

論文の内容の要旨

論文題目

中枢神経系胚細胞腫モデル作製を目標とした *KIT* 変異 iPS 細胞樹立と始原生殖細胞誘導

氏名 葛岡 桜

中枢神経系胚細胞腫 (CNS GCT) は東アジア、とくに日本に報告が多い脳腫瘍で、国内では 19 歳以下の小児脳腫瘍の第 2 位 (15.2%) となっている。思春期男児に多く発生し (82.4%)、松果体や下垂体など頭蓋内正中部位に好発 (81%) し、腫瘍圧迫による水頭症、視力視野障害、尿崩症、下垂体機能低下症などで発症する。病理学的な特徴は多彩な組織型を示すことであり、ジャーミノーマ、奇形腫、卵黄囊腫瘍、絨毛がん、胎児性癌およびその混合腫瘍を呈する。最も多い組織型はジャーミノーマで 62.3% を占め、つづいて奇形腫が 14.2% である。治療は組織型分類に基づいた治療を行うことが推奨され、摘出術のみで予後良好である成熟奇形腫を除き、放射線治療とプラチナ製剤を中心とする化学療法が行われている。予後良好群のジャーミノーマや成熟奇形腫で 5 年生存率 100%、予後中間群の未熟奇形腫が 94.7%、予後不良群の卵黄囊腫瘍、絨毛がん、胎児がんが 61.2% であるが、若年発症であるため、放射線障害による発達遅滞、化学療法による造血障害や不妊などの問題が指摘されている。

これまで頭蓋内胚細胞腫瘍コンソーシアム (iGCT コンソーシアム) では国内 56 施設、266 症例に及ぶ世界最大のコホートを用いて CNS GCT の解析を進めてきた。CNS GCT の全エクソーム解析ではジャーミノーマの 65.7% に *KIT* シグナル経路の変異を認め、*KIT* 変異がその内 55.7% と最も多く、エクソン 17 に 1 塩基置換を生じた D816V 変異が最も多い。これは *KIT* の activation loop が構造変化を起こして自己活性化し、AKT や ERK などの下流因子の活性化が誘発される変異で、腫瘍化への関与が考えられている。

CNS GCT の起源は未解明だが、本研究で着目したジャーミノーマは、組織の形態学的特徴と *POU5F1*, *NANOG*, *TFAP2C* などのマーカー発現が免疫染色でも陽性であることから、胎生期の生殖細胞が起源と考えられてきた。

ヒトの生殖細胞系列は、発生 2 週目頃に形成される始原生殖細胞 (primordial germ cells, PGCs) が起源となる。PGCs はその後、正中線を後方へ卵黄囊まで遊走し、さらに後腸表面を遊走し、5 週目には生殖隆起に到達する。その間、増殖を続ける一方でゲノムワイドな DNA 脱メチル化が進行し、ゴノサイト (gonocyte, メスでは卵原細胞) へと分化が進む。

CNS GCT 38 例の RNA シークエンス結果 (未公開データ) をヒト PGCs のトランスクリプトームの公開データと比較すると、ジャーミノーマは発生 7~9 週のゴノサイトによく類似した遺伝子発現パターンを示す。また、CNS GCT 62 例での 450K メチル化アレイを用

いた解析では、他の腫瘍型や正常組織とは異なり、ジャーミノーマではインプリント領域を含むゲノムワイドな低メチル化を示し、これもゴノサイトに見られる所見に一致する。これらより、ジャーミノーマでは遺伝子発現もメチル化の程度もゴノサイトに近いと考えられた。

c-kit 変異を有する *W/W* 系統マウス、*KIT* リガンド変異を有する *Steel* 系統マウスではいずれも PGC の遊走・生存障害を起し、不妊となる。

以上の先行研究結果より、*KIT* 変異をもつ PGCs あるいは PGC から分化したゴノサイトがジャーミノーマの起源となる、という仮説を立て、まず *KIT* 変異をもつ iPS 細胞を作製し、これを PGC 様細胞 (PGC like cells, PGCLCs) からゴノサイトへと分化させることを計画した。

京都大学機能微細形態学で樹立された PGC に特異的な 2 種の遺伝子に蛍光レポーター *BLIMP1-2A-tdTomato* (BT) と *TFAP2C-2A-EGFP* (AG) を組込んだ BTAG ヒト iPS 細胞株を用い、nickase 型 CRISPR/Cas9 によるゲノム編集で *KIT^{D816V}* を導入した。PCR、シーケンス解析、サザンブロッティングを用いて遺伝子型を確認し、*KIT* 変異が導入され、ランダム変異挿入がなく、CRISPR 認識部位に塩基の欠失や挿入がなく、染色体異常を認めない 4 クローン (ヘテロ変異 3 株、ホモ変異 1 株) を得た。これらの iPS 細胞株は、コロニー形態、細胞増殖率、多能性マーカーである *POU5F1*, *NANOG*, *SOX2* の発現が BTAG 親株と同等で、免疫不全マウスへの移植で、いずれも三胚葉成分から構成されるテラトーマを形成したことから、*KIT* 変異挿入後も多能性を保持していることが確認できた。

次に親株と *KIT^{D816V}* iPS 細胞株を先行研究の手法を用いて PGCLCs へと誘導した。得られた細胞群を GFP と tdTomato の両蛍光レポーター陽性細胞を PGCLCs として FACS 解析し、PGCLC 誘導効率、細胞数を比較したところ、親株と有意差がなく、*KIT* 変異株でも生殖細胞系列への分化が可能であることが示された。

続いて、今回導入した変異 *KIT* の活性を評価した。樹立した *KIT^{D816V}* iPS 細胞株を用いて *KIT* および下流因子のリン酸化をウェスタンブロッティングで調べたところ、*KIT^{D816V}* iPS 細胞株では *KIT* リガンドである Stem Cell Factor (SCF) 非依存性に *KIT* のリン酸化が起きており、活性型変異であることが示された。しかし、*KIT* 経路下流の AKT と ERK はどちらもリン酸化が強く、親株と *KIT* 変異株で差は認められなかった。これは、iPS 細胞では *KIT* の発現量が低い一方、その多能性維持と増殖に FGF が重要で、FGF 経路によって ERK と AKT がリン酸化されていることが一因と推測された。そこで FGF 受容体阻害薬の処理を加え、親株と *KIT* 変異株でのリン酸化シグナルの差について検討した。

その結果、BTAG 親株も *KIT* 変異株も FGF 受容体阻害により ERK のリン酸化は消失したが、その後に *KIT* リガンドの SCF で刺激しても ERK のリン酸化は検出されなかった。

AKT に関しては、親株では FGF 受容体阻害薬によりリン酸化が低下するのに対し、*KIT^{D816V}* ヘテロ変異株では低下は緩やかで、ホモ変異株ではリン酸化が維持された。ここに SCF 刺激を加えると、BTAG 親株とヘテロ変異株では AKT のリン酸化が回復したが、

ホモ変異株では変動は見られなかった。

これらより、iPS 細胞においては、KIT の主な下流シグナル経路は AKT であり、SCF による刺激でも、変異 KIT においても ERK リン酸化への寄与は少ないことが確認できた。

次に iPS 細胞から PGCLC への分化誘導における KIT 活性化の影響を確認した。

野生型 KIT 受容体は SCF の結合により 2 量体を形成してリン酸化され、シグナルを伝達し、その後エンドサイトーシスを受ける。一方で *KIT^{D816V}* は自己活性化により SCF 非依存性にリン酸化され、細胞表面への発現、シグナル伝達後、エンドサイトーシスされることが知られている。そこで、PGCLC への分化誘導を BMP4 のみによる誘導とし、SCF-KIT 経路の影響をみるために SCF 添加群 (SCF+) と無添加群 (SCF-) で比較した。今回樹立した *KIT^{D816V}* 変異株と BTAG 親株とで、PGCLC 分化誘導の 2 日目から 4 日目までの細胞表面の KIT 発現量を、KIT 抗体を用いて FACS 解析で比較した。その結果、SCF- の PGCLC では BTAG 親株、ヘテロ変異株、ホモ変異株の順に KIT の細胞表面の発現が高く、誘導日数による変化はなかった。一方で SCF+ では全ての株でホモ変異株と同等の発現量にまで低下していた。このことより、*KIT^{D816V}* 変異株では、変異 KIT の自己活性化による細胞膜表面の KIT 発現量の低下が起こっていると考えられた。

さらに変異 KIT の PGCLC 生存における影響を評価するため、BTAG 親株と *KIT^{D816V}* iPS 細胞株とで SCF+ と SCF- の条件で PGCLC 誘導を行い、誘導された PGCLC 数を 8 日目まで計測した。その結果、SCF- では親株は 4 日目以降 PGCLC 数が顕著に減少し、8 日目にはほとんど死滅したが、ヘテロ変異株、ホモ変異株ではその減少が緩徐であり、8 日目でも生存する細胞が見られた。一方で SCF+ では逆に BTAG 親株で最も生存細胞が多く、ホモ変異株では減少していた。

以上より *KIT^{D816V}* 変異は iPS 細胞では増殖や多能性に影響を与えないものの、KIT-AKT 経路は活性化しており、PGCLC 誘導時の細胞表面の KIT 量低下や、SCF 非依存性を獲得していることが確認できた。また、*KIT^{D816V}* 変異はリガンド存在時において PGC 生存に必ずしも最適の条件ではないことが示唆された。

本研究では、*KIT^{D816V}* iPS 細胞を樹立し、これを発生初期の PGCLC へ誘導することに成功した。またこれらの細胞で変異 KIT が活性型であることを確認し、胚細胞腫モデル作製の基盤を完成させた。先行研究で PGCLCs を長期培養してゴノサイトに分化させる手法が報告されており、今後 *KIT* 変異株をジャーミノーマ起源とされるゴノサイトへと成熟させることで、腫瘍発生過程の再現を目指している。腫瘍化に至らない場合は *KIT* 変異ゴノサイトとジャーミノーマを比較し、遺伝子発現の差や合併変異の検索などからジャーミノーマの発症や増殖の機序解明に発展させていく予定である。