

脳オルガノイドを用いた、GPR161 が制御する髄芽腫形成メカニズムの解明

名古屋市立大学大学院

医学研究科細胞生化学分野 講師 嶋田逸誠

1. 研究の背景・目的

髄芽腫は、小脳に発生する最も一般的な小児悪性脳腫瘍である。2021年の世界保健機関の報告書において、髄芽腫は4つのサブグループに分類されている；WNT 活性化型、ソニックヘッジホッグ（SHH）活性化型およびTP53 野生型、SHH 活性化型およびTP53 変異型、非WNT/非SHH型。SHH 活性化型およびTP53 野生型は、髄芽腫の総数の約30%を占める。また、乳幼児（3歳未満）と成人（16歳以上）を問わず、髄芽腫の中で最も一般的なサブグループを構成している。SHH 活性化/TP53 変異型の髄芽腫は、髄芽腫のサブタイプの中で最も稀であり、予後は悪い。SHH-髄芽腫は菱形唇上部の顆粒ニューロン前駆細胞や神経幹細胞から発生する。

SHH シグナルは、ヒトを含む動物の胚発生や組織の恒常性維持に関わる重要なシグナル伝達経路である。SHH シグナル伝達経路は、SHH タンパク質がパッチ（PTCH）と呼ばれる膜貫通型受容体に結合することで開始され、Smoothed（SMO）と呼ばれる下流のエフェクターの抑制を解除する。これにより、GLI と呼ばれる転写因子が核に移行し、細胞の増殖、分化、生存に関わる様々な標的遺伝子の発現を制御する。SHH シグナル伝達経路は、神経系、四肢、肺、皮膚など様々な臓器や組織の発生に重要な役割を果たすと同時に、がん、先天性異常、神経疾患など、多くのヒト疾患においてSHH シグナル伝達経路の制御異常が見られる。そのため、SHH シグナル伝達経路は様々な疾患の新規治療薬開発のための重要な標的となっている。

我々はマウスを用いた解析で、一次繊毛に局在するオーファンG タンパク質共役型受容

体 (GPCR) Gpr161 が、神経管発達、大脳皮質構築、髄芽腫の発症における Shh シグナルの負の制御因子であることを明らかにした (Mukhopadhyay et al., Cell 2013; Shimada et al., Developmental Biology 2019; Shimada et al., Cell Reports 2018)。しかし、GPR161 がヒトの脳において、どのような役割を有しているかは明らかではない。

本研究の目的は、ヒト小脳オルガノイドを用い、GPR161 の欠損が髄芽腫を発生させるかどうかを明らかにし、そのメカニズムを解明することである。ヒト iPS 細胞由来脳オルガノイドはヒト脳を模倣する優れた 3 次元培養モデルである。小脳オルガノイドの作製は 2015 年に報告されているが (Muguruma et al., 2013, Cell Reports)、SHH 活性型髄芽腫オルガノイドの作製は、まだ報告されていない。従って本研究において、GPR161 髄芽腫オルガノイドの作製を試みる。

2. 研究の対象ならびに方法

iPS 細胞培養

iPS 細胞は理研 BRC バンクより入手した。培養方法は、Stemfit と iMatrix を使用した。

小脳オルガノイド・髄芽腫オルガノイド作製法

小脳オルガノイドは、ヒト iPS 細胞を用い、報告済みの手法を改良し作製した (Muguruma et al., 2015, Cell Reports)。GPR161 欠損 iPS 細胞は、CRISPR/CAS9 法を用い、作成した。髄芽腫オルガノイドは、GPR161 欠損 iPS 細胞を用い作成した。作成された小脳オルガノイド及び髄芽腫オルガノイドは免疫組織化学法で解析した。

3. 研究結果

ヒト iPS 細胞を用い、一ヶ月培養をし、小脳オルガノイドモデルの構築に成功した。小脳オルガノイドは、脳室様構造を有していた。免疫組織化学法で、PAX6 陽性神経幹細胞が存在する脳室様構造と TUJ1 陽性神経細胞が存在する神経層を観察した。さらに、小脳特異的な KIRREL2 陽性 Purkinje 神経前駆細胞を観察した。

次に、GPR161 欠損 iPS 細胞を用い、小脳オルガノイドを作製したところ、野生型より大きなサイズのオルガノイドが作成された。免疫組織化学法で解析したところ、脳室様構造の数は減少していた。PAX6 陽性細胞の凝塊が多数オルガノイド内に観察された。これらの細胞をより詳細に観察するため、SHH 髄芽腫で発現が亢進する NMYC に着目した。NMYC 抗体

を用いて解析したところ、多数の PAX6 陽性細胞が NMYC を発現していることを明らかにした。さらに DNA ダメージは、髄芽腫細胞のがん幹細胞で亢進していることが知られているため、DNA ダメージを解析した。pH2AX 陽性 DNA ダメージが PAX6 陽性細胞に多数観察された。

これらの結果より、GPR161 の欠損をした iPS 細胞より、髄芽腫オルガノイドを作製することができた。

4. 考察

本研究計画において、SHH 活性型髄芽腫オルガノイドの作製に成功した。髄芽腫オルガノイドには、PAX6 陽性細胞や NMYC 陽性細胞が観察された。他の組織のがんオルガノイドモデルの研究では、細胞分裂の亢進が解析されているため、次年度は髄芽腫オルガノイドにおいてがん幹細胞の細胞分裂能を解析したいと考える。治療法開発のため、髄芽腫オルガノイドに関する研究を進め、アンメット・メディカル・ニーズを減少させるために様々な治療法の研究開発を行いたいと考える。

5. 文献

Muguruma K, Nishiyama A, Kawakami H, Hashimoto K, Sasai Y. Self-organization of polarized cerebellar tissue in 3D culture of human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 2015 Feb 3;10(4):537-50. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.051. Epub 2015 Jan 29.

Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, Jackson PK. The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell.* 2013 Jan 17;152(1-2):210-23. doi: 10.1016/j.cell.2012.12.026.

Shimada IS, Hwang SH, Somatilaka BN, Wang X, Skowron P, Kim J, Kim M, Shelton JM, Rajaram V, Xuan Z, Taylor MD, Mukhopadhyay S. Basal Suppression of the Sonic Hedgehog Pathway by the G-Protein-Coupled Receptor Gpr161 Restricts Medulloblastoma Pathogenesis. *Cell Rep.* 2018 Jan 30;22(5):1169-1184. doi: 10.1016/j.celrep.2018.01.018.

Shimada IS, Somatilaka BN, Hwang SH, Anderson AG, Shelton JM, Rajaram V, Konopka G, Mukhopadhyay S. Derepression of sonic hedgehog signaling upon Gpr161 deletion unravels forebrain and ventricular abnormalities. *Dev Biol.* 2019 Jun 1;450(1):47-62. doi: 10.1016/j.ydbio.2019.03.011. Epub 2019 Mar 23.

6. 論文発表

該当なし