

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591372

研究課題名(和文)PTHrPでなくPTHを大量発現する後腹膜腫瘍に内在する異所性ホルモン産生機構

研究課題名(英文)The mechanism of ectopic PTH-, but not PTHrP-, production in retroperitoneal tumor

研究代表者

岡崎 具樹 (Okazaki, Tomoki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60203973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：後腹膜腫瘍に高Ca血症を伴う一例の、腫瘍のPTH大量発現をRT-PCRおよび免疫組織法で確認した。PTH遺伝子配列に異常はなかったが、幾つかのPTH遺伝子転写因子群の発現量が変動していた。RNA-seqで、コピー数増減が、PTHがある11番染色体に集中し、さらにATRX遺伝子や転写共役遺伝子med1、USP24が発現消失しており、またCYP24A1mRNAの発現量が著増していた。まずCYP24A1蛋白が大過剰に発現され、その発現細胞内において活性化ビタミンD濃度が激減し、PTH mRNAの産生が著明に増強され、さらに腫瘍化刺激が重なって、異所性のPTH発現腫瘍形成が起こったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We confirmed intratumoral overproduction of PTH, but not PTHrP, in a retroperitoneal malignant fibrous hyperplasia in a patient who showed lethal hypercalcemia by using RT-PCR and immunohistochemical assay. The rearrangements or mutations of the PTH gene were not observed, while several transcriptional factors responsible for PTH gene regulation were markedly affected in their amounts. Our RNA-seq revealed that copy number variation of chromosome 11 where PTH gene resides occurred much more frequently than that in other chromosomes. Further, we found nonsense mutations of ATRX, med1 and USP24 and so on. Lastly, we found that CYP24A1 mRNA was drastically upregulated, suggesting that resultant intratumoral hypovitaminosis D might lead to uncontrollable intratumoral overproduction of PTH protein. Additional oncogenic stimuli such as perturbations of ATRX or med1/USP24 may well resulted in ectopic PTH overproduction.

研究分野：内分泌学

キーワード：PTH 異所性ホルモン産生腫瘍 次世代シーケンス法 マイクロアレイ CYP24A1 ATRX

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、後腹膜に発生した、PTH 産生かつ PTHrP 非産生線維性組織球腫として確定診断した症例に遭遇した。本研究では、PTH 遺伝子が厳格な組織特異的発現をするために副甲状腺以外の癌組織で発現することが極めて少ないことが知られていることが発端になっている。この、副甲状腺細胞から逸脱して異所性に発生した、PTH 産生腫瘍の成因を解析できる格好の機会を得た。

## 2. 研究の目的

ホルモン産生分泌の調節に因る生体の恒常性の維持に不可欠な本来のネガティブフィードバック制御機構がどのような分子機序で阻害されるのかを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

すでに保持している充分量の腫瘍標本を題材として、RNA 発現および DNA 再編成の解析、クロマチン-タンパク解析等の手法を駆使して詳細に検討する。起源を一にし、共通の受容体を利用する PTHrP 遺伝子が数多くの腫瘍の進行期に大量発現される機構との対比も念頭に置きたい。以下の方法を用いた。1)リアルタイム RT-PCR による PTH および PTHrP 遺伝子発現の定量的解析 2) 次世代法を含む DNA シークエンシング 3)リアルタイム RT-PCR による本腫瘍での、副甲状腺細胞関連遺伝子発現の定量解析 4)マイクロアレイによる解析 5) バイサルファイトクローニング 6) 副甲状腺組織的発現に必要な PTH 遺伝子の DNA 配列およびノンコーディング RNA の検討

## 4. 研究成果

後腹膜原発の悪性組織球腫症例に見られた著明な高 Ca 血症は、PTHrP でなく PTH の腫瘍からの大量発現によるものであることを RT-PCR および免疫組織学法により確認した。

しかし、本症例の PTH 遺伝子上流約 800 塩基対、全エキソン、下流約 800 塩基対までの遺伝子配列およびには変異は認められず、腫瘍特異的なメチル化の差も見られなかった。さらに、癌センターの市川仁博士が、10 数例の悪性組織球腫症例のみを対象にマイクロアレイ法で遺伝子発現解析結果を報告していることを知り、そのうちの 4 例と我々の症例との間でデータマイニングを行った。4 つのサン

ル(そのうち 1 例がやはり後腹膜原発であった)のデータを抽出し、比較検討した結果、ビタミン D 代謝酵素(CYP24A1、CYP27B1)、腫瘍抑制遺伝子の一つとして副甲状腺腫でその発現低下が知られていた HIC1、さらに PTH 遺伝子上流配列に結合してその遺伝子発現を促進するのに必要な転写因子群(AUF1、SP3、NFYB、p300、PCAF など)の mRNA の発現量が我々の症例のみにおいて、著明に変動していた。予想通り、対象に用いた 4 例の悪性組織球腫症例は、いずれも PTH mRNA がほとんど発現していなかった。この結果は、われわれが併行して行なった個別の RT-PCR のデータといずれもほぼ一致した。これらのことから、ここに述べた 10 種近くの遺伝子が異所性 PTH 遺伝子発現の原因に強く関与することが示唆された。

さらに東大先端研の油谷浩幸教授とともに次世代シーケンシング法を用いて本症例の RNA-seq を行った。コピー数の増減のある 30 数個の遺伝子部位のうち、40%にも上る 15 部位が PTH の存在する 11 番染色体に集中して認められた、神経内分泌後腹膜(膵臓が中核をなす)において高頻度に欠損が認められる、クロマチン修飾およびその構造改変にきわめて重要な役割を担う ATRX 遺伝子がフレームシフト変異のために発現消失していた。この ATRX 遺伝子以外にエキソーム解析でタンパク発現欠落候補変異を 25 個の遺伝子に見出した。

活性化ビタミン D 濃度の上昇が起こるとその過剰を防ぐために種々の組織から CYP24A1 蛋白の発現が強力に誘導される。興味深いことにわれわれの腫瘍組織(NFH)での CYP24A1 mRNA の発現量は、副甲状腺腫瘍のそれに比べて 10 万倍以上に著増していた。われわれの仮説は、まず何らかの原因で CYP24A1 タンパクが大過剰に発現され、その発現があった細胞内において活性化ビタミン D 濃度の激減が起こることによって PTH mRNA の産生刺激が著明に増強されるとともに、さらに何らかの腫瘍化刺激(ATRX?)が重なった結果、その異所性の PTH 発現腫瘍の形成が起こったというものである。さらに 4 例の PTH を発現しない NFH mRNA のアレイ結果との間で subtraction を行い、副甲状腺腫と正常副甲状腺との間で有意に発現量の差があるものを抜粋して、最終的に

は PTH の過剰発現に伴う二次的な変化を共通に受けるであろう遺伝子群を除外するところまで完了した。また PTH 遺伝子転写開始部近傍に、いくつかの enhancer RNA (eRNA) とも考えられる non-coding RNA の発現を確認した。また、この ATRX 遺伝子以外にエキソーム解析でタンパク発現欠落候補変異を 25 個の遺伝子に見出した。その中には転写共役遺伝子 med1 や USP24 などのユビキチン関連遺伝子が含まれていた。

#### 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3件)

- 1) T. Susa, R. Ikaga, T. Kajitani, M. Iizuka, H. Okinaga, M. Tamamori-Adachi and T. Okazaki (2015) Wild-type and Specific Mutant Androgen Receptor Mediates Transcription via 17 -Estradiol in Sex Hormone-sensitive Cancer Cells. *J. Cell. Physiol.* 230:1594-1606 doi 10.1002/jcp.24906 (査読有)
- 2) Fujii H, M. Tamamori-Adachi, K. Uchida, T. Susa, T. Nakakura, H. Hagiwara, M. Iizuka, H. Okinaga, Y. Tanaka and T. Okazaki (2014) Marked Cortisol Production by Intracrine ACTH in GIP-Treated Cultured Adrenal Cells in Which the GIP Receptor Was Exogenously Introduced. *PLoS ONE* 9(10):e110543. doi:10.1371/journal.pone.110543 (査読有)
- 3) M. Iizuka, T. Susa, Y. Takahashi, M. Tamamori-Adachi, T. Kajitani, H. Okinaga, T. Fukusato and T. Okazaki (2013) Histone acetyltransferase Hbo1 destabilizes estrogen receptor by ubiquitination and modulates proliferation of breast cancers. *Cancer Sci.* 2013,104:1647-55. doi: 10.1111 / cas.12303. (査読有)

##### [学会発表](計4件)

- 1) T. Susa, M. Iizuka, H. Okinaga, M. Tamamori-Adachi and T. Okazaki Involvement of vitamin D3 in intracellular signaling between dihydrotestosterone and androgen receptor in prostate cancer LNCaP

cells. ENDO 2015 Meeting and Expo Mar 5-8 San Diego, USA

- 2) T. Susa, R. Ikaga, T. Kajitani, M. Iizuka, H. Okinaga, M. Tamamori-Adachi and T. Okazaki Abberent, but physiological interactions between the mutated androgen receptor and E2 in several hormone responsive cancer cells. ENDO 2014 Meeting and Expo JUNE 21-24 Chicago, USA

- 3) Fujii H, M. Tamamori-Adachi, K. Uchida, T. Susa, T. Nakakura, H. Hagiwara, M. Iizuka, H. Okinaga, Y. Tanaka and T. Okazaki Marked cortisol production by intracrine ACTH in GIP-treated cultured adrenal cells in which GIP receptor was exogenously introduced. ENDO 2014 Meeting and Expo JUNE 21-24 Chicago, USA

- 4) T. Susa, T. Kajitani, M. Iizuka, M. Tamamori-Adachi, T. Okazaki The Androgen Receptor in the Human Prostate Cancer Cell Line, LNCaP, Mediates Multi-Hormonal Regulation of Both Parathyroid Hormone-Related Protein (PTHrP) and PSA Genes. ENDO 2013 Meeting and Expo JUNE 15-18 San Francisco, USA

##### [図書](計2件)

- 1) 岡崎 具樹 副甲状腺・骨代謝疾患マニュアル 2013年 診断と治療社 PTH作用と合成分泌調節機構
- 2) 岡崎 具樹 内分泌・糖尿病・代謝内科 内分泌ホルモンのすべて 2013年 科学評論社 副甲状腺ホルモン

##### [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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://kaken.nii.ac.jp/d/r/60203973.ja.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岡崎 具樹 (Okazaki, Tomoki)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：60203973

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：