

令和元年6月3日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09810

研究課題名(和文)下垂体腫瘍における新規治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Searching for the novel therapeutic targets in pituitary tumors

研究代表者

谷 祐至 (TANI, YUJI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：30456214

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)：下垂体腫瘍における新規標的因子としてのPLZFに注目した。PLZFはマウス下垂体に強発現し、in vitroではGH産生下垂体腫瘍細胞株(GH3)に発現を認め、主に核内、一部細胞質へ局在していた。PLZFは転写抑制因子として働くために核内への移行が必要であることからGH3細胞を用いて、局在変化を調節する因子について探索した。さらに、PLZFの下流シグナルについて検討した結果、脂質代謝、特にLDL受容体の発現制御に関わることが明らかとなった。ChIP-assayでLDL受容体の上流にPLZF結合サイトを確認し、ChIP-seqでの詳細な解析を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下垂体腫瘍の代表疾患である先端巨大症やクッシング病への治療選択肢は広がりつつあるが、治療困難例や薬剤抵抗性を示す症例もあり、新たな治療標的分子の探索は不可欠である。ホルモンの正常化に加え、腫瘍増殖の抑制効果を併せ持つ標的因子が望まれている。

研究成果の概要(英文)：We focused on PLZF as a targeting factor in pituitary tumors. PLZF was expressed in mouse pituitary and GH producing pituitary tumor cell lines (GH3). Using GH3 cells, we searched for the localization and the factors that regulate nuclear-cytoplasmic shuttling of PLZF. We examined the downstream signals of PLZF and revealed interaction between PLZF and LDL receptor. We identified a PLZF binding site upstream of the LDL receptor and proceeded with detailed analysis using ChIP-seq.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

コントロール不良の先端巨大症においては、主に心血管、呼吸器合併症、悪性腫瘍の増加により健常人と比較して2~3倍の死亡率を示し約10年余命が短縮すると報告されてきた。治療によってGH値、IGF-I値をコントロールすると死亡率の増加を改善することが明らかになっていることから、早期診断・早期治療が重要である。治療の第一選択は経蝶形骨洞下垂体腫瘍摘出術(TSS)である。その寛解率はマクロアデノーマでは50~60%とされる。先端巨大症の約70%がマクロアデノーマであることから、術後においても薬物療法を必要とする症例は少なくない。ソマトスタチン誘導体(octreotideやlanreotide)はGH産生細胞に発現するソマトスタチン受容体(sstr)の主にタイプ2に結合してアゴニストとして作用する。50~60%でGHが、60~70%でIGF-Iが正常化する。しかし、約半数の患者においては十分なコントロールが得られないという欠点がある。GH受容体拮抗薬のペグピソマンは、GH受容体へのアンタゴニストとして作用し、IGF-Iを低下させるが、腫瘍縮小効果は期待できず、治療に関係なく腫瘍が増大する可能性がある。内服薬のドーパミン作用薬でのIGF-Iの正常化は10~34%に過ぎない。治療困難例には多剤併用療法を試みるが、効果は限定的であり、新たな治療標的分子の探索は不可欠である。ホルモンの正常化に加え、腫瘍増殖の抑制効果を併せ持つ標的因子が望まれている。

我々はこれまで下垂体腫瘍における新規標的因子として(プロ)レニン受容体(PRR)に注目してきた。PRRは、液胞型(V型)ATPase(V-ATPase)のVoドメインに結合する蛋白M8-9と同じATP6AP2(ATPase, H+transporting, lysosomal accessory protein 2)にコードされている。このPRRはVoドメインの安定化に必須とされる。V-ATPaseは酸性小胞膜に存在し、ATPの加水分解エネルギーによってプロトンを送り込んで小胞内を酸性化する他、膜融合を媒介したり、pHセンサーとして働いたり、オートファジーとも関連し、多機能性をもつことが示されている。我々は下垂体摘出腫瘍、特にGH産生腫瘍でPRRの強い染色性を示し、PRRがV-ATPaseの機能を介してGH分泌に関与することを報告した。

一方、PLZFは急性前骨髄性白血病でレチノイン酸受容体(RARα)との融合遺伝子として同定された転写因子であり、近年では前立腺癌などの腫瘍増殖や薬剤抵抗性において注目されている。PRRとPLZFは蛋白質間作用を有することが報告されている。一般的にPLZFは転写抑制因子として核内で作用し、腫瘍増殖を負に制御するが、腎細胞癌やグリオブラストーマでは発現が亢進し腫瘍増殖に働くとの報告もある。

2. 研究の目的

PRRはV-ATPaseの機能を介して下垂体からのGH分泌に関与するが、蛋白質間作用を有する転写因子PLZFの下垂体腫瘍における発現や機能を検討した報告は皆無である。そこで、下垂体腫瘍(特にGH産生腫瘍)における新規標的因子としてのPLZFの意義について検討した。

3. 研究の方法

PLZFの細胞内情報伝達系と機能解析

初めにGH産生(GH3)、ACTH産生(AtT20)下垂体腫瘍細胞株等を用い、PLZFの発現をPCR/Immunoblotting、細胞内局在を蛍光免疫染色で確認する。子宮内膜間質や平滑筋細胞でDexamethasone(DEX)はPLZFの発現を亢進させ、核内移行を促進するとされる。PRRに結合するProrenin、RARに結合するRetinoic acid、PLZFに作用するGenistein、Dexamethasone、V-ATPase阻害薬(Bafilomycin A1, Concanamycin A)等の添加により発現

量または核内への局在変化を検討する。核内蛋白を抽出し immunoblotting で確認し、濃度・時間依存性変化を検討する。PLZF の下流シグナルはクローニング済みであるラット pCDNA3.1_PLZF の過剰発現または siRNA によるノックダウン、薬剤添加を行い検証する。PLZF を介した腫瘍増殖やホルモン・サイトカイン分泌との関連を検証する。

4. 研究成果

はじめに PLZF の発現・局在を確認したところ、マウス下垂体に強発現していた(図 1)。次に各種細胞株を用いた蛍光免疫染色では、GH 産生下垂体腫瘍細胞株 (GH3) で特に強い発現を認め、主に核内、一部細胞質へ局在していた。そこで、GH3 細胞を用いて、核内と細胞質の局在変化を調節する因子について探索した。PLZF は転写抑制因子として働くために核内への移行が必要である。Dexamethasone (DEX) と RAR に結合する Retinoic acid は PLZF の発現を亢進させ、核内移行を促進した、一方、エストロゲンや Genistein は核内での発現を低下させることが分かった。この作用には、細胞質から核内への移行を抑制する作用と、細胞内での遺伝子発現を調節している可能性が考えられた。そこで、過剰発現・ノックダウン・各種薬剤添加により PLZF の発現を変化させ、下流シグナルについて検討した結果、脂質代謝、特に LDL 受容体の発現制御に関わることを明らかにした(図 2,3)。さらに、ChIP- assay で LDL 受容体の上流(-989/-728)に PLZF 結合サイトを確認した(図 4)。ChIP-seq での詳細な解析を進めた。

図1

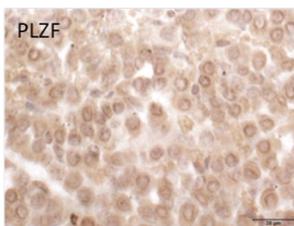


図2

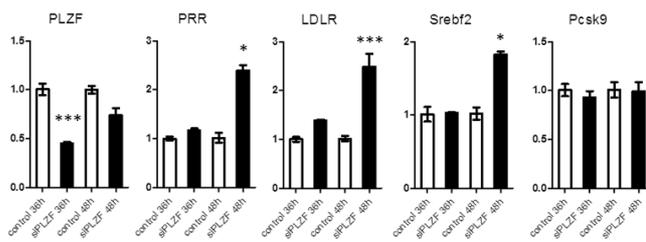


図3

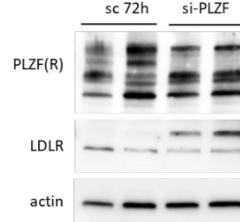
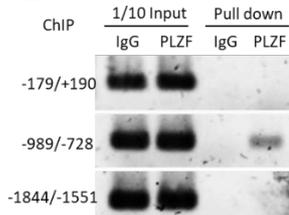


図4



5. 主な発表論文等 なし

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。