

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659638

研究課題名（和文） 消化器神経内分泌腫瘍の発生、進展機構の解明とそれを応用した分子標的治療の開発

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of tumorigenesis of enteric and pancreatic neuroendocrine tumor and development of new molecular targeting therapy.

研究代表者

宮崎 勝（MIYAZAKI MASARU）

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

研究成果の概要（和文）：消化管神経内分泌腫瘍(NET)の発生、腫瘍進展様式を解明し、新規治療法の開発を目指すことを目的とした。当院での膵 NET 切除例 33 例の再検討から、Neuroendocrine carcinoma(NEC)は特に予後不良で、新規治療法開発が特に急務であることが示された。膵発生時に重要な機能を持つ Pdx1, Ngn3 を強発現する群は予後良好であり、腫瘍の分化度を示していると考えられた。現在、NET 細胞における機能を解明中である。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reveal the molecular mechanisms underlying tumorigenesis of pancreatic neuroendocrine tumors (pNET). Reevaluating 33 resected cases revealed that patients with Neuroendocrine carcinoma experienced extremely poor prognosis and the development of new therapy is necessary. Strong expression of Pdx1 and Ngn3, which play important role in pancreatic development, in NET cells predicted favorable prognosis. These results indicate that these factors induce tumor cell differentiation. We are now trying the molecular roles of these factors using cell line.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：膵臓外科学

## 1. 研究開始当初の背景

消化器領域の神経内分泌腫瘍(NET: neuroendocrine tumor)は膵、消化管の内分泌細胞に由来する腫瘍である。これらの腫瘍の罹患率は近年増加傾向にあるが、これまではその生物学的動態は解明されておらず、その分類が統一されたものはないため治療の指針もなされていないのが現状であった。WHO は 2004 年にホルモンの合成能、生物学的動態からの分類法を提唱した。しかし、その分類法では予後を完全に反映していないこと、やや曖昧さが残っていることなどから改訂が加えられ、現在では腫瘍の細胞分裂

の頻度を中心とした分類法が提唱され、これが汎用されている。その分類の中でも特に Neuroendocrine carcinoma (NEC) と言われる一群は予後不良の疾患であり、有効な治療法がないことがその一因である。NEC は外科切除が唯一効果が期待されるものの、その進行の早さから発見時にはすでに手術適応でないことも多く、また、たとえ外科切除ができたとしても早期に再発を来すことが知られている。一方で、従来の化学療法による治療効果は限定的であり、予後の改善に結びついていないのが現状である。このように有効な治療法が見いだせていない原因の一つ

に、本腫瘍の病態生理や分子生物学的特徴が十分には明らかにされていないことが挙げられる。また、NEC以外のNETについても同様のことが指摘できる。これらの腫瘍については外科切除が大きな効果を示すことは知られているものの、その病態生理が明らかになっていないため、基本的には悪性腫瘍の準じた手術が行われる。しかし、これらの治療法によっても再発を繰り返す症例も多く見受けられ、このような治療方針が本当に最適であるか不明である。また一方で生物学的な病態が比較のおとなしいと考えられる腫瘍に対しては縮小手術による患者に対する負担の軽減を行う余地もあると考えられるものの、その適応範囲ははっきりしていないのも現状である。このように、NETの病態生理の解明は、増え続ける本疾患の治療方針決定に重要であり、また、NECなど治療成績が極端に悪い腫瘍に対する分子標的治療などの新規治療法の確立には欠かすことができない。

我々はすでにこれまでもNETの分子生物学的な特徴を解明する研究を行ってきた。まず、神経内分泌腫瘍細胞株を用いて、ソマトスタチンが本腫瘍細胞に発現するソマトスタチン受容体変異体、特にSSTR2とSSTR5を介して細胞内のMAPK活性を抑制することで増殖抑制を引き起こすことを報告し(Yoshitomi H, Miyazaki M et al. *Am J Physiol* 1997;272:E769-)、現在ではソマトスタチンホモログのoctreotideが本腫瘍の治療に臨床応用されている。また、神経分化促進転写因子であるHuman Achaete-Scuter Homologue Gene 1 (hASH1)がNETのなかでも特にNECに発現している事を見出し、本疾患の新たなマーカーになる事を報告した(Shida T, Miyazaki M et al. *Clin Cancer Res* 2005;11:450-458)。

このような神経内分泌腫瘍細胞の病態生理を改めて検討し、増殖、分化を司る分子生物学的機構の解明に努めることで、本疾患に対する新たな治療指針を打ち出し、また、新規治療法を開発することが可能になると考えられる。

## 2. 研究の目的

このような背景から、本研究では以下の点を目的とした。

①神経内分泌腫瘍の外科切除例の臨床病理学的因子を再検討し、その適正な治療指針の確立を行う。

②神経内分泌腫瘍における転写因子の発現を検討し、その役割を解明する。転写因子としては神経内分泌細胞の発生、分化に関わる因子を中心に検討し、その組織発生における機能を参考に腫瘍の悪性化、進展にどのような働きをするかを検討する。

## 3. 研究の方法

神経内分泌腫瘍の中でも特に問題となる膵NETを中心に検討を行った。

### ①NETの臨床病理学的因子の再検討

千葉大学医学部附属病院にて1997年からこれまでに外科切除を行った33例の膵NET症例の手術標本を使用し、NETの診断に汎用されるChromogranin A, Synaptophysin, Somatostatin receptor 2 (SSTR2)の発現を免疫組織学的に再検討した。また、同一症例においてWHO 2010年分類で重要視されている細胞分裂の指標であるKi-67の発現率を免疫染色にて再検討した。

### ②膵発生に関与する転写因子のNETにおける発現の検討

膵内分泌腫瘍には複数の転写因子が関わることが知られている。そこで、これらの転写因子の膵NETにおける発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子と比較した。標本としては前述の切除標本33例を使用した。対象とした転写因子はPdx-1, Ngn-3, hASH1とした。

### ③転写因子のNETにおける分子生物学的機能の検討

②の検討により、NETの分化、進展に関わると考えられる因子の腫瘍細胞における機能を神経内分泌腫瘍由来の細胞株を用いて検討する。マウスインスリノーマ由来のMIN-6細胞を使用する。各転写因子の発現をsiRNAを使用して抑制することにより、細胞の増殖能、浸潤能にどのような影響を及ぼすかを検討した。

## 4. 研究成果

### ①膵NET切除例の臨床病理学的因子再検討

これまでの切除例33例の手術標本を用い、Chromogranin A, Synaptophysin, SSTR-2A, Ki67を再検討し、術後経過、予後との関連を見た。33例の平均年齢は54.4歳(18-75歳)、男性14例、女性19例、全生存観察期間中央値は30ヶ月であった。WHO 2010分類では特にKi-67陽性細胞率を中心にNET G1(2%以下), G2(3-20%), NEC(20%を超える)に分類されている。Ki-67 indexにより、33例を再検討するとNET G1 24例, G2 5例, NEC 4例であった。G1, G2症例は全例生存をしていたが、NEC症例は全例が20ヶ月以内に原病死していた。外科切除後の無病再発期間について検討すると、G1では1例のみが局所再発、G2では5例中2例に肝再発、リンパ節再発が看取られた。NECの予後は悪く、全例で1年以内に再発を認めた。

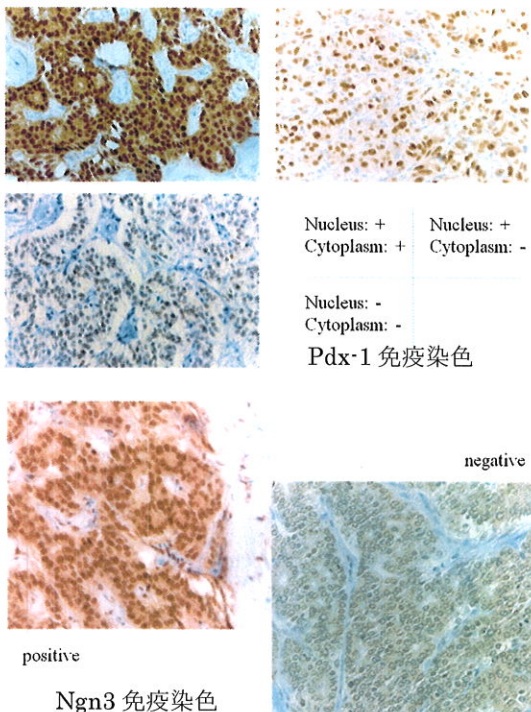
詳細を検討するとG1で再発した症例は切除断端に顕微鏡的遺残を認める症例であり、予後がよいG1症例といえども根治切除の重要性が示唆された。また、リンパ節転移を検討すると2センチ以下の症例ではKi-67 indexが5.5%であったG2症例でのみ転移を認めた。すなわち、術前に超音波内視鏡を使用した生

検等の手法で Ki-67 index がわかれば、膵部分切除などの縮小手術を検討して良いと考えられた。一方、NEC 症例では切除不能症例であるか、もしくは根治術ができたとしても術後早期に全例で再発を認めることから外科切除に加えて化学療法などの何らかの全身療法を加える集学的治療法を確立する必要があると思われた。

## ②膵発生に関与する転写因子の発現

腫瘍発生と組織発生ではその分化や進展に共通のシグナル伝達、転写因子を利用していることが多く認められる。そこで、膵内分泌細胞の発生、分化に関わる転写因子の発現を膵 NET で検討し、予後や臨床病理学的因子と比較した。

Pdx-1 はホメオボックス転写因子に分類され、膵発生のマスター遺伝子と言われ、原腸細胞から膵芽細胞への分化を誘導する。また、その後、膵内分泌細胞が最終的にホルモン分泌細胞に分化する際にも特にインスリン産生細胞の分化に重要な役割を果たすことが知られている。また、ヘリックスループヘリックス構造を持つ neurogenin 3 (Ngn3) も膵芽細胞から内分泌細胞へ分化する際に重要な役割を果たしていることが示されている。そこで、これらの二つの転写因子の膵 NET における発現を免疫染色を用いて検討した。

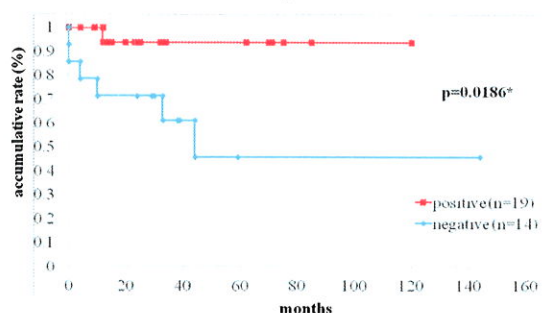


上図に示すように Pdx1, Ngn3 共に膵 NET 腫瘍細胞の核に発現を認めた。しかし、その発現の程度は腫瘍によりまちまちであった。そこで、腫瘍におけるこれらの転写因子の発現の強弱を腫瘍周囲の正常膵組織に存在するランゲルハンス島細胞における発現と比較し、これよりも強く発現しているものと弱く

発現しているものの 2 群にわけた。

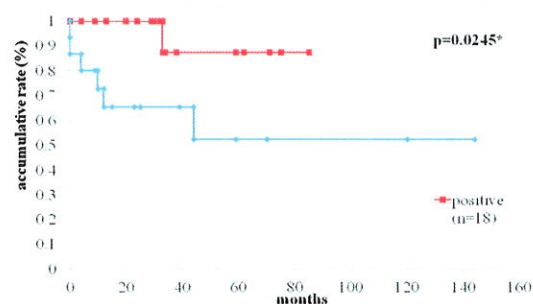
Pdx1 の発現では強発現群が 19 例、弱発現群が 14 例であった。この発現の強弱と臨床病理学的因子の関連を検討すると、強発現群で有意に頻度が高いものは性別 (女性)、NET G1、機能性腫瘍、腫瘍径 2 センチ以下、局所進展度 (T) 1、Stage I であり、どちらかという予後良好を示唆する因子との関連が多かった。これを反映して、予後の検討を行うと、Pdx1 強発現群では弱発現群に比較して有意に無再発生存期間、全生存期間共に延長していた。

## Disease free survival based on Pdx1 expression



一方、Ngn3 では強発現群は 18 例、弱発現群は 15 例であった。臨床病理学的因子との関連では強発現群はホルモン発現を認める症例に有意に多かったが、その他の因子との関連は認めなかった。また、Pdx1 発現の強弱と Ngn3 発現の強弱の相関は認められず、それぞれの転写因子の発現は独立して調整されていることが示唆された。

## Disease free survival based on nuclear Ngn3 expression



Ngn3 発現と予後との関連を見ると、Pdx1 と同様に無再発生存期間 (上図参照)、全生存期間共に強発現群の方が延長を認めた。

前述の様に Pdx1 および Ngn3 は膵内分泌腫瘍の分化に関わる転写因子である。このことから、これらの因子の発現は腫瘍細胞がやや分化していることを示していると考えられ、

そのためにいわゆる低分化の NEC とは一線を画して、予後良好のサインであると思われた。③このような仮説を裏付けるために、現在、膵内分泌腫瘍由来の細胞株におけるこれらの転写因子の役割について検討している。これまで、まずこれらの転写因子が各細胞株に発現しているかどうかを PCR を用いて確認する予定である。その上で、腫瘍細胞における発現が認められた細胞株に対し、その発現を siRNA を利用して減弱させ、その細胞形態の変化、増殖能、浸潤能に対する影響について検討し、これらの転写因子の腫瘍細胞での役割について検討しようとしている。依然、発現を確認する PCR 法において、条件設定に難渋しているところであり、今後の課題である。

我々はこれまでに膵神経内分泌腫瘍において、膵発生に伴うと言われる Pdx1 や Ngn3 が発現していることを示した。これらの因子の発現により腫瘍細胞が分化しやすい状況になってくることで、腫瘍の進展を遅くしているのではないかと推察された。今後も同様の研究を通し、膵癌における腫瘍細胞の発生、進展に関わる分子機構を解明していく。

#### 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 9 件)

1. Kagawa S, Takano S, Yoshitomi H, Kimura F, Satoh M, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa K, Matsushita K, Nomura F, Miyazaki M. Akt/mTOR signaling pathway is crucial for gemcitabine resistance induced by Annexin II in pancreatic cancer cells. J Surg Res. 2012;178:758-767. 査読有
2. Sakai N, Yoshidome H, Shida T, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Sakakibara M, Miyazaki M. CXCR4/CXCL12 expression profile is associated with tumor microenvironment and clinical outcome of liver metastases of colorectal cancer. Clin Exp Metastasis 2012;29:101-110. 査読有
3. 大塚将之, 中島正之, 木村文夫, 清水宏明, 吉留博之, 宮崎 勝. 肝原発が示唆されたガストリノーマの 1 例 日本臨床外科学会雑誌 2012;73:1205-1210. 査読有
4. 酒井望, 吉留博之, 宮崎勝.

【抗がん剤治療の最前線:分子標的薬剤の使用による進歩(前篇)】 新たな標的となる遺伝子とその変異、新薬 分子標的治療のターゲットとしての CXCL12/CXCR4. 最新医学 2012;67:1526-33. 査読有

5. Suzuki T, Yoshidome H, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Takeuchi D, Kato A, Furukawa K, Yoshitomi H, Iida A, Dochi T, Miyazaki M. Hepatocyte apoptosis is enhanced after ischemia/reperfusion in the steatotic liver. J. Clin. Biochem. Nutr 2011;48:142-148 査読有
  6. Yoshidome H, Iida A, Kimura F, Shimizu H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Response to “Which side is nuclear factor-kappa B on liver injury?” Surgery 2011;149:460-461. 査読有
  7. Ohtsuka M, Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Kato A, Yoshitomi H, Furukawa K, Takeuchi D, Takayashiki T, Suda K, Takano S, Kondo Y, Miyazaki M. Similarities and differences between intraductal papillary tumors of the bile duct with and without macroscopically visible mucin secretion. Am J Surg Pathol 2011;35: 512-521. 査読有
  8. 細川 勇, 竹内 男, 大塚将之, 吉富秀幸, 岸本 充, 宮崎 勝. 非典型的な画像所見を呈した非機能性膵神経内分泌腫瘍の 1 例. 日本臨床外科学会雑誌 2011;72:1008-1014. 査読有
  9. 吉富秀幸, Kenneth S. Zaret, 宮崎勝. 【胆と膵の再生医学の最前線】 膵発生における血管内皮細胞の役割. 胆と膵 2011;32:1213-1218. 査読有
- [学会発表] (計 15 件)
1. 要望演題「肝胆膵領域における感染症対策②」質量分析計による肝胆膵手術後ドレーン廃液の細菌同定の試み. 吉富秀幸, 曾川一幸, 渡邊正次, 中村祐介, 清水宏明, 吉留博之, 大塚将之, 加藤厚, 古川勝規, 竹内男, 高屋敷吏, 久保木知, 鈴木大亮, 野村文夫, 宮崎勝. 第 25 回日本外科感染症学会総会 (2012 11.22 千葉)

2. ポスター 術前に神経内分泌腫瘍と診断した膵腫瘍の2例  
田中 圭、大塚将之、岸本 充、中島正之、木村文夫、清水宏明、吉留博之、加藤 厚、古川勝規、吉富秀幸、竹内 男、高屋敷吏、久保木知、鈴木大亮、中谷行雄、宮崎 勝  
第54回日本消化器病学会大会・JDDW 2012 (2012.10.10-13. 神戸)
3. Symposium(Special Remarks)  
Pancreas Club Inc. Joint Symposium: Downstaging Cemo ± Radiotherapy for Borderline Resectable Pancreatic Cancer.  
Miyazaki M.  
International Symposium on Pancreas Cancer 2012 (2012.10.5 Kyoto, Japan)
4. Poster Combination of preoperative gemcitabine/S-1 chemotherapy and aggressive surgical resection for borderline or initially unresectable locally advanced pancreatic cancer.  
Yoshitomi H, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Furukawa H, Takeuchi D, Takayashiki T, Kimura F, Miyazaki M.  
32nd ESSO (European Society of Surgical Oncology) (2012.9.19-21Valencia, Spain)
5. 一般口演 膵 Solid-pseudopapillary neoplasm に対する積極的外科切除成績の検討  
細川 勇、吉富秀幸、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤 厚、古川勝規、竹内 男、宮崎 勝.  
第67回日本消化器外科学会総会 (2012.7.20 富山)
6. 一般演題 膵腺傍細胞癌自験例の検討  
中村祐介、吉富秀幸、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤 厚、古川勝規、竹内 男、高屋敷吏、久保木知、鈴木大亮、中島正之、宮崎 勝.  
(日本膵臓学会雑誌, 27, 432, 2012)  
第43回日本膵臓学会大会 (2012.6.29 山形)
7. Poster Session Inhibitory effects of peroxisome proliferator -activated receptor-g on tumor growth in human hepatocellular carcinoma: Usefulness as a prognostic predictor and therapeutic target.  
Satoshi Kuboki, Hiroyuki Nojima, Masaru Miyazaki.  
DDW 2012 (2012.5.19-22 San Diego, USA)
8. ポスターセッション 膵 基礎-3 (癌幹細胞、浸潤転移) 膵組織幹細胞特異的な転写因子 Sox9 の膵癌組織における発現の検討.  
中田泰幸、吉富秀幸、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、古川勝規、竹内男、高屋敷吏、久保木知、鈴木大亮、中島正之、宮崎勝.  
第112回日本外科学会定期学術集会 (2012.4.13 千葉)
9. Combination of Preoperative Gemcitabine/S-1 Chemotherapy and Aggressive Surgical Resection for Borderline or Initially Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer.  
Hideyuki Yoshitomi, Fumio Kimura, Hiroaki Shimizu, Hiroyuki Yoshidome, Masayuki Ohtsuka, Atsushi Kato, Katsunori Furukawa, Dan Takeuchi, Tsukasa Takayashiki, Satoshi Kuboki, Daisuke Suzuki, Masayuki Nakajima, Masaru Miyazaki.  
21th IASGO (World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists) (2011.11.11 Tokyo, Japan)
10. Frozen section examination of bile duct margins in hilar cholangiocarcinoma.  
Masayuki Nakajima, Masayuki Ohtsuka, Fumio Kimura, Hiroaki Shimizu, Hiroyuki Yoshidome, Atsushi Kato, Hideyuki Yoshitomi, Dan Takeuchi, Katsunori Furukawa, Tsukasa Takayashiki, Kosuke Suda, Satoshi Kuboki, Masaru Miyazaki.  
International Surgical Week (ISW) 2011(2011.8.31 Yokohama, Japan)
11. 一般口演 膵癌における CD44 発現と予後との関連性についての検討.  
高原善博、吉富秀幸、高野重紹、賀川真吾、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、古川勝規、竹内男、高屋敷吏、須田浩介、久保木知、宮崎勝.  
(膵臓 26(3), 366, 2011)  
第42回日本膵臓学会大会 (2011.7.29 弘前)
12. ワークショップ 消化器癌に対する分子生物学の臨床応用(上部消化管・肝胆膵) 膵癌術後補助化学療法の個別化を目指した Gemcitabine 耐性因子の同定と Akt/mTOR シグナル制御の意義.  
吉富秀幸、賀川真吾、高野重紹、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加

藤厚、  
野村文夫、宮崎勝。  
第 66 回日本消化器外科学会総会  
(2011. 7. 15 名古屋)

13. 膵癌に対する積極的外科切除と Gemcitabine (GEM) を中心とした化学療法による集学的治療による治療成績の向上。

吉富秀幸、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、古川勝規、竹内男、高屋敷史、須田浩介、久保木知、宮崎勝。

第 111 回日本外科学会定期学術集会  
(東北地方太平洋沖地震の為、誌上発表)  
(2011/5)

14. サージカルフォーラム 膵臓：基礎-2  
膵癌細胞における、gemcitabine 耐性因子 Annexin II の発現と Akt/mTOR シグナル制御の意義。

賀川 真吾、高野 重紹、吉富 秀幸、木村文夫、清水 宏明、吉留 博之、大塚 将之、加藤 厚、古川 勝規、竹内 男、高屋敷 史、須田 浩介、久保木 知、野村 文夫、宮崎勝

第 111 回日本外科学会定期学術集会  
(東北地方太平洋沖地震の為、誌上発表)  
(2011/5)

15. 膵癌における癌幹細胞マーカー発現形式の検討と臨床病理学因子との関係。

高原善博、吉富秀幸、高野重紹、賀川真吾、木村文夫、清水宏明、吉留博之、大塚将之、加藤厚、古川勝規、竹内男、高屋敷史、須

田浩介、久保木知、賀川真吾、宮崎勝。

第 111 回日本外科学会定期学術集会  
(東北地方太平洋沖地震の為、誌上発表)  
(2011/5)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 勝 (MIYAZAKI MASARU)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：70166156

### (2) 研究分担者

吉留 博之 (YOSHIDOME HIROYUKI )  
千葉大学・大学院医学研究院・講師  
研究者番号：10312935

吉富 秀幸 (YOSHITOMI HIDEYUKI)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：60375631

高屋敷 史 (TAKAYASHIKI TUKASA)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：30456024

中島 正之 (NAKAJIMA MASAYUKI)  
千葉大学・医学部付属病院・助教  
研究者番号：80466705