異体は、腎腫瘍のみならず、脾臓の血管腫などを発症するが、それらの発生にも原因遺伝子の2ヒットが関与する。ホモ変異体は胎生中期に致死となる。これらのモデル動物のヘテロ変異体は共に自閉症様の症状を示すものの、TSCに類似する脳内の結節や腫瘍性病変は、Ekerラットに特有に認められる。

TSC1 と *TSC2* の産物は複合体を形成し、細胞の増殖や代謝制御に中枢的な役割を果たすmTORキナーゼ複合体1(mTORC1)の抑制因子として働く。*TSC1* または *TSC2* の機能喪失によるmTORC1活性亢進が病態発生に関与することが明らかにされている。我々はmTOR阻害薬(ラパマイシン)投与により *Tsc2* 欠損腫瘍細胞の増殖が抑制されることを明らかにした。現在、TSC患者の腫瘍の治療にラパマイシン系治療薬が用いられている。一方我々は最近、KOマウスの自閉様症状がラパマイシン投与により改善することも報告し、ラパマイシン系治療薬によるTSCの精神神経症状の軽減の可能性を示した。しかし一方、動物実験や患者への投与において、腫瘍の縮小効果には限界があり、薬剤投与の中断により腫瘍が再増大する結果が示されている。また副作用の問題も払拭されておらず、新規の治療標的経路の解明が望まれているのが現状である。

2. 研究の目的

TSC患者やモデル動物に見られる、多様な細胞分化異常を示す腫瘍性病変や神経症状の発生機構を理解するためには、組織特異的な細胞分化過程の視点からの分析が不可欠である。そのために、病態発生の鍵となる細胞分化の異常現象を培養下に誘導できるシステムが有力なツールとなる。そのようなシステムができれば、治療薬のハイスループットなスクリーニングも可能となる。しかしながら現在まで主に用いられてきたのは線維芽細胞株や腫瘍細胞株であり、分化を分析するための良い培養細胞実験系は確立されていない。そこで、我々はその一つの候補として、TSC遺伝子に変異を持つ多能性幹細胞の分化誘導系を利用するシステムの構築を目指すこととした。その際、患者由来iPS細胞では、ホモ変異体細胞や、遺伝的背景を揃え

た野生型、ヘテロ変異体のセットを用いることは容易ではない。そこで我々はまず、脳症状などにおいてヒトに類似する Eker ラットを利用し、近年報告されたラットES細胞樹立法により、野生型(*Tsc2*^{+/+})、*Tsc2*ヘテロ(*Tsc2*^{+/-})、ホモ(*Tsc2*^{-/-})変異体の胚より多能性幹細胞(以下ES細胞)を樹立することを試みることにした。

3. 研究の方法

(1) ES細胞の樹立

Ekerラットのヘテロ接合体同士の交配を行い、交配が確認できたラットについて、交配後4.5日目に子宮角を培養液(N2B27)にて灌流することにより胎生4.5日目の胚盤胞を得た。ラットES細胞の樹立は、Buehrらの方法(参考文献1)に準じて行った。得られた胚盤胞の透明帯を酸性タイロードにて除去した後、4穴培養プレート内の2i培養液(1μM PD0325901: MEK阻害薬、3μM CHIR99021: GSK3阻害薬及びLIFを含むN2B27)内のコンフルエントになったマイトマイシンC処理MEF(胎生13.5日目の胎児線維芽細胞)上に胚盤胞を移した。培養開始5~7日目に同様の培養液中に継代し、その後、3~4日毎に継代する。ES細胞様コロニーの出現を確認した後、アルカリフォスファターゼ陽性の形質を活性染色法により確認した。また、各コロニーの一部よりDNAを抽出し、PCR法により遺伝子型(*Tsc2*ホモ変異、ヘテロ変異、野生型)を決定した。

(2) 分化実験

ES細胞の分化能は胚葉体誘導と奇形腫形成によって確認した。胚葉体は、低接着性プレート中で10日間培養した後、マトリゲル上に静置することにより誘導した。奇形形成は、5 x 10⁵個のES細胞をヌードマウスの時被膜下、あるいは1.5 x 10⁶個のES細胞をNOD/SCIDマウスの皮下に注入することにより行った。ラパマイシン投与は、注入5週間後に、1.5 kg/kg体重/隔日の投与量にて3回投与(1週間)を行った。組織試料は10%中性ホルマリンに固定し、パラフィン包埋標本作製して、組織分析に用いた。分化の様子について各胚葉の分化マーカーに対する抗体を、mTORC1経路の活性化について抗リン酸化S6抗体等を、その他各種抗体を用いた免疫染色を行って分析を行った。

(3) キメララット作製

Brown NorwayラットまたはWistarラットの胎生4.5日の胚盤胞を採取し、ES細胞を10-12個/胚で注入した後、レシピエントラットの子宮に戻した。死亡胎児、新生児の皮膚等よりDNAを抽出し、PCR法により*Tsc2*遺伝子型を分析した。

(4) 神経系分化誘導実験

神経系分化誘導実験については、Yingらの方

法(Nat Biotech 21:183-6, 2003)、Matsumotoらの方法(Stem Cell Rep, 8:422, 2016)をもとにした取り組みを行った。

(5) 遺伝子発現解析

遺伝子発現の網羅的分析は、アフィメトリックス社 GeneChip 1.0ST アレイを用いて行った。クラスタリング解析は GeneSpring ソフトウェア (Ver12.1) を用いて行った。RT-PCR は SuperscriptIII (Life Technologies 社)による逆転写により行った。qRT-PCR はアプライドバイオシステムズ社の Fast CYBR Green システムを用いて行った。

(6) ウェスタンブロット解析

ウェスタンブロットは定法により行い、mTOR 間連経路、各種ヒストン修飾部位に対する抗体を用いて行った。

4. 研究成果

(1) *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の樹立

本研究において、我々は世界ではじめて *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の樹立に成功し、報告することができた(業績論文 5)。*Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞は、野生型や *Tsc2* ヘテロ変異体 ES 細胞と同様に、培養下に Oct4、Sox2 や Nanog などの多能性幹細胞のマーカーを発現していた。胚葉体形成実験、免疫不全マウス個体における奇形腫形成実験において、三胚葉に由来する各種分化形質を持つ細胞・組織を形成し、多分化能を示すことがわかった。ウェスタンブロット解析によりリン酸化 S6 を調べたところ、*Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞は、培養下に mTORC1 の活性亢進を示すことが明らかとなった。この結果より、*Tsc2* が欠損し、mTORC1 活性が異常亢進しても ES 細胞の多分化能は失われないことが明らかとなった。これらの知見は、世界で初めて報告されたものである。

Tsc2 ホモ変異体 ES 細胞由来の組織を保持するキメララットは一つの有用な実験ツールとなる。しかしながらホモ変異体 ES 細胞由来の細胞を高い割合で保持するキメラは胎生期、発生直後に死亡することが示唆された(業績論文 5)。しかし、ES 細胞の寄与を少なくする工夫を行うことにより、今後展開が可能となった意義は大きい。

(2) *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の表現型分析

一方、*Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞は多分化能を示すものの、奇形腫において通常の分化組織の中に、野生型、*Tsc2* ヘテロ変異体異常な腺管様構造を発生することもわかった(図 1、

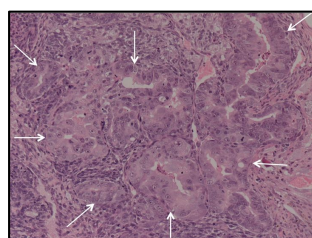


図 1 *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の奇形腫に認められる異常腺管様構造(矢印)

業績論文 3)。この異常な腺管様構造では S6 のリン酸化が亢進しており、mTORC1 活性化がその出現に参与していることが示唆された。実際、免疫不全マウスへのラパマイシン投与により、この異常腺管様構造は消失した。これらの結果から、*Tsc2* 欠損は ES 細胞の多分化能を失わせるものではないものの、特定の細胞系譜への分化の際に著しい影響を与えることが示唆される。異常腺管様構造がどのような性質を示すものか、分化マーカー等の免疫染色を行った調べたところ、腎上皮等の腺管のマーカーとして知られる cubilin と megalin が発現していることがわかった。また E カドヘリンと カテニンの膜への発現も弱いながら観察された。従って、何らかの上皮様の性質を示す系譜の異常であることが示唆された。また、一部に フェトプロテインの発現も観察された。胎児性腫瘍の発生も示唆されるものである。最終的に、異常腺管様構造がどのような分化系譜の異常から発生しているのか断定はできないが、この異常腺管構造の発生の基盤となっている分化異常は、TSC の細胞・組織特異的な腫瘍発生機構に密接に関連するものであることが想像される。

さらに特定の細胞系譜への分化誘導を行い、病態発生の基盤、新規治療標的を探索することを目的として、神経分化誘導に取り組んだ。しかしながら、野生型 ES 細胞を用いても効率的に分化誘導が生ずる条件を設定することは困難であった。この点は、残された課題と言える。

(3) *Tsc2* ホモ変異体 ES 細胞の遺伝子発現異常

培養 ES 細胞の遺伝子発現を網羅的に調べ、クラスタリング解析を行ったところ、野生型、*Tsc2* ヘテロ変異体細胞は類似の全体像を示し、ホモ変異体細胞とは異なる発現様式を示すことがわかった(図 2、業績論文 5)。すなわち、*Tsc2* 欠損により、遺伝子発現異常が惹起され、それが上記の分化異常の基盤とな

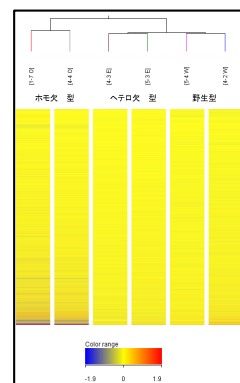


図 2 ES 細胞の遺伝子発現のクラスタリング解析

なっていることが示唆された。qRT-PCR により各遺伝子の発現差異を確認したところ、*Emp1*(Epithelial Membrane Protein 1 gene)、*Emp2*、*Dkk1*等の発現上昇、*Lefty2*等の発現低下が確認された。また、各種の初期発生、細胞分化に関わる転写因子の発現を調べたところ、*Cdx2*の発現がホモ変異体細胞で亢進していることも明らかとなった。これらのうち、*Cdx2* タンパクについては、奇形腫の異常腺管様組織において

発現が亢進している様子が免疫組織染色によって確認された。従って、*Cdx2* の異常発現が *Tsc2* 欠損による細胞分化異常に関与している可能性が示唆される。

一方、各種のエピゲノム修飾(ヒストン修飾)を調べたところ、*Tsc2* ホモ変異体細胞においてヒストン H3 のリジン 4 のトリメチル化が低下していることが観察された。このトリメチル化の状態はラパマイシン処理により、是正される傾向を認めた(図 3)。これらの結果は *Tsc2* ホモ変異体の遺伝子発現異常に mTORC1 経路依存的なヒストン H3 リジン 4 トリメチル化の低下が関わっていることを示唆する。

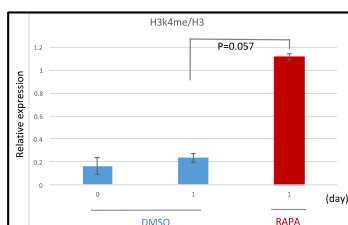


図3 ラパマイシン処理によるヒストン H3 リジン 4 トリメチル化の回復

現時点で、遺伝子発現の変化とヒストン H3 リジン 4 トリメチル化低下、*Cdx2* 発現亢進との関連は明らかとなっていないが、今後、TSC 遺伝子産物-mTORC1 経路による *Cdx2* 発現、エピゲノム修飾の制御機構、それらの下流における各種遺伝子発現制御機構と病態発生における役割の解明をさらに進めることにより、新規の TSC の治療標的分子の特定がさらに進むものと期待される。

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 8 件)

- (1) Hino O, Kobayashi T, Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor gene, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci* 118:5-11 (2017) (査読有り)
DOI:10.1111/cas.13116
- (2) Aizawa Y, Shirai T, Kobayashi T, et al. (11 人中 3 番目) The tuberous sclerosis complex model Eker (*TSC2*^{+/-}) rat exhibits hyperglycemia and hyperketonemia due to decreased glycolysis in the liver. *Arch Biochem Biophys* 590:48-55 (2016) (査読有り)
DOI:10.1080/09168451.2016.1165603
- (3) Kawano H, Tada N, Kobayashi T, et al. (9 人中 8 番目) Aberrant differentiation of *Tsc2*-deficient teratomas associated with activation of the mTORC1-TFE3 pathway. *Oncol Rep* 34:2251-2258 (2015) (査読有り)

DOI:10.3892/or.2015.4254

- (4) Sugiura H, Yasuda S, Kobayashi T, et al. (11 人中 8 番目) Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in tuberous sclerosis complex. *Nat Commun* 6:6842 (2015) (査読有り)
DOI:10.1038/ncomms7842
- (5) Ito Y, Tada N, Kobayashi T, et al. (10 人中 9 番目) Establishment of *Tsc2*-deficient rat embryonic stem cells. *Int J Oncol* 46:1944-1952 (2015) (査読有り)
DOI:10.3892/ijo.2015.2913

〔学会発表〕(計 10 件)

- (1) 西川桂子、小林敏之、樋野興夫:「ラット由来 *Tsc2* 欠損 ES 細胞にみられるエピゲノム・遺伝子発現異常」、第 40 回日本分子生物学会年会(2017 年度生命科学系学会合同年次大会)、2017 年 12 月 7 日、神戸
- (2) Kobayashi T, Hino O. Exploring the aberrant epigenetic regulation in tuberous sclerosis-associated pathologies using *Tsc2*-deficient rat embryonic stem cells. International Tuberous Sclerosis Complex Research Conference 2018, Lisbon, Nov 3-5, 2016
- (3) 小林敏之、小橋(張)丹青、樋野興夫:「*Tsc2* 欠損 ES 細胞を用いた結節性硬化症関連腫瘍発生のモデリング」、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日、横浜
- (4) 河野春奈、伊藤敬孝、小林敏之、樋野興夫、堀江重郎「腎癌モデル動物の幹細胞を用いた *Tsc2* 欠損による腫瘍発生機序の解明」、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術総会、2015 年 6 月 11 日、松山
- (5) 河野春奈、伊藤敬孝、堀江重郎、小林敏之、樋野興夫:「*Tsc2* 欠損胚性幹細胞の遺伝子発現異常」第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日、横浜

〔図書〕(計 1 件)

- (1) 「腫瘍病変発生モデル動物」小林敏之、樋野興夫、結節性硬化症の診断と治療最前線(日本結節性硬化症学会編、診断と治療社)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計0件）

6．研究組織

(1) 研究代表者

小林 敏之 (KOBAYASHI, Toshiyuki)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：40260070

(2) 研究分担者

小池 正人 (KOIKE, Masato)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80347210

(3) 連携研究者

多田 昇弘 (TADA, Norihiro)
順天堂大学・医学研究科・准教授
研究者番号：50338315

砂堀 毅彦 (SUNAHORI, Takehiko)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号：00407115

(4) 研究協力者

西川 桂子 (NISHIKAWA, Keiko)
順天堂大学・医学研究科・博士1年