

201438122A

厚生労働科学研究委託費
(革新的がん医療実用化研究事業)

(委託業務題目) 希少がんである神経内分泌腫瘍の個別化医療開発に向けた
がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能解析

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 山口 陽子

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の革新的がん医療実用化研究委託事業による委託業務として、堀田知光が実施した平成26年度「希少がんである神経内分泌腫瘍の個別化医療開発に向けたがん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能解析（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） 希少がんである神経内分泌腫瘍の個別化医療開発に向けた がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能解析-----	4
山口 陽子	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後およびエベロリムスの効果の 関連の解析、PHLDA3 欠損マウスの異常の分析、PHLDA3 と MEN1 の両遺伝子 欠損マウスの解析-----	11
山口 陽子	
2. 収集した 50 症例のヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索-----	15
大木 理恵子	
3. 収集した 50 症例のヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索-----	18
山田 正三	
III. 学会等発表実績 -----	24
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	29

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

I. 委託業務成果報告書（総括）

希少がんである神経内分泌腫瘍の個別化医療開発に向けた
がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能解析

研究分担者 山口陽子 国立がん研究センター研究所 リサーチ・レジデント

研究要旨：大木らは PHLDA3 が肺や膵の神経内分泌腫瘍（NET）のがん抑制遺伝子として働く事、また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵NETは予後不良であることを明らかにした（Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009, Ohki# et al., PNAS, 2014）。このことから、PHLDA3 が膵NETの予後予測マーカーおよび薬剤選択の指標となりうるかを検討する。さらに、膵島の過形成を起こす PHLDA3 マウスと NET のがん抑制遺伝子である MEN1 ノックアウトマウスとを掛け合わせ、膵NETのモデルマウスの作成を試みる。また、これまでに、PHLDA3 欠損マウスが下垂体NETを形成することが示された。そこで、本研究では、PHLDA3 欠損マウス下垂体NETと、収集したヒト下垂体NETを解析し比較する事で、下垂体NETの治療・診断につながる結果を得る。（#は corresponding author。）

A. 研究目的

本研究の目的は、希少がんであるヒトの神経内分泌腫瘍 (NET) の症例解析とモデルマウスの作成を通して NET の治療と診断に貢献することである。

大木らは p53 標的遺伝子の解析から PHLDA3 を同定し、PHLDA3 が Akt の抑制を介して肺 NET のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした (Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009)。

NET は肺や内分泌器官などに生じる希少がんである。我々は希少な NET の中でも比較的解析が進んでいる膵 NET に着目し、PHLDA3 の機能を解析した。その結果、膵 NET においても PHLDA3 は高頻度な LOH を呈し、PHLDA3 の LOH をもつ膵 NET は予後不良であることがわかった (Ohki# et al., PNAS, 2014)。

肺と膵臓以外の NET について、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが我々の解析によってわかっている (未発表)。このことから、PHLDA3 は様々な臓器に発生する NET の共通のがん抑制遺伝子であることが考えられる。

本研究では、PHLDA3 が膵 NET の予後予測マーカーおよび薬剤選択の指標となりうるかを検討する。さらに、PHLDA3 ノックアウトマウスと NET のがん抑制遺伝子である MEN1 ノックアウトマウスとを掛け合わせ、NET のモデルマウスの作成を試みる。また、PHLDA3 欠損マウス下垂体 NET と、ヒト下垂体 NET を解析し比較する事で、下垂体 NET の治療・診断につながる結果を得る。

B. 研究方法

- ① ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後及びエベロリムスの効果の関連の解析を行った。後者はさらに、PHLDA3 欠損マウスへのエベロリムス投与によって検討する。
- ② PHLDA3 欠損マウスの異常の分析
- ③ PHLDA3 と MEN1 の両遺伝子欠損マウスの作製と解析
- ④ 下垂体 NET の収集

- ⑤ 収集したヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索
- ⑥ PHLDA3 欠損マウス下垂体 NET に生じた NET の詳細な分類

(倫理面への配慮)

当該研究を遂行するために、組換え DNA 実験、動物実験に対する審査を必要とするが、既に研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会、実験動物安全管理委員会の承認をそれぞれ得ている。しかしながら、実験に際しては、法律および「国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全管理規程」、「国立がん研究センター実験動物安全管理規程」および「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、細心の注意を払いながら組換え DNA 実験、動物実験を遂行した。特に、動物実験においては、動物愛護を配慮し、実験動物を最小限に留め、出来る限り苦痛が軽減されるよう十分に配慮した。がん組織における遺伝子発現・変異を解析するにあたって「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮した。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」そして「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守した。これらことから倫理面の問題はない。

C. 研究結果

- ① ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後及びエベロリムスの効果の関連の解析として、a-c を行った。
 - (a)膵 NET において、PHLDA3 の LOH が生じた患者の予後を予測できるか
 - (b)膵 NET の治療に使われている Akt 経路阻害剤エベロリムスの著効例と PHLDA3 の LOH の有無が関連するか
 - (c)膵ランゲルハンス島 (ラ島) の肥大が起こる PHLDA3 欠損マウスにエベロリムスを投与し、ラ島の大きさの指標としてエベロ

リムスの効果を判定

a, b に関しては症例数を増やして解析を進めている。

c に関してはマウスへのエベロリムス投与の条件検討を行っている。

② PHLDA3 欠損マウスの異常の分析

PHLDA3 欠損マウスでは膵臓ランゲルハンス島の過形成と下垂体 NET が観察されている。現在は下記の解析を進めている。

(a) PHLDA3 欠損マウスにおいて膵臓や下垂体以外の内分泌器官の異常の有無

(b) PHLDA3 欠損マウスの下垂体に生じた NET を産生するホルモンによって分類

a について、解剖時に各器官の観察を行い、異常が確認された器官のサンプルを収集している。

b について、マウス下垂体における産生ホルモン認識抗体を用いた染色の条件が決定した。

③ PHLDA3 と MEN1 の両遺伝子欠損マウスの作製と解析

膵 NET 症例の多くで PHLDA3 と MEN1 の LOH が観察されたことから、PHLDA3 と MEN1 を欠損したマウスを掛け合わせ、PHLDA3 と MEN1 の二重欠損マウスの作成に成功した。

現在、当該マウスにおけるラ島の面積や膵 NET のグレードの診断に用いられる ki67 陽性率を解析している。当該マウスでは PHLDA3 単独欠損マウスと比較して、ラ島の肥大および ki67 陽性率が高くなる傾向にある。

④ 下垂体 NET の収集

下垂体 NET は産生するホルモンによって分類される。これまでに収集した検体と合わせ、GH 産生型を 52 検体、PRL 産生型を 12 検体、TSH 産生型を 14 検体、ACTH 産生型を 21 検体、GH 産生型を 52 検体、非機能性の下垂体 NET を 60 検体、計 159 例を収集

した。

⑤ 収集したヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索

収集したヒト下垂体 NET 50 症例を収集し、ゲノム DNA を精製した。現在、a, b の解析を進めている。

(a) PHLDA3 遺伝子の LOH や、ORF 内の点突然変異があるか

(b) 産生するホルモンによって分類される下垂体 NET の種類に PHLDA3 遺伝子異常が関連するか

⑥ PHLDA3 欠損マウスの下垂体に生じた NET の詳細な分類

PHLDA3 欠損マウスでは膵臓ラ島の過形成と下垂体 NET が観察されている。現在は下記の解析を進めている。

(a) PHLDA3 欠損マウスの下垂体に生じた NET を産生するホルモンによって分類

D. 考察

ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後及びエベロリムスの効果の関連の解析については、希少がんである膵 NET 検体を増やすことで膵 NET の本態解明および治療法開発に着実に近づいていると言える。また、下垂体 NET においても PHLDA3 はがん抑制的に機能すると考えられる結果がマウスを用いた実験から得られており、今後より詳細に解析することで NET 共通の発がん機構の解明につながると考えられる。さらに PHLDA3/MEN1 欠損マウスの解析から、これらの遺伝子欠損が膵 NET の悪性化に相加的に働く可能性が示唆され、本マウスが膵 NET のモデルマウスとなることが期待できる。

PHLDA3 は下垂体 NET においてもがん抑制的に機能すると考えられる結果が、ヒトおよびマウスから得られており、今後より詳細に解析することで下垂体腫瘍の本態解明につながると考えられる。本研究では、希少な下垂体 NET を計 159 例収集した。また、特に希少な ACTH 産生型を 21 例、TSH

産生型の下垂体 NET を 14 例収集した。このような、特に希少な症例を含む希少がん検体の収集および解析は、希少がんの発症メカニズムの解明および治療法の開発を大きく推進すると期待できる。

E. 結論

PHLDA3 は肺や下垂体など、臓腑以外の NET においてもがん抑制的に機能するため、本研究は、NET 共通のがん抑制メカニズムの解明につながると考えられる。様々な器官に生じる NET を統合した解析が可能になれば、NET 研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。様々な器官に生じる NET を統合した解析が可能になれば、NET 研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- ① Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. **PNAS**, 111 (23), E2404-E2413, 2014.
- ② Iwata T, Tamanaha T, Koezuka R, Tochiya M, Makino H, Kishimoto I, Mizusawa N, Ono S, Inoshita N, Yamada S, Shimatsu A, Yoshimoto K. Germline deletion and a somatic mutation of the PRKAR1A gene in a Carney complex-related pituitary adenoma. *European Journal of Endocrinology*. 2015
- ③ Yamada S, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Takeshita A, Takeuchi Y, Ito J, Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg*. 2014.
- ④ Arihara Z, Sakurai K, Yamashita R, Niitsuma S, Ueno T, Yamamura N, Yamada S, Inoshita N, Takahashi K. Bromocriptine, a dopamine agonist, increases growth hormone secretion in a patient with acromegaly. *Tohoku J Exp Med*. 2014
- ⑤ Fukuhara N, Horiguchi K, Nishioka H, Suzuki H, Takeshita A, Takeuchi Y, Inoshita N, Yamada S. Short-term preoperative octreotide treatment for TSH-secreting pituitary adenoma. *Endocr J*. 2014.
- ⑥ Yamaguchi-Okada M, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S. Remote extradural haematomas following extended transsphenoidal surgery for a craniopharyngioma—a case report. *Br J Neurosurg*. 2014.
- ⑦ Nishioka H, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamada S. Aggressive transsphenoidal resection of tumors invading the cavernous sinus in patients with acromegaly: predictive factors, strategies, and outcomes. *J Neurosurg*. 2014. J

Neurosurg. 2014.

- ⑧ Nishioka H, Yamada S. Response. J Neurosurg. 2014.
- ⑨ Iwata T, Yamada S, Ito J, Inoshita N, Mizusawa N, Ono S, Yoshimoto K. A novel C-terminal nonsense mutation, Q315X, of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in a Japanese familial isolated pituitary adenoma family. Endocr Pathol. 2014.
- ⑩ Nakano-Tateno T, Tateno T, Hlaing MM, Zheng L, Yoshimoto K, Yamada S, Asa SL, Ezzat S. FGFR4 polymorphic variants modulate phenotypic features of Cushing disease. Mol Endocrinol. 2014.
- ⑪ Kobayashi N, Fukuhara N, Fukui T, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Yamada S. Clinical characteristics of streptococcus pneumoniae meningoencephalitis after transsphenoidal surgery: three case reports. Neurol Med Chir (Tokyo). 2014.
- ⑫ Oyama K, Kawana F, Suenaga K, Fukuhara N, Yamada S. A handmade eye movement monitor using a piezoelectric device during transsphenoidal surgery. Neurosurg Rev. 2014.

日本語論文

- ① 山口 陽子, 齊藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子. 新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* による Akt 経路の 制御機構と治療への展開 - 膵神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して-. **実験医学**, 2014 年 7 月 増刊号: 135-143.

2. 学会発表

- ① Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulated MYCN/ATM/p53 pathway. ポスター発表 0136. Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Atsuko Nakazawa, Sayaka Yoshida, Nobuhiro Akita, Osamu Shimozato, Atsushi Iwama, Akira Nakagawara. 16th International p53 workshop. 於: スウェーデン スtockホルム 国外
- ② PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. ポスター発表 P-3295 山口 陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木 理恵子 第73回日本癌学会年会 2014年9月27日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulated MYCN/ATM/p53 pathway.
- ③ 口頭発表 E-1029 上條 岳彦、大平 美紀、竹信 尚典、中川原 章、山口陽子. 第73回日本癌学会年会 2014年9月25日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- 1番染色体短腕にコードされる新規がん抑制遺伝子 DMAP1 は MYCN/ATM/p53 経路を制御する. プレナリーセッションにおける口頭発表 (優秀演題賞) PS-3 山口陽子、竹信 尚典、大平 美紀、秋田 直洋、中川原 章、上條 岳彦. 第56日本小児血液・がん学会学術集会 2014年9月25日. 於: 岡山県岡山市 国内
- ④ Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である. ポスター 基礎研究 P1-1 大木理恵子 第2回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会. 2014年9月20日. 於: 東京都文京区 国内
- ⑤ PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of

- neuroendocrine tumors. シンポジウム
発表 SS-6 大木理恵子 日本癌学会
年会 2014年9月27日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- ⑥ PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である. ポスター発表 P-3295 山口 陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木理恵子 日本癌学会年会 2014年9月27日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- ⑦ Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である 口頭発表 大木理恵子 アステラス病態代謝研究会 2014年10月18日. 於: 東京都中央区 国内
- ⑧ PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日独がんワークショップ 2014年11月15日. 於: ドイツベルリン 国外
- ⑨ PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日韓がんワークショップ 2014年11月29日. 於: 韓国済州島 国外
- ⑩ 先端巨大症: 術前術後の諸問題、山田正三、第1回スキルアップセミナー 2014. 2. 1、国内
- ⑪ 間脳下垂体疾患の外科治療-過去・現在・未来-、山田正三、第70回臨床内分泌研究会、2014. 2. 7、国内
- ⑫ 拡大経鼻手術による頭蓋咽頭腫の外科治療、山田正三、第6回東海脳腫瘍手術手技研究会、2014. 4. 12、国内
- ⑬ My surgical strategy and technique of transsphenoidal surgery、Shozo Yamada、The 1th Asian-Pacific Transsphenoidal Surgery Hands-on Workshop、2014. 6. 13、国
- ⑭ Transsphenoidal approach with its extension、Shozo Yamada、The 1th Asian-Pacific Transsphenoidal Surgery Hands-on Workshop、2014. 6. 13、国外
- ⑮ 下垂体腫瘍の外科治療: 過去・現在・未来、山田正三、第23回秋田県内分泌研究会、2014. 7. 4、国内
- ⑯ 下垂体腫瘍に対する治療戦略、山田正三、第1回下垂体セミナー、2014. 7. 18、国内
- ⑰ クッシング病の診断と外科治療、山田正三、第19回内分泌クリニカルカンファレンス、2014. 7. 26、国内
- ⑱ 先端巨大症~病理所見から見た臨床へのアプローチ~、山田正三、Pfizer Endocrinology Forum、2014、2014. 8. 31、国内
- ⑲ アクロメガリー診療・10年の進歩と展望/外科の立場から、山田正三、第10回アクロメガリーフォーラム、2014. 10. 4、国内
- ⑳ 下垂体腫瘍術後のGH分泌不全症の病態と治療、山田正三、第24回臨床内分泌代謝 Update イブニングセミナー、2014. 11. 28、国内

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず
2. 実用新案登録
該当せず
3. その他
該当せず

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

II-1. 委託業務成果報告書（業務項目）

ヒト膵NETにおけるPHLDA3のLOHと予後およびエベロリムスの効果の関連の解析

PHLDA3欠損マウスの異常の分析

PHLDA3とMEN1の両遺伝子欠損マウスの解析

研究分担者 山口陽子 国立がん研究センター研究所 リサーチ・レジデント

研究要旨：大木らは PHLDA3 が肺や膵の神経内分泌腫瘍（NET）のがん抑制遺伝子として働く事、また、PHLDA3 遺伝子を欠損した膵NETは予後不良であることを明らかにした（Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009, Ohki# et al., PNAS, 2014）。このことから、PHLDA3 が膵NETの予後予測マーカーおよび薬剤選択の指標となりうるかを検討する。さらに、膵島の過形成を起こす PHLDA3 マウスと NET のがん抑制遺伝子である MEN1 ノックアウトマウスとを掛け合わせ、膵NETのモデルマウスの作成を試みる。（#は corresponding author。）

A. 研究目的

本研究の目的は、希少がんであるヒトの神経内分泌腫瘍 (NET) の症例解析とモデルマウスの作成を通して NET の治療と診断に貢献することである。

大木らは p53 標的遺伝子の解析から PHLDA3 を同定し、PHLDA3 が Akt の抑制を介して肺 NET のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした (Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009)。

NET は肺や内分泌器官などに生じる希少がんである。我々は希少な NET の中でも比較的解析が進んでいる膵 NET に着目し、PHLDA3 の機能を解析した。その結果、膵 NET においても PHLDA3 は高頻度な LOH を呈し、PHLDA3 の LOH をもつ膵 NET は予後不良であることがわかった (Ohki# et al., PNAS, 2014)。

肺と膵臓以外の NET について、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが我々の解析によってわかっている (未発表)。このことから、PHLDA3 は様々な臓器に発生する NET の共通のがん抑制遺伝子であることが考えられる。

本研究では、PHLDA3 が膵 NET の予後予測マーカーおよび薬剤選択の指標となりうるかを検討する。さらに、PHLDA3 ノックアウトマウスと NET のがん抑制遺伝子である MEN1 ノックアウトマウスとを掛け合わせ、NET のモデルマウスの作成を試みる。

B. 研究方法

- ① ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後及びエベロリムスの効果の関連の解析を行った。後者はさらに、PHLDA3 欠損マウスへのエベロリムス投与によって検討する。
- ② PHLDA3 欠損マウスの異常の分析
- ③ PHLDA3 と MEN1 の両遺伝子欠損マウスの作製と解析
(倫理面への配慮)

当該研究を遂行するために、組換え DNA 実験、動物実験に対する審査を必要とするが、既に研究機関の遺伝子組換え実験安全委員

会、実験動物安全管理委員会の承認をそれぞれ得ている。しかしながら、実験に際しては、法律および「国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全管理規程」、「国立がん研究センター実験動物安全管理規程」および「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、細心の注意を払いながら組換え DNA 実験、動物実験を遂行した。特に、動物実験においては、動物愛護を配慮し、実験動物を最小限に留め、出来る限り苦痛が軽減されるよう十分に配慮した。がん組織における遺伝子発現・変異を解析するにあたって「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮した。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」そして「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守した。これらのことから倫理面の問題はない。

C. 研究結果

- ① ヒト膵 NET における PHLDA3 の LOH と予後及びエベロリムスの効果の関連の解析として、a-c を行った。
 - (a)膵 NET において、PHLDA3 の LOH が生じた患者の予後を予測できるか
 - (b)膵 NET の治療に使われている Akt 経路阻害剤エベロリムスの著効例と PHLDA3 の LOH の有無が関連するか
 - (c)膵ランゲルハンス島 (ラ島) の肥大が起こる PHLDA3 欠損マウスにエベロリムスを投与し、ラ島の大きさの指標としてエベロリムスの効果を判定

a, b に関しては症例数を増やして解析を進めている。
c に関してはマウスへのエベロリムス投与の条件検討を行っている。

- ② PHLDA3 欠損マウスの異常の分析
PHLDA3 欠損マウスでは膵臓ランゲルハンス

島の過形成と下垂体NETが観察されている。現在は下記の解析を進めている。

(a)PHLDA3 欠損マウスにおいて膵臓や下垂体以外の内分泌器官の異常の有無

aについて、解剖時に各器官の観察を行い、異常が確認された器官のサンプルを収集している。

③ PHLDA3 と MEN1 の両遺伝子欠損マウスの作製と解析

膵NET症例の多くでPHLDA3 と MEN1 のLOHが観察されたことから、PHLDA3 と MEN1 を欠損したマウスを掛け合わせ、PHLDA3 と MEN1 の二重欠損マウスの作成に成功した。

現在、当該マウスにおけるラ島の面積や膵NETのグレードの診断に用いられるki67陽性率を解析している。当該マウスではPHLDA3 単独欠損マウスと比較して、ラ島の肥大およびki67陽性率が高くなる傾向にある。

D. 考察

ヒト膵NETにおけるPHLDA3のLOHと予後及びエベロリムスの効果の関連の解析については、希少がんである膵NET検体を増やすことで膵NETの本態解明および治療法開発に着実に近づいていると言える。また、下垂体NETにおいてもPHLDA3はがん抑制的に機能すると考えられる結果がマウスを用いた実験から得られており、今後より詳細に解析することでNET共通の発がん機構の解明につながると考えられる。さらにPHLDA3/MEN1欠損マウスの解析から、これらの遺伝子欠損が膵NETの悪性化に相加的に働く可能性が示唆され、本マウスが膵NETのモデルマウスとなることが期待できる。

E. 結論

PHLDA3は肺や下垂体など、膵臓以外のNETにおいてもがん抑制的に機能するため、本研究は、NET共通のがん抑制メカニズムの解明につながると考えられる。様々な器官

に生じるNETを統合した解析が可能になれば、NET研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

日本語論文

- ① 山口陽子, 齊藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子. 新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* によるAkt経路の制御機構と治療への展開 -膵神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して-. **実験医学**, 2014年7月増刊号: 135-143.

2. 学会発表

- ① Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulated MYCN/ATM/p53 pathway. ポスター発表 0136. Yohko Yamaguchi, Hisanori Takenobu, Miki Ohira, Atsuko Nakazawa, Sayaka Yoshida, Nobuhiro Akita, Osamu Shimozato, Atsushi Iwama, Akira Nakagawara. 16th International p53 workshop. 於: スウェーデン スtockホルム 国外
- ② PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. ポスター発表 P-3295 山口陽子, 陳 ヨ, 西川 雷羅, 峯岸 舞子, 大木 理恵子 第73回日本癌学会年会 2014年9月27日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- ③ Novel 1p tumor suppressor DMAP1 regulated MYCN/ATM/p53 pathway. 口頭発表 E-1029 上條 岳彦, 大平 美紀, 竹信 尚典, 中川原 章, 山口陽子. 第73回日本癌学会年会 2014年9月25日. 於: 神奈川県横浜市 国内
- ④ 1番染色体短腕にコードされる新規が

ん抑制遺伝子 DMAP1 は MYCN/ATM/p53 経路を制御する. プレナリーセッションにおける口頭発表(優秀演題賞) PS-3 山口陽子、竹信 尚典、大平 美紀、秋田 直洋、中川原 章、上條 岳彦. 第 56 日本小児血液・がん学会学術集会 2014 年 9 月 25 日. 於:岡山県岡山市 国内

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず
2. 実用新案登録
該当せず
3. その他
該当せず

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

II-2. 委託業務成果報告書（業務項目）

収集した 50 症例のヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索

研究分担者 大木理恵子 国立がん研究センター研究所 主任研究員

研究要旨：大木らは PHLDA3 が肺や膵の神経内分泌腫瘍（NET）のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした（Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009, Ohki# et al., PNAS, 2014）。また、これまでに、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが示された。そこで、本研究では、PHLDA3 欠損マウスの下垂体 NET と、既に収集した 50 症例のヒト下垂体 NET を解析し比較する事で、下垂体 NET の治療・診断につながる結果を得る。

A. 研究目的

本研究の目的は、希少がんであるヒトの神経内分泌腫瘍 (NET) の症例解析とモデルマウスの作成を通して NET の治療と診断に貢献することである。

大木らは p53 標的遺伝子の解析から PHLDA3 を同定し、PHLDA3 が Akt の抑制を介して肺 NET のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした (Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009)。

NET は肺や内分泌器官などに生じる希少がんである。我々は希少な NET の中でも比較的解析が進んでいる膵 NET に着目し、PHLDA3 の機能を解析した。その結果、膵 NET においても PHLDA3 は高頻度な LOH を呈し、PHLDA3 の LOH をもつ膵 NET は予後不良であることがわかった (Ohki# et al., PNAS, 2014)。

肺と膵臓以外の NET について、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが我々の解析によってわかっている (未発表)。本研究では、PHLDA3 欠損マウス下垂体 NET と、既に収集した 50 症例のヒト下垂体 NET を解析し比較する事で、下垂体 NET の治療・診断につながる結果を得る。

B. 研究方法

(1) 収集した 50 症例のヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索

(2) PHLDA3 欠損マウスの異常の分析

(i) 下垂体に生じた NET の詳細な分類 (倫理面への配慮)

当該研究を遂行するために、組換え DNA 実験、動物実験に対する審査を必要とするが、既に研究機関の遺伝子組換え実験安全委員会、実験動物安全管理委員会の承認をそれぞれ得ている。しかしながら、実験に際しては、法律および「国立がん研究センター遺伝子組換え実験安全管理規程」、「国立がん研究センター実験動物安全管理規程」および「国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針」を遵守し、細心の注意を払いながら組換え DNA 実験、動物実験を遂行した。特に、動物実験においては、

動物愛護を配慮し、実験動物を最小限に留め、出来る限り苦痛が軽減されるよう十分に配慮した。がん組織における遺伝子発現・変異を解析するにあたって「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、虎ノ門病院倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮した。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」そして「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守した。これらのことから倫理面の問題はない。

C. 研究結果

①ヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索

収集したヒト下垂体 NET 50 症例を収集し、ゲノム DNA を精製した。現在、a, b の解析を進めている。

(a) PHLDA3 遺伝子の LOH や、ORF 内の点突然変異があるか

(b) 産生するホルモンによって分類される下垂体 NET の種類に PHLDA3 遺伝子異常が関連するか

③PHLDA3 欠損マウスの異常の分析

PHLDA3 欠損マウスでは膵臓ラ島の過形成と下垂体 NET が観察されている。現在は下記の解析を進めている。

(a) PHLDA3 欠損マウス下垂体に生じた NET を産生するホルモンによって分類

D. 考察

PHLDA3 は下垂体 NET においてもがん抑制的に機能すると考えられる結果が、ヒトおよびマウスから得られており、今後より詳細に解析することで下垂体腫瘍の本態解明につながると考えられる。

E. 結論

PHLDA3 は肺や下垂体など、膵臓以外の NET においてもがん抑制的に機能するため、本研究は、NET 共通のがん抑制メカニズムの

解明につながると考えられる。様々な器官に生じる NET を統合した解析が可能になれば、NET 研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- ① Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase³, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. **PNAS**, 111 (23), E2404-E2413, 2014.

日本語論文

- ① 山口 陽子, 齊藤 梢, 陳 ヨ, 大木 理恵子. 新規がん抑制遺伝子 *PHLDA3* による Akt 経路の 制御機構と治療への展開 -膵神経内分泌腫瘍の個別化医療開発を目指して-. **実験医学**, 2014 年 7 月 増刊号: 135-143.

2. 学会発表

- ① Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である. ポスター 基礎研究 P1-1 大木理恵子 第 2 回日本神経内分泌腫瘍研究会学術集会. 2014 年 9 月 20 日. 於: 東京都文京区 国内
- ② PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt

and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. シンポジウム発表 SS-6 大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日. 於: 神奈川県横浜市 国内

- ③ PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である. ポスター発表 P-3295 山口 陽子、陳 ヨ、西川 雷羅、峯岸 舞子、大木理恵子 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日. 於: 神奈川県横浜市 国内

- ④ Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である 口頭発表 大木理恵子 アステラス病態代謝研究会 2014 年 10 月 18 日. 於: 東京都中央区 国内

- ⑤ PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日独がんワークショップ 2014 年 11 月 15 日. 於: ドイツベルリン 国外

- ⑥ PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日韓がんワークショップ 2014 年 11 月 29 日. 於: 韓国済州島 国外

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当せず
2. 実用新案登録
該当せず
3. その他
該当せず

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）

II-3. 委託業務成果報告書（業務項目）

収集した 50 症例のヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索

研究分担者 山田正三 国家公務員共済組合連合会虎の門病院間脳下垂体外科

副院長・内分泌センターセンター長・間脳下垂体外科部長

研究要旨：大木らは PHLDA3 が肺や膵の神経内分泌腫瘍（NET）のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした（Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009, Ohki# et al., PNAS, 2014）。また、これまでに、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが示された。そこで、本研究では、PHLDA3 欠損マウス下垂体 NET と、ヒト下垂体 NET を解析し比較する事で、下垂体 NET の治療・診断につながる結果を得る。（#は corresponding author。）

A. 研究目的

本研究の目的は、希少がんであるヒトの神経内分泌腫瘍（NET）の症例解析とモデルマウスの作成を通してNETの治療と診断に貢献することである。

大木らは p53 標的遺伝子の解析から PHLDA3 を同定し、PHLDA3 が Akt の抑制を介して肺 NET のがん抑制遺伝子として働く事を明らかにした (Kawase, Ohki# et al., Cell, 2009)。

NET は肺や内分泌器官などに生じる希少がんである。我々は希少な NET の中でも比較的研究が進んでいる膵 NET に着目し、PHLDA3 の機能を解析した。その結果、膵 NET においても PHLDA3 は高頻度な LOH を呈し、PHLDA3 の LOH をもつ膵 NET は予後不良であることがわかった (Ohki# et al., PNAS, 2014)。

肺と膵臓以外の NET について、PHLDA3 欠損マウスが下垂体 NET を形成することが我々の解析によってわかっている (未発表)。本研究では、PHLDA3 欠損マウス下垂体 NET と、ヒト下垂体 NET を解析し比較する事で、下垂体 NET の治療・診断につながる結果を得る。ヒト下垂体 NET はこれまでに 50 症例を収集しており、本研究ではさらにヒト下垂体 NET 検体を収集する。

B. 研究方法

ヒト下垂体 NET 検体を収集した。

(倫理面への配慮)

がん組織における遺伝子発現・変異を解析するにあたって「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して、虎ノ門病院倫理審査委員会の承認のもと試料等提供者の人権とプライバシーを保障しつつ研究を進めた。また、研究成果報告の際には、個人情報公開されないように配慮した。すべての研究は、「個人情報保護法」ならびに「疫学指針」そして「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」を遵守した。これらのことから倫理面の問題は無い。

C. 研究結果

下垂体 NET は産生するホルモンによって分類される。これまでに収集した検体と合わせ、GH 産生型を 52 検体、PRL 産生型を 12 検体、TSH 産生型を 14 検体、ACTH 産生型を 21 検体、GH 産生型を 52 検体、非機能性の下垂体 NET を 60 検体、計 159 例を収集した。

D. 考察

本研究では、希少な下垂体 NET を計 159 例収集した。また、特に希少な ACTH 産生型を 21 例、TSH 産生型下垂体 NET を 14 例収集した。このような、特に希少な症例を含む希少がん検体の収集および解析は、希少がんの発症メカニズムの解明および治療法の開発

を大きく推進すると期待できる。

E. 結論

PHLDA3 は肺や下垂体など、腭臓以外の NET においてもがん抑制的に機能するため、本研究は、NET 共通のがん抑制メカニズムの解明につながると考えられる。様々な器官に生じる NET を統合した解析が可能になれば、NET 研究とそれに続く創薬や治療法の開発が加速すると予想される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

- ① Iwata T, Tamanaha T, Koezuka R, Tochiya M, Makino H, Kishimoto I, Mizusawa N, Ono S, Inoshita N, Yamada S, Shimatsu A, Yoshimoto K. Germline deletion and a somatic mutation of the PRKAR1A gene in a Carney complex-related pituitary adenoma. *European Journal of Endocrinology*. 2015
- ② Yamada S, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamaguchi-Okada M, Nishioka H, Takeshita A, Takeuchi Y, Ito J, Inoshita N. Clinicopathological characteristics and therapeutic outcomes in thyrotropin-secreting pituitary adenomas: a single-center study of 90 cases. *J Neurosurg*. 2014.
- ③ Arihara Z, Sakurai K, Yamashita R, Niitsuma S, Ueno T, Yamamura N, Yamada S, Inoshita N, Takahashi K. Bromocriptine, a dopamine agonist, increases growth hormone secretion in a patient with acromegaly. *Tohoku J Exp Med*. 2014
- ④ Fukuhara N, Horiguchi K, Nishioka H, Suzuki H, Takeshita A, Takeuchi Y, Inoshita N, Yamada S. Short-term preoperative octreotide treatment for TSH-secreting pituitary adenoma. *Endocr J*. 2014.
- ⑤ Yamaguchi-Okada M, Fukuhara N, Nishioka H, Yamada S. Remote extradural haematomas following extended transsphenoidal surgery for a craniopharyngioma--a case report. *Br J Neurosurg*. 2014.
- ⑥ Nishioka H, Fukuhara N, Horiguchi K, Yamada S. Aggressive transsphenoidal resection of tumors invading the cavernous sinus in patients with acromegaly: predictive factors, strategies, and outcomes. *J Neurosurg*. 2014. *J Neurosurg*. 2014.
- ⑦ Nishioka H, Yamada S. Response. *J Neurosurg*. 2014.