

平成27年6月17日

平成26年度共同研究報告書

京都大学再生医科学研究所長 殿

研究代表者（申請者）

所属：国立がん研究センター研究所

職名：研究員

氏名：大木 理恵子

下記のとおり共同研究課題の実施結果について報告します。

記

1. 研究課題：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
2. 再生医科学研究所共同研究者： 角 昭一郎 准教授
3. 研究期間：平成26年4月1日～平成27年3月31日
4. 研究経過及び研究成果：

膵臓はその約9割以上は外分泌腺が占め、その中に内分泌細胞が集まる膵島が島のように浮かんで存在している組織である。膵島細胞が腫瘍化すると膵内分泌腫瘍となり、一方で膵島の機能が破綻し、インスリン分泌が異常になると糖尿病を発症する。糖尿病患者の治療として、膵臓移植より患者の体への負担が少ないという事で膵島移植が行われている。日本においては臓器提供者が少ないため、より高い膵島の生着率が望まれており、膵島細胞を増殖させる、あるいは膵島細胞の細胞死を抑制する方法が模索されている。

我々は、これまで機能未知であった PHLDA3 遺伝子が、p53 によって誘導される遺伝子である事を見だし、PHLDA3 が p53 による Akt 抑制を担う重要な遺伝子である事を世界で初めて明らかにした (Cell, Vol. 136, pp. 535-550, 2009)。PHLDA3 遺伝子は、細胞膜に存在するイノシトールリン脂質 (PIPs) との結合に働く PH ドメインのみから構成されるタンパク質をコードしている。一方、Akt も PH ドメインを持つタンパ

ク質であり、活性化には PH ドメインを介して細胞膜に局在する事が必須である。PHLDA3 は、Akt のいわば内在的に発現する dominant negative 体として機能し、Akt と PIPs との結合を直接阻害する。その結果、Akt の細胞膜局在は阻害され、下流の生存シグナルは伝達されない (Fig. 1)。

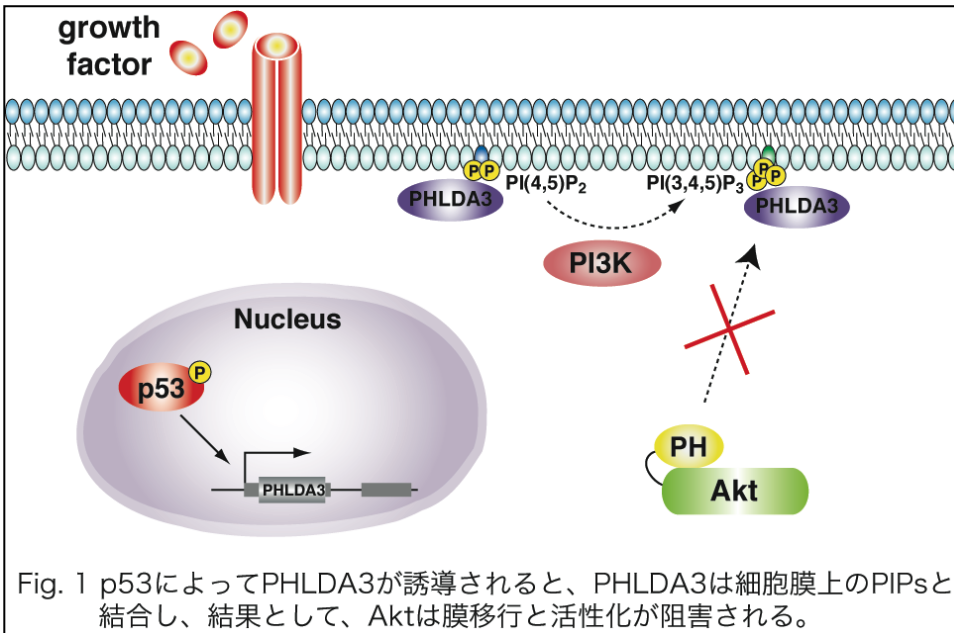
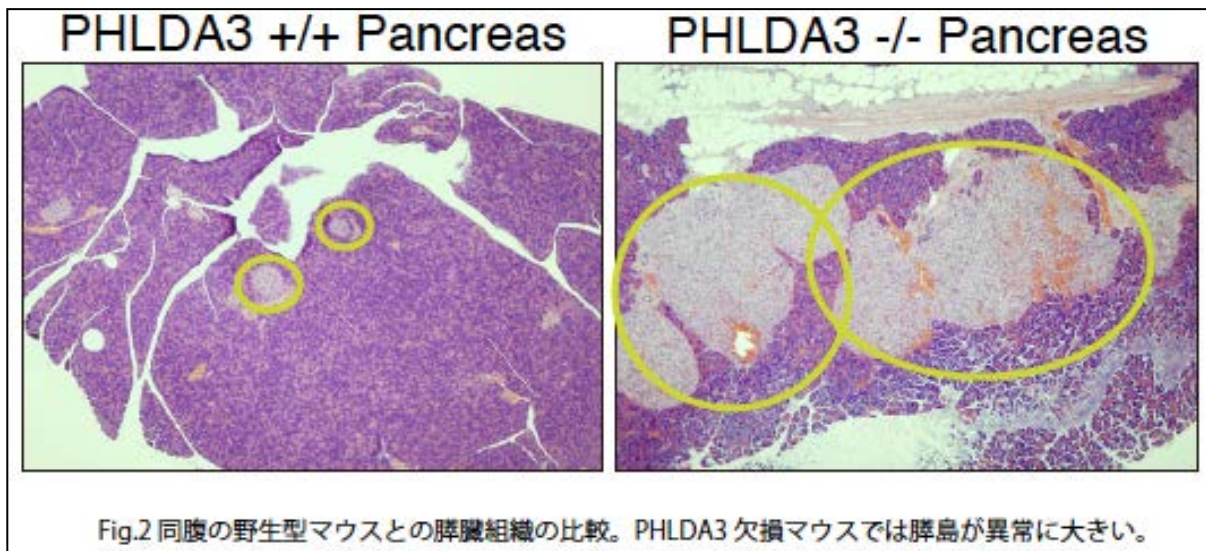


Fig. 1 p53によってPHLDA3が誘導されると、PHLDA3は細胞膜上のPIPsと結合し、結果として、Aktは膜移行と活性化が阻害される。

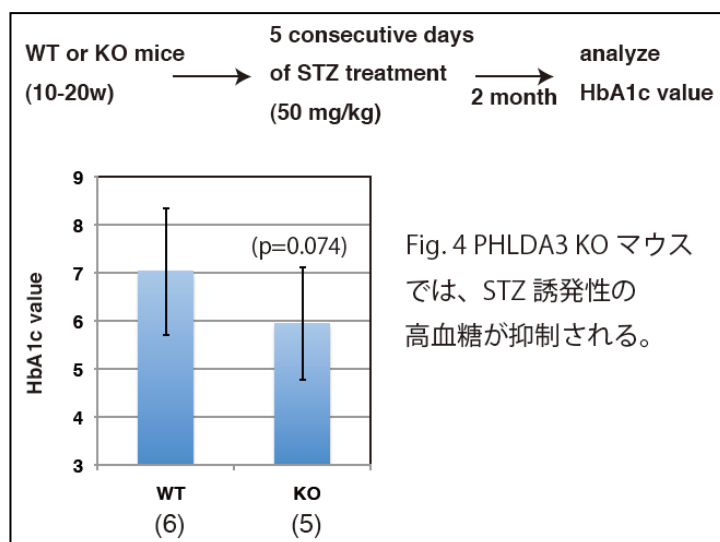
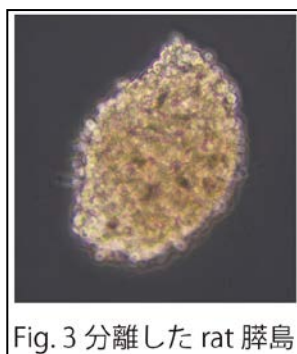
がん抑制において、非常に強いがん化促進能を持つ Akt の活性を制御する事はとても重要である。実際に PHLDA3 の発現を抑制した細胞では Akt の異常な活性化が認められるとともに、細胞ががん化(足場非依存性の増殖能を獲得)している事が示され、PHLDA3 はがん抑制能を有する事が示された。さらに、ヒト肺及び膵内分泌腫瘍において PHLDA3 遺伝子の高頻度な欠損が認められた。これらのがん組織では正常組織と比較して PHLDA3 の発現低下と Akt 活性の上昇が認められ、PHLDA3 が内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子として機能していると考えられた。

一方で、PHLDA3 が膵内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子であるという事から、PHLDA3 が膵内分泌細胞の増殖を制御するのではないかと考え研究を進めている。これまでに膵島β細胞由来の細胞株 RIN 細胞、正常膵島細胞を用いて、膵β細胞において PHLDA3 が細胞増殖と Akt 活性を抑制している事を明らかにした。

さらには PHLDA3 欠損マウスにおいて膵島の過形成が認められており、PHLDA3 は膵島細胞の増殖を抑制する事が示された (Fig. 2)。



これまでに角昭一郎准教授との共同研究によって、分離膵島から得た膵島細胞を用い (Fig. 3)、PHLDA3 が膵島細胞において細胞増殖の抑制、アポトーシス誘導に機能する事を明らかにした。



また、PHLDA3 欠損マウスを用いて実験的に一型糖尿病を引き起こすと、PHLDA3 欠損マウスでは野生型マウスに比べ、顕著に血糖値の上昇が抑えられている事が示され (Fig. 4)、マウス生体内においても PHLDA3 が膵島細胞の増殖、アポトーシスを制御する事が示された。

今後さらに膵島機能に PHLDA3 がどのように関わるのか解析を進める事で、糖尿病研究、膵島移植に役立つ成果を得る事が可能である。さらには PHLDA3 機能を抑制した膵島を作り出し、再生医療の分野に役立てたいと考えている。

## 5. 研究成果の公表

※発表論文リスト（掲載予定、プレプリントを含む。準備中も可）、学会発表等

1. Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase, 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. Toshitsugu Fujita, Miyuki Yuno, Daisuke Okuzaki, Rieko Ohki, and Hodaka Fujii. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres by enChIP-RNA-Seq. PLoS One, accepted.

3. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Cholestatic Liver Injury after Biliary Reconstruction Impairs Transplanted Islet Viability and Function. Am J Transplant. (in press)

4. Sakata N, Sax N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Kato S, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Kodama T, Unno M. Enhanced Ultrasonography using Nano/Microbubble Contrast Agent for Islet Transplantation. Am J Transplant. (in press)

5. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Ishida M, Aoki T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Nerve Growth Factor Improves Survival and Function of Transplanted Islets via TrkA-mediated  $\beta$  Cell Proliferation and Revascularization. Transplantation. (in press)

6. Yoshimatsu G, Sakata N, Takemura T, Minowa T, Tsuchiya H, Hata T, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Motoi F, Naito T, Katayose Y, Egawa S, Unno M. The effect and mechanism of bone marrow derived mesenchymal stem cells on intramuscular islet transplantation. Plos One. 2015;10(2):e0117561. doi: 10.1371/journal.pone.0117561.

7. Tsuchiya H, Sakata N, Yoshimatsu G, Hata T, Fukase M, Aoki T, Ishida M, Katayose Y, Egawa S, Unno M. Extracellular Matrix and Growth Factors Improves the Transplant Efficacy of Intramuscular Islet Transplantation. (in submission)

## 日本語論文

1. 山口 陽子, 斉藤 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. 陳 ヨ, 斉藤 梢, 山口 陽子, 大木 理恵子. 膵神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の発見. 胆と膵、Vol.36 No.6、2015 年 6 月 掲載予定.

## ・学位申請

1. 土屋朗之:細胞外基質と増殖因子は筋肉内膵島移植の移植効率を改善させる(2015年3月 東北大学医学博士取得予定)

・特許

- 1.特願 2014-107529、発明の名称：移植材料及びその調製方法（内容：PHLDA3 遺伝子機能抑制による膵島移植効率上昇）、提出日：平成 26 年 5 月 23 日、発明者：大木理恵子、角昭一郎、坂田直昭。

・ その他の研究成果

Proc Natl Acad Sci USA に発表した論文の内容が、国立がん研究センターホームページ、マイナビニュース、m3.com、日刊工業新聞、medical tribune、yahoo news で取り上げられた。

口頭発表（国内 14、海外 3）

1. 膵全摘と自家膵島移植術後の胆管炎が移植膵島に与える影響—急性閉塞性胆管炎モデルマウスを用いた検討— 畠 達夫, 坂田直昭, 吉松軍平, 土屋朗之, 川口 桂, 益田邦洋, 青木 豪, 藪内伸一, 深瀬耕二, 水間正道, 林 洋毅, 岡田恭穂, 森川孝則, 中川 圭, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明：第 26 回日本肝胆膵外科学会学術集会（和歌山）（平成 26 年 6 月）
2. 筋肉内膵島移植の臨床応用に向けて. 坂田直昭, 吉松軍平, 土屋朗之, 畠 達夫, 深瀬正彦, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明：（シンポジウム）第 69 回日本消化器外科学会総会（郡山）（平成 26 年 7 月）
3. Clinical Experiences of Islet Autotransplantation in Tohoku University. 坂田直昭, 後藤昌史, 元井冬彦, 片寄 友, 江川新一, 下瀬川徹, 里見 進, 海野倫明：（ディベート）第 45 回日本膵臓学会大会（小倉）（平成 26 年 7 月）
4. 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
5. 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
6. 造影超音波検査は移植膵島の生着／機能評価に有効である. 坂田直昭, Nicolas Sax, 吉松軍平, 土屋朗之, 畠 達夫, 深瀬正彦, 青木 豪, 石田晶玄, 岡田恭穂, 林 洋毅, 中川 圭, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 小玉哲也, 海野倫明：（ワークショップ）第 52 回日本人工臓器学会大会（札幌）（平成 26 年 10 月）
7. 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
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 日韓がんワークショップ 2014 年 11 月 29 日. 於：韓国済州島 国外
9. 膵島移植の成功に向けた当科の取り組みと三次元生体組織構築への期待. 坂田直昭, 海野倫

明：(講演) 第3回三次元生体組織構築シンポジウム(大阪)(平成26年12月)

10. 神経成長因子 Nerve growth factor は血管新生を誘導し膵島移植成績を向上させる. 坂田直昭, 嶋 達夫, 土屋朗之, 深瀬正彦, 青木 豪, 石田晶玄, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 海野倫明：(シンポジウム) 第42回日本膵・膵島移植研究会(東京)(平成27年3月)
11. 移植膵島の生着を評価するための超音波検査研究のこれまでの足取り. 坂田直昭, Sax Nicolas, 青木 豪, 石田晶玄, 片寄 友, 江川新一, 小玉哲也, 海野倫明：第42回日本膵・膵島移植研究会(東京)(平成27年3月)
12. 細胞外基質と成長因子の処置により筋肉内膵島移植の移植効果は劇的に向上する. 坂田直昭, 土屋朗之, 青木 豪, 石田晶玄, 川口 桂, 益田邦洋, 岡田 良, 藪内伸一, 深瀬耕二, 大塚英郎, 水間正道, 岡田恭穂, 林 洋毅, 中川 圭, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明：第14回日本再生医療学会総会(横浜)(平成26年3月)
13. 膵島移植における超音波検査の有用性. 坂田直昭, 小玉哲也, Sax N, 片寄 友, 海野倫明：第14回日本再生医療学会総会(横浜)(平成27年3月)
14. 膵島移植生着を評価するための画像検査-超音波検査を中心に-. 坂田直昭, 小玉哲也, 吉松軍平, 青木 豪, 石田晶玄, 川口 桂, 益田邦洋, 藪内伸一, 深瀬耕二, 大塚英郎, 水間正道, 林 洋毅, 中川 圭, 岡田恭穂, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 海野倫明：第115回日本外科学会定期学術集会(名古屋)(平成27年4月)
15. 細胞外基質と血管新生因子が筋肉内膵島移植に与える有効性の検討. 土屋朗之, 坂田直昭, 吉松軍平, 青木 豪, 川口 桂, 益田邦洋, 岡田 良, 石田晶玄, 藪内伸一, 深瀬耕二, 岡田恭穂, 林 洋毅, 中川 圭, 森川孝則, 吉田 寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明：第115回日本外科学会定期学術集会(名古屋)(平成27年4月)
16. 筋肉内膵島移植を成功させるための戦略 細胞外基質と成長因子の有効性と超音波検査による移植膵島のモニタリング. 坂田直昭, 土屋朗之, 青木 豪, 石田晶玄, 益田邦洋, 岡田 良, 藪内伸一, 深瀬耕二, 大塚英郎, 水間正道, 岡田恭穂, 林 洋毅, 中川 圭, 森川孝則, 吉田寛, 元井冬彦, 内藤 剛, 片寄 友, 江川新一, 海野倫明：第101回日本消化器病学会総会(仙台)(平成27年4月)
17. 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 2015 SNUCRI Cancer Symposium 2015年4月. 於：韓国広州 国外

ポスター発表 (国内15、海外4)

1. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. Rieko Ohki, 16th International p53 workshop. 2014年6月 於ストックホルム 国外.
2. Enhanced Ultrasonography using Nanobubble Contrast Agent for Islet Transplantation. Sakata N, Nicolas S, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Hata T, Katayose Y, Egawa S, Kodama T, Unno M: 2014 World Transplant Congress (San Francisco) (平成26年7月)
3. The study of the effectiveness of extracellular matrix on islet transplantation. Tsuchiya H, Sakata N,

Yoshimatsu G, Hata T, Fukase M, Motoi F, Katayose Y, Egawa S, Unno M: 2014 World Transplant Congress (San Francisco) (平成 26 年 7 月)

4. Nerve growth factor Supplementation Improves Graft Survival and Function Following Islet Transplantation to Diabetic Mice. Hata T, Sakata N, Yoshimatsu G, Tsuchiya H, Fukase M, Motoi F, Katayose Y, Egawa S, Unno M.: 2014 World Transplant Congress (San Francisco) (平成 26 年 7 月)
5. ナノバブル造影剤高周波超音波検査による移植膵島生着機能評価. 坂田直昭, Sax Nicolas, 片寄 友, 江川新一, 小玉哲也, 海野倫明: 第 50 回日本移植学会総会 (東京) (平成 26 年 9 月)
6. Establishment and analysis of a novel malignant gastric cancer mouse model harboring loss of tumor suppressor gene p53. Junko Ohtsuka, Issei Ezawa, Hideo Namiki, Ryo Abe, Masanobu Oshima, Rieko Ohki 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. 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
8. 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
9. PHLDA3 遺伝子は下垂体神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である. 峯岸舞子, 齋藤梢, チンヨ, 會田雪絵, 川瀬竜也, 山田正三, 並木秀男, 仙波憲太郎, 大木理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
10. 膵島移植における超音波検査の有効性. 坂田直昭, Sax Nicolas, 小玉哲也, 海野倫明: 第 13 回日本超音波治療研究会 (仙台) (平成 26 年 11 月 15 日)
11. p53 アイソフォームである  $\Delta$  1stTAD-p53 は, 完全長 p53 と異なるがん抑制経路を担う. 鈴木詩織, 小關知子, 川瀬竜也, 大出祥子, 胡桃坂仁志, 大木理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
12. 新規 p53 標的遺伝子 p53PAD1 は膜蛋白質の糖鎖修飾の調節を介してがん抑制的に機能する. 江澤 一星, 澤井 勇一郎, 川瀬 竜也, 田代 文夫, 並木 秀男, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
13. 新規 p53 標的遺伝子 PAD5 は HSF1 を脱リン酸化する事で活性化しがん化を促進する. 浅野 良則, 川瀬 竜也, 建部 聡子, 田代 文夫, 並木 秀男, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
14. PHLDA3 遺伝子は新規の神経内分泌腫瘍 (NET) 抑制遺伝子であり, MEN1 遺伝子とは異なる経路で腫瘍を抑制する. チン ヨ, 齋藤 梢, 會田 雪絵, 並木 秀男, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
15. 新規 p53 標的遺伝子 p53PAD7 は分泌タンパク質であり, G2 期における細胞周期期停止を引き起こす. 松下 周, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会
16. がん抑制遺伝子 PHLDA3 は PH ドメイン内の機能未知な領域を介して Akt の機能を特異的に抑制している. 西川 雷羅, 齋藤 梢, 川瀬 竜也, 佐藤 美和, 広川 貴次, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2014 年 11 月, 日本分子生物学会

17. 癌抑制遺伝子 p53 活性を増強する新規抗癌剤の創製。 清水 美来、松本 真悠子、高木 基樹、新家 一男、田沼 靖一、並木 秀男、胡桃坂 仁志、大木 理恵子 2014 年 11 月、日本分子生物学会
18. Enhanced Ultrasonography for Islet Transplantation. 坂田直昭, Sax Nicolas, 吉松軍平, 土屋朗之, 畠 達夫, 青木 豪, 石田晶玄, 片寄 友, 江川新一, 小玉哲也, 海野倫明: 第 18 回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (大阪) (平成 26 年 1 月)
19. がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析。 大塚旬子、江澤一星、安部良、大島正伸、大木 理恵子 2015 年 2 月、2015「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ