

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461374

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子MEN1の癌抑制機能破綻による膵 細胞腫瘍化機構の全容解明

研究課題名(英文) Mechanisms of pancreatic beta-cell tumorigenesis by tumor suppressor function failure of tumor suppressor gene MEN1.

研究代表者

小澤 厚志(OZAWA, ATSUSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10573496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：インスリノーマに代表される膵神経内分泌腫瘍の詳細な腫瘍発症機構は不明である。遺伝性に膵内分泌腫瘍を呈する疾患として多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)があげられるが、責任遺伝子MEN1、翻訳産物meninの詳細な機能は不明である。私達はMeninの共役結合蛋白であるJunDに注目し、JunDと結合能のない変異JunDトランスジェニックマウスを作製し解析したところ、ヒトインスリノーマに類似した表現型を呈していた。またこのマウスの腫瘍化のメカニズムはこれまで提唱されている腫瘍化機構とは別の経路であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of tumorigenesis of pancreatic-neuroendocrine tumor (p-NET) is still unclear. Several genes were reported to be involved in the tumorigenesis pathway of p-NET. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is an autosomal dominantly inherited syndrome characterized by the occurrence of tumors in pituitary, parathyroid and enteropancreatic neuroendocrine glands. It is known that JunD is one of the main binding partners of menin encoded by MEN1 gene. We generated and analyzed the transgenic mice that over-expressed mutant JunD. We investigated that this mouse could be the model of insulinoma. The mechanisms underlying the tumorigenesis of this mouse was different from the previous reports revealing the p-NET tumorigenesis.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：遺伝子 内分泌腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

膵細胞は膵臓内の内分泌小器官である膵ランゲルハンス島(膵島)に存在しインスリンを産生・分泌する。インスリンは生体内で唯一の血糖降下ホルモンで糖代謝、脂質代謝、蛋白質代謝など代謝制御機構の中心的役割を果たしている。再生医療へのアプローチという観点からも膵細胞の発生・分化・増殖・死・再生など膵細胞運命決定機構を解明することは重要である。インスリノーマに代表される膵神経内分泌腫瘍発症機構の詳細は不明であるが、膵細胞の自然史研究のモデルとして注目される。遺伝性に膵内分泌腫瘍を発症する疾患として多発性内分泌腫瘍症1型/MEN1型(原因遺伝子: *MEN1*)、フォンヒッペル・リンドウ病、神経線維腫症1型および結節性硬化症が知られている。MEN1型は常染色体優性遺伝疾患で複数の臓器に腫瘍発症を認める。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るが *MEN1* の両 allele 欠失がどのような機構で標的組織の腫瘍化を引き起こすのかは不明である。2012年に報告されたmeninのクリスタル構造解析の結果、meninの同一ポケットに転写調節因子であるJunDとMLL(mixed lineage leukemia)がそれぞれ別個に結合し、異なった転写調節能を示すことが明らかとなり、meninの機能解析においてJunD、MLLとの関連が注目されている。MLLはmeninと核内でHistone methyltransferase (HMT) complexを形成し膵細胞にて細胞周期を調節しているCDK inhibitorの*p27*や*p18*遺伝子プロモーター領域に直接結合し転写調節していることが示され、meninに変異があると転写制御機構が破綻し細胞の腫瘍化を来すと考えられている。一方で、JunDはAP-1(activating protein 1)ファミリーに属する転写因子であるが、meninはJunDと複合体を形成しガストリン遺伝子など標的遺伝子の発現を抑制しているが、meninと結合できないJunDはJNK(c-Jun N-terminal kinase)によるリン酸化を受けて標的遺伝子発現を増強することが示された。

MEN1型のモデルマウスとして、*Men1<sup>+/-</sup>*マウスが発表されたが、私達はmenin/JunD複合体がMEN1型の腫瘍発症機構において重要と考え、近年、Cre-loxPシステムを用いてmeninと結合できない変異*JunD* (*JunD<sup>G42E</sup>*)を膵細胞特異的に過剰発現させたトランスジェニック(TG)マウスを作製し解析したところ、10ヶ月齢にて膵細胞の過形成を認めた。これらの事実から、menin/JunD複合体形成の破綻が膵細胞腫瘍化のinitiationとなることが推察される。またMEN1型以外の遺伝性3疾患では、そ

れぞれの原因遺伝子が膵内分泌細胞の分化増殖・血管新生に幅広く関与するセリン・スレオニンキナーゼであるmTOR (mammalian target of rapamycin) パスウェイ遺伝子の制御に関わる。近年、非遺伝性膵内分泌腫瘍症例のエクソーム解析にて、*MEN1*、*DAXX* (death-domain-associated protein)、*ATRX* (thalassemia/mental retardation syndrome X-linked)、mTORパスウェイ遺伝子群にそれぞれ44%、25%、18%、16%の体細胞変異が同定された。このことから膵内分泌腫瘍の発症においては、胚細胞的側面からも体細胞的側面からも *MEN1* とmTORパスウェイ関連遺伝子が中心的な役割を演じていることは確実である。しかしながら *MEN1* による腫瘍発症機構と、mTORパスウェイ遺伝子(群)変異による腫瘍発症機構が全く別の経路であるのか、何らかのクロストークを有するののかについては不明なままである。

## 2. 研究の目的

これまでの私達の研究成果、ならびに他のグループからの最新の研究知見に基づいて、癌抑制遺伝子 *MEN1* の癌抑制機能破綻による膵細胞の腫瘍発症機構の全容解明のため、A: menin-JunD複合体破綻により惹起される膵細胞腫瘍発症機構の解明、B: 膵細胞腫瘍化機構における *MEN1* 遺伝子とmTORパスウェイ遺伝子群のクロストークの解明を本研究課題の主目的とした。

## 3. 研究の方法

1) 膵細胞特異的 *JunD<sup>G42E</sup>* TGマウスより単離した膵島細胞を用いたcDNAマイクロアレイ解析により、腫瘍形成過程において増減を認める因子(群)を同定し、2) 膵細胞株に野生型menin、変異meninをそれぞれ遺伝子導入し過剰発現させ、免疫沈降法にてそれぞれの導入遺伝子に結合する蛋白質(群)を同定した。3) 膵細胞特異的 *JunD<sup>G42E</sup>* TGマウスの詳細な表現型の解析として、a) 3月齢から15月齢までの経時的な体重の変化、b) 絶食後の空腹時血糖値および、c) 血中インスリン濃度の測定を行った。4) 膵細胞特異的 *JunD<sup>G42E</sup>* TGマウス及び野生型マウスより単離した膵島細胞を培養後に種々の手法にてインスリン分泌刺激実験を行った。5) 膵内分泌腫瘍発症前段階である、8月齢の膵細胞特異的 *JunD<sup>G42E</sup>* TGマウスより単離した膵島細胞を用いてcDNAマイクロアレイ解析を施行した。

## 4. 研究成果

1) 10月齢の膵細胞特異的 *JunD<sup>G42E</sup>* TGマウスを安楽死させコラゲネース法にて膵島細胞のみを単離し、total RNAを抽出し、クオリティ検査を施行後、cDNAマイクロアレイ解析を施行した。対照群である野生型マウスと比較して、271遺伝子が2倍以上の発現増加を認め、246遺伝子が0.5倍以下に発現が低

下していた。更に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、DNA複製因子群、転写因子群、細胞周期調節因子群の変動が大きかった。2) マウス腓 細胞過形成株 (HC-9) マウス腓 細胞腺腫株 (TC6) に、野生型menin, 変異menin (JunD と結合不能) にflag tagを標識したプラスミドを一過性に遺伝子導入し、一定期間培養後に核蛋白成分を抽出し、それぞれを抗flag抗体にて免疫沈降させた。得られた沈降物を電気泳動後、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への抗体を用いてウェスタンブロット解析を行ったところ、HMT 巨大複合体の構成要素である、Ash2, RbBP5 とmeninの共役結合を確認した。野生型menin 導入株、変異menin導入株とも共役結合蛋白質に差異を認めなかったことから、menin-JunD 共役結合の破綻はHMT巨大複合体の形成に影響を与えないことが明らかとなった。3) 腓 細胞特異的JunD<sup>G42E</sup>TGマウスを3月齢から15月齢まで経時的に体重および8時間絶食後の血糖値、血清インスリン値を測定したところ、TGマウスは対照群と比較して体重に有意差は認めなかったが、TGマウスでは9月齢以降、対照群と比較して有意に空腹時の血糖値が低下し、低血糖は高インスリン血症によるものであること、が明らかとなった。4) 更にTGマウス、対照群マウスから単離した膵島細胞を培養後にインスリン分泌能を詳細に検討したところ、TGマウスは野生型マウスと比較してより低濃度のグルコースおよびカルシウム刺激でもインスリン分泌能を有していた。一方でKCL刺激で膵島細胞を脱分化させてもTGマウスのインスリン分泌能は対照群と有意差がないことが明らかとなった。5) より若年の膵 細胞特異的JunD<sup>G42E</sup>TGマウスを用いたcDNAマイクロアレイ解析では、野生型と比べて転写調節因子や細胞分化誘導因子、血管増生因子遺伝子群の変動が大きく、腫瘍形成への関与が示唆された。しかしMen1欠損マウスで認められる細胞周期調節因子p27, p18遺伝子の発現低下は認めず、mTORパスウェイ遺伝子群における有意な変動も認めなかった。以上、今回の私達の研究成果から膵 細胞特異的JunD<sup>G42E</sup>TGマウスはヒトインスリンノーマに極めて類似した表現型を示すことが判明し、新たなインスリンノーマのモデルマウスとなりうる可能性が示された。またその腫瘍化機構にはこれまでの膵内分泌腫瘍発症のメカニズムとして提唱されているmTORパスウェイ経路やMEN1-HMT complex-p27, p18経路以外のメカニズムであることが示された。

##### 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 15件)

1. Continuous or transient high level of glucose exposure differentially increases coronary artery endothelial cell proliferation and human colon cancer cell proliferation. Shimoda Y, Tagaya Y, Ozawa A, Yamada M (他7名、7番目) *Cell J* (in press), 2016 査読有. doi: 10.22074/cellj.2017.4446.
2. Nivolumab-induced hypophysitis in a patient with advanced malignant melanoma. Okano Y, Satoh T, Ozawa A, Yamada M (他11名、10番目) *Endocr J* 63:905-912. 2016 査読有. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27440480>
3. Characteristics of Japanese aldosterone-producing adenomas with KCNJ5 mutations. Okamura T, Nakajima Y, Ozawa A, Yamada M (他15名、11番目) *Endocr J* Epub ahead of print. 2016 査読有. doi: 10.1507/endocrj.EJ16-0243.
4. HbA1c and mean glucose derived from short term continuous glucose monitoring (CGM) assessment do not correlate in patients with HbA1c >8. Yamada E, Okada S, Ozawa A, Yamada M (他9名、12番目) *Endocr Pract* Epub ahead of print. 2016 査読有. doi: 10.4158/EP161363.
5. Fyn phosphorylates AMPK to inhibit AMPK activity and AMP-dependent activation of autophagy. Yamada E, Okada S, Ozawa A, Yamada M (他5名、7番目) *Oncotarget* Epub ahead of print. 2016 査読有. doi: 10.18632/oncotarget.11916.
6. APPL1 promotes glucose uptake in response to mechanical stretch via the PKC $\zeta$ -non-muscle myosin IIa pathway in C2C12 myotubes. Saito T, Okada S, Ozawa A, Yamada M (他8名、9番目) *Cell Signal* 28: 1694-1702, 2016 査読有. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.07.010.
7. GNAS mutations in adrenal aldosterone-producing adenomas. Nakajima Y, Okamura T, Ozawa A, Yamada M (他10名、7番目) *Endocr J* 63:199-204, 2016 査読有. doi: 10.1507/endocrj.EJ15-0642.
8. Insulin autoimmune syndrome during the administration of clopidogrel. Yamada E, Okamura T, Ozawa A, Yamada M (他2名、5番目) *J Diabetes* 8:588-589, 2016 査読有. doi: 10.1111/1753-0407.12385.
9. Reversible Hypopituitarism Associated with Intravascular Large B-Cell Lymphoma: Case Report of Successful Immunochemotherapy. Sawada Y, Ishii S, Ozawa A, Yamada M (他8名、7番目) *Tohoku J Exp Med* 238:197-203, 2016 査読有. doi: 10.1620/tjem.238.197.
10. Somatic mutations of the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase (PRKACA) gene in Japanese patients with several adrenal adenomas secreting cortisol. Nakajima Y, Okamura T, Ozawa A, Yamada M (他14名、7番目) *Endocr J* 61:825-823. 2014 査読有. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069672>
11. Coordinated regulation of transcription and alternative splicing by the thyroid hormone receptor and its associating coregulators. Satoh T, Katano-Toki A, Ozawa A, Yamada M (他9名、9番目) *Biochem Biophys Res Commun* 451:24-29, 2016 査読有. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.029.
12. Protection against high-fat diet-induced obesity in Helz2-deficient male mice due to enhanced expression of hepatic leptin receptor. Yoshino S, Satoh T, Ozawa A, Yamada M (他14名、10番目) *Endocrinology* 155:3459-3472, 2014 査読有. doi: 10.1210/en.2013-2160.
13. A case of thyroid storm with a markedly elevated level of circulating soluble interleukin-2 receptor complicated by multiple organ failure and disseminated intravascular coagulation syndrome. Shimoda Y, Satoh T, Ozawa A, Yamada M (他10名、5番目) *Endocr J* 61:691-696, 2014 査読有. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748455>

14. ラ氏島細胞研究Update: Meninとラ氏島細胞. 小澤厚志, 渡邊琢也, 山田正信. ホルモンと臨床 Vol 62, 25-29 (2014) 査読無.
15. 多発性内分泌腫瘍症1型. 小澤厚志, 山田正信. 臨床画像 Vol 31, 10月増刊号, 7-9, 2015 査読無.

〔学会発表〕(計 25 件)

1. MEN1など稀な機能性下垂体腺腫の診断と治療. 小澤厚志, 佐藤哲郎, 山田正信 (シンポジウム) 第27回日本間脳下垂体腫瘍学会 2017.2.24-2.25 東京
2. 見逃してはいけない二次性(症候性)肥満. 山田正信, 小澤厚志, 佐藤哲郎(他4名, 3番目) (教育講演: 招待講演) 第37回日本肥満学会 2016.10.7-10.8 東京
3. エコーで発見された甲状腺結節の取り扱い. 小澤厚志, 山田正信 (教育講演: 招待講演) 第17回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 2016.9.9-9.10 東京
4. Role of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) in Cold-Induced Adaptive Thermogenesis in Mouse. Ozawa A, Watanabe T, Yamada M (他6名, 1番目) 17<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology 2016.8.31-9.4. Beigin, China.
5. Management of glucocorticoid replacement therapy by continuous glucose monitoring in adult patients with primary and secondary adrenal insufficiency. Watanabe T, Ozawa A, Yamada M (他6名, 2番目) 17<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology 2016.8.31-9.4. Beigin, China.
6. Role of menin in the proliferation and differentiation of pancreatic beta cells. Ozawa A, Yamada M (他3名, 1番目) (シンポジウム) 第58回日本糖尿病学会年次学術集会 2015.5.21-24. 下関
7. Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Regulates Cold-Induced Adaptive Thermogenesis in Brown Adipose Tissue. Ozawa A, Watanabe T, Yamada M. (他5名, 1番目) 15<sup>th</sup> International Thyroid Congress and 85<sup>th</sup> Annual Meeting of the ATA (American Thyroid Association). 2015.10.18-23. Orlando, FL, USA.
9. Cold-induced adaptive thrmogenesis in brown adipose tissue requires regulation by Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH). Ozawa A, Watanabe T, Yamada M. (他10名, 1番目) 8<sup>th</sup> International Asia-Oceania Conference on Obesity. 2015.10.2-4. Nagoya, Jspan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤 厚志 (OZAWA, Atsushi)  
群馬大学大学院・医学系研究科・助教  
研究者番号: 10573496

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

山田 正信 (YAMADA, Masanobu)  
群馬大学大学院・医学系研究科・教授  
研究者番号: 90261833

(4) 研究協力者

渡邊 琢也 (WATANABE, Takuya)