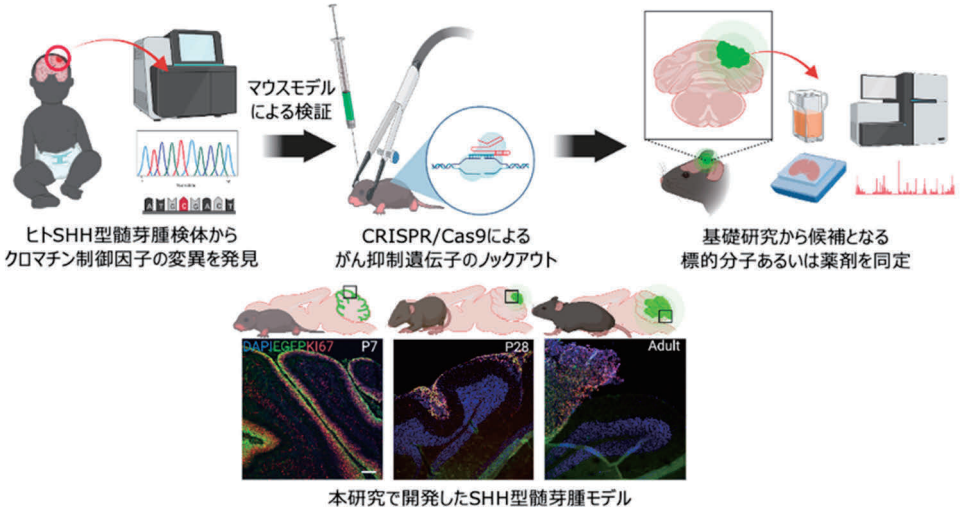
200　小児脳腫瘍のepigeneticな発がん機構の解明	川内　大輔

【目的】脳細胞の増殖と分化は遺伝子プログラムにより厳密に制御されており、遺伝子の突然変異などによるプログラムの破綻は時に脳腫瘍という難治がんを引き起こす。特に小児脳腫瘍は小児がんの中で最も致死率が高く、その効果的な治療法の確立が急務である。本研究で扱うソニックヘッジホッグ（SHH）型髄芽腫は、髄芽腫全体の約 30%を占め、細胞増殖シグナルとして知られる SHH シグナルが小脳顆粒細胞で異常活性することが原因で生じるとされる。個別化医療の戦略として SHH 阻害剤は化学療法の第一選択であるが、抵抗性や副作用の問題が無視できず、更なる治療標的の同定による薬剤の併用療法が期待されている。新しい治療標的の探索には SHH 型髄芽腫において高頻度で観察される遺伝子変異の機能解析が手がかりを与える。クロマチン制御因子の機能欠損変異はその代表的なものであり、髄芽腫においてエピジェネティックに制御される分子が発癌に寄与していることが示されつつあるが、生物学的研究から導かれる分子標的薬は未だ存在しない。本研究では、SHH 型髄芽腫の発がんに関わるクロマチン制御因子の機能欠損変異を生体内で評価するスクリーニング系を確立し、新しい発がん機構を見出すとともに、その下流で機能しうる分子を治療標的候補として提案することを目指す（図）。

【方法】脳腫瘍は周囲の脳細胞と相互作用して増殖・進展するため、個々の遺伝子変異の発がん能を評価するためには腫瘍ができる環境下で遺伝子変異を誘導し、個体レベルで解析することが望ましい。そこで我々は生体内電気穿孔法による遺伝子導入と CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を組み合わせ、腫瘍の起源細胞である小脳顆粒細胞を EGFP で遺伝学的に標識した生後 5 日目の Atoh1^{EGFP} マウスの小脳に直接 *Ptch1* sgRNA（sgPtch1）と候補遺伝子の sgRNA、*Cas9* 遺伝子を導入して SHH 髄芽腫の腫瘍形成が加速するかどうかを検証した。

【結果】まず、我々が今回開発した、生後 5 日目の Atoh1^{EGFP} マウスの小脳への生体内電気穿孔法により小脳顆粒細胞において *Ptch1* 遺伝子をノックアウトした場合に SHH 型髄芽腫が誘導されるかどうかを検証した。その結果、生後 28 日目に前がん状態が観察され、最終的に 32%（n＝10／31）のマウスで腫瘍形成が認められた。腫瘍の発達過程で GFP を発現する細胞は分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現していた。またこれらの腫瘍はヒト SHH 型髄芽腫に特徴的な遺伝子は高いレベルで発現しており、本研究で開発した方法論が、新生仔マウスから SHH 型髄芽腫を生み出すことが可能であることを証明している。さらに、*Ptch1* と同時にヒト SHH 型髄芽腫で変異の報告されたクロマチン制御因子をノックアウトした結果、これまでに報告されていない発がんに影響しうる新しい遺伝子変異が発見された。現在、これらの変異によって生じるがんシグナルの解析を進めている。

本研究のフローチャート



200. 小児脳腫瘍の epigenetic な発がん機構の解明

川内　大輔

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

Key words：小児脳腫瘍，マウスモデル，電気穿孔法，クロマチン制御因子，エピゲノム

緒　言

小児脳腫瘍は小児がんで死亡する原因で第一位である重篤な疾患であり、脳が発生する時期に生じる遺伝子変異など、遺伝子プログラムの破綻によって脳細胞が異常増殖することによって生じると考えられている。近年、がんの根本的な治療に向け、世界的ながんゲノム解読プロジェクトが発足、展開され、小児脳腫瘍に特徴的な遺伝子変異が次々と報告されている。一方で、個々の腫瘍は同じ遺伝子変異を常に持つわけではなく、遺伝子変異や遺伝子発現プロファイルをベースに腫瘍の亜群が定義され、それに対応した個別化治療の必要性が提唱されている。

髄芽腫は小児悪性脳腫瘍のうち最も高頻度で見られるがんの一つであり、最も分子解析が進んでいる。遺伝子発現やゲノム変異、DNA メチル化、タンパク発現などの多階層マルチオミクス解析により、大きく 4 つの亜群（WNT・SHH・Group3・Group4）に分けられる［1, 2］。そのうち、本研究で扱うソニックヘッジホッグ（SHH）型髄芽腫は、髄芽腫全体の約 30%を占め、細胞増殖シグナルとして知られる SHH シグナルが小脳顆粒細胞で異常活性することが原因で生じるとされる。実際に、SHH 型髄芽腫では SHH シグナルが活性化しており、SHH 阻害剤が化学療法の第一選択と考えられた時期もあった。しかし、実際に多くの SHH 型髄芽腫は SHH 阻害剤に抵抗性であり、SHH 阻害剤の骨形成への副作用もあるため、遺伝子変異に応じたさらなる分子標的薬が望まれている。

我々は現在までに国際的な脳腫瘍ゲノム解読プロジェクトに参画し［3, 4］、ヒト髄芽腫に高頻度で見られる遺伝子変異データから特にクロマチン制御因子の変異に着目して研究を進めてきた。近年では、がんモデル動物を用いて、ヒストン修飾を行うポリコーム複合体の足場タンパク質である BCOR の機能欠損変異により、epigenetic な機構により SHH 型髄芽腫の形成過程で細胞増殖を刺激するインスリン様成長因子（IGF）2 の発現が数十倍に上昇して腫瘍進展が加速することを報告したが［5］、BCOR の変異が全ての SHH 型髄芽腫で見られるわけではなく、他のクロマチン制御因子の変異がいかに腫瘍形成に関わっているのか、その知見はいまだ十分ではない。

本研究では、モデルマウスにおいて SHH 型髄芽腫の腫瘍増殖に影響をもたらすクロマチン制御因子を迅速かつ網羅的に解析する方法を開発し、それを用いたスクリーニングにより、がん抑制遺伝子として機能する新しいクロマチン制御因子の同定を目指す。

方　法

SHH 型髄芽腫はマウス小脳顆粒細胞より SHH シグナルの異常活性により派生する。そこで我々は生体内電気穿孔法と CRIRPR/Cas9 によるゲノム編集技術を組み合わせ［6］、小脳顆粒細胞を GFP で遺伝学的に標識した生後 5 日目の Atoh1^{EGFP} マウスの小脳に直接 *Ptch1* sgRNA（sgPtch1）と *Cas9* 遺伝子およびルシフェラーゼ遺伝子を導入して SHH 髄芽腫を誘導できるかどうかを検証した。特に標的とする遺伝子の sgRNA の配列については、ゲノム編集実験のウェブツールである CHOPCHOP（https://chopchop.cbu.uib.no/）を用いて設計し、

px330 プラスミドベクターに組み込んで使用した。遺伝子導入されたマウスは 2 日後に遺伝子導入が成功したことをルシフェラーゼの発現を指標に生物発光イメージングを用いて確認し、生後 28 日目あるいは神経疾患の症状が観察されるまで飼育された。

これらの腫瘍が SHH 型髄芽腫であることを比較検証するために、SHH 髄芽腫を生じる *Ptch1* ヘテロマウスと過去に我々が報告した MYC 型髄芽腫モデルを用いた。MYC 型髄芽腫モデルの作出は具体的には生後 7 日目の小脳顆粒細胞を密度勾配遠心で単離したのち、*MYC* 遺伝子および TRP53 ドミネガ体をコードした遺伝子をレトロウイルスで導入し［7］、免疫不全マウスである成体 NSG マウスに 1×10^6 個ずつ移植した。これらのマウスは神経疾患の症状が観察されるまで飼育された。腫瘍を形成したマウスの脳はホルマリン固定後に、免疫染色により免疫組織化学的に解析された。いくつかの実験では、腫瘍組織は固定前に単離され、ゲノム DNA と Total RNA が抽出された。腫瘍のゲノム DNA は CRIPSR により、目的の遺伝子が正しくノックアウトされているかどうかを調べる目的に PCR の鋳型として使用された。また total RNA は SHH シグナルの関連遺伝子の発現を解析する目的で定量 PCR に使用された。

結　果

1. 生体内電気穿孔法を用いた新規 SHH 型髄芽腫モデルの開発

まず我々は、開発した生体内電気穿孔法により生後 5 日目の $Atoh1^{EGFP}$ マウスの小脳顆粒細胞に直接 sgPtch1 と *Cas9* 遺伝子を導入した。その結果、生後 28 日目に前がん状態が観察され、最終的に 32%（n＝10／31）のマウスで腫瘍形成が認められた。腫瘍の発達過程で EGFP を発現する細胞は分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現していた（図 1）。

次に、sgPtch1 によって作出された腫瘍が SHH 型髄芽腫であることを確認するために、*Ptch1* ヘテロマウス由来の腫瘍と MYC 型髄芽腫モデルをそれぞれポジティブ、ネガティブコントロールとして使用し、SHH シグナルの下流遺伝子である *Gli1* および *Mycn*、さらには SHH 髄芽腫に特徴的な *Atoh1* および *Sfrp1* の発現レベルを qRT-PCR により解析した。その結果、sgPtch1 により誘導されたがんにおける遺伝子の発現は *Ptch1* ヘテロマウス由来のものと同様、MYC 型髄芽腫モデルと比較して高い発現レベルを示した（図 2A）。また免疫組織化学染色により、SHH 型髄芽腫に特徴的な中程度の増殖細胞（Ki67 陽性）と YAP1 シグナルの細胞核への凝集が観察された（図 2B、C）。これらの結果は、本研究で開発した方法論が、新生仔マウスから SHH 型髄芽腫を生み出すことが可能であることを証明している。

2. 髄芽腫形成に関連するクロマチン制御因子の機能的スクリーニング

この方法がクロマチン制御因子のスクリーニングに使用できるかどうかを検証するため、我々は SHH 型髄芽腫の進展を加速させることで知られるがん抑制遺伝子 *Trp53* 変異を誘導した。その結果 sgTrp53 単独では腫瘍を誘導しなかったものの、sgPtch1 と sgTrp53 を同時に導入した場合には sgPtch1 単独と比較して腫瘍の進展速度が上昇し、67%（n＝12／18）のマウスで腫瘍が形成された（図 3、赤曲線）。このように sgPtch1 に加えて二次的に遺伝子をノックアウトする我々の方法では腫瘍進展の加速が観察されることが明らかになった。

以上の結果を踏まえ、我々はこれまでに共同研究者であるドイツがん研究センターから報告された SHH 型髄芽腫におけるクロマチン制御因子の変異のうち、機能欠損変異であるナンセンス変異とフレームシフト変異を持つもの 12 遺伝子を抽出し、現在そのうちの 5 遺伝子に関して機能解析の結果を得た。そのうちの一つの遺伝子 X に対する sgGeneX と sgPtch1 を導入した結果、腫瘍形成の促進が観察された（図 3、青曲線）。

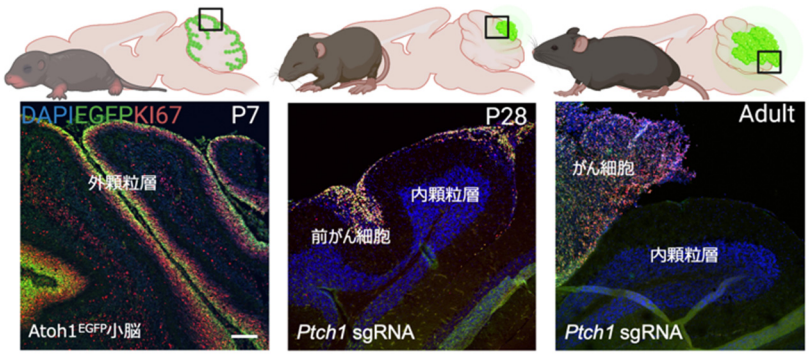


図 1. *Ptch1* ノックアウトによる SHH 型髄芽腫モデル

Atoh1^{EGFP} マウスの生後 7 日目小脳（左）、*Ptch1* sgRNA を生後 5 日目に導入した生後 28 日目小脳（中）、がんを発症した成体小脳（右）の抗 GFP 抗体（緑）および抗 Ki67 抗体（赤）による免疫組織化学染色。矢状断面。スケールバー：100 μm。

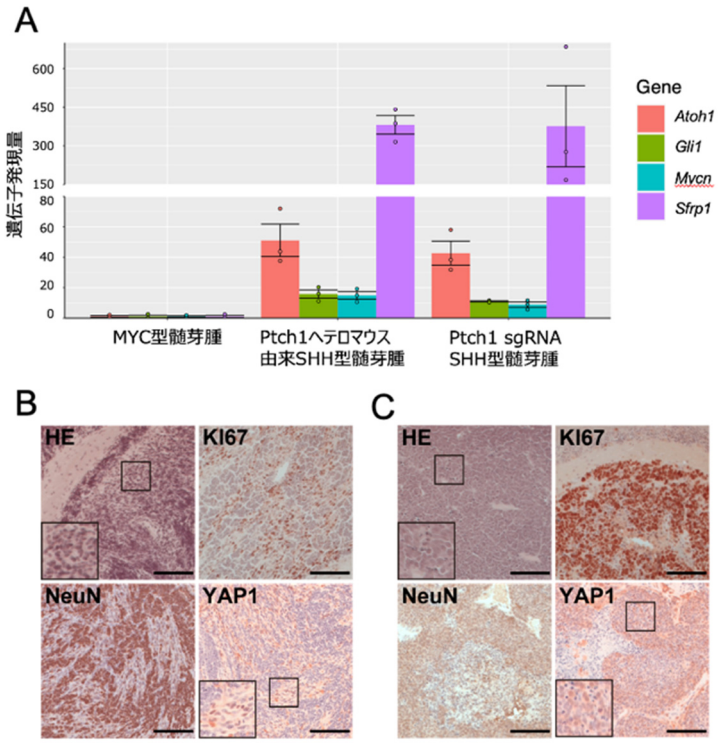


図 2. *Ptch1* sgRNA により誘導した SHH 型髄芽腫モデルの分子解析

A） 定量化 PCR による腫瘍ごとの遺伝子発現量の比較。各腫瘍を 3 サンプルずつ使用して標準偏差をエラーバーで示している。

B） SHH 型髄芽腫の HE 染色および免疫組織化学染色像。スケールバー：100 μm。YAP1 パネルにおける Inset に対しては 50 μm。

C） MYC 型髄芽腫の HE 染色および免疫組織化学染色像。スケールバー：100 μm。YAP1 パネルにおける Inset に対しては 50 μm。

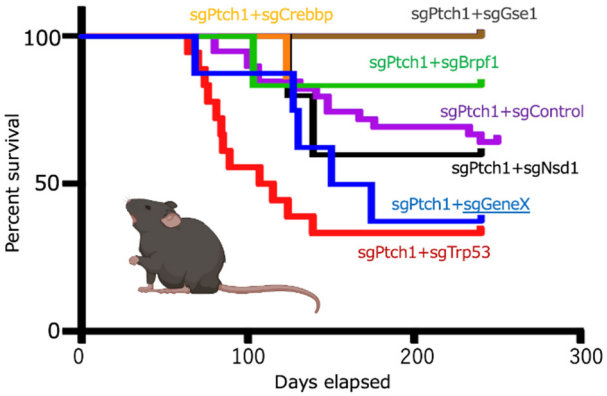


図 3. sgPtch1 により誘導した SHH 型髄芽腫モデルの分子解析
sgPtch1 とクロマチン制御因子の sgRNA を共に導入した Atoh1^{EGFP} マウスの生存曲線。sgTrp53（赤、ポジティブコントロール）および sgGeneX（青）を導入した場合にコントロール（紫）と比較して腫瘍発生が亢進している。

考　察

本研究で開発した方法論は、高い成功率で小脳顆粒細胞に遺伝子を導入し SHH 型脳腫瘍を作出することが可能であり、*Ptch1* を含む複数の遺伝子を同時にノックアウトすることで、腫瘍に影響を与える遺伝子を効率的に同定できる。我々は本研究でこの方法を用いて、新規がん抑制遺伝子 GeneX を同定しているが、この遺伝子は白血病などでも機能欠損していることが知られていることから、共通したがん抑制機能があると考えられ、今後の研究進展が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立精神・神経医療研究センター病態生化学研究部の星野幹雄部長である。また、本研究を手伝っていただいた学術振興会特別研究員の白石椋さん、大学院生の王万晨さん、技術補佐員の蛇見真紀さんに感謝の意を表したい。

文　献

1） Northcott PA, Buchhalter I, Morrissy AS, Hovestadt V, Weischenfeldt J, Ehrenberger T, Gröbner S, Segura-Wang M, Zichner T, Rudneva VA, Warnatz HJ, Sidiropoulos N, Phillips AH, Schumacher S, Kleinheinz K, Waszak SM, Erkek S, Jones DTW, Worst BC, Kool M, Zapatka M, Jäger N, Chavez L, Hutter B, Bieg M, Paramasivam N, Heinold M, Gu Z, Ishaque N, Jäger-Schmidt C, Imbusch CD, Jugold A, Hübschmann D, Risch T, Amstislavskiy V, Gonzalez FGR, Weber UD, Wolf S, Robinson GW, Zhou X, Wu G, Finkelstein D, Liu Y, Cavalli FMG, Luu B, Ramaswamy V, Wu X, Koster J, Ryzhova M, Cho YJ, Pomeroy SL, Herold-Mende C, Schuhmann M, Ebinger M, Liau LM, Mora J, McLendon RE, Jabado N, Kumabe T, Chuah E, Ma Y, Moore RA, Mungall AJ, Mungall KL, Thiessen N, Tse K, Wong T, Jones SJM, Witt O, Milde T, Von Deimling A, Capper D, Korshunov A, Yaspo ML, Kriwacki R, Gajjar A, Zhang J, Beroukhim R, Fraenkel E, Korbel JO, Brors B, Schlesner M, Eils R, Marra MA, Pfister SM, Taylor MD, Lichter P. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. Nature. 2017 Jul 19;547（7663）:311-317. doi: 10.1038/nature22973. PMID: 28726821

2) Forget A, Martignetti L, Puget S, Calzone L, Brabetz S, Picard D, Montagud A, Liva S, Sta A, Dingli F, Arras G, Rivera J, Loew D, Besnard A, Lacombe J, Pagès M, Varlet P, Dufour C, Yu H, Mercier AL, Indersie E, Chivet A, Leboucher S, Sieber L, Beccaria K, Gombert M, Meyer FD, Qin N, Bartl J, Chavez L, Okonechnikov K, Sharma T, Thatikonda V, Bourdeaut F, Pouponnot C, Ramaswamy V, Korshunov A, Borkhardt A, Reifenberger G, Poullet P, Taylor MD, Kool M, Pfister SM, Kawauchi D, Barillot E, Remke M, Ayrault O. Aberrant ERBB4-SRC Signaling as a Hallmark of Group 4 Medulloblastoma Revealed by Integrative Phosphoproteomic Profiling. Cancer Cell. 2018 Sep 10;34（3）:379-395.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.08.002.PMID: 30205043

3) Robinson G, Parker M, Kranenburg TA, Lu C, Chen X, Ding L, Phoenix TN, Hedlund E, Wei L, Zhu X, Chalhoub N, Baker SJ, Huether R, Kriwacki R, Curley N, Thiruvenkatam R, Wang J, Wu G, Rusch M, Hong X, Becksfort J, Gupta P, Ma J, Easton J, Vadodaria B, Onar-Thomas A, Lin T, Li S, Pounds S, Paugh S, Zhao D, Kawauchi D, Roussel MF, Finkelstein D, Ellison DW, Lau CC, Bouffet E, Hassall T, Gururangan S, Cohn R, Fulton RS, Fulton LL, Dooling DJ, Ochoa K, Gajjar A, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Zhang J, Gilbertson RJ. Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma.Nature. 2012 Aug 2;488（7409）:43-8. doi: 10.1038/nature11213.PMID: 22722829

4) Northcott PA, Shih DJ, Peacock J, Garzia L, Morrissy AS, Zichner T, Stütz AM, Korshunov A, Reimand J, Schumacher SE, Beroukhim R, Ellison DW, Marshall CR, Lionel AC, Mack S, Dubuc A, Yao Y, Ramaswamy V, Luu B, Rolider A, Cavalli FM, Wang X, Remke M, Wu X, Chiu RY, Chu A, Chuah E, Corbett RD, Hoad GR, Jackman SD, Li Y, Lo A, Mungall KL, Nip KM, Qian JQ, Raymond AG, Thiessen NT, Varhol RJ, Birol I, Moore RA, Mungall AJ, Holt R, Kawauchi D, Roussel MF, Kool M, Jones DT, Witt H, Fernandez-L A, Kenney AM, Wechsler-Reya RJ, Dirks P, Aviv T, Grajkowska WA, Perek-Polnik M, Haberler CC, Delattre O, Reynaud SS, Doz FF, Pernet-Fattet SS, Cho BK, Kim SK, Wang KC, Scheurlen W, Eberhart CG, Fèvre-Montange M, Jouvet A, Pollack IF, Fan X, Muraszko KM, Gillespie GY, Di Rocco C, Massimi L, Michiels EM, Kloosterhof NK, French PJ, Kros JM, Olson JM, Ellenbogen RG, Zitterbart K, Kren L, Thompson RC, Cooper MK, Lach B, McLendon RE, Bigner DD, Fontebasso A, Albrecht S, Jabado N, Lindsey JC, Bailey S, Gupta N, Weiss WA, Bognár L, Klekner A, Van Meter TE, Kumabe T, Tominaga T, Elbabaa SK, Leonard JR, Rubin JB, Liau LM, Van Meir EG, Fouladi M, Nakamura H, Cinalli G, Garami M, Hauser P, Saad AG, Iolascon A,… Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. Nature. 2012 Aug 2;488（7409）:49-56. doi: 10.1038/nature11327.PMID: 22832581

5) Kutscher LM, Okonechnikov K, Batora NV, Clark J, Silva PBG, Vouri M, van Rijn S, Sieber L, Statz B, Gearhart MD, Shiraishi R, Mack N, Orr BA, Korshunov A, Gudenas BL, Smith KS, Mercier AL, Ayrault O, Hoshino M, Kool M, von Hoff K, Graf N, Fleischhack G, Bardwell VJ, Pfister SM, Northcott PA, Kawauchi D. Functional loss of a noncanonical BCOR-PRC1.1 complex accelerates SHH-driven medulloblastoma formation. Genes Dev. 2020 Sep 1;34（17-18）:1161-1176. doi: 10.1101/gad.337584.120. Epub 2020 Aug 20. PMID: 32820036

6) Zuckermann M, Hovestadt V, Knobbe-Thomsen CB, Zapatka M, Northcott PA, Schramm K, Belic J, Jones DT, Tschida B, Moriarity B, Largaespada D, Roussel MF, Korshunov A, Reifenberger G, Pfister SM, Lichter P, Kawauchi D, Gronych J. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. Nat Commun. 2015 Jun 11;6:7391. doi: 10.1038/ncomms8391.PMID: 26067104

7） Kawauchi D, Robinson G, Uziel T, Gibson P, Rehg J, Gao C, Finkelstein D, Qu C, Pounds S, Ellison DW, Gilbertson RJ, Roussel MF. A mouse model of the most aggressive subgroup of human medulloblastoma. Cancer Cell. 2012 Feb 14;21（2）:168-80. doi: 10.1016/j.ccr.2011.12.023.PMID: 22340591