

平成 29 年 4 月 28 日

再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点  
平成 28 年度共同研究報告書

京都大学ウイルス・再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：国立がん研究センター中央病院  
病理科・臨床検査科

職名：医員

氏名：森 泰昌

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：遺伝子改変多能性幹細胞を用いた網膜芽細胞腫及び二次がん発生機構の解明
2. ウイルス・再生医科学研究所共同研究者： 戸口田 淳也
3. 研究期間：平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

4. 研究経過及び研究成果：

RB1 遺伝子の経配偶子性変異 (RB1<sup>+/−</sup>) を原因とする遺伝性両眼性網膜芽細胞腫患者由来 iPS 細胞の作製と解析を目的として、患者由来 iPS 細胞作製とゲノム解析ならびに iPS 細胞バンクへの寄託のための倫理申請を完了した。本研究期間内において 2 例の両眼性網膜芽細胞腫の患者血液ならびに組織から体細胞における RB1 遺伝子のゲノム変異、ならびに腫瘍細胞のゲノムにおける対側アレルの二次性変異領域を特定した。その結果、これら 2 例の RB1 遺伝子変異は、いずれも経配偶子性変異及び体細胞性変異が異なるフレームシフト変異であることが判明した。現在 iPS 細胞作製を京都大学にて進めている。

本研究の目的である網膜芽細胞腫及び二次がん発生機構の解明の為、まず網膜芽細胞腫の患者について発症までの期間、再発、転移、治療法と二次がんの部位、腫瘍の分化度等病理学的分類、瘍形成性、二次がん発症の有無、と RB1 遺伝子変異パターンの解析を

106例の網膜芽細胞腫を対象として行った。その結果、ゲノム変異はRB1エクソン上のほぼ全領域で認められた。また蛋白構造やドメインに関連した特異的な集積は見られなかった。遺伝性、非遺伝性あるいは両眼性・片眼性の比較においては、遺伝性にフレームシフトやスプライシング変異が多く、非遺伝性ではミスセンス/インフレーム変異がやや多い傾向が示された。また片眼性・非遺伝性では変異の指摘できない症例もわずかに含まれた。

次に網膜芽細胞腫で発現する分子について病理組織検体を用いた免疫組織化学染色ならびにRNA in situ hybridizationを用いて解析を行った。蛋白発現として哺乳類における眼発生に関連する分子SOX2, Bmi1, CRX, OTX1/2, Rhodopsin等について検索を行った。その結果、Bmi1, CRX, OTX1/2は、ほぼ全ての症例に強い陽性像を示した。一方、SOX2はほぼ全ての症例ではあるものの、陽性細胞はごく少数に留まった。これらは形態学的に比較的均一に見られる腫瘍内の分化勾配が示された。またRhodopsinは非常に分化度の高い(正常網膜に類似した)腫瘍の一部にのみ発現が見られた。さらに本解析からこれまで報告のない2種の新規蛋白(分子X, Y)の発現があることを発見した。特に網膜芽細胞腫瘍特異的で背景の正常網膜には発現が見られない分子Xについて、RNA発現も含め多数症例で詳細に解析し、確認を行い再現性が見られた。この結果治療ターゲット候補分子Xを得た。さらに分子Xの直接的なターゲット探索のため、クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーによる解析により、分子Zを発見した。Zはメチルトランスフェラーゼであり、プロモーター領域に分子Xのモチーフを有することを明らかとした。

今後、前述した現在作製中の患者由来iPSを対象に、残った正常アレルをゲノム編集にて壊しRB1遺伝子null<sup>-/-</sup>細胞を作製する。これらの細胞を既知の方法により神経あるいは骨へ分化した際の同定したターゲット候補分子Xの発現の有無を解析する。さらに網膜ならびに間葉系細胞への分化誘導とin vitro, in vivo双方で腫瘍化能の有無を解析する。腫瘍化が見られた場合、候補分子Xのカスケードの阻害から腫瘍化抑制の可否について検討を行う。

## 5. 研究成果の公表

- ※発表論文リスト(掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可)、学会発表、特許取得等
- 現在論文投稿準備中である。