

令和元年6月17日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07378

研究課題名(和文) 神経内分泌腫瘍におけるPHLDA3のがん抑制機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of PHLDA3 in neuroendocrine tumor

研究代表者

滝川 雅大 (TAKIKAWA, Masahiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：80807834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに膵臓と肺の神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor; NET)において、p53標的遺伝子であるPHLDA3が高頻度なヘテロ接合性の喪失(LOH)を起こしていることを発見してきた(Cell 2009, PNAS 2014)。このようなPHLDA3遺伝子の異常は全身の臓器で発症するNETで共通して起きていると考え、様々な臨床検体の解析と、NETモデルマウスの作出・解析を行った。さらに、PHLDA3のファミリー遺伝子であるPHLDA1の機能解析を行ったところ、PHLDA3と同様に、AktによるPIPsの競合阻害によって細胞増殖抑制能を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor; NET)は、毎年の発症率が10万人あたり6人未満の希少がんであり、サンプルの収集が困難であることから研究が遅れていた。神経内分泌細胞は全身の諸臓器に分布していることが知られている。肺と膵臓のNETで高頻度な遺伝子異常を示したPHLDA3が、全身の神経内分泌腫瘍に関連する可能性を明らかにすることで、現在使用されている抗がん剤の適応拡大や、NET悪性化の診断に基盤的な知見を得ることが期待できる。また、がん抑制遺伝子PHLDA3と同様の働きを示すPHLDA1の機能を明らかにし、がん悪性化メカニズムの解明を行った。

研究成果の概要(英文)：PHLDA3 is a target gene of p53. Inactivation of PHLDA3 by loss of heterozygosity (LOH) in PHLDA3 locus is frequently observed in pancreatic and lung neuroendocrine tumors (NETs) (Cell 2009, PNAS 2014). We hypothesized that neuroendocrine tumors arisen in every organ might harbor genetic alterations in PHLDA3. To investigate the relationship between PHLDA3 alterations and cancer malignancy, we collected several kinds of clinical samples and constructed NET model mice.

We found that PHLDA1, another PHLDA family gene, acts as a repressor for cell proliferation via competitive interaction to PIPs leading to Akt inhibition.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経内分泌腫瘍 p53 PHLDA3遺伝子 PHLDA1遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの神経内分泌腫瘍(neuroendocrine tumor; NET) は神経内分泌細胞に由来する腫瘍である。神経内分泌細胞は近年、各種ホルモンを分泌する内分泌臓器のみでなく全身にdiffuse neuroendocrine systemとして分布することが確認され、NETも全身諸臓器に発生することが知られてきている。NETは、膵臓のほか下垂体、上皮小体、副腎、甲状腺、消化管、胸腺、肺などに生じることが知られている。しかしながら腫瘍発生機序は十分に解明されておらず、分子標的治療薬の開発もほとんど進んでいないのが現状である。その理由の一端は、各臓器に発症するNETが希少がん(毎年の病気の発症率が人口10万人あたり6人未満)であるために、サンプルの収集が難しいことやモデルマウスの開発が遅れていることが挙げられる。我々はこれまでに、p53標的遺伝子の解析によってPHLDA3を同定し、機能未知であったPHLDA3遺伝子が、新規のAkt抑制因子である事を明らかにした。また、ヒトの膵NETにおいて、PHLDA3遺伝子座は、約70%と高頻度にヘテロ接合性の喪失(loss of heterozygosity; 以下LOH)を呈すること、LOHに加えてDNAメチル化という2 hitによって不活化されていることを明らかにした。これらの事実から、PHLDA3遺伝子は膵NETの新規がん抑制遺伝子である事が示された。同様に、膵臓に加え、肺のNETにおいてもPHLDA3遺伝子に高頻度のゲノム異常が確認された。さらに、PHLDA3欠損マウスでは膵島の過形成や、いくつかの組織の神経内分泌細胞の異常増殖と腫瘍が高頻度で発生することを明らかにした(PNAS, 2014)。これらの結果から、我々は、PHLDA3が様々な臓器に発症するNET共通のがん抑制遺伝子であり、PHLDA3によるAkt経路の抑制がNET抑制において中心的な役割を持つと考えている。

2. 研究の目的

以下の3点について、分子レベルでの検討を行う。

- (1) 全身でのNET発症におけるPHLDA3遺伝子変異の影響
- (2) マウスを用いたPHLDA3のin vivo解析
- (3) PHLDA3ファミリー遺伝子の、PHLDA1の機能解析

3. 研究の方法

- (1) 臨床医との連携の元、様々な臓器由来のNET臨床サンプルを解析した。膵臓や肺のNETで高頻度に見られたLOHの有無を確認することと、その他のがん関連遺伝子の変異解析の検討も行った。
- (2) PHLDA3ノックアウトマウスを樹立し、NET発症マウスの発がん試験を行った。
- (3) PHLDA1の分子生物学的な機能解析を行い、PHLDA3との差異を明らかにした。

4. 研究成果

- (1) 各種全身の諸臓器から発症したNET臨床サンプルを用いてPHLDA3の遺伝的な変異解析を行った。PHLDA3に関する総説を執筆し、受理・掲載された(Cancer Sci. 2017)。

(2) NET 発症マウスとして PHLDA3 と様々なマウスの掛け合わせを行い、全身に発症する NET の解析を行った。

(3) 最も有名ながん抑制遺伝子 p53 は転写因子であり、PHLDA3 はその標的遺伝子として転写活性化が行われる。細胞増殖シグナルの活性化を司る Akt は細胞膜上で PIP3 と結合することで活性化されるが、PHLDA3 はその PIP3 に競合的に結合することで Akt の活性化を抑制していることが明らかになっている。そこで、ファミリー遺伝子である PHLDA1 でも同様の働きを示すか、もしくは全く異なる機能を持つかを明らかにした。その結果、PHLDA1 は p53 依存的に転写が活性化され、タンパク質レベルでの発現量が増加することが明らかになり、細胞増殖抑制的な働きをすることが明らかになった。また、PHLDA1 は翻訳開始となるメチオニンを二つ持ち、short form と long form の二つの isoform が発現しうることが予想されていた。これまでの報告では long form が dominant であると考えられてきたが、実際に long form PHLDA1 と short form PHLDA1 を発現するベクターを構築し、293T 細胞内で過剰発現させて、HeLa, HCT116, MDA-MB-231, OE33, SK-MEL-28, BXP-3, ACHN などの細胞株から発現された内在性の PHLDA1 と比較を行った。western blot の結果から、いずれの細胞株から発現される PHLDA1 も short form PHLDA1 と同じ泳動度を示すことが確認された。この結果から、short form PHLDA1 が dominant に働いていると推定された。この結果を受けて、様々な細胞内で short form と long form の PHLDA1 を発現させたところ、いずれの isoform も Akt の活性化が抑制されることが明らかになった。また、PHLDA1 は細胞膜に局在し、PIPs にも結合することも明らかになった。PHLDA1 の一連の解析から得られた結果は、PHLDA3 が PIPs に結合することで細胞膜に局在し、Akt の活性化を抑制している、という結果と一致する。すなわち、PHLDA1 は PHLDA ファミリー遺伝子であり、その機能は PHLDA3 に非常に近いことから、がん抑制遺伝子であると考えられる。上記内容について論文としてまとめたものが受理・掲載された (Cancer Sci. 2018)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

原著論文

1. Yu Chen*, Masahiro Takikawa*, Shuichi Tsutsumi, Yoko Yamaguchi, Atsushi Okabe, Mayuna Shimada, Tatsuya Kawase, Akane Sada, Issei Ezawa, Yuhei Takano, Kisaburo Nagata, Yutaka Suzuki, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, and Rieko Ohki.
"PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt." *Cancer Science*. Wiley Publishing Asia, 109(11): 3532-3542. 2018 Nov. *equal contribution

総説

2. Masahiro Takikawa and Rieko Ohki

"A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors." *Cancer Science*. Wiley Publishing Asia, 108(6):1101-1108. 2017 Jun.

〔学会発表〕(計 1 件)

ポスター発表

1. 滝川雅大、石川冬木、大木理恵子

" Identification of novel receptors for secreting protein p53PAD7 that triggers inhibition of cell proliferation " 第 77 回 日本癌学会学術総会、大阪、2018 年 9 月 28 日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/fundamental_oncology/project/020/index.html

6 . 研究組織

1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。