

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19551

研究課題名(和文) 新たな多発性内分泌腫瘍症1型原因遺伝子CDK2並びにCDK3の発見

研究課題名(英文) Identification of CDK2 and CDK3 as new causative genes for Multiple Endocrine Neoplasia type 1

研究代表者

堀口 和彦 (Horiguchi, Kazuhiko)

群馬大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10737943

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1型)の新規疾患原因遺伝子変異候補として、研究代表者が発見したCDK2遺伝子M196T変異、CDK3遺伝子R122W変異、P204S変異が実際に疾患の原因となりうるかについて検討した結果、CDK2M196T変異、CDK3R122W変異は、細胞の増殖能に影響を与えず、腫瘍発症原因ではないと考えられた。しかし、CDK3P204S変異については細胞増殖能を増加させることが明らかとなり、MEN1型の腫瘍発症原因となりうるということが判明した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the newly discovered M196T mutation of CDK2 gene, R122W mutation, and P204S mutation of CDK3 gene can actually cause the disease as a candidate of new causative gene mutation of Multiple endocrine neoplasia type 1. As a result of the study using stable expression cell lines, M196T mutation, R122W mutation, it was found that these mutations did not affect the proliferation of the cell. Therefore, it was not considered to be the cause of the onset of Multiple endocrine neoplasia type 1. Since the preparation of stable expression cell lines of CDK3 gene wild type was difficult, the stable cell line of P204S mutation was compared with stable expression cell lines that express benign SNP. As a result, P204S mutation, as compared with SNP stable expression cell lines, to activate the cell cycle, it was revealed to increase the cell proliferation ability. Therefore, CDK3 gene p204s mutation was found to be a cause of tumor onset of Multiple endocrine neoplasia type 1.

研究分野：内分泌代謝内科学

キーワード：多発性内分泌腫瘍症1型 細胞周期調節因子 遺伝子変異

## 1. 研究開始当初の背景

内分泌腫瘍は、腫瘍の圧迫や転移ばかりでなく内分泌腫瘍の特徴である種々のホルモン過剰分泌により日常生活に著しい障害を来す。さらに近年、内分泌臓器の過形成やセットポイントの異常によるわずかなホルモンの過剰分泌は、糖尿病や高脂血症、肥満などの生活習慣病発症の一因と考えられ、内分泌腫瘍の発症分子機構を解明し治療戦略をたてることは、内科学における急務の課題である。内分泌腫瘍発症機構に關与する遺伝子異常は、これまで様々な研究が行われ、多発性内分泌腫瘍症(MEN)1型における MEN1 遺伝子胚細胞変異、あるいは MEN2 型における RET 遺伝子胚細胞変異が有名であるこの MEN1 型は、下垂体腫瘍、副甲状腺、膵消化管内分泌腺の3腺のうち2腺以上に腫瘍発症を認める常染色体優性遺伝性の家族性腫瘍症候群であり、高頻度に MEN1 遺伝子に変異が検出されるが、家族性の 10%、散発性の 40%程度 の症例では MEN1 遺伝子に変異を認めず、その他の遺伝子変異が発症に關与している可能性が考えられている。2006年に MEN1 遺伝子変異のない MEN1 型の1家系における、細胞周期を負に制御するサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI)の一つである CDKN1B(p27)遺伝子変異が、さらにその後の検討から、p27以外の3種類の CDKI(p15、p18、p21)遺伝子変異が MEN1 発症に關与することが明らかとなった。そこで我々は、MEN1 型の発症機構に MEN1、CDKN 遺伝子と並び、細胞周期制御因子であるサイクリン依存性キナーゼ(CDK)遺伝子が關与する可能性に注目し、MEN1 遺伝子に変異のない MEN1 型症例において CDK 遺伝子変異の腫瘍発症への關与を検討し、CDK2 遺伝子に M196T、CDK3 遺伝子に R122W、P204S の新規疾患原因遺伝子変異候補を発見するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、MEN1 型の原因として新たに発見した新規の CDK2 遺伝子、CDK3 遺伝子変異候補について、詳細な機能解析を行い、内分

泌腫瘍発症に關与するメカニズムについて明らかとすることを目的とする。現在、MEN1 遺伝子の腫瘍発症への關与は、多発性内分泌腫瘍症のみならず、様々な散発性内分泌腫瘍、非内分泌臓器での発症への關与の可能性が示唆されている。よって本研究がめざす MEN1 を基盤とした腫瘍発症機構の解明は、内分泌腫瘍のみならず、様々な臓器での腫瘍発症機構の解明につながるものと考えられる。さらに、今回注目した CDK については既に多くの阻害剤が開発され、現在いくつかの CDK 阻害薬は臨床試験の段階にある。従って本研究成果によってそれら阻害剤の内分泌腫瘍治療への応用が期待されるため、本研究ではこれらの変異による腫瘍発症メカニズムを解明し、今後の散発性腫瘍も含めた新たな治療標的し新薬の開発の端緒とすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)新たに発見した CDK2、CDK3 遺伝子変異による腫瘍発症分子機構の詳細を *in vitro* で検証するため、ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ野生型、CDK2 M196T、CDK3 R122W および P204S 変異発現ベクターを作成する。作成したベクターを Lipofection 法でマウス膵インスリン産生腫瘍細胞株である MIN6 細胞へ遺伝子導入し、G418 にて選別後、シングルコロニーを単離し、それぞれの遺伝子発現安定細胞株を樹立する。それらの細胞を用いてウェスタンブロット法により導入した蛋白質発現量を確認し、それぞれ低～高発現かつ野生型、変異型で発現量似通った少なくとも2系統の CDK 遺伝子変異安定発現細胞株を樹立する。

(2)(1)で樹立した新規 CDK 遺伝子変異安定発現細胞株を用いて、CDK 変異が細胞周期に与える影響を調べるため、樹立した細胞株をヨウ化プロピジウム染色後にフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析により検討する。また、細胞増殖能については MTT アッセ

イ、BrDU アッセイを用いて検討する。

(3)CDK は、その下流にある Retinoblastoma(Rb) 蛋白質をリン酸化することにより細胞周期を制御していることから、新規 CDK 遺伝子変異による Rb 蛋白質のリン酸化への影響をウエスタンブロット法を用いて検討する。

(4)腫瘍発症への関与が疑われる変異について *in vivo* で検証するため、変異 CDK トランスジェニックマウスを作成し、下垂体、副甲状腺、膵内分泌腺などの内分泌臓器における腫瘍発症について経時的に観察する。

(5)トランスジェニックマウスより内分泌臓器を摘出し、細胞周期に関連する mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定し、蛋白質発現量はウエスタンブロット法や免疫組織染色をもちいて検討を行う。

(6)樹立した CDK 変異遺伝子安定発現細胞株を用いて、CDK 阻害剤の細胞増殖並びに細胞周期に与える影響を MTT アッセイ、BrDu 染色、細胞周期解析により検討する。

#### 4. 研究成果

(1)CDK2 遺伝子に関しては、野生型、M196T 変異ともに MIN6 細胞に遺伝子導入が可能であり、安定細胞発現株の樹立が可能であった。野生型、変異型ともに発現量の異なる 3 種類の安定発現細胞株を樹立した(図 1)。

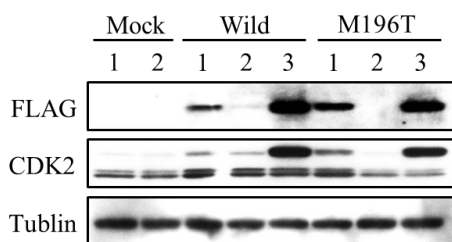


図 1

(2)樹立した CDK2 野生型、変異型安定発現細胞株を用いて、細胞増殖能の差異を確認するため、MTT アッセイを行ったが、野生型、変異型で有意な増殖能の違いは認めなかった。さらに、CDK2 の下流シグナルである Rb のリン酸化についても、ウエスタンブロット解析

により確認したが、野生型、変異型で差はなかった。さらに、フローサイトメトリーによる細胞周期解析を行ったが、野生型、変異型で比べて、G0/G1 期細胞数、M 期細胞数、S 期細胞数ともにほぼ同程度あり(図 2)、CDK2 遺伝子 M196T 変異の腫瘍発症への関与の可能性は低いことが判明した。

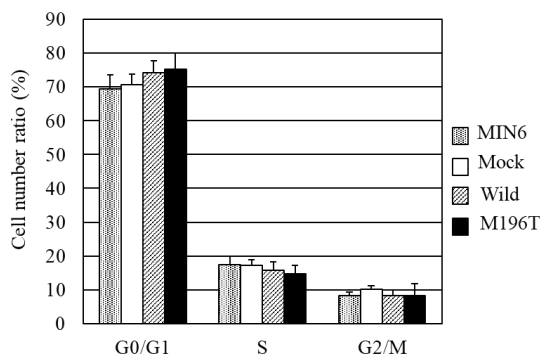


図 2

(3)CDK3 遺伝子に関しては、変異型である R122W 変異、P204S 変異、また疾患原因遺伝子ではないことが判明している N72Del については、発現量がほぼ等しい安定発現細胞株の樹立が可能であった。しかし、CDK3 遺伝子野生型安定発現細胞株に関しては、合計 100 クローン以上のピックアップを行ったにも関わらず、安定的に CDK3 野生型を発現する細胞株が樹立できなかった。その理由として、作成した CDK3 野生型ベクターの毒性も考え、ベクターの再作成、再導入を行ったが、初期には、発現が確認できても、その後発現が消失し、何らかの理由で細胞から排除されている可能性が考えられた。野生型との比較が、本研究の最も重要な点であり、この過程に多くの資源の投入が必要となった。

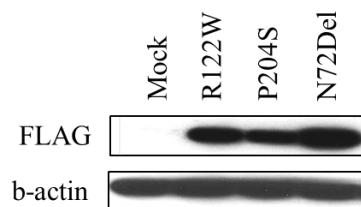


図 3

(4)CDK3 野生型安定発現細胞株の樹立に手間

取っていたため、遺伝子導入を行っていない MIN6 細胞、良性の遺伝子多型であることが判明している N72Del 安定発現細胞株をコントロールとして、細胞増殖能を MTT アッセイで検討したところ、CDK3P204S 変異安定発現細胞株は、MIN6 細胞、N72Del 安定発現細胞株と比較して、有意に細胞増殖能が高いことが判明した(図 4)。

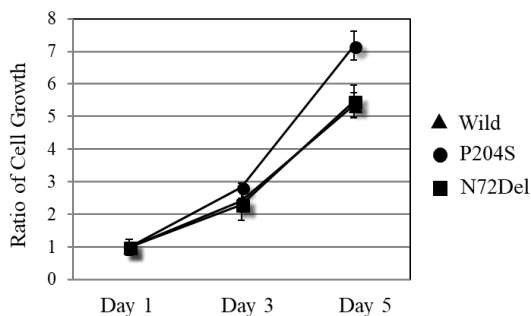


図 4

(5)CDK3R122W 変異、P204S 変異安定発現細胞株に関しては、遺伝子導入を行っていない MIN6 細胞、N72Del 安定発現細胞株をコントロールとしてフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析の結果、R122W 安定発現細胞株は、コントロールと比較して有意な差は認めなかったが、CDK3P204S 変異安定発現細胞株は、コントロールと比較して、G0/G1 期細胞の有意な減少と、G2/M 期細胞の有意な増加、S 期細胞の上昇傾向を認め、CDK3P204S 変異安定発現細胞株は細胞周期が、コントロールと比較して活性化された状態にあり、CDK3P204S は細胞増殖能を増加させ、腫瘍発症に関与している可能性が示された。

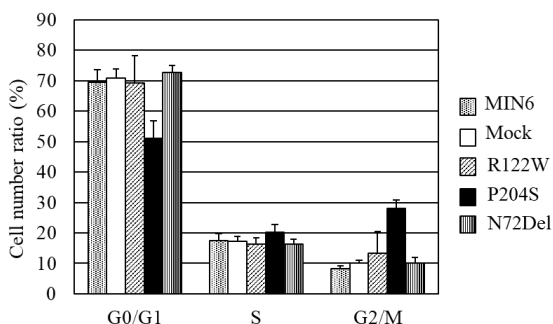


図 5

(6) *in vitro* で、少なくとも新たに発見した

CDK3P204S 変異は細胞増殖能を増加させ、腫瘍発症に関与する可能性が示されたが、トランスジェニックマウスの作製を開始する段階までは進めなかった。その理由として、確実に違いを示すことが重要な CDK3 野生型安定発現細胞株の樹立に時間と、多くの費用を要し、CDK3P204S 変異が野生型と比べ細胞増殖能が増加していることが示せなかったことが挙げられる。同様に、CDK 阻害薬を用いた検討も同様の理由から実施まで至らなかった。CDK3 遺伝子野生型安定発現細胞株が樹立できなかった理由を含め、今後さらなる検討が必要である。

< 引用文献 >

Sunita K. Agarwal, Carmen M. Mateo, and Stephen J. Marx. Rare Germline Mutations in Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Genes in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and Related States. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009; 94: 1826-1834

J Ciceneas, M Valius. The CDK inhibitors in cancer research and therapy. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011, 137(10):1409-18

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

堀口和彦、山田正信、不適切 TSH 分泌症候群：TSH 産生下垂体腫瘍の発症機序は解明されたか? *最新医学*. 査読無、72: 1424-1431、2017.

<https://ci.nii.ac.jp/naid/40021349516>

Santosh S\*, Horiguchi K\*, (\*These two authors equally contributed), Tosaka T, Yamada S, Yamada M. Whole-Exome Sequencing Study of Thyrotropin Secretion Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 査読有、2017; 102(2): 566-575.

DOI: 10.1210/jc.2016-2261.

〔学会発表〕(計 8件)

堀口和彦、Sapkota Santosh、岡村孝志、石田恵美、中島康代、石井角保、小澤厚志、渋沢信行、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。散発性TSH産生下垂体腫瘍におけるコピー数多型解析。第28回間脳下垂体腫瘍学会、静岡、2018

堀口和彦、Sapkota Santosh、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。TSH産生下垂体腫瘍の全エクソン解析、第27回臨床内分泌代謝Update、神戸、2017

堀口和彦、Sapkota Santosh、中島康代、石井角保、小澤厚志、渋沢信行、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。Whole-Exome Sequencing Study of Thyrotropin-Secreting Pituitary Adenomas。第60回日本甲状腺学会学術集会、大分、2017

堀口和彦、山田正信、下垂体腫瘍のエクソーム解析による遺伝子異常の全貌、第32回日本下垂体研究会学術集会、栃木、2017

Horiguchi K, Okamura T, Matsumoto S, Nakajima Y, Ishii S, Ozawa A, Shibusawa S, Satoh S, Yamada S, Yamada M, Central Hypothyroidism related to pituitary adenomas: Resistance to Central Hypothyroidism in patients with GH-secreting adnoema. The 12<sup>th</sup> Asia and Oceania Thyroid Association Congress, Busan, Korea, 2017

堀口和彦、松本俊一、吉野聡、中島康代、登丸琢也、石井角保、小澤厚志、渋沢信行、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。先端巨大症と非機能性下垂体腫瘍における中枢性甲状腺機能低下症の特徴、第27回日本間脳下垂体腫瘍学会 2017.2.24~25 東京

堀口和彦、中島康代、登丸琢也、石井角保、小澤厚志、渋沢信行、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。先端巨大症と非機能性下垂体腫瘍における中枢性甲状腺機能低下症

の特徴、第43回日本神経内分泌学会学術集会 2016.10.14~15 静岡

堀口和彦、松本俊一、吉野聡、中島康代、登丸琢也、石井角保、小澤厚志、渋沢信行、佐藤哲郎、登坂雅彦、山田正三、山田正信。先端巨大症における中枢性甲状腺機能低下症の特徴、第59回日本甲状腺学会学術集会 2016.11.3~5 東京

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀口 和彦 (HORIGUCHI, Kazuhiko)  
群馬大学・大学院医学系研究科・医員  
研究者番号：10737943

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

山田 正信 (YAMADA, Masanobu)  
佐藤 哲郎 (SATO, Tetsuro)