

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08901

研究課題名(和文)多発性内分泌腫瘍症1型におけるMEN1遺伝子のヘテロ接合性欠失機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of heterozygous deletion mechanism of MEN1 gene in multiple endocrine neoplasia type 1

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) 3,400,000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、内分泌腺腫瘍化におけるMEN1遺伝子のヘテロ接合性の欠失(loss of heterozygosity: LOH)のメカニズムと、腫瘍形成過程におけるLOHの意義につき検討した。MEN1型における標的内分泌腺においては、LOH発症前の遺伝子プロファイルが、腫瘍形成後の遺伝子プロファイルと大きく異なっていた。また内分泌腺の腫瘍化において、MEN1遺伝子のLOHの起こり方は同一個体の腫瘍部においても均質でなく、またLOHの程度と、腫瘍の悪性度や機能獲得(ホルモン過剰分泌)とは相関がないことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMEN1型の腫瘍発症機構の研究としては、癌抑制遺伝子の機能破綻後の、すなわちLOHが生じた後の腫瘍組織を用いてMEN1の機能不全が腫瘍増殖に及ぼす影響について論ぜられた研究が主であったが、今回、私達は、MEN1型におけるLOH発症前の標的内分泌腺における遺伝子変動に着目して研究を遂行した。今後研究を進展させることでp53遺伝子、Rb遺伝子、APC遺伝子など他の癌抑制遺伝子にも共通するLOHの機構の解明につながる可能性がある。また、膵内分泌腫瘍化に関わる新規因子群や経路の詳細が解明できれば、膵内分泌腫瘍の診断、治療における新たな分子マーカーや、創薬のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：MEN1, the causative gene of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN type 1), is considered to be a tumor suppressor gene.

We investigated the significance of LOH (loss of heterozygosity) in the process of tumorigenesis in endocrine glands. In target endocrine glands in MEN1, the genetic profile before LOH was significantly different from that after tumorigenesis. In endocrine tumorigenesis, the occurrence of LOH of the MEN1 gene is not uniform even in the same individual tumor site, and there is no correlation between the degree of LOH and the malignancy of the tumor or gain of function (hormone hypersecretion).

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：遺伝子 腫瘍症候群 マウス

## 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 型の原因遺伝子 *MEN1* は 1997 年にクローニングされ、遺伝子産物は *menin* と命名された。*MEN1* は癌抑制遺伝子と考えられており、MEN1 型の標的内分泌細胞の腫瘍化には、まず *MEN1* 両 allele の欠失、すなわち *MEN1* 遺伝子のヘテロ接合性の欠失 (loss of heterozygosity: LOH) が生じることが重要な事象と考える。しかしながら MEN1 型において標的細胞における *MEN1* の野生型 allele の障害が、どのような機序で発生し、ヘテロ接合性の欠失 (LOH) が完成するのは、これまで詳細が不明のままである。2012 年に報告された *menin* のクリスタル構造解析の結果では、*menin* の同一ポケットには転写因子である MLL や JunD が結合することが示された。MEN1 型のモデルマウスとして、*Men1* ヘテロ欠損マウス (*Men1*<sup>+/-</sup>) が発表されているが、私達は *menin*-JunD 共役結合破綻が MEN1 型の腫瘍発症機構において重要と考え、JunD の欠損した *Men1*<sup>+/-</sup>-*JunD*<sup>-/-</sup> マウスを作製し解析したところ、*Men1*<sup>+/-</sup> マウスと比較して、*Men1*<sup>+/-</sup>-*JunD*<sup>-/-</sup> では、より早期に膵内分泌腺腫が発症しており、更に同腺腫においては *Men1* の野生型 allele の欠失が生じていた。これらの研究結果から、*menin*-JunD の複合体形成不全が MEN1 型における内分泌細胞腫瘍化過程において、second hit を引き起こし、*MEN1* の LOH を完成させると考えた。

### 2. 研究の目的

MEN1 型に発症する腫瘍のうち、膵内分泌腺および副甲状腺の腫瘍化を対象として、first hit (ヒト MEN1 型における *MEN1* 胚細胞変異、あるいはモデルマウスにおける変異 *Men1* allele) が既に生じている状態で、どの段階で、どのような機序で second hit が生じ、*MEN1* 野生型 allele の欠失 (LOH) が生じるのか、その機構を解明すること、および *menin* の欠失によって標的内分泌腺における遺伝子プロファイルに生じる差異と、その表現型としての腫瘍悪性度や腫瘍の機能性・非機能性の腫瘍分化に与える機構を解明すること本研究課題の主目的とした。

### 3. 研究の方法

MEN1 型における膵内分泌腫瘍発症過程における癌抑制遺伝子 *MEN1* 野生型 allele の消失による LOH 形成機構の全容解明のため、下記の研究 1) ~ 4) を行った。

1) *Men1*<sup>+/-</sup> マウスより単離した膵内分泌細胞を用いての cDNA マイクロアレイ解析: MEN1 型のモデルマウスである *Men1* ヘテロ欠損マウス (*Men1*<sup>+/-</sup>) では、約 9 月齢から膵内分泌腫瘍を発症するため、腫瘍発症前段階である 5 月齢と 8 月齢でマウスからコラゲネース法にて膵島細胞を単離し、total RNA を抽出し、cDNA マイクロアレイ解析を施行した。

2) 膵内分泌腫瘍細胞株を用いて抗 JunD 抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP): *Men1* 遺伝子の LOH 形成に重要な役割を担うと考えられる転写因子 JunD への抗体を用いて、膵内分泌腫瘍細胞株にて免疫沈降を行い、回収した断片化 DNA を試料として ChIP シークエンスを計画した。これによって、膵内分泌細胞において JunD が調節する標的遺伝子群の網羅的解析を試みた。

3) ヒト MEN1 型に発症した膵内分泌腫瘍検体を用いての遺伝子 / 蛋白発現解析: 当院の内分泌糖尿病内科および遺伝子診療部で MEN1 型の診断が確定された患者のうち、膵内分泌腫瘍の手術適応を満たし、外科的切除術を施行された症例のホルマリン固定パラフィン包埋された腫瘍標本から未染色切片を作製し、クロモグラニン A、シナプトフィジン、インスリン、グルカゴン、ガストリン、*menin* への各抗体を用いて免疫染色を行い、また MIB-1 index も計測した。

4) ヒト MEN1 型に発症した膵内分泌腫瘍組織を用いた RNA シークエンシング: 3) で用いた腫瘍サンプルのうち、*MEN1* 遺伝子に生殖細胞系列に病的変異を有する群と、生殖細胞系列変異を認めない群からそれぞれ 4 例ずつ、腫瘍部から Total RNA を抽出し RNA サンプルから rRNA を除去し、クオリティチェックを行い、シークエンスライブラリー調整後に RNA シークエンシングを行い、解析した。

5) 3) と同様にヒト MEN1 型に発症した副甲状腺腫瘍検体を用いて *menin* 抗体を用いた免疫染色と、腫瘍組織から抽出した RNA を用いての RNA シークエンシングを行った。

### 4. 研究成果

1) *Men1*<sup>+/-</sup> マウスより単離した膵内分泌細胞を用いての cDNA マイクロアレイ解析:

マイクロアレイ解析にて得られた結果を用いて、パスウェイ解析、Go-fisher解析を施行したところ、膵内分泌腫瘍発症の前段階である5月齢と8月齢の*Men1*<sup>+/-</sup>マウスの膵内分泌腺組織においてはDNA複製因子群、細胞周期調節因子群などでの遺伝子変動が多いことが判明した。私達は既に10-12月齢の*Men1*<sup>+/-</sup>より単離した膵内分泌細胞を用いて同様のcDNAマイクロアレイ解析を施行していたが、腫瘍発症後の結果を反映してか、血管新生に關与する遺伝子群や、細胞増殖に關与する遺伝子群の大きな発現変動を認めていた。今回の5月齢および8月齢の*Men1*<sup>+/-</sup>より単離した膵内分泌細胞における変動遺伝子群と10-12月齢のマウスからの結果は相違していた。特に腫瘍発症前段階で生じている遺伝子発現変動が、*Men1*野生型alleleの消失に關与していることが予想され、現在、これまでの発表論文や遺伝子データベースを検索し、LOH発症に關与する遺伝子群の絞り込みを行っている。

2) 膵内分泌腫瘍細胞株を用いた抗JunD抗体によるクロマチン免疫沈降(ChIP)：マウス膵細胞過形成株 (HC-9) から核蛋白成分を抽出し、市販の抗JunD抗体を用いて免疫沈降させた。得られた沈降物を電気泳動後、抗menin抗体や、これまでmeninとの共役結合が報告されている種々の蛋白質(巨大転写複合体の構成要素である、MLL, Ash2, RbBP5など)への抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったが、これら蛋白質の発現が確認できなかった。

3) ヒトMEN1型に発症した膵内分泌腫瘍検体を用いての遺伝子/蛋白発現解析：臨床的にMEN1型の診断が確定された患者の膵内分泌腫瘍においては、症例ごとにmeninの染色性は一樣でなく、同一個体における腫瘍部においてもmeninの染色性に差が見られた。またmeninの染色性とMIB-1 indexには相関はなく、meninの蛋白質発現レベルと腫瘍の悪性度には相関関係は認めなかった。また膵内分泌腫瘍の機能性・非機能性とmenin発現量の間にも相関関係は認めなかった。

4) ヒトMEN1型に発症した膵内分泌腫瘍組織を用いたRNAシーケンシング：MEN1遺伝子に生殖細胞系列に病的変異を有する群と、生殖細胞系列変異を認めない群からそれぞれRNAを抽出し、RNAシーケンシングを行った。発現変動遺伝子のIPAパスウェイ解析では、変動遺伝子群の上流因子予測解析、およびさらに上流の制御因子予測解析においてMEN1が有意なものとして検出された。

5) ヒトMEN1型に発症した副甲状腺腫瘍組織を用いた遺伝子/蛋白発現解析, RNAシーケンシング：ヒトMEN1型に発症する副甲状腺腫瘍においてもmeninの染色性は一樣でないことが判明した。またmeninの染色性と副甲状腺ホルモン濃度には相関関係は認めなかった。RNAシーケンシングについては発現変動遺伝子群の解析を継続している。

従来のMEN1型の腫瘍発症機構の研究としては、癌抑制遺伝子の機能破綻による腫瘍化機構として、主にsecond hitが起こった後の、すなわちLOHが生じた後の腫瘍組織や、腫瘍細胞を用いてmeninの機能不全が腫瘍増殖に及ぼす影響、効果について論ぜられてきた歴史があり、MEN1野生型allele欠失の機構を解明しようという試みはなされて来なかった。今回、私達は本研究を通して、MEN1型におけるLOH発症前の標的内分泌腺における遺伝子プロファイルが、腫瘍形成後の遺伝子プロファイルと大きく異なることを見出した。また内分泌腺の腫瘍化において、MEN1遺伝子のLOHの起こり方は同一個体の腫瘍部においても均質でなく、またLOHの程度と、腫瘍の悪性度や機能獲得(ホルモン過剰分泌)とは相関がないことが判明した。今後研究を進展させることで*p53*遺伝子、*Rb*遺伝子、*APC*遺伝子など他の癌抑制遺伝子にも共通するLOHの機構の解明につながる可能性がある。また、膵内分泌腫瘍化に關与する新規因子群や経路の詳細が解明されれば、膵内分泌腫瘍の診断、治療における新たな分子マーカーや、創薬のターゲットとなる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kondo Yuri, Ozawa Atsushi, Kohno Daisuke, Saito Kazuma, Buyandalai Battsetseg, Yamada Sayaka, Horiguchi Kazuhiko, Nakajima Yasuyo, Shibusawa Nobuyuki, Harada Akihiro, Yokoo Hideaki, Akiyama Hideo, Sasaki Tsutomu, Kitamura Tadahiro, Yamada Masanobu	4. 巻 32
2. 論文標題 The Hypothalamic Paraventricular Nucleus Is the Center of the Hypothalamic?Pituitary?Thyroid Axis for Regulating Thyroid Hormone Levels	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thyroid	6. 最初と最後の頁 105-114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/thy.2021.0444	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 Saito Kazuma, Horiguchi Kazuhiko, Yamada Sayaka, Buyandalai Battsetseg, Ishida Emi, Matsumoto Shunichi, Yoshino Satoshi, Nakajima Yasuyo, Yamada Eijiro, Saito Tsugumichi, Ozawa Atsushi, Tajika Yuki, Akiyama Hideo, Yamada Masanobu	4. 巻 69
2. 論文標題 Maternal hypothyroidism is associated with M-opsin developmental delay	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 391 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JME-22-0114	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, MATSUMOTO Shunichi, YAMADA Eijiro, SAITO Tsugumichi, OKADA Kazuya, WATANABE Takuya, NAKAJIMA Yasuyo, OZAWA Atsushi, YAMADA Masanobu, OHSHIMA Kihachi, OKADA Shuichi	4. 巻 42
2. 論文標題 TBC1D8B, a GTPase-activating protein, is a novel apoptosis inducer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.95	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 MATSUMOTO Shunichi, OKADA Junichi, YAMADA Eijiro, SAITO Tsugumichi, OKADA Kazuya, WATANABE Takuya, NAKAJIMA Yasuyo, OZAWA Atsushi, OKADA Shuichi, YAMADA Masanobu	4. 巻 42
2. 論文標題 Overexpressed exocyst complex component 3-like 1 spontaneously induces apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 109 ~ 113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.42.109	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 Katano-Toki Akiko, Yoshino Satoshi, Nakajima Yasuyo, Tomaru Takuya, Nishikido Ayaka, Ishida Emi, Horiguchi Kazuhiko, Saito Tsugumichi, Ozawa Atsushi, Satoh Tetsuro, Yamada Masanobu	4. 巻 562
2. 論文標題 SFPQ associated with a co-activator for PPAR , HELZ2, regulates key nuclear factors for adipocyte differentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.014	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 T, Ozawa A, Masuda S, Yoshino S, Ishida E, Kondo U, Horiguchi K, Isii S, Tomaru T, Shibusawa N, Saito T, Yamada E, Nakajima Y, Matsumoto S, Katano-Toki A, 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 Scientific reports	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 Yoshino Satoshi, Iwasaki Yusaku, Matsumoto Shunichi, Satoh Tetsuro, Ozawa Atsushi, Yamada Eijiro, Kakizaki Satoru, Trejo Juan Alejandro Oliva, Uchiyama Yasuo, Yamada Masanobu, Mori Masatomo	4. 巻 10
2. 論文標題 Administration of small-molecule guanabenz acetate attenuates fatty liver and hyperglycemia associated with obesity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-70689-5	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 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 該当する

1. 著者名 小澤厚志	4. 巻 78巻増刊4
2. 論文標題 多発性内分泌腫瘍の病態生理と臨床像	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 841-847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 小澤厚志	4. 巻 126
2. 論文標題 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	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 内科	6. 最初と最後の頁 591-596
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 内分泌総論 (教育講演)
3. 学会等名 第25回遺伝性腫瘍セミナー (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤厚志、近藤友里、渡邊琢也、河野大輔、北村忠弘、山田正信
2. 発表標題 エネルギー代謝調節機構におけるThyrotropin-Releasing Hormone (TRH)の役割 (シンポジウム)
3. 学会等名 第42回日本肥満学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤厚志、近藤友里、河野大輔、北村忠弘、山田正信
2. 発表標題 エネルギー代謝調節機構におけるThyrotropin-Releasing Hormone (TRH)の役割: TRHノックアウトマウスの解析 (シンポジウム)
3. 学会等名 第7回群馬大学生体調節研究所 内分泌代謝シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小澤厚志
2. 発表標題 内科医から見たMEN1に伴うPNETの症例のポイント (CPC)
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 Ozawa A, Kondo Y, Horiguchi K, Yamada M
2. 発表標題 A Case of Multiple Endocrine Neoplasia type 2A with malihnant paraganglioma.
3. 学会等名 ENDO 2022, Atlanta, GA, USA. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kondo Y, Ozawa A, Kohno D, Horiguchi K, Shibusawa N, Yokoo H, Kitamura T, Yamada M
2. 発表標題 Analysis of the responsible region of TRH in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis using Paraventricular nucleus-specific TRH deficient mice.
3. 学会等名 ENDO 2022, Atlanta, GA, USA. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Horiguchi K, Saito K, Battsetseg B, Takamizawa T, Ishida E, Matsumoto S, Yoshino S, Yamada E, Ozawa A, Yamaguchi R, Tosaka M, Yamada S, Yamada M
2. 発表標題 Comprehensive genetic analysis of TSH-secreting pituitary adenomas.
3. 学会等名 ENDO 2022, Atlanta, GA, USA. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kondo Y, Ozawa A, Watanabe T, Yoshioka M, Yamada S, Nishikido A, Ishida E, Horiguchi K, Matsumoto S, Nakajima Y, Katano-Toki A, Ishida E, Matsumoto S, Okada S, Yamada M.
2. 発表標題 Leptin regulates Hypothalamus-Pituitary-Thyroid axis via TRH in energy expenditure during fasting: The study on TRH deficient mice.
3. 学会等名 ENDO 2021, San Diego, CA, USA (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------