

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19869

研究課題名(和文) 膵内分泌腫瘍におけるDAXX遺伝子の作用解明と薬物治療効果への関係

研究課題名(英文) Mechanism and Relationship for medical treatment of DAXX gene in pancreatic neuroendocrine tumor

研究代表者

青木 豪 (Aoki, Takeshi)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：10636955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DAXX遺伝子の機能解析に先立ち、NETの予後への関連が示唆されているプロゲステロン受容体(PgR)に注目。NETにおいて臨床学的特徴の異なる、機能性腫瘍および非機能性腫瘍におけるPgRおよびインスリン産生能に焦点を絞り、研究を行った。機能性腫瘍の代表格であるインスリノーマでは、非機能性腫瘍とくらべ明らかにPgRの発現率が高いことが確認された。さらに非機能性腫瘍の中でも、免疫組織学的検討によってのみホルモン発現している腫瘍が存在し、これも有意差を持ってPgRの発現率が高いことを示せた。NETをホルモン分泌の種類によって分類することで、PgR発現と、腫瘍の臨床学的特徴を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：At first, I focused on the Progesterone receptor (PgR) which was suggested the relationship to prognosis of pancreatic neuroendocrine tumor (pNET). I studied the relationship between PgR and ability of insulin production in pNET. PgR expression was associated with insulin expression in pNET. PgR showed high expression in the order of Insulinoma, insulin positive non-functional pNET (ins (+) NF) and insulin negative non-functional pNET (ins (-) NF). Insulinoma and ins (+) NF shared common clinical characteristics, morphology and PgR expression status. On the other hand, ins (-) NF might have a unique pathogenesis with little association with PgR expression.

研究分野：膵神経内分泌腫瘍

キーワード：pNET DAXX プロゲステロン受容体 インスリン

## 1. 研究開始当初の背景

膵内分泌腫瘍(Neuroendocrine tumor: NET)は、膵臓の内分泌機能を司る膵ランゲルハンス島由来の腫瘍であり、インスリンなどのホルモン産生が特徴である。組織学的所見に基づき G1, G2, Neuroendocrine cancer (NEC) に分類され、NEC は高頻度に肝転移を認め、予後不良である。

NET は近年増加傾向にあるが、膵癌に比べると比較的稀な疾患であることから、研究は進んでおらず、十分な知見が得られているとは言えない。NET の治療にはオクトレオチド(OCT)が用いられ、申請者は、この腫瘍増殖抑制効果が G1 cell cycle arrest によってもたらされることをインスリンノーマの動物モデルを用いて解明し、報告している (Aoki T, et al. Pancreas 2014)。しかしながらその治療成績は十分とはいえず、NET のより有効な治療法の確立には、さらなる病態の解明と新規治療薬の開発が必要である。

2011 年に米国のジョーンズホプキンス大学のグループにより、NET において高頻度に ATR-X 遺伝子と domain-associated protein (DAXX) 遺伝子に遺伝子変異が認められることが報告された (Jiao Y, et al. Science 2011)。DAXX、ATRX 遺伝子変異が予後良好な因子とされる一方、予後不良例に遺伝子欠損が見られるとの報告もあり (Marinoni I, et al. Gastroenterology 2014)、DAXX と ATRX 変異と予後との関係には一定見解が得られていない。DAXX 遺伝子や ATRX 遺伝子と臨床データとの比較研究は数多いが、その機能解析などの基礎的な研究の報告は少ない。特に肝転移において DAXX 遺伝子、ATRX 遺伝子の関係性は未解明である。NET の肝転移と DAXX 遺伝子との関係を解明することは、DAXX 遺伝子を介し肝転移の進行を抑制するための NET 治療薬の開発、それによって NET の生命予後の改善に寄与するものと考えられる。

申請者のグループでは NET に関する以下の

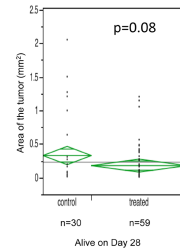
研究を進めてきた。

(1) NET 発症の動物モデルマウスに OCT を投与することで腫瘍が縮小する傾向が見られた (図 1) (Aoki T, et al. Pancreas 2014)。

(2) OCT を有効に作用させるため、微

小気泡性超音波造影剤に OCT を結合させ、超音波照射によりこれを腫瘍に直接作用させる手法を検討中。現在、ポリエチレングリコール(PEG)修飾されたりポソームを作成し、PEG 鎖にオクトレオチドを組み込んだ造影剤を試作した。試作した造影剤のタンパク重量は、OCT が結合した分増加した (未発表)。

図1. オクトレオチド投与による腫瘍径の差



以上の背景とこれまでの研究に基づき、DAXX 遺伝子の NET における機能解析を行い、また NET 肝転移の動物モデルを作成し、DAXX 遺伝子の発現と肝転移の関連を明らかにし、その上で、DAXX 遺伝子の有無により、OCT など NET 治療薬の効果も併せて検討する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、膵神経内分泌腫瘍(NET)において遺伝子変異が高頻度に起こることが報告されている domain-associated protein (DAXX) の増殖能、肝転移能への影響を動物モデルで解析し、また NET に対して臨床的に用いられる各種薬剤への治療効果にどのように関与しているかを明らかにすることである。検討項目としては、(1) NET の動物モデルにおいて DAXX 遺伝子変異が増殖能・浸潤能・転移能における役割を解明すること、(2) DAXX 遺伝子変異の有無が临床上使用されている治療薬の効果に差をもたらすか明らかにすること、(3) さらに NET の肝転移動物モデルを作成し、DAXX 遺伝子の肝転移における役割を明らかにし、その治療経過を超音波診断によって可視化することで治療効果を多角的に評価することの3項目とする。これにより NET の生物学的特徴の变化解明と NET に対するオーダーメイド治療の確立が可能になる。

臨床検体で明らかになってきた DAXX 遺伝子変異の役割を *in vitro*, *in vivo* 双方の実験系で明らかにする。さらに既存の治療薬を用いて治療実験を行うことにより、腫瘍の種類 (DAXX 遺伝子の有無など) による治療効果による影響を解明し、適切な治療薬を選択することが可能となれば、NET の治療成績向上

につながると考えられる。特に本研究では NET の肝転移に着目し、DAXX 遺伝子の存在意義とその薬物治療に対する影響の解明を目指す点に特色があり、これまではない有意義な研究である。一般に肝転移をきたさないような NET は予後良好であるため、本研究は肝転移を主たる治療の対象として位置づけている。

### 3. 研究の方法

この研究計画では、NET の細胞株における DAXX 遺伝子のゲノムレベルでのノックダウンもしくは RNAi を用いたノックダウンを行うことで DAXX ノックダウン NET 細胞株を作成し、その機能を *in vitro*、*in vivo* 双方の実験系で解析する。

NET の肝転移モデルを作成し、OCT などの NET 治療薬を投与し、DAXX 遺伝子の有無が薬剤感受性にどのような影響を及ぼすかを検討する。その際に本学で開発した OCT 結合超音波造影剤を用いて薬物治療実験中の動物の肝腫瘍のサイズを超音波検査でリアルタイムに視覚化することで多角的に評価する。

### 4. 研究成果

本研究は、NET において DAXX 遺伝子などが、腫瘍肝転移時に与える影響、また各種薬剤への治療効果にどのように関与しているかを明らかにすることを主旨として計画された。

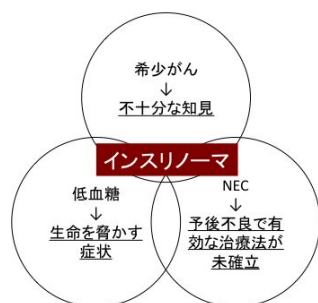
DAXX 遺伝子の機能解析に先立ち、NET の予後への関連性が示唆されているプロゲステロン受容体に注目し、この機能解析を進めた。

DAXX 遺伝子の機能解析に先立ち、NET の予後への関連性が示唆されているプロゲステロン受容体に注目。

NET において臨床学的特徴の異なる、機能性腫瘍および非機能性腫瘍におけるプロゲステロン受容体およびインスリン産生能に焦点を絞り、関連性を明らかにすべく、研究

を行った(図 1)。インスリノーマは比較的予後良好な機能性腫瘍であるが、肝転移をきたす症例も存在し、この場合低血糖発作により患者の生命を脅かすのみならず、切除不能となった場合、肝転移巣の増大をきたすこともある。また、非機能性腫瘍の中には、臨床症

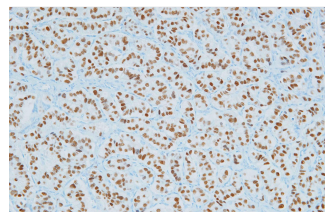
図1. インスリノーマを取り巻く背景



状を認めないものの、免疫染色によってペプチドホルモンの存在が確認されるものも存在する。

当院の pNET 症例 91 例の切除標本に免疫染色を行い

図2. インスリノーマのプロゲステロン受容体染色



(図 2)、プロゲステロン受容体の発現程度を検討した。その結果、機能性 (ホルモン産生) 腫瘍の代表格であるインスリノーマでは、非機能性腫瘍とくらべ明らかにプロゲステロン受容体の発現率が高いことが確認された。さらに非機能性腫瘍の中でも、免疫組織学的検討によってのみホルモン発現している腫瘍が存在し、インスリノーマほどではないものの、全くホルモン発現していない非機能性腫瘍と比べると、有意差を持ってプロゲステロン受容体の発現率が高いことを示した。また臨床学的検討を加えたところ、プロゲステロン受容体陽性群では陰性群と比較して平均腫瘍サイズが小さく ( $p=0.01$ )、遠隔転移の頻度が低く ( $p=0.03$ )、臨床病期 (ENETS TNM Stage) が早期であり ( $p=0.03$ )、WHO2010 Grade が低く ( $p=0.01$ )、生存率が高い ( $p=0.01$ ) ことが判った。

正常隣組織での検討も行ったところ、細胞におけるプロゲステロン受容体発現率は 71.6%であった。またプロゲステロン受容体陽性細胞におけるインスリン発現率は 78%であった。いずれも男女間で陽性率に差は認めず、閉経前後においてもプロゲステロン受容体の陽性率に差が認められないことが確認された。

NET をホルモン分泌の種類によって分類することで、プロゲステロン受容体の発現と、腫瘍の臨床学的特徴を明らかにすることができた。

今後、インスリノーマ以外の機能性腫瘍 (グルカゴノーマやソマトスタチノーマなど) においても同様に免疫染色をおこなっていく。

プロインスリンや、グルカゴン、ソマトスタチンなどのペプチドホルモンと、プロゲステ

ロン受容体発現の関連を検討していく予定である。これにより NET の発生、ランゲルハンス島の発生に関し、新たな知見が得られるのではないかと考えている。

#### 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 1 件)

青木豪、同時性肝転移を有する膵神経内分泌腫瘍の治療、手術(金原出版株式会社)、査読なし、vol.71 No.1 January 2017、87-92

〔学会発表〕(計 3 件)

Takeshi Aoki、40<sup>th</sup> World Congress of the International College of Surgeons、Optimal range of the lymph node dissection in the Surgery for pancreatic neuroendocrine tumor、2016 年 10 月 23 日、国立京都国際会館(京都)  
青木豪、第 71 回日本消化器外科学会総会、膵インスリノーマ 35 症例の検討～肝転移をきたす症例の特徴～、2016 年 7 月 14 日、あわぎんホール(徳島)  
青木豪、第 116 回日本外科学会定期学術集会、転移を有する膵神経内分泌腫瘍の臨床病理学的性質、2016 年 4 月 14 日、大阪国際会議場(大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

青木 豪 (AOKI, TAKESHI)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号：10636955

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

坂田 直昭 (SAKATA, NAOAKI)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号：50431565