

令和 4 年 6 月 30 日現在

機関番号：85402

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17572

研究課題名(和文) PTEN変異大腸癌の病態解析・治療標的の検索とその臨床応用

研究課題名(英文) Pathological analysis and therapeutic targeting of PTEN-Mutant colorectal cancer.

研究代表者

佐田 春樹 (Sada, Haruki)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・外科医師

研究者番号：30851422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：PTENはヒト大腸癌の約半数で蛋白質の発現が低下している。自然発生大腸癌マウスモデルにおいてPten遺伝子を大腸粘膜特異的にノックアウトすると、発癌を早め、粘膜下層への浸潤をより高頻度に認めた。さらにこのマウスに発生した大腸癌の転写産物を網羅的に解析することで、PTEN欠損大腸癌関連遺伝子群の拾い上げを行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん遺伝子パネル検査で高頻度に変異を認める遺伝子の一つとしてPTEN遺伝子が挙げられる。大腸癌の半数でPTENの発現が低下しているが、現時点でPTEN遺伝子変異症例に対するエビデンスレベルの高い分子標的薬は確立されていない。本研究で拾い上げられたPTENシグナル欠損大腸癌に特異的な遺伝子群を用いることで、ヒト大腸癌症例において、PTENシグナルに異常により変化する標的分子が正確に抽出できれば、臨床病理学的解析、薬剤効果測定、創薬および新規治療薬のバイオマーカー検索への発展が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Loss of PTEN (phosphatase and tensin homologue) expression in human colorectal cancers is found in 40%, but its functional contribution is not fully understood. Simultaneous Pten and Apc deficiency promoted tumor invasion and tumorigenesis in mouse colon epithelium than Apc deficiency. Moreover, based on the RNA-Seq analysis between tumor of Pten/Apc deficient mouse and that of Apc deficient mouse, Pten regulating genes as the potential molecular target in PTEN-deficient tumor in human were screened and identified.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 マウスモデル PTEN RNA-seq GSEA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

*PTEN(Phosphatase and Tensin Homolog Deleted from Chromosome 10)*は大腸癌の約50%で発現異常を認める癌抑制遺伝子である。一方で、*PTEN* 遺伝子変異の有無のみの検索では複雑な調節機能の全体像を把握することが困難であり、この経路に異常をきたす大腸癌症例の正確な絞り込みに影響を及ぼし、標的治療の開発の支障になっている。そのため現時点では *PTEN* 遺伝子変異を標的としたエビデンスレベルの高い分子標的薬は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、大腸自然発癌モデルとして Wnt シグナル異常をベースとする Pten 遺伝子による複合的遺伝子改変マウスモデルを確立し、PI3K-PTEN-AKT シグナル経路異常に特異的な関連遺伝子群同定、ならびに Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を用いた分子生物学的サブクラス分類への応用を目指す。さらに、このシグナルに異常があるヒト大腸癌症例のサブクラス分類が可能となれば、臨床病理学的解析、薬剤効果予測、創薬および新規治療薬のバイオマーカー検索への発展が期待できると考える。

3. 研究の方法

研究 1.

Pten 遺伝子異常を有する大腸発癌マウスモデルの確立

マウスの大腸上皮特異的転写活性を持つ CDX2 プロモーター(CDX2P)を利用した大腸上皮細胞特異的に Apc 遺伝子をノックアウトした自然発生大腸癌マウスをコントロールマウスとし、同じ細胞系において Apc に加え Pten 遺伝子をノックアウトした大腸癌マウスを作成し、病理形態学的に比較した。さらに、二種類のマウス大腸腫瘍組織を比較して Pten 遺伝子異常に特異的な関連遺伝子群の絞り込みを行うため、RNA-seq による網羅的解析を行い、さらに GSEA を行う。

研究 2.

マウス大腸腫瘍オルガノイドを用いた Pten 遺伝子異常に特異的な関連遺伝子群の絞り込み

:2 種類の遺伝子改変マウスモデルから、マウス大腸腫瘍オルガノイドを作成し、PI3K-PTEN-AKT 経路の下流の主因子である mTOR の阻害剤(ラパマイシン)の投与を行う。治療前後でオルガノイドより RNA を抽出し、ラパマイシンによって遺伝子発現変化がレスキューされた(Pten 欠損で亢進したシグナルがラパマイシンで抑制される、または抑制されたシグナルが薬剤で亢進する)遺伝子群を Gene Set として設定する。

研究 3.

Pten 遺伝子異常に特異的な関連 Gene Set のヒト大腸癌での再現性の確認: 呉医療センター・中国がんセンター外科ならびに広島大学病院消化器・移植外科において、手術症例から採取したヒト大腸癌からオルガノイドを作成し、20 例くらいの小さなライブラリーとして保存する。そのライブラリーから、ウエスタンブロット法で PTEN 蛋白質発現レベルを測定する。そのうち PTEN 蛋白質の発現レベルが高い症例と低い症例を、5 例ずつ抽出し、転写産物を網羅的に解析することで、研究 1 の Gene Set が GSEA で有用であるか、また蛋白質発現量と Enrich Score の相関を確認する。

4. 研究成果

Apc と *Pten* を複合的に遺伝子改変(ノックアウト)したマウスは、*Apc* 単独遺伝子改変マウスと比較し、腫瘍発生が早く、粘膜筋板への浸潤傾向が強いことを確認した。さらに生存期間も *Apc* と *Pten* を複合的に遺伝子改変マウスで有意に短いことも確認した。

さらに、採取した腫瘍からの qRT-PCR による Pten mRNA レベル、Western blot による Pten の定量においても、Pten ノックアウトマウスにおいて低下していることを確認した。

PTEN 欠損大腸癌関連遺伝子群の拾い上げのため、*Apc* と共に *Pten* をノックアウトしたマウスと *Apc* のみノックアウトしたマウスから発生した腫瘍を、RNA-seq(n=3 づつ)にて網羅的解析を行った。

PTEN シグナル下流をターゲットとした分子標的薬の投与を行い、投与後の大腸腫瘍 RNA を抽出

し、コントロール群と転写産物を比較することで治療標的を抽出し、さらに免疫染色を追加し、確認を行なっている。

2022年度から科研費(若手研究)に採択された「PTEN 変異大腸癌の病態解析と AKT-mTOR シグナルを標的とした治療応用」に引き継ぎ研究を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐田 春樹
2. 発表標題 新規自然発生大腸癌マウスモデルを用いた家族性大腸腺腫症マウスモデルの確立とその臨床応用
3. 学会等名 第76回日本大腸肛門病学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	檜井 孝夫 (Hinoi Takao)		
研究協力者	田代 裕尊 (Tashi ro Hirotaka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------