

# 論文内容要旨

Genetic diagnosis of Cowden syndrome (CS) and establishment of CS-specific induced pluripotent stem cells (iPSC) for the study of disease mechanisms

(Cowden 症候群の遺伝子診断及び同疾患由来人工多能性幹細胞 (iPSC) の樹立と同細胞を用いた疾患研究)

主指導教員：岡本 哲治 教授

(応用生命科学部門 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：高田 隆 教授

(基礎生命科学部門 口腔顎顔面病理病態学)

副指導教員：栗原 英見 教授

(応用生命科学部門 歯周病態学)

大林 史誠

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

人工多能性幹細胞 (iPSC) は自己複製能をもち、さまざまな細胞系列へ分化する能力を有しているため、細胞の増殖・分化機構の解明、再生医療への応用、各種疾患の病態解明や創薬及び治療法開発などへの応用が期待されている。Cowden 症候群は口腔及び消化管の多発性腫瘍や皮膚病変を主症状とし、高頻度に乳がんや甲状腺がんを発症する常染色体優性遺伝性疾患であり、がん抑制遺伝子 *Pten* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) の変異が関与していると考えられている。

本研究では、口腔粘膜の多発性腫瘍形成を主訴に広島大学病院顎・口腔外科を受診した患者に対して臨床診断及び遺伝子診断を行い Cowden 症候群の確定診断を行うと共に、同疾患の末梢リンパ球より無血清・無フィーダー細胞培養条件で iPSC を樹立した。さらに、同 iPSC の分化多能性及び *Pten* 遺伝子・蛋白の発現解析を行い、本疾患の病態解明を行った。

## 【方法】

口腔内多発性腫瘍形成を主訴とし、乳がん、甲状腺がんの既往を有する患者 (60 歳女性) は、臨床的に Cowden 症候群が最も疑われたため、末梢血由来 DNA 及び生検パラフィンブロック由来 DNA を用いて遺伝子解析を行った。遺伝子解析には次世代シーケンサー MiSeq を使用し、4813 遺伝子の全エクソンの塩基配列を網羅的に解析した。

患者末梢血リンパ球より iPSC の誘導・樹立を試みた。RD6F に IL-2 を添加した無血清培地にて 6 日間初代培養後、 $1 \times 10^5$  の細胞を laminin 処理 dish (6well-dish) 上に播種し、センダイウィルスベクター-SeVdp (KOSM) 302L を MOI=6 で 2 時間感染させた。iPSC の誘導効率は、alkaline phosphatase (ALP) 陽性コロニー数の誘導時の細胞数に対する比率を算定することで求めた。樹立 iPSC (CS-iPSC) の未分化性及び多分化能を各種未分化マーカー及び分化マーカー遺伝子・タンパクの発現を指標に RT-PCR 法及び蛍光免疫染色法にて検討した。CS-iPSC における *Pten* 及び各種未分化マーカー・分化マーカー遺伝子の絶対発現量を droplet digital PCR (ddPCR) 法で評価すると共に、PTEN、AKT 及びリン酸化 AKT 蛋白の発現を western blot 法にて解析した。また、Bio-Plex 装置を用いて AKT シグナルに関与する蛋白のリン酸化レベルを網羅的に検討した。さらに、CS-iPSC の細胞増殖能への影響を検討するとともに、FGF-2 及び activin A の未分化性に及ぼす影響を ddPCR 法にて検討した。また、bisulfite シークエンス法を用いて *Pten* プロモーター領域のメチル化及び変異について解析を行った。(広島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会承認研究計画：第 58 号)

【結果】 MiSeq 次世代シーケンサーで疾患関連 4813 遺伝子の全エクソンの遺伝子配列

を網羅的に解析した結果、変異は 9354 カ所に存在し、その内アミノ酸置換が示唆される変異は 2751 カ所で、deletion は 231 カ所に認めた。*Pten* 遺伝子領域の塩基配列を 193 回解析した結果、*Pten* の exon 8 の同一アレル内に 1020 番目の塩基 T の欠失 (deletion) (c.1020delT)及び1027番目の塩基GのAへの変異 (c.1027G>A)を認めた。さらに、MTHFR、IL4R、BRCA2、IL7R、HYDIN など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。

末梢リンパ球より無血清・無フィーダー細胞培養条件で CS-iPSC を樹立した。ALP 活性を指標にした iPSC の誘導効率は 0.24%であり、健常人由来 iPSC の誘導効率(0.03%)と比較して有意に高いことが明らかとなった。CS-iPSC は各種未分化マーカーを発現し、未分化性を示すとともに、胚様体培養法により 3 胚葉への分化多能性を有していた。*Pten* 発現及び PTEN 関連シグナル分子の解析結果、健常人由来 iPSC と比較して、*Pten* mRNA、PTEN 蛋白の発現低下、さらにリン酸化 AKT 及び AKT シグナル分子の亢進が示唆された。

*Pten* mRNA の塩基配列及びアレル特異的 PCR 解析の結果、変異アレル由来 mRNA は検出できなかった。そのため、*Pten* プロモーター領域のメチル化及び変異について解析したが、メチル化異常や変異は存在しなかった。一方、exon 7 及び変異を有する exon8 の下流の intron 内に設計した primer (予想サイズ 331bp)を用いて RT-PCR を行ったところ、健常人由来 RNA では検出できない、331bp の遺伝子増幅産物が認められた。塩基配列解析から同産物は変異アレル由来であることが明らかになったことから、CS-iPSC では変異アレル由来 *Pten* RNA は splicing 異常により成熟 mRNA が生成できないため、正常アレル由来 *Pten* の transcript のみが発現する haploinsufficiency(ハプロ不全)が起こっていることが明らかとなり、これが本患者における発症原因である可能性が考えられた。

#### 【結論・考察】

口腔粘膜・消化管粘膜症状及び既往歴から、臨床的に Cowden 症候群が疑われた患者に対して、MiSeq を用いた網羅的遺伝子解析により *Pten* 遺伝子の変異を明らかにし確定診断することができた。今回同定した *Pten* 遺伝子の変異部位は、今まで報告されていない新規の変異であった。さらに、フィーダーフリー・無血清培養条件で同症候群の疾患特異的 CS-iPSC の樹立に成功した。CS-iPSC は未分化性と 3 胚葉への分化多能性を有していた。CS-iPSC を用いた検討から、*Pten* の haploinsufficiency(ハプロ不全)により本症候群が発症していることが強く示唆された。本疾患特異的 iPSC を用いた病態モデルは、本疾患のさらなる病態解明や安全な治療法の開発研究に寄与すると考えられた。