

令和5年度 TR 事業研究奨励助成金

研究成果報告書

2024年04月30日提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 陳 好

研究課題：
(テーマ)

非機能性膵神経内分泌腫瘍の肝転移メカニズム解明と新規治療標的の同定

研究期間： 自 2023年04月01日
至 2024年03月31日

研究指導者：氏名 大木 理恵子

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) 期間中の研究について

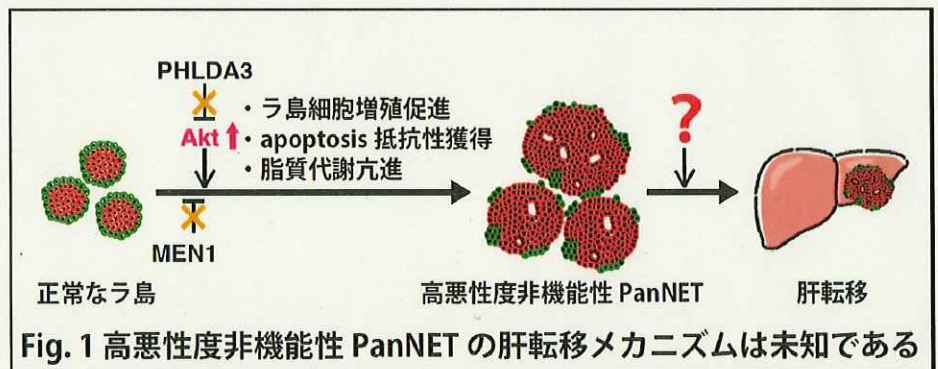
1) 要旨

日本人が高頻度に発症する非機能性膵臓神経内分泌腫瘍 (pancreatic neuroendocrine tumor: PanNET) は肝臓やリンパ節に転移することが多く、肝転移を伴った場合の5年生存率は約50%であり、予後不良であることが報告された。しかし、非機能性 PanNET は患者由来の細胞株が欠如していること、適切な実験動物モデルがないことによって肝転移の詳細なメカニズムは解明されていない。本研究では、非機能性 PanNET の肝転移モデルの樹立及び解析を介して肝転移に関わる特有の遺伝子、シグナル経路及び代謝経路の解明を進めた。本研究によって、今まで未解明であった非機能性 PanNET の肝転移に関わるメカニズムの解明に加え、治療法の限られている肝転移非機能性 PanNET の治療標的及び特効治療法の開発につながる成果を得た。

2) 序 (Fig.1 参照)

膵臓神経内分泌腫瘍 (PanNET) は膵臓の神経内分泌組織ランゲルハンス島 (ラ島) に由来する腫瘍である。ラ島細胞はホルモンやペプチドを分泌する機能がある。PanNET はホルモンなどの過剰分泌による内分泌症状のある機能性 PanNET と内分泌症状のない非機能性 PanNET に分類される。これまでの研究により、日本人は非機能性 PanNET の発症率が高く、PanNET 全体の約9割に占めていることが明らかになっている。非機能性 PanNET は肝臓やリンパ節に転移することが多く、特に高悪性度の場合は約50%と高い頻度で肝転移が認められる。さらに、肝転移を伴った場合の5年生存率は約50%であり、予後不良であることが報告された。しかし、非機能性 PanNET

は患者由来の細胞株が欠如していること、適切な実験動物モデルがないことによって肝転移の詳細なメカニズムは解明されていないため、転移のリスク因子 (すなわち PanNET の悪性化マーカー) 及び最適な治療法は未だに同定されていない。



我々はこれまでにヒトの PanNET 症例において、PHLDA3 は高頻度にヘテロ接合性の喪失 (LOH) に加えてメチル化という two-hit によって不活化されており、PanNET の新規がん抑制遺伝子であること、さらには PHLDA3 の機能喪失は PanNET 患者の腫瘍悪性度及び予後と関連することを明らかにした (Ohki, Saito, Chen et al., PNAS, 2014; Sakata, Yamaguchi, Chen et al., PloS One, 2017)。一方、PanNET においては、がん抑制遺伝子 MEN1 の LOH 及び点突然変異が高頻度に認められることが知られている。我々は、半数以上のヒト PanNET 症例において、PHLDA3 と MEN1 両遺伝子の LOH が同時に認められることを明らかにした。このことから、PHLDA3・MEN1 両遺伝子の同時機能喪失が PanNET 発症に必須であると考えられる。

さらに、我々は、ヒト PanNET のゲノム異常を模倣して PHLDA3 と MEN1 を同時に欠損した (DKO) マウスモデルを作製した。DKO マウスでは、早期に高悪性度の非機能性 PanNET を発症することが示された。また、DKO マウスを用いて PanNET の発症メカニズムを詳細に解析したところ、悪性化に伴って Akt 経路、脂質代謝経路及びラ島細胞機能制御関連経路の異常が認められることが示された (未発表データ)。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と考えられる。

3) 実験方法

① 樹立した肝転移マウスモデルを用い、肝転移巣及び原発巣の空間的トランスクリプトミクス解析と一細胞解析を行い、肝転移に関わる遺伝子及び各細胞の相互作用を解析する。

3匹の肝転移マウスモデルを用いて原発巣及び肝転移巣の空間的トランスクリプトミクス解析を行い、それぞれの遺伝子発現地図を作成する。各細胞の位置情報を維持したまま原発巣及び肝転移巣における遺伝子発現の変動を解析し、肝転移に寄与する細胞群を同定する。また、同定した細胞群の局在位置を解析し、肝転移の腫瘍微小環境における機能及び他の細胞との相互作用を評価する。

② ヒト非機能性 PanNET 肝転移巣及び原発巣の空間的トランスクリプトミクス解析を行い、肝転移を促進する因子を同定する。

これまでに収集したヒト非機能性 PanNET 症例の原発巣及び肝転移巣を用いて空間的トランスクリプトミクス解析を行い、肝転移マウスモデルで得られた結果を患者症例で検証する。マウスモデル及びヒト症例の解析結果を統合して非機能性 PanNET 肝転移のがん微小環境の特徴及び肝転移のリスク因子を探索する。

③ 非機能性 PanNET 肝転移マウスモデルを用いて治療薬の奏功性を検討する。

ヒト非機能性 PanNET 細胞株とその細胞を用いた肝転移マウスモデルを使い、原発巣及び肝転移巣に対して既存治療薬であるエベロリムスの薬効試験を行う。

4) 結果

① 肝転移マウスモデルを用い、肝転移巣及び原発巣の空間的トランスクリプトミクス解析と一細胞解析を行い、肝転移に関わる遺伝子及び各細胞の相互作用を解析する。

我々はヒト非機能性 PanNET の細胞株を用いて異種同所移植することで肝転移モデルを樹立した (Fig.2 参照)。さらに、この肝転移マウスモデルを用いて原発巣及び肝転移巣の空間的トランスクリプトミクス解析を行い、それぞれの遺伝子発現地図を作成した。現在、原発巣及び肝転移巣の各細胞における遺伝子発現の変動を解析しているところである。

② ヒト非機能性 PanNET 肝転移巣及び原発巣の空間的トランスクリプトミクス解析を行い、肝転移を促進する因子を同定する。

非機能性 PanNET 同一患者の原発巣及び肝転移巣を全国から収集している。また、収集した一部の原発巣及び肝転移巣を用いて空間的トランスクリプトミクス解析を行っているところである。

③ 非機能性 PanNET 肝転移マウスモデルを用いて治療薬の奏功性を検討する。

ヒト非機能性 PanNET 細胞株に既存治療薬であるエベロリムスを処理して細胞の増殖について調べた。その結果、細胞の増殖が抑制されていることが明らかになった。現在、肝転移マウスモデルにエベロリムスを週2回で経口投与しているところである。

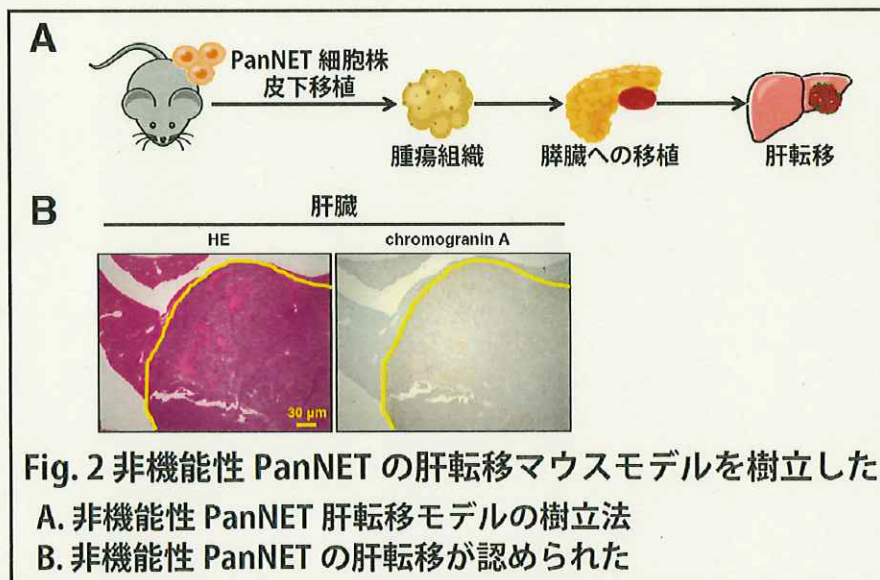


Fig. 2 非機能性 PanNET の肝転移マウスモデルを樹立した

A. 非機能性 PanNET 肝転移モデルの樹立法

B. 非機能性 PanNET の肝転移が認められた

5) 考察

ヒト非機能性 PanNET は希少がんであり、症例の収集が非常に困難である。今まで非機能性 PanNET の肝転移マウスモデルが存在しなかったため、患者症例を用いることは唯一の研究手段であり、肝転移の研究が大幅に遅れている。我々はヒト非機能性 PanNET の細胞株を用いて異種同所移植することで肝転移モデルを樹立した。このマウスモデルを用いることより、サンプルの収集に時間がかかる非機能性 PanNET 肝転移のメカニズム解明を効率よく行うことが可能となった。また、肝転移マウスモデルの解析を通じて、肝転移に寄与する細胞群の同定が可能となった。今後、同定した細胞群の局在位置を解析し、肝転移の腫瘍微小環境における機能及び他の細胞との相互作用を評価する予定である。さらに、肝転移マウスモデルで得られた結果を患者症例で検証して、マウスモデル及びヒト症例の解析結果を統合して非機能性 PanNET 肝転移のがん微小環境の特徴及び肝転移のリスク因子を探索する予定である。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

がん細胞によって形成されるがん微小環境は正常組織と異なる免疫系細胞、血管系細胞や線維芽細胞など様々な細胞によって構成され、腫瘍の進行を促進する。また、がん微小環境を構成する細胞の相互作用はがんの浸潤・転移に深く関わっている。臨床で使用されている抗がん剤の多くはがん細胞を標的としており、これらの薬剤への耐性にはがん微小環境が関与している可能性が考えられる。本研究の成果は、非機能性 PanNET 肝転移のがん微小環境の機能及び肝転移メカニズムの解明に結びつく結果が得られた。これは今後非機能性 PanNET 肝転移の研究を推進するための重要な一歩である。