

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10180

研究課題名(和文)新しい膵消化管神経内分泌腫瘍分類法の確立とそれに基づいた個別化治療の開発

研究課題名(英文) New criteria of pancreatic neuroendocrine tumors depending on expression levels of transcription factors related to neural and endocrine cell development

研究代表者

吉富 秀幸 (Yoshitomi, Hideyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：60375631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵神経内分泌腫瘍の生物学的特徴を加味した分類の確立を目的とした。神経芽細胞の維持に必要なSox2の発現は46例中、6例で陽性で、5例が神経内分泌癌であり、陰性例に比し腫瘍径が大きく、リンパ節、遠隔転移が高率だった。全例が15ヶ月以内に死亡したが、陰性例の5年生存率は96%と良好であった。細胞株の実験ではSox2の発現抑制によりc-myc, Oct4の発現が低下した。一方、内分泌細胞の分化に必要なPdx1の陽性例は陰性例に比し予後良好であった。Sox2陽性例は幹細胞に近い細胞、Pdx1陽性例は分化した細胞を起源とすることが示唆され、今後、それぞれの発現にあわせた治療の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is elucidate the pathophysiology and tumor biology of pancreatic neuroendocrine tumors (p-NETs). We assessed the expression of transcription factors SOX2 and Pdx1 essential for the normal fetal development of pancreatic neuroendocrine cells in 46 surgically resected p-NETs. SOX2 was positive in 6 of 46 p-NETs. 71% of NEC patients (5 of 7) showed positive for SOX2. SOX2 was specifically expressed in NEC. Patients with SOX2 positive p-NET showed the significantly shorter survival than patients with SOX2 negative p-NET. By experiments using cell line, Sox2 expression has a role to maintain stem cell related factor, c-myc and Oct4. High Pdx1 expression was seen in 25 of 46 p-NET patients. None of the NEC patients showed high Pdx1 expression. The expression patterns of SOX2 and Pdx1 highly correlated with prognosis of p-NETs. These expression patterns may represent the biological and pathophysiological difference of p-NETs and indicate the origin of tumor.

研究分野：消化器外科

キーワード：神経内分泌腫瘍 神経内分泌癌 Sox2 Pdx1 hASH1 NeuroD

1. 研究開始当初の背景

膵や消化管の神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor: NET) は比較的まれな腫瘍であるが、その中には転移・浸潤をきたし、極めて悪性度が高いものも含まれる。加えて、その罹患率は年々上昇しており、欧米に比較し本邦で高いことが知られている。しかし、その治療方針は一定していないのが現状である。このような背景から、近年、これらの腫瘍に対する注目が高まり、本邦や欧米から national database をまとめた報告が相次いでいる (J Clin Oncol 2008;26:3063-, Cancer Science 2014;105:1176-, Am J Surg Pathol 2014;38:437-)。このことは、本邦よりこの疾患に対する治療方針を研究し、発信することの重要性を意味している。

本疾患は、元々 carcinoid と言われるなどその診断基準が曖昧で分類もはっきりなされていなかった。また、腫瘍発生、進展のメカニズムについての分子生物学的機構も十分に明らかにされておらず、治療法の確立も十分にされていない。その分類は 2010 年の WHO 分類 (Bosman FT, et al.: WHO classification of tumors of the digestive system, IARC Press, Lyon, 2010.) が多く使われる。これは核分裂像や Ki-67 index による分類で有り、予後予測には大変有用である。しかし、その腫瘍の生物学的な特徴にのっとったものではなく、治療法の開発に有用かどうかは疑問が残る。特に Ki67 index が 20% を越えるものは neuroendocrine carcinoma (NEC) と言われ、その予後は極めて不良である。

最近、NEC の生物学的な特徴を知ることが目的に、網羅的な遺伝子異常の検索 (Science 2011;331:1199-) の報告がある。また、癌遺伝子の発現により、NEC を分類する試みも報告されている (Am J Surg Pathol 2012;36:173-, J Gastroenterol 2014;e-pub)。北欧を中心とした 305 例の NEC 症例の解析では化学療法の奏率が Ki67 index の 55% を境に大きく変化すると報告もある (Ann Oncol 2013;24:152-)。このような背景から NET は生物学的に異なるサブグループが存在し、それぞれのグループに対する最適な治療法は異なっている可能性がある。腫瘍細胞の生物学的特徴により個別に治療方針を変えていく試みは乳癌のホルモンリセプター発現による分類など、他癌腫ではすでに効果を上げており、今後、NET でもこのような方法を確立する必要がある。

我々はこれまでも NET 発生、進展の分子機構の解明を目指してきた。まず、神経内分泌腫瘍細胞株を用いて本腫瘍細胞にソマトスタチン受容体が発現しており、その中でも SSTR2 及び 5 を介して、ソマトスタチンが増殖に関わるシグナル伝達経路である MAPK 活性を抑制することで、増殖抑制

をもたらすことを発見し、ソマトスタチンの治療応用の可能性を示した (Yoshitomi H et al. Am J Physiol 1997;272:E769-)。現在ではソマトスタチンホモログである octreotide が本疾患の治療に応用されている。また、NEC に特異的な診断マーカーとして、正常神経分化の際の初期段階でごく一過性に発現、作用する神経分化促進転写因子 (Human Achaete-Scute Homologue Gene 1: hASH1) や低分化 NEC において細胞内シグナル伝達経路の Akt/mTOR pathway が活性化していることを見出し、新規治療法への根底となる結果を報告している。

一方、膵内分泌細胞の分化は神経細胞の分化と類似した機構により行われることが知られている。特に、前述した転写因子である NeuroD や ngn3 は原腸細胞から膵内分泌細胞への分化に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、膵の分化の分子機構についての研究も進めており、特に膵原器となる原腸細胞が周囲の間質細胞、特に血管内皮細胞との相互作用により、ptf1a という転写因子を発現することが膵の分化、増殖に重要であることを報告している (Matsumoto K, Yoshitomi H et al. Science 2001;294:559-, Yoshitomi H and Zaret KS Development 2004;131:804-)。しかし、これらの神経細胞や内分泌細胞の分化機構にかかわる因子の膵神経内分泌腫瘍における発現については、全く検討がなされておらず、不明である。

2. 研究の目的

このような背景から、我々は膵内分泌細胞や神経細胞の発生、分化に関わる因子の NET における発現を検討し、その生物学的な意義を探る研究を行うことを発想するに至った。このような検討を通して、最終的には膵・消化管神経内分泌腫瘍の発生、進展の分子機構を解明し、その中でも特に予後不良とされる神経内分泌癌 (neuroendocrine carcinoma: NEC) を中心に新しい治療法を確立することである。

神経内分泌腫瘍の分類は細胞増殖の指標である Ki67 index による WHO 分類が主に使用されるが、この分類法は腫瘍の生物学的な特徴が加味されていない。その中でも特に Ki67 陽性細胞が 20% を越える NEC は予後不良の疾患として知られ、その治療法が確立していない。悪性腫瘍の発生、進展と組織発生の分子機構は類似している点が多い。そこで、本研究では神経内分泌細胞の初期発生に関わる因子の神経内分泌腫瘍における発現を検討し、また、細胞実験を用い、これらの因子の腫瘍における機能を解明、本腫瘍の新しい分類法を提唱してその生物学的特性に沿った効果的な治療法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) NETにおける膵、神経組織発生に関わる因子の発現の検討

膵、神経細胞の組織発生に関わる因子の発現を、外科切除標本を中心とした検体を用いて検討する。対象は当院にて外科切除を行った膵NETの46例とした。2010年のWHO分類に基づき再度分類する。そのうえで、各転写因子の発現を検討する。検討する因子は、原腸から膵芽細胞への分化を誘導し、加えて膵インスリン分泌細胞の維持に必要であるPdx1、膵芽細胞からごく初期の内分泌細胞への分化を誘導し、加えて神経細胞の分化にも必要と言われるNeuroD、神経細胞への分化ごく初期に発現しその分化に重要な役割を持つhASH1、神経前駆細胞の維持に必要で幹細胞の維持に必須なSox2転写因子とした。これらの因子の腫瘍における発現を免疫染色により確認する。その結果を各症例の予後や転移、浸潤の程度、形式との関連、発現ホルモンとの相関を検討する。

(2) 神経内分泌細胞株を使用した各候補因子の腫瘍細胞における機能の検討

以上の検討で絞り込まれた因子が腫瘍細胞でどのような働きをしているかを検討する。細胞として、somatostatin分泌腫瘍細胞であるQGP-1やマウスインスリンノーマから確立したMin6を使用する。これらの細胞におけるPdx1、NeuroD、hASH1、Sox2転写因子の発現を確認し、発現が認められればこれらの因子の発現をsiRNAにより抑制する。このようなsiRNAを利用した各因子の発現抑制により、細胞増殖能、細胞遊走浸潤能への影響を検討する。

4. 研究成果

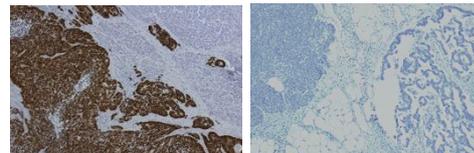
(1) 神経・内分泌発生にかかわる因子の膵NETにおける発現

hASH1: 神経前駆細胞から神経芽細胞への分化にかかわるhASH1の発現を46例のNETにて免疫染色法にて検討した。腫瘍細胞の核の染色が認められた。その発現が中等量以上のものを発現陽性と判断したところ、hASH1陽性例は6例、陰性例は40例であった。これらの各群における全生存期間を検討すると、5年生存率は陽性例で50%、陰性例で91%と有意に陰性例で予後良好であった($P=0.004$)。

NeuroD: NeuroDは神経芽細胞から神経細胞への最終的な分化に必要な転写因子である。その発現を免疫染色法で検討した。hASH1と同様にその発現を検討したところ、陽性例は39例、陰性例は7例であった。その全生存期間を検討すると、5年生存率は高発現症例群で91%、低発現症例群で36%であり、有意に高発現群

で予後が良好であった($P=0.003$)。

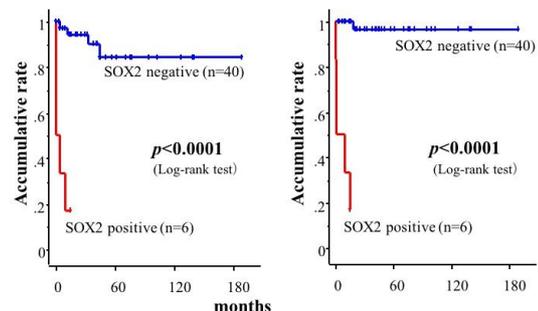
Sox2: 次に神経芽細胞の分化に必要で、これらの細胞の多分化能を維持する働きを持つSox2の発現を免疫染色で検討した。Sox2はiPS細胞を作成する上で重要なYamanaka因子の一つであり、幹細胞の機能を維持する働きがあるとされる。外科切除標本内の神経束における発現を内部コントロールとし、これよりも強く染まる症例を陽性、弱いもしくは染色されない症例を陰性としたところ、陽性例は6例、陰性例は40例であった。



Sox2 陽性

Sox2 陰性

陽性例と陰性例における臨床病理学的因子を比較したところ、陽性例では6例中5例と高率にWHO 2010の分類におけるneuroendocrine carcinoma (NEC)もしくはmixed adenoendocrine carcinoma (MANEC)であった一方、陰性例では40例中2例のみがNECまたはMANECであった($P<0.0001$)。くわえて、陽性例では陰性例に比較してホルモン染色の陽性率

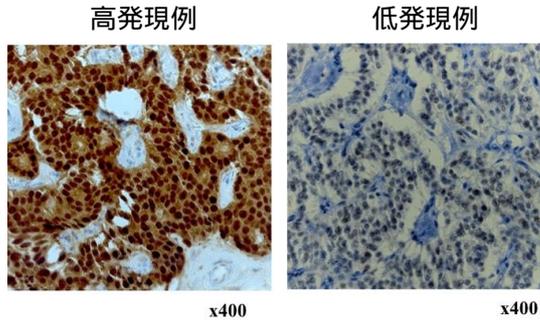


が低く、腫瘍径が大きく、また、リンパ節転移や遠隔転移を持つ症例が有意に多かった。

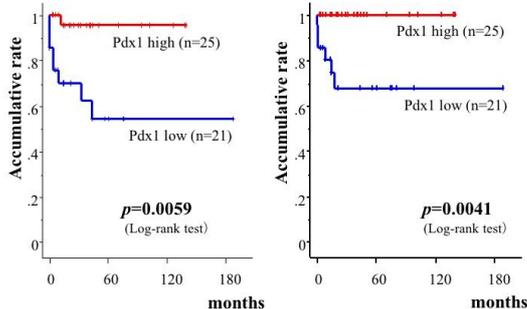
その生存期間を検討すると、Sox2陽性例では全例が15ヶ月以内に死亡していたが、陰性例では5年生存率が96%と極めて陽性例の予後が不良であった。

Pdx1: 次に膵内分泌腫瘍の分化に重要なPdx1転写因子の発現について検討した。Pdx1は原腸細胞から膵芽細胞への誘導に重要な働きを持つ。くわえて、多分化能を持った内分泌細胞がインスリン分泌細胞に分化する際もその発現が増強し、インスリン発現細胞(細胞)におけるインスリン分泌にも重要な役割を果たすとされる。膵NETにおける発現を免疫染色法で検討した。切除標本内のランゲルハンス島内のPdx1発現を内部コントロールとして、それよりも発現が

強い細胞が 50%以上の場合を高発現とし、それ未満を低発現とすると高発現は 25 例、低発現は 21 例であった。



臨床病理学的因子との比較では高発現群では全例が NET G1, G2 であり、NEC, MANEC の症例は認めなかった。一方、低発現群では 21 例中 7 例が NEC または MANEC であった。また、高発現群では低発現群に比較して有意に腫瘍径が小さく、リンパ節転移、遠隔転移例が少なかった。



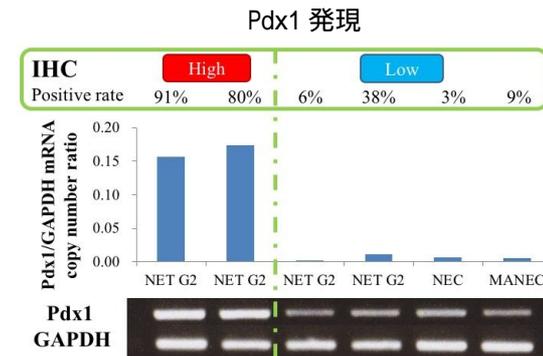
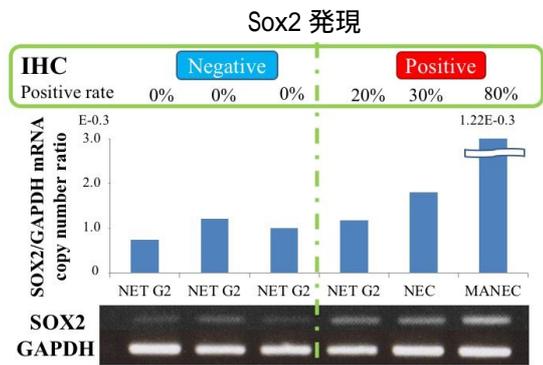
予後の検討では高発現群では観察期間中の死亡例は認めなかったが、低発現群では 5 年生存率は 67%であった。

以上の結果から、神経細胞の発生初期に発現し、神経芽細胞の機能維持に重要な hASH1 と Sox2 の発現は予後が不良であり、また、より低分化な腫瘍と考えられる NEC, MANEC での発現が強く認められた。一方で、神経細胞や膵内分泌細胞の分化に必要な NeuroD や Pdx1 の発現はより分化度の高い NET G1, G2 腫瘍に発現が強く、発現が高い例での予後が良好であった。

それぞれの因子の機能を考慮すると、hASH1 と Sox2 陽性腫瘍はより未熟なもしくは多分化能を持った細胞が腫瘍化したものであり、一方、Pdx1 や NeuroD の高発現例はより分化の進んだ細胞が腫瘍化したものである可能性が示唆され、これらの因子の発現の程度が腫瘍の起源となった細胞を示唆していると考えられた。特に Sox2 はその発現が大半の NEC, MANEC に認められ、高発現例では極めて予後が不良である事から、予後予測因子として有用である事が示された。

(2) EUS-FNA 検体での発現

転写因子の発現が予後予測因子となり、また、その腫瘍起源を示唆する可能性があることから、その発現の程度により最適な治療方針が決定できる可能性がある。すなわち、手術前にその診断が可能であれば、最適な外科切除方法、すなわち、縮小手術にすべきか拡大手術にすべきか、術前に化学療法などの補助療法を加えて治療すべきかといった治療方法の選択に結びつく可能性がある。そこで、本検討に用いた 46 例中、術前の超音波内視鏡下穿刺吸引組織診(EUS-FNA)における凍結標本が利用可能であった 6 例について、組織中の Sox2 および Pdx1 mRNA 発現量を quantitative RT-PCR (q-PCR) にて測定し、その結果と免疫組織染色による発現量とを比較した。



その結果、免疫染色における発現量（各グラフ上段 緑の囲い）と q-PCR の結果は相関を示し、特に Pdx1 の発現は両者の相関がよりはっきりしていた。この結果から術前の EUS-FNA により Sox2 や Pdx1 の腫瘍内発現量を予測することが可能であると考えられた。現在、前向きに本結果を検証する研究を計画中である。

- (3) Sox2 の神経内分泌腫瘍悪性化にかかわる分子機構の解明
免疫染色の結果からは Sox2 が最も腫瘍悪性化にかかわる因子として同定された。そこで、本因子の腫瘍細胞における機能について細胞株を用いて検討した。細胞株としては肝転移およびリンパ節転移を有する膵体尾部 pNEC より分離さ

れた QGP-1 を用いた。まず、Western blot 法により Sox2 の発現を確認すると、QGP-1 は浸潤性膵管癌細胞株よりもその発現は有意に高く、Sox2 が高発現していることが確認された。次に siRNA を用いてその発現を低下させた際にどのような細胞変化が起こるかについて検討した。

まず、細胞増殖における変化を検討したが Sox2 発現抑制によってもその増殖スピードには特に差を認めず、Sox2 は細胞増殖には関与していなかった。

Sox2 は神経芽細胞の多分化能を維持するのに必要であり、また、iPS 細胞樹立に必要な Yamanaka 因子の一つである。このことから、腫瘍細胞においていわゆる癌幹細胞様の働きに関与している可能性が示唆される。そこで、幹細胞の機能維持に関わる Sox2 以外の因子である c-myc, Oct4 の発現の Sox2 発現抑制における変化を q-PCR 法で検討したところ、c-myc mRNA 発現は有意に Sox2 発現抑制によって減少していた。一方、Oct4 発現も抑制されたものの、有意差には至らず、傾向が観察されたのみであった。

以上の結果から、Sox2 は幹細胞の機能維持に必要な因子の発現を調整している可能性が示唆された。今後、多分化能や Sphere 形成能などの幹細胞としての細胞の機能に Sox2 発現が関与しているか、検討する予定である。

以上の結果より、Sox2 および Pdx1 を中心とした神経細胞、内分泌細胞の発生に重要な転写因子の発現は膵神経内分泌腫瘍の起源を推測するために役立つ可能性が示唆された。今後、本研究費の終了後も前向きな検討を含め、Sox2, Pdx1 の発現と治療方法の関連について検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

- (1) Senoo J, Mikata R, Kishimoto T, Hayashi M, Kusakabe Y, Yasui S, Yamato M, Ohyama H, Sugiyama H, Tsuyuguchi T, Yoshitomi H, Ohtsuka M, Maeda H, Ota S, Nakatani Y, Kato N. Innunohisotochemical analysis of IMP3 and p53 expression in endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and resected specimens of pancreatic diseases. *Pancreatology* 2018;18:176-183 査読有
- (2) Suzuki K, Takano S, Yoshitomi H, Nishino H, Kagawa S, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Metadherin promotes metastasis by supporting putative cancer stem cell properties and epithelial plasticity in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2017;8:66098-66111 査読有
- (3) Higashihara T, Yoshitomi H, Nakata Y, Kagawa S, Takano S, Shimizu H, Kato A, Furukawa K, Ohtsuka M, Miyazaki M. Sex determining region Y bos 9 induces chemoresistance in pancreatic cancer cells by induction of putative cancer stem cell characteristics and its high expression predicts poor prognosis. *Pancreas* 2017;46:1296-1304 査読有
- (4) Nishino H, Takano S, Yoshitomi H, Suzuki K, Kagawa S, Shimazaki R, Shimizu H, Furukawa K, Miyazaki M, Ohtsuka M. Granyhead-like 2 (GRHL2) regulates epithelial plasticity in pancreatic cancer progression. *Cancer Med* 2017;6:2686-2696 査読有
- (5) Hijioka S, Hosoda W, Matsuo K, Ueno M, Furukawa M, Yoshitomi H, et al. Rb loss and KRAS mutation are predictors of the response to platinum-based chemotherapy in pancreatic neuroendocrine neoplasm with grade 3: A Japanese multicenter pancreatic NEN-G3 study. *Clin Cancer Res* 2017;23:4625-4632 査読有
- (6) Akiyama T, Shida T, Yoshitomi H, Takano S, Kagawa S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Miyazaki M. Expression of sex determining region Y-Box 2 and pancreatic and duodenal homeobox 1 in pancreatic neuroendocrine tumors. *Pancreas* 2016;45:522-527 査読有
- (7) Nishida T, Yoshitomi H, Takano S, Kagawa S, Shimizu H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Miyazaki M. Low stromal area and high stromal microvessel density predict poor prognosis in pancreatic cancer. *Pancreas* 2016;45:593-600 査読有
- (8) Sogawa K, Takano S, Iida F, Satoh M, Tsuchida S, Kawashima Y, Yoshitomi H, Sanda A, Kodera Y, Takizawa H, Mikata R, Ohtsuka M, Shimizu H, Miyazaki M, Yokosuka O, Nomura F. Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein a-chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br J Cancer* 2016;115:949-956 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1) 賀川真吾、吉富秀幸、古川勝規、高野重紹、大塚将之 ら 膵・神経分化マーカーを用いた転移性 pNET の治療戦略 第 48 回日本膵臓学会大会 2017/7/15 都めっせ (京都府・京都市)
- (2) 賀川真吾、吉富秀幸、古川勝規、高野重紹、宮崎勝、大塚将之 ら 膵・神経分化マーカーを用いた pNET の生物学的分類 第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017/04/29 横浜国際会議場 (神奈川県・横浜市)
- (3) Kagawa S, Yoshitomi H, Akiyama T, Takano S, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Miyazaki M et al. New classification for pancreatic neuroendocrine tumors with sex determining region Y-Box2 and pancreatic and duodenal homeobox 1. 第 47 回日本膵臓学会大会 第 20 回国際膵臓学会 共同開催 2016/08/05 仙台国際センター(宮城県・仙台市)
- (4) 秋山貴洋、吉富秀幸、高野重紹、大塚将之、加藤厚、古川勝規、宮崎勝ら 膵神経内分泌腫瘍における Sox2 および Pdx1 の発現 第 3 回日本神経内分泌腫瘍研究会 学術集会 2015/09/12 仙台市民会館(宮城県・仙台市)
- (5) 秋山貴洋、吉富秀幸、高野重紹、大塚将之、加藤厚、古川勝規、宮崎勝ら PNET の集学的治療 第 46 回日本膵臓学会大会 2015/06/19 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 件)

該当無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当無し

取得状況(計 件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉富 秀幸 (YOSHITOMI, Hideyuki)
千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：60375631

(2) 研究分担者

古川 勝規 (FURUKAWA, Katsunori)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：00400987

高野 重紹 (TAKANO, Shigetsugu)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20436380

宮崎 勝 (MIYAZAKI, Masaru)
国際医療福祉大学・大学病院・教授
研究者番号：70166156

加藤 厚 (KATO, Atsushi)
国際医療福祉大学・医学部・教授
研究者番号：70344984

大塚 将之 (OHTSUKA, Masayuki)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：90334185

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし