

Title	ゲノム編集技術で作出したPTEN機能欠損メダカの薬剤スクリーニングへの応用
Sub Title	PTEN knockout medaka produced by the gene editing technology and its application to screen anticancer drugs
Author	松崎, ゆり子(Matsuzaki, Yuriko)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2018
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2017.)
Abstract	<p>Phosphatase and tensin homolog (PTEN) 遺伝子はヒトおよびマウスの腫瘍において変異が多数報告されている腫瘍抑制因子である。PTEN タンパクはPI3K-AKT 経路のシグナル伝達に拮抗するフォスファターゼとしての機能が多くの報告されているが、近年、核内における機能も明らかになってきた。本研究ではゲノム編集技術 (TALEN) を用いて PTEN 機能欠損メダカを作出し、PTEN 欠損を補う薬剤スクリーニングへの応用を試みた。データベース上の配列から、メダカにもゼブラフィッシュと同様、2つの pten 遺伝子 ptena および ptenb の存在が推測されたため、ptena および ptenb を標的とした TALEN コンストラクトを個別に作製し、16 系統の ptena 変異と 2 系統の ptenb 変異を樹立した。ホモ接合型単一変異個体は、生存可能で妊性もあることが判明したが、pten 二重欠失胚は、受精後 3 日になっても脈管が形成されず、7 日胚で眼球が小さく尾部の発達が不十分となる表現型を示し、孵化前に死亡した。ウェスタンブロット解析を行ったところ、pten 二重欠失胚ではリン酸化 AKT の量比 (pAKT/AKT) は野生型の 4 倍となっており、PI3K 経路のシグナル伝達が亢進していることが示された。また pten 二重欠失胚に PI3 キナーゼの阻害剤 LY294002 を投与すると、pAKT/AKT 比は約 2 分の 1 に減少し、脈管も不完全ではあるが部分的に形成された。PI3K 経路下流の阻害剤 (ラパマイシンおよび N-<math>\alpha</math>-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone) を投与した場合も、二重欠失胚における脈管形成を部分的に回復させることができた。本研究で作製したモデルシステムでは、発生初期の段階で pten 二重欠失胚を野生型胚と容易に区別することができるため、PTEN 機能欠損を緩和する薬剤のスクリーニングに適している。</p> <p>Phosphatase and tensin homolog (PTEN) is a lipid and protein phosphatase that antagonizes signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT signaling pathway. The PTEN gene is a major tumor suppressor, with mutations of this gene occurring frequently in tumors of humans and mice. This study developed mutant medaka deficient in PTEN with the use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) technology. Medaka possesses two pten genes, ptena and ptenb, similar to zebrafish. 16 ptena mutant lines and two ptenb mutant lines were established. Homozygous single pten mutants were found to be viable and fertile. In contrast, pten double-knockout (dko) embryos manifested severe abnormalities in vasculogenesis, eye size, and tail development at 72 hours post fertilization (hpf) and died before hatching. Immunoblot analysis revealed that the ratio of phosphorylated to total forms of AKT (pAKT/AKT) in pten dko embryos was four times that in wild-type embryos, indicative of up-regulation of signaling by the PI3K-AKT pathway. Treatment of pten dko embryos with the PI3K inhibitor LY294002 reduced the pAKT/AKT ratio by about one-half and partially rescued the defect in vasculogenesis. Additional inhibitors of the PI3K-AKT pathway, including rapamycin and N-<math>\alpha</math>-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, also partially restored vasculogenesis in the dko embryos. This model system allows pten dko embryos to be readily distinguished from wild-type embryos at an early stage of development and is suitable for the screening of drugs able to compensate for PTEN deficiency.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170020">http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2017000001-20170020</a>

研究代表者	所属	医学部附属先端医科学研究所	職名	助教	補助額	300 (A) 千円
	氏名	松崎 ゆり子	氏名 (英語)	Yuriko Matsuzaki		
研究課題 (日本語)						
ゲノム編集技術で作出した PTEN 機能欠損メダカの薬剤スクリーニングへの応用						
研究課題 (英訳)						
PTEN knockout medaka produced by the gene editing technology and its application to screen anticancer drugs						
1. 研究成果実績の概要						
<p>Phosphatase and tensin homolog (PTEN)遺伝子はヒトおよびマウスの腫瘍において変異が多数報告されている腫瘍抑制因子である。PTEN タンパクは PI3K-AKT 経路のシグナル伝達に拮抗するフォスファターゼとしての機能が多くの報告されているが、近年、核内における機能も明らかになってきた。本研究ではゲノム編集技術 (TALEN) を用いて PTEN 機能欠損メダカを作出し、PTEN 欠損を補う薬剤スクリーニングへの応用を試みた。データベース上の配列から、メダカにもゼブラフィッシュと同様、2つの pten 遺伝子 ptena および ptenb の存在が推測されたため、ptena および ptenb を標的とした TALEN コンストラクトを個別に作製し、16系統の ptena 変異と2系統の ptenb 変異を樹立した。ホモ接合型単一変異個体は、生存可能で妊性もあることが判明したが、pten 二重欠失胚は、受精後3日になっても脈管が形成されず、7日胚で眼球が小さく尾部の発達が不十分となる表現型を示し、孵化前に死亡した。ウェスタンブロット解析を行ったところ、pten 二重欠失胚ではリン酸化 AKT の量比 (pAKT/AKT) は野生型の4倍となっており、PI3K 経路のシグナル伝達が亢進していることが示された。また pten 二重欠失胚に PI3 キナーゼの阻害剤 LY294002 を投与すると、pAKT/AKT 比は約2分の1に減少し、脈管も不完全ではあるが部分的に形成された。PI3K 経路下流の阻害剤 (ラパマイシンおよび N-<math>\alpha</math>-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone) を投与した場合も、二重欠失胚における脈管形成を部分的に回復させることができた。本研究で作製したモデルシステムでは、発生初期の段階で pten 二重欠失胚を野生型胚と容易に区別することができるため、PTEN 機能欠損を緩和する薬剤のスクリーニングに適している。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>Phosphatase and tensin homolog (PTEN) is a lipid and protein phosphatase that antagonizes signaling by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-AKT signaling pathway. The PTEN gene is a major tumor suppressor, with mutations of this gene occurring frequently in tumors of humans and mice. This study developed mutant medaka deficient in PTEN with the use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) technology. Medaka possesses two pten genes, ptena and ptenb, similar to zebrafish. 16 ptena mutant lines and two ptenb mutant lines were established. Homozygous single pten mutants were found to be viable and fertile. In contrast, pten double-knockout(dko) embryos manifested severe abnormalities in vasculogenesis, eye size, and tail development at 72 hours post fertilization(hpf) and died before hatching. Immunoblot analysis revealed that the ratio of phosphorylated to total forms of AKT (pAKT/AKT) in pten dko embryos was four times that in wild-type embryos, indicative of up-regulation of signaling by the PI3K-AKT pathway. Treatment of pten dko embryos with the PI3K inhibitor LY294002 reduced the pAKT/AKT ratio by about one-half and partially rescued the defect in vasculogenesis. Additional inhibitors of the PI3K-AKT pathway, including rapamycin and N-<math>\alpha</math>-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, also partially restored vasculogenesis in the dko embryos. This model system allows pten dko embryos to be readily distinguished from wild-type embryos at an early stage of development and is suitable for the screening of drugs able to compensate for PTEN deficiency.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
松崎ゆり子	ゲノム編集技術で作出した PTEN 機能欠損メダカの 抗癌剤スクリーニングへの応用	日本癌学会	2017年9月			
松崎ゆり子	TALEN 技術で作出したメダカ PTEN 機能欠損系統の表現型と疾患モデルとしてのスクリーニングへの応用	ゼブラフィッシュ創薬研究会	2017年11月			
松崎ゆり子	Establishment of pten knockout medaka with transcription activator-like effector nucleases (TALENs) as a model of PTEN deficiency disease	PLoS ONE	2017年10月			