

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17994

研究課題名(和文) AIP欠失細胞株を用いたAIPの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of AIP using AIP-deficient cell lines

研究代表者

福田 高士 (Fukuda, Takashi)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：10812779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：arylhydrocarbon receptor-interacting protein(AIP)は家族性下垂体腺腫の原因遺伝子である。家族性下垂体腺腫は腫瘍が大きく、薬剤に対する治療抵抗性を示すことも知られている。我々はラットの成長ホルモン(GH)産生下垂体腫瘍細胞であるGH3のAIPをゲノム編集で欠失させたAIP KO GH3を作成した。作成されたAIP KO GH3を薬剤抵抗性のモデルとして薬剤スクリーニングを行った。薬剤スクリーニングを行ったところCucurbitacin IはStat3のリン酸化を抑制し細胞増殖やGHの分泌を抑制することが可能であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下垂体腺腫は頭蓋内腫瘍の中で頻度が高い腫瘍である。GHを産生する下垂体腺腫であるGH産生下垂体腺腫は手術療法に加えて薬剤治療も用いられるが薬剤治療に反応しない症例も多い。我々はStat3のリン酸化が薬剤抵抗性下垂体腺腫の機序の一つとなることを示した。Stat3のリン酸化に作用する薬剤を検討することが薬剤抵抗性下垂体腺腫の症例における新たな薬剤治療につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：arylhydrocarbon receptor-interacting protein (AIP) is the causative gene for familial pituitary adenomas. Familial pituitary adenomas are known to have large tumors and resistance to drug therapy. We generated AIP KO GH3, a genome-edited deletion of AIP in GH3, a rat growth hormone (GH)-producing pituitary tumor cell. AIP KO GH3 was screened for drugs as a model of drug resistance. The drug screening revealed that Cucurbitacin I can inhibit cell proliferation and GH secretion by suppressing Stat3 phosphorylation.

研究分野：下垂体

キーワード：成長ホルモン 下垂体腺腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

下垂体はホルモンの中枢であり、下垂体から分泌されるホルモンの不足または過剰は様々な病態を引き起こす。下垂体腺腫は頭蓋内の腫瘍として2番目の頻度で発生する(REPORT OF BRAIN TUMOR REGISTRY OF JAPAN (1984-2000) 12th Edition)。下垂体腺腫は産生する下垂体ホルモンによって分類され、ホルモンを産生しない非機能性腺腫、プロラクチン(PRL)産生腺腫、成長ホルモン(GH)産生腺腫などに分類されている。

GH産生腺腫は先端巨大症と呼ばれており、GH過剰とGHの刺激によって肝臓で産生されるインスリン様成長因子1(IGF-1)の高値、特徴的な顔貌変化や手指の増大を呈することに加え、糖尿病などの代謝異常、寿命の短縮を呈する(先端巨大症および下垂体性巨人症の診断と治療の手引き、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、間脳下垂体機能障害に関する調査研究班、平成24年度総括・分担研究報告書、2013(平成24年度改訂))。その治療は経鼻的腫瘍摘出術などによる手術療法が中心となっているが、手術療法が困難な症例や術後の残存腫瘍に対しては薬物療法も行われている。

正常な下垂体では、ソマトスタチン刺激によってGH分泌が抑制される。そのため、既存薬はソマトスタチン受容体を活性化させる薬剤が主体である。ソマトスタチンアナログなどによる薬物療法は腫瘍サイズを縮小させ、過剰なGH分泌の抑制が可能である。しかし、ソマトスタチンアナログであるオクトレオチドの奏効率は19.2%と十分ではない。近年使用されるようになった新たなソマトスタチンアナログであるパシレオチドでもオクトレオチドと比較して高い奏効率31.3%を認めるものの、それでも効果は十分ではない(Colao A, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(3):791-799.)。そのため、薬物療法が有効ではない治療抵抗性症例に対する新規の薬物療法の開発が望まれているが、薬剤をスクリーニングするための有用な治療抵抗性モデルとなる細胞系は今まで存在していなかった。そして、治療抵抗性の疾患である家族性下垂体腺腫の原因と考えられているAIPの発現低下がソマトスタチンアナログの効果を減弱するという報告(Chahal HS, et al. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(8):E1411-20.)もあり、AIPの機能解析が治療抵抗性先端巨大症の治療につながると推測される。

2. 研究の目的

本申請研究の目的は、治療抵抗性の下垂体腺腫に対する有効な薬剤を得るために、新規薬剤標的を同定することである。

代表者は、下垂体腺腫におけるAIPの機能解析を行う過程において、ラットのGH産生下垂体腫瘍細胞であるGH3に対してゲノム編集(CRISPR/Cas9システム)を行い、Aip(ラットのAIP)遺伝子の両アリル exon4 領域にフレームシフト変異が発生した細胞株を樹立した(Fukuda T, et al. PLoS One. 2016;11(10):e0164131.)。

得られた細胞株(AIP KO GH3)はAIPを恒常的に機能喪失させた下垂体細胞株で、親株と比較してGH分泌が約40倍増加し、細胞増殖能が亢進していた。さらに、ソマトスタチンによる細胞増殖抑制作用が低下していたことから、治療抵抗性GH産生下垂体腺腫の特徴を示していると考えられた。

AIP欠失細胞としては、AipホモノックアウトES細胞から作出したAip KO MEF細胞(ATCC CRL3288)が利用可能であるが、GH産生能を持つAIP欠失細胞報告は、代表者の細胞が世界初の報告であり、AIP遺伝子変異の機能解析や、薬剤スクリーニングのモデルとして利用できる点で、学術的な独自性があるといえる。本年、海外の研究室から、ソマトトロフ(GH分泌細胞)特異的Aip KOマウスが報告され、Aip欠失によるGH産生腺腫の形成が証明された(Gillam M P, et al., Journal of the Endocrine Society, 2017;1:78-95)。しかし、KOマウスにおける腺腫形成は生後40週齢以降と晩発性であるため、新規薬剤の抗腫瘍効果の評価には、代表者の樹立した細胞を皮下移植した担がんモデルの利用は簡便で有用であると考えられる。我々の作製した細胞を用いた解析ではIL-6r Jak1/2 - Stat3の経路がAIPの機能喪失によって活性化することが示されている(Fukuda T, et al. PLoS One. 2016;11(10):e0164131.)。Stat3が下垂体腫瘍の増殖に関与しており、GHの転写を活性化するという報告(Zhou C, et al. J Clin Invest. 2015;125(4):1692-1702.)があり、その経路の障害も新規薬剤の標的となりうる。

3. 研究の方法

(1) 薬剤抵抗性細胞株を用いた薬剤スクリーニングを行い、GH産生に対して抑制的に作用するシグナルを明らかにする。

AIPを機能喪失して作製した治療抵抗性下垂体腺腫と同様の特徴を持つ細胞株であるGH3-FTYを96-well plateに播種し、各種阻害剤ライブラリー(384種;文部科学省新学術領域研究・癌支援化学療法基盤支援活動班より供与)を終濃度10 μMにて投与し、24時間培養する。リアルタイムPCRを用いてGh(マウスのGH遺伝子)のmRNA発現量を解析する。GHを抑制する薬剤または細胞死を誘導する薬剤をスクリーニングする。候補薬剤の濃度を変えて、GH抑制作用を評価す

る。次に、候補薬剤について細胞増殖抑制作用についても評価を行う。

(2) . 候補薬剤を担がんマウスへ投与し、抗腫瘍効果を評価する。

新規薬剤が親株の GH3 と治療抵抗性モデルである AIP KO GH3 において同等の効果がみられるものであればマウスにおいても評価を行う。以前の我々の既報 (Fukuda T, et al.. PLoS One.2016;11(10):e0164131.) において行った BALB-c/nu マウスに GH3,AIP KO GH3 をそれぞれ皮下接種させ腫瘍形成を行う。担がんマウスに薬剤投与を行い、腫瘍のサイズや血中 GH, IGF-1 濃度を測定し薬剤の効果を検証する。

4 . 研究成果

(1) 薬剤抵抗性細胞株を用いた薬剤スクリーニングを行い、GH 産生に対して抑制的に作用するシグナルを明らかにする。

各種阻害剤ライブラリーを用いて薬剤スクリーニングを行った。Cucurbitacin I と Cytochalasin D は特に Gh mRNA の発現を抑制した。特に Cucurbitacin I では 1microM 以下の濃度では濃度依存性に Gh mRNA を抑制した。(図 1)。細胞増殖についても濃度依存性に抑制した。(図 2)。

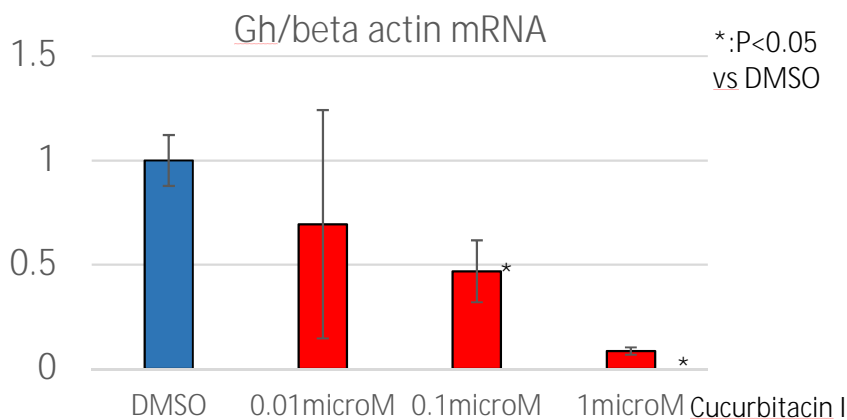


図 1.Cucurbitacin I による濃度依存性の Gh mRNA 抑制

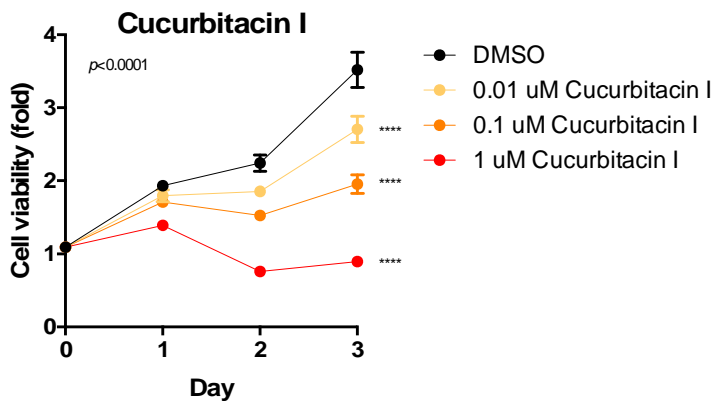


図 2.Cucurbitacin I による濃度依存性の細胞増殖抑制

Cucurbitacin I は Stat3 のリン酸化を抑制する薬剤である。Cucurbitacin I の存在下で AIP KO GH3 を培養し Stat3 のリン酸化を測定したところ DMSO 群と比較し有意に Stat3 のリン酸化が抑制できた。

(2) 候補薬剤を担がんマウスへ投与し、抗腫瘍効果を評価する。

BALB/c-nu マウスに対して AIP KO GH3 を皮下接種し 1 週後より Cucurbitacin I を週 3 回 腹腔内投与を行った。対照群には DMSO の投与を行った。その後、腫瘍サイズや血中 GH, IGF-1 の濃度の測定を行った。腫瘍サイズ, 血中 GH 濃度, IGF-1 濃度はどれも Cucurbitacin I 群は DMSO 群と比較し明らかな有意差は認めなかった。Cucurbitacin I の濃度や投与期間などの変更を行ったがどれも同様に有意差は認めなかった。

(3)まとめ

今回の薬剤スクリーニングでは Cucurbitacin I が薬剤抵抗性下垂体腺腫細胞株において Stat3 のリン酸化を抑制することを通して GH mRNA の発現、細胞分泌増殖の抑制を示した。in vitro の実験では上記を示すことが可能であったが in vivo では再現できなかった。薬剤抵抗性下垂体腺腫において Stat3 のリン酸化が主要な役割を果たしている可能性が考えられた。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------