

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2021～2023

課題番号：21KK0146

研究課題名（和文）膵神経内分泌腫瘍の分子生物学的特性と転移機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular characteristics and metastatic mechanism of Pancreatic neuroendocrine neoplasm.

研究代表者

伊藤 剛 (Ito, Go)

東京医科歯科大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：20733900

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究グループが有する国内有数の膵神経内分泌腫瘍（pan-NEN）手術検体、オルガノイド培養技術と国際共同研究先ドイツ・キール大学が有する世界トップレベルのハイスループット解析技術を統合しpan-NENの転移・悪性度を規定する因子の探索を行った。pan-NEN膵原発巣、肝転移巣、膵正常部手術検体、同検体から樹立したオルガノイドを用いて、RNA-seqを施行し網羅的遺伝子解析を実施した。各部位の遺伝子発現の比較から転移を規定する候補遺伝子群を同定することに成功している。またキール大学と本学の医学部間国際交流を提携し今後の国際交流発展、後進育成への基盤も築いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により膵神経内分泌腫瘍の悪性度・転移を規定する遺伝子群の同定に成功しており、pan-NENの分子生物学的特性を解明する新たな基盤となる知見が獲得された。またpan-NEN手術検体・オルガノイドバイオバンクの樹立により今後の創薬や新薬の治療効果判定などへと利用可能な解析系の構築も実施している。今後pan-NENの臨床的特性をより正確に反映する新たな分類の作成などpan-NEN診断・治療につながると考えている。また今後のドイツとの学術上の国際交流の基盤を作りさらなる発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this international collaborative study, we aimed to clarify the molecular biological mechanisms that define the metastasis of NEN by using the combination of advanced high throughput technology of the collaborating institution in Germany, and the abundant number of NEN cases and organoid technology of our research group, which is one of the best in Japan. We performed RNA-seq using surgical specimens from primary lesions, liver metastases, normal pancreas tissues, and organoids established from the same specimens. As a results, we identified candidate genes that regulate metastasis by comparing gene expression at each sample. In addition, we established an international exchange agreement between Kiel University and Tokyo medical and dental university, which will lead to the further development of international exchange and collaboration works.

研究分野：消化器病態学

キーワード：膵神経内分泌腫瘍 肝転移 膵オルガノイド 網羅的遺伝子発現解析 RNA-seq

1. 研究開始当初の背景

本邦において膵神経内分泌腫瘍(pan-NEN)は10万人に2.7人が発症し、希少がんの一つに位置付けられてきたが、診断技術の向上により近年患者が増加し続けている代表的な悪性疾患である。本疾患は主に50歳代に発症するが、半数以上がStage II以上の進行期として診断されるため予後不良である。pan-NENはWHO分類(2019年版)では高分化型のNeuroendocrine tumor(NET)と低分化型のNeuroendocrine carcinoma(NEC)に大別されている。NETは増殖能(Ki67 index)に応じて更にG1, G2, G3の3亜型に分類されている。一方、機能の面からはホルモン産生の有無により機能性NEN(インスリノーマ・ガストリノーマ等)と非機能性NENに大別されるが、特に非機能性腫瘍の場合は腫瘍が著しい進展に至るまで全く無症状であり、このため早期発見が極めて困難である。現在pan-NENの根治を目指す際には外科的切除が唯一の治療法となっている。他臓器転移等をきたし、外科的切除の適応外となった際にはソマトスタチンアナログ、mTOR阻害剤、受容体チロシンキナーゼ阻害剤等が選択されているが、いずれも期待できる有効性は極めて限定されており、特にNECは極めて予後不良である。NETは一般に増殖能が低く発育が緩徐とされているが、一方で腫瘍径やWHO分類に関わらずリンパ節・他臓器転移をきたし、NECと同様に予後不良となる。従ってpan-NENに対し真に有効な新規治療を開発するためにはNET・NECの成立・進展を規定する細胞・分子機構やNET・NECの転移を規定するゲノム・エピゲノム因子や責任分子を解明することが必要不可欠であるが、そのいずれも詳細が全く明らかとされていない。

近年分子生物学的な細胞内機構の解明、遺伝子発現パターンの網羅的解析の手法としてRNA-Seqなどのハイスループット解析技術が著しく進展している。しかしながらその高い専門性から、個々の解析対象・疾患に対し独自の解析アルゴリズム・パイプラインを構築するには、適切な経験と実績を有する共同研究機関との連携が不可欠である。そこで本研究はキール大学附属研究所(ICMB, ドイツ)と国際共同研究により行うこととした。ICMBはRNA-Seq等のハイスループット解析技術を用いた臨床検体の解析において世界トップレベルの経験と実績を有し、ドイツ国内外との国際共同研究も多数の実績を有している。例えば最近、COVID-19患者等の臨床検体を高度なハイスループット・シーケンス技術を用いて解析し、重要な成果の獲得に成功している(*NEJM* 2020¹, *Immunity* 2020²)。またRNA-Seq技術を用いた大規模国際共同研究においては国際的にも高く評価される実績を有している。そのため本国際共同研究はICMBにおけるハイスループット解析技術と疾患研究に精通した専任bioinformaticianの支援を得て行うことを計画した。

2. 研究の目的

Pan-NENはWHO分類に関わらず臨床的に「長期に渡り良性の経過を辿る低悪性度腫瘍」と「早期から転移し極めて予後不良な経過を辿る高悪性度腫瘍」に大別されることが経験的に知られている。リンパ節転移・他臓器転移を有する例は有効な治療の選択肢が極めて限定されており、このため最も予後不良である。臨床的経験に沿ったpan-NENの良性・悪性のクラス分類が可能となれば、pan-NEN患者の治療方針選択を大きく変革することが可能である。しかしpan-NENの疾患成立・進展や遠隔転移を規定する分子レベルの病態は全く明らかとされていない。従って、本研究ではpan-NENが如何なる腫瘍細胞により発症・成立・進展するのか、またその過程で如何なる分子機構が介在しているのかという臨床的視点から発想された課題に立脚し、「pan-NENの分子生物学的特性とは何か」またこれに基づく「pan-NENの悪性度・転移の規定要因とは何か」明らかにすることを目的とする。本研究の遂行により、pan-NENの発症・成立・進展・転移における新たな分子制御機構が明らかとなり、これによりpan-NENに対する新規治療の開発と予後の改善に寄与することが可能となるものと考えている。また本国際共同研究を実施することにより今後のICMBとの国際共同研究の発展やキール大学との国際交流の強化も目的とする。人的交流により若手研究者が国際的経験を積む機会を提供し後進の育成を目指すことも本研究の重要な側面と考えている。

3. 研究の方法

本研究では研究グループが有する高度なオルガノイド培養技術、pan-NENのハイボリュームセンターである本学肝胆膵外科が有する国内有数の症例数から得られる生検・手術検体を用いて、pan-NENオルガノイドを作成し解析を行った。解析に際しては世界トップレベルのハイスループット解析技術を有するキール大学附属研究所(ICMB)との共同研究により、臨床検体から大規模データ解析に至る独自の解析パイプラインを構築し、健常部、転移巣、原発巣の手術検体と同部位から樹立したオルガノイドを用いて網羅的遺伝子解析によりその遺伝子発現の特性の比較検討を行った。

4. 研究成果

(1) 膵神経内分泌腫瘍オルガノイドの樹立

オルガノイド培養技術の発展により、多彩な臓器・腫瘍から生体内の分子・細胞特性を忠実に反映した患者由来オルガノイドを *in vitro* 解析に用いることが可能となっている。従来、患者由来組織を用いた解析には手術による切除や生検により得られた臨床検体が用いられて来たが、同検体は腫瘍細胞とは異なる免疫細胞・線維芽細胞等が混在するため、解析対象となる腫瘍細胞に特化する工程・工夫が必要であった。しかしながらオルガノイド培養技術の登場により、例えば腫瘍細胞に適した培養環境を *in vitro* で再現することにより解析対象となる細胞だけを培養・純化し解析に用いることが容易に可能となっている。オルガノイド培養技術は腸上皮オルガノイドの培養法が先行し発展してきたが、膵オルガノイドについても基本技術的には確立されていた(*Nat Protoc* 2016³)。研究代表者らは同技術の一部改変し pan-NEN 原発巣・肝転移巣の手術検体から pan-NEN オルガノイドの樹立・培養法の確立を行なった。機能性 pan-NEN であるインスリノーマから樹立した pan-NEN オルガノイドはインスリンを分泌することを ELISA で確認しており、同オルガノイドは腫瘍の性質を反映することを確認している(図1)。

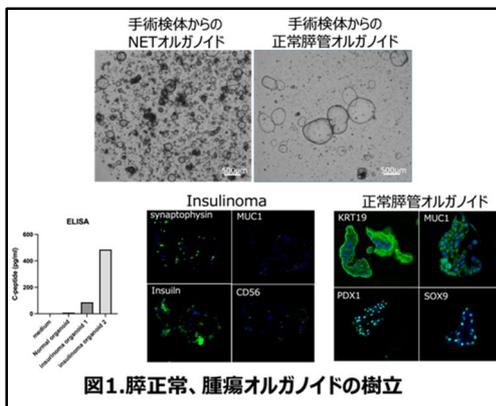


図1.膵正常、腫瘍オルガノイドの樹立

(2) 膵神経内分泌腫瘍オルガノイド・手術検体バイオバンクの樹立

本学肝胆膵外科は pan-NEN のハイボリュームセンターであり、年間 20 例程度の手術件数がある。研究代表者が樹立した pan-NEN オルガノイド培養法を用いて、健常部・原発巣・肝転移巣からの手術検体と、同検体から樹立した pan-NEN オルガノイドを用いて計 100 例程度からなる pan-NEN バイオバンクを樹立した。

手術検体	正常	膵原発巣	肝転移巣
G1	17	26	0
G2	3	9	10
G3	3	3	8
NEC	0	1	1

オルガノイド	正常	膵原発巣	肝転移巣
G1	2	5	1
G2	1	3	0
G3	0	0	0

図2.提出済みの検体

(3) RNA-seq の実施による pan-NEN の遺伝学的特徴

樹立した pan-NEN バイオバンクの中から手術検体 56 例、オルガノイド 12 例を用いて同サンプルから RNA を抽出し本邦において RNA-seq を行った(図2)。得られた raw data は国際共同研究先ドイツ ICMB と共有し、同施設の選任 bioinformatician により解析を行った。解析により QC の coverage 数不足により 3 例が除外となったが、PCA 解析において手術検体では健常部と腫瘍部は区別可能であり、オルガノイドにおいても同様の結果であった。また腫瘍 G1 と G3 は明確に区別可能であった。手術検体と同部位から作成した手術検体の遺伝子発現は概ね相関しておりオルガノイドは作成元の手術検体の性質を概ね反映することが明らかとなった(図3)。

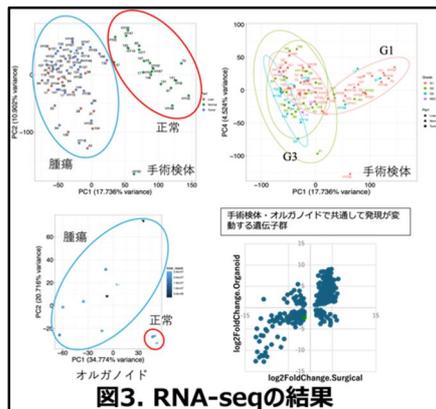


図3. RNA-seqの結果

(4) 膵神経内分泌腫瘍の転移を規定する候補遺伝子の同定

RNA-seq の結果手術検体において健常部と腫瘍部で比較すると腫瘍部で変動が多い遺伝子として 3859 個の遺伝子を同定し、原発巣に比較し転移巣で変動が多い遺伝子として 958 個の遺伝子を同定している。また両比較に共通して変動する遺伝子として 251 個の遺伝子を明らかとしている。オルガノイドにおいても正常部に比較し腫瘍部で発現が変動する遺伝子として 1294 個の遺伝子を認めた(図4)。

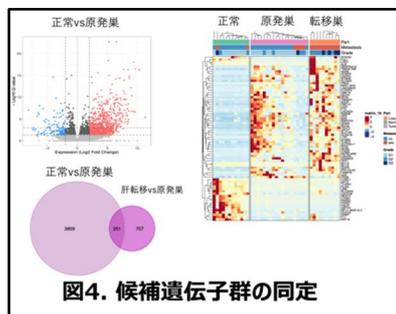


図4. 候補遺伝子群の同定

今後はオルガノイドと手術検体で共通して発現が変動する遺伝子群やそれぞれの遺伝子発現の変動が大きい遺伝子群に特に着目し転移メカニズムとの関連を解析していく。

(5) 国際交流の強化

本助成の目的に若手研究者の国際性の養成と国際共同研究の基盤の強化が挙げられており、本助成の重要な側面であるため本国際共同研究による国際交流の成果を上げる。

当該期間に全世界的に COVID-19 の流行があったため一部交流の制限が生じているが、本学医学部学生 1 名、大学院生 1 名、研究代表者は本国際共同研究先施設に渡独し、研究成果の発表や交流を行っている。国際共同研究先とはオンラインを通じて頻繁にミーティングもを行い研究成果・情報の共有を行った。また、研究代表者が主導しキール大学と本学は国際交流の提携を締結しており、本学の国際化の強化と国際交流の拡大の基盤を構築した。今後人的交流も含め国際交流の活性化に繋がる成果である。

参考文献

1. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. David Ellinghaus et.al. N Engl J Med. 2020 Oct 15;383(16):1522-2534
2. Longitudinal Multi-omics Analyses Identify Responses of Megakaryocytes, Erythroid Cells, and Plasmablasts as Hallmarks of Severe COVID-19
Joana P Bernardes et.al. Immunity 2020 Dec 15;53(6):1296-1314.e9
3. Culture and establishments of self-renewing human and mouse adult liver and pancreas 3D organoids and their genetic manipulation
Laura Broutier et. al. Nat Protoc. 2016 Sep;11(9):1724-43

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watanabe S, Ogasawara N, Kobayashi S, Kirino S, Inoue M, Hiraguri Y, Nagata S, Shimizu H, Ito G, Mizutani T, Nemoto Y, Tsuchiya K, Okamoto R, Watanabe M, Yui S	4. 巻 58
2. 論文標題 Organoids transplantation as a new modality to design epithelial signature to create a membrane-protective sulfomucin-enriched segment	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 379 ~ 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-023-01959-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kobayashi S, Ogasawara N, Watanabe S, Yoneyama Y, Kirino S, Hiraguri Y, Inoue M, Nagata S, Okamoto-Uchida Y, Kofuji S, Shimizu H, Ito G, Mizutani T, Yamauchi S, Kinugasa Y, Kano Y, Nemoto Y, Watanabe M, Tsuchiya K, Nishina H, Okamoto R, Yui S	4. 巻 42
2. 論文標題 Collagen type I-mediated mechanotransduction controls epithelial cell fate conversion during intestinal inflammation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-022-00237-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tamura A, Ito G, Matsuda H, Nibe-Shirakihara Y, Hiraoka Y, Kitagawa S, Hiraguri Y, Nagata S, Aonuma E, Otsubo K, Nemoto Y, Nagaishi T, Watanabe M, Okamoto R, Oshima S	4. 巻 628
2. 論文標題 Zranb1-mutant mice display abnormal colonic mucus production and exacerbation of DSS-induced colitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 147 ~ 154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fazio A, Bordoni D, Kuiper J, Weber-Stiehl S, Stengel ST, Arnold P, Ellinghaus D, Ito G, Tran F, Messner B, Henning A, Bernardes JP, Haesler R, Luzius A, Imm S, Hinrichsen F, Franke A, Huber S, Nikolaus S, Aden K, Schreiber S, Sommer F, Natoli G, Mishra N, Rosenstiel P	4. 巻 13
2. 論文標題 DNA methyltransferase 3A controls intestinal epithelial barrier function and regeneration in the colon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-33844-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Welz L, Kakavand N, Hang X, Laue G, Ito G, Silva MG, Plattner C, Mishra N, Tengen F, Ogris C, Jesinghaus M, Wottawa F, Arnold P, Kaikkonen K, Stengel S, Tran F, Das S, Kaser A, Trajanoski Z, Blumberg R, Roecken C, Saur D, Tschurtschenthaler M, Schreiber S, Rosenstiel P, Aden K	4. 巻 162
2. 論文標題 Epithelial X-Box Binding Protein 1 Coordinates Tumor Protein p53-Driven DNA Damage Responses and Suppression of Intestinal Carcinogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 223 ~ 237.e11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.09.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Zheng T, Ellinghaus D, Juzenas S, Cossais F, Burmeister G, Strege PR, Ito G, Banasik K, Becker T, Hampe J, Hendricks A, Hinz S, Rosenstiel PC, Roecken C, Laudes M, Zeissig S, Zobel M, Zawistowski M, Vacic V, Sazonova O, Noblin ES, Farrugia G, Beyder A, Wedel T, Kahlke V, Schafmayer C, D'Amato M, Franke A	4. 巻 70
2. 論文標題 Genome-wide analysis of 944 133 individuals provides insights into the etiology of haemorrhoidal disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 1538 ~ 1549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-323868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Katsuda H, Ito G, Hiraguri Y, Muto T, Ishido S, Kobayashi M, Yamashita H, Ito A, Ono H, Kudo A, Watanabe M, Tanabe M, Okamoto R
2. 発表標題 Analysis of gene expression to elucidate the pathogenesis of pancreatic solid pseudopapillary neoplasm
3. 学会等名 UEGW2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林正典, 伊藤剛, 山下宏成, 工藤篤, 田邊稔, 岡本隆一
2. 発表標題 膵SPNの病態解明にむけた集学的解析
3. 学会等名 第64回 日本消化器病学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野 宏晃, 村瀬 芳樹, 小川 康介, 伊藤 剛, 浅野 大輔, 石川 喜也, 上田 浩樹, 赤星 径一, 工藤 篤, 田中 真二, 田邊 稔
2. 発表標題 膵臓癌の新規抗がん剤を評価する前臨床試験的な包括的実験モデルの構築
3. 学会等名 第122回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kobayashi S, Ogasawara N, Watanabe S, Ito G, Kano Y, Mizutani T, Shimizu H, Watanabe M, Okamoto R, Yui S
2. 発表標題 Dissection of inflammatory and regenerative signature of intestinal epithelium via in vitro culture recapitulating the repair process
3. 学会等名 DDW 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ogasawara N, Kano Y, Yamauchi S, Kobayashi K, Watanabe S, Ito G, Mizutani T, Shimizu H, Watanabe M, Kinugasa Y, Okamoto R, Yui S
2. 発表標題 Dissection of cancer cell plasticity in a novel defined culture system for human colorectal cancer
3. 学会等名 DDW 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kuribayashi R, Ito G, Mishra N, Hiraguri Y, Katsuda H, Kobayashi M, Muto T, Yamashita H, Kudo A, Tanabe M, Aden K, Rosenstiel P, Watanabe M, Okamoto R
2. 発表標題 Analysis of molecular characteristics and metastatic mechanism of pancreatic neuroendocrine neoplasms
3. 学会等名 International Syscid Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小林 正典 (Kobayashi Masanori) (10825459)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教 (12602)	
研究分担者	工藤 篤 (Kudo Atsushi) (20376734)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授 (12602)	
研究分担者	田邊 稔 (Tanabe Minoru) (50197513)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	岡本 隆一 (Okamoto Ryuichi) (50451935)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	ICMB, Christian Albrecht University		