

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18670

研究課題名（和文）PTEN+/-カウデン症候群特異的iPSC由来オルガノイドを用いた腫瘍幹細胞研究

研究課題名（英文）Cancer stem cell research using PTEN+/- Cowden syndrome-specific iPSC-derived organoids

研究代表者

大林 史誠（Fumitaka, Obayashi）

広島大学・医系科学研究科（歯）・助教

研究者番号：20806096

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）：健康人と同様、Cowden症候群患者由来から無血清培養条件下でiPSCの誘導が可能であった。健康人と比較しても誘導効率が高かったが通常の培養で、樹立維持は健康人と同様で増殖速度や未分化性も特に変化はみとめなかった。一方でPTENの遺伝子発現とタンパク発現量は約半量に低下しており、PTEN/AKTシグナルの活性化を認めた。さらにCS-iPSCはPTENの発現上昇を認め、変異アレルからの遺伝子発現に依存していることが分かった。疾患との関連性は不明であるが、異常PTENの蓄積による何らかの変化が生じている可能性が示唆された。CS-iPSCを正常配列への修復を試みたが、修復は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患の原因となる変異アレルからの遺伝子発現様相は今後の疾患発症メカニズムの解明に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：As in healthy individuals, iPSCs derived from Cowden syndrome patients could be induced under serum-free culture conditions. Although the induction efficiency was higher than that of healthy controls, the establishment and maintenance of iPSCs in normal culture was similar to that of healthy controls, and there was no particular change in the growth rate or undifferentiated characteristics of iPSCs.

On the other hand, PTEN gene expression and protein expression levels were reduced by about half, indicating activation of PTEN/AKT signaling. In addition, CS-iPSCs showed increased expression of PTEN, indicating a dependence on gene expression from the mutant allele. Although the relevance to the disease is unknown, it is suggested that some changes may be caused by the accumulation of abnormal PTEN. attempts to repair CS-iPSCs to normal sequence were unsuccessful.

研究分野：Oncology

キーワード：PTEN Cowden症候群 iPSC細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

PTEN 遺伝子は腫瘍抑制遺伝子であり、様々な腫瘍でその発現異常や遺伝子変異が認められる。家族性腫瘍症候群である Cowden 症候群は PTEN 遺伝子の変異で生じる遺伝性疾患であり、口腔内の多発性ポリープを主徴候とする。また乳がんなどの悪性腫瘍を高確率で併発する。本研究は Cowden 症候群患者の末梢血単核球を分離、ウィルスベクターにて初期化し、疾患特異的人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) を作成し、腫瘍形成のバイオメカニズムを探索することを目的とした。

2. 研究の目的

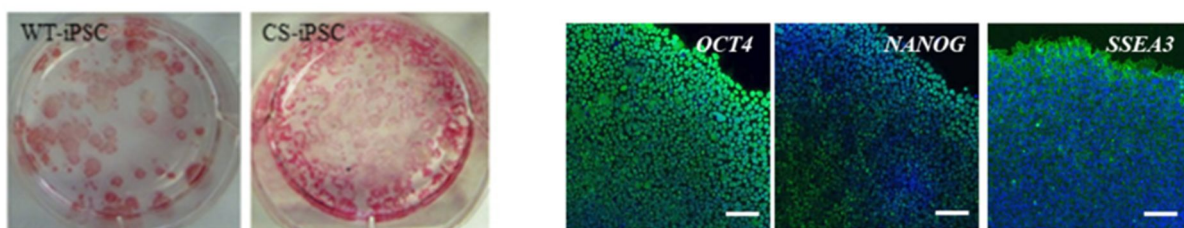
がん抑制遺伝子の一つである PTEN は AKT シグナル介して、細胞の生存や増殖を調節している。Cowden 症候群 (CS) は PTEN 過誤腫症候群と呼ばれる 家族性腫瘍症候群の一つであり、口腔粘膜を含め消化管や皮膚に多発性の小丘疹を主徴候とし、甲状腺がん、乳がんなどの腫瘍性疾患が好発する常染色体優性遺伝疾患である。近年 PTEN/AKT 経路は正常幹細胞や癌幹細胞の Stemness に重要であり PTEN 喪失によって癌幹細胞の発生、増殖生存の亢進が示唆されている。しかし、詳細なメカニズムは不明である。本研究では、新たに変異同定した PTEN 遺伝子発現の低下を有する CS 患者の末梢血リンパ球から誘導した CS 由来疾患特異的 iPS 細胞 (CS-iPSC) とゲノム編集技術で遺伝子修復した iPSC を用いて PTEN 喪失による幹細胞の挙動やニッチ、PTEN 喪失によって生じる癌幹細胞 (CSC) の起源について検討する。

3. 研究の方法

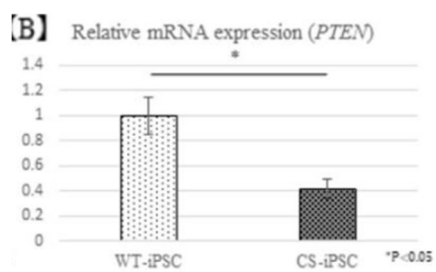
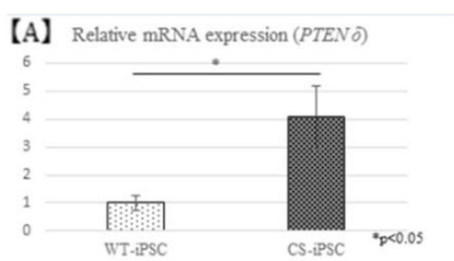
Cowden 症候群患者由来末梢血単核球を採血し遠心分離を行い、培養したのち、センダイウィルスベクターを無血清培養条件下で感染させ iPSC を誘導する。まずは健常人由来 iPSC と比較してその細胞特性と遺伝子発現を解析する。また Cowden 遺伝子の原因遺伝子である PTEN 遺伝子の遺伝子修復を iPSC で行い、修復前後での細胞特性を解析する。また、口腔癌細胞株の培養上清を用いて、iPS 細胞を腫瘍幹細胞に分化誘導させ、PTEN 遺伝子の発現と AKT シグナル伝達経路を中心に腫瘍の発生メカニズムとを探索する。

4. 研究成果

健常人と同様、Cowden 症候群患者由来から無血清培養条件下で iPSC の誘導が可能であった。健常人と比較しても誘導効率が高かったが通常の培養で、樹立維持は健常人と同様で増殖速度や未分化性も特に変化はみとめなかった。



一方で PTEN の遺伝子発現とタンパク発現量は約半量に低下しており、PTEN/AKT シグナルの活性化を認めた。またダイレクトシーケンス法で PTEN mRNA の塩基配列を確認したが、mRNA の配列には遺伝子変異は認められず、正常のアレルからの PTEN に依存していると考えられた。さらに本患者の変異部位はエクソンの末端にあり、イントロンを含んだマイナーアイソフォームである PTEN の発現を確認した結果、CS-iPSC は PTEN の発現上昇を認め、ダイレクトシーケンス法で確認した結果、変異アレルからの遺伝子発現に依存していることが分かった。疾患との関連性は不明であるが、異常 PTEN の蓄積による何らかの変化が生じている可能性が示唆された。また CS-iPSC にゲノム編集にて正常配列への修復を試みたが、ベクターの導入効率がわるく、修復は困難であった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Obayashi Fumitaka, Hamada Atsuko, Yamasaki Sachiko, Kanda Taku, Toratani Shigeaki, Okamoto Tetsuji	4. 巻 58
2. 論文標題 Identification of a Cowden syndrome patient with a novel PTEN mutation and establishment of patient-derived induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal	6. 最初と最後の頁 69 ~ 78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11626-021-00637-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------