

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461025

研究課題名(和文) 膵神経内分泌腫瘍における腫瘍間質間相互作用を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new therapeutic strategy for targeting interaction of tumor stroma in pancreatic neuroendocrine tumor

研究代表者

伊藤 鉄英 (ITO, TETSUhide)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50253448

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)：我々は膵神経内分泌腫瘍(PNET)における腫瘍間質相互作用を評価し、新規治療法の可能性を証明した。PNETでは腫瘍間、腫瘍内では膵星細胞の発現が多く、Ki-67指数と予後との関連が示唆された。

また、mTOR pathway、somatostatin受容体の発現とともに約30%にdopamine受容体の発現を認められ、さらにdopamine受容体はKi-67指数、肝転移の有無、予後因子との関連が認められ、dopamine受容体をターゲットした治療は進行性PNET患者に対する新たな治療戦略として期待が持てることを証明した。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study is to evaluate the interaction between pancreatic neuroendocrine tumor (PNET) and stromal cells, especially pancreatic stellate cells (PSCs). The degree of PSCs infiltration in stroma and intra-PNET cells was more dominant and well correlated with Ki-67 labeling index and prognosis. Furthermore, the expression of dopamine receptor was observed in approximately 30% accompanied with mTOR pathway and somatostatin receptor type 2. The degree of expression of dopamine receptor was correlated with Ki-67 labeling index and prognosis.

In conclusion, we demonstrated that the target therapy against dopamine receptor might be a new therapeutic strategy for treatment in patients with advanced PNET.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵神経内分泌腫瘍 腫瘍間質相互作用 新規治療法 Ki-67指数 mTOR pathway somatostatin受容体
dopamine受容体 予後因子

1. 研究開始当初の背景

-本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ-

Pancreatic neuroendocrine tumor (PNET) は膵の悪性腫瘍であり、膵腫瘍全体に占める割合は約1~2%と比較的稀な疾患である。我々が2005年に行った本邦におけるPNETの実態・疫学調査

(Ito T, J Gastroenterol, 2007; Ito T, J Gastroenterol, 2010)では、1年間の受療者数は2845人、人口10万人あたりの有病患者数は2845人、新規発症率は1.01人であった。膵悪性腫瘍に占めるPNETの割合は年々増加しており(図)、その癌生物学、腫瘍進展メカニズムの解明ならびに新規治療法の確立は急務となっている。PNETはその組織学的分化度を基準に、NET G1、NET G2、NECに分類されるが(2010年WHO分類)、その臨床病型は多種多様であり、インスリンーマやガストリノーマなどのホルモン産生腫瘍や、遺伝子背景を有する多発性内分泌腺腫症(Multiple endocrine neoplasia type 1)などが存在する。予後や臨床転帰も多種多様であり、診断・治療に際しては組織学的な検索が必須であるが、予後を予測する血清マーカー(Chromogranin A)や組織学的因子(Ki67/MIB1 index)は他の癌種に比べ、比較的少ないのが現状である。治療法としては腫瘍に発現するソマトスタチン受容体(SSTR: somatostatin receptor)を標的としたソマトスタチンアナログ製剤ならびに、腫瘍において活性化しているPI3K-Akt-mTOR経路を標的としたmTOR阻害薬が存在する。とくにmTORシグナルは細胞増殖に重要な役割を果たし、また癌の増殖に必要な蛋白質の合成・翻訳にも関わっており、我々はこのmTORシグナルの阻害薬であるエベロリムス(アフィニトール®)に、PNET患者の著しい予後改善効果があることを明らかにした。

(Yao JC, Ito T, N Engl J Med, 2011; Yao JC, Ito T, N Engl J Med, 2011; Ito T, Jpn J Clin Oncol, 2012)

現在はソマトスタチンアナログとmTOR inhibitorを併用した臨床試験が、当施設において進行中であり、併用療法によるより効果的な治療効果が期待されている。

一方で、未だに明らかにされていない領域がPNETにおいて存在する。癌間質相互作用である。膵管癌の場合には、既に膵星細胞が間質組織において中心的役割を担っていることが明らかとなっており、癌の進展、抗がん剤に対する治療抵抗性、患者予後に深く関連し、新たな治療標的となっている。最近では、アルブミン結合パクリタキセル(アブラキサン®)が、ゲムシタピンとの併

用療法により臨床試験(I, II相)にて著明な予後改善効果を有することが報告され、興味深いことに患者組織標本において間質に存在する膵星細胞数の著しい減少が認められた。このことは、間質を標的とした治療が癌患者の予後を直接的に改善する可能性を明らかにしている。

2. 研究の目的

近年、腫瘍間質相互作用が様々な分子およびシグナルを介して癌の進展に強く関わることが示唆されており、とくに膵管癌においては間質に存在する膵星細胞が増殖因子やプロテアーゼ、血管成長因子を分泌し、癌の増殖、浸潤、転移に寄与し、予後不良因子として認識されている。膵神経内分泌腫瘍(Pancreatic neuroendocrine tumor: PNET)は、豊富な腫瘍内血流やホルモン産生腫瘍の存在など、膵管癌と一部異なる性格を有する腫瘍であるが、多発肝転移症例などは膵管癌同様、予後が著しく不良であり、新たな治療法が期待される。本研究ではPNETにおける腫瘍間質相互作用の病態を明らかにし、膵星細胞に着目した新規治療標的の開拓を行う。

-これまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯-

本研究はPNETにおける新たな癌生物学の解明、間質を標的とした新規治療標的の開拓、予後予測因子の同定、新規治療法の開発を遂行するにあたり避けて通れない課題であるが、残念ながらPNETと膵星細胞とのクロストークに着目し、腫瘍の増殖、浸潤、転移などのメカニズムを解明しようとした試みは未だ皆無であり、その1つの原因として両者の診療、研究に精通している研究者が皆無であったことが挙げられる。我々はこれまでPNET患者の診療を数多く行い、その患者数は国内有数であり、詳細な症例プロファイリングを行っている。またPNETの外科切除標本を免疫組織学的染色法を用いて、様々なタンパク発現解析(IGF-1受容体)を行い、患者予後との相関を明らかにしている(Furukawa M, Ito T, Clin. Cancer research 2004)。加えて、我々は膵星細胞が発見、同定された頃(1998年)より研究しており、数多くの研究報告を行ってきており(Gibo J, Ito T, 2005; Laboratory Investigation; Nakamura T, Ito T, Pancreas 2010; T. Nakamura, Ito T, International Journal of Inflammation 2012; Uchida M, Ito T, Laboratory Investigation in press)こちらの領域に関しても国内有数の研究を行ってきている。

さらに申請者らは米国国立衛生研究所 (NIDDK, NIH) の Prof. Robert T. Jensen と古くから研究交流を幅広く行ってきており、同研究所における PNET 細胞株の培養技術も確立できている (Nakamura T が現在留学中)。これらの技術確立により、本研究に取り組むのに十分な準備が整ってきており、これまでの基礎データを格段に発展させうる時期に至ったと考えている。

研究期間内に明らかにする事柄

本研究では PNET 患者の切除標本ならびに患者プロフィールをもとにした解析、隣星細胞ならびに PNET 細胞株 (Bon-1 cell line) を対象にした基礎研究を行い、癌間質相互作用を臨床ならびに基礎的見地から明らかにする。特に予後に直接関わる遠隔転移形成機序に焦点をあて研究を行う。さらに同定した癌間質相互作用にかかわる隣星細胞機能を標的としたこれまでにないアプローチによる PNET 新規治療法を開発する。本研究においては次の 5 つの項目を研究期間内に明らかにする。

- ・PNET 組織における隣星細胞の局在を明らかにする
- ・PNET 周囲隣星細胞の Characterization を行う
- ・腫瘍因子 (Bon-1) および間質因子 (隣星細胞) による腫瘍間質相互作用において中心的役割を担う分子を明らかにする。

本研究の学術的特色・独創的な点及び予想される結果と意義

本研究の特色は PNET の癌進展機序において、癌細胞そのものではなく、周囲の環境、すなわち隣星細胞による間質作用に着目している点である。これまで PNET と隣星細胞との相互作用について検討した報告は 1 つもなく、世界で初めての研究となる。PNET 組織における隣星細胞の局在に関してはこれまで誰も注目しておらず、その分布を明らかにすることにより、様々な組織型、免疫組織学的染色パターン、細胞分裂度などと相関する新たな予後予測因子となりうる可能性がある。とくに PNET 周囲隣星細胞の Characterization を行うことにより、PNET における PI3K-Akt-mTOR pathway の活性化機序の解明や (隣星細胞からの PDGF 刺激によるもの?)、新たな SSTR 発現細胞 (隣星細胞?) の同定が可能となる。臨床標本から得られたデータを改めて詳細に評価するため、in vitro の実験系により各々から分泌される刺激による細胞機能変化 (癌の浸潤、転移、隣星細胞の増殖、遊走ならびに paracrine factor としての増殖因子、血管成長因子、細胞外

基質分解因子分泌) を明らかにし、共培養実験系を用いた新規治療標的の検証ならびに開発を行うことを可能にする。以上の結果により今後の PNET 治療研究に大きなインパクトを与え、学術的にも広範な波及効果が期待される。本研究により PNET 研究のブレイクスルーをもたらす新規治療法の開発につながれば将来の PNET 患者の予後改善という社会的要請にも応えることができるかと期待される。

3. 研究の方法

-要旨-

まず、PNET 患者組織標本を用いて隣星細胞の局在を明らかにする。次に PNET 組織周囲に存在する隣星細胞の発現分子、受容体を明らかにし、また活性化シグナルを明らかにする。以上の隣星細胞のプロフィールと PNET 患者の分化度、ホルモン産生の有無、転移の有無、各種治療薬による治療効果の有無、予後との相関を網羅的に解析し、癌間質相互作用の中心的役割を担う分子、受容体、シグナル伝達を同定する。臨床標本における環境 (癌間質相互作用) を再現する in vitro 培養実験系を作成し、単一細胞培養系ならびに共培養系を用いて、効果的な治療戦略を確立する。

1. PNET 組織における隣星細胞の局在を明らかにする

免疫蛍光組織学的染色法を用いることにより、PNET ならびに隣星細胞の隣組織および腫瘍内局在を検討する。顕微鏡は Nikon A1/C1 共焦点顕微鏡を用い、200-1000 倍の倍率で観察する。PNET のマーカーには Chromogranin A, Synaptophysin を用いる。隣星細胞のマーカーには -SMA を用いる。腫瘍間、腫瘍内の星細胞を評価し、腫瘍面積 (腫瘍細胞数) 当たりの星細胞の割合を算出する。また周囲の腺房細胞ならびに導管細胞、正常隣ランゲルハンス島、血管、神経との解剖学的関係も同時に検討する。得られた位置データをスコアリングし、腫瘍細胞の細胞分裂度、Ki-67 との相関、ホルモン産生との相関、遠隔転移との相関、予後との相関、治療反応性との相関を多変量解析を用いて統計学的に分析する。すでに我々はいくつかの PNET 組織標本を用いて、様々な PNET における隣星細胞 (-SMA 陽性細胞) の局在を明らかにしている。インスリノーマなどの予後良好な PNET では隣星細胞は腫瘍全体を囲むように局在し、一方でガストリノーマなどの予後不良な PNET では腫瘍内で蜂巣を形成するように局在している。

<具体的な工夫>

PNET のタンパク発現には多様性があるため、複数のマーカー、抗体を用いてより、感度、特異度が高いものを用いる。ホルモン産生腫瘍の場合はそれらの抗体も用いて評価する。

<うまくいかないときの対処>

免疫染色による解剖学的位置評価が何らかの理由（抗体が認識するエピトープが癌の組織型によってあったりなかったりする）でうまくいかない場合は、複数の抗体を用いて総合的に検討する。原発巣で明らかでない場合は、肝臓などの転移巣標本を用いて評価することにより、より悪性度の高い PNET において周囲の間質細胞（肝星細胞など）との関係が明瞭にできる可能性がある。それでも結果の出方にバラつきがある場合は、パラフィン切片をマイクロダイセクション法を用いて、腫瘍および膵星細胞を個別に単離、RNA を抽出し、Realtime PCR 法で各遺伝子発現の増減を定量的に評価する。

2. PNET 周囲膵星細胞の

Characterization を行う

1 で得られたデータをもとに、どのような分子の発現変化が膵星細胞に出現しているかを明らかにする。腫瘍の増殖に関与する PDGF、IGF などの成長因子ならびに上皮間葉形質転換に関与する TGF- β 、血行性転移に関与する VEGF の発現を免疫組織化学的に評価する。また腫瘍側におけるこれら成長因子の受容体発現も同時に検討する。以上の結果から PNET における腫瘍間質変化に関わる候補分子、受容体が明らかにされる。また、既に治療薬として確立している mTOR inhibitor, somatostatin analog の標的となる mTOR pathway ならびに SSTR の発現についても同時に検討し、これらの治療薬の標的として膵星細胞が存在するかを明らかにする。

<具体的な工夫>

単に、すべての膵星細胞を網羅的に検討すると効率が良くないため、転移巣のサンプルも同時に用いる。

転移巣に存在する PNET で、原発巣の PNET と同一の性格を有する PNET を検出し、その周囲に存在する膵星細胞に焦点をあてることにより、悪性の予後に関連する膵星細胞の性格を明確にできる。

<うまくいかないときの対処>

これらの成長因子、受容体の染色性が不良である場合は、その下流シグナル分子である ERK や smad などに標的を変更し、染色を行う。

また mTOR なども同様に、その下流である 4EBP-1 や S6K などの分子に標的を変更する。

3. 腫瘍因子（Bon-1）および間質因子（膵星細胞）による腫瘍間質相互作用において中心的役割を担う分子を明らかにする。

腫瘍因子にはホルモン産生腫瘍から分泌されるホルモン（インスリン、グルカゴン、ガストリン、ソマトスタチン、VIP）が存在する。またクロモグラニン A も同様に分泌される因子である。これらで刺激することにより、膵星細胞の機能である細胞外基質産生、分解、各種成長因子の発現、分泌、増殖、遊走がどのように変化するかを明らかにする。なかでも 2 で明らかにされた候補分子について詳細に検討する。また間質因子として、膵星細胞から分泌される因子によって腫瘍細胞の mTOR pathway ならびに SSTR 発現がどのように変化するかを明らかにする。また既知の治療薬（mTOR inhibitor, Somatostatin analog）によって膵星細胞からの Pracrine 因子がどのように変化し、腫瘍細胞にどのような影響を与えるかを検討する。最後に、共培養実験系を用いて、非接触、接触条件下における腫瘍間質相互作用の変化をみる。膵星細胞はコネキシンなどの細胞細胞間結合によって重要な分子を発現しているため、腫瘍細胞との接着によってもたらされる変化が存在しうる。これらの接着分子の発現変化、ならびに中和抗体を用いて、中心的役割を担う分子の同定を行う。

4. 研究成果

我々は膵神経内分泌腫瘍(PNET)における腫瘍間質相互作用を評価し、新規治療法の可能性を証明した。PNET では腫瘍間、腫瘍内では膵星細胞の発現が多く、Ki-67 指数と予後との関連が示唆された。

また、mTOR pathway、somatostatin 受容体の発現とともに約 30% に dopamine 受容体の発現を認められ、さらに dopamine 受容体は Ki-67 指数、肝転移の有無、予後因子との関連が認められ、dopamine 受容体をターゲットした治療は進行性 PNET 患者に対する新たな治療戦略として期待が持てることを証明した。

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 2 件)

- 1) Lee L, Igarashi H, Fujimori N, Hijioka M, Kawabe K, Oda Y, Jensen RT, Ito T.

Long-term outcomes and prognostic factors in 78 Japanese patients with

advanced pancreatic neuroendocrine tumors: a single-center retrospective study.

Jpn J Clin Oncol. 2015;45:1131-8.

- 2) Ito T, Lee L, Hijioka M, Kawabe K, Kato M, Nakamura K, Ueda K, Ohtsuka T, Igarashi H.

The up-to-date review of epidemiological pancreatic neuroendocrine tumors in Japan.

J Hepatobiliary Pancreat Sci.

2015;22:574-7.

〔学会発表〕(計 1 件)

第101回日本消化器病学会総会(H27/4仙台)

ワークショップ8

胆膵領域におけるNET治療の新展開

李倫學、五十嵐久人、伊藤鉄英。

〔図書〕(計 0 件)

〔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

伊藤鉄英 (ITO, Tetsuhide)

九州大学・大学院医学研究院・病態制御

内科学・准教授

研究者番号 : 50253448

(2)研究分担者

九州大学・大学院医学研究院・病態制御

内科学・共同研究員

五十嵐久人 (IGARASHI, Hisato)

研究者番号 : 60467941

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

研究協力者

新名雄介 (NIINA, Yusuke)、脇岡真之

(HIJIOKA, Masayuki)、李倫學 (LEE, Lingaku)