

Title	患者由来iPS細胞を用いた神経線維腫2型における両側聴神経腫瘍発生機序の解明
Sub Title	Elucidation of developmental mechanisms of the bilateral vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2 using patient-derived iPS cells
Author	松崎, 佐栄子(Matsuzaki, Saeko) 大石, 直樹(Ōishi, Naoki)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>遺伝性疾患の疾患iPS研究ではloss of function解析のために遺伝子改変技術により遺伝子変異を修復することで、細胞レベルでの表現形が消失するかを確認する。そのため本研究ではまずiPS細胞樹立予定症例を含めたNF2患者における変異の同定を行った。MRIにて両側聴神経腫瘍を認め臨床的にNF2と診断した患者7例 (男性3例, 女性4例) の末梢血からDNAを抽出し次世代シーケンサーにて遺伝子解析を行い5例がathogenic, 1例がlikely pathogenic, 1例がunknownであった。現在, 遺伝子変異と臨床像の関連を検討中で, 病原性の高い変異症例からiPS細胞を樹立予定である。</p> <p>In the research of hereditary diseases with hiPS cells, repairing gene mutations is in general an indispensable step for confirming phenotypes at the cellular level. Therefore, in this study, we first identified mutations in the NF2 gene before establishing hiPS cells. DNA was extracted from the peripheral blood of 7 patients (3 males and 4 females) who had bilateral acoustic nerve tumors defined by MRI and were clinically diagnosed as NF2. Gene analysis was performed with a next-generation sequencer. Pathogenic variants were found in NF2 gene in 5 cases, likely pathogenic variant in 1 case. We are currently working on establishing patient-derived iPS cells from pathogenic mutant cases with severe symptoms.</p>
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2016~2018 課題番号: 16K20276 研究分野: 遺伝性難聴
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20276seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K20276seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和元年6月6日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20276

研究課題名(和文)患者由来iPS細胞を用いた神経線維腫2型における両側聴神経腫瘍発生機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of developmental mechanisms of the bilateral vestibular schwannoma in neurofibromatosis type 2 using patient-derived iPS cells

研究代表者

松崎 佐栄子(Matsuzaki, Saeko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：70573400

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 遺伝性疾患の疾患iPS研究ではloss of function解析のために遺伝子改変技術により遺伝子変異を修復することで、細胞レベルでの表現形が消失するかを確認する。そのため本研究ではまずiPS細胞樹立予定症例を含めたNF2患者における変異の同定を行った。MRIにて両側聴神経腫瘍を認め臨床的にNF2と診断した患者7例(男性3例, 女性4例)の末梢血からDNAを抽出し次世代シーケンサーにて遺伝子解析を行い5例がpathogenic, 1例がlikely pathogenic, 1例がunknownであった。現在、遺伝子変異と臨床像の関連を検討中で、病原性の高い変異症例からiPS細胞を樹立予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経線維腫症2型の患者由来iPS細胞を樹立するにあたり、まずは末梢血を用いてNF2患者の遺伝子変異の解析を行った。遺伝子変異と実際の臨床像を検討中であり、今回の研究成果により病原性の高い遺伝子変異症例を選択しiPS細胞を樹立することが可能となる。よってより効率的に神経線維腫症2型の病態を解明できると考えられる。

研究成果の概要(英文): In the research of hereditary diseases with hiPS cells, repairing gene mutations is in general an indispensable step for confirming phenotypes at the cellular level. Therefore, in this study, we first identified mutations in the NF2 gene before establishing hiPS cells. DNA was extracted from the peripheral blood of 7 patients (3 males and 4 females) who had bilateral acoustic nerve tumors defined by MRI and were clinically diagnosed as NF2. Gene analysis was performed with a next-generation sequencer. Pathogenic variants were found in NF2 gene in 5 cases, likely pathogenic variant in 1 case. We are currently working on establishing patient-derived iPS cells from pathogenic mutant cases with severe symptoms.

研究分野：遺伝性難聴

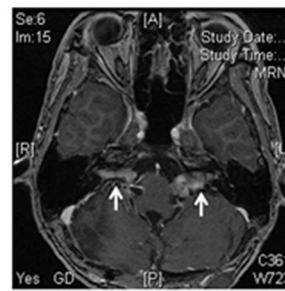
キーワード：神経線維腫症2型 聴神経腫瘍 遺伝性難聴 NF2 iPS細胞 ヒトiPS細胞

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

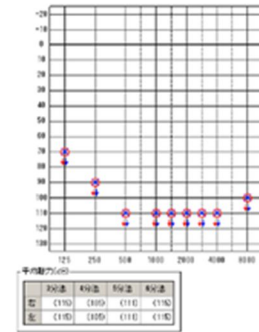
### 1. 研究開始当初の背景

神経線維腫症 (neurofibromatosis) は常染色体優性遺伝形式をとる遺伝性疾患で、神経線維腫症 1 型 (neurofibromatosis type1: NF1, レックリングハウゼン病) と神経線維腫症 2 型 (neurofibromatosis type2: NF2) に分類される。NF2 においてはほとんどの症例で 30 歳までに両側聴神経腫瘍 (vestibular schwannoma 以下 VS) がみられるようになるのが最大の特徴であり、その他の神経系腫瘍 (脳及び脊髄神経鞘腫, 髄膜腫, 脊髄上衣腫) や皮膚病変 (皮下や皮内の末梢神経鞘腫, 色素斑), 眼病変 (若年性白内障) を呈する。両側聴神経腫瘍は両側感音難聴を引き起こし, Quality of life (QOL) を著しく損なう。NF2 の両側聴神経腫瘍に対する治療は手術治療が中心であり, ほかには放射線治療があるが, 現状では手術・放射線いずれの治療法においても腫瘍制御率および聴力温存率は満足できるものではなく, 薬物療法に対する期待が高まっている。創薬に当たっては疾患メカニズムの解明が必須であるが, 2012 年の Children's Tumor Foundation において行われた神経線維腫症 1 型, 2 型に関する大規模な検討の報告書によれば, 海外では全身に神経線維腫が多発するマウスモデルは作成されているものの内耳道内に神経線維腫を発症する動物モデルはいまだ作成されておらず, NF2 においてなぜ高率に両側内耳道腫瘍が発生するのか解明されていないことが大きな課題となっていた。

本邦では平成 10 年 5 月より NF2 が公費対象疾患に指定され, 平成 10 年, 11 年度分の臨床調査個人票の解析結果が報告された。その報告によれば NF2 患者が受診する診療科は, 脳神経外科 86.4% に対し耳鼻咽喉科はわずか 3.9% とされている。NF2 のほとんどの症例において 30 歳までに両側聴神経腫瘍が発症するにも関わらず, NF2 患者の聴覚障害に対し耳鼻咽喉科医の関与が十分ではないことが指摘されている。聴力経過については, 海外においては 2014 年に 6 カ国 10 施設から集められた NF2 患者 120 症例 200 耳において 3 年で 16% の症例に有意な聴力低下がみられることなどが報告されたが, 本邦では臨床統計の報告は少なく, かつ各報告に含まれる症例数が欧米諸国からの報告と比較するとはるかに少ない状況であった。



頭部造影MRI  
両側内耳道内に腫瘍を認める



徐々に聴力が低下し  
両側 聾となっている

NF2の症例: 29歳男性

### 2. 研究の目的

NF2 の病態を検討するにあたり, 適切な動物モデルが存在しないため, NF2 患者由来の疾患特異的 hiPS 細胞を用いて検討を行うこととした。疾患特異的 hiPS 細胞を用いて検討を行うことは, 従来手法では決して明らかにすることができなかった病態を新たに解明することにつながる。慶應義塾大学病院耳鼻咽喉科においては数十年前より聴神経腫瘍の診療に力を入れており, 多数の NF2 症例が通院している。今回は豊富な NF2 症例のうち 3 家系から NF2 変異ヒト iPS 細胞を樹立することとした。

### 3. 研究の方法

NF2 患者由来疾患特異的 hiPS 細胞を樹立し, 両側聴神経腫瘍の病態生理を直接的に検討する。樹立した NF2 患者由来 hiPS 細胞は, 内耳型 (内耳細胞経由) シュワン細胞および中枢型 (神経堤細胞経由) シュワン細胞へ誘導し, マイクロアレイを用いて遺伝子解析を行う。内耳型シュワン細胞と中枢型シュワン細胞に差異が見られれば, その部位が治療ターゲットとなりうると考えられ, 病態が解明されたのちは薬剤スクリーニングを行う。また, 内耳道という「場」が腫瘍化に関わっているかを確認するため, NF2 患者由来疾患特異的 hiPS 細胞から作成したシュワン細胞をマウスおよびラットの内耳道, 頭蓋内, 脊椎に投与し, 部位により腫瘍化に差異があるのかを検討する。

このような遺伝性疾患における疾患 iPS 研究では, loss of function 解析のために, 遺伝子改変技術 (Crispr/Cas9 や TALEN 法) により遺伝子変異を修復することで, 細胞レベルでの表現形が消失するかを確認する。そのため本研究ではまず iPS 細胞樹立予定症例を含めた NF2 患者における変異の同定を行った。

### 4. 研究成果

遺伝性疾患における疾患特異的 iPS 細胞研究では, 患者 iPS 細胞由来疾患細胞の解析と同時にゲノム編集技術で原因遺伝子の変異を修復し, 見つけれられた遺伝子変異以外の原因遺伝子の存在を否定することが可能となる。そのため研究の前段階として対象疾患の遺伝学的解析が必須であり, 本研究でもまずは遺伝子解析から開始した。MRI にて両側聴神経腫瘍を認め臨床的に NF2

# NGS解析結果

症例	性別	変異	mutation	病原性
1	M	586C>T heterozygote	nonsense	pathogenic
2	F	c.1515_1532delinsT heterozygote	frameshift	pathogenic
3	M	586C>T heterozygote	nonsense	pathogenic
4	M	c.407_423dup heterozygote	frameshift	pathogenic
5	F	c.516+1G>A heterozygote	splice site	pathogenic
6	F	357_359del heterozygote	deletion	likely pathogenic
7	F	unknown	unknown	unknown

5 : truncating変異

と診断した患者7例(男性3例,女性4例)の末梢血からDNAを抽出し次世代シーケンサーにて遺伝子解析を行った。5例が pathogenic, 1例が likely pathogenic, 1例が unknownであった。現在, 遺伝子変異と臨床像の関連を検討しており, 今後病原性の高い変異症例から iPS 細胞の樹立を予定している。また, likely pathogenic 変異に分類された例はスプライスサイトの変異で一般的には truncate 変異と考えられるが, 本例の NF2 としての表現形は軽症で発症年齢も遅かった。このような症例で腫瘍細胞における Merlin タンパクの発現を検討するには腫瘍組織を解析すべきだが, NF2 の両側聴神経腫瘍では手術による腫瘍制御率も高くはなく, 腫瘍組織を得る機会は稀で, 実際本例も長い間 MRI での経過観察のみを行っている。遺伝性疾患の病態を解明する際にしばしば行われる細胞株への遺伝子強制発現系を用いた解析は何らかの現象を示唆する情報をもたらす可能性はあるが, スプライシングそのものが細胞種に大きく依存する現象で患者の体内で起きていることを人為的に腫瘍化させ, しかも特に NF2 の検討において聴神経とは異なる細胞株で検討することは, misleading な結果をもたらす可能性がある。今後の本研究ではこのような症例の分子遺伝学的研究に hiPS 細胞技術を用いた細胞レベルでの解析を適応していく予定である。

## 5 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

(1) Schwannoma of the External Auditory Canal as a Part of Schwannomatosis

Acta Oto-Laryngologica Case Reports p 5-9, 2018

Saeko Matsuzaki, Naoki Oishi, Satoko Wakabayashi, Kaoru Ogawa

査読あり

[学会発表](計8件)

(1) EYA4 遺伝子変異4症例から樹立した iPS 細胞由来内耳細胞と難聴の表現型についての検討

松崎 佐栄子, 藤岡 正人, 細谷 誠, 小川 郁

第120回日本耳鼻咽喉科学会総会学術講演会 2019年

(2) 当院の神経線維腫2型症例における NF2 遺伝子の分子遺伝学的検討

野口勝, 藤岡正人, 大石直樹, 吉浜圭祐, 松永達雄, 務台英樹, 奈良清光, 西山崇経, 鈴木成尚, 細谷誠, 松崎佐栄子, 神崎晶, 小川郁

第120回日本耳鼻咽喉科学会 2019年

(3) 当院の神経線維腫症2型症例における NF2 遺伝子の分子遺伝学的検討

野口勝, 藤岡正人, 松永達雄, 大石直樹, 吉浜圭祐, 西山崇経, 鈴木成尚, 細谷誠, 松崎佐栄子, 神崎晶, 森本佑紀奈, 戸田正博, 大平貴之, 吉田一成, 小川郁

第28回日本聴神経腫瘍研究会 2019年

(4) EYA4 遺伝子変異特異的疾患 iPS 細胞の樹立

松崎 佐栄子, 藤岡 正人, 細谷 誠, 小川 郁

第27回日本耳科学会総会・学術講演会 2018年

( 5 ) The localization of PENDRIN aggregation in Pendred syndrome patient specific iPSCs derived outer sulcus cells Tsubasa Saeki; Makoto Hosoya; Takanori Nishiyama; Saeko Matsuzaki; Shinsuke Shibata; Tatsuo Matsunaga; Masato Fujioka; Kaoru Ogawa; Hideyuki Okano ARO 41st MidWinter Meeting Manchester Grand Hyatt San Diego 2018/2/10-15 アメリカ・サンディエゴ

( 6 ) Pendred 症候群疾患特異的 iPS 細胞を用いた in vitro モデルの検討 細谷 誠 , 藤岡 正人, 佐伯 翼, 西山 崇経, 松崎佐栄子, 松永 達雄, 小川 郁 第 76 回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 2017 年

( 7 ) Pendred 症候群疾患特異的 iPS 細胞を用いた in vitro 慢性障害モデルの検討 細谷 誠 , 藤岡 正人, 佐伯 翼, 西山 崇経, 松崎佐栄子, 松永 達雄, 小川 郁 第 27 回日本耳科学会総会・学術講演会 2017 年

( 8 ) 疾患特異的 iPS 細胞を用いた Pendred 症候群の病態解析 佐伯 翼, 細谷誠, 西山崇経, 松崎佐栄子, 松永達雄, 藤岡正人, 小川郁 慶應ライフサイエンスシンポジウム 2017 年

〔図書〕

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：大石 直樹

ローマ字氏名：OISHI, Naoki

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。