

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591346

研究課題名(和文)多発性内分泌腫瘍症1型の腫瘍発生メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN)

研究代表者

小澤 厚志(OZAWA, ATSUSHI)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10573496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1型)は、下垂体、副甲状腺、膵内分泌腺などに腫瘍発生を呈する遺伝性腫瘍症候群であるが、詳細な腫瘍発生機構は不明である。MEN1型の原因遺伝子MEN1の翻訳産物であるmeninと直接結合する蛋白質として転写因子であるJunD及びMLLが知られているが、私達はMEN1型に関わる種々のモデルマウスを用いた検討で、膵内分泌腫瘍の悪性化や内分泌組織特異的な腫瘍発生機構にJunDとMLLが深く関与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is an autosomal dominantly inherited syndrome characterized by the occurrence of tumors in multiple endocrine tissues including parathyroid, enteropancreatic neuroendocrine and anterior pituitary. Although the tissue selectivity of tumors in specific endocrine organs is the essence of MEN1, the mechanisms underlying the tissue-specific tumorigenesis remain unknown. It is known that JunD and MLL, both transcription factors, are main binding partners of menin encoded by MEN1 gene. Through the analysis of mouse models and cDNA microarray, we investigated that JunD and MLL are the key molecules in tumorigenesis of endocrine tissues in MEN1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：内分泌学 内分泌腫瘍 遺伝性腫瘍症

1. 研究開始当初の背景

多発性内分泌腫瘍症 1 型 (Multiple Endocrine Neoplasia type1: MEN1 型) は、同一家系内または同一人において、下垂体、副甲状腺、膵内分泌腺を主要 3 組織とし、他に甲状腺、副腎、腸管、性腺などに多発性の腫瘍発生を認める遺伝性腫瘍症候群である。半数以上が家族性発症であり、遺伝形式は常染色体優性遺伝である (*Nat Rev Cancer*. 5: 663-, 2005.). 1997 年にポジショナルクローニング法を用いて MEN 1 型の原因遺伝子の分子クローニングが施行され、原因遺伝子は *MEN1*, 遺伝子蛋白産物は *menin* と命名された (*Science*. 276: 404-, 1997.). その後、*MEN1* 遺伝子の変異が大多数の MEN 1 型患者のみならず、副甲状腺腫瘍、気管支カルチノイド、ガストリン産生腫瘍など散発性の内分泌腫瘍患者の一部にも認めることが示された。*MEN1* 遺伝子の変異の多くは遺伝子機能喪失タイプの不活性型変異と考えられ、*MEN1* 遺伝子は癌抑制遺伝子であり、その腫瘍発症様式は、Knudson の two-hit theory に従うと考えられる。しかし、どのような機序で標的組織においてのみ正常 allele の体細胞変異 (second hit) が起こり、*MEN1* 遺伝子正常 allele の LOH (Loss of heterozygosity) を来たして腫瘍化するのはいまだ不明のままである。*menin* は既知の蛋白と構造上の類似性が乏しく、そのアミノ酸配列から分子機能を推定することは出来ない。*menin* の機能解析の一環として *menin* に直接結合する蛋白質 (群) の同定が世界の幾つかのグループにて行われ、これまで 20 以上の分子が報告されてきた。これらは転写調節因子群、ゲノム安定性に関与する群、細胞周期調節因子群など多岐に渡る。*JunD* は、細胞調節因子群である AP-1 ファミリーに属する転写因子で、細胞増殖抑制機能を有する転写因子と考えられているが、Agarwal らは *menin* が *JunD* による転写制御を抑制することを報告した (*Cell*. 96: 143-, 1999.). 一方、急性白血病との関与が注目されている MLL (Mixed Lineage Leukemia) は *menin* と核内で巨大複合体を形成し、細胞周期調節因子である CDK1 (cyclin-dependent kinase inhibitor) の *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子のプロモーター領域に直接結合し、転写を活性化するが、*menin* の変異による機能喪失により、*p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子の転写抑制が生じ、細胞増殖の制御が破綻することが報告された (*Mol Cell*. 13: 587-, 2004.).

2. 研究の目的

癌抑制遺伝子 *MEN1* の機能解析は、*p53* や *Rb* など他の癌抑制遺伝子が関与する発癌機構を解明する手掛かりになる可能性があり非常に興味深い。上述した通り *menin* の機能破綻による腫瘍発症機構や、なぜ下垂体、副甲状腺、膵内分泌腺などの標的組織においてのみ腫瘍が発症するかについての詳細は不明である。私達は、MEN1 型のモデルマウスで

ある *Men1* ノックアウトマウス及び *JunD* ノックアウトマウス、*MLL* ノックアウトマウスをそれぞれ保持しており、この利点を生かして、1) *menin* とその共役因子 (*JunD*, *MLL*) との関連性から、MEN1 型の腫瘍発症機構ならびに標的組織特異的腫瘍発症機構を解明すること、2) *menin* の機能破綻による腫瘍発症化に関与する新たな molecule の探索を研究目的とした。また、ヒト *MEN1* 遺伝子転写産物では exon1 が e1A ~ e1F と 6 つ異なる splicing variant を形成し、これまでの胸腺、膵臓由来の cDNA を用いた検討では、e1B variant が最も多く発現していることが報告されている。しかし、これら exon1 の variant の生理的意義は不明のままである。そこで今回 3) 下垂体腺腫におけるヒト *MEN1* 遺伝子 splicing variant 発現の解析をも研究目的とした。臨床的に MEN 1 型を呈する症例において、*MEN1* 遺伝子の変異陽性率は、約 70~80% であり、*MEN1* 遺伝子に変異を認めない症例も数多く存在する。本研究において新規発見された遺伝子が、これら *MEN1* 遺伝子変異陰性例においての責任遺伝子として同定される可能性があり、遺伝子診断への応用が期待される。MEN 1 型症例においては、現在の臨床レベルでは発生した腫瘍に対しての外科的切除術が、唯一の根本的治療法であり、術後のホルモン補充療法の必要性や、術後再発の危険性など問題点は多い。本研究で腫瘍発生に関与する新規 molecule が同定されれば、分子標的治療のターゲットとなりうる可能性があり、新たな腫瘍治療法の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

(1) *Men1*, *JunD* ダブル変異マウス (*Men1^{+/-}JunD^{-/-}*) の樹立と病理学的解析:

Men1 遺伝子のノックアウトマウスは、ホモ接合体マウスは胎生致死を示すが、ヘテロ接合体マウスはヒト MEN 1 型に類似の表現型を呈し、9 ヶ月齢より下垂体、副甲状腺、膵細胞に腫瘍 (adenoma) を発症することが確認されている (*Proc Natl Acad Sci*. 98: 1118-, 2001.). *Men1^{+/-}* と *JunD^{-/-}* マウスを交配させ目的とする遺伝子型マウス (*Men1^{+/-}JunD^{-/-}*) を得る。野生型マウス、*Men1^{+/-}* マウスを対照群として、これら 3 群のマウスを飼育し、経時的に 6 ヶ月齢、9 ヶ月齢、12 ヶ月齢、18 ヶ月齢で安楽死させ、病理解剖を施行する。

(2) *Men1* ノックアウトマウス膵島細胞を用いたマイクロアレイ解析:

9 ヶ月齢の *Men1^{+/-}* マウス及び野生型マウスより、コラゲネース法を用いて膵島細胞を単離し、RNA を抽出し cDNA マイクロアレイ解析を施行する。パスウェイ解析、Go-Fisher 解析を行い、膵島腫瘍発症機構に関与する遺伝子群の同定を行う。

(3) *Men1* ノックアウトマウス、*MLL* ノックアウトマウスの内分泌組織における細胞周期調節因子の発現解析:

野生型マウス、*Men1^{+/-}* マウス、*MLL^{+/-}* マウスよ

りそれぞれ、脳、下垂体、膵島、副腎、肝臓、腎臓、精巣を単離し、mRNA および核蛋白を抽出し、*Men1*, *Mll*, *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 発現レベルを Real time qPCR 法、Western-blot 法にて解析する。

(4) ヒト下垂体腺腫における *MEN1* 遺伝子 splicing variant の発現解析:

ヒト下垂体由来の Marathon Ready cDNA を鋳型として *MEN1* 遺伝子の 5' RACE 法を施行する。ヒト副腎及びヒト視床下部を対照組織とする。5' RACE にて得られた PCR 産物を pGEM-T easy vector にサブクローニングし、各組織から 50 クローンずつ直接シーケンス法にて解析する。次に、外科的に摘出されたヒト下垂体腺腫 (PRL 産生腺腫 8 例, GH 産生腺腫 9 例, ACTH 産生腺腫 5 例, 非機能性腺腫 5 例) から total RNA を抽出し cDNA を作製し、*MEN1* exon1 splicing variant の発現率を解析する。

4. 研究成果

(1) *Men1*, *JunD* ダブル変異マウスの樹立と病理学的解析:

野生型マウス、*Men1^{+/-}* マウス、ダブル変異マウスを 6 月齢から 18 月齢まで、各遺伝子型それぞれ 12-15 匹ずつを経時的に解剖・病理解析を施行した結果、6 月齢では *Men1^{+/-}* で約 40% に膵ラ氏島の過形成を認め、ダブル変異マウスでは約 70% に過形成、更に 30% に腺腫を認めた。更に 12 月齢、18 月齢で解剖・病理解析を施行したところ野生型マウスでは下垂体、膵ラ氏島に 18 月齢でも腫瘍発症を認めなかったが、*Men1^{+/-}* では 12 月齢で下垂体、膵ラ氏島にそれぞれ 22%, 44% の腫瘍 (腺腫) 発症を認め、18 月齢では 27%, 72% であった。一方でダブル変異マウスでは下垂体、膵ラ氏島の腫瘍発症頻度は 12 月齢で 22%, 75%、18 月齢では 33%, 90% であり、膵ラ氏島では腺腫のみならず癌の発症も認めた。*JunD* の欠失により、膵ラ氏島では明らかに腫瘍発症頻度と悪性度が高くなった。ダブル変異マウスは、*Men1^{+/-}* マウスと比較して、早期に膵ラ氏島に腫瘍発症を認め、また悪性度も高いことが判明した。

(2) *Men1* ノックアウトマウス膵島細胞を用いたマイクロアレイ解析:

JunD の欠失による膵ラ氏島腫瘍発症の分子機構解明の目的で、腫瘍発症の最初期にあたる 9 ヶ月齢の雄 *Men1^{+/-}* マウスから膵ラ氏島を単離しマイクロアレイ解析を施行した結果、*Men1^{+/-}* マウスでは野生型マウスに比較して、271 遺伝子が 2 倍以上の発現増加を認め、246 遺伝子が 1.5 倍以下の発現低下を認めていた。特に細胞周期関連遺伝子群の発現が多く、またパスウェイ解析の結果からは、カルシウム調節系因子群、加水分解酵素関連遺伝子群、細胞膜受容体シグナルパスウェイ因子群の変動が大きかった。これらの変動因子群をダブル変異マウスの膵ラ氏島由来の RNA を用いて qPCR 法にて発現解析を施行したところ、*Men1^{+/-}* マウスとの間に有意差を認め、腫瘍発症の背景となっている可能性が示唆された。

(3) *Men1* ノックアウトマウス、*Mll* ノックアウトマウスの内分泌組織における細胞周期調節因子の発現解析:

まず野生型マウスにおける、*Men1* 及び関連遺伝子の発現レベルを qPCR 法にて解析したところ、*Men1* の mRNA 発現レベルは、内分泌組織、非内分泌組織において有意差は認めなかった。一方、*Mll* mRNA は下垂体、膵島、副腎において高発現していた。*p27^{kip1}* mRNA 発現も、同様に下垂体、膵島、副腎にて有意に高発現していた。また、*p18^{ink4c}* mRNA は副腎と精巣にて有意な高発現を示した。以上から、*Mll*, *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子の内分泌腺特異的な高発現が、*MEN1* 型の内分泌腺組織特異的腫瘍発症と関連することが示唆された。次に *Men1^{+/-}* マウスにおいて、同様に各組織における *Mll*, *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子の発現解析を行った。これら遺伝子の発現は野生型マウスでの解析と同様の結果であった。このことから *menin* の発現量の減少は、*Mll*, *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子の発現に影響を与えないことが判明した。次に *Mll^{+/-}* マウスにおける、*Men1*, *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* の遺伝子発現量を検討したところ、*Men1* 遺伝子の発現量は野生型に比較して有意差を認めなかったが、*p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子は下垂体、膵島において発現レベルが低下していた。このことから少なくとも下垂体、膵島における *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子の発現は *Mll* により規定されていることがわかった。以上のことから、*MEN1* 型における内分泌腺特異的腫瘍発症機構の一環として、*Mll* による細胞周期調節因子 *p27^{kip1}*, *p18^{ink4c}* 遺伝子制御機構の関与を解明した。

(4) ヒト下垂体腺腫における *MEN1* 遺伝子 splicing variant の発現解析:

各組織におけるヒト *MEN1* 遺伝子 exon1 splicing variant (e1A~e1F) それぞれの発現率は下垂体: e1A, 7%; e1B, 0%; e1C, 7%; e1D, 85.7%; e1E, 0%; e1F, 0%, 副腎: e1A, 0%; e1B, 29.4%; e1C, 0%; e1D, 70.6%; e1E, 0%; e1F, 0%, 視床下部: e1A, 0%; e1B, 25%; e1C, 25%; e1D, 50%; e1E, 0%; e1F, 0% であり、*MEN1* 遺伝子 exon1 の 6 つの splicing variant は、下垂体、副腎、視床下部でそれぞれ発現率が異なっていた。e1A variant は下垂体のみで発現していた。また下垂体では副腎、視床下部で高発現していた e1B variant の発現を認めなかった。しかし、実際の下垂体腺腫組織においては、PRL 産生腺腫の 88%, GH 産生腺腫の 78% で e1B の発現を認めた。ACTH 産生腺腫および非機能性腺腫では e1B の発現は認めなかった。ACTH 産生腺腫では、e1A の発現率が 80% と高率であった。*MEN1* 遺伝子 exon1 splicing variant 発現比率が、下垂体腫瘍の組織型を決定する上での新たな biomarker となりうることが示された。

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 11 件)

Katano-Toki A, Satoh T, Ozawa A, Mori M.(15人中7番目), THRAP3 interacts with HELZ2 and plays a novel role in adipocyte differentiation. Mol Endocrinol. 査読有, 27,2013:769-780.doi:10.1210/me.2012-1332

Hashimoto K, Ishida E, Ozawa A, Mori M.(9人中4番目), Human stearoyl-CoA desaturase 1 (SCD-1) gene expression is negatively regulated by thyroid hormone without direct binding of thyroid hormone receptor to the gene promoter. Endocrinology. 査読有, 154, 2013:537-549. doi: 10.1210/en.2012-1559.

Yamada M, Nakajima Y, Ozawa A, Mori M.(14人中7番目),KCNJ5 mutations in aldosterone- and cortisol-co-secreting adrenal adenomas. Endocr J. 査読有, 59, 2012:735-741.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863749

Nakajima Y, Yamada M, Ozawa A, Mori M.(12人中5番目), NR4A1 (Nur77) mediates thyrotropin-releasing hormone-induced stimulation of transcription of the thyrotropin gene: analysis of TRH knockout mice. PLoS One. 査読有, 7, 2012:e40437.doi:10.1371/journal.pone.0040437.

Taguchi R, Ozawa A, Mori M.(15人中7番目), Expression and mutations of KCNJ5 mRNA in Japanese patients with aldosterone-producing adenomas. J Clin Endocrinol Metab. 査読有, 97, 2012 :1311-1319.doi:10.1210/jc.2011-2885

Sakurai A, Suzuki S, Ozawa A, Yamazaki M. (34人中30番目) Multiple endocrine neoplasia type 1 in Japan: establishment and analysis of a multicentre database. Clin Endocrinol(Oxf). 査読有, 76, 2012:533-539.doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04227.x.

Wang Y, Ozawa A, Marx SJ.(7人中2番目)

The tumor suppressor protein menin inhibits AKT activation by regulating its cellular localization. Cancer Res. 査読有, 71, 2011:371-382. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3221.

Taguchi R, Ozawa A, Mori M.(10人中5番目) Haploinsufficient and predominant expression of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)-related genes, MLL, p27Kip1 and p18Ink4C in endocrine organs. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 415, 2011:378-383.doi:10.1016/j.bbrc.2011.10.077.

Nakajima Y, Ozawa A, Mori M.(10人中6番目) Cardiovascular complications of patients with aldosteronism associated with autonomous cortisol secretion. J Clin Endocrinol Metab. 査読有, 96, 2011:2512-2518.doi:10.1210/jc.2010-2743

Ishida E, Ozawa A, Mori M.(16人中5番目) 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, 58, 2011:287-96. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21441703

Hashimoto K, Ozawa A, Mori M.(11人中6番目) Liver X receptor- / expression ratio is increased in ACTH-secreting pituitary adenomas. Neurosci Lett. 査読有, 494, 2011:34-37. doi:10.1016/j.neulet.2011.02.048.

〔学会発表〕(計15件)

Atsushi Ozawa, Takuya Watanabe 他(12人中1番目). Distinct expression of splicing variants of the human MEN1 (multiple endocrine neoplasia type 1) gene in various pituitary adenomas. 11th Annual ENETS (European neuroendocrine tumor society) conference. 2014.3.5-3.7, バルセロナ、スペイン.

小澤厚志、渡邊琢也 他(14人中1番目). 変異 JunD による膵神経内分泌腫瘍発症機構

の解明：膵 細胞特異的変異 JunD トランスジェニックマウスの作製と解析. 第 40 回日本神経内分泌学会学術集会. 2013.10.25-26, 宮崎.

小澤厚志、山田正信 他(8 人中 1 番目). MEN1 遺伝子 Exon1 splicing variant の腫瘍組織における発現解析. 第 19 回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2013.7.26-7.27, 別府.

小澤厚志、山田正信 他(10 人中 1 番目). 膵 細胞腫瘍発症への変異 JunD の関与：細胞特異的変異 JunD トランスジェニックマウスの解析. 第 87 回日本内分泌学会学術総会. 2013.4.25-27, 仙台.

小澤厚志、山田正信 他(9 人中 1 番目). 下垂体における MEN1 遺伝子 Exon1 splicing variant の発現解析. 第 23 回日本間脳下垂体腫瘍学会学術総会. 2013.3.15-16, 鹿児島.

小澤厚志、山田正信 他(8 人中 1 番目). 多発性内分泌腫瘍症 1 型(MEN1)モデルマウスの解析：臓器特異的腫瘍発症機構の解明. 第 86 回日本内分泌学会学術総会. 2012.4.19-21, 名古屋.

〔図書〕(計 4 件)

小澤厚志 他、文光堂、臨床検査ガイド 2013~2014、2013、355-357.

小澤厚志 他、医学の世界社、ホルモンと臨床「内分泌腫瘍発症機構に迫る」、2012、37-41.

水出雅文、小澤厚志 他、医学の世界社、ホルモンと臨床「膵内分泌腫瘍」、2012、17-23.

小澤厚志 他、医学の世界社、ホルモンと臨床「膵内分泌腫瘍」、2012、37-43.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤厚志 (OZAWA, Atsushi)

群馬大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10573496