

博士論文

Generation of a genetically engineered glioma mouse model
by using the Sleeping Beauty transposon system

(SB トランスポゾンを用いた
新規グリオーマ・マウスモデルの作製)

住吉 敬介

Generation of a genetically engineered glioma mouse model
by using the Sleeping Beauty transposon system

SB トランスポゾンを用いた
新規グリオーマ・マウスモデルの作製

分子細胞生物学専攻 再生基礎医科学国際研究拠点

指導教員 渡 邊 す み 子

学位申請者 住 吉 敬 介

目次

	ページ
略語集	2
要旨	5
序論	6
実験方法	21
結果	30
考察	73
謝辞	82
参考文献	83

略語集

Akt	Akt Serine/Threonine Kinase
Ascl1	Achaete-Scute Family BHLH Transcription Factor 1
AT/RT	Atypical teratoid/rhabdoid tumor
ATRX	ATP-Dependent Helicase ATRX
BGH	Bovine growth hormone
BSA	Bovine serum albumin
CMV	cytomegalovirus
DCX	Doublecortin
DLX	Distal-Less Homeobox
DNA	deoxyribonucleic acid
DsRed	Discosoma red fluorescent protein
EdU	5-Ethynyl-2'-deoxyuridine
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB2	Human epidermal growth factor receptor (Her2)
GBM	Glioblastoma multiform
Gfap	Grial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green fluorescent protein
IDH1/2	Isocitrate Dehydrogenase 1/2
INK4a	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A, P16-INK4A
IRES	Internal ribosomal entry site
H1	Human H1 RNA polymerase III promoter
LOH	Loss of heterozygosity (LOH) of 1p/19q
MBP	Myelin Basic Protein

mRNA	Messenger ribonucleic acid
Neo	Neomycin
NeuN	RNA Binding Protein, Fox-1 Homolog 3
NF1	Neurofiblomin 1 or Neurofiblomatosis type 1
NG2	Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4
Olig2	Oligodendrocyte Transcription Factor 2
OPC	Oligodendrocyte progenitor cell
PCR	Polymerase chain reaction
PDGFA	Platelet derived growth factor A
PDGFRA	Platelet derived growth factor A receptor
PGK	Mouse Phosphoglycerate Kinase (promoter)
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
Puro	Puromycin
RCAS/tva	RCAS vector/tva receptor system
RMS	Rostral Migratory Stream
SB	Sleeping Beauty
shRNA	Short hairpin ribonucleic acid
Sox2	SRY-Box 2
SV40	Simian Virus 40
SYP	Synaptophysin
SVZ	Subventricular zone
S100B	S100 Calcium Binding Protein B
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TIR	Terminal inverted repeats

TP53	Tumor Protein 53 (human)
-------------	--------------------------

Trp53	Tumor Protein 53 (mouse)
--------------	--------------------------

WHO	World Health Organization
------------	---------------------------

第1章

要旨

グリオーマは、成人で最も頻度が高い原発性悪性脳腫瘍である。その病態を理解するために、簡便にグリオーマを誘導するモデルとして、トランスポゾンを用いたグリオーマ・マウスモデルを開発した。ヒトのグリオーマで高頻度に変異を認める *NF1*、*TP53* や高発現を認める *PDGFA* に着目し、これらの遺伝子の発現誘導や抑制に加え、蛍光タンパクを発現するベクターを作製した。このベクターのマウス脳内への導入により、オリゴデンドロサイト前駆細胞が起源細胞として、高効率にグリオーマが誘導できることを示した。さらに、複数のベクターを導入し、異なる遺伝学的な変化を有する細胞を同一腫瘍内で可視化し、腫瘍内不均一性の存在を示した。

第2章

序論

グリオーマは、成人において、最も頻度が高い原発性悪性脳腫瘍である。グリオーマの治療方法としては、外科治療、化学療法、放射線治療などを用いた集学的な治療が行われるが、いまだ根治的な治療法は開発されていない^{1,2}。グリオーマの中でも悪性度の高いグリオブラストーマは、病態の進行の早さ、治療抵抗性、再発性などから、きわめて予後不良の疾患として知られている。World Health Organization (WHO) による分類では、グリオブラストーマはグレードIVに該当し、がん細胞と毛細血管の異常増殖から、出血や脳組織の破壊を引き起こし、急激な神経症状を発症する。グリオブラストーマの生存率は、遺伝子型によって差はあるが、6ヵ月無増悪生存率は20%未満であり、高頻度に再発する^{3,4}。平均生存期間は21ヵ月以内であり、2年生存率は30%未満ときわめて予後不良であり、有効な治療法の開発が急務である。

グリオーマの発生過程は、神経幹細胞・前駆細胞が増殖し、グリア細胞に分化する過程で変異を蓄積し、無制限の増殖能を獲得することで生じると考えられている⁵。また、近年の研究から、成熟したグリア細胞や神経細胞も、遺伝子変異によるリプログラミングを経て、グリオーマに形質転換しうることを示されている (図 1)

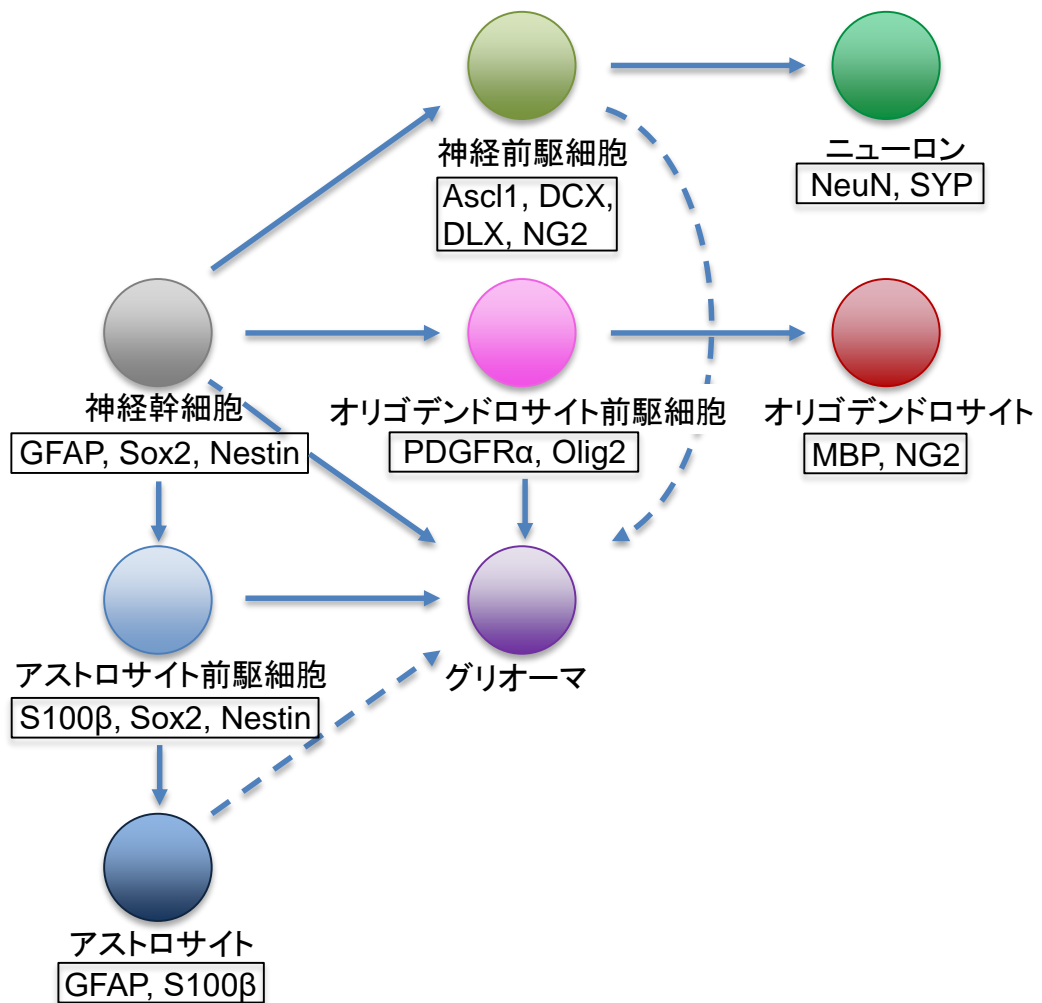


図1 グリオーマの起源

グリオーマは、神経幹細胞や前駆細胞に変異が蓄積して、無制限の増殖能を獲得した細胞が組織内で空間を占めて、腫瘍を形成することが知られている。ウイルスを用いたマウスモデルでは、成熟したアストロサイトや神経細胞からもグリオーマの誘導が報告されている。

6. グリオーマの中でも悪性度の高いグリオブラストーマは、組織学的に、非定型な核、細胞の多型、活発な有糸分裂、毛細血管の異常増殖、壊死などを伴い、活発な増殖細胞と、ドーマントなグリオーマ幹細胞から成り立つと考えられている⁷。グリオブラストーマを治療する上で障壁となるのは、まず、グリオーマ幹細胞がドーマントな状態にあるため、化学療法や、放射線による Deoxyribonucleic acid (DNA) 損傷に高い抵抗性を持つことである^{8,9}。さらに、同一の腫瘍内にも、異なる変異を持つ細胞が不均一に分布しており、治療を行っても、抵抗性のクローンが生まれやすいことである¹⁰ (図2)。グリオーマの腫瘍内不均一性を考慮した治療戦略は、いまだ確立できていない。

グリオブラストーマの治療薬を開発するために、その遺伝学的な変化が詳細に解析されてきた¹¹。グリオブラストーマにはデ・ノボタイプ (de novo type) とセカンダリータイプ (secondary type) があり、デ・ノボタイプは壮年以降に多く、セカンダリータイプは若年層に多い¹²。デ・ノボタイプとセカンダリータイプは、組織学的な区別は困難であるが、発症までの経過や、遺伝子型のプロファイルによって区別される⁷。セカンダリータイプのグリオブラストーマは、グリオブラストーマの約10%を占め、びまん性星細胞腫 (グレードII) や退形成性星細胞腫 (グレードIII) など、良性のグリオーマから、数年間を経て悪性度が高まり、グレードIVに至るこ

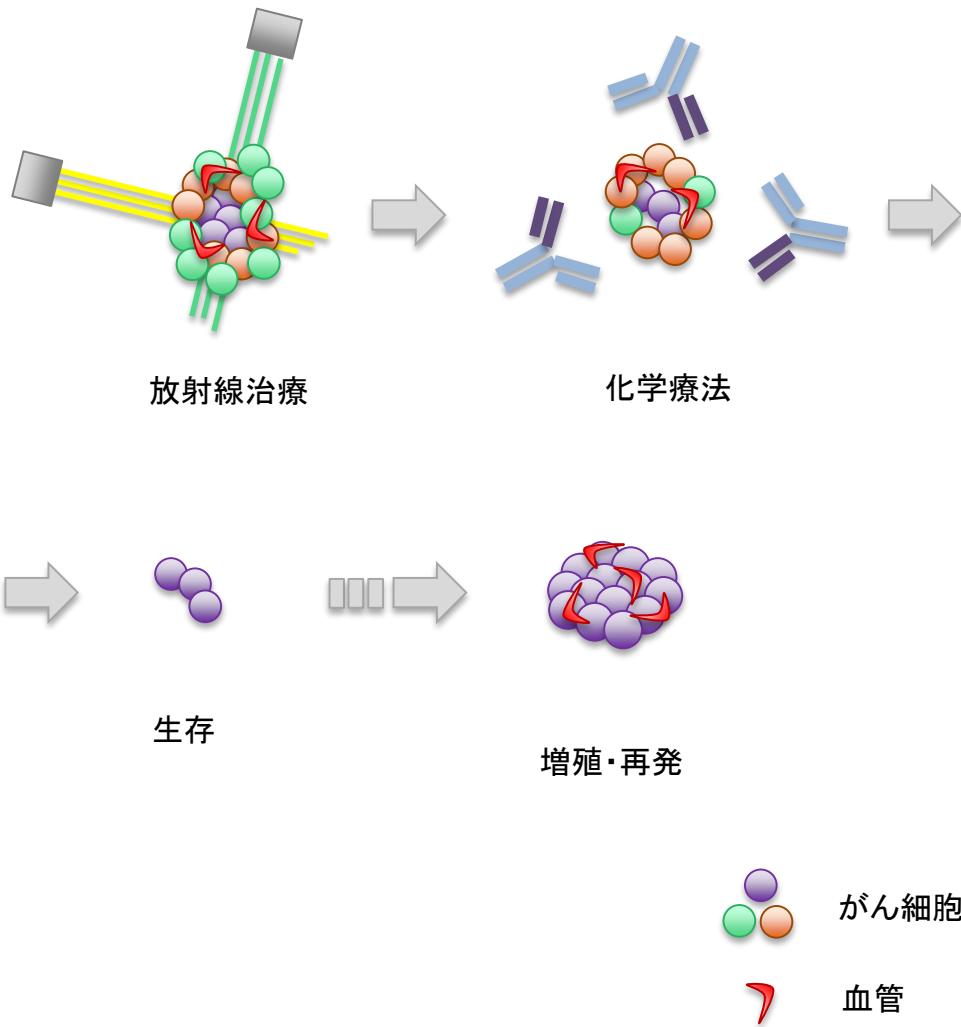


図2 腫瘍内不均一性が原因となるグリオーマの再発
 グリオーマを構成するがん細胞の変異に偏りがあるため、放射線治療や化学療法でターゲットとしたがん細胞が死滅しても、いずれの処置にも耐えた細胞が残存することがある。その細胞が時間に伴い増殖し、腫瘍が再発する。

とで発症する。この過程に寄与する遺伝子として、*Isocitrate Dehydrogenase 1 (IDH1)*, *Tumor Protein 53 (TP53)*, *Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked (ATRX)* などが関与することが知られている⁷。一方、デ・ノボタイプは、グリオブラストーマとして急激に発症し、*Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)*, *TP53*, *Phosphatase And Tensin Homolog (PTEN)* などの遺伝子が関与することが知られている⁷ (図 3)。これらの代表的な遺伝子変異に加えて、近年の次世代シーケンサーを用いた網羅的なゲノム解析により、頻度が低いゲノム変異が多数明らかになってきた¹³。これらの変異遺伝子の中には、機能が分かっていない遺伝子も多く、動物モデルを用いた機能解析と、治療標的分子の同定が課題となっている。

モデル動物を用いて遺伝子の機能を個体レベルで解析するために、Cre/LoxP システムを用いた過剰発現実験や、コンディショナル・ノックアウト実験は、標準的な手法として広く用いられてきた^{14,15,16}。しかし、グリオーマは多数の遺伝子変異を併せ持つことが分かっており、そのような病態をモデルするために2つ以上の変異遺伝子を導入しようとする、マウスの複雑な掛け合わせが要求される。ヒト脳腫瘍のゲノム解析で明らかになった膨大な数の変異遺伝子について、個々の遺伝子ごとに Cre/LoxP システムを用いて解析するアプローチは、マウスの掛け合わせなどに長時間を要し、より効率的な系の確立が求められている。この問題を解決する

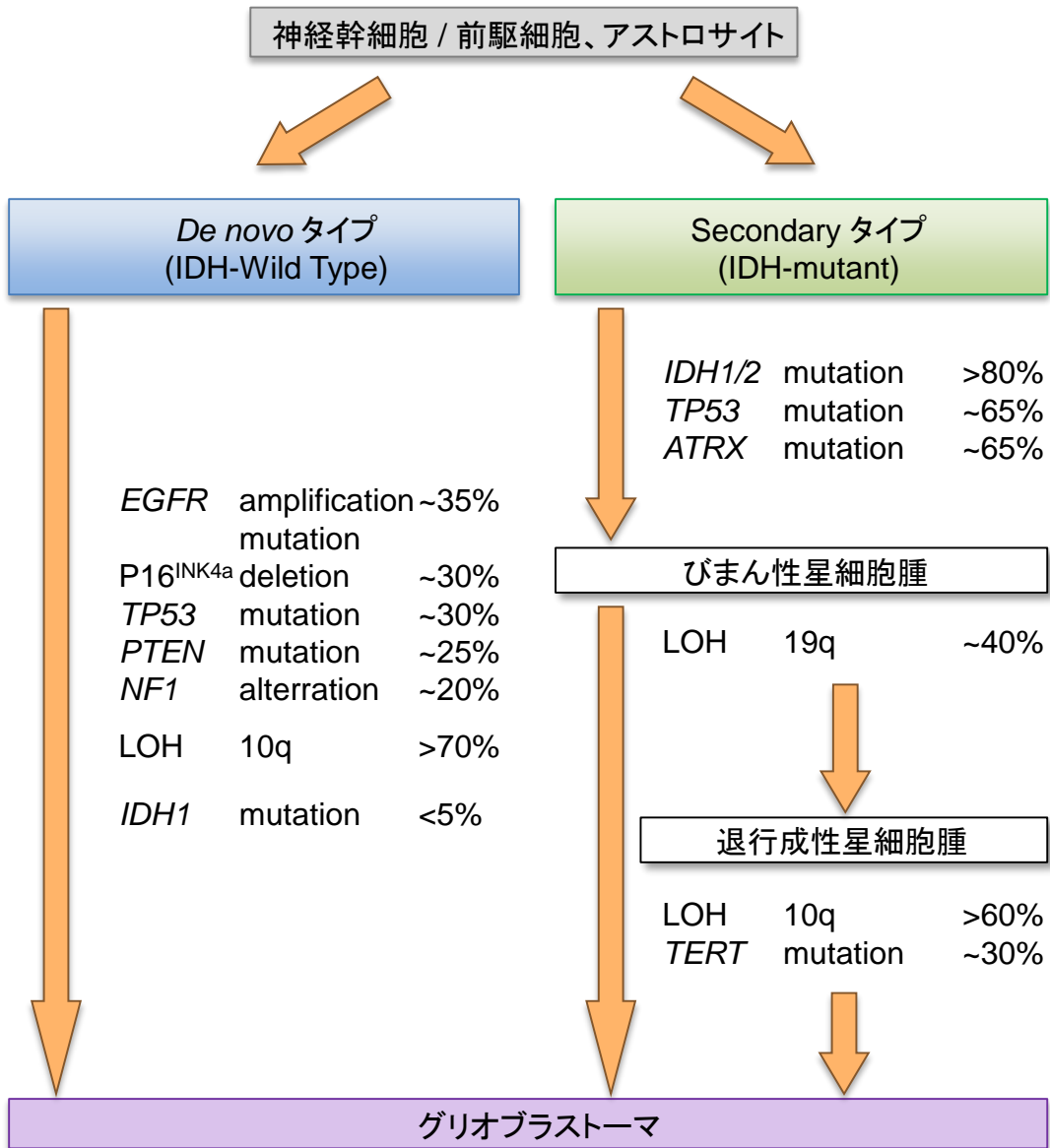


図3 異なる遺伝子変異で発達するグリオブラストーマ
 デ・ノボタイプは、上記の遺伝子変異の組み合わせで急速に悪性化するのに対し、セカンダリータイプは、IDH1/2の変異を経て、グレードの低いびまん性星細胞腫や退行成性星細胞腫の特徴を示した後に、数年かけて緩やかに悪性化する。

ために、体細胞レベルで効率的に、複数の遺伝学的変化を導入できるようなグリオーマ・マウスモデルの開発が必須である。

これまでにトランスポゾンを用いたグリオーマのマウスモデル作製については6報の報告がある(表1)。これらの中で3報が Sleeping Beauty トランスポゾンを用いたグリオーマ・モデルマウスの開発である。トランスポゾンは、ゲノム中を動き回る DNA 配列である(図4)。Sleeping Beauty は、cut-and-paste 型のトランスポゾンであり、Salmonid fish から単離された¹⁸。脳腫瘍の研究では、トランスポゾンの donor DNA plasmid と、Sleeping Beauty トランスポゼースをコードする plasmid を、新生児マウスの側脳室に注入し、エレクトロポレーションを行うことで、donor DNA plasmid 中の配列を、側脳室周辺の神経幹細胞や前駆細胞のゲノムに導入できる¹⁹(図5)。先行研究において、Wiesner らは3種類の遺伝子：*Neuroblastoma Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (NRAS)*, *EGFR*, *Trp53* に着目し、*NRAS* と *EGFR* の恒常的活性型変異体(*NRAS-G12V*, *EGFRvIII*)、及び *Trp53* に対する shRNA (*shTrp53*) を3つのプラスミドとして導入した。その結果、100%の効率でグリオーマが生じることを示した。他の例では、*Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (HRAS)* と *Serine-Threonine Protein Kinase (AKT)* の恒常的活性型変異体を用い、これらを2つのプラスミドとして、piggyBac トランスポゾンを用いて導入することで、グリオ

トランスポゼース	トランスポゾン	遺伝的背景	表現型	参考文献
piggyBac	V5-ErbB2 V664E		Anaplastic high grade glioma	20
piggyBac	Hras G12V		High grade glioma	20
SB13	Nras G12V shTrp53	<i>lfnar1^{-/-}</i>	脳腫瘍（組織型、情報なし）	43
SB13	NRAS G12V EGFRvIII shTrp53		astrocytoma	19
SB100	NRAS PDGFB shTrp53		Glioblastoma Multiform	17
piggyBac	AKT Hras G12V		Atypical teratoid/rhabdoid tumor	21

表1 トランスポゾンを用いたグリオーマを誘導したマウスモデルの報告
SB:Sleeping Beauty

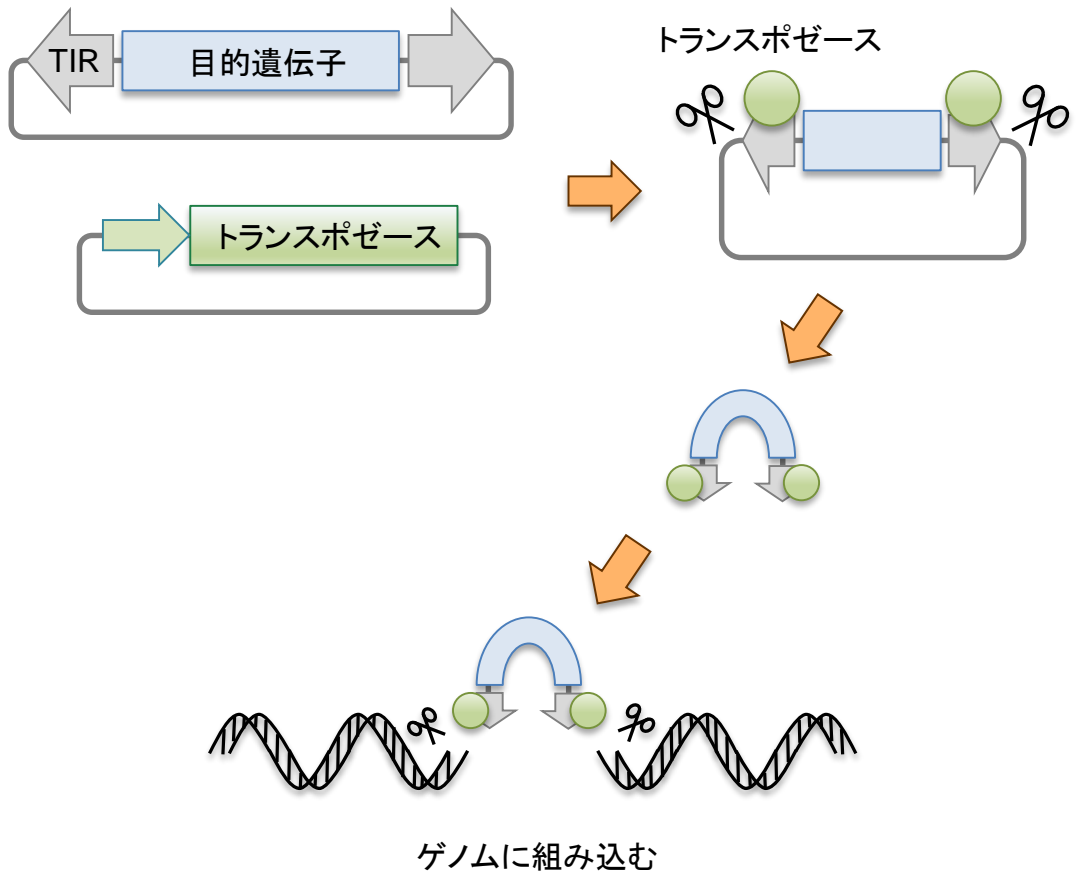


図4 トランスポゾンシステム

導入された細胞内でトランスポゼースが発現する。トランスポゼースは、トランスポゾンベクターの認識配列を切断して、これを運搬し、ホストのゲノムにランダムに組み込む。

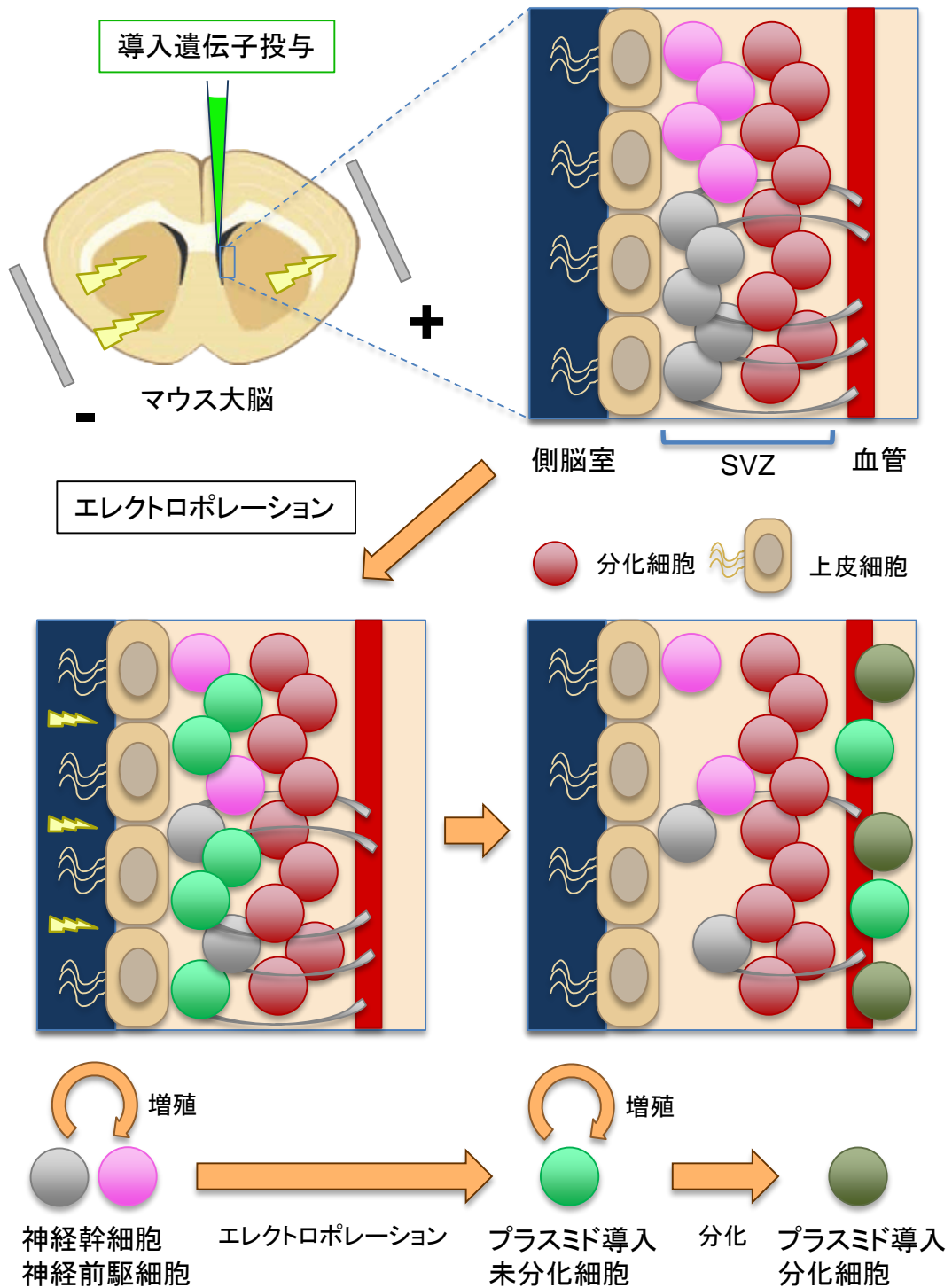


図5 エレクトロポレーションによる神経幹細胞への遺伝子導入
 出生後0~1日齢マウスの左側脳室に、トランスポゾンベクターを投与し、エレクトロポレーションにより神経幹細胞に目的遺伝子を導入する。導入された細胞は、分化しながら脳実質に移動する。

ーマを誘導した例もある^{20,21}。このように、トランスポゾンを用いることで、プラスミド・ベクターだけで、簡便にグリオーマを誘導することが出来るため、個体レベルで候補遺伝子の機能解析を行うためには最適な手法と言える。しかし、トランスポゾンを用いた既存のグリオーマ・モデルの問題点として、ほとんどのモデルが *RAS* の恒常的活性型変異体を用いている点が挙げられる。*RAS* の変異は、ヒトのグリオーマでは、ほとんど認められないため²²、*RAS* 変異体を用いたモデルは、グリオーマの病態をモデルするとは言い難い。ヒトグリオーマを遺伝学的に模倣し、高効率でグリオーマを誘導できるモデルマウスの作製が求められている。

そこで私は、ヒトのグリオーマで高頻度に変異を認める遺伝子として、*Platelet derived growth factor α (PDGFA)*、*Neurofibromin 1(NF1)*、*TP53* に着目してマウスモデルを作製した。PDGF ファミリーは、A-、B-、C-、D-鎖がヘテロ、または、ホモで二量体を形成することが知られている (PDGF-AA、-AB、-BB、-CC および-DD)。*PDGF* ファミリーの中でも、*PDGFA* が、約 81%のグリオーマで高発現している²³。*PDGF-AA* リガンドは受容体である *PDGFRα (Platelet derived growth factor α receptor: PDGFRA)* に結合し、下流のシグナルを活性化する。ヒトのグリオブラストーマでは、*PDGFRA* に増幅、変異、置換などが生じていることが知られており、*PDGFRA* シグナルは、グリオーマの発生に重要な役割を果たすと考えられている²³⁻²⁶。

NF1 は、神経線維腫症 I 型の原因遺伝子であり、癌抑制遺伝子として機能する²⁷。ヒトのグリオブラストーマでは、約 10% で遺伝子変異を認める²²。また、*TP53* は、DNA 損傷、低酸素、栄養欠乏、細胞の過剰増殖、リボヌクレオチドの枯渇によるストレス等によって活性化し、損傷した細胞の応答を決定する中心的な因子であり、結果として癌抑制遺伝子として機能する²⁸。ヒトのグリオブラストーマでは、約 30% で遺伝子変異を認める²²。グリオーマの発生に伴う遺伝子変異の検討では、発生早期に 7 番染色体のコピー数が増加することが知られており (Gain 7)、7 番染色体の増幅は *PDGFA* の過剰発現を伴う。さらに、グリオーマの進行に伴って、*NF1* の欠損が起こる²⁹。*NF1* の欠損は、*TP53* の変異と相関して起こるため³⁰、*PDGFA* の過剰発現、*NF1* と *TP53* のノックダウンを組み合わせることで、ヒトのグリオブラストーマで起こる遺伝学的な変化を模倣すると考えた。RCAS/tv-a レトロウイルスシステムを用いて上記の 3 つの遺伝学的変化 (*PDGFA*、shNf1、shTrp53) を神経幹細胞・前駆細胞に導入することで、グリオブラストーマが形成されることが示されているが²⁹、RCAS レトロウイルスベクターの 2.5kbp という長さの制約から 3 つのウイルスが同時に感染した細胞を可視化することが困難であり、グリオーマの起源細胞の実体が不明である。私は、*PDGFA*、shNf1、shTrp53 を全て単一のトランスポゾンベクター組み込んだ。さらに蛍光タンパク発現カセットを加えることで、3 つの遺伝学的な変化が導入された細胞を生体内で可視化した。蛍光タンパクの発現

を追跡することで、グリオーマの起源細胞の局在を時間軸、空間軸に置いて 4 次元的に同定し、グリオーマ進行の過程を明らかにすることを目的とした。

新規グリオーマのモデルマウスを作製することに加えて、私は、腫瘍内不均一性を再現するモデルを作製することを目指した。近年、ヒトグリオーマの単一細胞に対する RNA シークエンス (RNA-seq) 解析が進んでおり、それらの解析から、個々の細胞の遺伝子発現パターンは、高度の不均一性を伴うことが明らかになった³¹、³²。腫瘍内不均一性の原因については、いまだ不明な点が多いが、個々の細胞が有するゲノム変異や、エピジェネティックなゲノム・ヒストン修飾の違い、腫瘍細胞近傍の微少環境の違いなどが原因と考えられている。乳がんのモデルマウスを用いて、腫瘍内不均一性をモデル化した例があるが³³、グリオーマにおいては、腫瘍内不均一性を個体レベルで作製したモデルは限られている²¹。

先行研究において、Chen らは、*HRAS* と *AKT* の 2 つのがん遺伝子に着目し、それらを発現するベクターを作製した²¹。そして、異なる蛍光タンパクを発現するトランスポゾンベクターと共に、神経幹細胞に遺伝子導入した。その結果、異なる蛍光で標識されるがん細胞のサブクローンが、混在している (**mixed**) 様子を可視化した²¹ (図 6)。導入した変異遺伝子と蛍光タンパクは異なるベクターで導入され

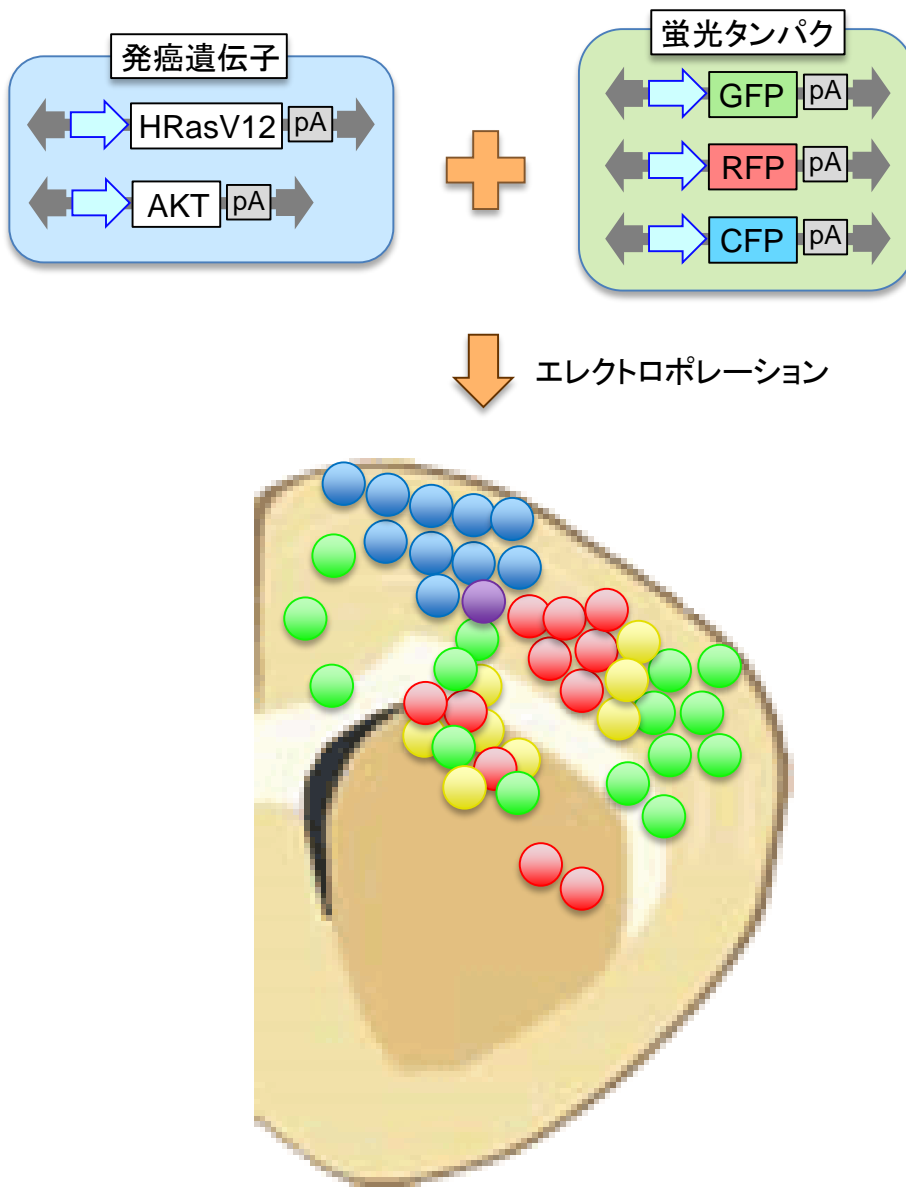


図6 トランスポゾンを用いたラットグリオーマモデル

発癌遺伝子と蛍光タンパクを発現するトランスポゾンベクターを共に胎児マウスの側脳室に投与し、エレクトロポレーションにより神経幹細胞に導入した。個体の成長に伴い、脳実質でグリオーマが形成され、蛍光タンパクにより可視化されたが、グリオーマ細胞がいずれのトランスポゾンベクターの組み合わせに誘導されたのか、検証はされなかった。

ているため、*HRAS* 発現細胞と *AKT* 発現細胞の挙動を蛍光タンパクにより追跡・比較することはできないが、このアプローチは、腫瘍内不均一性を可視化する上で、有効な手法と考えられる。すなわち、複数のトランスポゾンベクターを同時に導入することで、異なるベクターがゲノムに組み込まれた細胞を混在させて、それらのクローンの競合を生体内で観察することができる。

私は、この手法を用いて、グリオーマにおける腫瘍内不均一性を再構築することを計画した。そのために、*PDGFA*、または、*shp53/shNfl* を含むベクターに、それぞれ異なる蛍光タンパクを発現するカセットを組み込んだ。これらのトランスポゾンベクターをエレクトロポレーションで神経幹細胞・前駆細胞に導入することで、異なる遺伝学的な変化を有する細胞を、異なる蛍光タンパクで可視化した。本研究により、トランスポゾンベクターの同時導入という方法が、腫瘍内不均一性を個体レベルで再現する上で、有効な手法であることを検証した。

第 3 章

実験方法

全ての動物実験は、東京大学動物実験実施規則および東京大学動物実験実施マニュアルの規定に則り、動物実験の許可を得て行った。

プラスミドの作製

トランスポゾンベクターを作製した手順を示す。pT2/shTrp53/shNfl/polyA ベクターについては、まず、マウス *Trp53*、*Nfl* をノックダウンするため shRNA を発現する shRNA カセットをデザインした。*Nfl* と *Trp53* の標的配列は先行研究で報告されている配列を利用した；*Nfl* (5'-GGA CAC AAT GAG ATT AGA T-3')³⁵、*Trp53* (5'-GTA CAT GTG TAA TAG CTC C-3')⁶。2 本の 1 本鎖 DNA をアニールさせて、両端が *Bgl*II と *Hind*III の切断断端になるように設計し、pSUPER.retro.puro ベクター (Addgene) の *Bgl*II と *Hind*III サイトに挿入した (図 7)。作製したプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションして培養し、プラスミドを精製した。pSUPER.retro.puro ベクターの H1 プロモーターと shRNA 発現カセットを含む DNA フラグメントを *Eco*R1、*Hind*III サイトで切断して回収した。H1-shTrp53 発現カセットについては、*Eco*RI サイトを平坦化し、H1-shNfl 発現カセットについては、*Hind*III サイトを平坦化して、H1-shTrp53 発現カセット (図 8A) と H1-shNfl (図 8B) 発現カセットをライゲーションした。次に、pL453 ベクターの polyA 配列を *Eco*R1、*Hind*III サイトで切り出

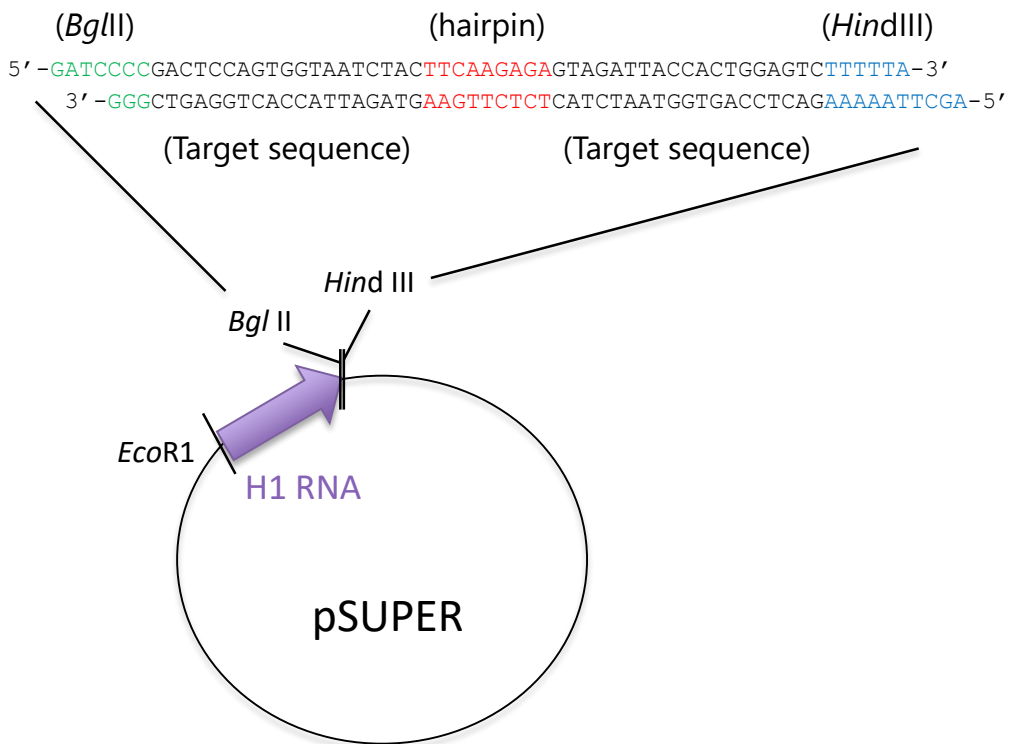


図7 H1プロモーター下流でshRNAを発現するカセットの入手方法
shRNAのターゲット配列を設定し、2本のオリゴをライゲーションさせた後、pSUPER.retro.puroベクターの*Bal* II、*Hind* IIIサイトに対して挿入する。合成したプラスミドを大腸菌にトランスフォーメーションした後、プラスミドを増幅させて*Eco*R1、*Hind* IIIサイトで切断して目的のshRNA発現カセットを得る。

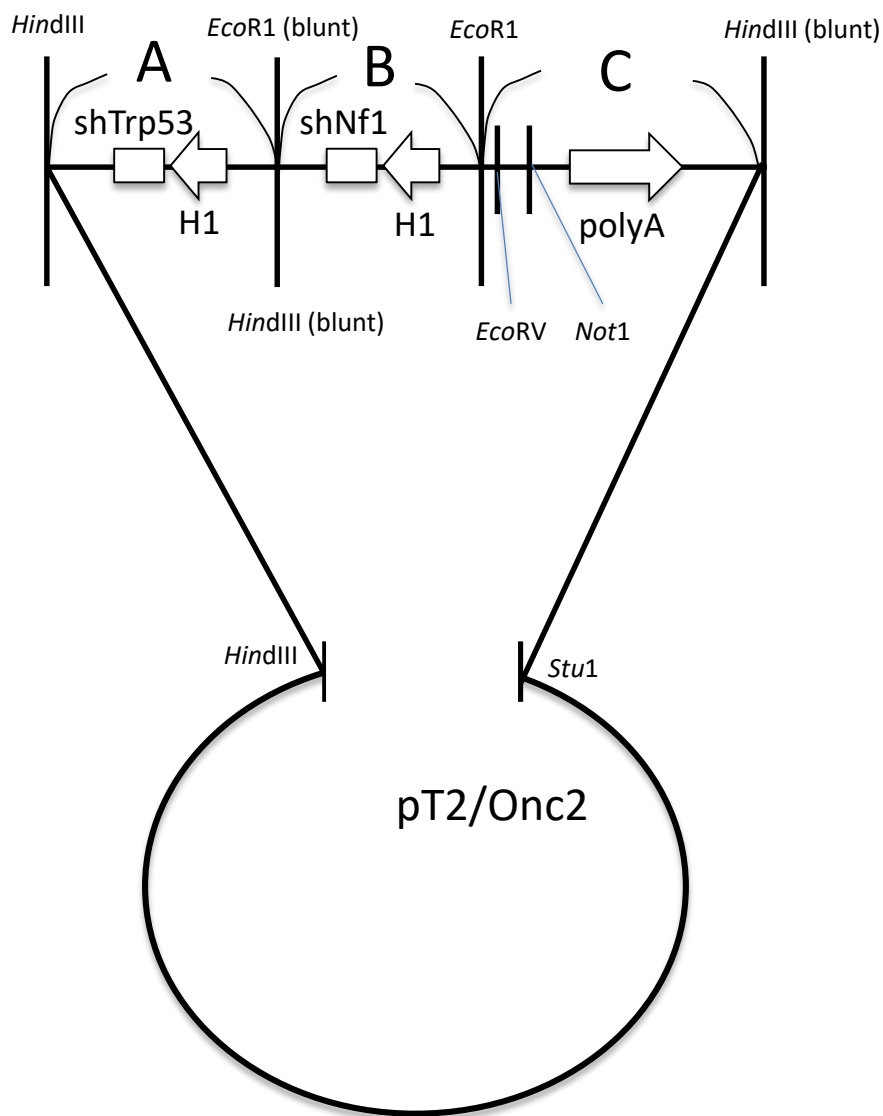


図8 pT2/shTrp53/shNf1/polyAベクターの設計図

pT2/Onc2をHindIII、StuIサイトで切断する。A:H1プロモーターの下流でshTrp53を発現するカセットのEcoRIサイトをブラント処理する。B:H1プロモーターの下流でshNf1を発現するカセットのHindIIIサイトをブラント処理する。C:polyAを発現するカセットのHindIIIサイトをブラント処理する。A~Cのカセットをトリプルライゲーションし、pT2/shTrp53/shNf1/polyAベクターを得た。

し、*HindIII* サイトを平坦化した。pT2/Onc2 の *HindIII*、*Stu1* サイトに、H1-shTrp53-H1-shNf1 発現カセットと polyA 配列をクローニングして (図 8C)、pT2/shTrp53/shNf1/polyA ベクターを得た。pT2/shp53/shNf1/SV40-GFP ベクター (以下 NP ベクター) の作製については、まず pT2/shp53/GFP4 ベクター (Addgene) から、SV40-GFP 発現カセットを F プライマー(5'-GAT ATC TTC AAT TCG CCA GCA CAG TG-3')と R プライマー(5'-GCG GCC GCT CAT TAC TTG TAC AGC TCG TCC ATG-3')を用いて、PCR で増幅し、PCR 産物を回収した。そして、前記 PCR 産物を上記の pT2/shp53/shNf1/polyA ベクターの *EcoR1* と *Not1* サイトの間に挿入した。

pT2/shp53/shNf1/ CMV-PDGFA-IRES-DsRed ベクター (以下 PNP ベクター) の作製については、まず、pIRES-DsRed-Express ベクター (Takara Bio Inc.) の CMV プロモーター上流に、KOD mutagenesis kit を用いて、*EcoRV* サイトを挿入した。次に、ヒト癌細胞株 (SV480) から分離した cDNA に対し、F プライマー(5'-GAT ATC TAG TTA TTA ATA GTA ATC AAT TAC GGG GTC-3')と R プライマー(5'-AGG CCT ATG CAT GGC GGT AAT ACG GTT ATC-3')を用いて、*PDGFA* の配列を PCR で増幅し、PCR 産物を精製した。*PDGFA* の PCR 産物を *EcoR1* サイトで切断して、pIRES-DsRed-Express ベクターの *EcoR1* サイトに挿入した。CMV-PDGFA-IRES-DsRed 配列を *EcoRV*、*Not1* サイトで切断し、pT2/shp53/shNf1/polyA ベクターに挿入した。

SB11³¹ は pMX-IRES-Puro ベクター (Cell Biolab) に挿入した。pT2/polyA ベクター

については、pT2/shTrp53/shNf1/polyA ベクターを *EcoRV*、*HindIII* サイトで切断して、*HindIII* サイトを平坦化した後、セルフライゲーションした。pT2/CMV-PDGFA-IRES-DsRed ベクター（以下 P ベクター）については、上記の CMV-PDGFA-IRES-DsRed 配列を pT2/polyA ベクターの *EcoRV*、*Not1* サイトに挿入した。pT2/CAG-EGFP ベクター（以下 GFP ベクター）については、pT2 ベクターに CAG-EGFP-polyA 配列を挿入した。

動物実験

エレクトロポレーションは、先行研究の手法を参考にして実施した³⁶。まず出生後 0~1 日齢 ICR マウス（Japan SLC）を氷上に数分間安置し、低体温により麻酔させた。2 種類のプラスミド（トランスポゾンベクターと pMX-SB11-IP ベクター）を混合した DNA 溶液は 5.0 µg/µl の濃度で調整した。また、3 種類のプラスミド（2 種類のトランスポゾンベクターと pMX-SB11-IP ベクター）を混合したものは約 7.5 µg/µl の濃度に調整した。注入部位を確認するための色素として、0.1% fast green dye（Sigma）を加えた。このプラスミド DNA 混合液を 10 µl のガラス製マイクロシリンジ（Ito Corp.）を用いて、2 µl マウスの左側脳室に投与した。直径 7.5 mm のプラチナ製電極を用いて、マウス頭部の両側から挟み込むように設置し、Square Wave Electropolator CUY21SC（NEPA GENE）を用いて、100V を 6 パルス（1 回のパルス

は 50 ミリ秒間放電し、950 ミリ秒間のインターバルを含む) の条件で通電した。マウスは週に 2 回モニタリングを行った。歩行障害や高度の背骨の彎曲、7 日間で 25% 以上の体重減少が観察された場合、モニタリングを終了し、安楽死の処分を行った。上記の症状を呈したマウスに、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) (50 mg/体重 kg) を 1 日に 1 回、4 日間腹腔内投与した後、解剖した。処置は、東京大学動物実験規則に則って行った。

細胞株実験

NIH3T3 細胞は、DMEM (Nacalai Tesque)、10%の FBS、penicilin、streptomycin 入りの培地で培養した。pMX-IRES-Puro、または、pMXs-SB11-IRES-puro ベクターを NP ベクターと共に GeneJuice 試薬 (Millipore) を用いて、NIH3T3 細胞にトランスフェクションで導入した。2 日間のピューロマイシン処理 (1 µg/ml) を行って薬剤耐性細胞を選択した後、細胞培養を継続した。導入 18 日後、FACSCalibur (BD) を用いて GFP 陽性細胞の割合を測定した。

ノックダウン効率を測定するため、定量的 PCR 解析を行った。細胞から Sepazol 溶液 (Nacalai Tesque) を用いて、total RNA を抽出し、ReverTraAce 試薬 (Toyobo) を用いて、逆転写反応を行った。合成した cDNA に対して、以下のプライマーを用い

て Light Cycler 1.5 (Roche) で実行した。

Nfl F: 5'-AGCTCTACTCACAGTGTCTG, R: 5'-GAGGGAATCCTTTGGGTTTC.

Trp53 F: 5'-ACGCTTCTCCGAAGACTGG, R: 5'-AGGGAGCTCGAGGCTGATA.

Gapdh F: 5'-TGACCACAGTCCATGCCATC, R: 5'-CATACCAGGAAATGAGCTTGAC.

Sdha F: 5'-GTGTGAAGTAGGGCAGGTCC, R: 5'-ACAAGGCACTGGCTCGATAC.

組織解析

マウスは 4% PFA/PBS で還流固定を行った後に解剖し、摘出した脳は 4%PFA で約半日間固定処理を行った。組織は約半日間 15%スクロース、30%スクロース溶液にそれぞれ浸し置換処理を行った後に、FSC 22 Blue compound (Leica) に包埋した。脳の凍結切片はマイクロトーム (Leica) で作製し、各々10 μm の縦切り、横切り切片を準備した。切片は免疫組織化学染色、あるいは、H&E 染色に供した。

免疫組織化学染色

組織切片を 2% bovine serum albumin (BSA) /PBS で 30 分間処理し、ブロッキングした。次に、2% BSA/PBS に希釈した、以下の 1 次抗体溶液を用いて、常温で 1 時間インキュベートした。

- Chicken anti-GFP polyclonal antibody (1:2000, abcam),

- mouse anti-Gfap monoclonal antibody (1:500, Sigma)
- mouse anti-Nestin monoclonal antibody (1:100, BD)
- rabbit anti-Olig2 polyclonal antibody (1:500, Novus Biologicals)
- rabbit anti-DsRed polyclonal antibody (1:500, Clontech)
- mouse anti-DsRed monoclonal antibody (1:500, MBL)
- rabbit anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000, abcam)
- rabbit anti-MMP2 polyclonal antibody (1:500, abcam)
- mouse anti-Vimentin antibody (1:100, Sigma)
- rabbit anti-Nfl polyclonal antibody (1:250, Santa Cruz)
- mouse anti-TP53 monoclonal antibody (1:500, Santa Cruz)
- mouse anti-PDGFA monoclonal antibody (1:250, Santa Cruz)
- rat anti-PDGFR α monoclonal antibody (1:250, BD PharmingenTM)

1 次抗体の反応終了後、PBS で 3 回洗い、2 次抗体反応を行った。2 次抗体は、以下のものを用いて、2% BSA/PBS で 500 倍に希釈して利用した。

- Alexa Flour 488-conjugated goat anti-chick IgG (ThermoFisherScientific)
- Alexa Flour 594-conjugated goat anti-rabbit, -mouse, -rat IgG
(ThermoFisherScientific)

- Alexa Flour 647-conjugated goat anti-rat IgG (ThermoFisherScientific)
- Alexa Flour 680 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) (ThermoFisherScientific)

PBS で 3 回洗浄後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)で 10 分間インキュベーションして、核染色を行った。EdU 取り込み細胞の染色には、Click-iT Assay Kits (Invitrogen) を用いた。蛍光画像は AxioImager M1 microscope (Zeiss) で撮影した。

第 4 章

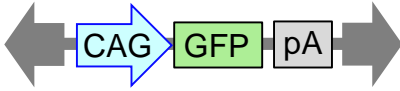
結果

1. *PDGFA*, *shNf1*, *shTrp53* を組み込んだトランスポゾンベクターの作製

ゲノムに組み込まれた後に cDNA や shRNA を発現するトランスポゾンベクターを 4 種類作製した (図 9A)。GFP ベクターは、Enhanced green fluorescent protein (EGFP) を発現する。P ベクターは CMV プロモーターにより *PDGFA* と、その下流の Internal Ribosomal Entry Site (IRES) により DsRed の発現が誘導される。NP ベクターは H1 プロモーターにより *Nf1* と *Trp53* に対する shRNA (*shNf1*, *shTrp53*) が発現し、SV40 プロモーターにより EGFP の発現が誘導される。PNP ベクターは、*PDGFA*、*shNf1*、*shTrp53*、DsRed 全ての発現が誘導される。本研究で用いた DsRed は、DsRed-Express 変異体であり、このタンパクは半減期が 12 時間以内と短いため³⁸、*PDGFA* の発現レベルをモニターするのに適している。*Nf1* および *Trp53* に対する shRNA として、先行研究で報告された標的配列を用いた^{6, 35, 38}。まず、定量的 PCR (qPCR) によって、NP ベクターにより *Nf1* と *Trp53* の発現が抑制されるかを検討した。*Nf1* および *Trp53* の発現レベルは、GFP ベクターを導入した細胞に対して、NP ベクターを導入した細胞で有意に減少していることが確認できた (図 9B)。

A

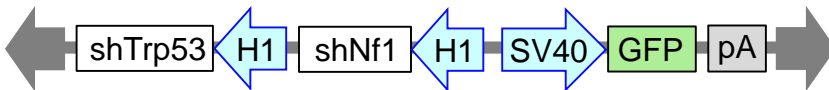
GFP



P



NP



PNP

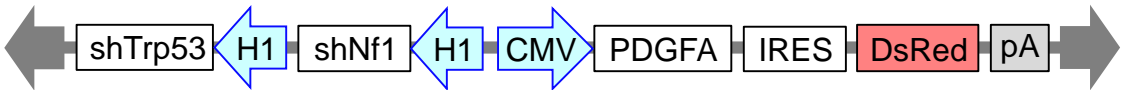
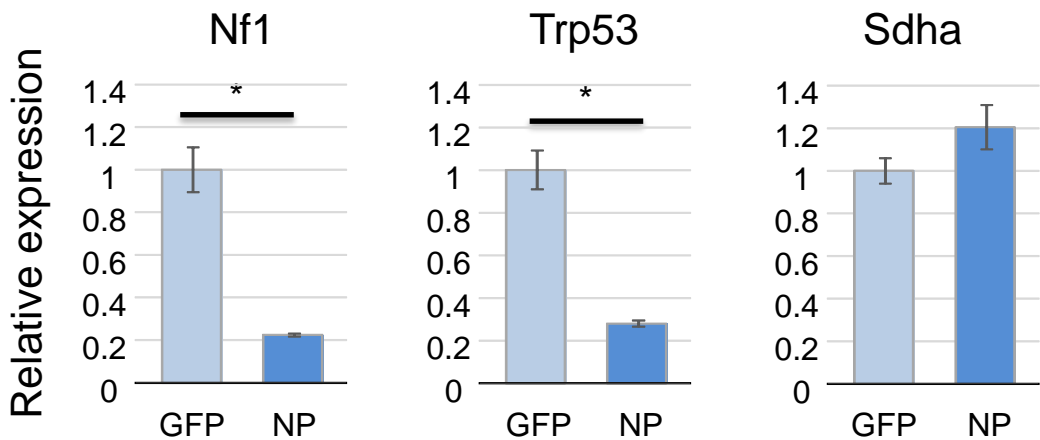
**B**

図9 トランスポゾンベクターの概略図とGFPベクター、NPベクターにおけるmRNA発現

4種類のトランスポゾンベクター；GFP、P(*PDGFA*)、NP(*shNf1*, *shTrp53*)、PNP(*PDGFA*, *shNf1*, *shTrp53*)ベクターを作製した(A)。*Nf1*、*Trp53*、*Sdha*の発現を、GFPベクターとNPベクターについてqPCRにより測定した。*Nf1*、*Trp53*のmRNA発現はNPベクターにおいて顕著に低下した(B)。

* ; $P < 0.05$, student's *t*-test

SB トランスポゾンシステムは2つの要素から構成される。トランスポゾン DNA 配列と SB トランスポゼースである¹⁸。トランスポゼースはトランスポゾン DNA の両端の反復配列を認識して、プラスミド DNA からの切り出しを引き起こし、染色体中の TA 塩基配列への組み込みを誘導する。ゲノムに組み込まれた DNA 配列は、増殖後も維持されるため、恒常的な発現を誘導する。まず、SB トランスポゼースによって、目的遺伝子がゲノム中に組み込まれるかどうかを細胞レベルで検討した。NIH3T3 細胞に NP ベクターとコントロールの空ベクター、または、NP ベクターと SB トランスポゼース発現ベクターをトランスフェクションした。導入 18 日後に顕微鏡で観察した結果、SB トランスポゼースを発現した細胞で多数の GFP 発現細胞を認めた (図 10B, D)。GFP 陽性細胞の割合を計測したところ、SB トランスポゼースの存在により、GFP 陽性細胞の割合が増加することが示された (図 10E)。以上から、SB トランスポゼースは、ゲノム中への組み込みを促進したと考えられた。

2. PNP ベクターは生体内でグリオーマを効率的に誘導した

新生児マウスの側脳室に DNA 溶液を投与し、エレクトロポレーションを行うことで、側脳室の壁面に局在する神経幹細胞・前駆細胞に外来遺伝子を導入できることが示されている^{20,39}。ゲノムに取り込まれなかったトランスポゾンは、細胞分裂

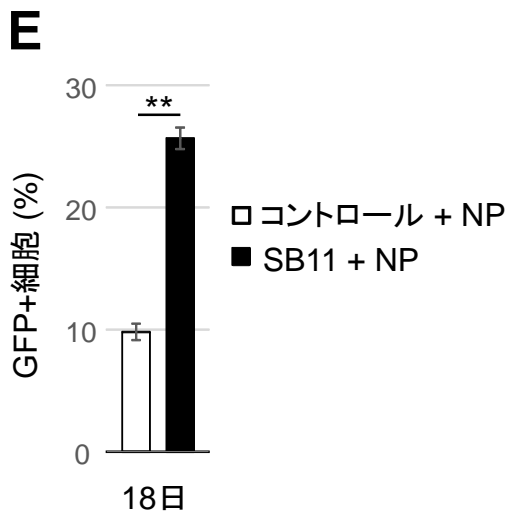
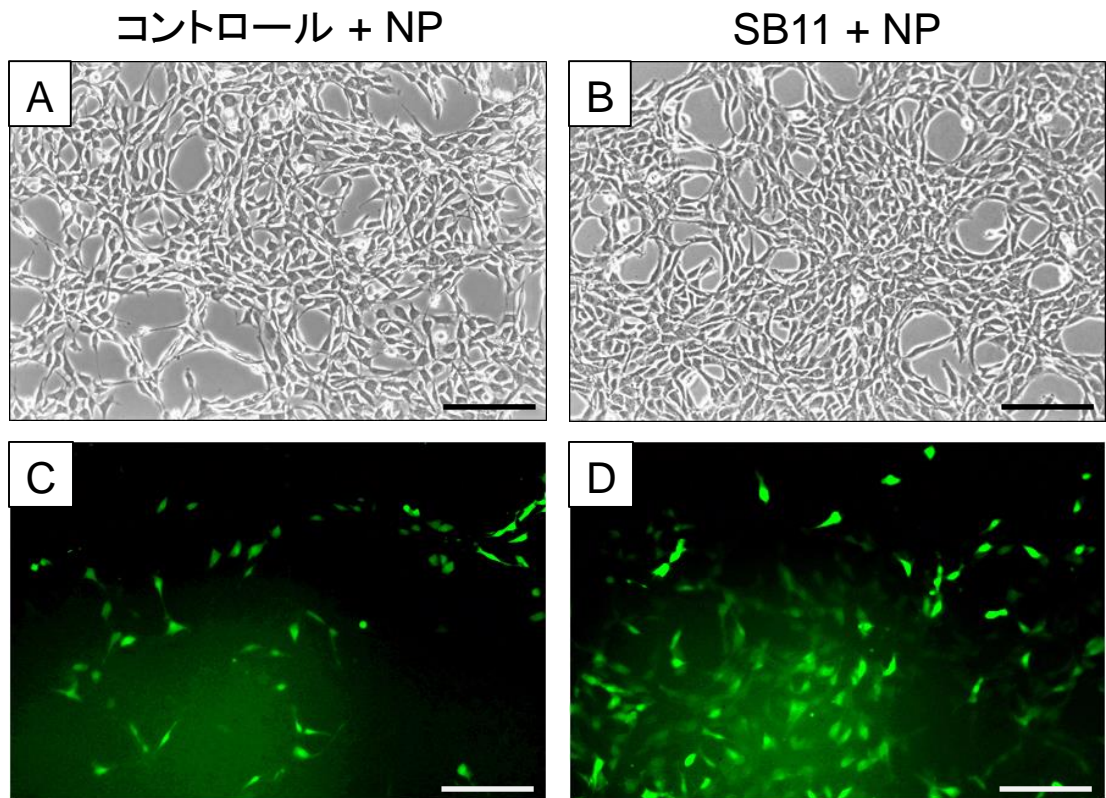


図10 *in vitro* におけるGFP発現の比較
 NIH3T3細胞にコントロールベクターとNPベクター(A, C)、または、SB11トランスポゼースとNPベクターを導入して(B, D)、18日間培養した。下のパネルは上のパネルと同じ領域で、GFP発現を検出した(C, D)。C, Dにおける視野あたりのGFP+細胞を計測した(E)。GFP+細胞は、コントロールと比較して、SB11を導入した細胞で顕著に増加した(E)。Bars = 200 μ m ** ; $P < 0.01$, student's *t*-test

に伴って希釈されて行き、複数回の分裂後に発現が検出できなくなる。一方、ゲノムに取り込まれたトランスポゾン、増殖後も恒常的に発現を誘導する。本研究では、プラスミド DNA を、出生後 0~1 日齢の新生児マウスの左側脳室に投与し、エレクトロポレーションを行った (図 11A)。まず、エレクトロポレーションによる導入を確認するために、NP ベクターのエレクトロポレーションを行った。導入 2 日後の側脳室近傍において GFP を発現した細胞を認め、プラスミドが、側脳室近傍の神経幹細胞・前駆細胞に導入されたことが確認された (図 11B)。

次に、トランスポゾンベクターと SB11 トランスポゼース発現ベクターを共に Subventricular zone (SVZ) に投与し、エレクトロポレーションを行った。8 週経過後に脳の組織解析を行った。GFP ベクター、P ベクターを導入したマウスの脳実質において、蛍光タンパクを発現した細胞が観察された (図 12E, F)。しかし、蛍光タンパクを発現する細胞は、200 倍の視野に 1~2 個程度と非常に数が少なく、クラスターは形成されていなかった。これらの結果は、GFP ベクター、P ベクターは、細胞増殖の促進には至らなかったことを示している。実際に、H&E 染色において、組織学的な変化は認めなかった (図 12A, B)。

次に、NP ベクターを導入した脳を解析した。NP ベクターを導入したマウスの脳

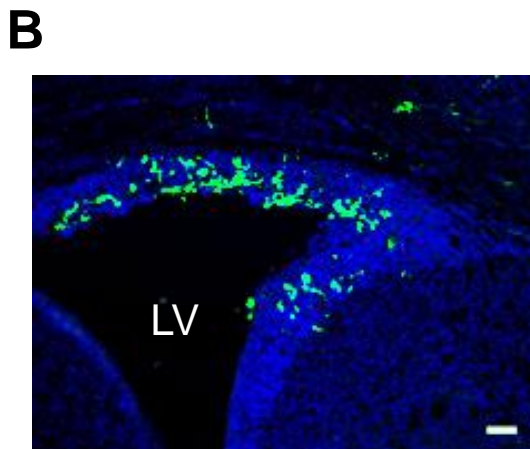
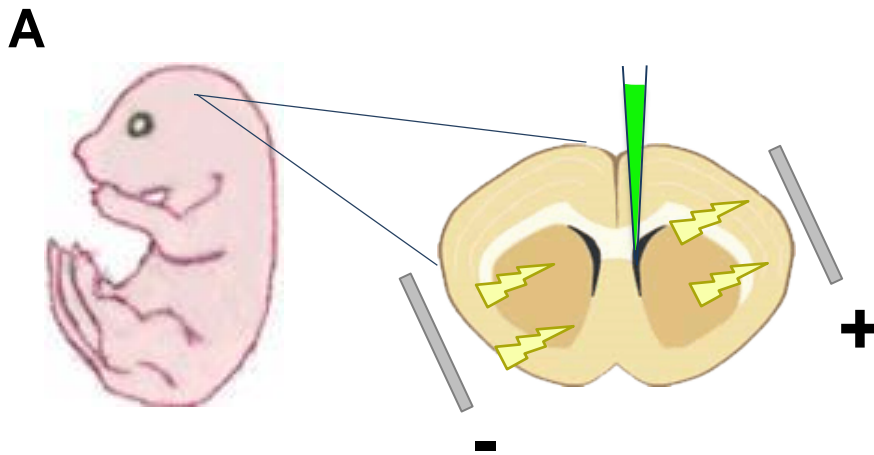


図11 エレクトロポレーションの概略図とSVZにおけるGFP発現
 出生後P0~1マウスの側脳室にNPベクターを1 μ l投与し、エレクトロポレーションによりSubventricular zone (SVZ)の壁面にある神経幹細胞・前駆細胞に導入した(A)。NPベクター導入2日後に、SVZにおけるGFP+細胞を認めた(B)。Bar = 50 μ m, LV = Lateral Ventricle

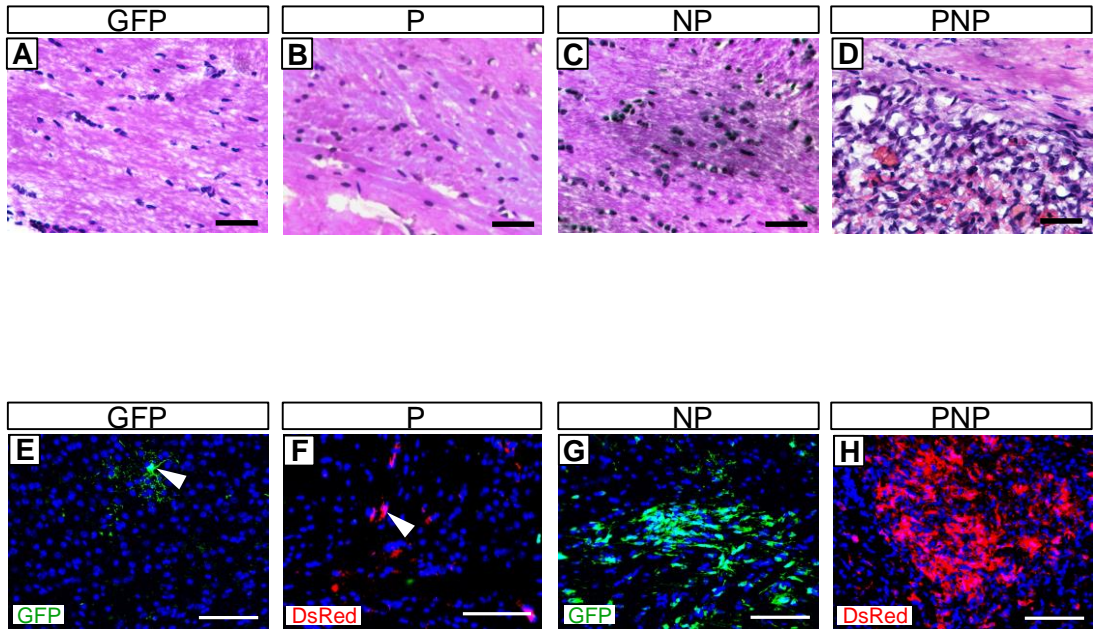


図12 トランスポゾンベクターを導入してから8週間における組織評価
 マウスの脳にGFP、P、NP、PNPベクターを導入して8週後に、H&E染色と免疫組織化学染色による組織評価を行った。GFPベクター、Pベクターを導入したマウスでは、病変は認められず(A, B)、単一のGFP+細胞やDsRed+細胞がわずかに認められた(E, F)。NPベクターを導入したマウスでは、組織の一部が変色し、核の集積が認められて(C)、GFP+細胞のクラスターが認められた(G)。PNPベクターを導入したマウスでは、細胞の集積、出血、組織構造の破綻が認められて(D)、DsRed+細胞の大きなクラスターが認められた(H)。Bars = 100 μ m

では、脳実質に多数の GFP+細胞を認めた (図 12G)。H&E 染色を行った所、GFP+細胞が集積している領域に一致して、細胞密度の増加を認めた (図 12C)。一方、PNP ベクターを導入した場合、DsRed+細胞のクラスターが認められた (図 12H)。H&E 染色を行ったところ、細胞密度が顕著に高まっており、局所的な出血や組織構造の破綻を認めた (図 12D)。PNP ベクター導入により得られた組織画像は、ヒトグリオーマの組織所見に一致すると考えられた。

次に、ベクターを導入したマウスの生存を解析した。Kaplan-Meier 生存曲線を解析した結果、GFP ベクター、P ベクター、NP ベクターを導入したマウスは、症状を呈することなく 23 週間生存した。一方、PNP ベクターを導入したマウス (以下 PNP マウス) の 90%以上は、23 週齢までに歩行異常などの神経症状を呈したため、安楽死を行った (図 13)。神経症状を認めた PNP マウスの脳を解剖したところ、脳実質に出血領域を認めた (図 14A, D, H)。蛍光シグナルを検出したところ、出血領域に一致して強い DsRed シグナルを認めた (図 14B, C, F, G)。脳切片の組織解析を行ったところ、DsRed+細胞が、脳実質や脳幹で広範囲に分布することが明らかになった (図 15B)。H&E 染色によって腫瘍領域を組織学的に解析すると、出血や組織構造の破綻を認めた (図 15A)。高倍率で観察すると、核が偏在して好酸性の細胞質を有するゲミストサイティックな細胞を認め (図 16B 矢頭)、核分裂中の細胞

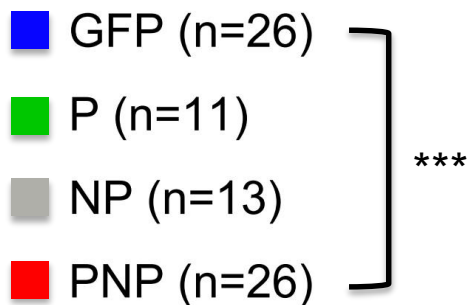
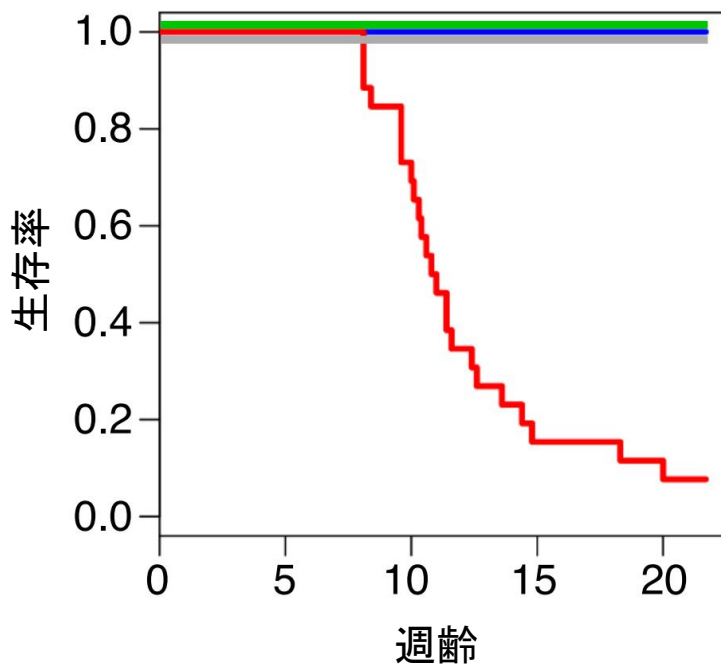


図13 トランスポゾンベクターを導入したマウスの生存曲線
 Kaplan-Meier生存曲線により、GFP、P、NPベクターを導入したマウスは23週まで生存した一方で、PNPベクターを導入したマウスは、90%以上が23週までに神経症状を呈し、安楽死を行った。Log-rank test (GFP vs PNP)、*** : $P < 0.001$

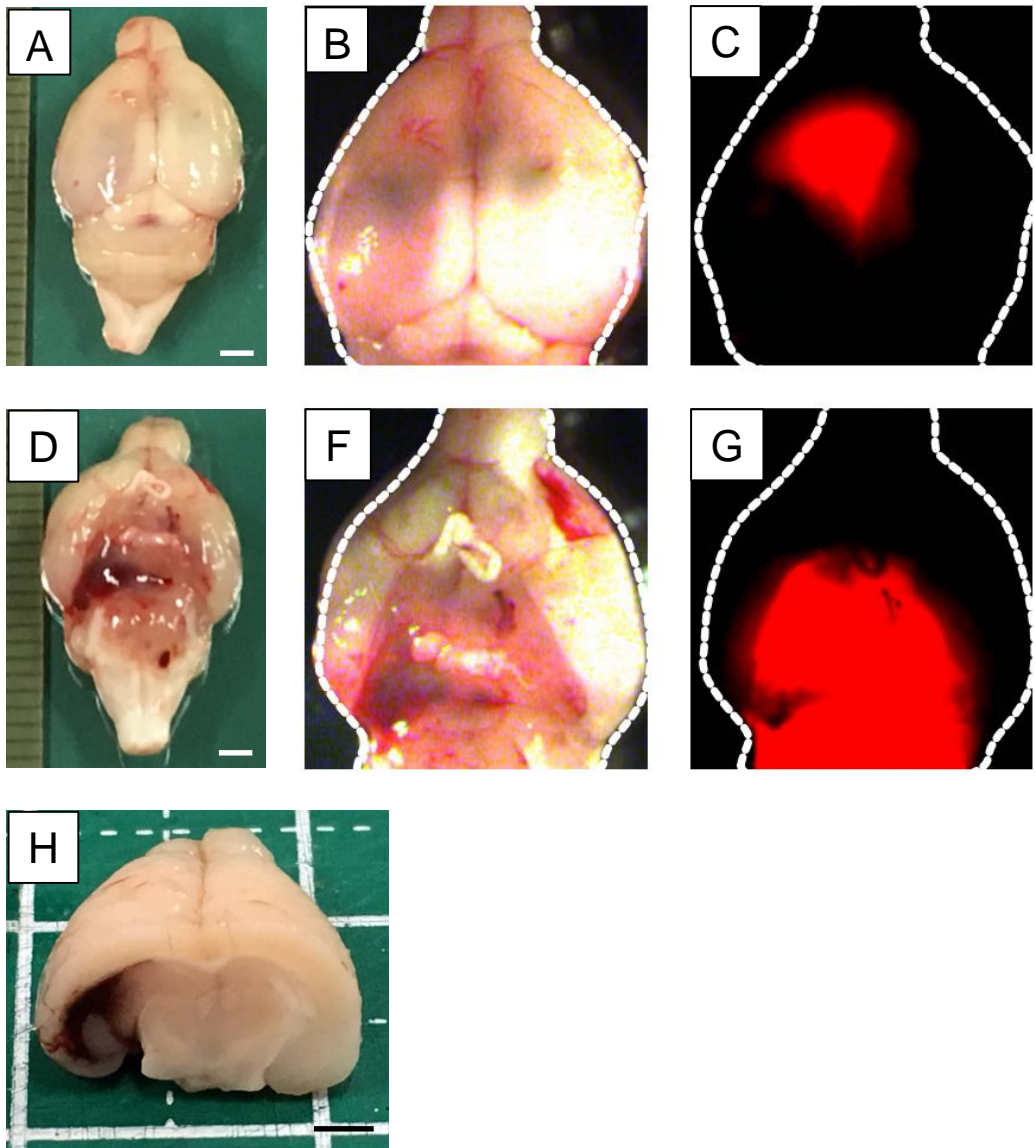


図14 神経症状を呈したPNPマウスの剖検
 脳実質に広範囲な出血が認められ(A, D, H)、出血領域とDsRedのシグナルがほぼ一致した(B, C, F G)。Bars = 2 mm

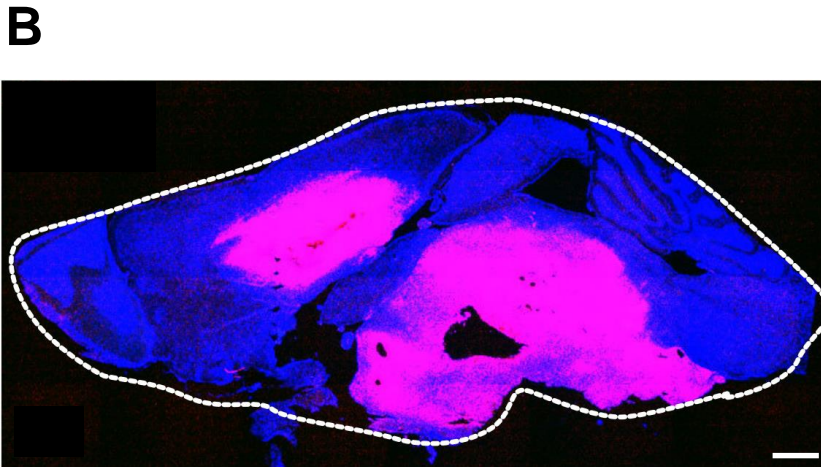
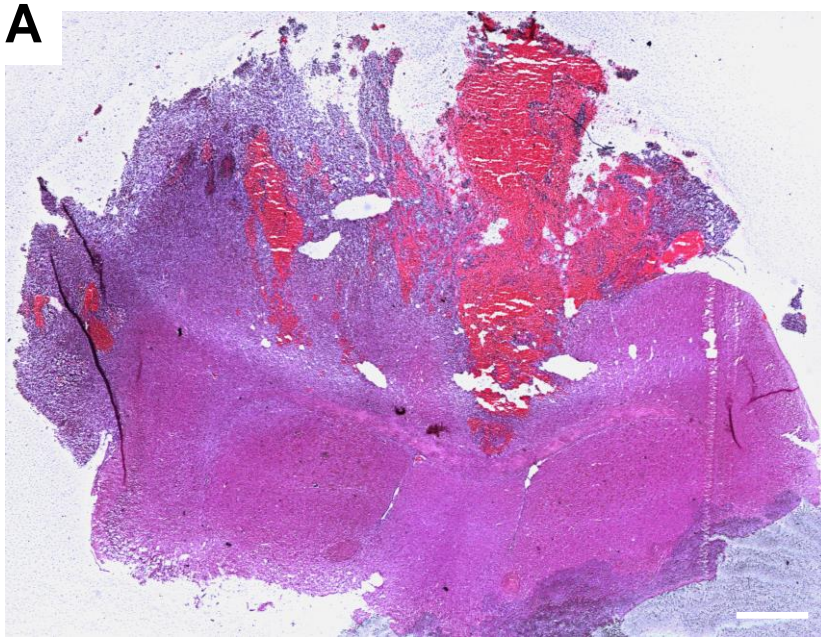


図15 PNPベクターを導入して神経症状を呈したマウスの腫瘍の局在
H&E染色により、脳実質にがん細胞の集積や出血が広範囲に認められ
て(A)、免疫組織化学染色により、DsRed+細胞の大きなクラスターが認
められた(B)。Bar = 1 mm

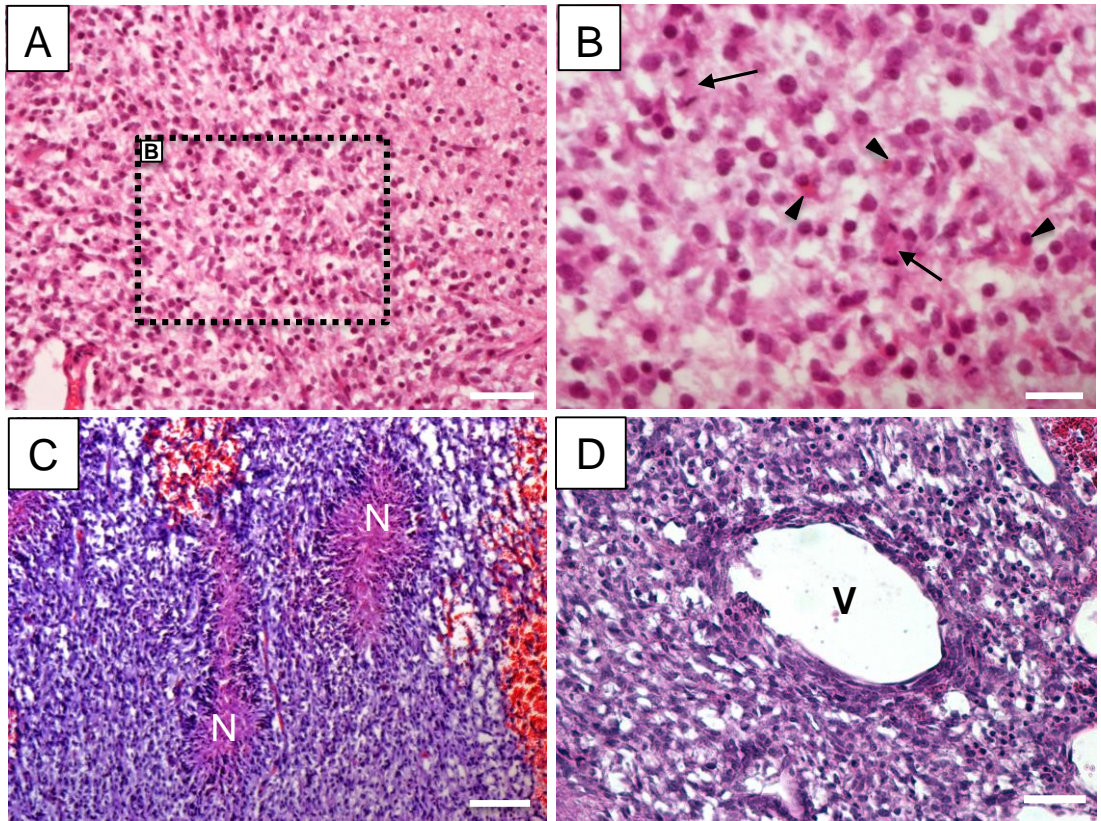


図16 PNPベクターを導入したマウスに形成された腫瘍の組織学的所見
 H&E染色、A:腫瘍部分の全体像、B:核が偏在して好酸性の細胞質を有するゲミストサイティックな細胞を認めた(矢頭)、核分裂中の細胞を認めた(矢印)、C:柵状構造を伴う壊死領域(N)、D:血管(V)周囲への腫瘍細胞の集積

Bars = 100 μ m(A, C, D), 20 μ m(B). N = Necrosis, V = Vessel

が認められたことから（図 16B 矢印）、アストロサイトーマに特徴的な所見を認めた。また、一部の個体では、柵状構造を伴う壊死領域を認めることから（図 16C）、悪性度の高いグリオブラストーマに特徴的な所見を認めた。以上から、PNP ベクター誘導性グリオーマは、ヒトグリオーマの組織所見と一致することを示している。PNP マウスで発生した腫瘍の病理組織像は（1）核が偏在して好酸性の細胞質を有する *gemistocytic* な細胞を認め、アストロサイトーマに特徴的な所見である。（2）領域によっては異型性の少ない *Oligodendrocyte* 的な組織像を示す領域も存在する。（3）柵状構造の中に壊死領域を認めることや高度な多型性を有することから GBM として矛盾しない所見を認める個体がいる。（4）胎児性腫瘍（旧 PNET）などグリオーマ以外の脳腫瘍を積極的に疑うような組織像は見られない。以上の所見は、ヒトのグリオーマに類似していることが確かめられた。

次に、免疫組織化学染色を行って、腫瘍の性質を解析した。DsRed+がん細胞は、EdU の取り込みを認め（図 17A, D）、また、Ki67 陽性であることから（図 17B, E）、増殖性を有することが確認された。がん細胞は *Olig2* を発現していたが（図 17C, F）、*Nestin*、*Gfap*、*NeuN* は発現していなかった（図 17G-L）。*Gfap* の発現はリアクティブなアストロサイトでのみ認められた（図 17H, K）。*Olig2* は、オリゴデンドロサイト前駆細胞 (*Oligodendrocyte progenitor cell: OPC*) のマーカーであることから、

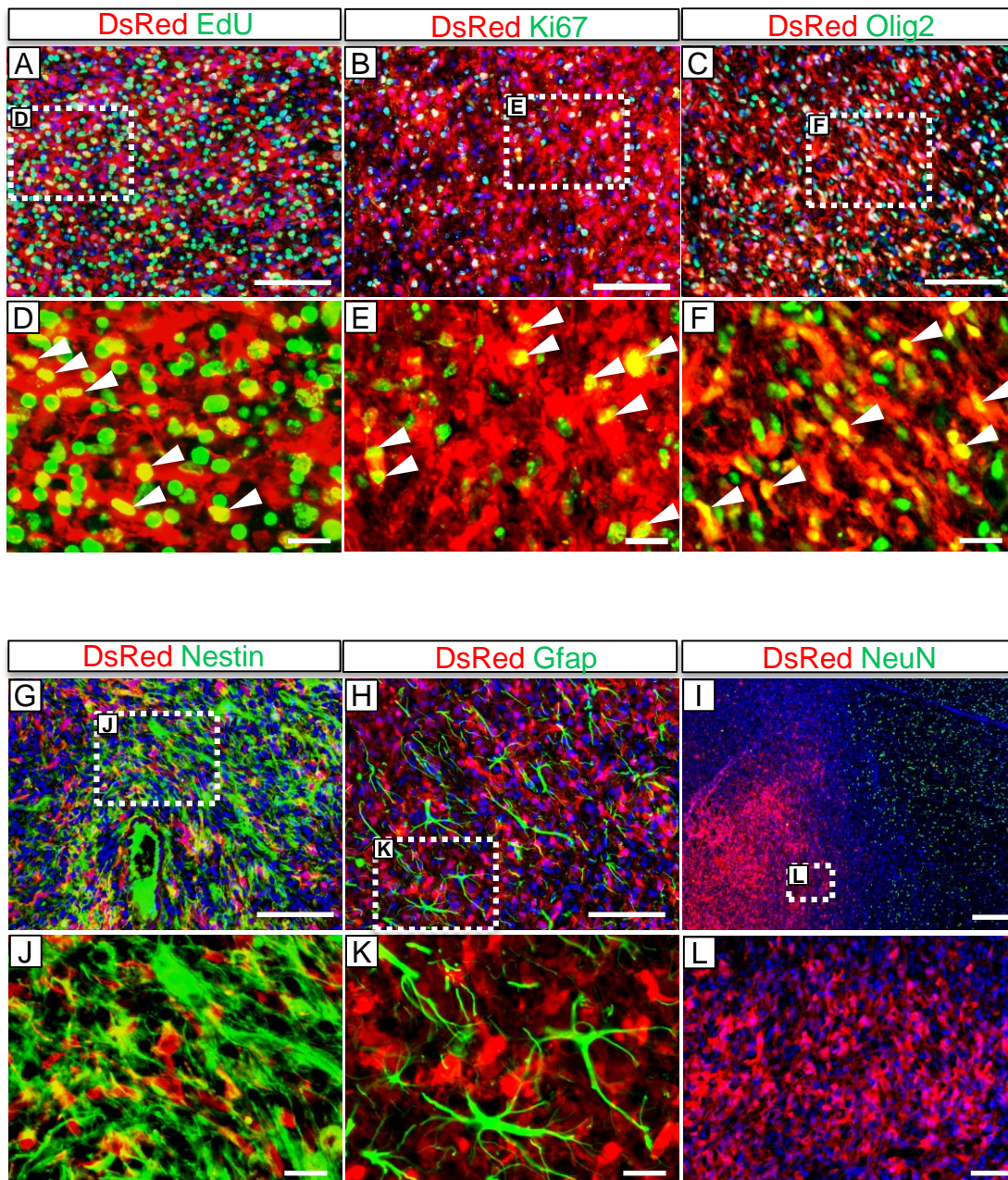


図17 神経症状を呈したPNPマウスに形成された腫瘍の組織評価
 矢頭で示すように、DsRed+細胞は、EdUを取り込んで増殖性を示した(D)。同様に、Ki67、DsRed共陽性細胞が多数認められた(E)。大部分のDsRed+細胞は、Olig2を発現した(F)。一方で、DsRed+細胞は、Nestin、Gfap、NeuNを発現しなかった(G-L)。
 Bars = 100 μ m(A, B, C, G, H), 20 μ m(D, E, F, J, K), 200 μ m(I), 50 μ m(L)

がん細胞は OPC の特徴を保持していると考えられた。Ki67+DsRed+細胞よりも、EdU+DsRed+細胞の方が相対的に多い理由としては、EdU は、DNA 合成の間に DNA に取り込まれるが蓄積する一方で、Ki67 は M 期においてのみ高く発現することから、EdU+DsRed+細胞の方が多いと考えられた。

PNP マウスの非腫瘍領域においては、EdU の取り込みが、わずかな Olig2+細胞に認められた(図 17M, N)。また、GFP ベクターを導入した 8 週齢マウスでは、EdU の取り込みが、一部の Olig2+細胞において認められた(図 17O, P)。これらの結果は、腫瘍が誘導されていない正常な領域においては、OPC が緩やかに増殖していることを示している。

次に、PNP ベクターに設計した、*PDGFA*、*shNf1*、*shTrp53* の発現を *in vivo* で確認した。*PDGFA* は、DsRed+がん細胞領域において、高い発現が認められた (図 18A-C)。DsRed+細胞クラスター近傍において、*Nf1* を発現している DsRed 陰性細胞が認められたが (図 18F)、DsRed+細胞クラスターにおいては、*Nf1* の発現は認められなかった。同様に、DsRed+細胞クラスターにおいては、*Trp53* の発現は認められなかった。以上から、導入した PNP ベクターの、*PDGFA*、*shNf1*、*shTrp53* の発現は誘導されていると考えられた。

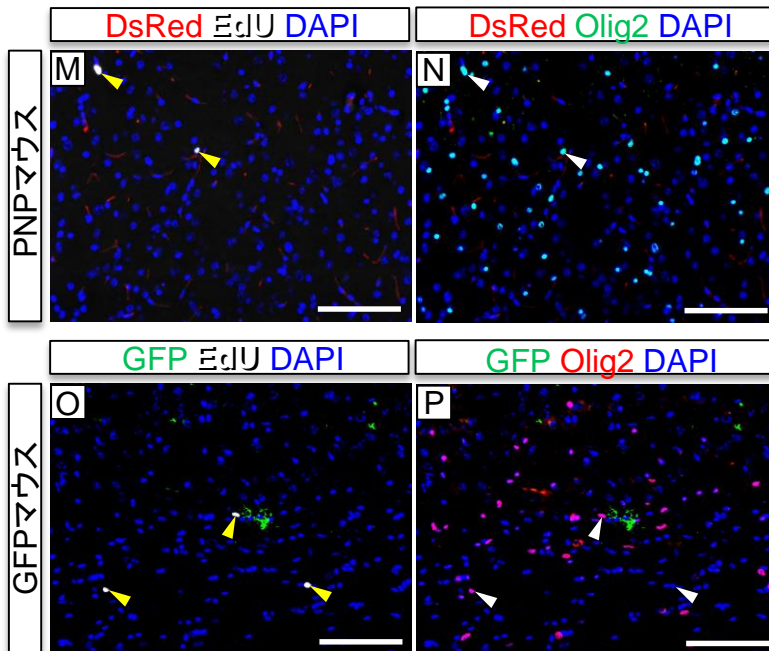


図17 神経症状を呈したPNPマウスの非腫瘍領域と、8週齢GFPマウスにおける増殖性の評価
 矢頭で示すように、PNPマウスの非腫瘍領域において、Olig2+細胞にEdUの取り込みがわずかに認められた(M, N)。また、GFPマウスにおいては、Olig2+細胞にEdUの取り込みが、PNPマウスの非腫瘍領域の細胞と同様に、わずかに認められた(O, P)。Bars = 100 μ m(M-P)

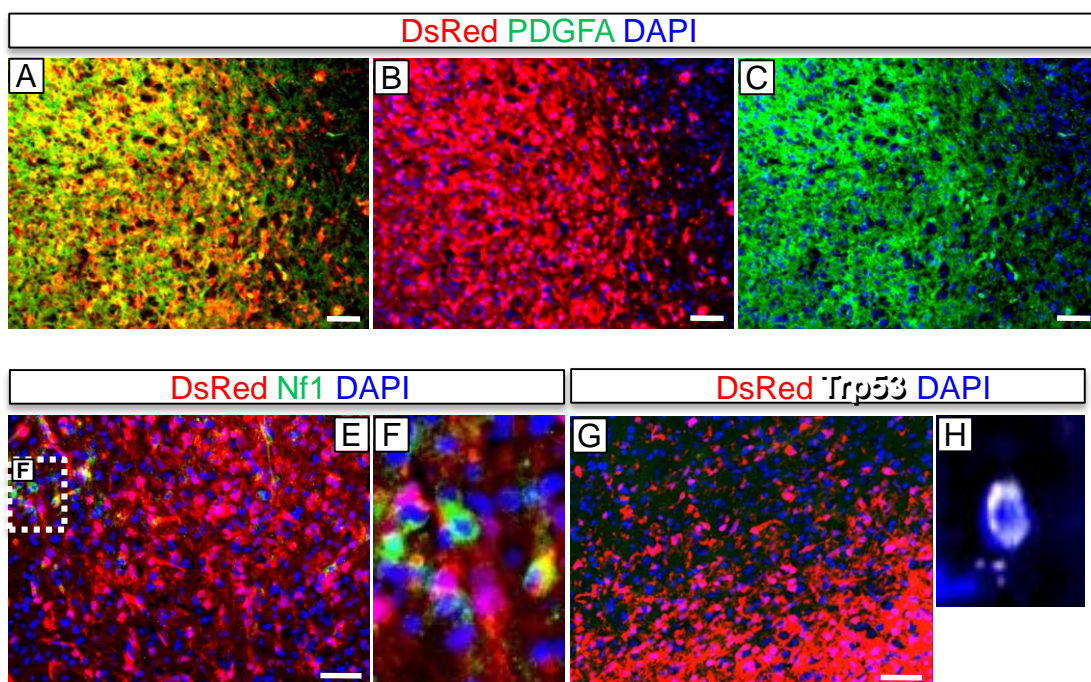


図18 神経症状を呈したPNPマウスにおける、トランスポゾンにより導入した目的遺伝子の発現確認

DsRed+がん細胞領域において、トランスポゾンにより発現を誘導した *PDGFA* の高い発現が認められた(A-C)。DsRed+細胞クラスター近傍において、*Nf1* を発現しているDsRed陰性細胞が認められた(F)。一方で、DsRed+細胞クラスターにおいては、*Nf1* の発現は認められなかった(E)。同様に、DsRed+細胞クラスターにおいては、*Trp53* の発現は認められなかった(H)。

Bars = 20 μ m(A-E, G)

3. PNP ベクターは Olig2+細胞の増殖と腫瘍随伴 OPC の増殖を誘導した

次に、DsRed の蛍光を指標にして、PNP マウスにおいてグリオーマがどのように発生するのか、その初期過程を解析した。PNP マウスの 2 週齢の脳を解析したところ、DsRed+細胞のクラスターが、吻側移動経路 (Rostral Migratory Stream: RMS) より約数百 μm 線条体寄りの領域に形成されていることが明らかになった (図 19A)。DsRed+細胞は、EdU の取り込みを認め、増殖性が確認できた (図 19E)。これらの増殖細胞は Olig2 を発現していたが (図 19D)、Gfap、NeuN を発現していなかった (図 19F, G)。これらの結果は、PNP ベクターを導入された神経幹細胞・前駆細胞が、正常な分化領域である RMS から線条体へと移動し、Olig2+の OPC へと分化した後に、グリオーマの起源細胞となって増殖し、腫瘍形成につながったことを示している。

4 週から 6 週にかけて経時的に腫瘍の観察を行ったところ、DsRed+クラスター領域が拡大した (図 20A, C)。免疫組織化学染色により、DsRed+細胞は EdU を取り込んでおり (図 21F)、増殖性を有することが示された。DsRed+細胞の大部分は Olig2 を発現しており (図 21E)、OPC が増殖を続けていると考えられた。興味深いことに、DsRed+グリオーマ細胞以外にも、増殖細胞を認めた (図 21H)。これらの細胞は Olig2+であったことから (図 21G)、正常の OPC と考えられる。すなわち、

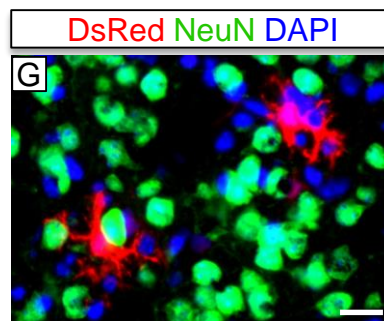
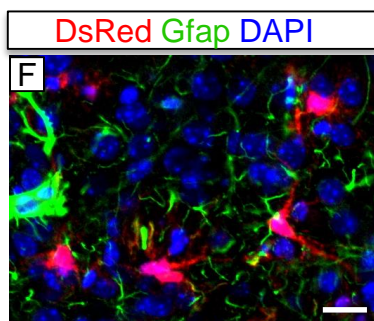
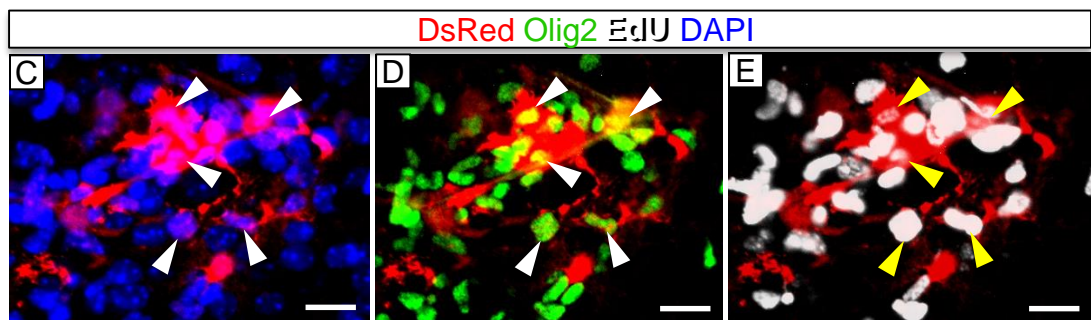
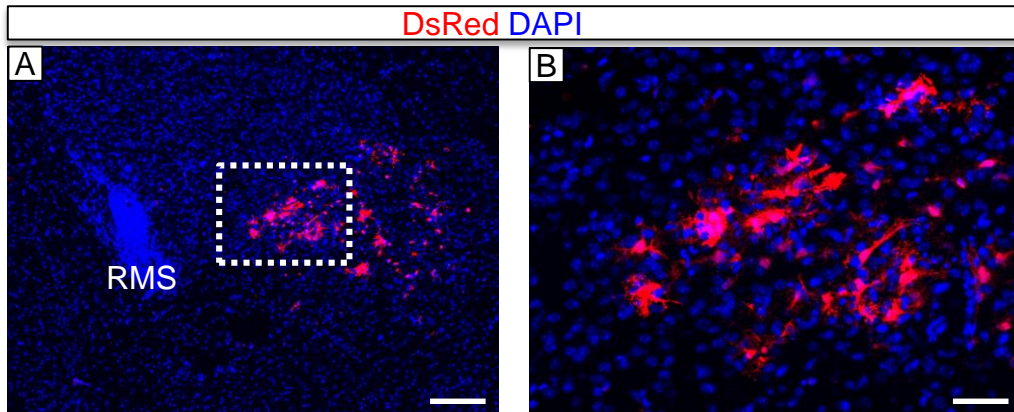


図19 2週齢PNPマウスにおける、DsRed+細胞クラスターの組織評価
 DsRed+細胞は、RMSから数百 μm ほど離れてクラスターを形成した(A)。
 DsRed+細胞は、矢頭で示すように、Olig2を発現して(D)、EdUを取り込んで増殖性を示した(E)。一方、DsRed+細胞は、Gfap、NeuNを発現しなかった(F, G)。
 RMS = Rostral Migratory Stream, Bars = 200 μm (A), 50 μm (B), 20 μm (C-G)

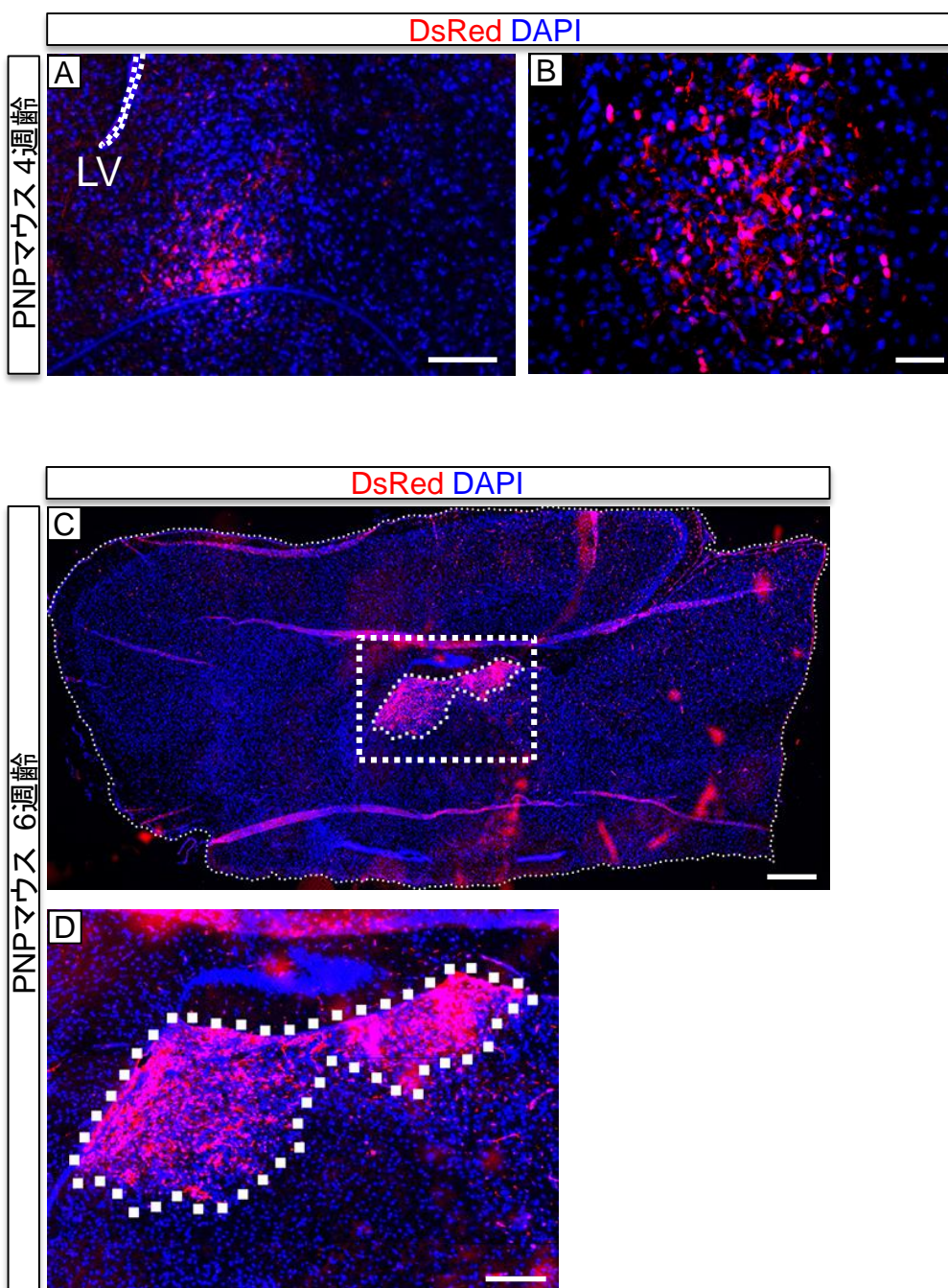


図20 4週齢または6週齢PNPマウスで形成された腫瘍の組織評価
 DsRed+細胞のクラスター領域は、4週齢(A, B)、6週齢(C, D)と個体の成長に伴って、拡大した。
 LV = Lateral Ventricle, Bars = 200 μ m(A), 50 μ m(B), 500 μ m(C), 20 μ m(D)

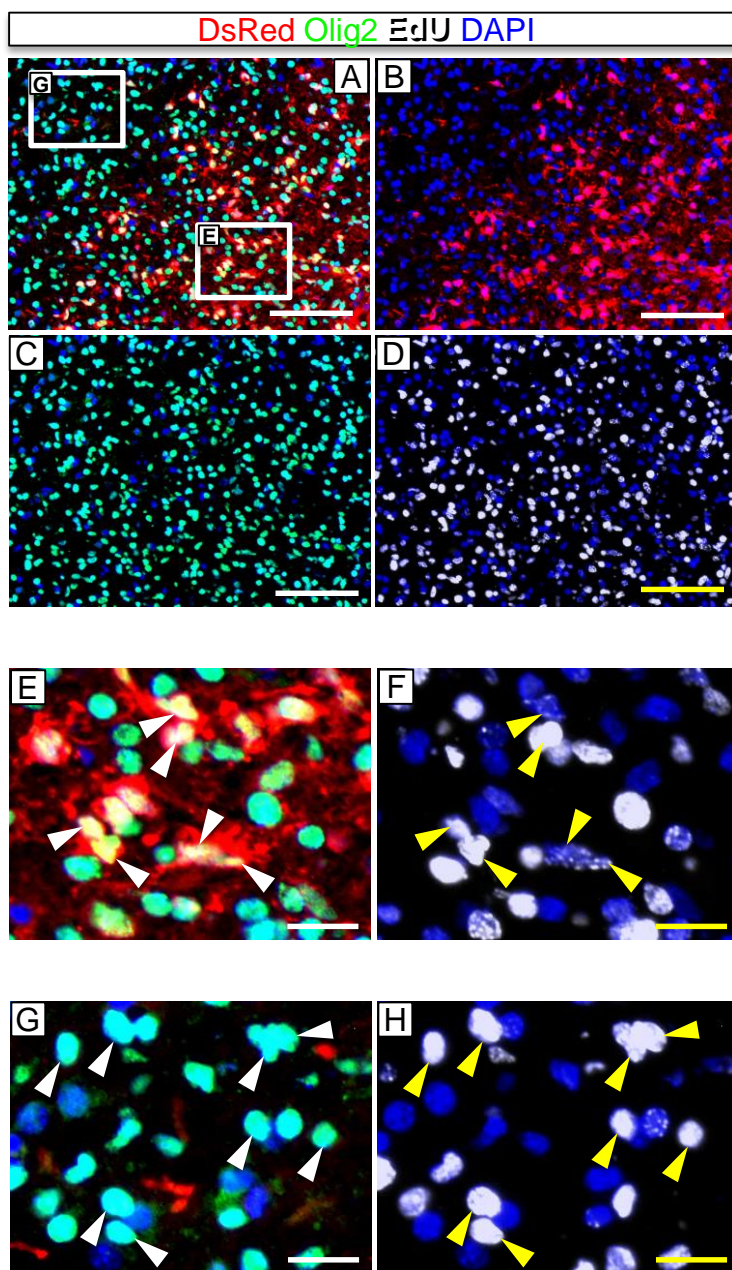


図21 6週齢PNPマウスにおける腫瘍の組織解析

DsRed+細胞クラスター領域とその周辺部に対し、免疫組織化学染色を行った。DsRed+細胞クラスター領域は、はっきりと境界を示したのに対し(B)、Olig2の発現、EdUの取り込みは全体で均一に認められた(C, D)。腫瘍の中心部を(E)、周辺部を(G)とした。DsRed+細胞は、Olig2を発現し(E矢頭)、EdUの取り込みにより増殖性を示した(F矢頭)。一方で、周辺部におけるDsRed-Olig2+細胞においても、増殖性を認めた(G, H矢頭)。Bars = 100 μ m(A-D), 20 μ m(E-H)

脳実質に存在する OPC が、グリオーマ細胞の近傍でパラクラインにより PDGFA に反応して増殖したと考えられる。グリオーマ近傍で増殖する OPC は、腫瘍随伴 OPC として血管新生を促進することで、グリオーマの成長を促すことが知られている⁴⁰。以上から、PNP ベクター誘導性グリオーマは、Olig2 陽性の OPC を起源細胞とし、周囲に腫瘍随伴 OPC を誘導したことが明らかになった。

4. NP ベクターは、OPC の緩やかな増殖を引き起こした

一方、NP ベクターを導入したマウス（以下 NP マウス）は、少なくとも 23 週まで、脳腫瘍に関連した症状は見られなかった（図 13）。先行研究において、神経幹細胞・前駆細胞で *Nfl* と *Trp53* を共にコンディショナル・ノックアウトさせると、OPC が増殖し、前癌病変を形成することが報告されている³⁵。そこで、NP マウスにおいても、OPC の増殖が誘導されているのかを検討した。6 週齢 NP マウスの脳に組織学的な解析を行ったところ、GFP+細胞が散在性に分布していた。GFP+細胞は *Olig2* を発現しており、大部分の GFP+細胞は EdU 陰性であった（図 22E, F 矢印）。これらの結果から、NP ベクターは、OPC の増殖を引き起こしたが、その増殖速度は、PNP ベクターを導入した場合に比べて、緩やかであると考えられた。さらに、NP ベクター導入細胞の近傍に、増殖性の *Olig2*+細胞は観察されなかった（図 22G, H 矢印）。実際に、GFP+細胞の存在領域と、非存在領域とを比較しても、*Olig2*+

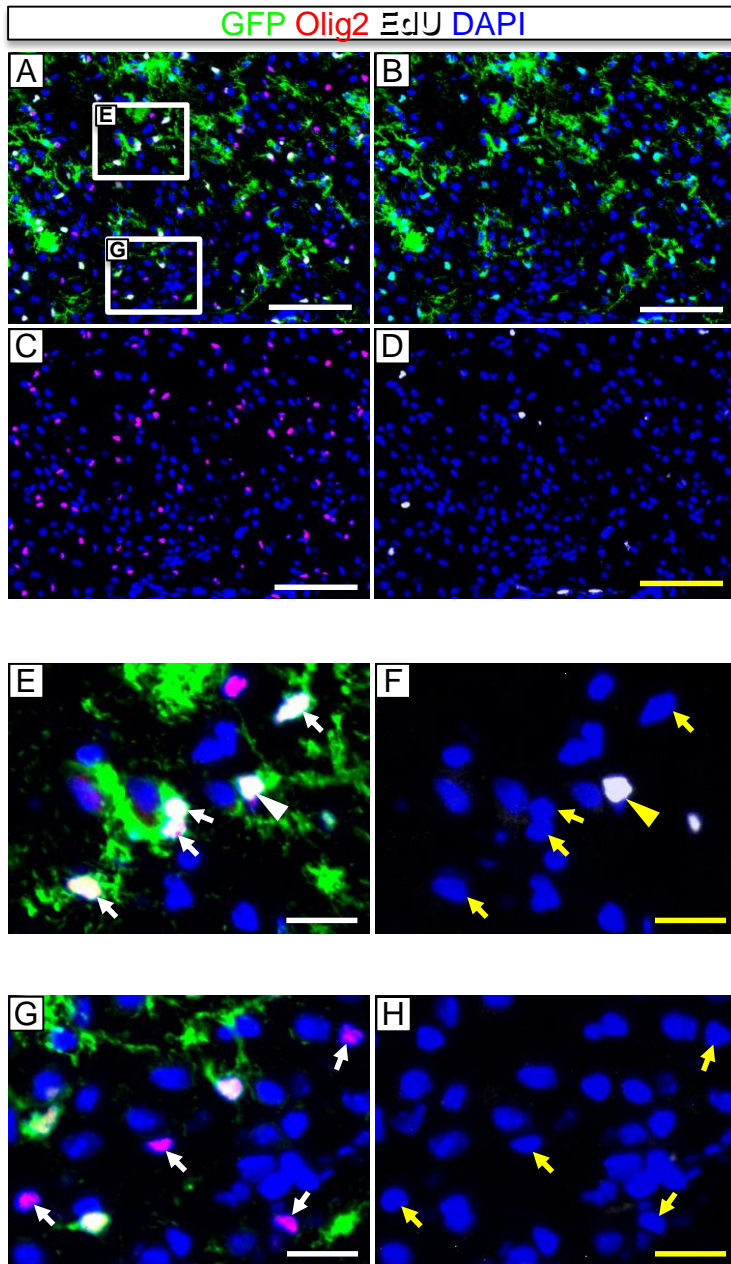


図22 6週齢NPマウスにおける組織解析

NPベクターを導入した脳では、GFP+細胞のクラスターが認められた。GFP+細胞が密に認められる領域を(E)、GFP+細胞の周辺部に正常OPCが認められる領域を(G)とした。Olig2を発現する細胞は、領域全体で発現が認められたが(C)、EdUの取り込みはほとんど認められなかった(D)。大部分のGFP+細胞は、Olig2を発現したが(E矢印、矢頭)、EdUの取り込みはほとんど認められなかった(F矢印)。一方で、GFP-Olig2+の正常OPCは、EdUの取り込みを認めなかった(G, H矢印)。
 Bars = 100 μ m(A-D), 20 μ m(E-G)

細胞の分布に差を認めなかった (図 23A, B)。以上から、NP ベクターは OPC の緩やかな増殖を引き起こすが、腫瘍随伴 OPC の誘導は伴わないことが明らかになった。

5. P ベクターと NP ベクターの同時導入により、異なる遺伝学的変化を有する細胞が混在した

近年、グリオーマにおける単一細胞での RNA seq 解析や、または、1 つの腫瘍内において、複数領域の変異の解析から、高度の不均一性が存在することが報告されてきた^{10,32}。ただ、このような不均一性をモデルするマウスは、ほとんど報告が無い。ヒト・グリオーマの治療戦略を立てる上でも、遺伝学的に不均一な細胞集団の挙動を、腫瘍形成の初期課程から、マウスモデルを利用して調査するのは不可欠であると考えられる。このような不均一性をマウスでモデルするために、遺伝学的に不均一な細胞集団を作り出し、可視化することを目的にした。そのため複数のトランスポゾンベクターを同時に導入することを計画して、P ベクターと NP ベクターを同時にエレクトロポレーションした (以下 P+NP マウス)。P ベクターまたは NP ベクターがゲノムに組み込まれると、DsRed または GFP の発現が誘導される。そのため、これらのベクターを単独でゲノムに組み込んだ細胞は、DsRed+細胞または GFP+細胞として可視化される (図 24A, B)。一方で、P ベクターと NP ベクターを

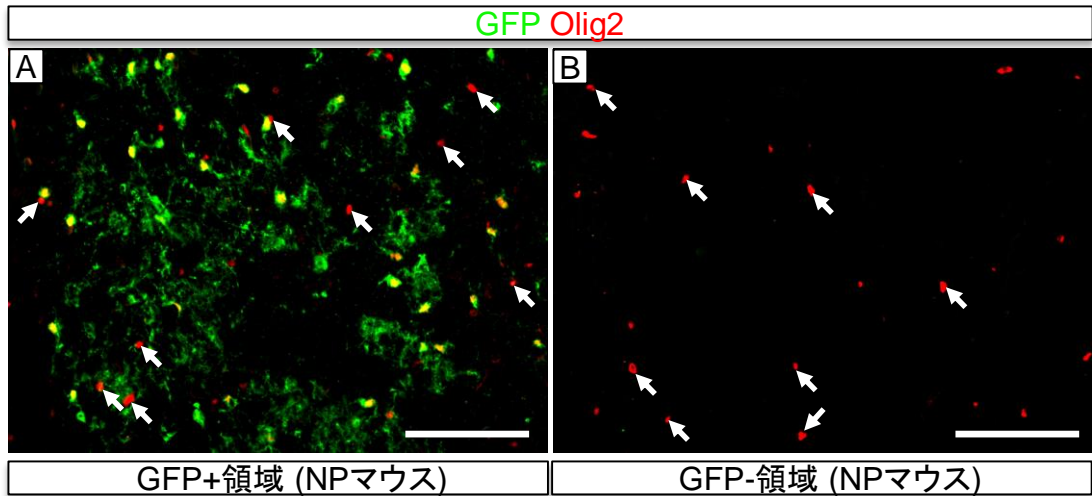


図23 6週齢NPマウスにおいて、GFP+細胞存在領域と非存在領域での
 Olig2+細胞分布の比較
 GFP+細胞が存在している領域と、存在していない領域において、正常
 OPC(GFP-Olig2+細胞)の分布を比較したところ、差は認められなかった。
 Bars = 100 μ m(A, B)

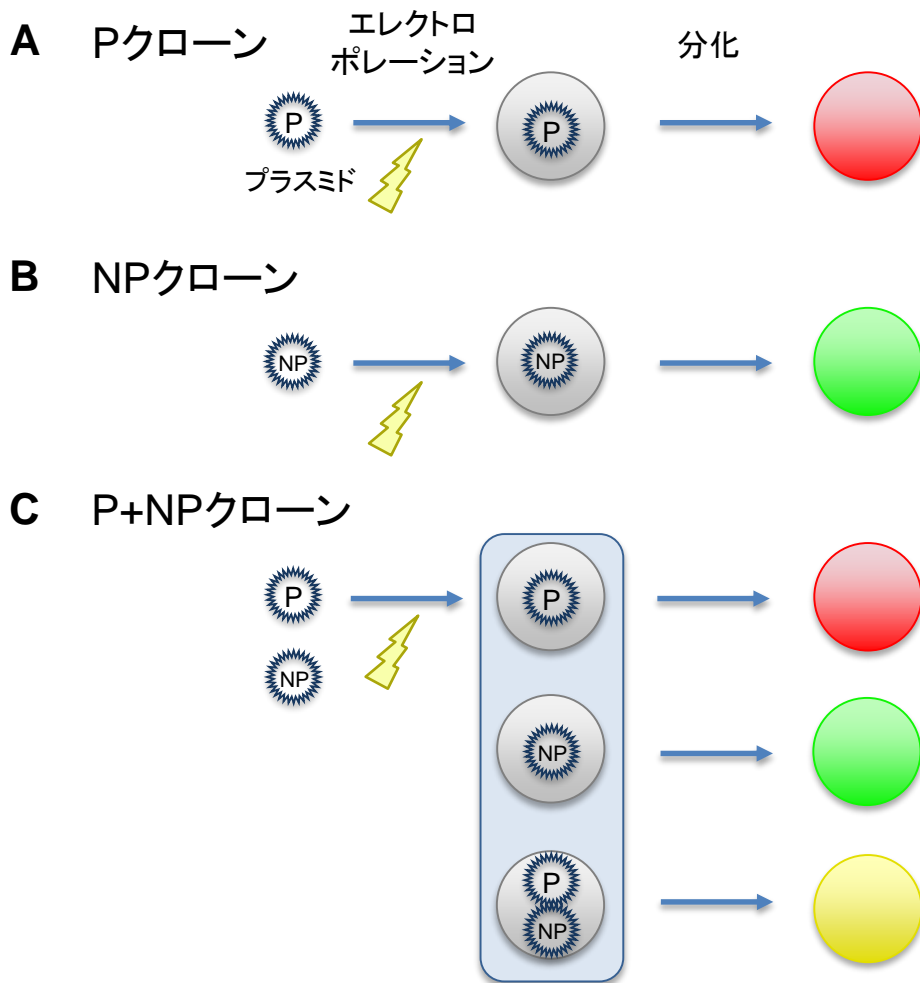


図24 エレクトロポレーションによる遺伝子導入細胞が、導入プラスミド依存的に発現する蛍光タンパクの発現パターン
Pベクター、NPベクターを導入すると、それぞれDsRed+のPクローン、GFP+のNPクローンへと誘導される(A, B)。一方で、PベクターとNPベクターを同時に導入すると、蛍光タンパクの発現レベルに応じて、DsRed+細胞、GFP+細胞、DsRed+GFP+細胞の混在したP+NPクローンが誘導されることが期待される(C)。

両方ともゲノムに組み込んだ場合は、DsRed と GFP を共発現するため、DsRed+GFP+細胞が出現することが期待される (図 24C)。DsRed と GFP の発現レベルは、トランスポゾンベクターが組み込まれたゲノム領域や、コピー数、ゲノムメチル化やヒストンの修飾状態などにより変化すると考えられる。そのため、DsRed+GFP+細胞を含むクラスターの中には、DsRed+細胞や GFP+細胞も同時に存在すると考えられる。

まず、増殖細胞において、ゲノムに組み込まれなかったプラスミドに由来する一過性の発現 (transient expression) は消失していると考えられる 2 週齢において、P+NP マウスの脳切片の解析を行った。P ベクターのみ取り込んだ DsRed+細胞の大部分は、単一細胞として存在していた (図 25B)。一方で、NP ベクターが組み込まれた GFP+細胞は、クラスター形成を認めた (図 25D)。EdU を取り込んだ GFP+細胞を散在性に認めることから (図 25K)、GFP+細胞は増殖性を示すと考えられた。以上の結果は、P マウス、NP マウスの脳の組織切片で認めた結果と矛盾しない。

一方、P+NP マウスの脳においては、DsRed+GFP+細胞を含むクラスターを認めて、P ベクター、NP ベクターが共にゲノムに組み込まれたことを示している (図 25G)。DsRed+GFP+細胞は、GFP+細胞と比較して、EdU 陽性細胞を多数含み (図 25M, N)、活発に増殖していると考えられた。P ベクターが導入された細胞 (以下

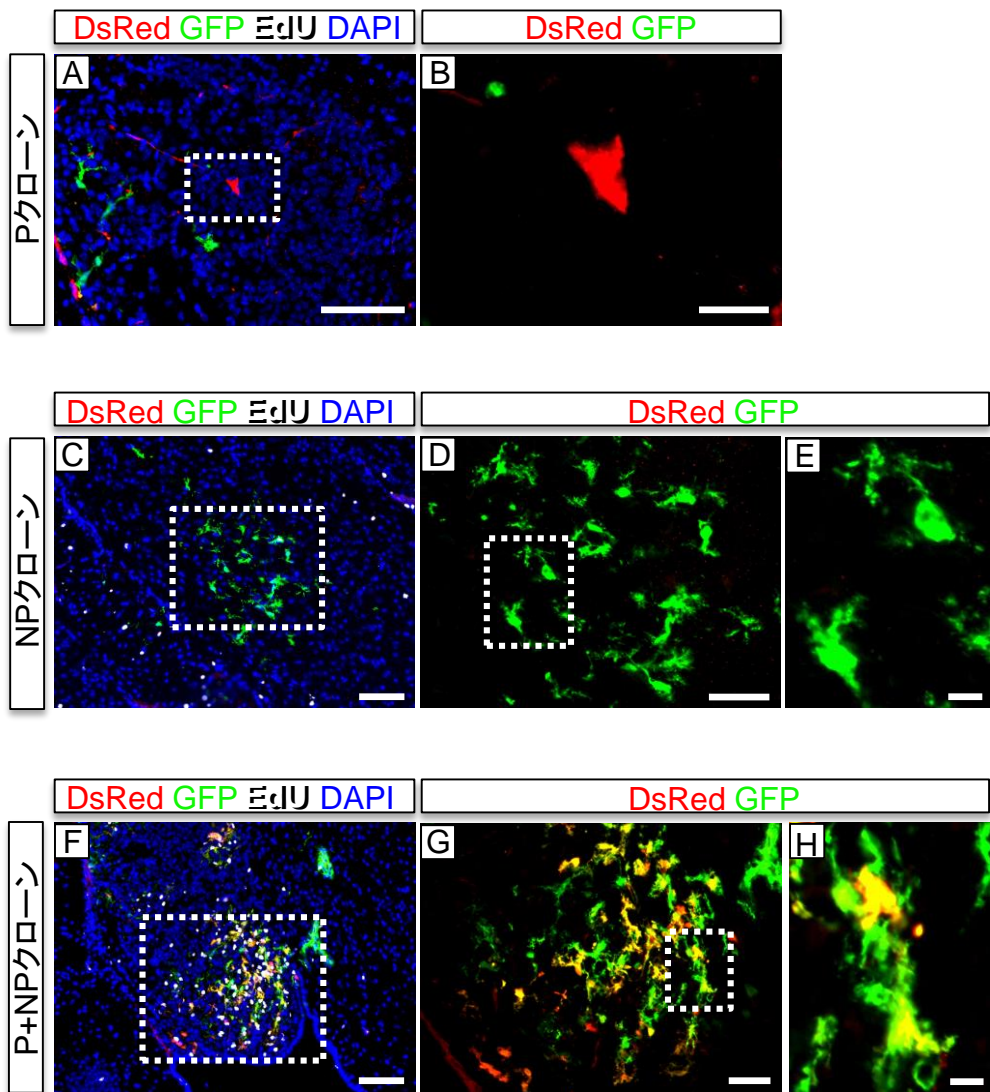


図25 2週齢P+NPマウスにおけるPクローン、NPクローン、P+NPクローンの分布と形態

PクローンはDsRedを発現して、単一の細胞として認められた(A, B)。NPクローンは、GFP+細胞から成るクラスターを形成した(C-E)。P+NPクローンは、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞、GFP+細胞の混在するクラスターを形成した(F-H)。

Bars = 100 μ m(A, C, F), 50 μ m(D, G), 20 μ m(B), 10 μ m(E, H)

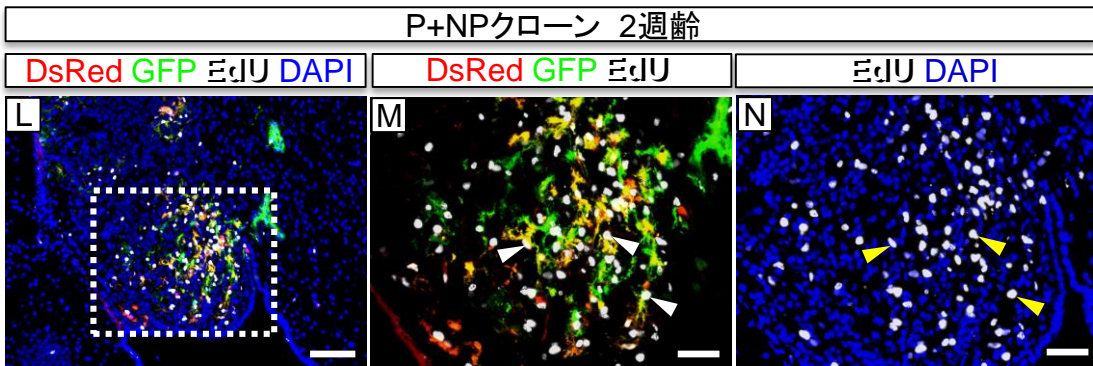
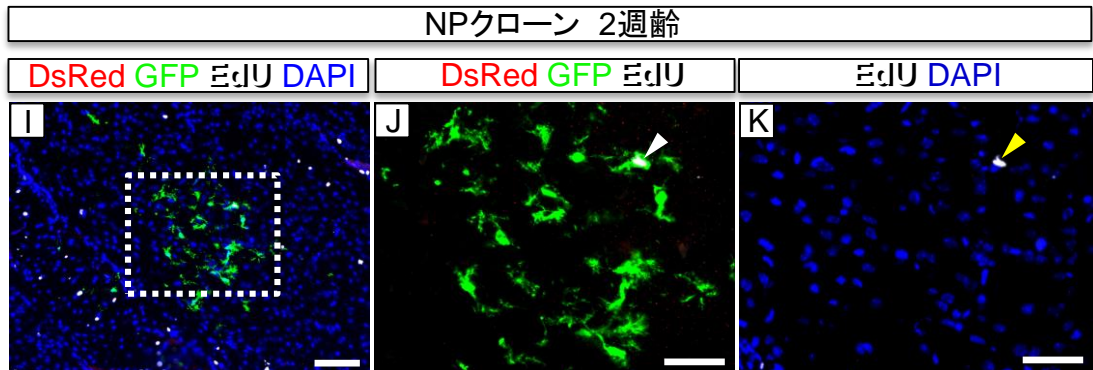


図25 P+NPベクターから導入された、NPクローン、P+NPクローンの増殖性
 NPクローンは、EdUの取り込みがわずかに認められた(K)。一方で、P+NPクローンは、EdUの取り込みを多数認めた(M, N)。Bars = 100 μ m(I, L), 50 μ m(J, K, M, N)

P クローン) は、マウス 3 個体中 2 個体で認められ、NP ベクターが導入された細胞 (以下 NP クローン) のクラスターは、マウス 3 個体中 2 個体で認められた。P+NP ベクターが導入された細胞 (P+NP クローン) のクラスターは、マウス 3 個体中 2 個体で認められた。6 週齢になると、低倍率の観察でも腫瘍の局在が明白となった (図 26A)。腫瘍のクラスターは、主に GFP+細胞で構成され、浸潤的に広がっていた (図 26B, C)。一方、DsRed+GFP+細胞は、腫瘍の中心部に密集してクラスターを構成していた (図 26C)。

6. P+NP マウスの腫瘍で、PDGFA 発現レベルの腫瘍内不均一性を認めた

P+NP マウスは、8 週齢以降、PNP マウス同様に神経症状を呈したため、安楽死を行った (図 27)。Kaplan-Meier 生存曲線により、P+NP マウスの生存は PNP マウスの生存に対して、有意な差は認められなかった。よって、P+NP ベクター誘導性の病変も致死性であることが明らかとなった。神経症状を呈した P+NP マウスの脳を病理組織学的に解析したところ、柵状構造を伴う壊死領域を認め (図 28A)、核が偏在して好酸性の細胞質を有するゲミストサイティックな構造を認めた (図 28B 矢頭)。よって、P+NP マウスの組織所見は、PNP マウスと同様の組織所見を示すことが明らかとなった。組織学的に解析をすると、大きな腫瘍 (図 29B-E) と小さな腫瘍 (図 29G) を認めた。大きな腫瘍の中心部は、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞

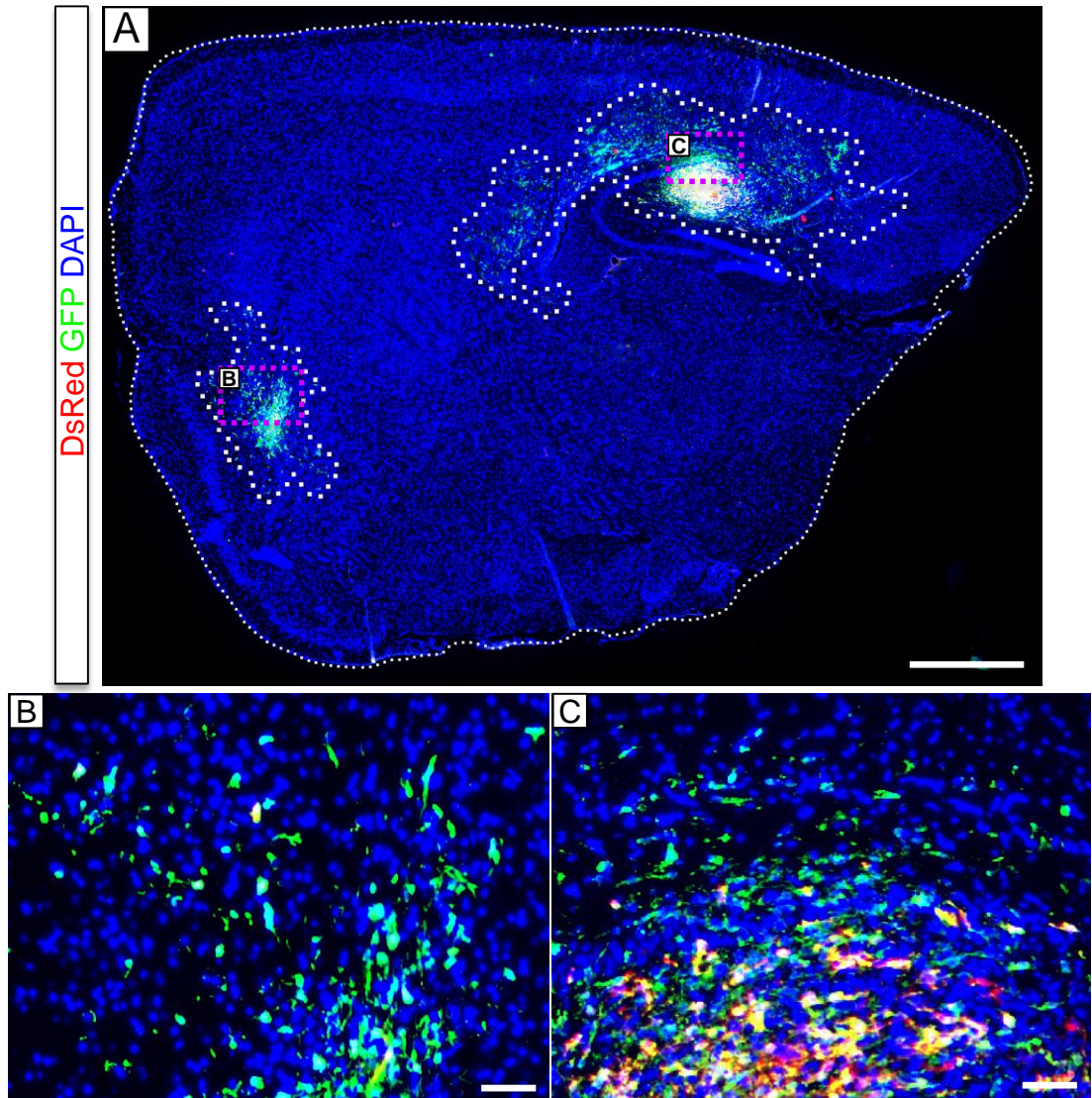
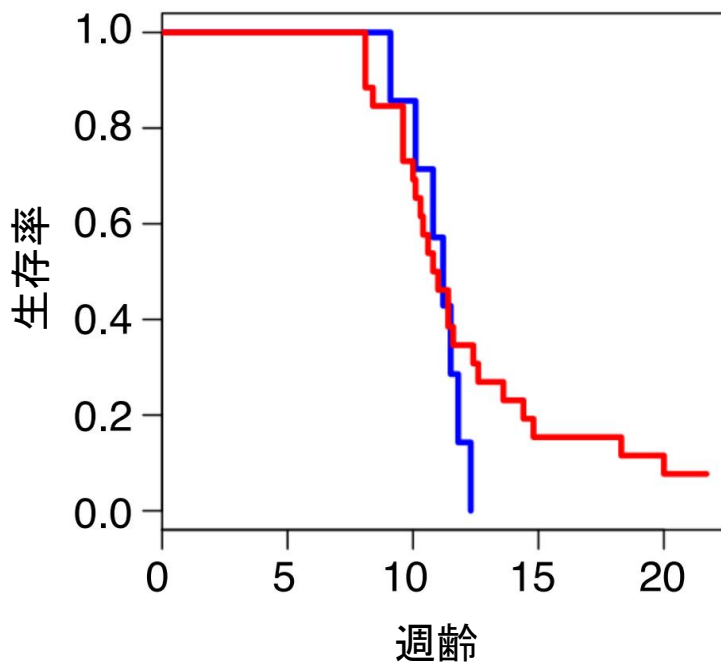


図26 6週齢P+NPマウスにおける同一個体で形成された不均一なグリ
オーマ

腫瘍が低倍率で認められた。腫瘍のクラスターは、主にGFP+細胞で構成されて、浸潤的に広がっていたが(B, C)、DsRed+GFP+細胞は、クラスターの中心部分に密集していた。Bars = 1 mm(A), 50 μ m(B, C)



■ P+NP (n=7)
 ■ PNP (n=26)
 } ns

図27 トランスポゾンベクターを導入したマウスの生存曲線
 Kaplan-Meier生存曲線により、P+NPマウスの生存をPNPマウスの生存と比較したところ、有意な差は認められなかった。Log-rank test (P+NP vs PNP) ns =not significant

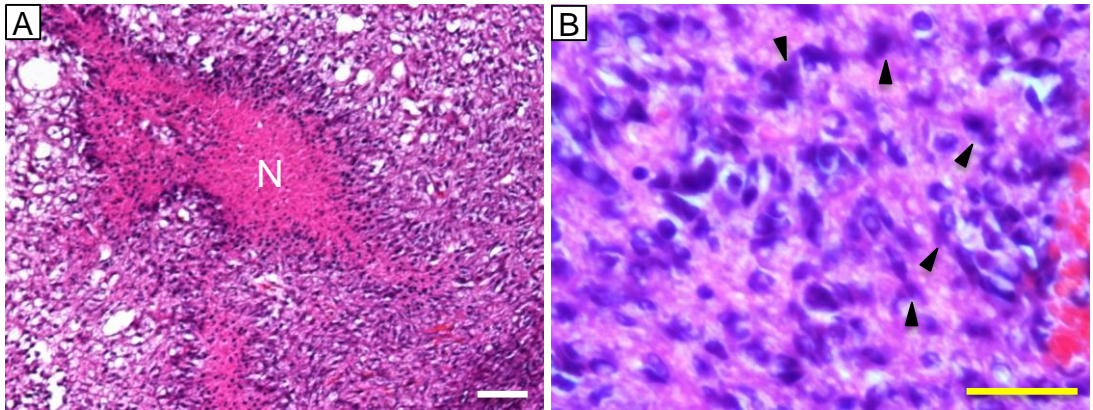


図28 神経症状を呈したP+NPマウスの脳の組織学的な評価
柵状構造を伴った壊死領域が認められ(A)、核が偏在した好酸性の細胞質を有するゲミストサイティックな細胞を認めた(B矢頭)。Bars = 100 μm (A), 50 μm (B)

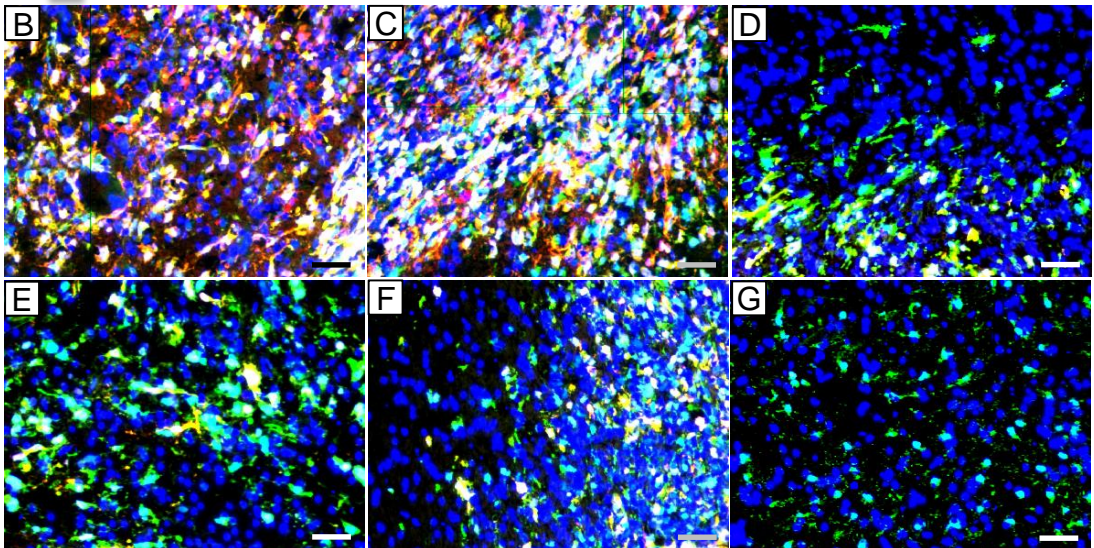
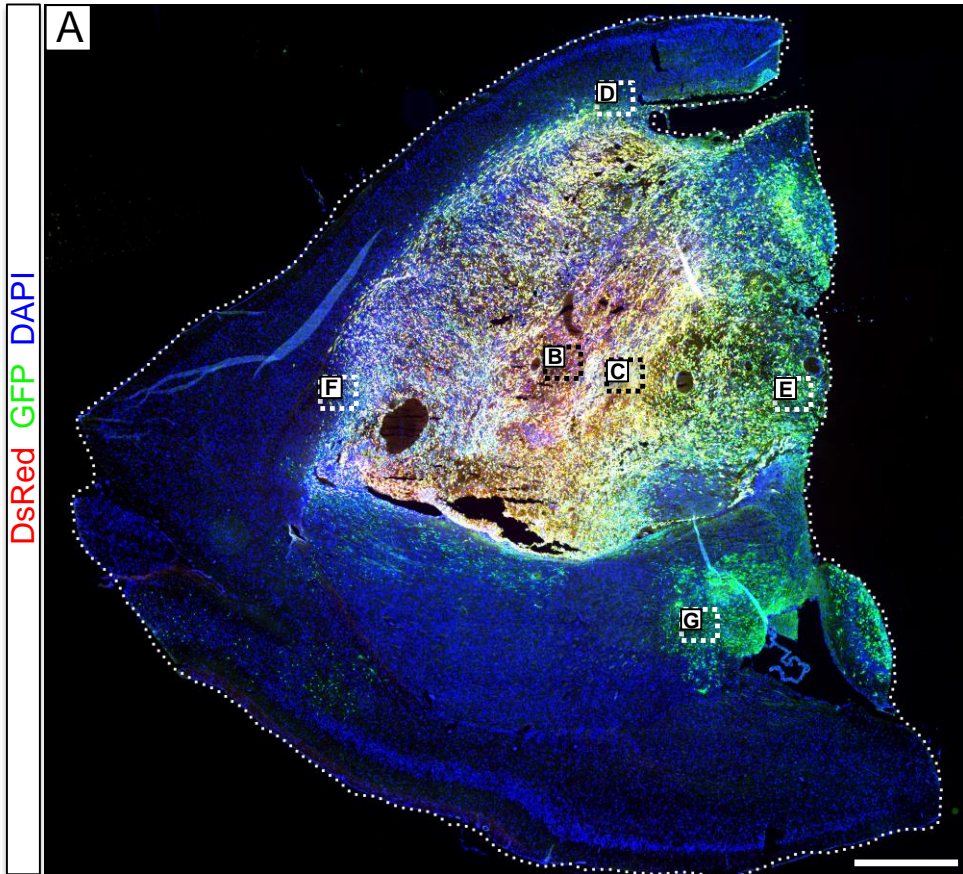


図29 神経症状を呈した10週齢P+NPマウスにおいて形成された腫瘍
 腫瘍の中心部は、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞で構成されていた(B,
 C)のに対し、周辺部はGFP+細胞で構成されていた(D-F)。GFP+細胞の
 みで構成されたクラスターは(G)、他のクラスターと比較して、小さい
 細胞体を有していた。

Bars = 1 mm(A), 50 μ m(B-G)

で構成されていたが (図 29B, C)、辺縁部は、主に GFP+細胞で構成されていた (図 29D-F)。DsRed+GFP+細胞や DsRed+細胞は密集して分布している一方で、GFP+細胞は、散在的に分布しており、脳実質へと浸潤的に分布する様子が観察された。

GFP+細胞のみで構成されている小さなクラスター (図 29G) には、DsRed+GFP+細胞や DsRed+細胞が存在しないため、NP クローンから成ると考えられた。NP クローンは周囲の組織に浸潤し、散在して分布しており、前述の P+NP クローン内に存在する GFP+細胞よりも小さい細胞体を有していた。これらの結果は、P+NP クローン中の GFP+細胞は、NP クローン内の GFP+細胞と性質が異なることを示唆する。

DsRed+GFP+細胞を有する P+NP クローンにおいて、中心部に DsRed+GFP+細胞や DsRed+細胞が局在し、周辺部に GFP+細胞が分布するという腫瘍内不均一性が、他の個体でも生じるかを検討した。神経症状を呈したマウスをさらに 3 個体解析した結果、DsRed+GFP+細胞を含む腫瘍において、やはり DsRed+GFP+細胞や DsRed+細胞が腫瘍の中心付近に局在した (図 30B, E, H)。一方で、腫瘍の辺縁部は、主に GFP+細胞で成り立っていた (図 30C, F, I)。これらの結果から、腫瘍中心部の細胞が、PDGFA を強く発現する傾向は、P+NP マウスで共通して認める表現型であると

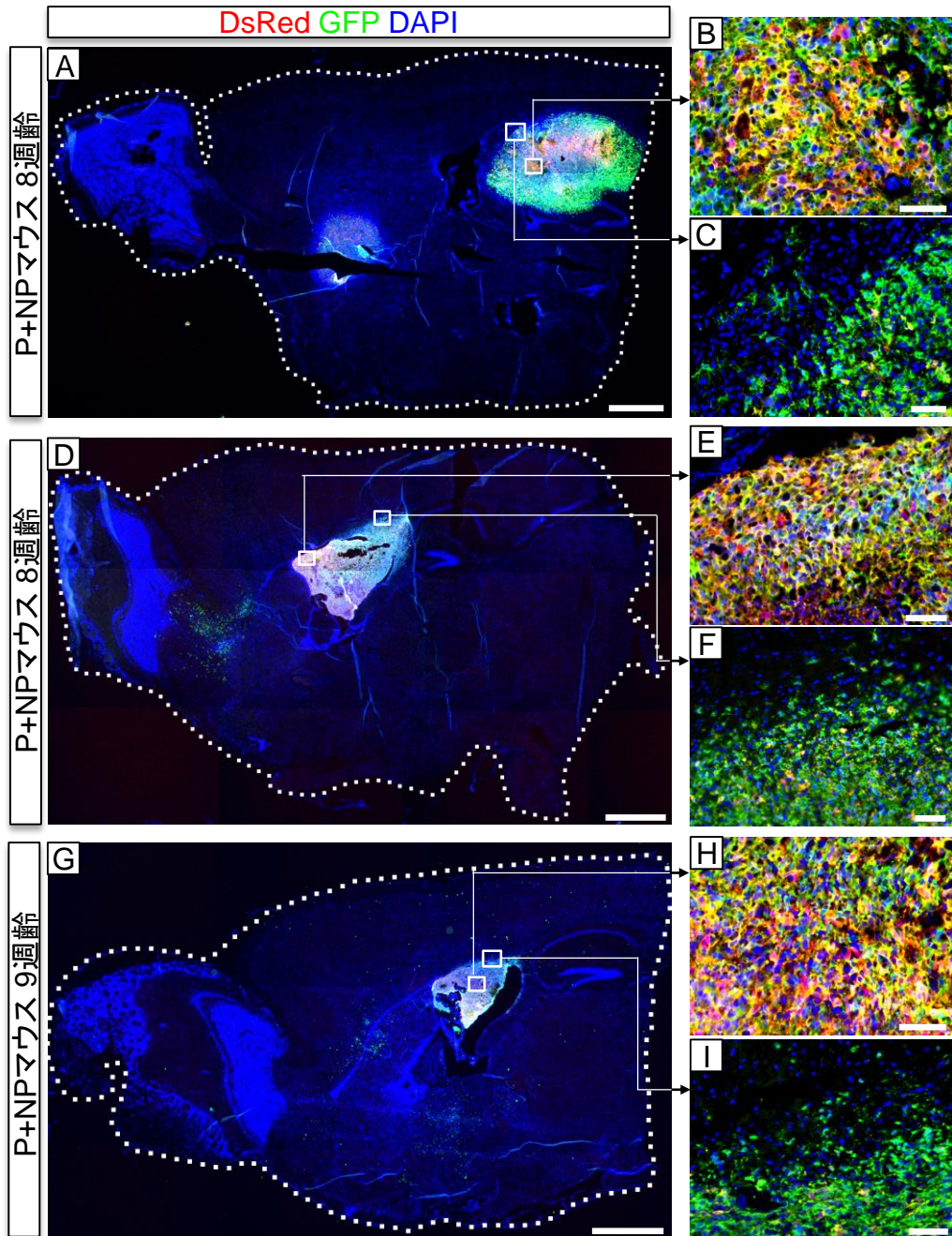


図30 神経症状を呈した3個体のP+NPマウスの剖検
腫瘍の中心部は、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞で構成されていた(B, E, H)。一方で、周辺部は、GFP+細胞で構成されていた(C, F, I)。
Bars = 1 mm(A, D, G), 50 μ m(B, C, E, F, H, I)

考えられた。

P+NP クローンの腫瘍内で分布する、黄色・赤色・緑色の細胞が、腫瘍内不均一性を反映しているかどうか、免疫組織化学染色により評価を行った。PDGFA の発現は、黄色や赤色のクラスターで強く発現が認められ (図 31A, C)、一方で、P+NP クローンの辺縁部の緑色のクラスターでは、発現が認められなかった (図 31B, D)。これは PDGFA が、黄色や赤色のクラスター付近で分泌されていると考えられる。また、間葉系のマーカーである MMP2、Vimentin で評価したところ、腫瘍の中心部の黄色や赤色のクラスターでは、MMP2 の発現は認められなかったのに対し (図 32C, F)、辺縁部の緑色のクラスターでは、MMP2 の発現が認められた (図 32B, E)。同様に、腫瘍の中心部の黄色や赤のクラスターでは、Vimentin の発現は認められなかったのに対し (図 33C, F)、辺縁部の緑色のクラスターでは、Vimentin の発現が強く認められた (図 33B, E)。以上から、P+NP クローンの腫瘍では、腫瘍内に不均一な発現が生じていることが明らかとなった。

P+NP マウスでは、PNP マウス同様に、柵状構造を伴った壊死領域の形成を認めた (図 34B)。興味深いことに、柵状構造を構成する腫瘍細胞が強く DsRed を発現していることが明らかになった (図 35A, C, G)。一方で、GFP のシグナルは腫瘍細

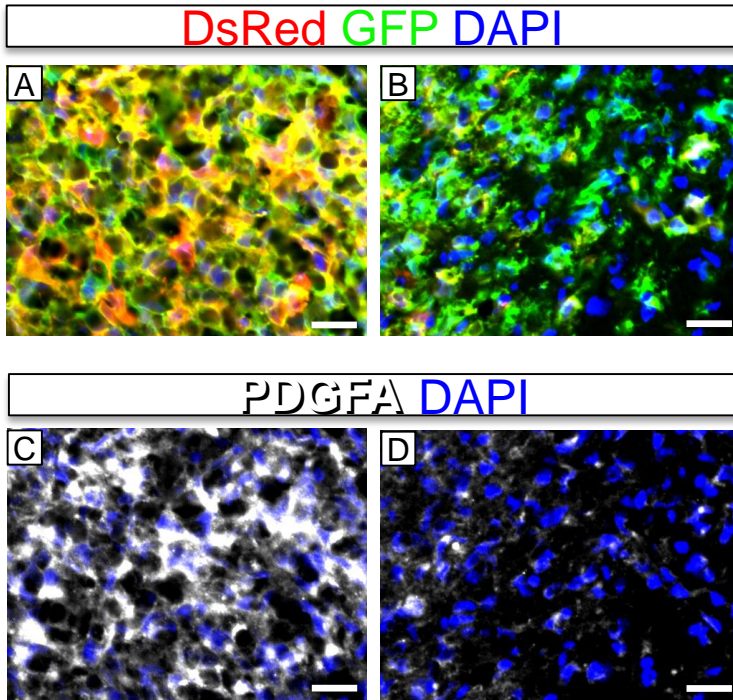


図31 P+NPマウスにおける組織評価

黄色や赤色の細胞で構成されている領域では、PDGFAの発現が認められた(A, C)。一方で、緑色の細胞で構成されている領域では、PSDGFAの発現が認められなかった(B, D)。

Bars = 20 μ m(A- D)

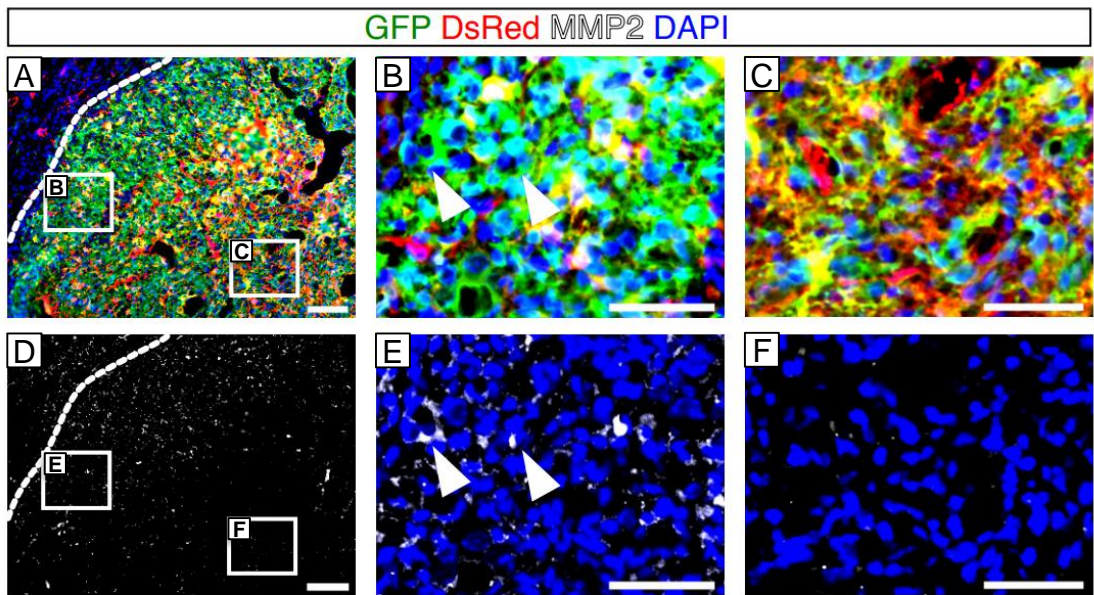


図32 P+NPマウスにおける組織評価

黄色や赤色の細胞で構成されている領域では、MMP2の発現は認められなかった。一方で、緑色の細胞で構成されている領域では、MMP2の発現が認められた。

Bars = 100 μ m(A, D), 50 μ m(B, C, E, F)

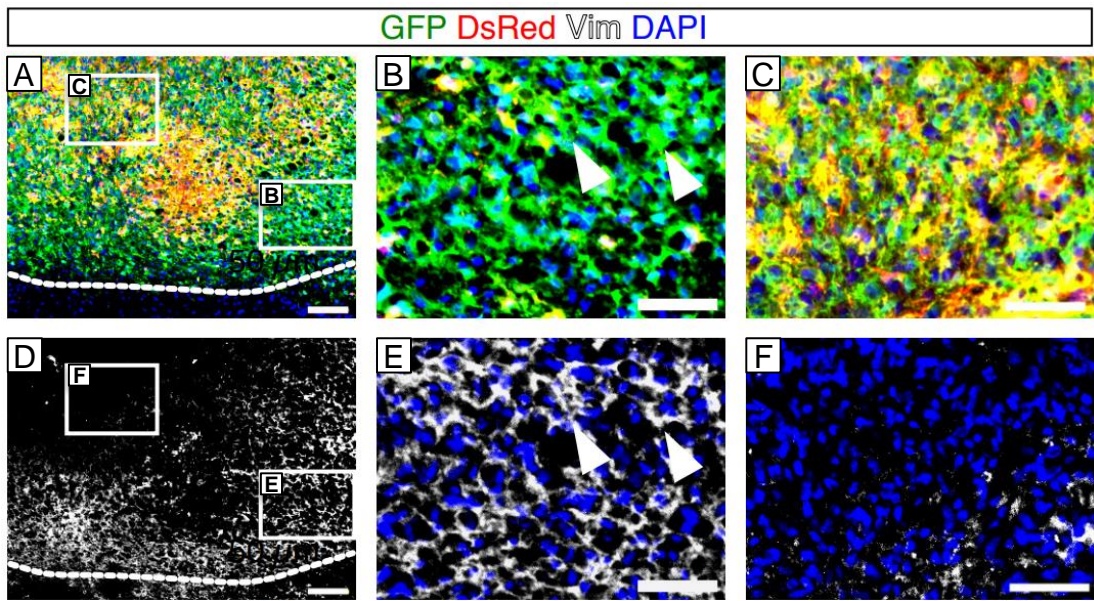


図33 P+NPマウスにおける組織評価

黄色や赤色の細胞で構成されている領域では、Vimentinの発現は認められなかった。一方で、緑色の細胞で構成されている領域では、Vimentinの発現が認められた。

Bars = 100 μ m(A, D), 50 μ m(B, C, E, F)

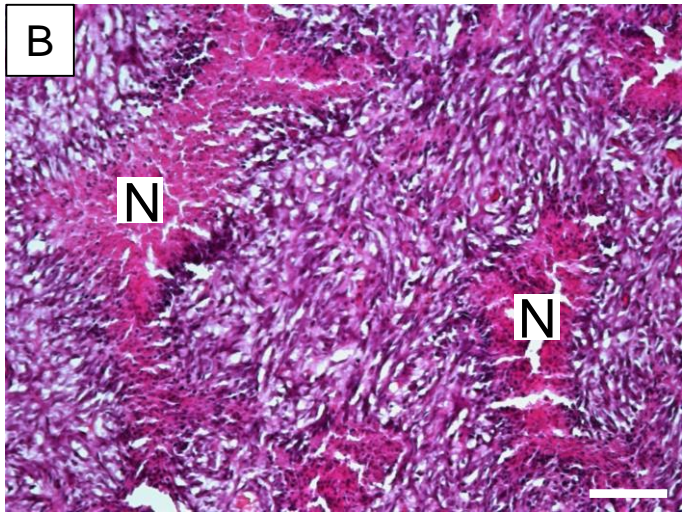
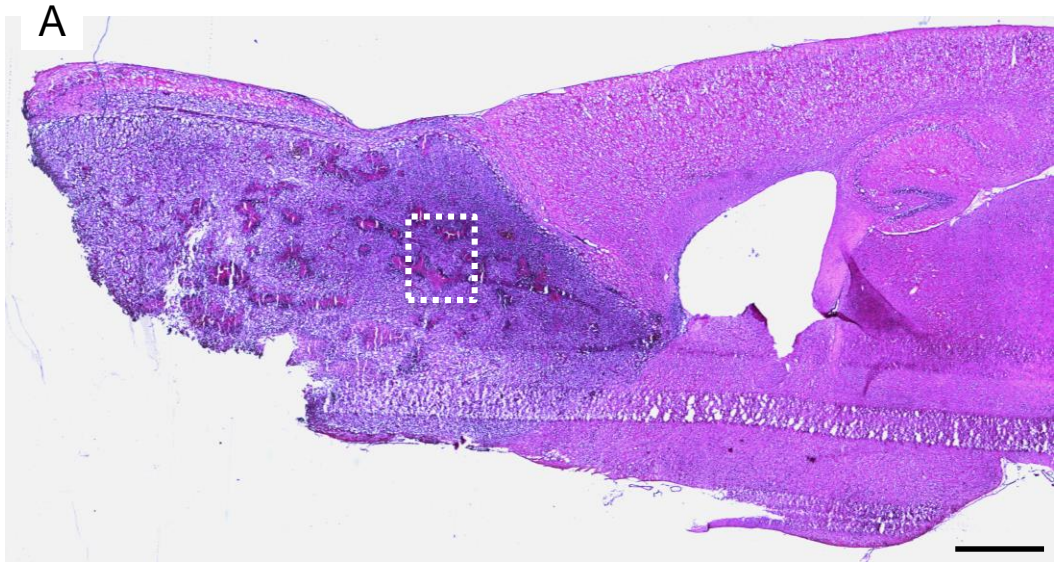


図34 神経症状を呈したP+NPマウスの組織解析
腫瘍の内部では、柵状構造を伴った壊死領域が認められた(B)。
N = Necrosis, Bars = 1 mm(A), 50 μ m(B)

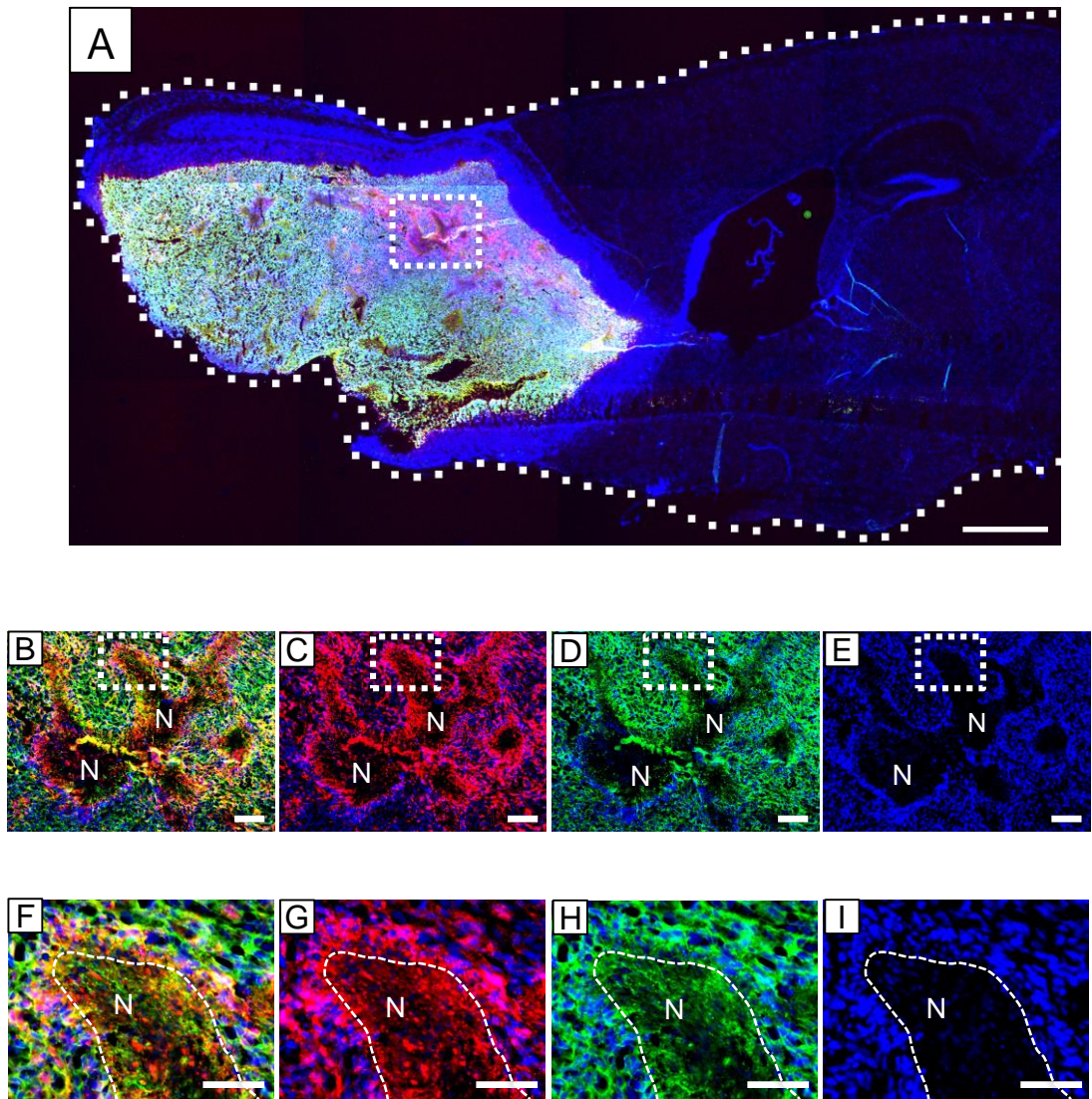


図35 神経症状を呈したP+NPマウスの組織解析
 柵状構造に沿ってDsRedのシグナルが強く検出された(A, C, G)。一方で、
 GFPのシグナルは組織全体に均一に発現していた(A, D)。
 Bars = 1 mm(A), 100 μ m(B-E), 50 μ m(F-I)

胞全体で均一に認めた (図 35A, D)。柵状構造は、腫瘍中心部の低酸素領域で生じる構造であり、*PDGFA* の発現は、腫瘍中心部の低酸素領域で、誘導される可能性が示唆された。

第5章

考察

本研究で作製したモデルの新規性について

本研究では、*Sleeping Beauty* トランスポゾンシステムを用いて、グリオーマの新規マウスモデルを開発した。まず、本論で作製したモデルの利点をまとめる。

- ① トランスポゾンベクターが蛍光タンパク発現カセットを含むため、ベクターを取り込んだ細胞を蛍光タンパクで検出することができる。
- ② PNP ベクターは、単一のトランスポゾンベクターで効率よくグリオーマを誘導することが出来るため、既存の遺伝子改変マウスと組み合わせたり、候補遺伝子を含む別のトランスポゾンベクターと組み合わせることが容易であり、遺伝子の機能解析実験に有用である。
- ③ 2種類のトランスポゾンベクター (P+NP) を同時に導入することで、異なる遺伝学的な変化を持つ細胞を、異なる蛍光タンパクの発現として可視化することができ、腫瘍内不均一性を作り出すことができた。

本論で用いた遺伝学的な変化として、ヒトで高頻度に変異を認める *PDGFA*、*NF1*、*TP53* に着目した。既存のトランスポゾンベクターシステムとして、Wiesner らによって開発された *NRAS/shp53* システムが存在し¹⁹、グリオーマ形成における候補遺

伝子の解析に活用されてきた^{42,43}。本論で作製したモデルは、ヒトのグリオーマで変異が稀である RAS を用いることなく²²、NRAS/shp53 システムと同レベルの高効率で腫瘍を誘導できた。また、マウスが発症するまでの期間も、NRAS/shp53 システムの約 3 ヶ月と遜色ない結果であった。NRAS/shp53 システムとの最大の違いは、PNP ベクターは、単一ベクター内に、腫瘍形成に必須な cDNA と shRNA を全て含んでいる。また、蛍光タンパク発現カセットを含むため、ベクター導入細胞の挙動を生体内で追跡することが可能である。NRAS/shp53 システム以外では、最近、トランスポゾンベクターを用いて、*H3.3*, *PDGFR*, *ATRX*, *Trp53* の 4 つの遺伝学的変化を誘導してグリオーマを誘導した例もある⁴⁴。しかし、これら 4 つの遺伝子の組み合わせでは、癌細胞が浸潤的に増えるものの、6 ヶ月経ってもマウスが神経症状を呈することはなかった。本研究で開発した PNP ベクターは、極めて効率よく脳腫瘍を誘導できるため、簡便な悪性グリオーマのマウスモデルとして、汎用性が高いことが期待される。

P ベクター、NP ベクター、PNP ベクター導入細胞の挙動について

本研究では、GFP、または DsRed の蛍光タンパクをモニターすることで、がんの起源細胞や、病態の進行を詳しく解析した。先行研究において、Ozawa らは、RCAS/t-va レトロウイルスを用いることで、*PDGFA* 単独でオリゴデンドログリオーマの発

症を誘引しうると報告した²⁹。しかし、本研究では、P ベクターを導入した場合、増殖細胞を認めなかった。この違いの原因として、遺伝子導入細胞が異なることが一因と考える。RCAS/t-va システムは、脳の広範囲の領域の前駆細胞に遺伝子導入することができるのに対して⁴⁵、エレクトロポレーション法では、側脳室の神経幹細胞・前駆細胞にのみ遺伝子導入が行われる。レトロウイルスを用いた導入法では、初期段階のがん細胞を可視化していないため、*PDGFA* で誘導されたオリゴデンドログリオーマの起源細胞は不明であるが、本研究で用いたエレクトロポレーション法では、先行研究で導入した Nestin+細胞や Gfap+細胞と同じ細胞に遺伝子導入することは難しいと考えられる。

P ベクターとは対照的に、NP ベクターは *Olig2* 陽性の OPC の増殖を促進した。この結果は、先行研究と矛盾しない⁴¹。NP マウスにおいて、がん細胞の成長は緩やかであり、少なくとも 20 週齢までマウスは症状を呈さなかった。先行研究においては、*Nf1* と *Trp53* を欠損した細胞は、2 次的な変異を蓄積し、数カ月後に悪性度の高いグリオーマに形質転換することが報告されている。しかし、本研究では、NP マウスにおいて、悪性度の高いグリオーマを形成する例は認めなかった。この違いの原因として、先行研究における *Trp53* の欠損 (null) は、ゲノム不安定性を引き起こし、2 次的な変異の蓄積を伴うが、本研究で用いたモデルでは、*Trp53* に

対する shRNA によるノックダウン効率は 100%ではないため、2 次的な変異の蓄積が少ないためと考えられた。

NP ベクターで形成した腫瘍病変は、悪性度が低いのに対して、PNP ベクターによって、悪性度の高い腫瘍が形成された。両者の違いがどのようにして生まれたのか、腫瘍形成のメカニズムを考える上で重要な点である。まず、PNP ベクターと NP ベクター、いずれも Olig2 陽性の OPC の増殖を誘導した。しかし、NP ベクターを導入した細胞 (NP 細胞) と PNP ベクターを導入した細胞 (PNP 細胞) の挙動には、いくつかの違いを認めた。まず、NP 細胞は散在して分布しており、細胞体が小さく、長いプロセスを持つ分化細胞の形態を示した。一方、PNP 細胞は密集して局在しており、アメーバ状の形態を示し、プロセスは太くて短く、未分化な状態であると考えられた。PNP 細胞で多数の増殖細胞を認めたが、NP 細胞では、増殖細胞はわずかであった。これらの結果は、PNP 細胞が NP 細胞よりも未分化な性質を有していることを示唆する。NP 細胞や、PNP 細胞そのものの違いに加えて、PNP 細胞の周辺には腫瘍随伴 OPC を認めた⁴⁰。しかし、NP 細胞の周辺には、腫瘍随伴 OPC を認めなかった。

このような表現系の違いが生じた原因として、以下のようなメカニズムが考えら

れる。PNP 細胞は、PDGFA を分泌し、細胞自律的、および非自律的、2 つのメカニズムを通して発癌を促進したと考えられる。まず、細胞自律的な作用として、PNP 細胞が分泌した PDGFA は、PNP 細胞そのものの PDGFR α を活性化すると考えられる。実際、OPC は、PDGFR α を発現することが知られている。この細胞自律的な効果により、高い増殖性と未分化な形態変化が誘導されたと考えられる。一方で、細胞非自律的な作用として、PNP 細胞が分泌した PDGFA が、脳実質に存在する正常の OPC を活性化し、腫瘍随伴 OPC を生み出したと考えられる³⁹。腫瘍随伴 OPC は血管上皮細胞の新生血管形成を促進して、グリオーマの成長を支持することが知られている³⁴。これら細胞自律的、非自律的の 2 つの作用により、PNP 細胞が悪性グリオーマを誘導したと考えられる。

P+NP マウスで認めた腫瘍内不均一性について

P ベクターと NP ベクターを同時に導入することで、両方のベクターがゲノムに組み込まれた細胞を作製した。その結果、腫瘍クラスターの中に、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞 GFP+細胞が混在していた。これらの細胞が、単一の起源細胞に由来するのか、あるいは複数の起源細胞に由来するのかについては、本研究では明らかではない。この点を明らかにするには、腫瘍クラスターの細胞を単離・培養して、サザンブロッティングによりゲノム中にトランスポゾンが挿入された位置を比較

することで、単一クローンに由来するのか、複数のクローンに由来するのかを区別することが必要である。

いずれの場合にしても、DsRed+GFP+細胞、DsRed+細胞、GFP+細胞の違いは、ベクターの蛍光タンパクの発現レベルの違いを反映する。DsRed+細胞のDsRedシグナルについては、DsRed-Expressタンパクの半減期が短いことを考慮すると、PDGFAのmRNA発現レベルを反映していると考えられる。一方、GFPの発現は、SV40プロモーターで誘導されており、必ずしもshRNAの発現量と相関するとは限らない。DsRedシグナルの強度が腫瘍内で不均一であるのに対して、GFPシグナルは、顕微鏡で観察する限り、腫瘍内のシグナル強度は均一であったことから、蛍光レベルにおける不均一性の原因は、PDGFAの発現レベルが異なることが最大の要因だと考えられる。

PDGFAを強く発現するDsRed+GFP+細胞やDsRed+細胞は、腫瘍の中心部に存在したのに対して、周辺組織へ浸潤する細胞は、GFP+細胞で構成されていた。悪性度が高いグリオーマにおいて、腫瘍の中心部は血管形成が不十分となり、低酸素領域となる⁴⁶。低酸素領域は、柵状構造の壊死領域（palisading necrosis）を伴うことが知られている。実際、柵状構造を構成するグリオーマ細胞で、強いDsRedシグナ

ルを認めた。これらの結果は、PDGFA がグリオーマ細胞に低酸素ストレスへの抵抗性を与えたと考えられる。PDGFR α 受容体を介したシグナルは、Akt および mTOR を活性化し、細胞の代謝変化を誘発する⁴⁷。Akt/mTOR 経路は、低酸素ストレスへの応答に重要な役割を果たす転写因子 HIF-1 α タンパクの合成に重要である⁴⁸。このようなシグナル経路が活性化しているかを検討するためには、DsRed+GFP+細胞や DsRed+細胞を単離して、遺伝子発現レベルで、HIF-1 α 下流の遺伝子発現レベルを検討することが必要である。

グリオーマ細胞が低酸素ストレスに対して取る他の選択肢として、低酸素環境から離脱する戦略が挙げられる。グリオーマ細胞の浸潤性には、間葉系細胞への形質転換が関与する⁴⁹。Nfi 遺伝子の欠損は、グリオーマ細胞を間葉系細胞へと転換させるため²⁹、腫瘍の周辺部分を占める GFP+の細胞は、PDGFA の発現を抑制し、Nfi のノックダウンの表現型を高めることで、浸潤能を高めた可能性が考えられる。グリオーマ細胞が間葉系細胞の性質を獲得するために重要な遺伝子として、転写因子 SLUG の発現や⁵⁰、MMP-2 の分泌が報告されている⁵¹。腫瘍周辺部の GFP+の細胞における SLUG や MMP-2 の発現レベルを検討することが今後の課題である。もし低酸素ストレスへの応答性や、間葉系細胞への形質転換の程度においても、腫瘍内不均一性を認めれば、P+NP マウスで認めた腫瘍内不均一性は、単に PDGFA の発

現レベルの違いだけではなく、腫瘍細胞の性質の違いとしても不均一性が存在することを示す結果となる。DsRed+細胞、DsRed+GFP+細胞、GFP+細胞を単離し、遺伝子発現レベルを詳細に解析し、移植実験で表現型を比較することが今後の課題である。

ヒトのグリオーマにおいて、PDGFA の発現レベルが腫瘍内で不均一性であることを報告した例はない。しかし、腫瘍検体は、通常、腫瘍の一部分を摘出して得られる。腫瘍組織全体における PDGFA の発現パターンを解析した例はなく、3次元空間における PDGFA の不均一性の有無を検討することが求められる。

以上をまとめると、PDGFA、shNf1、shp53 の遺伝子変異の組み合わせが、マウスグリオーマを効率的に誘導することが本研究により実証された。このモデルは、単一のトランスポゾンベクターのみを必要とすることから、グリオーマ形成への関与が疑われる候補遺伝子の機能解析を行う有用なツールになると言える。また、複数のトランスポゾンベクターを同時にエレクトロポレーションすることで、同一の腫瘍の中に、異なる遺伝学的変化を持つ細胞を混在させて、蛍光タンパクによって可視化することができた。このようなアプローチにより、三次元空間における腫瘍サブクローンの局在を明らかにすることができ、腫瘍内サブクローン間で生じる協調作

用や競合関係を解析する上で、有用な手法となることが期待される。

第6章

謝辞

実験を遂行するにあたり、渡邊すみ子特任教授には、研究に対する心構えや展望など、厳しくも優しい指導をいただき、心から感謝申し上げます。また、高祖秀登特任講師には、実験手技や論理の方向性など、いつも助言をいただきましたことを篤く御礼申し上げます。

作製したマウスモデルで誘導された腫瘍の病理診断に関して、附属病院病理診断科の大田泰徳特任准教授にご協力をいただきましたことを、改めて御礼申し上げます。

最後になりましたが、再生基礎医科学国際研究拠点の皆様には、平素から多大なご支援をいただきましたことを、この場を借りて御礼申し上げます。

第 7 章

引用文献

- [1] Roger Stupp, Warren P. Mason, Martin J. van den Bent, Michael Weller, Barbara Fisher, Martin j. B. Taphoorn, Karl Belanger, Alba A. Brandes, Christine Marosi, Ulrich Bogdahn, *et al.* Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N Engl J Med.* 352: 987-996. 2005

- [2] Blumenthal DT, Kanner AA, Aizenstein O, Cagnano E, Greenberg A, HersHKovitz D, Ram Z, Bokstein F. Surgery for Recurrent High-Grade Glioma After Treatment with Bevacizumab. *World Neurosurg.* S1878-8750(17): 32028-4. 2017

- [3] Jennifer L. Clarke, Michele M. Ennis, W. K. Alfred Yung, Susan M. Chang, Patrick Y. Wen, Timothy F. Cloughesy, Lisa M. DeAngelis, H. Ian Robins, Frank S. Lieberman, Howard A. Fine, Lauren Abrey, Mark R. Gilbert, Minesh Mehta, John G. Kuhn, Kenneth D. Aldape, Kathleen R. Lamborn, and Michael D. Prados. Is surgery at progression a prognostic marker for improved 6-month progression-free survival or overall survival for patients with recurrent glioblastoma? *Neuro Oncol.* 13(10): 1118-24. 2011

- [4] Tanaka S, Louis DN, Curry WT, Batchelor TT, Dietrich J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: no longer a dead end? *Nat Rev Clin Oncol.* 10(1): 14-26.

2013

- [5] Alcantara LIaguno SR, Parada LF. Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *British J Cancer*. 115(12): 1445-1450. 2016
- [6] Friedmann-Morvinski D, Bushong EA, Ke E, Soda Y, Marumoto T, Singer O, Ellisman MH, Verma IM. Dedifferentiation of neurons and astrocytes by oncogenes can induce gliomas in mice. *Science*. 338(6110): 1080-4. 2012
- [7] Ohgaki H, Kleihues P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res*. 19(4): 764-72. 2013
- [8] Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 444(7120): 756-60. 2006
- [9] Seymour T, Nowak A, Kakulas F. Targeting Aggressive Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Oncol*. 5: 159. 2015
- [10] Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S. Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(10): 4009-14. 2013
- [11] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Brenman SH, *et al*. The somatic genomic

- landscape of glioblastoma. *Cell*. 155(2): 462-77. 2013
- [12] Sarkar C, Jain A, Suri V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas. *Indian J Cancer*. 46(2): 108-19. 2009
- [13] Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, *et al*. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet*. 47(5): 458-68. 2015
- [14] Zhu Y, Guignard F, Zhao D, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma. *Cancer Cell*. 8(2): 119-30. 2005
- [15] Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA. p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation. *Nature*. 455(7216): 1129-33. 2008
- [16] Alcantara LIaguno SR, Wang Z, Sun D, Chen J, Xu J, Kim E, Hatanpaa KJ, Raisanen JM, Burns DK, Johnson JE, Parada LF. Adult Lineage Restricted CNS Progenitors Specify Distinct Glioblastoma Subtypes. *Cancer Cell*. 28(4): 429-40. 2015
- [17] Calinescu AA, Nunez FJ, Koschmann C, Kolb BL, Lowenstein PR, Castro MG.

- Transposon mediated integration of plasmid DNA into subventricular one of neonatal mice to generate novel models of glioblastoma. *J Vis Exp.* (96) 2015
- [18] Ivics Z, Hakett PB, Plasterk RH, Izsvak Z. Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell.* 91(4): 501-10. 1997
- [19] Wiesner SM, Decker SA, Larson JD, Ericson K, Forster C, Gallardo JL, Long C, Demorest ZL, Zamora EA, Low WC, SantaCruz K, Largaespada DA, Ohlfest JR. De novo induction of genetically engineered brain tumors in mice using plasmid DNA. *Cancer Res.* 69: 431-9. 2009
- [20] Breunig JJ, Levy R, Antonuk CD, Molina J, Dutra-Clarke M, Park H, Akhtar AA, Kim GB, Bannykh SI, Verhaak RG, Danielpour M. Ets Factors Regulate Neural Stem Cell Depletion and Gliogenesis in Ras Pathway Glioma. *Cell Rep.* 12: 258-71. 2015
- [21] Chen F, Becker AJ, LoTurco JJ. Contribution of tumor heterogeneity in a new animal model of CNS tumors. *Mol Cancer Res.* 12: 742-53. 2014
- [22] Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, *et al.* The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell.* 155: 462-77. 2013
- [23] Martinho O, Longatto-Filho A, Lambros MB, Martins A, Pinheiro C, Silva A, Pardal

- F, Amorim J, Mackay A, Milanezi F, Tamber N, Fenwich K, Ashworth A, Reis-Filho JS, Lopes JM, Reis RM. Expression, mutation and copy number analysis of platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and its ligand PDGFA in gliomas. *Br J Cancer*. 101: 973-82. 2009
- [24] Ozawa T, Brennan CW, Wang L, Squatrito M, Sasayama T, Nakada M, Huse JT, Pedraza A, Utsuki S, Yasui Y, Tandon A, Fomchenko EI, Oka H, Levine RL, Fujii K, Ladanyi M, Holland EC. PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas. *Genes Dev*. 24: 2205-18. 2010
- [25] Fleming TP, Saxena A, Clark WC, Robertson JT, Oldfield EH, Aaronson SA, Ali IU. Amplification and/or overexpression of platelet-derived growth factor receptors and epidermal growth factor receptor in human glial tumors. *Cancer Res*. 52: 4550-3. 1992
- [26] Kumabe T, Sohma Y, Kayama T, Yoshimoto T, Yamamoto T. Amplification of alpha-platelet-derived growth factor receptor gene lacking an exon coding for a portion of the extracellular region in a primary brain tumor of glial origin. *Oncogene*. 7: 627-33. 1992
- [27] Gutmann DH, Parada LF, Silva AJ, Ratner N. Neurofibromatosis type 1: modeling CNS dysfunction. *J Neurosci*. 32: 14087-93. 2012

- [28] Bieging KT, Mello SS, Attardi LD. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 14(5):359-70. 2014
- [29] Ozawa T, Riester M, Cheng YK, Huse JT, Squatrito M, Helmy K, Charles N, Michor F, Holland EC. Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma. *Cancer Cell*. 26: 288-300. 2014
- [30] Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, *et al*. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 17: 98-110. 2010
- [31] Patel AP, Tirosh I, Trombetta JJ, Shalek AK, Gillespie SM, Wakimoto H, Cahill DP, Nahed BV, Curry WT, Martuza RL, Louis DN, Rozenblatt-Rosen O, Suva ML, Regev A, Bernstein BE. Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science*. 344: 1396-401. 2014
- [32] Tirosh I, Venteicher AS, Hebert C, Escalante LE, Patel AP, Yizhak K, Fishier JM, Rodman C, Mount C, Filbin MG, *et al*. Single-cell RNA-seq supports a developmental hierarchy in human oligodendroglioma. *Nature*. 539: 309-13. 2016
- [33] Cleary AS, Leonard TL, Gestl SA, Gunther EJ. Tumour cell heterogeneity maintained by cooperating subclones in Wnt-driven mammary cancers. *Nature*. 508:

113-7. 2014

- [34] Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA. Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic Sleeping Beauty transposon system. *Nature*. 436: 221-6. 2005
- [35] Koso H, Takeda H, Yew CC, Ward JM, Nariai N, Ueno K, Nagasaki M, Watanabe S, Rust AG, Adams DJ, Copeland NG, Jenkins NA. Transposon mutagenesis identifies genes that transform neural stem cells into glioma-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109: E2998-3007. 2012
- [36] Feliciano DM, Lafourcade CA, Bordey A. Neonatal subventricular zone electroporation. *J Vis Exp*. 2013.
- [37] Yung CW, Barbari TA, Bentley WE. Integrated non-invasive system for quantifying secreted human therapeutic hIL2. *Biotechnol Bioeng*. 95: 938-45. 2006
- [38] Koso H, Yi H, Sheridan P, Miyano S, Ino Y, Todo T, Watanabe S. Identification of RNA-Binding Protein LARP4B as a Tumor Suppressor in Glioma. *Cancer Res*. 76: 2254-64. 2016
- [39] Fernandez ME, Croce S, Boutin C, Cremer H, Raineteau O. Targeted electroporation of defined lateral ventricular walls: a novel and rapid method to study fate specification during postnatal forebrain neurogenesis. *Neural Dev*. 6: 13. 2011

- [40] Huang Y, Hoffman C, Rajappa P, Kim JH, Hu W, Huse J, Tang Z, Li X, Weksler B, Bromberg J, Lyden DC, Greenfield JP. Oligodendrocyte progenitor cells promote neovascularization in glioma by disrupting the blood-brain barrier. *Cancer Res.* 74: 1011-21. 2014
- [41] Liu C, Sage JC, Miller MR, Verhaak RG, Hippenmeyer S, Vogel H, Foreman O, Bronson RT, Nishiyama A, Luo L, Zong H. Mosaic analysis with double markers reveals tumor cell of origin in glioma. *Cell.* 146: 209-21. 2011
- [42] Fujita M, Scheurer ME, Decker SA, McDonald HA, Kohanbash G, Kastenhuber ER, Kato H, Bondy ML, Ohlfest JR, Okada H. Role of type 1 IFNs in antiglioma immunosurveillance-using mouse studies to guide examination of novel prognostic markers in humans. *Clin Cancer Res.* 16: 3409-19. 2010
- [43] Koschmann C, Calinescu AA, Nunez FJ, Mackay A, Fazal-Salom J, Thomas D, Mendez F, Kamran N, Dzaman M, Mulpuri L, Krasinkiewicz J, Doherty R, Lemons R, Brosnan-Cashman JA, Li Y, Roh S, Zhao L, Appelman H, Ferguson D, Gorbunova V, Meeker A, Jones C, Lowenstein PR, Castro MG. ATRX loss promotes tumor growth and impairs nonhomologous end joining DNA repair in glioma. *Sci Transl Med.* 8: 328ra28. 2016
- [44] Pathania M, De Jay N, Maestro N, Harutyunyan AS, Nitarska J, Pahlavan P,

- Henderson S, Mikael LG, Richard-Londt A, Zhang Y, Costa JR, Hebert S, Khazaei S, Ibrahim NS, Herrero J, Riccio A, Albrecht S, Ketteler R, Brandner S, Kleinman CL, Jabado N, Salomoni P. H3.3K27M Cooperates with Trp53 Loss and PDGFRA Gain in Mouse Embryonic Neural Progenitor Cells to Induce Invasive High-Grade Gliomas. *Cancer Cell* 32:684-700. 2017
- [45] Hambardzumyan D, Amankulor NM, Helmy KY, Becher OJ, Holland EC. Modeling Adult Gliomas Using RCAS/t-va Technology. *Transl Oncol.* 2: 89-95. 2009
- [46] Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG. Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro Oncol.* 7: 134-53. 2005
- [47] Strickland M, Stoll EA. Metabolic Reprogramming in Glioma. *Front Cell Dev Biol.* 5: 43. 2017
- [48] Harada H, Itasaka S, Kizaka-Kondoh S, Shibuya K, Morinibu A, Shinomiya K, Hiraoka M. The Akt/mTOR pathway assures the synthesis of HIF-1 α protein in a glucose- and reoxygenation-dependent manner in irradiated tumors. *J. Biol Chem,* 284(8): 5332-42. 2009
- [49] Joseph JV, Conroy S, Pavlov K, Sontakke P, Tomar T, Eggens-Meijer E, Balasubramaniyan V, Wagemakers M, den Dunnen WF, Kruyt FA. Hypoxia enhances

migration and invasion in glioblastoma by promoting a mesenchymal shift mediated by the HIF1alpha-ZEB1 axis. *Cancer Lett.* 359: 107-16. 2015

[50] Yang HW, Menon LG, Black PM, Carroll RS, Johnson MD. SNAI2/Slug promotes growth and invasion in human gliomas. *BMC Cancer.* 10: 301. 2010

[51] Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades. *Brain Tumor Pathol.* 20(2): 65-72. 2003