

【目的】 脳細胞の増殖と分化は遺伝子プログラムにより厳密に制御されており、遺伝子の突然変異などによるプログラムの破綻は時に脳腫瘍という難治がんを引き起こす。特に小児脳腫瘍は小児がんの中で最も致死率が高く、その効果的な治療法の確立が急務である。本研究で扱うソニックヘッジホッグ (SHH) 型髄芽腫は、髄芽腫全体の約 30% を占め、細胞増殖シグナルとして知られる SHH シグナルが小脳顆粒細胞で異常活性化することが原因で生じるとされる。個別化医療の戦略として SHH 阻害剤は化学療法の第一選択であるが、抵抗性や副作用の問題が無視できず、更なる治療標的の同定による薬剤の併用療法が期待されている。新しい治療標的の探索には SHH 型髄芽腫において高頻度で観察される遺伝子変異の機能解析が手がかりを与える。クロマチン制御因子の機能欠損変異はその代表的なものであり、髄芽腫においてエピジェネティックに制御される分子が発癌に寄与していることが示されつつあるが、生物学的研究から導かれる分子標的薬は未だ存在しない。本研究では、SHH 型髄芽腫の発がんに関わるクロマチン制御因子の機能欠損変異を生体内で評価するスクリーニング系を確立し、新しい発がん機構を見出すとともに、その下流で機能しうる分子を治療標的候補として提案することを目指す (図)。

【方法】 脳腫瘍は周囲の脳細胞と相互作用して増殖・進展するため、個々の遺伝子変異の発がん能を評価するためには腫瘍ができる環境下で遺伝子変異を誘導し、個体レベルで解析することが望ましい。そこで我々は生体内電気穿孔法による遺伝子導入と CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を組み合わせ、腫瘍の起源細胞である小脳顆粒細胞を EGFP で遺伝学的に標識した生後 5 日目の *Atoh1*^{EGFP} マウスの小脳に直接 *Ptch1* sgRNA (sg*Ptch1*) と候補遺伝子の sgRNA、*Cas9* 遺伝子を導入して SHH 髄芽腫の腫瘍形成が加速するかどうかを検証した。

【結果】 まず、我々が今回開発した、生後 5 日目の *Atoh1*^{EGFP} マウスの小脳への生体内電気穿孔法により小脳顆粒細胞において *Ptch1* 遺伝子をノックアウトした場合に SHH 型髄芽腫が誘導されるかどうかを検証した。その結果、生後 28 日目に前がん状態が観察され、最終的に 32% (n=10/31) のマウスで腫瘍形成が認められた。腫瘍の発達過程で GFP を発現する細胞は分裂細胞のマーカーである Ki67 を発現していた。またこれらの腫瘍はヒト SHH 型髄芽腫に特徴的な遺伝子は高いレベルで発現しており、本研究で開発した方法論が、新生仔マウスから SHH 型髄芽腫を生み出すことが可能であることを証明している。さらに、*Ptch1* と同時にヒト SHH 型髄芽腫で変異の報告されたクロマチン制御因子をノックアウトした結果、これまでに報告されていない発がんに影響しうる新しい遺伝子変異が発見された。現在、これらの変異によって生じるがんシグナルの解析を進めている。

本研究のフローチャート

