

チンパンジーの腫瘍耐性機構から探るヒトグリオーマの発生メカニズムと制御

京都大学霊長類研究所

ゲノム細胞研究部門ゲノム進化分野 助教 今村公紀

大学院生 伊藤達也

大学院生 黒木康太

1. 研究の背景・目的

ヒトの脳では神経幹細胞（NSC）によって生涯にわたり新しい神経細胞が産生されている。しかし、NSC による神経新生は加齢とともに減少する一方、脳腫瘍であるグリオーマの発生率は増加していく。グリオーマはグリオーマ幹細胞（GSC）によって形成され、発ガン機構の解明や創薬の標的として注目されている。現在、GSC の起源は NSC にあるというセオリーが有力であり、GSC は胎児性の NSC と類似の特性を示す。胎児性の NSC は活発に増殖するのに対し、発生・発育に伴って細胞周期は延長し、成体では非常にゆっくりとしか分裂しない。従って、加齢に伴う NSC の質的な変化、とりわけ増殖制御機構（シグナル伝達・代謝・エピゲノム）の破綻が、GSC の発生を引き起こすと考えられる。グリオーマの分子基盤の研究には、グリオーマ組織由来の細胞株を用いた研究が進められてきた。近年では NSC の遺伝子操作によって「人工グリオーマ幹細胞」を誘導する研究が精力的に行われ、腫瘍化を引き起こす原因遺伝子や分子基盤の解明に貢献している。

一方、ヒトと最も近縁な現生動物であるチンパンジーでは、加齢に伴う様々な疾患の罹患率・病態がヒトとは異なる。これは我が国の死因第一位を占めるガンにおいても例外ではなく、チンパンジーがガンに罹患することは極めて稀である。従って、チンパンジーは腫瘍化に抵抗する何らかの素因を有することが推測され、チンパンジー/ヒトの比較解析は、ガンの理解や予防・治療戦略を考える上で有用な知見をもたらさう。しかし、これまでに「進化医学」的アプローチによる研究は全く展開されていない。進化生物学的視点からチンパンジー/ヒト神経細胞のエピゲノムを比較した報告によると、特定の神経疾患に加えてガン関連の遺伝子領域がヒト特異的に脱メチル化状態にあり、ヒトが罹り易い疾患とは

進化系統学的には「ヒト固有のエピゲノム疾患」である可能性も考えられる。「疾患の進化」の視点からグリオーマをとらえ直すことにより、ヒトのみを対象とした研究では見落としになってしまうような知見や戦略を提供できるのではないかと期待している。

2. 研究の対象ならびに方法

【1. チンパンジー/ヒト間における神経発生動態の時空間的・質的相違の特定】

チンパンジー/ヒト iPS 細胞のニューロスフェアや脳オルガノイド誘導系を利用し、両者の神経発生動態や細胞特性、分子基盤について種間比較を行う。また、腫瘍原性に注目した解析も行う。

【2. チンパンジーNSC へのヒト特異的遺伝子の導入と表現型解析】

種特異的に認められる NSC の細胞特性の「チンパンジー細胞のヒト化」「ヒト細胞のチンパンジー化」をもたらす遺伝子を同定する。ヒト特異的遺伝子については、比較ゲノミクスによる既知遺伝子や上述 1 で新規同定した遺伝子の導入と表現型解析を行う。また、トランスクリプトーム解析などによって導入遺伝子の分子作用機序の解明を試みる。

【3. グリオーマ発生の分子機構の解明：腫瘍化応答と制御】

両種の NSC に対してグリオーマ発生の個別要因の導入や人工グリオーマ幹細胞 (GSC) 化を行い、表現型や分子基盤を解析する。チンパンジーNSC の「腫瘍耐性因子/分子機構」候補をヒト NSC/GSC に導入し、腫瘍抑制機能を検証する。

3. 研究結果

作製したチンパンジー3 個体由来の iPS 細胞に対して各種性状解析を行い、核型や多能性遺伝子の発現、三胚葉分化能などを確認した。NSC 特異的な分化誘導としては「ニューロスフェア形成法」を応用し、チンパンジーiPS 細胞から NSC を誘導し、かつ持続的に継代培養する系も確立した。この NSC は、成熟培養条件で効率良くニューロンを産生することが可能である。さらに、NSC の分化ポテンシャルは、培養日数・継代数に伴い継時的に変化することを観察した。まず、ニューロスフェアにおける NSC 関連遺伝子の発現について、NESTIN などのマーカー遺伝子は培養過程で顕著な変動が認められないのに対し、PAX6 などのマスター転写因子は 1 次ニューロスフェアにおいて最も高く、2 次ニューロスフェア以降では 1 次 NSC よりも低い発現量で維持されていた。また、NSC の分化ポテンシャルについても、NSC から産生されるニューロンのサブタイプが、ニューロスフェアの培養期間・継代数に伴って大脳皮質深層型から上層型へと継時的に推移することが観察された。

現在、本培養系を用いてトランスクリプトームの解析を進めている。一方、遺伝子機能解析の試みとして、細胞周期抑制因子である p57Kip2 の機能抑制実験を行った。shRNA によって p57 をロックダウンしたチンパンジー iPS 細胞からニューロスフェアを形成させたところ、コントロールのニューロスフェアの成長速度が早くサイズも大きくなること、そして 1 次 NSC からの成熟分化誘導時にニューロンマーカー遺伝子の発現量が高くなることが観察された。このことから、p57Kip2 はチンパンジー NSC の自己複製を制御し、1 次 NSC においては神経分化と神経前駆細胞の増殖を抑制していることが示唆された。

4. 考察

これまでの研究結果により、ニューロスフェア形成法によって誘導したチンパンジー NSC の特性と動態変化が明らかとなってきた。こうした NSC の挙動は、正常な発生様式である大脳形成と、その破綻した様式としての腫瘍形成 (GSC 化) の両経路における根源的な素因となりうる。現在までに明らかにしてきた NSC の挙動を司る分子基盤について、その詳細を解明するために、現在進行中のトランスクリプトーム解析を今後も推進していく。また、本研究の主題であるヒト/チンパンジー間の比較解析に向けて、チンパンジー iPS 細胞と同じプロトコルを用いたヒト iPS 細胞のニューロスフェア形成も既に実施しており、上述の表現型・分子基盤の比較解析によってヒトとチンパンジーの NSC の特異性を特定していく。

一方、具体的な遺伝子機能解析として、引き続き p57Kip2 の解析に取り組むことに加え、上述のトランスクリプトーム解析の精査によって新規候補遺伝子群を絞り込んでいく、これらの候補遺伝子について、p57Kip2 の場合と同様に、チンパンジー/ヒト iPS 細胞の神経発生モデリングにおける強制発現や抑制による機能解析を行い、種特異的な表現型の再現と作動機序の解明を試みる。

5. 文献

Kitajima et al., in preparation