

令和元年6月11日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11687

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子Pten異常カウデン症候群iPS細胞を用いた発症機序解明と治療法開発

研究課題名(英文) Mechanism of pathogenesis and therapy development using tumor suppressor gene Pten abnormal Cowden syndrome iPS cells

研究代表者

神田 拓 (KANEDA, TAKU)

広島大学・病院(歯)・助教

研究者番号：00423369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌抑制遺伝子Pten異常カウデン症候群患者の末梢血をMiSeq次世代シーケンサーで4813遺伝子の全エクソンを検索した。PTEN遺伝子領域のアレル内にTのdeletion及びc.1027G>A変異を認めた。この結果、341番目のアミノ酸FがLに、さらに342番目のアミノ酸KのRへの置換が示唆され、その後にstop codonが形成されることから、PTEN蛋白はtruncationしている可能性が考えられた。癌関連遺伝子の変異も認め、本患者の乳癌や甲状腺癌の既往が裏付けられた同患者由来PBMCをRD6F無血清培地で初代培養後、無フィーダー・無血清培養系で疾患特異的iPSCを誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Cowden症候群は全身諸臓器の多発性過誤腫と高率に悪性腫瘍を合併する疾患で、がん抑制遺伝子phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)の変異が関与するまれな常染色体優性遺伝である。Cowden症候群特異的iPSCは、本疾患の病態解明及び治療法の開発研究において有用な手法と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The peripheral blood of the cancer suppressor gene Pten abnormal Cowden syndrome patient was searched for all exons of 4813 genes by MiSeq next generation sequencer. Deletion of T and c. 1027 G > A mutation were recognized in the allele of the PTEN gene region. These results suggest that the PTEN protein is truncated because the 341 amino acid F is replaced by L and the 342 amino acid K is replaced by R, followed by the formation of stop codon. After primary culture of PBMCs from the same patient, who also had mutations in cancer-related genes and had a history of breast cancer or thyroid cancer in this patient, in RD6F serum-free medium, disease-specific iPSCs were induced in a non-feeder serum-free culture system.

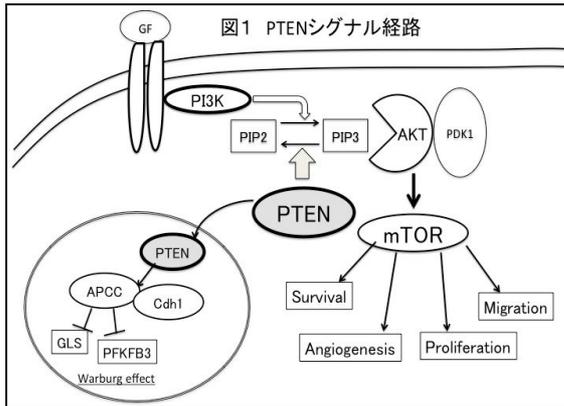
研究分野：外科系歯学

キーワード：COWDEN PTEN がん抑制遺伝子 IPS 無血清

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Cowden(カウデン)症候群は全身諸臓器とりわけ乳房、甲状腺、および子宮内膜に多発性過誤腫ないし悪性腫瘍が高率に生じるリスクが高い疾患で、がん抑制遺伝子 phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN)の変異が関与するまれな常染色体優性遺伝と考えられている。臨床的な特徴として、粘膜皮膚病変(顔面の外毛根鞘腫、乳頭腫性丘疹など)、巨頭症があり、口腔内に生じた乳頭状病変症状から疾患を発見されることも多い。臨床診断基準について NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Clinical Practice Guidelines in Oncology, Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, version 2, 2017) では、国際 Cowden コンソーシアムにて提唱され、PTEN 遺伝子検査は



Cowden 症候群の確定診断を行う唯一の方法とされている。孤発例と家族歴のある場合が散見されるが発症頻度は200,000人に1人程である。症状が多彩でありまた臨床的徴候がわずかなことがあるため、臨床的に十分に認識されず診断がついていない場合が多いとされる。またその発症機序もがん抑制遺伝子 PTEN の異常との報告は多いが、その詳細は不明である。

2. 研究の目的

本研究では本学倫理規定(第ヒ-58号:口腔顎顔面領域に病変を有する遺伝子疾患患者および健常者由来細胞からの人工多能性幹細胞樹立に関する研究および第ヒ-72号:口腔顎顔面領域に病変を有する遺伝子疾患患者の遺伝子変異およびその遺伝子診断に関する研究)に基づき同意を得られた Cowden 症候群患者末梢血より PTEN 遺伝子の新規変異を確認した iPS 細胞の誘導を行い、同細胞を用いて本症候群の病態解明およびゲノム編集を応用した新規遺伝子治療法の開発を目的とする。

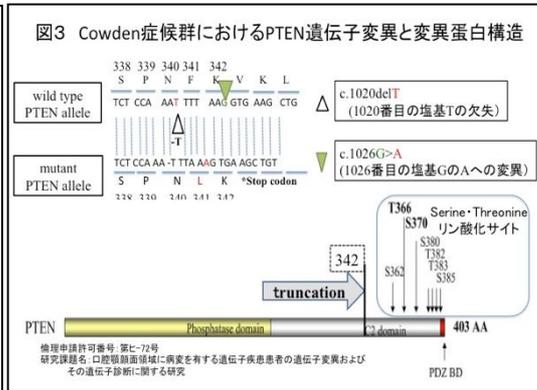
3. 研究の方法

ゲノムへの integration のないセンドライウイルス(SeVdp)を用いたがん抑制遺伝子 PTEN 変異 Cowden 患者由来 iPS 細胞を樹立し、フィーダーフリー・無血清培地条件での発症メカニズムの解明や機能解析を応用し、安全な再生医療の臨床応用を目指す。

4. 研究成果

(1) PTEN 遺伝子の新規ヘテロ変異

甲状腺癌、乳がんなどの既往歴および口腔および消化管などの多発過誤腫の症状を示した Cowden 症候群患者より(図2)、広島大学倫理規定に基づき患者の同意を得て末梢血を採取し、Miseq 次世代シーケンサーにて解析した。その結果 PTEN 遺伝子の新規ヘテロ変異を認め、Codon 341 Phenylalanine の Leucine へ置換、codon 343 Valine の stop codon への置換を確認した(図3)(第71回日本口腔科学会学術総会(愛媛)2017.4.26にて発表報告)



(2) 疾患患者の遺伝子診断

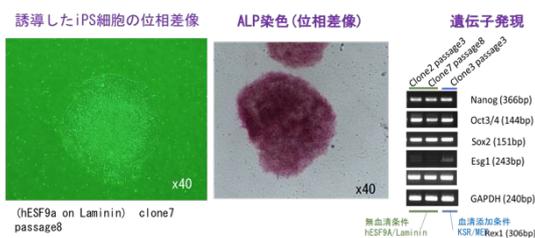
同患者の末梢血を次世代シーケンサーを用いた解析した結果、その他にも腫瘍関連遺伝子変異が検出された。塩基の変異カ所数は 9354 カ所、アミノ酸置換など、機能変化をしていると思われるものは 2751 カ所、deletion は 231 カ所認めた(表 1)。

表 1 PTEN 遺伝子以外の代表的変異遺伝子

遺伝子名	検出変異	locus	アミノ酸置換部位	アミノ酸置換	Codons	Exon	病態関連臓器	関連疾患
MTHFR	G>G/A	1p36.3	222	A/V	gCc/gTc	5/12	stomach	carcinoma
CFH	C>T/T	1q32	402	H/Y	Cat/Tat	9/22	breast	carcinoma
IL7R	T>T/C	5p13	66	I/T	aTc/aCc	2/8	stomach	carcinoma
CYP2C19	G>G/A	10q24	212	W/*	tgG/tgA	4/9	stomach	carcinoma
SAA1	C>C/T	11p15.1	70	A/V	gCc/gTc	3/4	stomach	carcinoma
BRCA2	A>A/C	13q12.3	372	N/H	Aat/Cat	10/27	stomach	carcinoma
IL4R	T>T/C	16p12.1-p11.2	503	S/P	Tcc/Ccc	10/10	large_intestine	carcinoma
HYDIN	GA>GA/G	16q22.2	3903			69/86	haematopoietic_and_lymphoid_tissue	lymphoid_neoplasm
FUT3	A>A/C	19p13.3	20	L/R	cTg/cGg	2/2	breast	carcinoma

(3) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立

図4 センダイウイルスを用いた無血清培養条件での Cowden症候群疾患モデルiPS細胞誘導



特異的 iPS 細胞の樹立においては、レトロウイルスベクターを使用することによる初期化因子導入時のがん遺伝子の活性化リスクあるいはがん抑制遺伝子の不活性化の可能性を排除するため、宿主ゲノムに遺伝子挿入のないセンダイウイルスベクター(産業技術研究所、中西真人博士より供与 J.Biol.Chem 2011) による疾患特異性 iPS 細胞誘導を行っており、本手法にもとづき、フィーダーフリー無血清培養系における疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、Cowden 症候群患者由来 iPSC 細胞の未分化性および分化多能性の検証をおこなった(図 4)。

(4) 本樹立細胞における未分化関連遺伝子発現量および蛋白発現量の比較

健常人 iPSC と Cowden- iPSC における未認可関連遺伝子発言察および淡白発言量の比較を行い、CS- iPSC は健常人 iPSC と比較し、PTEN 蛋白の発現減少が示唆され、さらに p53 の蛋白発現の増加が示唆された。CS- iPSC は健常人 iPSC と比較し、維持中のコロニー形成時では Nanog 遺伝子

発現量の差は認めなかったが、単一細胞に播種を行った際、CS-iPSCのNanogの発現量はWT-iPSCと比較して上昇していることが示唆された。このことより未分化性の維持に有利に働いていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 完全無血清・フィーダーフリー・ウイルスインテグレーションフリー培養系での疾患特異的 iPSC 細胞の樹立と病態モデル研究 第二報 濱田充子、中瀬洋司、中峠洋隆、大林史誠、福谷多恵子、山崎佐知子、神田 拓、小泉浩一、虎谷茂昭、岡本哲治 第 72 回口腔科学会総会 愛知 2018.5.11-13
2. レックリングハウゼン病由来 iPSC 細胞のインテグレーションフリー・フィーダーフリー・無血清培養系での樹立による疾患研究 福谷多恵子、濱田充子、中峠洋隆、大林史誠、山崎佐知子、神田 拓、小泉浩一、虎谷茂昭、岡本哲治 第 72 回口腔科学会総会 愛知 2018.5.11-13
3. T. FUKUTANI, A. HAMADA, H. NAKATAO, F. OBAYASHI, S. YAMASAKI, T. KANDA, K. KOIZUMI, S. TORATANI, T. OKAMOTO. Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease, NF1) and establishment of NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) for the study of disease mechanisms. 7th Hiroshima Conference (Hiroshima University) 2018.3.30
4. 福谷多恵子、虎谷茂昭、松井健作、濱田充子、山崎佐知子、神田 拓、小川郁子、岡本哲治 Gli1 遺伝子変異を伴う顎関節滑膜炎性軟骨腫症の 2 例 第 65 回 日本口腔科学会中国・四国地方部会 2017 年 11 月 11 日 高知
5. 福谷多恵子、濱田充子、中峠洋隆、大林史誠、山崎佐知子、神田 拓、小泉浩一、虎谷茂昭、岡本哲治. Neurofibromatosis type I の遺伝子診断及び同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSC) のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹立による疾患研究. 第 54 回日本口腔組織培養学会学術大会. 2017.11.3 岩手
6. 福谷多恵子、濱田充子、中峠洋隆、大林史誠、山崎佐知子、神田 拓、小泉浩一、虎谷茂昭、岡本哲治: Neurofibromatosis type I の遺伝子診断及び同疾患特異的 induced pluripotent stem cells (iPSC) のインテグレーションフリー・フィーダー細胞フリー・無血清培養系での樹立による疾患研究. 第 27 回日本口腔内科学会・第 30 回日本口腔診断学会 2017.9.15-17 (札幌)
7. Genetic diagnosis of Cowden Syndrome (CS) and establishment of CS-specific induced pluripotent stem cells (iPSC) in virus integration-, feeder-, and serum-free defined culture for disease model study, Fumitaka Obayashi, Atsuko Hamada, Hirotaka Nakatao, Taeko Fukutani, Eri Akagi, Sachiko Yamasaki, Taku Kanda, Shigeaki Toratani, Tetsuji Okamoto Department of Molecular Oral Medicine and Maxillofacial Surgery, Applied Life Sciences, Graduate Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Japan The 15th International Conference on cellular endocrinology. (Hiroshima), 2017.10.9
8. Genetic diagnosis of Neurofibromatosis type I (von Recklinghausen's disease) and

establishment of NF1-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) in virus integration-, feeder-, and serum-free defined culture for disease model study ○Taeko FUKUTANI、Atsuko HAMADA、Hiroataka NAKATAO、Fumitaka OBAYASHI、Sachiko YAMASAKI、Taku KANDA、Kouichi KOIZUMI、Shigeaki TORATANI、Tetsuji OKAMOTO The 15th International Conference on cellular endocrinology.2017.10.9

9. 大林史誠,濱田充子,中峠洋隆,赤木恵理,林 靖也,山崎佐知子,神田 拓,虎谷茂昭,岡本哲治. Cowden 症候群特異的 iPS 細胞の樹立研究 第 71 回日本口腔科学会学術総会 (愛媛) 2017.4.26
10. Fumitaka Obayashi,Atsuko Hamada,Hiroataka Nakatao,Taeko Fukutani Eri Akagi,Sachiko Yamasaki, Taku Kanda, Shigeaki Toratani,Tetsuji Okamoto Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from peripheral blood lymphocytes of a patient with Cowden syndrome in serum-and feeder-free culture. The 14th International Conference on cellular endocrinology. (Hiroshima),2016.11.13
11. Taeko FUKUTANI, Atsuko HAMADA, Hiroataka NAKATAO, Fumitaka OHBAYASHI, Eri AKAGI,Sachiko YAMASAKI,Shigeaki Taku Kanda TORATANI, Tetsuji OKAMOTO. Generation of disease-specific human induced pluripotent stem (iPS) cells from peripheral blood lymphocytes of a patient with Von Recklinghausen syndrome in serum-and feeder-free culture. The 14th International Conference on cellular endocrinology. (Hiroshima),2016.11.13
12. 大林史誠、濱田充子、中峠洋隆、赤木恵理、林靖也、山崎佐知子、神田拓、虎谷茂昭、岡本哲治 Cowden 症候群の遺伝子診断および同症候群由来疾患特異的 iPS 細胞の樹立研究 2016. 4.15-17 口腔科学会総会 博多

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：岡本哲治

ローマ字氏名：Okamoto Tetsuji

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究科(歯)

職名：教授

研究者番号(8桁): 00169153

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。