

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09536

研究課題名(和文) 難治性・浸潤性下垂体腺腫に関する転写因子PITX2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of PITX2 for refractory and invasive pituitary adenoma

研究代表者

三輪 点 (MIWA, Tomoru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：20365282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体腺腫の浸潤性を腫瘍の単純な増殖性とは異なる性質と考え、新たな因子を探索し、転写因子PITX2が浸潤性下垂体腺腫で発現し、海綿静脈洞への浸潤性と強く関与している可能性を得た。さらに、ホルモン非産生性のみならず、産生性(特に成長ホルモン、プロラクチン)下垂体腺腫においても、PITX2がその浸潤性と関係している可能性が示唆された。また上皮間葉系マーカーであるSNAIL1が腫瘍のサイズと相関を示す可能性も示唆された。一方で、下垂体腺腫細胞を低接着プラスチック上で長期培養する事は非常に難がかった。一時的にSphere形成するが、passage後のgrowthが悪く長期的な培養は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、海綿静脈洞への浸潤性下垂体腺腫と密接に関わる転写因子PITX2を同定した。下垂体腺腫の浸潤性に関与する分子は現在なお明らかでないため、下垂体の初期発生に必須な転写因子であるPITX2と下垂体腫瘍の浸潤性との関与に注目している。PITX2は前立腺癌や乳癌等で予後因子となる事が報告されているが、下垂体腺腫において類似した報告は未だ認めず独自性が高い。本研究の目的は、PITX2の下垂体腺腫に及ぼす生物学的影響を関連因子の挙動を含め詳細に解析することで、根治困難な下垂体腺腫に対する新たな治療ストラテジーを提示できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The cause of cavernous sinus (CS) invasion of pituitary neuroendocrine tumors (PitNETs) has not been fully elucidated. We analyzed the relationship between CS invasion in PitNETs and the expression of PITX2 and SNAIL1, which are the transcription factors associated with the morphogenesis of pituitary gland. We analyzed the expression of PITX2 and SNAIL1 employing quantitative real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry. PITX2 expression was significantly higher in PitNETs with CS invasion than PitNETs without CS invasion. Expression of SNAIL1 was significantly elevated in PitNETs with suprasellar expansion compared with PitNETs without suprasellar expansion. There was no apparent relationship between CS invasion and mitotic count, Ki-67 index, and p53 expression. High PITX2 expression was observed in non-functional PitNETs with CS invasion, suggesting that PITX2 may be involved in CS invasion of PitNETs.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：下垂体腺腫 浸潤 海綿静脈洞 PITX2 上皮間葉系転換

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫は鞍上部に生じる良性腫瘍であるが、しばしば周囲の海綿静脈洞へ強く浸潤するため、手術が困難となり、残存病変から再発をきたすことがある。小型の下垂体腺腫でも海綿静脈洞浸潤を起こすことが多く、特徴的な所見の一つと言える。また病理組織学的に良性とは判断し難い程、異型を呈する症例も経験する。WHO2004では、異型性を有する下垂体腺腫を細胞増殖マーカーである MIB-1 index >3%, 免疫組織化学的に癌抑制遺伝子産物である p53 陽性で定義していた。しかし、下垂体腺腫はその他多くの腫瘍と異なる細胞生物学的動態を示すため、海綿静脈洞浸潤を来す腫瘍や大型の下垂体腺腫がこの 2 つの定義を満たすことは少ないという解離は、実臨床で多く経験することであった [Lloyd RV. IARC Press, Lyon, 2004]。例えば、多くの腫瘍で認める RAS 遺伝子変異が、下垂体腺腫では極めて稀である事が報告されている [Karga HJ. J Clin Endocrinol Metab.1992; Yoshimoto K. Jpn J Cancer Res.1992]。そのため、ごく最近改訂された WHO2017 では、異型下垂体腺腫という概念は推奨されず、海綿静脈洞浸潤を来す腫瘍を aggressive な下垂体腺腫と定義され、下垂体腺腫における浸潤性が現在最も注目されている研究分野となっている。

我々は、これまでに下垂体腺腫に対する臨床・基礎研究を続けてきた。60 症例の非機能性下垂体腺腫の解析を行い、本来下垂体発生のごく初期にのみ発現するはずの paired-like homeodomain family に属する転写因子 PITX2 が再び upregulation され、海綿静脈洞浸潤と密接に関わる事を明らかにした。元来、PITX2 は様々な脊椎動物で Nodal や Lefty2 と同じく非対称組織の原基を作る転写因子として知られており、組織の形態形成を担う [Hamada H. Nat.Rev. Genet. 2002]。下垂体においては、同じく転写因子である PITX1 が細胞の分化に深く関与し、正常の下垂体でも発現が見られるのに対し、PITX2 は下垂体前葉の器官発生期の初期段階で特に強く関わるが、その後発現は低下し、成人下垂体では発現していない [L'honoré A. Development. 2010; Charles MA. Endocrinology. 2005]。しかし、下垂体において極めて重要な転写因子であり、ヒト ES 細胞から下垂体原基を経て、下垂体前葉の各種内分泌細胞へ分化させる際に、PITX2 の発現誘導が必須であり、下垂体組織に存在する幹細胞の増殖と renewal を引き起こすとされている [Suh H. Development. 2002; Sun Z. Development. 2016]。さらに PITX2 は本来 Wnt pathway に属し、細胞周期の制御因子として細胞増殖に関わるため [Baek SH. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 ; Kioussi C. Cell. 2002; Maier S. Eur J Cancer. 2007]、近年乳癌、前立腺癌等の悪性腫瘍の予後との相関が指摘されている。また、PITX2 遺伝子のメチル化により予後が不良となるとの報告もある [Hirose H. Ann Surg Oncol. 2011; Uhl B. J Mol Diagn. 2017; Sheng X. Medicine (Baltimore). 2017]。しかし下垂体腺腫における研究はほとんどなく、特に海綿静脈洞浸潤との関係を明らかにした研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、下垂体腺腫における PITX2 の機能解析を行い、浸潤性下垂体腺腫に対する新たな治療ストラテジーの提言を目指す。

3. 研究の方法

(1) PITX2 の発現解析

下垂体腺腫細胞株、下垂体腺腫患者組織における PITX2 の発現解析を Western blot により行う。また両試料より RNA を抽出精製し、リアルタイム qPCR により定量的な発現量も解析する。同時に下垂体腺腫細胞株における免疫染色から、細胞内局在を確認し、下垂体腺腫患者組織における免疫染色から、組織中における分布・陽性細胞の割合を判定する。現在非機能性下垂体 60 例の解析は予備実験として行っているため、非機能性下垂体腺腫をさらに 40 例増し 100 例とし再現性を確認し、機能性下垂体腺腫も現在保管している 50 例で行い、下垂体腺腫の臨床経過（海綿静脈洞浸潤や、増大速度、再発率等）との関係性を検証する。海綿静脈洞浸潤を認める症例、認めない症例の患者数は同程度となるようにする。また細胞株による発現解析で、治療標的としての適性を評価する。

(2) PITX2 発現細胞の培養及び浸潤能評価

申請者らは、海綿静脈洞浸潤を認める下垂体腺腫細胞には PITX2 が強発現していることを同定している。PITX2 は転写因子であるため、通常フローサイトメトリーでの単離培養は困難である。そこで、申請者らは、まず海綿静脈洞浸潤を認める下垂体腺腫検体を、血清無添加培地に上皮細胞成長因子 (epidermal growth factor : EGF) および塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor : bFGF) 入りの低接着フラスコで初代継代培養する。これらの細胞集団は、申請者らの予備実験により PITX2 高発現の細胞と予想されるため、シングルセルクローニングを行った後、細胞染色及び定量 PCR により PITX2 高発現の細胞集団を同定し、PITX2 high expressed population (PHP) の細胞株を樹立する。同様に、海綿静脈洞浸潤を認めない下垂体腺腫検体から、PITX2 low or negative expressed population (PLP) の細胞株を樹立する。これら二つの細胞株を用いて、血清無添加培地での sphere-forming assay を行い、自己複製能を比較解析する。また、ソフトアガロースアッセイを行い、コロニー形成能を評価することで造腫瘍能を評価する。

(3) 浸潤性下垂体腺腫モデルマウスの作製

申請者らは、将来的に PITX2 をターゲットとした浸潤性下垂体腺腫に対する新たな分子標的治療の開発を目指しており、in vivo での抗腫瘍効果を検討することが不可欠である。(2)の PHP を皮下に移植したマウスを作製する。

4. 研究成果

下垂体腺腫は、鞍上部に生じる良性腫瘍であるが、海綿静脈洞に強く浸潤する傾向があり、しばしば治癒困難となる。その場合、手術が困難となり、残存病変から再発をきたすことがある。小型の下垂体腺腫でも海綿静脈洞浸潤を起こすことが多く、特徴的な所見の一つと言える。しかし、下垂体腺腫の浸潤性に関与する分子は未だ明らかでない。申請者らは、下垂体腺腫の浸潤性を腫瘍の単純な増殖性とは異なる性質であると考え、新たな因子を探索し転写因子 PITX2 が、浸潤性下垂体腺腫で発現し、海面静脈洞への浸潤性と強く関与している可能性を得た。さらに、ホルモン非産生性のみならず、ホルモン産生性（特に成長ホルモン、プロラクチン）下垂体腺腫においても、PITX2 がその浸潤性と関係している可能性が示唆された。また上皮間葉系マーカーである SNAIL1 が腫瘍のサイズ、特に鞍上部進展と強い相関を示す可能性が示唆された。一方で、下垂体腺腫細胞を低接着プラスチック上で長期培養する事は非常に難があった。分離分散溶液を Trypsin、Accutase、TrypLE Select など様々試し、一時的に Sphere 形成する細胞集団は見られるも、passage 後の growth が悪く長期的な培養は困難であった。そのため、シングルセルクローニングし細胞株化をすることは不可能であった。また passage することなく、免疫不全マウスの皮下に移植すれど、1-2 週間程度で細胞は消失し、治療標的となる腫瘍塊形成は困難であった。一方で、機能性、非機能性に関わらず、PITX2 が浸潤性と関与していることは、明らかに病理組織学的及び qPCR 法により示され、今後の難治性下垂体腺腫の増殖・浸潤を抑える治療標的として重要であると言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamura R, Ohara K, Morimoto Y, Kosugi K, Oishi Y, Sato M, Yoshida K, Toda M.	4. 巻 Jun;30(2)
2. 論文標題 PITX2 Expression in Non-functional Pituitary Neuroendocrine Tumor with Cavernous Sinus Invasion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocr Pathol.	6. 最初と最後の頁 81-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12022-019-9573-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤瑞仁 田村亮太 森本佑紀奈 小杉健三 大石裕美子 吉田一成 戸田正博
2. 発表標題 浸潤性下垂体腺腫におけるPITX2及びSNAIL1の発現解析
3. 学会等名 第30回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	戸田 正博 (Toda Masahiro) (20217508)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------