

論文の内容の要旨

論文題目 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)

氏名 住吉 敬介

グリオーマは成人における最も頻度の高い脳腫瘍であり、中でもグリオブラストーマは、病態の進行の早さ、治療抵抗性、再発性などから悪性度が高いことが知られている。World Health Organization による分類では、グリオブラストーマはグレードIVであり、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誘引し、脳機能の著しい低下を引き起こす。診断から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は急務である。

近年、グリオーマが持つ遺伝子変異が網羅的に解析され、腫瘍化の原因となりうる遺伝子変異の理解が進んだ。しかしながら、特定の変異を持ったがん細胞が、生体内でどのように腫瘍を形成するのかというプロセスの分子基盤については更なる理解が必要である。

この問題を解決するために、ヒトグリオーマを遺伝学的に模倣して、腫瘍形成を時空間的に追跡することができる新たなモデルマウスを作製することを本研究の目的とした。Cre/LoxP システムは、特定の発生段階の特定の組織や細胞群で遺伝子の不活性や過剰発現を起こす手段として有効であるが、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。そこで、私は Sleeping Beauty (SB) トランスポゾンを用いて体細胞ゲノムに直接遺伝子配列を導入することで、複数の遺伝子を同時に発現させるシステムを利用した。SB 転移因子は、外来の DNA 配列を神経前駆細胞や神経幹細胞に導入する手段として報告されている。同様の試みとして、3種類の変異遺伝子、RAS-G12V、EGFRvIII、*Trp53* に対する shRNA を個別のプラスミドで新生児マウスの脳に導入した結果、致死性の高いグリオーマを100%の確率で誘導できることが報告されている。また、変異遺伝子の組み合わせを RAS と AKT に設定し、piggyBac トランスポゾンシステムを用いて成体の神経幹細胞に導入し、グリオーマ発生を誘導した報告もある。ところが、トランスポゾンシステムを用いた既存のグリオーマ・マウスモデルの問題は、ほとんどのモデルで RAS の変異を用いているが、RAS の変異はヒトグリオーマでは低頻度であることである。したがって、ヒトグリオーマの性質を遺伝学的に模倣した、浸潤性が高い腫瘍を形成するマウスモデルの開発が求められている。本研究ではヒトグリオーマで高頻度に変異を認める3つの遺伝子、Platelet Derived Growth Factor A (PDGFA)、Neurofibromin 1 (*Nf1*)、Tumor Protein 53 (TP53) に注目して、モデルを作成した。

今回の検討では、単一のプラスミドから誘導されたがん細胞が、どのように局在し、組織内でどのような腫瘍を形成するかを検討するために、以下の実験を行った。

1. *Nf1, Trp53* に対する shRNA と *PDGFA* を組み込んだ単一トランスポゾンベクターを作製した

トランスポゾンベクターを4種類作製した。GFPベクターは、Green Fluorescent Protein (GFP)の発現カセットを、Pベクターは*PDGFA*と Discosoma Red Fluorescent Protein (DsRed)の共発現カセットを、NPベクターはshNf1, shTrp53と、GFPの発現カセットを持つプラスミドである。PNPベクターは*PDGFA*、DsRed、shNf1、shTrp53の発現カセットを持つ。

SBトランスポゾンシステムは2つの要素から構成され、トランスポゾンDNA配列とSBトランスポゼースである。トランスポゼースは環状トランスポゾンDNAの認識配列にしたがって切除し、運搬された配列は染色体に組み込まれて長期間の発現が誘導される。SBトランスポゼースの発現により、作製したトランスポゾンベクターが実際にゲノムに組み込むかどうかを検討した。NIH3T3細胞にNPベクターとコントロールベクターを、またはNPベクターとSBトランスポゼースを導入して発現効率を比較した。SBトランスポゼースを導入した細胞はコントロールと比較して、導入18日後も安定してGFPを発現していた。

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

これらのベクターが*in vivo*でグリオーマを誘導するか検討した。新生児マウスの脳にエレクトロポレーションを行うと、側脳室の壁面に局在する神経幹細胞や前駆細胞に目的遺伝子を導入することができる。出生後0~1日齢の新生児マウスの左側脳室にトランスポゾンベクターとSB11発現ベクターを投与し、エレクトロポレーションによりベクターを細胞内に導入し、8週齢時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では、蛍光タンパクを発現した細胞が観察されたが、数は非常に少なく、増殖細胞を認めなかった。H&E染色においても、病変は認められなかった。一方、NPベクターの導入により、脳実質にGFP陽性細胞の集積を認め、細胞密度が高い領域を認めた。PNPベクターを導入すると、DsRed陽性細胞のクラスターが認められ、H&E染色によりグリオーマの組織所見を認めた。

GFPベクター、Pベクター、NPベクターを導入したマウスは、神経症状を呈することなく23週間生存したが、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週齢までに神経症状を呈した。

脳切片の組織解析により、DsRed陽性細胞の増殖を広範囲に認めた。腫瘍部分を組織学的に解析すると、柵状構造を伴う壊死領域と出血が見られ、悪性度の高いグリオーマの組織所見を認めた。DsRed陽性のがん細胞は、5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU)を取り込んで増殖性を示し、オリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte progenitor cell: OPC)マーカーであるOlig2が共染した。以上から、PNPベクターにより、効率よくグリオーマが誘導できることが示された。

3. P+NPマウスの腫瘍において*PDGFA*の発現に不均一性を認めた

腫瘍内不均一性をマウスでモデル化するためにPベクターとNPベクターを共に側脳室に投与してエレクトロポレーションを行った(P+NPマウス)。PベクターやNPベクターがゲノムに組

み込まれると、DsRed や GFP を発現し、蛍光シグナルによりそれぞれのベクターを発現する細胞を検出することができる。

ほとんどの P+NP マウスは、8 週齢以降、神経症状を呈した。神経症状を呈したマウスは、H&E 染色により腫瘍形成を認めた。腫瘍の中心部は DsRed+GFP+ と DsRed+細胞で構成されていたのに対し、辺縁部は GFP+細胞で構成されていた。DsRed+GFP+や DsRed+細胞は密集していた一方で、GFP+細胞は散在的に分布した。さらに、壊死領域では、柵状構造を形成するがん細胞で DsRed の強い発現を認めた。以上から、腫瘍の中心部に存在するがん細胞は、辺縁部のがん細胞に比べて PDGFA を高く発現しており、腫瘍内に不均一性が存在することが示された。

【考察】

本研究では、単一ベクターでグリオーマが形成できることを示した。先行研究で、PDGFA、shNf1、shTrp53 を含む 3 つのレトロウイルスを感染させて、末期腫瘍を解析した報告はあるが、ウイルス感染細胞の挙動が判別できないデメリットがあった。本研究では、複数の変異遺伝子を単一のトランスポゾンベクターに発現させることで、PDGFA、shNf1、shTrp53 が導入された細胞を可視化し、グリオーマの起源細胞が OPC であることを見出した。

PNP ベクターが悪性度の高いグリオーマを誘導したが、NP ベクターではそのような表現型を認めなかった。NP ベクター、PNP ベクターのいずれも Olig2 陽性の OPC の増殖を誘導したが、両者の間で、以下の違いを認めた。まず、NP 細胞は散在して分布し、細胞体が小さく、長いプロセスを持つ形態を示した。一方、PNP 細胞は密集し、アメーバ状の形態を示し、プロセスは太くて短く、未分化な状態と考えられた。さらに、PNP 細胞の周辺には腫瘍随伴 OPC を認めたが、NP 細胞の周辺には OPC の増殖は認めなかった。以上から、PNP 細胞は、PDGFA を分泌し、細胞自律的に増殖を促進した一方で、周囲の OPC を細胞非自律的に活性化したと考えられる。

NP ベクターと P ベクターを同時に導入することで、腫瘍内不均一性が生じることを見出した。Nf1、Trp53 を欠損した GFP+細胞は、腫瘍の周辺部に存在したのに対して、PDGFA を発現する DsRed+GFP+細胞は、腫瘍の中心部に局在した。間葉系のマーカーである Matrix Metalloproteinase 2(MMP2)、Vimentin の発現解析により、腫瘍の中心部では MMP2、Vimentin の発現が低く、辺縁部では発現が高いことが示された。

以上の結果をまとめると、PDGFA、shNf1、shTrp53 の遺伝子変異の組み合わせにより、OPC の増殖を誘導し、マウスグリオーマを効率的に誘導できることが実証された。このモデルは、単一のトランスポゾンベクターでグリオーマを誘導できることから、グリオーマの候補遺伝子の機能解析を行う有用なツールになると考えられる。また、2 種類のトランスポゾンベクターを同時に導入することで、遺伝学的に異なる細胞の局在を蛍光タンパクにより可視化できることを実証した。本研究で用いた戦略は、腫瘍の発生過程を理解し、腫瘍内不均一性が持つ意義を解析する上で、有用なアプローチと考えられる。