

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19390105

研究課題名 (和文) 下垂体腫瘍の機能分化に関する分子病理学的研究：Notch シグナルによる新展開

研究課題名 (英文) Molecular pathology for functional differentiation of human pituitary adenomas: New development of NOTCH signaling pathway.

研究代表者

長村 義之 (YOSHIYUKI OSAMURA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10100992

研究成果の概要 (和文)：

近年、細胞の増殖・機能維持に関するシグナル伝達経路として NOTCH シグナル伝達経路が着目され、特に魚類やげっ歯類の発生分化において、その特異的な機能が報告されている。本研究では、ヒト正常下垂体、下垂体腺腫において NOTCH シグナル伝達経路 (受容体 NOTCH1, NOTCH3, リガンド Jagged1, Jagged2) の発現を解析した。正常下垂体で NOTCH1 は GH 細胞の、NOTCH3 は ACTH 細胞の細胞質局在が確認されたが、GH 産生腺腫では NOTCH3 が核内に検出され活性化型として機能することが示唆された。ACTH 産生腺腫においては NOTCH1, NOTCH3 共に各局在を示した。NOTCH シグナル伝達経路は、ヒト下垂体において細胞の分化、増殖、維持に関与していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

The Notch signaling pathway is a highly conserved pathway for cell to cell interaction. It is known that this pathway is involved in the regulation of cellular differentiation and proliferation. It was reported that Notch signaling pathway functions in the pituitary gland. In mouse pituitary, persistent expression of activated *Notch2* is sufficient to delay gonadotrope (LH/FSH producing cells) differentiation, and activated Notch1 suppress the corticotrope differentiation and promote the GH or TSH producing cells. The other, in human pituitary gland, it was reported that *NOTCH3* mRNA was expressed in clinically nonfunctioning adenoma. However, it has not been clarified whether NOTCH signaling is related to the functions and/or growth of several adenomas. To elucidate the functional role of NOTCH signaling in human pituitary adenomas, we focused on the NOTCH3 signaling pathway in this study, and detected the expression and localization of NOTCH3 receptor and NOTCH ligands DLL1, Jagged1, and Jagged2 in various types of human pituitary adenomas by immunohistochemistry. Cleaved NOTCH3 which is active form (N3ICD; NOTCH3 intracellular domain) was localized in nuclei of pituitary adenoma cells. N3ICD was observed in all GHomas, 60% of ACTHomas, 90% of Gn-omas, and half cases of NCAs. The expression of DLL1 was detected in 90% of GHomas, 70% of ACTHomas, all cases of Gn-omas and NCAs. No signals for NOTCH3 and DLL1 were observed in TSHomas and PRLomas. These results are further suggestive of the idea that NOTCH signaling pathway plays a role in the functional differentiation of human pituitary adenomas.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：下垂体、Notch シグナル、転写因子、Wnt シグナル

1. 研究開始当初の背景

本研究テーマにおける国内外での状況：下垂体前葉細胞の発生分化（ホルモン産生能）については、1988年にRosenfeldとKarinがPituitary specific transcription factor (Pit-1) をクローニングして、GH, PRL, TSH への分化に携わることを発表して以来、多くの転写因子が発見され、細胞の機能分化の分子機構については、もっとも進んだ分野であり、良いモデルとして注目されている。

これまでの研究により下垂体細胞および下垂体腺腫の機能分化は右図1のように転写因子・共役因子の組み合わせにより、主として(1)GH-PRL-TSH (■)、(2)POMC (ACTH のプロホルモン) (■)、および(3)FSH/LH (■)の3細胞系譜に分けられることが明らかにされている(転写因子 Pit-1: GH-PRL-TSH, 転写因子 Tpit, neuroD1: POMC (ACTH), 転写因子 SF-1: FSH/LH など)。ヒト下垂体腺腫における機能分化も多くのものが、図1のような正常下垂体細胞での転写因子の組み合わせと同様のメカニズムにより制御されていることが、我々の研究で明らかとなっている。ヒト下垂体に見られる特徴は、POMC, PRL を除く多くの下垂体細胞、腺腫細胞にαSU が同時に発現していることである。このαSUの発現に関しては、最近になってFoxl2など新たな転写因子も報告されている (Ellsworth BS *et al.*) が、早期の機能分化については、まだ解明されていない点が多い。中でも今回は、ヒト下垂体細胞、腺腫において(1)分化の早期にPOMCとαSU, Pit-1系細胞の分化の分岐点がある、(2)FSH/LH/TSHなど糖タンパクホルモンのみならず、GH・PRL産生細胞・腺腫にも高頻度にαSU(更に一部でFSH/LH)が共有される点に

注目した。αSUはホルモンの転写促進因子として作用していることが実験的に証明されている (Burrows HL *et al.*, Mol Endocrinol; 1996)。図1(○)に示すようにNotch signalingが作用しているとの報告がなされている。また、ヒト下垂体腺腫の中には“細胞系譜の異なる”GH(■)とACTH(■)、αSUとACTH(■)が同一細胞内に共存するような“細胞系譜を越えた”機能分化を示す腫瘍もあり初期の転写因子の発現異常が提唱されている。このような背景で、今回の研究では、下垂体分化の初期の機能分化、特にPOMCとProp1/Pit1系譜への分化に重要なNotch signalingに注目して、下垂体腺腫についての以下の課題を解明することを目的とする。

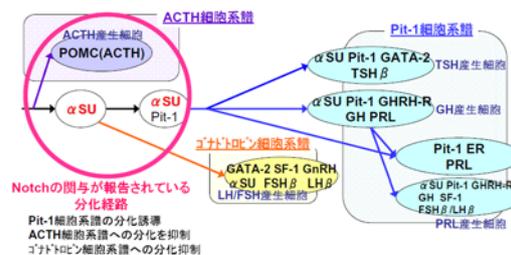


図1 ヒト下垂体細胞系譜
GH: growth hormone, PRL: prolactin, TSH: Thyroid stimulating hormone, POMC: proopiomelanocortin, ACTH: adrenocorticotropic hormone, FSH: follicle stimulating hormone, LH: luteinizing hormone. αSU (subunit) は共通の構造を有しており、各TSHβ, FSHβ, LHβSUと結合してホルモンの機能を発現する。

2. 研究の目的

下垂体分化の初期の機能分化に関与しているNotch signalingに注目して、以下の問題を解明することを目的とする。

(1) 下垂体腺腫におけるNotch signaling (レセプター、リガンド、標的分子)の発現について

げっ歯類では、下垂体での Notch signaling の報告があるがヒト下垂体細胞、腺腫での解析は、極めて少ない。Notch レセプター、リガンド、Notch 標的分子が、早期の α SU, POMC, GH への分化に関与することに注目し、下垂体腺腫での分化への関与を明らかにする。方法は、免疫組織化学 (Notch 細胞外ドメイン、細胞内ドメインに対する抗体を用いて細胞内局在を観察)、Real Time RT-PCR (各種下垂体腺腫を対象に Notch レセプター、リガンド、標的分子の mRNA 発現を定量的に解析) が主体となる。免疫組織化学には、これまで日本医大脳外科で採取された下垂体腺腫約 1500 例が対象となる。さらに、細胞系譜を越えた機能分化を示す下垂体腺腫 (ACTH と GH を同時発現する症例など) を取り上げ、下垂体腫瘍での機能の分化異常における Notch signaling の解析も行う。以上のことから、下垂体腺腫におけるホルモン産生と Notch signaling 分子の発現を明らかにし、機能分化における Notch の役割を考察する。

(2) 下垂体細胞・腺腫における Notch signaling の機能の解明

上記での結果を踏まえて、Notch レセプター、リガンド、標的分子の役割を明らかにする。方法としては、ヒト下垂体腺腫の初代培養細胞 (α SU 産生、GH/PRL 産生、ACTH 産生を中心として)、ヒト下垂体培養細胞株 (HP75)、下垂体腫瘍由来細胞株 (α T3-1, α T1-1, T β L2 など) を対象に Notch signaling 遺伝子導入、RNAi を用いて個々の分子のホルモン産生、増殖、アポトシスなどへの影響を明らかにし、Notch signaling の個々の腫瘍細胞での機能的役割を明らかにする。

(3) Notch signaling の機能についての実験 下垂体腫瘍モデルによる実証とヒト腫瘍への還元

我々が保持している腫瘍モデル動物 (Prop-1 トランスジェニック (Tg) マウス、トローパミン (D2) ノックアウト (KO) マウス、エストロゲン (E2) 過剰投与ラット) を実験的下垂体腫瘍のモデルとして、免疫組織化学や Real time RT-PCR 法を用いて Notch レセプター、Notch リガンド、Notch 標的分子の発現を解析し、下垂体腺腫形成過程における Notch signaling 機構を検討する。そこで得られたデータから、腫瘍細胞で発現する Notch レセプターに対応する阻害剤 (γ secretase インヒビターなど) の影響を、下垂体細胞株および実験腫瘍モデルを対象に解析し、腫瘍細胞からのホルモン産生、細胞増殖の抑制など、その機能について実証する。これらの結果を踏まえて、ヒト腫瘍の機能発現

と分子標的治療も視野に入れたその制御などへの還元を試みる。

3. 研究の方法

現在までに採集した約 1500 例の下垂体腺腫の 10%ホルマリン固定・パラフィン包埋ブロックを利用して、以後の検討を行う。さらに 4%パラホルムアルデヒド固定パラフィン包埋ブロックおよびその同一症例の cDNA 約 150 例については分子病理学的に解析をおこなった。

(1) 下垂体腺腫における Notch signaling (レセプター、リガンド、標的分子) の発現解析 免疫組織化学

ヒト下垂体腺腫における Notch レセプター (Notch2, Notch3)、Notch リガンド (D111, Jagged1, Jagged2)、Notch 標的分子 (Hes1, Hes5, Rbp-J κ) について、各々の特異抗体 (表 1) を用いた免疫組織化学染色により機能発現を解析。

Notch signaling は NICD (notch intracellular domain) の核内移行によって機能することから、Notch2 および Notch3 のリガンド結合部位 (N 末端) に特異的なモノクローナル抗体を作製する。さらに、NICD である Cleaved Notch2、Cleaved Notch3 の特異抗体を作製し、免疫組織化学およびウェスタンブロッティング法により下垂体腺腫における機能的な Notch シグナル伝達経路の解析を行った。

表1 Notch signaling 特異抗体

抗原	入手先	参考文献
Notch2	sc-5545; Santa Cruz Biotechnology bNBD; Developmental Studies Hybridoma Bank	Mol Cell Biol. 2004 24(1). BLOOD. 2004 103(9).
Notch3	sc-5593; Santa Cruz Biotechnology	Cancer Res. 2006 66(12).
D111	sc-12530; Santa Cruz Biotechnology	American J Human Genetics. 2006 78.
Jagged1	sc-8303; Santa Cruz Biotechnology T81.15H; Developmental Studies Hybridoma Bank	BLOOD. 2004 103(9). Cancer Research. 2005 65.
Jagged2	sc-8157; Santa Cruz Biotechnology	
Hes1	Toray Industry Co.Ltd.	Cancer Research. 2005 65.
Notch2 N末端	(自家製 手配済み)	
Notch2 NICD	(自家製 手配済み)	
Notch3 N末端	(自家製 手配済み)	
Notch3 NICD	(自家製 手配済み)	

RT-PCR Real time RT-PCR

現在までに採取されたヒト下垂体腺腫の中で、機能性腺腫 (GH 産生腺腫、ACTH 産生腺腫、PRL 産生腺腫など) および非機能性腺腫 (多くの腫瘍が α SU, FSH β 産生腺腫) の cDNA を用いて Notch レセプター (Notch2, Notch3)、Notch リガンド (D111, Jagged1, Jagged2)、Notch 標的分子 (Hes1, Hes5, Rbp-J κ) について特異的 Primer (表 2) を設計し、Real Time RT-PCR 法により定量的に発現解析を行った。

更に、異常なホルモン産生 (GH と ACTH など細胞系譜を越えた

表2 Primerの配列

	FWD:	BWD:
Human Notch 2	GGAATGGTGCCAGAAGCTGAT	GCCCCATTTTTCAACAACAA
Human Notch 3	GATGAGCTTGGGAATCAGC	GGTCTCCTCCTTGCTATCC
Human D11 1	ACTGCAGCTCTTCACCCGTG	CACGTTGTCGTACAGTGC
Human Jagged 1	GAAACAGCTCGCTGATTGCT	TCACCAAGCAACAGATCCAA
Human Jagged 2	AATGGTGGCATCTGTGTGTA	GCGATACCCGTTGATCTCAT

ホルモンの同時産生など) についても Notch レプター、Notch リガンド、Notch 標的分子の関与を明らかにする。

(2) 下垂体腺腫における Wnt signaling の機能的意義

発生や形態形成など様々な生命現象に重要な役割を果たしている WNT シグナル伝達経路の活性化が、多くの疾病に深く関わっていることが明らかとされつつあるにも関わらず、ヒト下垂体においては未知であった。そこで、ヒト下垂体腺腫に特異的な WNT シグナル伝達経路、特にげっ歯類の解析から下垂体ホルモン産生細胞への影響が考えられる WNT4 とその受容体 Frizzled6 (FZD6) シグナル伝達経路の機能を解明するために免疫組織化学を試行し、その発現を確認した。さらに FZD6 を起点として活性化するシグナル伝達経路を Western Blotting 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 下垂体腺腫における Notch signaling (レプター、リガンド、標的分子) の発現解析 免疫組織化学

正常下垂体において、NOTCH1 は α SU 陽性 GH 細胞の、NOTCH3 は ACTH 細胞の細胞質もしくは細胞膜に確認された。しかしながら、核内陽性は認められなかった。また、リガンド DLL1 は正常下垂体で陰性、JAGGED1 は α SU 陰性 GH 細胞に、JAGGED2 は PRL 細胞および Gn 細胞に陽性であった (図 1)。

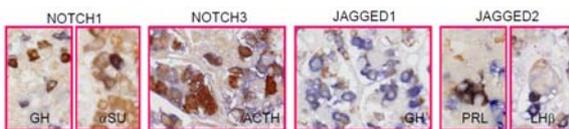


図1. 正常下垂体におけるNOTCHシグナル分子の発現

腺腫においては、正常下垂体とは異なり、NOTCH の核内陽性が認められた。GH 産生腺腫の全例に NOTCH3 の核内陽性が確認され、リガンドは JAGGED1 が 30%、JAGGED2 が全例で細胞膜陽性であった。PRL 産生腺腫では 50% の症例に NOTCH1 の核内陽性が認められ、リガンドは JAGGED1、2 が 40% の割合で細胞膜陽性であった。TSH 産生腺腫では、NOTCH1 核内陽性、JAGGED2 の細胞膜陽性が観察された。一方、ACTH 産生腺腫の 50% に NOTCH1 の、70% に NOTCH3 の核内陽性が確認され、リガンドは JAGGED2 が 50% に細胞膜陽性であった。ACTH 産生腺腫同様に Gn 産生腺腫および Null cell 腺腫においても NOTCH1、3 の核内陽性例が確認された (図 2)。

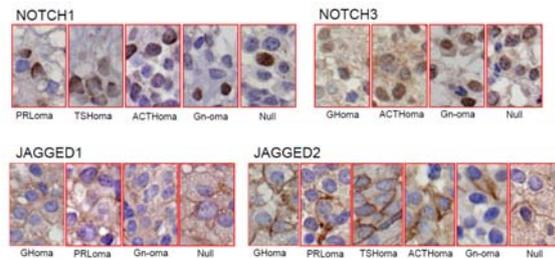


図2. 下垂体腺腫におけるNOTCHシグナル分子の発現

(2) 下垂体腺腫における Wnt signaling の発現解析

正常下垂体における WNT4、FZD6 はともに Gn 細胞の一部に発現していた (図 3A, 図 4)。腺腫における WNT4、FZD6 発現は、GH 産生腺腫、PRL 産生腺腫、TSH 産生腺腫で高頻度に確認された (図 3B, 図 4)。また、その下流シグナルである β catenin 経路の活性化 (β catenin の核移行) が報告されているにも関わらず、下垂体腺腫の全例では認められなかった (図 5)。一方、MAPK 経路 (ERK1/2, c-Jun, p38, CaMK II) のうち ERK1/2 を介して機能することが示唆された。

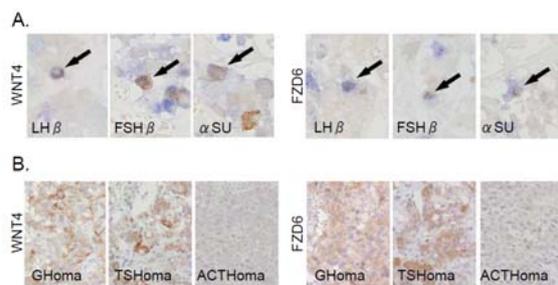


図3. 正常下垂体 (A) および腺腫 (B) における WNT4、FZD6 の免疫組織化学検討

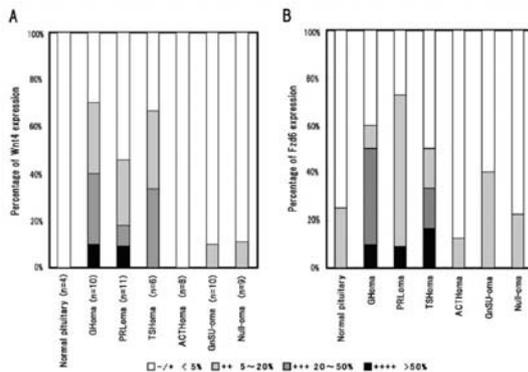


図4. 正常下垂体・下垂体腺腫における WNT4 (A)、FZD6 (B) 陽性率

以上のことから、次のことが考察された。

① ヒト下垂体では腺腫化に伴う NOTCH シグナル伝達経路の亢進が考えられた。また、腺腫間で受容体の核陽性およびリガンドの細胞膜陽性パターンが異なることから、下垂体

腺腫の機能分化における NOTCH シグナル伝達経路の関与が強く示唆された。

② WNT-FZD6 シグナル伝達経路は、ヒト下垂体の腺腫化に伴って、GH 産生腺腫、PRL 産生腺腫、TSH 産生腺腫といった PIT1 細胞系譜の腺腫タイプ特異的に発現し、ここでは WNT/MAPK シグナル伝達経路が重要な役割を担うことが示唆された。

【結論】

① ヒト下垂体における NOTCH シグナル伝達経路は、正常から腺腫への腫瘍化に伴ってホルモン産生細胞に特異的に活性化することが考えられた。

② ヒト下垂体における WNT シグナル伝達経路は、主として PIT1 系譜の細胞の腫瘍化とともに MAPK 経路を介して機能する可能性が明らかとなった。

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 27 件)

1. Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M: **Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease.** *Domest Anim Endocrinol* 2009, **36**:3-12. (査読:有)

〔学会発表〕 (計 48 件)

1. 飛田麻耶, 長村義之, 東條克能, 田嶋尚子: **下垂体腺腫の病理と臨床-最近の話題をめぐって "若手研究者による新知見" ACTH 産生下垂体腺腫における ACTH 分泌の変動.** 第 82 回 *日本内分泌学会学術総会* 2009. 4/23 ~4/25 群馬県民会館、前橋商工会議所 (群馬)

〔図書〕 (計 1 件)

寺本明・長村義之: **下垂体のすべて**
医学書院 2009

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長村 義之

(YOSHIYUKI OSAMURA)

東海大学・医学部・教授
研究者番号: 10100992

(2) 研究分担者

1) 竹腰 進

(SUSUMU TAKEKOSHI)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 70216878

(H20 より連携研究者)

2) 梅村 しのぶ

(SHINOBU UMEMURA)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号: 20276794

(H20 より連携研究者)

3) 梶原 博

(HIROSHI KAJIWARA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 20317754

(H20 より連携研究者)

4) 木村 穰

(MINORU KIMURA)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 10146706

(H20 より連携研究者)

5) 吉村 眞一

(SHINICHI YOSHIMURA)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 30230808

(H20 より連携研究者)

6) 松野 彰

(AKIRA MATSUNO)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号: 00242058

(H20 より連携研究者)

7) 寺本 明

(AKIRA TERAMOTO)

日本医科大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号: 60231445

(H20 より連携研究者)

(3) 連携研究者

()

研究者番号: