

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03523

研究課題名(和文) がん抑制遺伝子PHLDA3による臓器を超えた神経内分泌腫瘍抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism of neuroendocrine tumor suppression by the tumor suppressor gene PHLDA3

研究代表者

大木 理恵子 (Ohki, Rieko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・独立ユニット長

研究者番号：70356252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：さまざまな臓器に発生する神経内分泌腫瘍(NET)は希少がんである。2011年には膵NETの全エクソーム配列が解析され、それ以降、下垂体や肺NETのゲノム解析も報告されたが、代表的ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常はほとんどなく、未だ腫瘍発生機序は十分に解明されていない。NET発症メカニズムを解明し、その知見に基づく有効な治療法や予防法の確立が望まれている。本研究によって、PHLDA3による臓器を超えたNET共通のがん化制御経路が存在すること、NET共通の発症・悪性化のメカニズムを世界に先駆けて解明することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NETという全身に分布する神経内分泌系の細胞から発生する希少がんがある。最近30年間に、NET患者の総数が5倍以上に増加したとされており、世界レベルでNET患者が増加している。また、日本のNET患者は米国の3倍であるという報告もあり、特に日本で研究すべき疾患である。いずれの臓器のNETも希少がんであり、NET症例の収集には多大な努力を要する。応募者らは症例を収集し、膵臓、肺、下垂体NETのゲノム解析を進めた。本研究によって、様々な臓器に発生するNETを統合して扱うことができるようになる可能性が高いため、NETの研究開発が大きく推進し、新規診断・治療法の開発に結びつくと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Neuroendocrine tumors (NETs), which occur in various organs, are rare cancers. In 2011, the complete exome sequencing of pancreatic NETs was analyzed, and since then, genomic analyses of pituitary and lung NETs have also been reported. However, there are few abnormalities in representative cancer genes or tumor suppressor genes, and the mechanisms underlying tumor development are still not fully understood. It is hoped that by elucidating the mechanisms of NET development and gaining insights from this knowledge, effective treatments and preventive measures can be established. This study has revealed the existence of a common cancer control pathway mediated by PHLDA3 that extends beyond organs and sheds light on the shared mechanisms of NET development and malignancy, leading the world in understanding these aspects.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん 神経内分泌腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 希少がんである NET の研究は困難かつ喫緊の課題

毎年の病気の発生率が人口 10 万人あたり 6 人未満と規定される希少がんの研究は、5 大がんと比較し大きな遅れを取っている。希少がんの 1 つに NET (NeuroEndocrine Tumor) という全身に分布する神経内分泌系の細胞から発生するがんがある。肺または膵、消化管において最も頻繁に認められるが、肺、下垂体、甲状腺、副腎、卵巣、および精巣などにも見つかる。いずれの臓器の NET も希少がんであり、NET 症例の収集には多大な努力を要する。応募者らを含む研究グループが症例を収集し、膵臓、肺、下垂体 NET のゲノム解析を進めた結果、これらの NET では代表的ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の機能異常がないことが示された。一方で NET 発症は応募者らが同定した PHLDA3 を始めとした NET 独特のがん関連遺伝子により制御されており、NET の発生機序は他のがん種とは大きく異なることが判明してきた。しかし、未だに NET の適切なモデル動物や細胞株がないため、NET 研究は困難であり、腫瘍発生機序が十分に解明されていない。2008 年の米国からの発表では、最近 30 年間に、NET 患者の総数が 5 倍以上に増加したとされており、世界レベルで NET 患者が増加している。また、日本の膵 NET 患者は米国の 3 倍であるという報告もあり、特に日本で研究すべき疾患である。

(2) Akt 抑制因子をコードする PHLDA3 は膵 NET のがん抑制遺伝子

応募者はこれまでに、がん抑制において中心的な役割を果たす、がん抑制遺伝子 p53 の機能解析を進めてきた (Cell, 2009, Science, 2000 他)。応募者らは、p53 標的遺伝子として PHLDA3 遺伝子を同定し、機能未知であった PHLDA3 が、新規の Akt 抑制因子である事を明らかにした (Cell, 2009)。また、PHLDA3 遺伝子座は、約 70%と高頻度のヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity; 以下 LOH) とメチル化という 2 hit によって不活化されていることを明らかにした (PNAS, 2014)。このことから、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。また、膵臓に加え、肺・大腸などの NET においても PHLDA3 遺伝子の高頻度のゲノム異常が示された (Scientific reports, 2019, 未発表データ)。さらに、PHLDA3 遺伝子異常と患者の予後・がんの悪性度との関連を、膵 NET 症例を用いて解析したところ、PHLDA3 機能が失われている患者の予後は不良で、がんの悪性度が高いことが示された。膵 NET だけではなく、大腸などの NET においても preliminary ではあるが、同様に PHLDA3 機能喪失とがん悪性化が関連するという結果が得られている。これらの事から、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 抑制が NET 抑制、特に悪性化の抑制において中心的な役割を持つと考え研究を進めている。

(3) 様々な臓器の NET の前がん病変、悪性 NET 発症マウスモデルの確立

応募者らは、PHLDA3 欠損マウスでは、膵島過形成など、いくつかの組織の神経内分泌細胞の前がん病変と悪性度の低い腫瘍が高頻度で発生する事を明らかにした (PNAS, 2014, Plos One, 2017, 未発表データ)。一方、多発性内分泌腫瘍症の原因遺伝子であり、PHLDA3 同様に NET のがん抑制遺伝子である MEN1 欠損マウスも膵島過形成と悪性度の低い下垂体 NET を発症する。さらに、肺 NET のがん抑制遺伝子として知られるがん抑制遺伝子 RB 欠損マウスは悪性度の低い甲状腺と下垂体 NET を発症する。しかし、いずれのマウスモデルも NET の発症には 1 年以上の時間を要する上に悪性度の高い NET は発症しない。そこで、応募者は、より早期に悪性度の高い NET を発症するマウスモデルを作製するため、PHLDA3 欠損マウスと MEN1 あるいは RB との二重欠損マウスを作製したところ、これらの二重欠損マウスは、6 ヶ月以内にほぼ全ての個体が膵臓・下垂体・甲状腺に悪性の NET を発症することが明らかになった。このように応募者らはヒト NET ゲノム異常を模倣する新規の膵臓・下垂体・甲状腺 NET マウスモデルの樹立に成功した。

2. 研究の目的

これまでの応募者の研究によって以下のことが明らかになっている：

ヒト膵臓などの NET 症例解析の結果、これらの NET では代表的ながん関連遺伝子の異常は認められず、NET の発生機序は他のがん種とは大きく異なると予測された。

ヒト肺・膵臓・直腸などの NET 症例解析の結果、これらの NET で PHLDA3 遺伝子の高頻度 (40~70%) の異常が認められる。

ヒト NET 症例では、NET の悪性化と PHLDA3 遺伝子異常が関連する。

PHLDA3 欠損マウスでは、いくつかの組織の神経内分泌細胞の前がん病変や悪性度の低い NET が高頻度で発生する。

以上のことから、応募者は、発生する臓器は違っていても神経内分泌細胞に由来する NET には

共通のがん化・悪性の経路があり、PHLDA3 がその経路を抑制することで NET 共通のがん抑制遺伝子として機能している、と考えている。さらには、臨床研究から悪性 NET には Akt 経路阻害剤であるエベロリムスが著効することが明らかになっており、NET 悪性化には Akt 経路が重要な役割を果たすことが示唆されている。そこで、応募者は、PHLDA3 が Akt 抑制因子であることから、NET では PHLDA3 機能が失われることで Akt が異常に活性化し、その結果として神経内分泌細胞の分化異常を伴ったがん化・未分化あるいは幹細胞的な性質の獲得が起こり、NET 発症と悪性化に繋がるのではないかと仮説を立てた。

しかし、PHLDA3 機能喪失と Akt の活性化が、細胞内のどのようなシグナル経路の異常を引き起こし、NET 発症と悪性化に繋がるのか、その詳細な分子メカニズムは解明できていない。そこで、本研究では、応募者が独自に樹立した膵・肺・甲状腺・下垂体 NET マウスモデルの解析を行い、世界最大級の様々な臓器由来のヒト NET コホート症例解析の結果と比較することで、臓器を超えた NET 共通のがん化メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

応募者がこれまで進めてきた NET マウスモデル作製、NET 臨床検体のゲノム解析等の成果に基づき、PHLDA3 が制御する NET 発症と悪性化の詳細なメカニズムを解析する。

(1) 複数臓器の NET マウスモデルを用いた細胞内シグナル異常の解析

膵臓・下垂体・甲状腺・肺 NET マウスモデルを作製する。これらのマウスモデルを対象に各臓器において、正常組織、前がん病変あるいは良性 NET、悪性 NET を組織・分子レベルで解析する。NET の悪性度の判定を病理組織学的分類 (Ki67 陽性率、核型異常、組織異形) により行う。また、それぞれの臓器について、野生型マウスにおける正常な神経内分泌組織、NET 前がん病変、悪性の NET の一細胞解析を行い、NET 発症の進行に合わせて、どのような細胞集団が出現するか解析する。これまでに、正常なマウス下垂体の一細胞解析に成功しており、同じ手法を用いて NET の一細胞解析も行う予定である。また、遺伝子発現解析、Western blotting など、分子レベルで解析し、NET 発症の進行とともにどのような細胞内シグナルの異常が生じるか解析する。応募者のこれまでの研究により、NET 発症の際には、神経内分泌細胞の分化異常が起こると考えられる結果を得ており、上記の解析を行うことで、悪性化に伴ってどのような分化異常が起こるのか、明らかにする。

(2) 世界最大級の NET コホートの解析

応募者は、様々な種類の NET からなる世界最大級の NET コホートを保有している。1 の研究で得られた結果は、ヒト臨床サンプルを用いてさらに検証する。応募者は、これまでに膵・下垂体 NET の網羅的ゲノム解析を行っており、これらの解析結果と比較検討する。

4. 研究成果

さまざまな臓器に発生する NET は希少がんである。2011 年には膵 NET の全エキソーム配列が解析され (Jiao, Y. et al., Science 331: 1199-1203) それ以降、下垂体や肺 NET のゲノム解析も報告されたが (George et al., Nature Commun., 9, 1048, 2018 など) 代表的ながん遺伝子やがん抑制遺伝子の異常はほとんどなく、未だ腫瘍発生機序は十分に解明されていない。NET 発症メカニズムを解明し、その知見に基づく有効な治療法や予防法の確立が望まれている。本研究によって、PHLDA3 による臓器を超えた NET 共通のがん化制御経路が存在すること、NET 共通の発症・悪性化のメカニズムを世界に先駆けて解明することができた。本研究を行うことで、様々な臓器に発生する NET を統合して扱うことができるようになる可能性が高いため、NET の研究開発が大きく推進し、新規診断・治療法の開発に結びつくと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ylenia Capodanno, Yu Chen, Joerg Schrader, Mitsuhiro Tomosugi, Shoiciro Sumi, Akihiko Yokoyama, Nobuyoshi Hiraoka, Rieko Ohki.	4. 巻 23
2. 論文標題 Cross-talk among MEN1, p53 and Notch regulates the proliferation of pancreatic neuroendocrine tumor cells by modulating INSM1 expression and subcellular localization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 979-992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neo.2021.07.008	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 Megumi Saito, Akane Sada, Masaki Fukuyo, Kiyono Aoki, Kazuhiro Okumura, Yuko Tabata, Yu Chen, Atsushi Kaneda, Yuichi Wakabayashi and Rieko Ohki.	4. 巻 142
2. 論文標題 PHLDA3 is an important downstream mediator of p53 in squamous cell carcinogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1040-1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2021.09.007	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 Aoze Su, Yuko Tabata, Kiyono Aoki, AkaneSada, Rieko Ohki, Satoru Nagatoishi, Kouhei Tsumoto, Siyuan Wang, Yuko Otani, and Tomohiko Ohwada.	4. 巻 69
2. 論文標題 Elaboration of non-naturally occurring helical tripeptides as p53-MDM2/MDMX interaction inhibitors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 681-692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00238	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 Yuko Nagamura, Makoto Miyazaki, Yoshiko Nagano, Arata Tomiyama, Rieko Ohki, Kazuyoshi Yanagihara, Ryuichi Sakai, and Hideki Yamaguchi.	4. 巻 13
2. 論文標題 SHP2 as a Potential Therapeutic Target in Diffuse-Type Gastric Carcinoma Addicted to Receptor Tyrosine Kinase Signaling cancers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13174309	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 Shingo Miyamoto, Yoshiko Nagano, Makoto Miyazaki, Yuko Nagamura, Kazuki Sasaki, Takeshi Kawamura, Kazuyoshi Yanagihara, Toshio Imai, Rieko Ohki, Masakazu Yashiro, Masato Tanaka, Ryuichi Sakai and Hideki Yamaguchi.	4. 巻 526
2. 論文標題 Integrin 5 mediates cancer cell-fibroblast adhesion and peritoneal dissemination of diffuse-type gastric carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 335-345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.11.008	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 大木理恵子	4. 巻 43
2. 論文標題 PHLDA3は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であり、悪性化の抑制に寄与する	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 99-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Yu Chen and Rieko Ohki*.	4. 巻 21
2. 論文標題 p53-PHLDA3-Akt Network: The Key Regulators of Neuroendocrine Tumorigenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 4098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21114098	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 Shiori Suzuki, Shuichi Tsutsumi, Yu Chen, Chikako Ozeki, Atsushi Okabe, Tatsuya Kawase, Hiroyuki Aburatani and Rieko Ohki*.	4. 巻 111
2. 論文標題 Identification and characterization of the binding sequences and target genes of p53 lacking the 1st transactivation domain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 451-466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14279	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yu Chen, Rieko Ohki.
2. 発表標題 Akt dysregulation by loss of PHLDA3 is an important determinant of pancreatic neuroendocrine tumor progression.
3. 学会等名 1st JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rieko Ohki.
2. 発表標題 Contribution of the p53 pathway in cancers that carry wild-type p53
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 チン ヨ、岩淵 禎弘、清野 透、平岡 伸介、飯田 湊太、新井 康仁、横山 明彦、岡田 眞里子、橋下 真一、仙波 憲太郎、大木 理恵子
2. 発表標題 PHLDA3 機能欠損によるAktの活性化は細胞の分化と代謝異常を引き起こし、膵臓神経内分泌腫瘍の悪性を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、金田 篤志、石川 冬木、定家 真人、大木 理恵子
2. 発表標題 分泌性タンパク質p53PAD7とHippoシグナル経路を介したアポトーシス誘導の解明.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本 樹、青木 清乃、高野 洋志、山本 采佳、山野 莊太郎、大島 正伸、八尾 良司、渡邊 利雄、田中 知明、大木 理恵子
2. 発表標題 p53標的遺伝子p53PAD5は腸管上皮細胞にストレス抵抗性を付与する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rieko Ohki
2. 発表標題 A novel p53 downstream tumor promotion pathway, p53-IER5- HSF1 pathway, that contributes to stress resistance and tumor progression.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yu Chen, Sadahiro Iwabuchi, Tohru Kiyono, Shigeyuki Magi, Yasuhito Arai, Akihiko Yokoyama, Mariko Okada, Shinichi Hashimoto, Kentaro Semba, Rieko Ohki.
2. 発表標題 Akt dysregulation by loss of PHLDA3 is an important determinant of pancreatic neuroendocrine tumor progression.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 滝川 雅大、渡邊 祐三、岡部 篤史、金田 篤志、石川 冬木、定家 真人、大木 理恵子.
2. 発表標題 分泌性タンパク質p53PAD7とHippoシグナル経路による増殖抑制機構の解明.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

基礎腫瘍学ユニットホームページ https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/fundamental_oncology/index.html 基礎腫瘍学ユニットホームページ https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/fundamental_oncology/
--

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	清野 透 (Kiyono Tohru) (10186356)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・プロジェクトリーダー (82606)	
研究分担者	小嶋 基寛 (Kojima Motohiro) (30338470)	国立研究開発法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長 (82606)	
研究分担者	陳 ㄩ (Chen Yu) (40838900)	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 (82606)	削除：2020年12月2日

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
---------	---------