

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09873

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子MEN1の非腫瘍組織(骨格筋)における新規機能の解明

研究課題名(英文) Analysis of function of tumor suppressor gene MEN1 in non-endocrine tumor tissue.

研究代表者

小澤 厚志(Ozawa, Atsushi)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：10573496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1型)の原因遺伝子MEN1は癌抑制遺伝子と考えられているが、非内分泌組織におけるMEN1の翻訳産物meninの機能は十分に解明されていない。今回、骨格筋におけるmeninの機能を解析した。Men1ヘテロ欠損マウスの骨格筋を用いたcDNAマイクロアレイ解析では、野生型に比べ糖代謝関連遺伝子群の変動が大きかった。またC2C12筋芽細胞株が骨格筋に分化する過程でmenin発現量が変動することを確認した。インスリン投与後にマウス骨格筋を単離し、抽出した蛋白を用いてのウェスタン解析では、meninの欠失が糖代謝関連の複数の蛋白の発現量に影響を与えていることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MEN1遺伝子および翻訳産物meninの機能として、これまで膵臓のインスリン分泌能獲得や肝臓での糖新生における役割についていくつかの報告があるが、今回の研究成果によって、骨格筋におけるmenin発現のhaploinsufficiencyが筋肉での糖代謝機構に直接的な影響を与えていることが初めて明らかとなった。内分泌腺腫瘍化における癌抑制蛋白としての機能以外に、膵内分泌細胞、肝臓、骨格筋という糖代謝ネットワークにおいてmeninが重要な役割を演じていることが判明し、今後研究を進展させることでmeninが糖尿病の病態を考察する上での新しい観点や、創薬のターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The causative gene MEN1 of multiple endocrine neoplasia type 1(MEN1) is considered to be a tumor suppressor gene, but the function of menin, a translation product of MEN1, in non-endocrine tissues has not been fully elucidated. The function of menin in skeletal muscle was analyzed. A cDNA microarray analysis using skeletal muscle of Men1 heterozygous mice revealed that the variation of glucose metabolism-related genes was larger than that of the wild type. We also confirmed that the expression level of menin fluctuates during the process of differentiation of C2C12 myoblast cells into myotubes. Immunoblotting analysis using the extracted protein of isolated skeletal muscle after insulin administration revealed that the deletion of menin affected the expression levels of multiple proteins related to glucose metabolism.

研究分野：内分泌

キーワード：遺伝子 遺伝性腫瘍 癌 骨格筋

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多発性内分泌腫瘍症 1 型(MEN1 型)は常染色体顕性遺伝性疾患で、副甲状腺、下垂体、膵・消化管内分泌腺を主要 3 組織として複数臓器に同時性・異時性に腫瘍発症を認める症候群である。MEN 1 型の責任遺伝子 *MEN1* は 1997 年にクローニングされ、遺伝子翻訳産物は *menin* と命名された。*MEN1* は癌抑制遺伝子と考えられるが、その詳細な機能は不明のままである。MEN1 型のモデルマウスとして、*Men1* ヘテロ欠損マウス(*Men1*^{+/-})が発表され、これまで世界の複数のグループでモデルマウスを用いて *menin* の癌抑制機能破綻による腫瘍発症メカニズムを解明するための実験がなされてきた。一方で *menin* は胎生初期の段階から全身諸臓器に偏在性に発現しており、*Men1* ホモ欠損マウス(*Men1*^{-/-})は、心筋形成不全、神経管形成不全や肝細胞分化障害のため胎生致死を呈することからも *menin* が非内分泌腺組織以外でも何らかの重要な機能を有する事は確実であるが、これまで非内分泌腺組織における *MEN1* や *menin* についての研究は限られており、癌抑制機能以外の *menin* の機能は全く詳細不明である。私達は *Men1*^{+/-} 及び野生型マウスを用いた実験をすすめていく過程で、膵内分泌腺に腫瘍を発症する前段階である 12 週齢では、*Men1*^{+/-} は野生型に比較して耐糖能が亢進しているという全く予期せぬ結果を得た。

2. 研究の目的

近年、私達は内分泌細胞において *menin* が一定条件下でセリノースレオニンキナーゼの Akt1 と直接結合し、Akt1 を細胞質から細胞膜表面へと局在を移動させることで、Akt1 活性を抑制していることを報告した。一方、骨格筋におけるインスリンシグナル伝達としては、インスリンが細胞膜表面のインスリン受容体に結合して、そのチロシンキナーゼ活性を亢進させ、基質であるインスリン受容体基質 1 (IRS-1) をリン酸化し、下流の Akt2 が活性化され、活性型 Akt2 が Rab-GTPase activating protein である AS160 をリン酸化して抑制し、低分子量 G 蛋白 Rab を活性化して GLUT4 を細胞膜に移動させることで糖取込みが促進される機構が知られている。私達は *menin* が骨格筋におけるインスリン感受性に Akt を介することで関与しているという作業仮説を着想するに至った。従来癌抑制遺伝子として捉えられてきた *MEN1* の非腫瘍組織における新たな機能を、非内分泌組織である骨格筋において解明することを本研究課題の主目的とした。

3. 研究の方法

「*menin* が骨格筋において Akt2 に結合し Akt2 下流のシグナル伝達を抑制して糖取込みを阻害する」という作業仮説を検証するため下記の実験を行った。

(1) *Men1* ヘテロ欠損マウス(*Men1*^{+/-})を用いた耐糖能の検討:

MEN1 型のモデルマウスである *Men1*³⁻⁸ ヘテロ接合体マウス(*Men1*^{+/-})と、対照群としての野生型マウス(WT)を用いて、12~24 週齢のマウスにおいてグルコース負荷試験、インスリン負荷試験を施行した。12~24 週齢の野生型、*Men1*^{+/-} から骨格筋を摘出しホルマリンで固定の後、H&E 染色を行って病理学的観察を行った。また摘出した骨格筋から RNA および Whole cell extract (WCE) を抽出し、qPCR 法および抗 *menin* 抗体を用いた immunoblot 法を用いて、骨格筋組織における *Men1* mRNA および *menin* 蛋白の発現量を確認した。*menin* の haploinsufficiency による膵ラ氏島細胞におけるインスリン分泌能の変化を確認するため、Ex-vivo でのインスリン分泌刺激試験を行った。マウスを安楽死させコラゲネース法を用いて膵ラ氏島細胞のみを単離し 2.8~16.7mM のブドウ糖、および塩化カリウムにて刺激し、上清を用いてインスリン濃度を ELISA 法にて測定した。

(2) *Men1* ヘテロ欠損マウス(*Men1*^{+/-})の骨格筋を用いた cDNA マイクロアレイ解析:

menin の欠失によって骨格筋でのインスリンシグナル経路に関与する遺伝子(群)の変動を確認するため、*Men1*^{+/-} から骨格筋組織を摘出し、Total RNA を抽出してクオリティ検査の後、cDNA マイクロアレイ解析を行った。

(3) C2C12 筋芽細胞を骨格筋細胞に分化させる過程で *menin* をノックダウンし、糖取込み率を評価した。また免疫蛍光顕微鏡を用いて、インスリン刺激にて *menin* が核内から細胞質へと局在が変化するかを観察した。

(4) マウスを麻酔後に、下大静脈からインスリンを投与し、ヒラメ筋、長指伸筋を 2 分後に採取し、WCE を抽出し、immunoblot 法にて骨格筋におけるインスリン受容体下流のシグナル伝達を確認した。

4. 研究成果

(1) *Men1*ヘテロ欠損マウス (*Men1*^{+/-})を用いた耐糖能の検討：

Men1^{+/-}と野生型マウスの12~24週齢におけるグルコース負荷試験、インスリン負荷試験では、週齢によって耐糖能に差異を認めた。12週齢では、*Men1*^{+/-}は野生型に比較して耐糖能が亢進していたが、14週以降では2群間の耐糖能に有意差は認めなかった。また16週以降の*Men1*^{+/-}においては、インスリン負荷試験ではインスリン感受性が低下しているという、当初の仮説とは逆の結果を得た。

12~24週齢の野生型、*Men1*^{+/-}から腓組織とヒラメ筋、長指伸筋を単離しての病理学的観察では、骨格筋では2群間で明らかな形態学的な差異は認めなかった。腓組織においては一部にラ氏島細胞の異形成を認めた。摘出した骨格筋を用いてのqPCR法では、*Men1*^{+/-}では野生型に比べ*Men1*遺伝子発現量は約50%に低下していた。immunoblot法でもmeninの蛋白発現量は、*Men1*^{+/-}でやや減弱していた。

マウスから単離した腓ラ氏島細胞を用いてのブドウ糖、塩化カリウムによるインスリン分泌刺激実験では、低濃度グルコース刺激におけるインスリン分泌能には2群間で有意差は認めなかったが、高濃度グルコース刺激では*Men1*^{+/-}由来の腓ラ氏島細胞でインスリン分泌の亢進を認めた。

ここまでで、当初想定していた骨格筋におけるmeninの機能とは異なる機能を示唆する実験結果が出てきた。そのためまず骨格筋由来のRNAを用いてのcDNAマイクロアレイ解析を行い、*Men1*^{+/-}と野生型の骨格筋において発現する遺伝子(群)の変動を確認した。

(2) *Men1*ヘテロ欠損マウス (*Men1*^{+/-})の骨格筋を用いたcDNAマイクロアレイ解析：

15週齢の*Men1*^{+/-}と野生型から摘出したヒラメ筋、長指伸筋よりRNAを抽出し、cDNAマイクロアレイ解析を行い、Go-Fischer解析、パスウェイ解析を施行したところ筋形成関連遺伝子群には2群間で大きな変動はなかったが、Notch signaling 関連、Glycolysis and Glucogenesis 関連遺伝子群に変動遺伝子が多くmeninが骨格筋における糖代謝機構に関連していることが示唆された。

(3) C2C12筋芽細胞株を骨格筋細胞に分化させる過程で*Men1*遺伝子及びmenin発現量をそれぞれqPCR法、immunoblot法にて解析したところ、骨格筋細胞への分化過程で*Men1*遺伝子およびmenin発現量が減弱していくことが判明した。更に、筋芽細胞から骨格筋細胞への種々の分化過程で、抗menin抗体を用いて蛍光顕微鏡で観察したところ、培養液の糖濃度組成や、分化刺激によってmeninの発現局在が変化することが判明した。

さらにC2C12筋芽細胞を骨格筋細胞に分化させる過程でsiRNA法によりmeninをノックダウンした状態で、グルコース類似体2-デオキシグルコース(2-DG)代謝速度を評価したところ、menin発現量の低下によって糖取り込み率が低下していることが判明した。

ここまでで、当初の作業仮説である「meninが骨格筋においてAkt2に結合しAkt2下流のシグナル伝達を抑制して糖取り込みを阻害する」とは逆に、骨格筋におけるmenin発現量の減弱が、筋へのグルコース取り込みを抑制し耐糖能を悪化させるという仮説が浮上した。その確認のため、以下の実験を行った。

(4) インスリンを投与後に単離したヒラメ筋、長指伸筋から抽出したWCEを用いたimmunoblot法では、骨格筋のインスリン受容体下流のリン酸化Aktおよびリン酸化AS160の発現量が*Men1*^{+/-}では低下していた。このことからインスリンが細胞表面のインスリン受容体に結合して、下流のAkt2の活性化と、活性型Akt2がRab-GTPase activating proteinであるAS160をリン酸化して抑制し、GLUT4を細胞膜に移動させる経路に、meninが直接的に関与していることが明らかとなった。

以上より、私達は当初、MEN1遺伝子の翻訳蛋白であるmeninが減少、欠落した状態が耐糖能の観点からは有利に働いているという仮説を立て実験をすすめたが、実際には当初の仮説とは逆に、骨格筋においては筋芽細胞から骨格筋細胞に分化する過程でmeninの発現量が変動し、かつmeninが減少した状態では骨格筋における糖取り込みが低下するという全く新しい知見を得た。これまでmeninは癌抑制蛋白と考えられており、下垂体、膵内分泌腺、副甲状腺といった標的組織での腫瘍抑制機能の観点から研究がなされてきたが、私達の研究成果から骨格筋での糖取り込み機構におけるmeninの全く新しい機能を同定することができた。今後研究を進展させることでmeninが糖尿病の病態を考察する上での新しい観点や、創薬のターゲットとなる可能性が示された。

また、これら研究を施行して行く過程で、マウスの各組織におけるmenin蛋白のmolecular sizeが異なるという新しい知見を得たため、特に筋肉におけるmenin蛋白のMolecular sizeが他組織に比べて大きいことに着目し、まず報告されているmeninのリン酸化やSUMO化といったタンパク質の翻訳後修飾の可能性を考え、脱リン酸化処理や、脱SUMO化処理を行ってmenin蛋白の発現解析を行ったが、質量サイズに変化はなかった。そのため、マウスの筋組織よりWCEを抽出し、抗menin抗体を用いて免疫沈降を行い、回収

溶液を SDS-PAGE にて泳動後に CBB 染色を行い、得られた目的のバンドを質量分析で解析する研究を継続している。中長期的には、骨格筋特異的 *Men1* ホモ欠損マウスを作成し、in-vivo での耐糖能解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe T, Ozawa A, Masuda S, Yoshino S, Ishida E, Kondo Y, Matsumoto S, Katano-Toki A, Horiguchi K, Nakajima Y, Yamada E, Tomaru T, Saito T, Ishii S, Shibusawa N, Okada S, Satoh T, Yamada M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcriptional Regulation of the Angptl8 Gene by Hepatocyte Nuclear Factor-1 in the Murine Liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 9999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-66570-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada J, Yamada E, Saito T, Yokoo H, Osaki A, Shimoda Y, Ozawa A, Nakajima Y, Pessin JE, Okada S, Yamada M.	4. 巻 25
2. 論文標題 Dapagliflozin Inhibits Cell Adhesion to Collagen I and IV and Increases Ectodomain Proteolytic Cleavage of DDR1 by Increasing ADAM10 Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 9999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25030495.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishikido A, Okamura T, Nakajima Y, Ishida E, Miyamoto T, Toki AK, Matsumoto S, Yoshino S, Horiguchi K, Saito T, Yamada E, Ozawa A, Shimoda Y, Oyama T, Yamada M.	4. 巻 501
2. 論文標題 Regulation of the KCNJ5 Gene by SF-1 in the Adrenal Cortex: Complete Genomic Organization and Promoter Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cell Endocrinol	6. 最初と最後の頁 110657
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2019.110657.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takamizawa T, Horiguchi K, Nakajima Y, Okamura T, Ishida E, Matsumoto S, Yoshino S, Yamada E, Saitoh T, Ozawa A, Tosaka M, Yamada S, Yamada M.	4. 巻 104
2. 論文標題 Central Hypothyroidism Related to Pituitary Adenomas: Low Incidence of Central Hypothyroidism in Patients With Acromegaly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Endocrinol Metab	6. 最初と最後の頁 4879-4888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/jc.2019-00466.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Junichi, Sunaga Noriaki, Yamada Eijiro, Saito Tsugumichi, Ozawa Atsushi, Nakajima Yasuyo, Okada Kazuya, Pessin Jeffrey E., Okada Shuichi, Yamada Masanobu	4. 巻 25
2. 論文標題 FAM83G Is a Novel Inducer of Apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2810 ~ 2810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25122810	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Takuya, Ozawa Atsushi, Ishii Sumiyasu, Tomaru Takuya, Shibusawa Nobuyuki, Saito Tsugumichi, Yamada Eijiro, Horiguchi Kazuhiko, Nakajima Yasuyo, Matsumoto Shunichi, Yoshino Satoshi, Katano-Toki Akiko, Hashimoto Koshi, Mori Masatomo, Okada Shuichi, Satoh Tetsuro, Yamada Masanobu	4. 巻 65
2. 論文標題 Usage of continuous glucose monitoring (CGM) for detecting an unrecognized hypoglycemia and management of glucocorticoid replacement therapy in adult patients with central hypoadrenalism	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 547 ~ 556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ16-0387	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamura Takashi, Nakajima Yasuyo, Shibusawa Nobuyuki, Horiguchi Kazuhiko, Matsumoto Shunichi, Yamada Eijiro, Tomaru Takuya, Ishii Sumiyasu, Ozawa Atsushi, Ishizuka Takahiro, Hashimoto Koshi, Okada Shuichi, Satoh Tetsuro, Yamada Masanobu	4. 巻 461
2. 論文標題 Pituitary NR4A1 is negatively regulated by thyroid hormone without direct binding of thyroid hormone receptors on the gene	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 32 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mce.2017.08.007	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小澤厚志、山田正信
2. 発表標題 MEN研究の最新の知見（シンポジウム）
3. 学会等名 第25回日本家族性腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 内分泌内科医から見たMEN1に伴うpNETの診療
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、近藤友里、岡村孝志、石田恵美、堀口和彦、松本俊一、吉野聡、中島康代、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍症モデルマウスの解析
3. 学会等名 第45回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、近藤友里、錦戸彩加、岡村孝志、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、中島康代、石井角保、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 膵内分泌腫瘍を発症するモデルマウスの解析
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、近藤友里、岡村孝志、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、中島康代、石井角保、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍症の2つのモデルマウスの解析
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、堀口和彦、松本俊一、吉野聡、中島康代、登丸琢也、石井角保、渋沢信行、岡田秀一、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 癌抑制蛋白meninの膵ラ氏島細胞における機能解析
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、近藤友里、岡村孝志、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、中島康代、石井角保、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 膵神経内分泌腫瘍症の2つのモデルマウスの解析
3. 学会等名 日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤厚志、渡邊琢也、近藤友里、錦戸彩加、岡村孝志、石田恵美、堀口和彦、吉野聡、中島康代、石井角保、渋沢信行、佐藤哲郎、山田正信
2. 発表標題 膵内分泌腫瘍を発症するモデルマウスの解析
3. 学会等名 日本糖尿病学会年次学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 内分泌腫瘍と分子標的薬（教育講演）
3. 学会等名 第20回家族性腫瘍セミナー（後期）（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 内分泌腫瘍と分子標的薬 (教育講演)
3. 学会等名 第20回家族性腫瘍セミナー(前期)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 遺伝性腫瘍症候群に発症する機能性下垂体腺腫の診断と治療 (シンポジウム)
3. 学会等名 第27回日本間脳下垂体腫瘍学会(招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 小澤厚志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 7
3. 書名 【内分泌腺腫瘍(第2版)-基礎・臨床研究のアップデート-】多発性内分泌腺腫瘍症(MEN) 多発性内分泌腫瘍の病態生理と臨床像	

1. 著者名 小澤厚志	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 6
3. 書名 2020377088 【いま知っておきたい! 内科最新トピックス】(第9章)内分泌 間脳下垂体機能障害の診断と治療:疑わないと始まらない	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------