

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09435

研究課題名(和文)下垂体腺腫における14q32インプリンティング領域の遺伝子発現制御機構

研究課題名(英文) Regulation of miRNAs located within the imprinted DLK1-DIO3 locus at 14q32 in pituitary adenomas

研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：90201863

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)：miRNAマイクロアレイ分析においてGH産生腺腫での14q32のDLK1-DIO3座位のmiRNAsの発現増加を認め、これらの変化はqRT-PCRで確認した。14q32におけるDNAコピー数の変化を認めなかった。パイロシーケンシングおよびバイサルファイトシーケンシングによるDNAメチル化分析により、2種のGH産生腺腫において、DLK1-DIO3遺伝子座での母親由来遺伝子発現を調節するDMRおよびMEG3-DMRの個々のCpG部位ごとにメチル化レベルが異なることを確認した。以上、14q32 miRNAはGH産生腺腫において発現増加が認められ、メチル化異常が特定のGH産生腺腫で観察された。

研究成果の概要(英文)：Among miRNAs up-regulated in GH-producing adenomas in miRNA microarray analysis, 14q32 miRNAs were included. In contrast, these miRNAs were down-regulated in FSH/LH- and ACTH-producing adenomas, and null-cell adenomas. The adenoma type-dependent expression pattern was confirmed with qRT-PCR analysis. Although DNA copy-number changes at the 14q32 locus were not detected in all adenomas examined, abnormal methylation of CpG sites in imprinted genes within the DLK1-DIO3 locus was observed in 2 GH-producing adenomas by methylation-specific MLPA. According to DNA methylation analysis by pyrosequencing and bisulfite sequencing, methylation levels were different at each individual CpG site in intergenic DMR and MEG3-DMR, which regulate maternal gene expression at the DLK1-DIO3 locus, in 2 GH-producing adenomas. In conclusion, 14q32 miRNAs were up-regulated in sporadic GH-producing adenomas and methylation abnormalities were observed in certain GH-producing adenomas.

研究分野：内分泌学・代謝学

キーワード：下垂体 腫瘍 インプリンティング DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

多くの散発性下垂体腺腫では腫瘍化に関与する体細胞変異はほとんど認められない。最近、エピジェネティックな制御調節が下垂体腫瘍形成に関与するという証拠が増えてきている。

例えば、非機能性腺腫においてプロモーター領域の過剰メチル化に起因する maternally expressed gene 3 (MEG3) 遺伝子の低発現が報告されている。MEG3 は、ヒト 14q32 のインプリンティング領域である DLK1 (delta-like homolog 1)-DIO3 (iodothyronine deiodinase type III) 座位に位置する long non-coding RNA (lncRNA) である。MEG3 に加えて、多数の 14q32 miRNA が非機能性腺腫で発現低下が認められている。

2. 研究の目的

本研究では、実施済みのマイクロアレイ解析により散発性下垂体腺腫の各タイプにおける miRNA 発現プロファイルの特徴を明らかにし、その結果を qRT-PCR で確認する。

各タイプにおける発現異常が腫瘍におけるゲノム DNA のコピー数の変化によるものか、DNA メチル化異常によるものかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析

Agilent Technologies オリゴヌクレオチドマイクロアレイ (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) を用いて miRNA マイクロアレイ解析を行った。ハイブリダイゼーション後、シグナルを Agilent Microarray Scanner (Agilent Technologies) で検出し、Feature Extraction software (Agilent Technologies) で定量化した。

平均ハイブリダイゼーションシグナル強度をデータ分析に用い、平均シグナル強度が 100 を超える miRNA を検出可能な miRNA とみなした。

対照のシグナル強度の半分または 2 倍未満のシグナル強度を有する miRNA は、それぞれ発現低下および発現増加 miRNA とした。

(2) qRT-PCR

TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) に含まれる特異的プライマーを用いて行った。TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems) を用いて 7300 リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems) で実施し、各 miRNA 発現レベルを RNU48 発現レベルに対して標準化した。

(3) MLPA およびメチル化特異的 MLPA

multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 分析は、SALSA MLPA ME032 UPD7-UPD14 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) を用いて行った。Methylation-specific (MS)-MLPA に関してはゲノム DNA を HhaI 処理して実施した。PCR 産物を ABI 3500 DNA 配列決定分析装置 (Applied Biosystems) で分析した。データは GeneMapper software (Applied Biosystems) を用いて解析した。

各ピークの割合を対照の正常な男性または女性の DNA の平均ピーク画分で除した。

メチル化百分率は、HhaI 処理試料におけるピーク強度と対応する未処理試料のピーク強度との比によって算出した。

(4) パイロシーケンシングによるメチル化分析

DLK1-DIO3 座において、intergenic (IG)-differentially methylated region (DMR) 内の 4 つの CpG 部位および MEG3-DMR の 8 つの CpG 部位についてのパイロシーケンシング分析を行った。PyroMark Q24 Advanced Instrument および PyroMark Q24 Advanced ソフトウェア (Qiagen, Chatsworth, CA, USA) を用いてデータを解析した。

(5) バイサルファイトシーケンシングによるメチル化分析

バイサルファイト処理ゲノム DNA を、MEG3-DMR プライマーセットを用いて増幅した。PCR 産物をプラスミドベクターにクローニングし、少なくとも 10 個の独立したクローンの塩基配列を ABI 3500xL genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて決定した。

4. 研究成果

(1) 各タイプの下垂体腺腫における miRNA 発現のプロファイル

follicle stimulating hormone (FSH)- β or luteinizing hormone (LH)- β (FSH/LH) 産生腺腫、adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 産生腺腫、またはヌル細胞腺腫のいずれかで発現減少を示す 93 の miRNA のうち 29 個が 14q32 miRNA 由来であった。

growth hormone (GH) 産生腺腫で 35 種の 14q32 miRNA 発現増加が認められた。これらの miRNA のうち、miR-127、miR-432、および miR-487 の発現増加は GH 産生腺腫において有意であった。

qRT-PCR では、miR-127-3p、miR-495、miR-487b、および miR-154 が、それぞれ GH および FSH/LH 産生腺腫において有意に発

現増加または発現減少を示した。

(2) DLK1-DIO3 遺伝子座における DNA コピー数の変化および GH 産生腺腫におけるインプリンティング遺伝子座内の CpG 部位における異常メチル化

GH および FSH / LH 産生腺腫における 14q32 miRNA の発現の変化機構を解析するために、MLPA 分析により DNA コピー数を比較した。

どの腺腫も遺伝子増幅や欠失などのコピー数の変動を示さなかった。

さらに、6q24.2 の pleiomorphic adenoma gene-like 1 (PLAGL1)、7q12.1 の growth factor receptor bound protein 10 (GRAB10)、7q32.2 の mesoderm specific transcript (MEST)、および 14q32 の MEG3 のインプリンティング遺伝子近傍に位置する CpG 部位のメチル化状態を MS-MLPA によって調べた。

1 種の GH 産生腺腫における MEG3 遺伝子の 2 カ所の CpG 部位の低メチル化、および別の 1 種の GH 産生腺腫における PLAGL1、GRAB10、および MEST 遺伝子における CpG 部位の過剰メチル化を認めた。FSH / LH 産生腺腫のうち、1 つの腺腫のみが MEG3 遺伝子の CpG 部位の過剰メチル化を有していた。

(3) GH 産生腺腫における 14q32 インプリンティング遺伝子座の DMR 内の異常な DNA メチル化

14q32 座は、母系遺伝子クラスターの発現を調節する 2 つの DMR (IG-DMR および MEG3-DMR) を含む。したがって、3 種の GH 産生腺腫および 1 種の FSH 産生腺腫におけるこれらの DMR の DNA メチル化レベルをパイロシーケンシングを用いて調べた。

1 種の FSH / LH 産生腺腫では、比較的低いメチル化レベル (30~50%) が IG-DMR の CpG 部位で観察されたが、MEG3-DMR では観察されなかった。注目すべきことに、2 種の GH 産生腺腫は、異常メチル化パターンを有した。1 種の GH 産生腺腫は IG-DMR の第 1 および第 3 の CpG 部位で高レベルであり、別の GH 産生腺腫では、IG-DMR の第 1 の CpG 部位では高レベルメチル化あり、IG-DMR の第 2 の CpG 部位と MEG3-DMR の第 1 の CpG 部位では低レベルメチル化であった。

パイロシーケンシングの結果を確認するために、MEG3-DMR のバイサルファイト配列決定を行った。1 種の GH 腺腫由来のプラスミドクローンは第 1 の CpG 部位の低メチル化を示し、パイロシーケンシングの結果と一致していた。

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 2 件)

① 吉本 勝彦. 下垂体腺腫の分子病理学. p115. 第 61 回成長ホルモン研究会抄録. Pharma Medica 34(6):113-115, 2016 査読なし

② 吉本勝彦、岩田武男、水澤典子、小野信二. Carney complex (CNC). 臨床画像. vol 31 No.10 増刊号 p.31-32, 2015 査読なし

[学会発表] (計 8 件)

① 吉本勝彦「家族性内分泌腫瘍：副甲状腺・下垂体腫瘍を中心に」. 第 8 回 大阪副甲状腺ホルモン研究会学術集会. 2018.1.6 大阪市立大学阿倍野キャンパス 大阪市

② 小野信二、岩田武男、水澤典子、山田正三、吉本勝彦. 非機能性腺腫および ACTH 腺腫における 14q32 領域遺伝子の発現低下. 第 27 回間脳下垂体腫瘍学会. 2017.2.24-2 日経ホール&カンファレンスルーム 東京都千代田区

③ 加藤朋子、波床朋信、村上隆亮、米光新、武呂誠司、藤澤一朗、岩田武男、吉本勝彦、井下 尚子、山田尚三、隠岐尚吾. 内分泌異常と線維性骨異形成症の合併から、McCune-Albright 症候群と診断した一例. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016.4.21-23 国立京都国際会館 京都市左京区

④ 吉本勝彦. 教育講演 13「家族性下垂体腺腫の病因」. 第 89 回日本内分泌学会学術総会. 2016.4.21-23 国立京都国際会館 京都市左京区

⑤ 吉本勝彦. 下垂体腺腫の分子病理学. 第 61 回成長ホルモン研究会. 2016.2.27 ホテルキャッスルプラザ 名古屋市

⑥ 吉本勝彦. 下垂体腫瘍発生と原因遺伝子. 第 25 回 臨床内分泌代謝 Update. 2015.11.27-28 東京国際フォーラム 東京都千代田区

⑦ 吉本勝彦. シンポジウム「下垂体腺腫の診断と治療 Update 2015」下垂体腺腫の腫瘍化機構. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015.4.23-25 ホテルニューオオタニ 東京都千代田区

⑧ 吉本勝彦. シンポジウム 「MEN1 の基礎と臨床」腫瘍発生分子機構の overview. 第 88 回日本内分泌学会学術総会. 2015.4.23-25 ホテルニューオオタニ 東京都千代

田区

〔図書〕(計1件)

① 吉本勝彦、岩田武男、水澤典子. 遺伝性・家族性下垂体腫瘍. p209-210. 下垂体疾患診療マニュアル 改訂第2版. 編集:平田結喜緒、山田正三、成瀬光栄. 編集協力:沖隆、高橋裕. 診断と治療社. 発行日2016年11月25日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授
研究者番号: 90201863

(2) 研究分担者

岩田 武男 (IWATA, Takeo)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 10350399

(3) 研究分担者

水澤 典子 (MIZUSAWA, Noriko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号: 80254746