

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08558

研究課題名(和文) マイクロRNAを介した下垂体ホルモン産生制御とホルモン産生細胞間情報伝達

研究課題名(英文) Regulation of pituitary hormone production and signal transduction via microRNA

研究代表者

田上 昭人 (Tanoue, Akito)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・部長

研究者番号：60301800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下垂体における成長ホルモン(GH)産生に関するmiRNAの同定とその機能解析を行い、個体の成長におけるmiRNAの関与を検討することを目的とした。下垂体GH産生細胞特異的にmiRNAを欠損させたマウスでは、体長、体重の減少、GH産生細胞数の減少、血中IGFレベルの減少することを見出した。GH産生細胞株とGH非産生細胞株を比較した結果、GH産生細胞に高発現するmiRNAを複数同定し、一部のmiRNAをGH非産生細胞株に導入すると、GH産生を誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下垂体は内分泌系による生体恒常性維持において、中枢神経系と末梢標的器官とをつなぐ重要な内分泌器官である。したがって、下垂体の機能調節機構を明らかにすることは、ホルモンを介した成長制御、ストレス応答反応、生殖機能制御等を理解する上で、極めて重要な研究課題である。本研究でGH産生におけるmiRNAの機能の一端が明らかとなり、GH分泌不全等の下垂体機能不全の病因を理解することにもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to identify the miRNAs involved in growth hormone (GH) production in the pituitary gland and to analyze their functions, and to examine their involvement in the growth of individuals. It was found that the mouse that miRNA deficient specifically in pituitary GH-producing cells have decreased body length and weight, decreased number of GH-producing cells, and decreased blood IGF level. As a result of comparing the GH-producing cell line and the GH-nonproducing cell line, multiple miRNAs highly expressed in the GH-producing cells were identified, and It was revealed that introduction of some miRNAs into GH non-producing cell lines induces GH production.

研究分野：実験薬理学、神経内分泌学

キーワード：下垂体 miRNA 成長ホルモン Dgcr8

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体は視交叉の後方に位置し間脳視床下部に接する内分泌器官であり、内分泌系において中枢神経系と末梢標的器官とをつなぐインタフェースとして働き、生体内の恒常性を維持する上で重要な器官である。下垂体前葉は5種類のホルモン産生細胞を有し、各ホルモン産生細胞の最終分化が産生するホルモンにより区別できることから、古くより細胞分化研究の良いモデル器官として研究が進められてきた。近年、下垂体の細胞分化及びホルモン遺伝子発現に関わる転写調節因子が同定され、また視床下部に由来する繊維芽細胞成長因子(FGF)や骨形成タンパク質(BMP)のような液性因子が発生期の下垂体誘導に作用することが明らかにされ、下垂体発生・細胞分化機構の分子基盤の理解が進んできた。一方、従来下垂体前葉ホルモンの産生・分泌は視床下部で産生され正中隆起外層から下垂体門脈系へ放出される向下下垂体刺激ホルモンにより制御されると考えられてきたが、近年、プロラクチン放出ペプチド等の下垂体前葉のホルモン分泌を制御するにもかかわらず下垂体門脈系を介さない視床下部因子や、グレリン等の末梢器官で産生される下垂体刺激ホルモンが同定され、下垂体ホルモン分泌は下垂体門脈系へ放出される視床下部因子により制御されるという従来の概念が変わりつつある。このように下垂体においてはその形成からホルモン分泌制御に至るまでの知見が蓄積されつつあるが、これらを司る分子機構に関しては未解明の部分も多く残されており、下垂体形成・細胞分化機構およびホルモン産生・分泌制御機構の解明には、未同定の因子の関与やこれまでに提示されていない概念の導入が必要だと考えられる。

一方、近年マイクロRNA(miRNA)による遺伝子発現・翻訳制御機構と生体恒常性維持・疾患発症との関連が注目されている。miRNAは18-25塩基長の小さな一本鎖RNAで、塩基配列の相補性を示すmRNAを標的とし、その分解を導くか、あるいは翻訳を抑制し、標的遺伝子の発現を抑制する。一つのmiRNAは多数のmRNAを標的とすることができ、一つのmiRNAが平均200個のmRNAを標的にしていると試算されている。逆に、一つのmRNAは複数のmiRNAの影響を受けている。このことは、miRNAが遺伝子発現を巧妙に制御し、遺伝子機能発現のファインチューナーとして機能していることを示している。したがって、miRNAの機能を理解することは、生体恒常性維持・疾患発症機構を理解するための新たな知見をもたらすと考えられる。

miRNAの効果は1993年にR.C.Leeらによって*C.elegans*で初めて発見された(Lee et al., Cell 1993)。哺乳類においても、miRNAは細胞の発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなどの細胞活動・機能の根幹に関わっていることが知られている。このmiRNAは約2000種類以上存在しており、様々な遺伝子発現様式を介して、上述のように最終的に細胞機能の発現に関わっていると考えられている。疾患領域においては特に癌とmiRNAの関係が精力的に研究され、ある種のmiRNAの発現量の亢進が細胞のがん化を誘発することが明らかにされている。下垂体発生におけるmiRNAの役割に関しても、miRNAの成熟化に関わる酵素であるDicerの下垂体特異的遺伝子欠損マウスが作成・解析されている。このマウスでは、下垂体の形成不全が認められ、下垂体糖たんぱく質ホルモンの共通サブユニットである-glycoprotein subunitの分解が亢進しており、その原因としてmiRNAであるlet-7b/cの消失が示されている(Repetto et al., Plos Genet. 2012)。また、miR-200b/miR-429欠損マウスは下垂体からの黄体形成ホルモン分泌異常を呈し、排卵不全による不妊となる事が示されている(Hasuwa et al., Science. 2013)。しかし、下垂体を構成する個々のホルモン産生細胞の機能とmiRNAとの関係については、未だその多くが検討されていない。

個体の成長には、下垂体から分泌される成長ホルモン(growth hormone; GH)が大きな役割を果たしている。GHは標的器官の一つである肝臓に作用し、肝臓からのインスリン様成長因子-I(IGF-I)分泌を介して、骨の伸長あるいは筋肉の成長に関与している。小児期でのGHの分泌不足は成長ホルモン分泌不全性低身長症を引き起こし、一方、分泌過剰は巨人症や末端肥大症を引き起こす。miRNAは生命活動の様々な部分に関与していると考えられ、個体の成長にも関与していると考えられる。しかし、GH/IGF-I系といった下垂体肝臓系をはじめとする成長機構におけるmiRNAの機能は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、上述の研究背景を基に、成長、特に下垂体におけるGH産生に関与するmiRNAの同定とその機能解析を行い、個体の成長におけるmiRNAの関与を検討し、miRNAによる遺伝子発現調節機構の観点から個体の成育機構の分子基盤を明らかにするとともに、下垂体内におけるmiRNAの細胞間情報伝達分子としての作用を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) in vivo系におけるGH産生細胞に発現するmiRNAの機能解析

GH産生細胞におけるmiRNAの機能を検討するため、GH-CreマウスとDgcr8-floxマウスを交配させ、GH発現細胞特異的にmiRNAの成熟化に関与するDcge8を欠損するマウスを作製し、その表現型を検討した。検討には、下垂体に対して下垂体ホルモンの免疫染色、血中下垂体ホルモンの測定を行った。

(2) in vitro系におけるGH産生細胞に発現するmiRNAの機能解析

GH産生細胞におけるmiRNAの機能を検討するため、GH産生細胞株と非GH産生細胞株のmiRNA

発現をマイクロアレイ解析にて比較した。GH 産生細胞で発現の高い miRNA を非 GH 産生細胞に導入し、GH 産生に与える影響を検討した。

4. 研究成果

(1) GH 産生細胞特異的 miRNA 欠損マウスの解析

GH 産生細胞特異的に miRNA の成熟化に関わる因子である Dgcr8 遺伝子を欠損したマウスを用い、その表現型解析により GH 産生細胞における miRNA 機能の解明を行った。GH 産生細胞特異的 Dgcr8 欠損マウスは野生型マウスに比べ、体長が短く、低体重であった。さらに下垂体の矮小化が認められ、下垂体の組織学的解析により GH 産生細胞数が減少し、血中 IGF-1 レベルも低下していた。これらの結果は、miRNA が下垂体 GH 産生細胞の発生あるいは機能を制御していることを示唆している。GH 産生細胞特異的 Dgcr8 欠損マウスから GH 産生細胞を単離するために、GH-cre 存在下で蛍光を発する GH-Cre;Dgcr8-flox;TOMATO マウスを作出し、初代培養系を用いた Dgcr8 による GH 分泌制御機構の解明に取り組んでいる。

(2) GH 産生を誘導する miRNA の同定と機能解析

GH 産生細胞の発生あるいは機能を制御している miRNA を同定するため、GH 産生細胞株と GH 産生細胞前駆細胞株 (GH 非産生細胞株) における miRNA 発現動態を比較した。その結果、複数の miRNA が GH 産生細胞前駆細胞株と比べ GH 産生細胞株において高発現していることを見出した。これら複数の miRNA について精査し、GH 産生細胞前駆細胞株と比べ GH 産生細胞株において 10 倍以上の発現が認められる 11 の miRNA を同定した。これら 11 の miRNA について、GH 産生細胞前駆細胞株へ導入し、GH 産生を誘導するか検討した結果、1 つの miRNA について、GH 発現を顕著に誘導した。miRNA を導入した GH 産生細胞前駆細胞株では、免疫組織化学による GH 陽性像を認め、培養上清において GH が検出された。また、ヒト iPS 細胞からの GH 産生細胞誘導系による GH 細胞への分化過程における miRNA の発現を検討する系の立ち上げ、GH 産生細胞分化過程における miRNA の作用を検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	中村 和昭 (Nakamura Kazuaki) (80392356)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・室長 (82612)	