

自己評価報告書

平成23年 4月20日現在

機関番号：32666
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2008～2012
課題番号：20591726
研究課題名（和文） 下垂体腺腫の増殖における SDF-1 の役割に関する分子形態学的研究
研究課題名（英文） Molecular and morphological mechanism of SDF-1-mediated signaling Pathway in pituitary adenoma
研究代表者
吉田 大蔵（YOSHIDA DAIZO）
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30210701

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学
キーワード：下垂体腺腫、細胞浸潤、血管新生

1. 研究計画の概要

我々は下垂体腺腫の血管新生の機序のひとつとして、下垂体腺腫細胞が分泌する stem cell-derived factor (SDF)-1 に着目した。この chemokine により骨髄で産生される endothelial progenitor cell を腫瘍局所に誘導し (homing effect)、下垂体腺腫の血管新生を促進する事と、さらに種々の SDF-1 の receptor を介した下垂体腺腫の未知の細胞内シグナルを解明することで、下垂体腺腫の成長における SDF-1 の機能を解明することを目的として研究を始めた。

(1) tissue microarray を用いた下垂体腺腫における SDF-1 発現の定量的解析

申請者はすでに下垂体腺腫組織の手術標本をパラフィンブロックとして100例近く保存しており、同時に台帳に年齢、性、subtype、サイズ、臨床上的特徴を始めとしてまとめている。Tissue microarray をこのパラフィンブロックから作成し、SDF-1 の組織での発現と positive control としての beta-actin との発現対比率を蛍光免疫染色から解析し、検討した。

(2) CXCR4, CXCR7 (SDF-1 receptor) ノックダウン細胞と強制発現細胞の確立

ヒト樹立下垂体腺腫細胞 (HP-75) に CXCR4, CXCR7 の full length clone を transfect して強制発現させた細胞と、これらをターゲットとした RNA 干渉 (siRNA 法) でノックダウンした細胞を作成した。これらの細胞に対して SDF-1 を培地中に加えれば、比較することで SDF-1 の刺激によって receptor である CXCR4 もしくは CXCR7 を介した細胞内

のシグナルを receptor 別に解析可能になることが期待された。大腸菌を用いた cDNA clone の増幅と細胞への vector を利用した transfection などは申請者の施設に稼動中の P2 level の実験室において行うが、研究代表者 (吉田) は以前よりそれらの機器を使用して研究を進めており、操作も習熟している。

2. 研究の進捗状況

当初の目的にそって実験は順調に進行中であるが 現在は CXCR4, CXCR7 の full length clone を transfect して強制発現させた細胞と、これらをターゲットとした RNA 干渉 (siRNA 法) でノックダウンした細胞を作成し、これらの細胞に対して SDF-1 を加えて SDF-1 によって刺激されるシグナルカスケードを解析中である。

3. 現在までの達成度

最初に当施設で endoscopic endonasal transsphenoidal surgery により摘出された 60 例 (15 GH-oma, 10 PRL-oma, 5 TSH-oma, 6 ACTH-oma, 24 NF-oma) の下垂体腺腫に、抗 SDF-1 抗体と骨髄前駆細胞に特異的な抗 CD34 抗体を用いて、蛍光二重免疫染色を行った。SDF-1 の発現と微小血管密度の関係を subtype や腺腫の浸潤の grading などで相関性を統計学的に解析し、さらには培養細胞を用いた ELISA 法により、低酸素刺激における下垂体腺腫細胞の SDF-1 分泌を定量的に解析した。Subtype における発現の相違には有意差がなく、SDF-1 発現と微小血管密度に正の相関が見られた。この結果下垂体腺腫細胞にも SDF-1 が発現しており、

従来検討された VEGF による組織に既存の血管内皮細胞による血管構築とは別個に、SDF-1 の homing effect によって骨髄から血管内皮前駆細胞を誘導する機序が存在し、下垂体腺腫の血管新生に密接に関わっている事が示唆された。

4. 今後の研究の推進方策

下垂体腺腫における miRNA の研究報告は、少なく単一の miRNA に焦点をあてた下垂体腺腫組織での発現傾向といったものが多いが機能解析はなされていないことに我々は着目している。従ってこれからの研究推進の方向として SDF-1 mRNA の発現を制御する miRNA の解析を中心に広範なシグナルの相互干渉を解析する予定である。今回我々は樹立下垂体腺腫細胞と正常下垂体での mRNA と個別に相補的な配列を有する miRNA を網羅的に解析する。さらにその中から前年度見出した SDF-1 の下流域に属するシグナルの mRNA に相補的な miRNA を見出し、miRNA が制御する SDF-1 シグナルの機能解析を行うことを今年度の研究目的とする。miRNA は様々な mRNA と類似構造を持つため SDF-1 のみならず多様な mRNA と相補構造を持つことが予想されるために、従来思いも及ばなかった mRNA が SDF-1 と同時に制御される可能性を秘め、シグナル伝達の未知の部分が明らかになることが期待されると考えられた。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

- (1) Kim K, Isu T, Sugawara A, Matsumoto R, Isobe M, Morimoto D, Mishina M, Kobayashi S, Yoshida D, Teramoto A. Selective posterior decompression of the cervical spine. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2011;51(2):108-12.
- (2) Kim K, Katsuno M, Isu T, Mishina M, Yoshida D, Kobayashi S, Teramoto A. Concomitant cranial and lumbar subdural hematomas -case report-. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2010;50(5):402-4.
- (3) Yoshida D, Koketshu K, Nomura R, Teramoto A. The CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses hypoxia-mediated growth hormone production in GH3 rat pituitary adenoma cells. *J Neurooncol*. 2010 Oct;100(1):51-64.

[学会発表] (計 12 件)

1. 吉田大蔵、額額健太、寺本明。ラット下垂体腺腫細胞 GH3 における miRNA による GH, PRL 産生の制御に関する研究。第 51 回日本神経病理学会 (東京、2010)
2. 吉田大蔵、額額健太、寺本明。ラット下垂体腺腫細胞 GH3 における GH, PRL 産生に関与する miRNA の機能解析。第 20 回日本間脳下垂体腫瘍学会 (西宮 2010)
3. Yoshida D, Koketshu K, Nomura R, Teramoto A. The CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses hypoxia-mediated growth hormone production in GH3 rat pituitary adenoma cells. *NeuroTalk-2010* (Singapore 2010)
4. 吉田大蔵、額額健太、野村竜太郎、寺本明。低酸素状態における CXCR4 のシグナル増強とアンタゴニスト、AMD-3100 の成長ホルモン産生に対する抑制効果。第 19 回日本間脳下垂体腫瘍学会。(2009年、東京)
5. 吉田大蔵、額額健太、寺本明。人工ペプチドを用いた新しい遺伝子導入法。第 50 回日本神経病理学会総会学術研究会 (2009年、高松)

○出願状況 (計 1 件)

(1)

名称：トランスフェクション剤

発明者：吉田大蔵、武井次郎

権利者：学校法人日本医科大学、

(株)スリー・ディー・マトリックス

種類：特許

番号：PCT/JP2009/064814

出願年月日：平成 21 年 8 月 26 日

国内外の別：国外