

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Functional analysis of tumor suppressor gene PHLDA3 to develop
tailor-made therapy for neuroendocrine tumor defined as a rare cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター、希少がん研究分野、リサーチ・
レジデント、山口 陽子
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Research Institute, Division of Rare Cancer,
Research resident, Yohko Yamaguchi
- 実施期間： 平成26年 7月11日 ～ 平成29年3月31日
- 分担研究 (日本語) 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
- 開発課題名： (英語) Functional analysis of tumor suppressor gene PHLDA3 to develop
tailor-made therapy for neuroendocrine tumor defined as a rare cancer
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター、希少がん研究分野、
主任研究員、大木 理恵子
- 所属 役職 氏名： (英語) National Cancer Center Research Institute, Division of Rare Cancer,
Group leader, Rieko Ohki
- 分担研究 (日本語) ヒト下垂体 NET における PHLDA3 遺伝子異常の探索
- 開発課題名： (英語) Assessing gene alteration of PHLDA3 in human pituitary tumor
- 研究開発分担者 (日本語) 国家公務員共済組合連合会虎の門病院 副院長・内分泌センター
センター長・間脳下垂体外科部長 山田 正三

所属 役職 氏名：（英 語） Toranomon Hospital, Department of hypothalamic & pituitary surgery,
Visa president of the hospital/ Director of Endocrine Center/ Head
of the department of hypothalamic & pituitary surgery

II. 成果の概要（総括研究報告）

【背景と目的】

我々は p53 標的遺伝子の解析から PHLDA3 を同定し、PHLDA3 ががん遺伝子 Akt の活性化阻害を介して肺の神経内分泌腫瘍（neuroendocrine tumor; 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 は全身の内分泌器官に生じる希少がんである。我々が膵 NET に着目し、PHLDA3 の機能を解析した結果、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）。膵 NET の予後と関連をもつ遺伝子は過去に報告が無く、PHLDA3 は予後予測マーカーとなる可能性が高い。

PHLDA3 が肺と膵臓の NET のがん抑制遺伝子として機能していることから、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た。このことから本研究では、下垂体 NET の診断・治療の開発を目的に、NET を生じる内分泌器官である下垂体における PHLDA3 の機能解析を行った。具体的には、ヒト下垂体 NET（下垂体腺腫）を収集・解析し PHLDA3 の遺伝子異常を解析した。また、PHLDA3 欠損マウス下垂体に NET が生じるかを解析した。

【方法】

- (1) ヒト下垂体 NET（下垂体腺腫）検体を希少な症例を含む 237 症例収集した。
- (2) 収集したヒト下垂体 NET 検体において PHLDA3 の LOH 解析を行った。
- (3) PHLDA3 プロモーターのメチル化解析を行った。
- (4) 収集したヒト下垂体 NET 検体において PHLDA3 ORF 内の変異解析を行った。
- (5) 下垂体 NET において観察された PHLDA3 変異体の Akt 活性抑制能について機能解析を行った。
- (6) 収集したヒト下垂体 NET 検体において MEN1 の LOH 解析を行い、PHLDA3 の LOH、遺伝子変異との関連を解析した。
- (7) Whole exome sequencing と RNA sequencing を行い、PHLDA3、MEN1 の LOH 以外の、主要がん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異の有無や発現量を解析した。
- (8) PHLDA3 欠損マウス下垂体標本の収集を行い、特に異常の認められたものについては HE 染色及び下垂体産生ホルモン認識抗体による免疫染色を行った。

【結果と考察】

以上の解析から、PHLDA3 遺伝子が下垂体 NET において重要ながん抑制遺伝子であることを示唆する結果を得た。

PHLDA3 は様々な NET においてがん抑制的に機能すると考えられ、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。各種の 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期待できる。

[Background and Purpose]

We clarified that PHLDA3 is a target gene of p53 and acts as a tumor suppressor gene via inhibition of Akt activation in lung NET (neuroendocrine tumor; Kawase, Ohki et al., Cell, 2009).

NET is a rare cancer occurring in endocrine organs of the whole body. We focused on pancreatic NET and analyzed the function of PHLDA3. As a result, PHLDA3 LOH was frequent and was correlated poor prognosis of pancreatic NET (Ohki et al., PNAS, 2014). Since any genes associated with the prognosis of pancreatic NET had not been reported, PHLDA3 is an important candidate for prognostic marker of pancreatic NET.

From the observation of PHLDA3 gene suppression and function in lung NET and pancreatic NET, we considered that PHLDA3 is a common tumor suppressor gene of various NET. Therefore, in this study, we analyzed the function of PHLDA3 in the pituitary gland an endocrine organ and origin of NET to create new diagnosis and therapy for pituitary NET. Specifically, human pituitary NET (pituitary adenoma) was collected and analyzed, and genetic abnormality of PHLDA 3 was analyzed. We also analyzed whether NET occurs in the pituitary gland of PHLDA3 deficient mice.

【Method】

- (1) 237 specimens of human pituitary NET (pituitary adenomas) including rare cases were collected.
- (2) LOH analysis of PHLDA3 was performed on the human pituitary NET specimens.
- (3) Methylation status of PHLDA3 promoter was analyzed.
- (4) Mutation in PHLDA3 ORF was analyzed on collected the human pituitary NET specimens.
- (5) Function of mutant PHLDA3 found in pituitary NET on Akt suppression was analyzed.
- (6) LOH analysis of MEN1 was performed on the human pituitary NET specimens, and the association with PHLDA3 LOH and gene mutation was analyzed.
- (7) Whole exome sequencing and RNA sequencing were performed to analyze the presence or absence and expression level of mutations in major tumor genes and tumor suppressor genes in addition to LOH of PHLDA3 and MEN1.
- (8) Pituitary specimens of PHLDA3-deficient mice were collected, and HE staining and immunohistochemistry with anti-pituitary hormone antibodies were carried out, when abnormality was observed.

【Results and Discussion】

From the above analysis, we obtained results suggesting that PHLDA3 gene may be an important tumor suppressor gene in pituitary NET.

PHLDA3 seems to be a common tumor suppressor in various NETs and this research would elucidate common oncogenic mechanism of NETs. If so, it will be expected that development of drug and therapy of NET will be accelerated.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1 件、国際誌 10 件）

掲載した論文（発表題目）	著者氏名	学会誌・雑誌等名	発表した時期	国内・外の別
記載例： タイトル	著者全員	雑誌名、Vol. No. 頁	年、月	国内・国外
A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors.	Masahiro Takikawa and <u>Rieko Ohki</u> (corresponding author).	Cancer Science , in press.	2017 年	国外
A novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells.	Issei Ezawa, Yuichiro Sawai, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Yuka Kobayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and <u>Rieko Ohki</u> (corresponding author).	Cancer Science , 107(6):734-45, 2016.	2016 年 6 月	国外
IER5 は新規の低リン酸化型の活性化 HSF1 を誘導し、がん化を促進する。	浅野良則, <u>大木理恵子</u> .	実験医学, 34, pp. 1783-1785, 2016.	2016 年 7 月	国内
The USP8 mutational status may predict drug susceptibility in corticotroph adenomas of Cushing's disease.	Hayashi K, Inoshita N, Kawaguchi K, Ibrahim Ardisasmitha A, Suzuki H,	Eur J Endocrinol. 174:213-26	2016 年	国外

	Fukuhara N, Okada M, Nishioka H, Takeuchi Y, Komada M, Takeshita A, <u>Yamada S.</u>			
A new multilayer reconstruction using nasal septal flap combined with fascia graft dural suturing for high-flow cerebrospinal fluid leak after endoscopic endonasal surgery.	Horiguchi K, Nishioka H, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, <u>Yamada S.</u>	Neurosurg Rev. 39(3):419-27	2016 年	国外
Low insulin resistance after surgery predicts poor GH suppression one year after complete resection for acromegaly: a retrospective study.	Edo N, Morita K, Suzuki H, Takeshita A, Miyakawa M, Fukuhara N, Nishioka H, <u>Yamada S</u> , Takeuchi Y.	Endocr J. 31:63(5):469-77	2016 年	国外
Long-term results of hypofractionated stereotactic radiotherapy with CyberKnife for growth hormone-secreting pituitary adenoma: evaluation by the Cortina consensus.	Iwata H, Sato K, Nomura R, Tabei Y, Suzuki I, Yokota N, Inoue M, Ohta S, <u>Yamada S</u> , Shibamoto Y.	J Neurooncol. 128(2):267-75	2016 年	国外
Endoscopic Endonasal Surgery for Purely Intra-Third Ventricle Craniopharyngioma.	Nishioka H, Fukuhara N, Yamaguchi-Okada M, <u>Yamada S.</u>	World Neurosurg. 91:266-71	2016 年	国外
Alterations of collagen-producing cells in human pituitary adenomas.	Tofrizal A, Fujiwara K, Yashiro T, <u>Yamada S.</u>	Med Mol Morphol. 49:224-232	2016 年	国外
Genetic and clinical characteristics of Japanese patients with sporadic somatotropinoma.	Matsumoto R, Izawa M, Fukuoka H, Iguchi G, Odage Y, Yoshida K, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Inoshita N, <u>Yamada S</u> , Ogawa W, Takahashi Y.	Endocr J 63(11),953-963	2016 年	国外

Whole-Exome Sequencing Study of Thyrotropin-Secreting Pituitary Adenomas.	Sapkota S, Horiguchi K, Tosaka M, <u>Yamada S</u> , Yamada M.	J Clin Endocrinol Metab. [Epub ahead of print]	2016年	国外
---	---	--	-------	----

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
記載例：タイトル、口頭・ポスター発表等の別	発表者全員	開催場所（学会名）	年、月	国内・国外
がん抑制遺伝子 PHLDA3 の下垂体腺腫における機能喪失性変異の同定と機能解析 口頭発表	<u>山口 陽子</u> 、富永 航平、陳 好、峯岸 舞子、 <u>山田正三</u> 、 <u>大木理恵子</u>	第27回日本間脳下垂体腫瘍学会、於：日経カンファレンスルーム	2017年2月	国内
PHLDA3 は下垂体腺腫の新規がん抑制遺伝子である 口頭発表	陳 好、峯岸 舞子、齋藤 梢、 <u>山田正三</u> 、並木 秀男、仙波 憲太郎、 <u>大木理恵子</u>	第27回日本間脳下垂体腫瘍学会、於：日経カンファレンスルーム	2017年2月	国内
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	<u>大木理恵子</u>	日本分子生物学会 ワークショップ 於：横浜	2016年12月	国内
がん抑制遺伝子 p53 が制御する様々ながん制御経路、口頭発表	<u>大木理恵子</u>	第19回学習院大学生命科学シンポジウム 於：学習院大学	2016年5月	国内
p53 標的遺伝子 IER5 は新規の低リン酸化型の活性化 HSF1 を作り出し、がん化を促進する 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	第11回 臨床ストレス応答学会大会、 於：山口大学	2016年11月	国内

IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	International Cancer Forum for Young Scientists、於：北海道大学	2016年11月	国内
がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がん病体モデルの作製と解析 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	平成28年度第2回金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム。於：金沢東急ホテル	2017年2月	国内
膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の確立 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」共同研究報告会。於：京都大学	2017年3月	国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

発表した演題等	発表者氏名	発表した場所（シンポジウム名等）	発表した時期	国内・外の別
がん研究の最前線 ～がん抑制遺伝子 p53 はどのようにがんを抑制するのか？～ 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	女子学院同窓会シンポジウム	2016年6月	国内
研究者という職は、女性に向いている職である 口頭発表 大木理恵子 於：早稲田大学	<u>大木理恵子</u>	第2回 Rikoh ティータイム シンポジウム～ワセダで輝く・ワセダから輝く、あなたの未来～	2016年5月	国内

がんの生物学・分子生物学 口頭発表 於：幕張メッセ	<u>大木理恵子</u>	日本がん治療認定医機構 【JBCT】教育セミナー	2016年11月	国内
がんの分子生物学 口頭発表	<u>大木理恵子</u>	がんゲノム医療講習会、於：国際研究交流会館	2017年3月	国内

(4) 特許出願