

PHLDA3 機能喪失を伴った非機能性膵神経内分泌腫瘍の 悪性化・転移機序の解明及び標的治療法の開発

国立がん研究センター研究所 基礎腫瘍学ユニット

陳 好

I 要 旨

膵臓の神経内分泌腫瘍 (Neuroendocrine Tumor: NET) は、膵臓の神経内分泌組織である膵島に由来する腫瘍であり、内分泌症状のある機能性膵 NET と内分泌症状のない非機能性膵 NET に分類される。近年、診断技術の進歩に伴い、NET の罹患率が世界中で上昇しているが、NET の詳細な発生・悪性化メカニズムは未だに不明である。我々は、これまでに、p53 の標的遺伝子 *PHLDA3* はがん遺伝子 *Akt* の抑制機能を持っており、ヒト膵 NET の悪性化を制御すること、ヒト散発性膵 NET では *PHLDA3* 及び遺伝性膵 NET の関連遺伝子 *MEN1* の同時機能喪失が発生に必要であることを明らかにした^{1),2)}。さらに、我々はこのヒト膵 NET のゲノム異常を模倣した早期に高悪性度膵 NET が発生する *PHLDA3* と *MEN1* の二重欠損マウスを作製した。本研究では、二重欠損マウスを用いて膵 NET の悪性化メカニズムを詳細に解析した。その結果、膵島細胞において *PHLDA3* 欠損による Akt 経路の活性化が認められ、悪性化に伴って二重欠損膵島細胞の代謝異常が明らかになった。また、収集したヒト膵 NET 症例においても同様なシグナル経路及び代謝の異常が認められた。さらに、代謝阻害剤による膵 NET 細胞株の増殖抑制が認められ、現在二重欠損マウスを用いて代謝阻害剤の奏効性を検討している。

膵 NET の最大の予後不良因子は肝転移であり、肝転移症例に有効な治療薬は存在せず、治

療薬開発は急務である。しかし、肝転移の動物モデルの開発が遅れているため、未だに膵 NET 肝転移のメカニズムは十分に解明されていない。本研究では、膵 NET の肝転移マウスモデルの作製を試みた。その結果、同所移植により膵 NET の肝転移が認められた。現在、肝転移マウスモデルを用い、肝転移に関わる詳細な分子メカニズムの解明を進めている。

II 目 的

本研究では、①ヒト膵 NET のゲノム異常を模倣したマウスモデルを用いて、膵 NET 悪性化の詳細なメカニズムを解明し、膵 NET の新規治療法を開発すること、②膵 NET の肝転移のマウスモデルを作製し、肝転移に関与するシグナル経路を解明することを目的とする。

III 方 法

1. 膵 NET 悪性化のメカニズムの解明及び新規治療法の開発

3 匹以上の高悪性度膵 NET が発生した *PHLDA3*・*MEN1* 二重欠損マウスを用い、膵 NET を膵臓組織から分離・回収した。回収した膵 NET から RNA とタンパク質を抽出し、Akt 経路の活性化レベルを検討した。また、5 匹の二重欠損マウスの膵臓切片を作製し、Akt の下流基質及び Akt 経路によって制御されている因子の免疫染色を行った。さらに、3 匹の二重欠損マウスから回収した膵 NET を用いて代

謝経路の変化について検討した。関与する代謝経路を同定し、その代謝経路を標的とする阻害剤を用いて膵 NET 細胞の増殖に対する効果を検証した。

2. 膵 NET の肝転移マウスモデルの作製

患者由来の膵 NET の細胞株及び *PHLDA3*・*MEN1* 二重欠損マウスから分離した高悪性度膵 NET を、異なる移植方法を用いてレシピエントマウスに移植した。

IV 結 果

1. 膵 NET 悪性化のメカニズムの解明及び新規治療法の開発

PHLDA3・*MEN1* 二重欠損マウスを用いて膵 NET 悪性化のメカニズムを詳細に解析した。その結果、悪性化に伴って Akt-mTOR 経路が活性化され、細胞増殖シグナルが増強されていること、代謝に関連する遺伝子の発現が強く誘導されていることが明らかになった。また、マウスで得られた知見を基に、ヒト膵 NET 症例を解析したところ、マウス同様に Akt/mTOR 経路の活性化と代謝に関連する遺伝子の異常が認められた。さらに、関与する代謝経路を標的とした薬剤を用いることで、膵 NET 細胞の生存と増殖を効果的に抑制できることを明らかにした。

2. 膵 NET の肝転移マウスモデルの作製

同じ膵 NET 患者由来の原発巣・転移巣の細胞株を用いてゼノグラフトを作製した。また、これらの細胞を免疫不全マウスへ移植したところ、膵 NET の肝転移が認められた。さらに、*PHLDA3*・*MEN1* 二重欠損マウスから高悪性度膵 NET を分離・回収して、野生型マウスに移植した。現在、その肝転移の有無を検討している。

V 考 察

1. ヒト膵 NET 症例を用いてゲノム解析を行ったところ、多くの症例において遺伝性膵 NET の関連遺伝子である *MEN1* 遺伝子の機能喪失が認められている³⁾。しかし、*MEN1* の機能喪失は膵 NET 患者の悪性度及び予後とは関連しないことが明らかになった¹⁾。*MEN1* の機能欠損は膵 NET のイニシエーターであることが示された。また、ヒト膵 NET 症例において、Akt-mTOR 経路の変異が高頻度に認められることが明らかになった³⁾。この結果より、Akt-mTOR 経路の異常な活性化は膵 NET に寄与することが示された。*PHLDA3* は Akt の抑制因子であり、*PHLDA3* の機能喪失を伴った膵 NET 患者の腫瘍悪性度が高く、予後が悪いことが明らかになった^{1), 2)}。以上のことより、*PHLDA3* の欠損による Akt 経路の活性化が膵 NET の悪性化に関与すると考えられる。本研究では、ヒト膵 NET のゲノム異常を模倣した早期に高悪性度膵 NET を発生する *PHLDA3*・*MEN1* 二重欠損マウスを用い、膵 NET 悪性化の詳細なメカニズムを明らかにした。Akt 経路の活性化と代謝経路の変化が膵 NET の悪性化の進行に寄与することを見出した。Akt 経路の抑制剤と代謝経路の阻害剤を併用することが、膵 NET の有効な治療法となると予想される。今後、Akt 経路の抑制剤であるエベロリムスと代謝経路の阻害剤の奏効性を、*PHLDA3*・*MEN1* 二重欠損マウスを用いて検討する予定である。

2. 本研究で作製した膵 NET の肝転移モデルは、膵 NET の微小環境を再現しており、転移前後の膵 NET 細胞と炎症細胞・免疫細胞・線維芽細胞の相互作用を詳細に解析することが可能である。また、これまでに収集した膵 NET の症例の中には複数の同じ患者由

来の原発巣と転移巣が含まれている。今後、肝転移マウスモデルを用いて肝転移に関与する細胞やシグナル経路の異常などを解明し、さらに、肝転移患者の原発巣と転移巣を用いてマウスと同様な結果が得られるかを検証する予定である。

VI 結 語

膵 NET の罹患率は 20 年間に約 4 倍に上昇している。しかし、膵 NET は希少がんであるため、サンプルの収集が難しく、動物モデルの開発も遅れており、発生・悪性化のメカニズムは未だに解明されていない。膵 NET 治癒の可能性がある唯一の治療法は外科的切除であるが、肝臓やリンパ節に転移して複数の転移病変を有する患者に対しては手術切除が適用されないことが多い。膵 NET の治療薬として承認されている薬剤の大半は、無増悪生存期間や腫瘍縮小効果など客観的な効果がほとんどない。以上のことより、膵 NET の詳細な悪性化・転移のメカニズムの解明、及び手術以外の膵 NET の有効な治療法の開発が急務である。本研究では、膵 NET の悪性化に寄与する異なる経路の異常が明らかになり、最適な治療法の開発に結びつく結果が得られた。また、膵 NET の微小環境を正確に再現する肝転移マウスモデルの作製に成功した。今後、このマウスモデルの解析を通じて、膵 NET の肝転移メカニズムを先駆けて明らかにすることができる。

参考文献

- 1) Rieko Ohki, Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Yukie Aita, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiko Shibata and Hitoshi Nakagama.

PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. *PNAS*, 111(23): E2404-E2413, June 2014.

- 2) Yu Chen and Rieko Ohki. p53-PHLDA3-Akt Network: The Key Regulators of Neuroendocrine Tumorigenesis. *International journal of molecular sciences*, 21 (11), 4089, 2020.

- 3) Yuchen Jiao, Chanjuan Shi, Barish H Edil, Roeland F de Wilde, David S Klimstra, Anirban Maitra, Richard D Schulick, Laura H Tang, Christopher L Wolfgang, Michael A Choti, Victor E Velculescu, Luis A Diaz Jr, Bert Vogelstein, Kenneth W Kinzler, Ralph H Hruban, Nickolas Papadopoulos. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*, 331(6021): 1199-203, March 2011.