様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成２３年４月 20 日現在

機関番号：１２３０１
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：２００８～２０１０
課題番号：２０５９１０８７
研究課題名（和文）内分泌腫瘍発生機構の解明：ＭＬＬ／ｍｅｎｉｎ核内複合体ー細胞周期経路からの戦略

研究課題名（英文）Role of MLL/menin-cell cycle pathway in neuroendocrine tumorigenesis

研究代表者
山田　正信（YAMADA　MASANOBU）
群馬大学・医学部・講師
研究者番号：９０２６１８３３

研究成果の概要（和文）：MEN１型の原因産物である menin は MLL と複合体を形成し、ヒストンのメチルトランスフェラーゼ活性により $p27^{Kip1}$ や $p18^{Ink4C}$ 遺伝子発現を制御している。MEN1 型では Men1 遺伝子の変異によりこれらの発現が低下し腫瘍が発生と関与する。本研究では、散発性下垂体腫瘍でも、MLL と $p27^{Kip1}$ 発現量が低下していることが判明した。そして、ソマトスタチンアナログ製剤のオクトレオチドは、抗腫瘍効果のひとつとして MLL-$p27^{Kip1}$ 経路を PI3K/Akt や MAPK を介し転写レベルで活性化することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Menin, the product of the MEN1 gene, form a nuclear complex with mixed lineage leukemia (MLL) protein, a human histone methyltransferase and activated transcription of the $p27^{Kip1}$ and $p18^{Ink4C}$ genes. In multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), a mutation of menin caused decreased expression of the $p27^{Kip1}$ and $p18^{Ink4C}$ genes and deregulated cell growth. We found that the MLL-$p27^{Kip1}$ pathway was downregulated in the pituitary adenomas, and octreotide increased the $p27^{Kip1}$ level, at least in part, by sequential transcriptional stimulation of the MLL and $p27^{Kip1}$ genes through PI3K/Akt and MAPK pathways.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合　計 |
|---|---|---|---|
| ２００８年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| ２００９年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| ２０１０年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総　計 | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：内分泌学
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学
キーワード：MLL、p27、下垂体腫瘍、オクトレオチド

1. 研究開始当初の背景

内分泌腫瘍の発症機構は多くの研究がされてきたが、これまで遺伝子変異による遺伝性下垂体腫瘍は、多発性内分泌腺腫症１型 (MEN1)の Men1 遺伝子のみであった。体細胞変異としては Gsαや p27, p18, p53, Rb1 の発現低下などが報告されていた。実際、Men1 や p27, p18, Rb1 のノックアウトマウスでは下垂体腫瘍が発生する。従って、これら

の下流もしくは上流には共通のシグナル伝達機構が存在することが予想された。

Mixed Lineage Leukemia (MLL)は、染色体転座によりそのＮ端側の蛋白質と他の種々の蛋白質とが融合蛋白質を生じ、急性骨髄性白血病や急性リンパ急性白血病を引き起こす蛋白質として１９９０年代前半に単離された。しかし、正常（野生型）の MLL の生理的機能については長い間不明であった。２００２年になり、同時に２グループから MLL はショウジョウバエの trithorax の ortholog で、Ｃ端側の SET ドメインにはヒストンメチル化活性がありヒストン３のＮ端から４番目リジン残基（Ｈ３Ｋ４）をメチル化し、ホメオボックス蛋白質のＨＯＸ遺伝子群の活性化をしていることが明らかとなった。このＨ３Ｋ４のメチル化は発現の強い遺伝子群に認められることが明らかとなっている。さらに、２００４年になり、この MLL と上記 Men1 の遺伝子産物である menin が、WDR5 や ASH2 など転写制御機構に重要な蛋白質と核内において巨大な複合体を形成し、ＨＯＸ遺伝子ばかりでなく p27 や p18 も標的遺伝子であることが判明した。そして MEN1 では、menin に変異が起こり、p27 や p18 の遺伝子発現が低下し内分泌腫瘍が発生することが明らかとなった。さらに 2006 年になり、p27 の遺伝子変異により家族性の下垂体腫瘍が発生することが報告され、MLL/menin-p27,p18 経路という一連のシグナル伝達機構が明らかとなり、この系の異常が下垂体腫瘍に強く関与していることが予想された。

また、主に内分泌腫瘍の治療に用いられているソマトスタチンアナログ製剤には、ホルモン分泌抑制作用と抗腫瘍作用があるが、前者は、その機構として Gi を介する PKA 経路の抑制あるいは Ca イオン流入の抑制などが明らかだが、後者の機構の詳細は不明であった。

## ２．研究の目的

内分泌腫瘍の代表として散発性下垂体腫瘍を用い MLL-p27$^{Kip1}$ 経路の腫瘍発生への関与を検討し、さらに、ソマトスタチンアナログ製剤のひとつのオクトレオチドの抗腫瘍作用におけ MLL-p27$^{Kip1}$ 経路の関与を明らかとすることを目的とした。

## ３．研究の方法

１）インフォームドコンセントの得られた下垂体腫瘍症例の経蝶形骨洞腫瘍摘出術にて摘出された腫瘍の一部を試料とした。これらの試料を実験に供する際には、倫理面および個人情報の取り扱いに十分に配慮して行った。

２）症例は、ＧＨ産生腫瘍 13 例、PRL 産生腫瘍 11 例、ACTH 産生腫瘍 5 例、TSH 産生腫瘍 4 例、非機能性腫瘍 15 例、正常下垂体 5 例である。

３）得られた腫瘍あるいは正常下垂体から Isogen を用いて total RNA を抽出した。アガロースゲルにてリボゾーム RNA を観察することにより RNA の質を確認した後、300 ng の total RNA からランダムプライマー、Oligo (dT)プライマーを用いて cDNA を作製した。

４）上記 cDNA と TaqMan probe を用いたリアルタイム PCR にて MLL、Men1、p27$^{Kip1}$、p18$^{Ink4C}$ の mRNA を増幅し、正常下垂体から作成したコントロール用 cDNA を希釈し標準曲線を作製後、それぞれの mRNA 量を GAPDH mRNA の相対的比率で補正した。また、得られた結果を腫瘍の大きさや術前薬物治療の有無など様々な臨床データと比較検討した。

５）ラット下垂体腫瘍細胞株である GH4C1 細胞にオクトレオチドを投与し、MLL、p27$^{Kip1}$ 発現量に与える影響をリアルタイム PCR、Western Blot、Luciferase assay で検討した。

６）GH4C1 細胞に MLL の強制発現系や siRNA を用いた発現抑制系を用いて、p27$^{Kip1}$ 発現量への影響を解析した。

## ４．研究成果

１)症例の平均年齢は GH 産生腫瘍で 43.7 ± 4.4 歳、PRL 産生腫瘍が 40.6 ± 2.8 歳、ACTH 産生腫瘍 44.6± 4.4 歳、TSH 産生腫瘍 49.3 ± 5.8 歳、非機能性腫瘍で 50.7 ± 2.1 歳、正常下垂体 75.2 ± 3.4 歳であった。男女比は女性比で、GH 産生腫瘍 45.5 ％、PRL 産生腫瘍 36.4 ％、ACTH 産生腫瘍 40.0 ％、TSH 産生腫瘍 25.0 ％、非機能性腫瘍 46.7 ％であり、いずれも有意な差は認められなかった。

２)PRL 産生腫瘍において MLL、Men1、p27$^{Kip1}$、p18$^{Ink4C}$ mRNA 発現量は正常下垂体と比較して有意に低下していた。GH 産生腫瘍におけるこれらの発現量は、低下しているものから正常発現を示すものがあった。非機能性腫瘍では p27$^{Kip1}$ mRNA 発現量は正常で、その他の mRNA 発現量は低下を示しプロラ

クチン産生腫瘍とは異なった発現様式を示していた。

3）下垂体腫瘍における MLL、Men1、p27$^{Kip1}$、p18$^{Ink4C}$ mRNA 発現量の相関を検討したところ、PRL 産生腫瘍、GH 産生腫瘍において、p27$^{Kip1}$ mRNA、MLL mRNA 間で強い相関が認められた。

4）GH 産生腫瘍における mRNA 発現量が症例により様々な発現量を示していたため、症例の各種パラメーターや腫瘍の特徴と発現量との比較検討し、オクトレオチド治療を受けた GH 産生腫瘍では未治療群と比較して MLL mRNA 発現量が 2.4 倍、p27$^{Kip1}$ mRNA 発現量が 4.2 倍と増加していることが判明した。さらに、未治療の GH 産生腫瘍における MLL、p27$^{Kip1}$ mRNA 発現量は、正常下垂体と比較して有意に低下していた。

5）GH4C1 細胞に MLL を強制発現すると p27$^{Kip1}$ mRNA レベルで 8 倍に、蛋白レベル 2.3 倍の増加を認め、p27$^{Kip1}$ プロモーター活性も 2.1 倍に増加した。

6）$GH_4C_1$ 細胞では、オクトレオチドの添加により MLL ならびに p27$^{Kip1}$ mRNA 量は濃度依存性に増加し、蛋白レベルでも同様の増加を認めた。さらに、オクトレオチドは p27$^{Kip1}$ プロモーター活性を 4 時間で約 2.6 倍に増加させ、MLL 遺伝子プロモーター活性を 4 時間で約 2 倍に増加した。また、オクトレオチドによる p27$^{Kip1}$ 発現量の増加は MLL 発現を siRNA により低下させることにより消失した。

（考察）

これまで下垂体腫瘍における p27$^{Kip1}$ 発現が低下していることは報告されているが、主に蛋白質の発現量について検討され、この低下は Skp2 などのユビキチンリガーゼを含む蛋白質分解機構によるものと考えられてきた。しかし、下垂体腫瘍では Skp2 や Jab1 発現量が正常下垂体と比較し変化がないことから、別の制御機構の存在が予想されていた。本研究では、下垂体腫瘍において p27$^{Kip1}$ 発現が MLL 発現により転写レベルで制御されていることが明らかとなり、また、これらの発現が下垂体腫瘍で低下していることは、p27$^{Kip1}$ ノックアウトマウスでは下垂体腫瘍が形成されることなどから、下垂体腫瘍発症の原因の 1 つであると考えられた。

オクトレオチドなどのソマトスタチンアナログは GH 産生腫瘍など様々な内分泌腫瘍の治療に用いられ、実際、GH 産生腫瘍では 70%の症例で血清 GH 値、IGF-1 値が正常化し、50%の症例で腫瘍が縮小する。このオクトレオチドによるホルモン分泌阻害は、主にオクトレオチドによる cAMP の減少と $Ca^{2+}$の細胞内流入を阻害することによるが、腫瘍を縮小させる機構については不明な点が多い。これまでの報告では、ソマトスタチンアナログが MAPK を介して p27$^{Kip1}$ 発現を増加させることや、p53 や bcl-2 associated protein を増加させること、TNF-α、DR4 などを増加させ、アポトーシス誘導することなどが報告されている。さらに、ラットのインスリノーマ細胞では、オクトレオチドは PI3K/Akt 経路を介して、mTOR、p70S6K のリン酸化を減少させ、細胞周期を制御すること、下垂体腫瘍細胞では PI3K/Akt 経路を介して、Zac1 を増加させ細胞周期を制御することなどが報告されている。本研究では、オクトレオチドが MLL、p27$^{Kip1}$ 発現量を増加させ、p27$^{Kip1}$ 発現量の増加には MLL が必要であること、さらに、MLL 発現量の増加は p27$^{Kip1}$ 発現量を増加させることが明らかとなった。このことからオクトレオチドの抗腫瘍効果のメカニズムの一つとして MLL-p27$^{Kip1}$ 経路が関与していると考えられた。

（結論）

下垂体腫瘍では、MLL-p27$^{Kip1}$ 経路に異常があり、これが一因となり腫瘍が発症している可能性が示唆された。また、ソマトスタチンアナログ製剤オクトレオチドは MLL 遺伝子の転写を促進し、さらに下流にある p27$^{Kip1}$ の発現を増加させていることにより細胞周期ならびに増殖を制御している。

## 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 26 件）


1. Ishida E, Yamada M, Horiguchi K, Taguchi R, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Yoshida S, Tanaka Y, Yokota M, Tosaka M, Hirato J, Yamada S, Yoshimoto Y, Mori M. Attenuated expression of menin and p27 (Kip1) in an aggressive case of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) associated with an atypical prolactinoma and a malignant pancreatic endocrine tumor. Endocr J. 査読有、2011 (in press)

2. Nakajima Y, Yamada M, Horiguchi K, Satoh T, Hashimoto K, Tokuhiro E, Onigata K, Mori M. Resistance to thyroid hormone due to a novel thyroid

hormone receptor mutant in a patient with hypothyroidism secondary to lingual thyroid and functional characterization of the mutant receptor. Thyroid. 査読有、2010 Aug;20(8):917-26

3. Yamada M, Horiguchi K, Umezawa R, Hashimoto K, Satoh T, Ozawa A, Shibusawa N, Monden T, Okada S, Shimizu H, Mori M. Troglitazone, a ligand of peroxisome proliferator-activated receptor-{gamma}, stabilizes NUCB2 (Nesfatin) mRNA by activating the ERK1/2 pathway: isolation and characterization of the human NUCB2 gene. Endocrinology. 査読有、2010;151:2494-2503.

4. Hashimoto K, Ishida E, Miura A, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Okada S, Yamada M, Mori M. A liver X receptor (LXR)-beta alternative splicing variant (LXRBSV) is preferentially expressed in the pituitary. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、2010 394:548-552.

5. Satoh T, Yoshino S, Katano A, Ishizuka T, Tomaru T, Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M, Mori M. Isolation of a novel leptin receptor gene promoter preferentially functioning in neuronal cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読有、2009;389:673-677.

6. Umezawa R, Yamada M, Horiguchi K, Ishii S, Hashimoto K, Okada S, Satoh T, Mori M. Aberrant Histone Modifications at the Thyrotropin-Releasing Hormone Gene in Resistance to Thyroid Hormone: Analysis of F455S mutant thyroid hormone receptor. Endocrinology. 査読有、2009; 150:3425-3432.

7. Satoh T, Ishizuka T, Tomaru T, Yoshino S, Nakajima Y, Hashimoto K, Shibusawa N, Monden T, Yamada M, Mori M. Tat-binding Protein-1, an ATPase of 19S Regulatory Particles of the 26S Proteasome, Enhances Androgen Receptor Function in Cooperation with Tat-binding Protein-1-interacting Protein/Hop2. Endocrinology 査読有、2009; 386:697-702.

8. Horiguchi K, Yamada M, Satoh T, Hashimoto K, Hirato J, Tosaka M, Yamada S, Mori M.. Transcriptional Activation of the MLL－$p27^{Kip1}$ Pathway by a Somatostatin Analogue. Clin Cancer Res. 査読有、15: 2620-2629. 2009.

9. Shimizu H, Oh-I S, Hashimoto K, Nakata M, Yamamoto S, Yoshida N, Eguchi H, Kato I, Inoue K, Satoh T, Okada S, Yamada M, Yada T, Mori M. Peripheral administration of nesfatin-1 reduces food intake in mice: the leptin-independent mechanism. Endocrinology. 査読有、150:662-671, 2009.

10. Matsumoto S, Hashimoto K, Yamada M, Satoh T, Hirato J, Mori M. Liver X receptor-alpha regulates proopiomelanocortin (POMC) gene transcription in the pituitary. Mol Endocrinol. 査読有、23:47-60. 2009.

〔学会発表〕(計 66 件)

1. 小澤厚志，山田正信，堀口和彦，田口亮，Stephen J Marx，森昌朋，多発性内分泌腫瘍症１型の腫瘍発生分子メカニズムの解明:モデルマウスの解析，第 37 回日本神経内分泌学会学術集会，京都，2010.10.23
2. 田口亮，山田正信，堀口和彦，小澤厚志，渋沢信行，橋本貢士，佐藤哲郎，森昌朋，下垂体腫瘍など内分泌臓器特異的腫瘍発生を規定する menin/MLL-$p27^{Kip1}$ の発現，第 37 回日本神経内分泌学会学術集会，京都，2010.10.23
3. Yamada M, Horiguchi K, Hashimoto K, Sato T, Yamada S, Mori M, Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with pituitary adenoma: Analysis of 345 patients pre- and post- operation, International Thyroid Congress, Paris, 2010.9.15
4. 山田正信，堀口和彦，梅澤良平，田口亮，橋本貢士，佐藤哲郎，岡田秀一，

清水弘行，森昌朋、チアゾリジン誘導体のNUCB2 mRNA安定性制御機構，第31回日本肥満学会学術集会，前橋，2010.5.29
5. 小澤厚志，山田正信，渋沢信行，橋本貢士，佐藤哲郎，森昌朋、MEN1遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいて発症する膵内分泌腺腫瘍の定量的解析，第53回日本糖尿病学会学術集会，岡山，2010.5.28
6. Horiguchi K, Yamada M, Taguchi R, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Tosaka M, Yamada S, Mori M, Gsp mutations and the MLL-p27 pathway in pituitary adenoma, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010. 3.29（京都国際会議場）
7. Taguchi R, Yamada M, Horiguchi K, Ozawa A, Hashimoto K, Sato T, Mori M, Profile of gene in cells expressing wild-type and A242V menin, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010.3.29（京都国際会議場）
8. Yamada M, Horiguchi K, Ishii S, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Aberrant histone modifications involved in resistance to thyroid hormone, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto Japan, 2010.3.28（京都国際会議場）
9. Ozawa A, Yamada M, Koibuchi Y, Horiguchi J, Horiguchi K, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Mori M, Expression level of p18, but not p27, is reduced in thyroid tumors, 9th Asia and Oceania Thyroid Association Congress, Nagoya Japan, 2009.11.2
10. 橋田哲、山田正信、渋沢信行、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋、再発を繰り返したSDHB遺伝子変異による家族性paragangliomaの1例、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009.4.29
11. 堀口和彦、山田正信、橋本貢士、佐藤哲郎、森昌朋、オクトレオチドによるMLL転写制御機構、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009.4.28
12. 小澤厚志、山田正信、森昌朋、MEN1遺伝子ヘテロ欠損マウスにおける膵内分泌腺腫瘍の定量的解析、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009.4.24
13. 山田正信、堀口和彦、小澤厚志、森昌朋、下垂体腺腫　最近の展開　下垂体腺腫薬物療法の分子メカニズムと腫瘍発生の接点、第82回日本内分泌学会学術集会、前橋、2009.4.23
14. Kazuhiko Horiguchi, Masanobu Yamada, Koshi Hashimoto, Tetsurou Satoh, Junko Hirato, Masahiko Tosaka, Shozo Yamada, and Masatomo Mori. Mixed lineage leukemia (MLL) is crucial for the action of somatostatin analogue. The 13th Meeting of the European NeuroEndocrine Association, Antalya Turkey ,2008.10.29
15. Masanobu Yamada, Kazuhhiko Horiguchi, Takeshi Hosoya, Shozo Yamada, Masatomo Mori, Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis in the Patients with Pituitary Adenoma: Analysis of 282 Pre- and Post- Operated Patients. The 13th Meeting of the European NeuroEndocrine Association, Antalya Turkey ,2008.10.29
16. 山田正信、堀口和彦、細谷剛、中島康代、橋本貢士、佐藤哲郎、山田正三、森昌朋、中枢甲状腺機能低下症の病態と治療、第81回日本内分泌学会、青森、2008.5.16

〔図書〕（計１件）
1. Yamada M, Satoh T, Hashimoto K. Chapter 13: Thyroiditis, Clinical Management of Thyroid Disease. p191-202, 2009, Fredrc Wondisford edt. Elsvier

〔その他〕
ホームページ等
http://ichinai.dept.med.gunma-u.ac.jp/lab/index.htm

６．研究組織
(1)研究代表者
山田　正信（YAMADA　MASANOBU）
群馬大学・医学部・講師
研究者番号：９０２６１８３３