

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19537

研究課題名(和文) 種々の神経内分泌腫瘍の統合的な理解に向けたがん抑制遺伝子PHLDA3の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of tumor suppressor PHLDA3 -towards understanding carcinogenesis of neuroendocrine tumors-

研究代表者

山口 陽子 (Yamaguchi, Yohko)

東邦大学・理学部・博士研究員

研究者番号：40738639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：PHLDA3はAktの活性化を抑制し、肺と膵臓の神経内分泌腫瘍(NET)のがん抑制遺伝子として機能する。さらにPHLDA3遺伝子欠損マウスでは、膵ランゲルハンス島(膵島)の過形成など内分泌組織の異常が観察されることから、PHLDA3が様々な器官に生じるNETの抑制に重要であると考えられる。そこで本研究では、PHLDA3の消化管NETにおける重要性を調べる目的で、消化管NET検体を収集し、PHLDA3のLOHを調べた。また、膵NETに見られる、PHLDA3遺伝子欠損による膵島のアポトーシス耐性獲得が、膵島移植へ応用可能であることを明らかにした(PLOS ONE, 2017)。

研究成果の概要(英文)：PHLDA3 functions as a tumor suppressor gene through suppression of Akt in the neuroendocrine tumors (NETs) of lung and pancreas. PHLDA3 gene-deficient mice show abnormality of endocrine tissue such as hyperplasia of pancreatic islets. For these reasons, it is considered that PHLDA3 is important for suppression of NETs occurring in various organs. Therefore, we investigated the importance of PHLDA3 gene in gastrointestinal neuroendocrine tumor (GI-NET) by collecting GI-NET specimens followed by LOH analysis of PHLDA3 gene. In addition, it was revealed that PHLDA3 deficiency improves islets engraftment through the suppression of apoptosis caused by hypoxic damage (PLOS ONE, 2017).

研究分野：分子腫瘍学

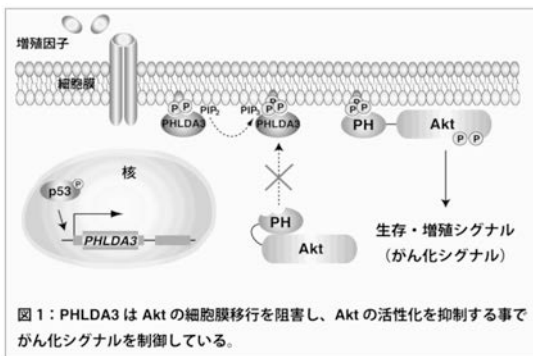
キーワード：p53 Akt 神経内分泌腫瘍

1. 研究開始当初の背景

p53 研究による PHLDA3 の同定

p53 遺伝子は転写因子をコードし、がんの約半数において抑制性的な変異が認められる。また、野生型 p53 を持つがんにおいては、p53 の活性を制御する因子の異常や、p53 標的遺伝子の不活性化が多数報告されている。本研究の対象となる PHLDA3 も p53 標的遺伝子の解析から同定され、がん遺伝子である Akt の抑制機能を持つ事が示されている (Kawase, Ohki* et al., Cell, 2009. *Corresponding author であり本課題の研究協力者)。

PHLDA3 による Akt 抑制機構 (図 1)



Akt は増殖シグナルによって活性化する。Akt は、増殖因子からのシグナルによって生じた細胞膜上の PIP₃ に結合し、活性化する。PHLDA3 は Akt のドミナントネガティブ体として機能し、Akt と PIP₃ との結合を阻害することで Akt 活性化を阻害する。このようにして PHLDA3 は、Akt が担う生存や増殖シグナルを抑制する。

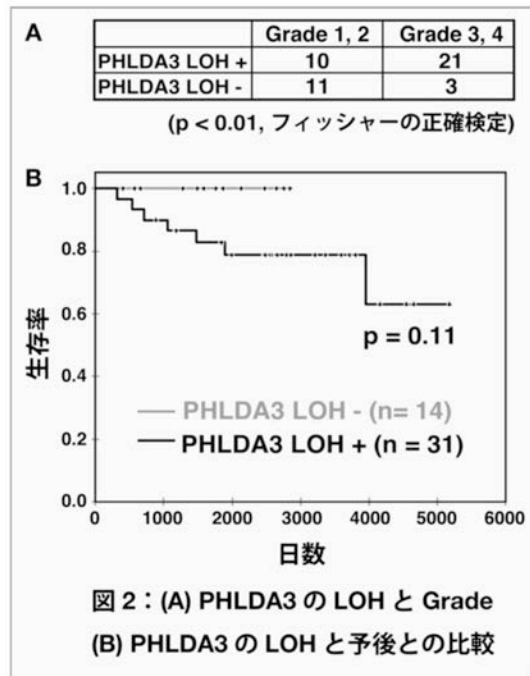
神経内分泌腫瘍 (NET) のがん抑制遺伝子 PHLDA3

NET は神経内分泌形質を持つ細胞から構成され、肺、膵臓、下垂体、消化管、上皮小体、副腎、甲状腺、胸腺などに生じる。しかし、こうした種々の NET に共通の発症機構が存在するかは未だ明らかでない。我々は、ヒト肺がんの NET である大細胞神経内分泌がんとカルチノイド腫瘍、そしてヒト膵 NET において PHLDA3 遺伝子座が高頻度にヘテロ接合性を失っている事 (LOH) を明らかにした (Kawase, Ohki* et al., Cell, 2009, Ohki* et al., PNAS, 2014)。さらに、膵 NET においては PHLDA3 が LOH とプロモーターメチル化のツーヒットによって発現抑制されることから、PHLDA3 が膵 NET の重要ながん抑制遺伝子である事が明らかになっている (Ohki* et al., PNAS, 2014)。また我々が進めている PHLDA3 遺伝子欠損マウスの解析では、膵ランゲルハンス島 (膵島) の過形成などの内分泌組織の異常が観察されることから、PHLDA3 が様々な器官に生じる NET の抑制に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

NET は肺や内分泌器官、消化管などに生じる。我々は PHLDA3 が Akt 機能を抑制し、肺と膵臓の NET においてがん抑制遺伝子として機能することを明らかにした。これらの NET では PHLDA3 が高頻度な LOH を呈し、PHLDA3 の LOH をもつ膵 NET は予後不良であることがわかっている (Cell, 2009, PNAS, 2014, 図 2)。また我々は PHLDA3 遺伝子欠損マウスにおいて、膵臓などの内分泌器官の異常を観察している。

本研究では (1) ヒト消化管 NET 検体における PHLDA3 遺伝子異常の探索および (2) PHLDA3 欠損マウスに生じる異常の分析を行い、種々の NET の発症機構の解明を目指す。



3. 研究の方法

(1) ヒト消化管 NET 検体における PHLDA3 遺伝子異常の探索

(2) PHLDA3 欠損マウスに生じる異常の分析

(3) 培養細胞を用いた PHLDA3 による Akt の阻害機構の解析

上記 (1) - (3) によって、様々な NET の発症機構を解析した。

(4) 膵島移植における PHLDA3 遺伝子欠損の効果の解析。(膵 NET に見られる、PHLDA3 遺伝子欠損による膵島のアポトーシス耐性獲得の膵島移植への応用。)

(5) PHLDA3 と類似した構造を持つ PHLDA1 の Akt 抑制に対する機能の解析

4. 研究成果

(1) ヒト消化管 NET 検体における PHLDA3 遺伝子異常の探索: PHLDA3 欠損マウスでは膵島やある種の内分泌組織の過形成が観察されていることから、PHLDA3 が全身に発生するヒト NET の重要ながん抑制遺伝子であ

ることが推察される。そのため、これまでに調べた肺、膵臓に加え、ヒト NET の半数を占める消化管 NET 検体において PHLDA3 の LOH が起きていないかを調べた。その結果、PHLDA3 の LOH を認めた (未発表)。

(2) PHLDA3 欠損マウスに生じる異常の分析: PHLDA3 欠損マウスでは膵島の過形成と下垂体 NET が観察されている。一方でヒト NET は膵臓以外にも下垂体、肺、上皮小体、副腎、甲状腺、消化管、胸腺など、全身に発生する。本研究では、PHLDA3 欠損マウスにおいて一部の器官に異常を観察した。

(3) 種々の NET には共通の発症機構が存在するのではないかと考え、培養細胞を使用して、PHLDA3 による Akt の阻害機構を詳細に解析した。その結果、PHLDA3 の結合因子として PH3IP (未発表のため分子名は伏せる) を同定した。PH3IP は Akt の活性化に関わる分子であるが、PH3IP による Akt 活性化が PHLDA3 によって抑制されたことから、PHLDA3 による Akt 活性化抑制が、PH3IP の機能の抑制を介している可能性が示された。

次に、PH3IP は PHLDA3 に結合することから、双方が細胞内のどこで相互作用するかを免疫染色で調べた。その結果、PH3IP は PHLDA3 と細胞内小器官に共局在すること、また PH3IP の有無によって PHLDA3 の局在が変化することを見出した (図 3)。現在、PH3IP、PHLDA3 の有無によって Akt の局在が変化するかを調査している。

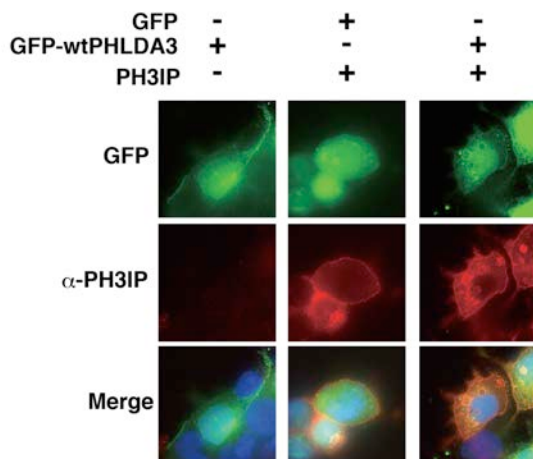


図 3

以上より、PHLDA3 の解析から新たな Akt 抑制機構が明らかになった。また、PH3IP の発現と NET の予後との関連についても報告があることから、研究期間に収集したヒト NET 検体及び PHLDA3 欠損マウスの異常が認められた内分泌器官において、見出した PH3IP の機能的関与を調べるべきである。

(4) 膵島移植における PHLDA3 遺伝子欠損の効果の解析: PHLDA3 遺伝子の欠損は、膵島細胞をアポトーシス耐性にする (PNAS, 2014)。このことから、PHLDA3 遺伝子の欠

損が、膵島移植において問題になる膵島のアポトーシスを解決するのではないかと考えて研究を行った。膵島細胞を死滅させた糖尿病モデルマウスに PHLDA3 欠損膵島を移植したところ、膵島が効率よく定着し、機能した (PLOS ONE, 2017)。

その機構は、移植の際に低酸素状態によって HIF1-alpha が安定化し膵島のアポトーシスを誘導するが、PHLDA3 遺伝子の欠損によって Akt が恒常的に活性化した膵島は移植時にもアポトーシスを起こさないといいものであった (図 4)。

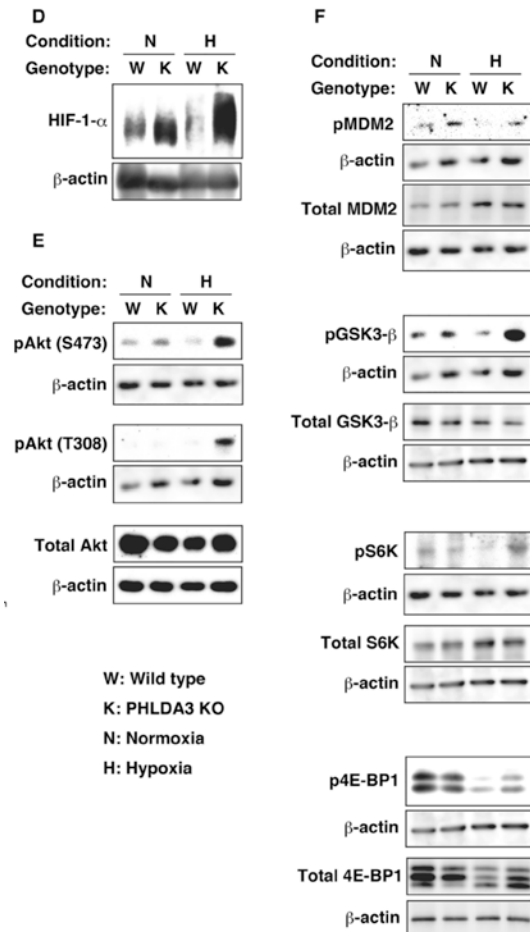


図 4 (Sakata, Yamaguchi. PLOS ONE. 2017. Figure 5 より抜粋)

D. 低酸素状態によって HIF-1-alpha が安定化する。E. PHLDA3 遺伝子を欠損した膵島では Akt 活性化の指標である Akt のリン酸化修飾が亢進する。F. PHLDA3 遺伝子を欠損した膵島では Akt 経路の分子がリン酸化を受け活性化し、活性化 Akt が機能していることがわかる。

(5) PHLDA3 と類似した構造を持つ PHLDA1 の Akt 抑制に対する機能の解析: PHLDA1 は PHLDA3 と類似した構造を持つ。さらに、PHLDA3 と同様に、がん抑制遺伝子 p53 によって発現誘導される (未発表)。このことから、PHLDA3 と同様に、PHLDA1 が DNA 損傷などの細胞ストレスによって誘導され、がん抑制遺伝子 Akt の活性化を阻害するがん抑

制遺伝子として機能するのではないかと考え、解析を行った。その結果、PHLDA1 が DNA 損傷の際に p53 依存的に誘導されること、PHLDA1 が PH ドメインを介して Akt を抑制すること、PHLDA1 が PIP₃ に結合することを明らかにした (未発表)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Sakata Naoaki, Yamaguchi Yohko, Chen Yu, Shimoda Masayuki, Yoshimatsu Gumpei, Unno Michiaki, Sumi Shoichiro, Ohki Rieko. Pleckstrin homology-like domain family A, member 3 (PHLDA3) deficiency improves islets engraftment through the suppression of hypoxic damage. PLOS ONE, 12, e0187927, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187927>. 査読あり。

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山口 陽子、西川 雷羅、陳 好、斎藤 梢、広川 貴次、八田 知久、夏目 徹、永田 喜三郎、大木 理恵子. Akt 抑制因子 PHLDA3 の新規結合分子 PH3IP は Akt 活性を制御する. 第 40 回日本分子生物学会年会. 2017 年.
- ② 山口 陽子、富永 航平、陳 好、峯岸 舞子、山田正三、大木理恵子. がん抑制遺伝子 PHLDA3 の下垂体腺腫における機能喪失性変異の同定と機能. 第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会. 2017 年.
- ③ 富永 航平、西川 雷羅、山口 陽子、永田 喜三郎、大木 理恵子. 様々ながん種におけるがん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能喪失性変異の同定と機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会. 2016 年.

[図書] (計 3 件)

- ① 大木 理恵子, 山口 陽子. 第 I 部: がん治療に求められる基盤的知識 (1) がんの生物学・分子生物学, がん治療認定医教育セミナーテキスト, 第 11 版. pp. 1-7, 2017 (日本がん治療認定医機構).
- ② 大木 理恵子, 山口 陽子. 第 I 部: がん治療に求められる基盤的知識 (1) がんの生物学・分子生物学, がん治療認定医教育セミナーテキスト, 第 10 版. pp. 1-9, 2016 (日本がん治療認定医機構).
- ③ 陳 ヨ, 斎藤 梢, 山口 陽子, 大木理恵子. Akt 抑制遺伝子である PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の新規癌抑制遺伝子である. 胆と膵, Vol. 36 (6) pp. 515-523, 2015 (医学図書出版).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 陽子 (YAMAGUCHI, Yohko)

東邦大学・理学部・博士研究員

研究者番号: 40738639

(4) 研究協力者

大木理恵子 (OHKI, Rieko)

国立がん研究センター・基礎腫瘍学ユニット・主任研究員