平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460413

研究課題名(和文) 膵神経内分泌腫瘍におけるプロゲステロン受容体の治療標的としての意義に関する研究

研究課題名(英文) Progesteron Receptor Expression in Pancreatic Neuroendocrine Tumor

研究代表者

笠島 敦子 (KASAJIMA, ATSUKO)

東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：50623005

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)：Progesteron receptor: PRは、膵神経内分泌腫瘍(pancreatic neuroendocrine tumor: PNET)に高率に発現し、良好な予後に関与するが、その機序は解明されていない。PNET組織において、PRサブタイプA(PRA)発現は増殖能および複数の細胞周期関連因子発現と負の相関を示した。さらにPNET培養細胞(QGP1)では、PRA発現が複数の細胞周期関連因子(CCNA2, CCNB1, CDK1, CDK2)発現ならびに細胞周期を抑制することが確認された。PRAが細胞周期の抑制と密に関与することを示し、PNETにおける治療標的となる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Progesteron receptor: PR is frequently expressed in pancreatic neuroendocrine tumor: PNET and is related to a longer prognosis of the patients. However, its mechanism is not clarified. Expression of PR subtype A (PRA) was negatively associated with multiple cell cycle regulators and with proliferative activities in PNET tissues. In addition, expression induced decrease expression of multiple cell cycle related gene (CCNA2, CCNB1, CDK1, CDK2) and inhibited cell cycle in a PNET cell line (QGP1). These results suggested that PRA is closely associated with inhibition of cell cycle and can be a target molecule in treatment for patients with PNET.

研究分野：病理学

キーワード：神経内分泌腫瘍

1. 研究開始当初の背景

性ステロイドホルモン受容体であるプロゲステロン受容体は乳腺、卵巣、子宮など女性生殖器に発生する悪性腫瘍において高率に発現し、その腫瘍増殖に密接に関与するとともに、治療標的として重要な臨床的意義を有する。膵神経内分泌腫瘍では、プロゲステロン受容体が性別に関わらず高率に発現することが報告され、さらにプロゲステロン受容体発現を有する膵神経内分泌腫瘍はプロゲステロン受容体を発現しない腫瘍に比して良好な予後を示すこと示され、プロゲステロン受容体が膵内分泌腫瘍において抗腫瘍効果を有する可能性が示されている (Arnason T et al. Neuroendocrinology 2011, 93:249-25)。一方で、一般的に膵神経内分泌腫瘍の起源と考えられているランゲルハンス島細胞においては、プロゲステロン受容体の発現がインスリン産生の抑制や細胞の増殖抑制に関与していることが示されており、正常ランゲルハンス島細胞においてもプロゲステロン受容体はその増殖や機能に重要な役割を有することが示されている (Zhou R et al. Steroids 2013, 78:987-995)。しかし、プロゲステロン受容体がどのように膵神経内分泌腫瘍の増殖に関与するか全く明らかでない。

2. 研究の目的

プロゲステロン受容体が神経内分泌腫瘍において抗腫瘍効果を示す機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)対象

東北大学病院において1992年から2015年までに外科的切除の施行された膵神経内分泌腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋検体計87症例およびその臨床情報を収集した。パラフィン包埋検体は、ヘマトキシリンエオジン染色標本の他、クロモグラニンA、シナプトフィジン、Ki67の免疫染色を行った上で、2010年に出版されたWHO分類の診断基準に準拠して再評価を行った。腫瘍組織と非腫瘍組織を対比する目的で、他疾患のために切除された非腫瘍性膵組織14症例を使用した。

(2)免疫組織化学法

免疫組織学的に、プロゲステロン受容体サブタイプA (PRA, hPRa7, NeoMarkers, Fremont, Calif., USA), サブタイプB (PRB, hPRa2, NeoMarkers) およびサイクリンD1 (CCND1, Abcam, Tokyo, Japan), A2 (CCNA2, Abcam), B1 (CCNB1, Abcam), B2 (CCNB2, Abcam), サイクリン依存性キナーゼ1 (CDK1, Abcam), サイクリン依存性キナーゼ2 (CDK2, Abcam), E2F1 (Life Technologies,) を染色し定量的に評価した。

(3)培養細胞

神経内分泌腫瘍の4種類の培養細胞 QGP-1 (膵由来) NCL-H727 (肺)、COLO 320DM (大腸)、KRJ-1 (小腸) におけるプロゲステロン受容体

発現をqPCR法によって定量した。

(RT-PCR法、培養細胞のPRA transfection、細胞増殖アッセイ、細胞周期分析方法の詳細については参考文献に記載)

4. 研究成果

患者から摘出された膵神経内分泌腫瘍組織では、PRAが47%、PRBが30%の症例に陽性を示し、このうちPRAの発現頻度は、ランゲルハンス島細胞における陽性率に比して低かった(71%, $p=0.09$, 有意差なし)。また、PRAは臨床的悪性度と相関することが知られているWHO分類で、グレードの低い腫瘍、すなわち悪性度の低い腫瘍組織において高頻度に発現していた($p=0.04$)。さらに、PRA発現は、細胞の増殖能を示すKi67指数と負の相関を示すことが確認された($p=0.02$)。また、細胞周期に促進的に作用するCCND1は、腫瘍組織中において、ランゲルハンス島細胞に比較して発現が高く($p=0.035$) WHO分類でグレード毎に比較した場合、PRAとCCND1の発現動態は相反することが確認された($p<0.05$)。これは、膵神経内分泌腫瘍において、PRA発現が腫瘍組織では正常組織(ランゲルハンス島細胞)に比して低下しさらに、腫瘍組織中では腫瘍細胞の増殖に対して抑制的に作用していることを示す結果といえる。

次に、PRAが細胞周期に関与する機序を調べるために、培養細胞を用い、PRA発現の有無によって、複数の細胞周期関連蛋白の発現、細胞周期関連遺伝子の発現および、細胞周期の解析を行った。まず、4種類の培養細胞におけるPRA、PRB発現の有無を調べた所、膵由来のQGP-1および大腸由来のCOLO 320DMにおいて高いPR発現を認めた。しかし、いずれの細胞株においても、PRBのみを発現し、PRAの発現は確認されなかった(PRA-/PRB+細胞)。そこで、Invitrogen社のLipofectamin試薬を使用し、PRAの強制発現を行い、2つの培養細胞(QGP-1、COLO 320 DM)に、PRA遺伝子を導入し、PRA発現を有する細胞株、PRA+/PRB+細胞を作製した。

PRA-/PRB+細胞とPRA+/PRB+細胞では、プロゲステロンの存在下において、PRA+/PRB+細胞において、PRA-/PRB+細胞に比べて、細胞周期関連因子である、CCND1、c-fos、c-junのmRNA発現が有意に低下した(いずれも $p<0.05$)。また細胞増殖能を定量するために、細胞活性アッセイ(Cell Counting kit-8; Dojindo Inc., Kumamoto, Japan)を用いた実験においても、プロゲステロンの存在下においてPRA+/PRB+細胞ではPRA-/PRB+細胞よりも、有意に細胞活性が低下していた($p=0.03$)。

これらの結果から、プロゲステロン受容体が細胞周期と密接に関連して腫瘍細胞増殖抑制を示すことが明らかとなった。

そこで、細胞周期に関連する複数の遺伝子発現状況を調べるため、82個の主要な細胞周期関連遺伝子を網羅的に解析することがで

きる cell cycle PCR array (QIAGEN, PAHS-020Z) を使用し、PRA+/PRB+細胞および PRA-/PRB+細胞における細胞周期関連遺伝子発現状況を詳細に解析した。この結果、プロゲステロン投与下において、PRA-/PRB+細胞では、CCNA2, CCNB1, CDK1, CDK2 を含む、合計 37 の細胞周期関連遺伝子の発現増加が確認され、反対に PRA+/PRB+細胞においては、30 の細胞周期関連遺伝子の発現抑制が確認された。PRA 発現の有無によって、増加・抑制を示した細胞周期関連因子の多くは、CCNA, CDK であった。

次に、これらの細胞の細胞周期における分布を定量化するために、Tali® Cell Cycle Solution (Invitrogen, Tokyo, Japan) および Tali™ Image-Based Cytometer (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用い、細胞周期の分布が PRA 発現の有無によりどう変化するか調べた。この結果、PRA-/PRB+細胞においては、S 期から G2/M 期への移行が認められたが、PRA+/PRB+細胞においてはこれらの遺伝子発現が低下し、細胞周期の移行が抑制されていることが確認された。

これらの結果は、PRA が細胞増殖に深く関与する細胞周期と密に関与し、細胞周期の抑制を介して膵神経内分泌腫瘍の増殖を抑制していることを示している。PRA が今後の膵神経内分泌腫瘍の治療標的となる可能性を示唆するものと考えられる。

これらの研究成果は下記に示す国際誌、学会等で発表された他、新たに国際誌に投稿中である。さらに、現在は、他臓器に発生する神経内分泌腫瘍の性ステロイドホルモンの発現動態や、ホルモン産生を有する神経内分泌腫瘍における性ステロイドホルモン受容体の関与について、詳細に解析を行っている。

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7件)

Ishida H, Kasajima A, Kamei T. et al(16人中2番目). SOX2 and Rb1 in esophageal small-cell carcinoma: their possible involvement in pathogenesis. Modern Pathology, 査読有, 2017 May;30(5):660-671. doi: 10.1038/modpathol.2016.222.

Ito T, Hijioka S, Masui T, Kasajima A, et al(12人中4番目). Advances in the diagnosis and treatment of pancreatic neuroendocrine neoplasm in Japan. J Gastroenterol, 査読有, 2017 52(1):9-18. doi:10.1007/s00535-016-1250-9.

Kasajima A, Cameselle-Teijeiro J, Loidi L et al(13人中1番目). A Calcitonin Non-producing Neuroendocrine Tumor of the Thyroid Gland. Endocrine Pathology, 査読有,

2016 Dec;27(4):325-331.

Yazdani S, Kasajima A, Ogata H, et al (10人中2番目). Progesterone Receptor Isoforms A and B in Pancreatic Neuroendocrine Tumor Neuroendocrinology. 査読有, 2015;101(4):309-20. doi:10.1159/000381455.

Kasajima A, Fujishima F, Morikawa T et al (13人中1番目). G-cell hyperplasia of the stomach induces ECL-cell proliferation in the pyloric glands in a paracrine manner. Pathology International 査読有, 2015 Mar 2. doi: 10.1111/pin.12276. Kasajima A, Yazdani S, Sasano H. Pathology diagnosis of pancreatic neuroendocrine tumors. Journal of Hepatobiliary Pancreatic Science. 査読有, 2015 Feb 2. doi: 10.1002/jhbp.208.

Yazdani S, Kasajima A, Tamaki K, et al(11人中2番目). Angiogenesis and vascular maturation in neuroendocrine tumors. Human Pathology 査読有, 2014 Apr;45(4):866-74. doi: 10.1016/j.humpath.2013.09.024.

[学会発表](計17件)

岡直美, 笠島敦子, 石田裕嵩, 他(10人中2番目). 手術検体を使用した肺神経内分泌腫瘍の予後規定因子に関する検討 第106回日本病理学会総会 2017年4月26-29日 東京、京王プラザホテル 橘知睦, 笠島敦子, 青木豪, 他(10人中2番目). 膵神経内分泌腫瘍におけるプロゲステロン受容体とホルモン発現の分析 第106回日本病理学会総会 2017年4月26-29日 東京、京王プラザホテル

Kasajima A, Sato S, Tachibana T, et al(8人中1番目). Multiple pancreatic neuroendocrine neoplasms - What pathologists should consider? 10th Asia Pacific IAP congress. 2017.04.24-27. Bali, Indonesia.

Kasajima A, Tachibana T, Ishida H, et al(8人中1番目). Prognosis and Incidence in Pancreatic and Gastrointestinal Neuroendocrine Neoplasms with emphasis on "NET G3": An analysis of 198 cases from Japan. 14th Annual ENETS Conference. 2017.03.09-11. Barcelona, Spain.

Kasajima A, Oka N, Ishida H, et al(11人中1番目). Classification of lung neuroendocrine neoplasms (Lung-NENs) according to WHO2010 for gastroenteropancreatic NENs (GEP-NENs) has prognostic relevance

and includes Lung-NEN G3. 14th Annual ENETS Conference. 2017.03.09-11. Barcelona, Spain.

石田裕嵩, 笠島敦子, 亀井尚, 他(16人中2番目). 食道および肺小細胞癌に共通する免疫組織学的な腺上皮分化 第4回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2016年9月24日, 東京、東京大学伊藤国際学術研究センター

伊藤渉, 笠島敦子, 橘知睦, 他(7人中2番目), 免疫組織化学による Somatostatin receptor (SSTR) の施設・観察者間一致性に関する検討 第4回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2016年9月24日, 東京、東京大学伊藤国際学術研究センター

岡直美, 笠島敦子, 石田裕嵩, 他(10人中2番目). 肺神経内分泌腫瘍 197 症例の臨床病理組織学的検討. 第4回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2016年9月24日, 東京、東京大学伊藤国際学術研究センター

Yazdani S, Kasajima A, Sasano H. Progesterone Receptor Isoform A Inhibits Cyclin B1 Expression in Pancreatic Neuroendocrine Tumor. 第4回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会 2016年9月24日, 東京、東京大学伊藤国際学術研究センター

Yazdani S, Kasajima A, Ito W, et al(4人中2番目). Cyclin A2 and Cyclin-dependent Kinase 1 Upregulation by Progesterone in Pancreatic Neuroendocrine Tumor 第105回日本病理学会総会 2016年5月12-14日 仙台、仙台国際センター

橘知睦, 笠島敦子, 笹野公伸. 主膵管狭窄を来し、ductulo-insular type の組織像を呈したセロトニン産生の膵神経内分泌腫瘍 第105回日本病理学会総会 2016年5月12-14日 仙台、仙台国際センター

笠島敦子, 笹野公伸 若年女性に認められた神経内分泌腫瘍 第89回日本内分泌学会総会, 2016年4月21-23日 京都、国立京都国際会館

Kasajima A, Yazdani S, Tachibana T, et al(12人中1番目). Neuroendocrine neoplasms of the pancreas and the lungs: potential differences in morphological characteristics and cell cycle regulation. 104th USCAP Annual Meeting 2016.03.12-18. Seattle, WA, USA.

Yazdani S, Kasajima A, Sasano H. Profiling of cell cycle pathway genes in pancreatic neuroendocrine tumor cell line after treatment with progesterone. 3rd Congress on Steroid Research 2016.11.15-18, Chicago, USA.

Kasajima A, Sasano H. A case of multiple gastrointestinal endocrine and non-endocrine neoplasms. Asia Pacific international association of Pathology meeting. June 4-7, 2015.

Brisbane, Australia

Yazdani S, Kasajima A, et al (6人中2番目). Progesterone Receptor Isoforms A and B in Pancreatic Neuroendocrine Tumor: Potential Regulators of Cell cycle. ENDO2015. 2015.04.1-4. San Diego, USA.

Kasajima A, Yazdani S, Ogata H, et al(12人中1番目). Progesterone Receptor and Its Synthesizing Enzymes in Pancreatic Neuroendocrine Tumor. 103rd USCAP Annual Meeting 2014.03.1-7. San Diego, CA, USA.

〔図書〕(計2件)

笠島敦子ほか、腫瘍病理鑑別診断アトラス 胆道癌・膵癌 文光堂, 2016, 膵病変 神経内分泌腫瘍, p154-162

笠島敦子ほか、腫瘍病理鑑別診断アトラス 内分泌 文光堂, 2017, 消化管 NET 第1-3部, p14-34

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

笠島 敦子 (KASAJIMA, Atsuko)
東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師
研究者番号: 50623005

(2)連携研究者

笹野 公伸 (SASANO, Hironobu)
東北大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50187142

中村 保宏 (NAKAMURA, Yasuhiro)
東北医科薬科大学・医学部・教授
研究者番号: 80396499

三木 康宏 (MIKI, Yasuhiro)
東北大学・災害科学国際研究所・講師
研究者番号: 50451521