

日本医療研究開発機構 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム
(疾患特異的 iPS 細胞を用いた病態解明・創薬研究課題)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 神経線維腫症 1 型患者の NF1 遺伝子変異に基づく病態解明と個別化医療を目的とした疾患特異的 iPS 細胞の樹立

(英語) Establishment of disease-specific iPS cells for elucidation of etiology and personalized medicine based on mutation of *NF1* in patients with neurofibromatosis type 1

研究開発実施期間: 令和 5 年 7 月 6 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 中田 英二
(英語) Eiji Nakata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 岡山大学学術研究院医歯薬学域・運動器先端リハビリテーション医学講座・准教授
(英語) Department of Advanced Rehabilitation Medicine for the Musculoskeletal System, Faculty of medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文:

神経線維腫症 1 型 (Neurofibromatosis type 1; NF1) は常染色体顕性遺伝で、17 番染色体上の *NF1* の病的バリエーションにより、Ras の恒常的な活性化が起こり、Ras/MAPK 経路と PI3K/AKT 経路が活性化し、若年時より全身の器官に様々な疾患が発生する。特に神経線維腫 (neurofibroma) が叢状神経線維腫 (plexiform neurofibroma) に進行すると、周囲の組織を変形させ痛みや機能障害を起こす。また、健常者に比べ脳腫瘍や乳がんなどの悪性腫瘍の発生率が高く、予後不良である。特に神経線維腫は悪性化し、悪性末梢神経鞘腫瘍 (malignant peripheral nerve sheath tumor; MPNST) が発生することがある。悪性化には *NF1* 遺伝子変異だけでなく、他の遺伝子変異も影響していると考えられているが、そのメカニズムは十分解明されていない。

欧米のガイドラインでは *NF1* のサーベイランスとして定期的に診察や画像診断を行うことが推奨され、がん死の低減につながると考えられているが、日本国内では体系的な診療体制が確立されていない。そこで、申請者は 2021 年に全

国で初めて NF1 を含めた遺伝性骨・軟部腫瘍の診療を行う専門外来（遺伝性骨・軟部腫瘍外来）を開設し、疾患に関する情報提供や遺伝カウンセリングを行った。また、レジストリのためデータベースを作成し患者登録を行った。さらに、我々は遺伝性腫瘍の原因遺伝子を調べ、がん予防に結びつけるため、中央西日本遺伝性腫瘍コホートを立ち上げている。

近年、ゲノム医療が広く行われ、genotype-phenotype correlation（遺伝子型－表現型相関）が注目されている。最近、NF1 は *NF1* 遺伝子の病的バリエーションのパターンで発症年齢や症状が異なることが報告されている。特に、ニューロフィブロミンがほとんど作られない *NF1* の large deletion および truncating/splicing mutations は、機能がある程度保たれたニューロフィブロミンが作られる missense mutations /inframe deletion に比べ発症年齢が若くて叢状神経線維腫や骨格異常などの症状が強く、MPNST の発生率も高い。しかし、理想的なモデル動物は存在せず、病的バリエーションの違いで臨床症状が異なる分子機構は解明されていない。そこで、AMED 再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム事業にて、NF1 患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、シュワン細胞前駆体に分分化誘導することで、より実際の病態に近い NF1 モデルを作製した。また、large deletion および truncating/splicing mutations (LTS 群) と missense mutations /inframe deletion (MI 群) のそれぞれ複数の NF1 患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、シュワン細胞前駆体 (SCP) に分化させ、疾患モデルを作製し、叢状神経線維腫の発生のメカニズムを解明に取り組んだ。

【NF1 患者からの疾患特異的 iPS 細胞の樹立とシュワン細胞前駆体への分化誘導】

当院の遺伝性骨・軟部腫瘍外来でフォローしている LTS 群と MI 群の複数の NF1 患者から同意を得て、遺伝カウンセリングと分子遺伝学的検査を実施した。末梢血単核球 (PBMC) を採取した。PBMC から DNA を抽出し、次世代シーケンサーで *NF1*, *NF2*, *SPRED1*, *SMARCB1*, *LZTR1* の5遺伝子について Exon とその両端のスプライス部位領域について、アレール頻度 0.1%以下の稀な一塩基置換と短い挿入・欠失を短鎖リード型次世代シーケンサーで同定し、NF1 の germline variant を確認した。本検査が陰性で、大規模欠失・挿入等のコピー数変化や大規模なゲノム構造変化など短鎖リード型の次世代シーケンサーでは高精度な解析が困難な場合は、マイクロアレイ染色体検査または MLPA 法で大規模欠失の有無を確認した。これらの検査で、*NF1* の病的バリエーションを調べ、大きな機能喪失につながる LTS 群と、タンパク翻訳の一部に影響はあるが機能はほとんど喪失されない MI 群の 2 群に分類した。当院にて遺伝学的検査を行った 44 例の *NF1* の病的バリエーションは、large Deletion 8.3%、frame shift 8.3%、nonsense 44.5%、splice variant 19.4%、missense 5.6%であった。この結果は研究参加者である二川により英語論文として publish された (Futagawa M, Okazaki T, Nakata E, et al. Genotypes and phenotypes of neurofibromatosis type 1 patients in Japan: A Hereditary Tumor Cohort Study. Hum Genome Var. 2024;11:42)。

NF1 患者の末梢血単核球細胞 (PBMC)を使用し、iPS 細胞へのリプログラミングを行った。iPS 化は SRV-iPSC-4 vector と呼ばれるリプログラミング遺伝子を搭載したセンダイウイルスを用いた。iPS 細胞特有のコロニー形成と GFP の除去によってリプログラミングの完了を確認した後、形成されたコロニーをシングルコロニーピックアップして培養を行った。同時に、コントロールとして NF1 遺伝子に変異のない健常人由来の iPS 細胞の樹立も行った。樹立した健常人由来と患者由来の iPS 細胞の増殖能には差をみとめなかった。次に、樹立した iPS 細胞が、iPS 細胞の特徴である多能性を有するか検証した。樹立した iPS 細胞の蛍光免疫染色によって、iPS 細胞の多能性マーカーである NANOG, OCT4 の発現を確認した。また、フローサイトメトリー解析によって、多能性を有しているとされる SSEA4 陽性細胞の割合を評価したところ、ほぼ 100%の細胞で陽性であることを確認した。さらに、PBMC と樹立した iPS 細胞で、NF1 遺伝子のエクソン部分を標的とした Target シーケンス解析を行い、*NF1* の病的バリエーションが一致することを確認した。したがって、iPS 細胞で病的バリエーションが確実に受け継がれていることが確認できた。以上の結果より、NF1 患者の PBMC から疾患特異的

iPS 細胞を樹立する事に成功したと結論した。NF1 患者の LTS 群 5 例、MI 群 2 例から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、本研究の課題として、樹立した疾患特異的 iPS 細胞 1 つを理研 BRC バンクへ寄託した。また、2025 年 4 月の時点で、他の 6 つの疾患特異的 iPS 細胞を BRC バンクへ寄託するため申請手続きを行っている。

次に、Wnt シグナルのアクチベーターである CHIR99021 を用いて iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導を行った。qRT-PCR によって、mRNA レベルで P75、SOX10、TFAP2B の発現上昇を認め、蛍光免疫染色でタンパクレベルで SOX10、AP-2a の発現を確認した。フローサイトメトリー解析でも、ほぼ 100% の細胞で P75 陽性であることを確認した。これらの結果から、健常人由来と患者由来の iPS 細胞から神経堤細胞への分化誘導が成功したと結論した。

次いで、B-Heregulin を含む培地を用いて神経堤細胞からシュワン前駆細胞への分化誘導を行った。qRT-PCR によって、mRNA レベルで神経系のマーカーである P75、SOX10、GAP43、ITGA4 の発現の上昇を認め、蛍光免疫染色でタンパクレベルで SOX10、P75、GAP43、S100 β の発現を確認した。作製した SCP と採取した末梢血単核球が同じ NF1 の病的バリエーションを有していることを NF1 遺伝子のエクソン部分を標的とした Target シークエンス解析で確認した。これらの結果から、健常人由来と患者由来の神経堤細胞からシュワン前駆細胞への分化誘導が成功したと結論した。患者由来の iPS 細胞株から誘導されたシュワン前駆細胞が、再現性のあるシーズとして利用できるか検討した。液体窒素による長期保存が可能か確認したところ、凍結融解後も、凍結融解前と比較して、同様のマーカー分子（SOX10、P75、GAP43、S100 β ）の発現を確認した。したがって、本細胞を用いて再現性のある研究を行うことができ、他施設へ供与し、共同研究にも使用できると考えた。

さらに、健常人由来 SCP と LTS 群、MI 群の NF1 患者由来 SCP の増殖能を CM30 インキュベーションモニタリングシステムを用いて多点観察による定量解析により、比較した。CM30 を用いた評価にて、増殖能は Large Deletion 例 > Truncating mutation 例 > Missense mutation 例 > 健常人例であった。したがって、ニューロフィブロミンの産生能が低い genotype は増殖能が高いことが分かった。本結果から、in vitro において、genotype-phenotype correlation（遺伝子型-表現型相関）が示された。このデータは、実臨床において、genotype と臨床症状との関連の知見と類似しており、真の臨床ニーズを反映した NF1 モデルを作成することができた。

【NF1 神経線維腫モデルの病態解析 (in vitro)】

神経線維腫が増大し叢状神経線維腫に変化する過程を再現するため、健常者群、LTS 群、MI 群の NF1 特異的 iPS 細胞から誘導した SCP をラットの坐骨神経に移植し NF1 神経線維腫モデルを作製した。1 か月後に移植部の組織を採取し、HE 染色および蛍光免疫染色 (Anti-human Nucleoli) にて、NF1 由来 SCP が生着し、腫瘍を形成していることを確認した。一方、健常者群では生着を認めなかった。

【AMED バイオバンク情報として遺伝学的検査結果の活用】

我々は遺伝性腫瘍の原因遺伝子を調べ、がん予防に結びつけるため中央西日本遺伝性腫瘍コホート (Mid-West Japan Hereditary Tumor Cohort; MeJeTo) を設立している（代表者は、本課題の分担研究者である岡山大学臨床遺伝子診療科 平沢晃教授）。MeJeTo はヒトゲノムを用いた個別化医療の研究プロジェクトであり、日本の 51 施設から DNA、臨床データ、疫学データを収集する大規模な遺伝性腫瘍症候群専用の前向きコホート研究を行っており、NF1 を含めた多数の患者が登録されている。本事業で行われた遺伝学的検査結果は、患者の同意を得て、MeJeTo に登録された。また、本研究による遺伝学的検査結果が、AMED バイオバンク情報として活用された。

【研究開発成果の科学的・社会的価値】

神経線維腫症 1 型 (NF1) の病態解明に向けた本研究の成果は、医療分野に以下の革新的な進展をもたらす可能性が高い。疾患特異的 iPS 細胞モデルの確立により、NF1 患者の遺伝子型 (Large deletion/Truncating/Missense 変異) と

細胞増殖能の相関を初めて in vitro で実証した。この知見は臨床現場での個別化医療推進の基盤となり、遺伝子変異タイプに応じた経過観察や治療選択の最適化が期待される。特に、末梢血単核球から安定した疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、シュワン前駆体に分化誘導する技術を確立したことで、全国的な研究基盤の構築に結び付いた。シュワン前駆細胞を移植したラットで腫瘍形成を確認しており、神経線維腫モデルを確立できた。このモデルは樹立した患者の *NF1* のゲノム情報を有しており、従来の遺伝子改変ラットに比べ、実際の病態に近く、前臨床評価に利用するモデルとして有用である。例えば、このモデルを用いることで、既存の mTOR 阻害剤や MEK 阻害剤の作用機序の再検証や、新規治分子標的薬の探索など、創薬スクリーニングのプラットフォームとして有用である。特に、増殖能が高いことが明らかになった Large Deletion 群は、悪性化リスクの高い患者群の早期特定につながる可能性がある。また、理研 BRC バンクへの iPS 細胞寄託により、国内外の研究者が本細胞株を用いた研究が可能になった。特に神経堤幹細胞を経てシュワン細胞前駆体への分化誘導系を確立することで、これまで再現が困難だった叢状神経線維腫の発生機序を in vitro と in vivo で再現する新規モデルを他の研究者にも提供することができるようになった。今後の臨床応用では、遺伝子型に応じた治療選択(予防的介入/積極的治療)や、腫瘍微小環境を標的とした新規治療戦略の開発が期待される。

英文：

Neurofibromatosis type 1 (NF1) causes various diseases in organs throughout the body from a young age. In particular, when neurofibromas progress to plexiform neurofibromas, they deform the surrounding tissues, causing pain and functional disorders. In addition, compared to healthy individuals, the incidence of malignant tumors such as brain tumors and breast cancer is higher, and the prognosis is poor in NF1. In particular, neurofibromas can become malignant and develop malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST). Not only NF1 gene mutations but also other gene mutations could affect malignancy, but the mechanism has not been fully elucidated.

In 2021, we opened the specialized outpatient clinic to treat hereditary bone and soft tissue tumors, including NF1 (hereditary bone and soft tissue tumor outpatient clinic), and provided information about the disease and genetic counseling. In addition, a database was created for the registration of the patients.

In recent years, genomic medicine has become widespread, and genotype-phenotype correlation has been paid attention. Recently, it has been reported that the age of onset and symptoms of NF1 vary depending on the pattern of pathogenic variants of *NF1*. In particular, patients with large deletions and truncating/splicing mutations of *NF1* (LTS group), which produce little neurofibromin protein, have a younger age of onset and more severe symptoms such as plexiform neurofibromas and skeletal abnormalities, and a higher incidence of MPNST, compared to missense mutation/inframe mutation of *NF1* (MI group), which produce neurofibromin protein with some degree of function. However, there are no ideal model animals, and the molecular mechanisms by which clinical symptoms differ depending on pathogenic variants have not been elucidated. Therefore, we established disease-specific iPS cells from NF1 patients and induced differentiation into Schwann cell precursors to create an NF1 model that is closer to the actual pathology.

With the consent of several NF1 patients in the LTS and MI group who were followed up at our hospital's hereditary bone and soft tissue tumor outpatient clinic, genetic counseling and molecular genetic testing were performed. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected. DNA was extracted from the PBMCs and examined for pathogenic variants of *NF1* using a next-generation sequencer. The patients were classified into two groups: the LTS group, which leads to a major loss of function, and the MI group, which affects part of protein translation but does not lose function so much.

PBMCs were used to reprogram the cells into iPS cells. For iPS generation, Sendai virus carrying a reprogramming gene called SRV-iPSC-4 vector was used. At the same time, iPS cells derived from healthy individuals without mutations of *NF1* were also established as a control. No difference was observed in the proliferation ability of the established iPS cells derived from healthy individuals and patients.

Disease-specific iPS cells were established from five NF1 patients in the LTS group and two in the MI group, and one of the established disease-specific iPS cells was deposited at the RIKEN BRC Bank as the subject of this study. Next, differentiation of the iPS cells into neural crest cells was induced using CHIR99021, a Wnt signal activator. qRT-PCR confirmed increased expression of P75, SOX10, and TFAP2B at the mRNA level, and fluorescent immunostaining confirmed expression of SOX10 and AP-2a at the protein level. Flow cytometry analysis also confirmed that nearly 100% of the cells were P75 positive. Based on these results, we concluded that differentiation of iPS cells derived from healthy individuals and patients into neural crest cells was successful.

Next, we induced differentiation of neural crest cells into Schwann precursor cells using a medium containing B-Heregulin. qRT-PCR confirmed increased expression of neural markers P75, SOX10, GAP43, and ITGA4 at the mRNA level, and fluorescent immunostaining confirmed expression of SOX10, P75, GAP43, and S100 β at the protein level. Based on these results, we concluded that differentiation of neural crest cells derived from healthy individuals and patients into Schwann precursor cells was successful.

Furthermore, we compared the proliferation ability of SCPs derived from healthy individuals with SCPs derived from NF1 patients of the LTS and MI groups. The proliferative ability was as follows: Large deletion cases > Truncating mutation cases > Missense mutation cases > Healthy subjects. Therefore, it was found that genotypes with ability of low production of neurofibromin had ability of high proliferation. From these results, genotype-phenotype correlation was shown in vitro. This data is similar to the knowledge of the relationship between genotype and clinical symptoms in the clinical practice, and it was possible to create an NF1 model that reflects true clinical needs. To reproduce the process in which neurofibromas change into plexiform neurofibromas, SCPs induced from iPS cells from the healthy subjects, and LTS and MI groups were transplanted into the sciatic nerve of rats to create an NF1 neurofibroma model. After one month, tissue from the transplanted area was collected, and HE staining and fluorescent immunostaining (Anti-human Nucleoli) confirmed that the NF1-derived SCPs had engrafted and formed a tumor. However, engraftment was not observed in the healthy subjects. The results of this research aimed at elucidating the pathology of NF1 are likely to bring about the following revolutionary advances in the medical field. By establishing a disease-specific iPS cell model, we were able to demonstrate the correlation between the genotype and the ability of cell proliferation in NF1 patients in vitro for the first time. This knowledge will serve as the basis for promoting personalized medicine in clinical settings, and is expected to optimize follow-up observations and treatment selection according to the type of gene mutation. In particular, the establishment of a technology to establish stable disease-specific iPS cells from PBMCs and induce differentiation into Schwann precursors has led to the construction of a nationwide research base. Tumor formation was confirmed in rats transplanted with schwann precursor cells, and a neurofibroma model was established. This model contains the genomic information of the NF1 patient, and is closer to the actual pathology than conventional genetically modified rats, making it a useful model for preclinical evaluation. In addition, the deposition of iPS cells at the RIKEN BRC Bank has made it possible for researchers in Japan and abroad to conduct research using this cell line. In future clinical applications, it is expected that treatment can be selected based on the genotype and the development of new treatment strategies.