

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：84203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09360

研究課題名（和文）難治性下垂体腺腫に対するNOTCHおよびPROP1を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of NOTCH and PROP1 as new therapeutic targets in high-risk pituitary adenomas

研究代表者

北条 雅人 (Hojo, Masato)

滋賀県立総合病院（研究所）・その他部局等・科長

研究者番号：60372588

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）： 難治性下垂体腺腫に対し、VEGF阻害薬の効果が期待されているが、下垂体血管への影響については解明されていない。Prop1は下垂体発生の過程で最初に発現する下垂体に特異的な転写因子で、Notch経路との関連性が報告されている。

本研究では、ACTH産生下垂体腺腫を解析し、分化度の低い腺腫においてPROP1が高率に発現しており、PROP1が難治性下垂体腺腫の治療標的となり得ることを示した。さらに、VEGF受容体阻害薬の投与で、下垂体血管に変化をきたし出血を誘発することを示した。VEGF阻害薬を難治性下垂体腺腫の治療薬として使用する際には、下垂体血管への影響を考慮する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ACTH産生下垂体腺腫において、分化の程度の低い腺腫細胞にPROP1が高率に発現していることを示し、PROP1が難治性下垂体腺腫の治療標的となる可能性を示した。Prop1に関連する因子としてNotch、Notchに関連する因子としてVEGF着目し、VEGF受容体の阻害により高率に下垂体出血をきたすことを示した。

本研究で、VEGF受容体阻害薬の投与により下垂体卒中を生じるリスクがあることを初めて示すことができた。このことは、抗VEGF療法の下垂体血管に対する作用の解明につながり、難治性下垂体腺腫の新たな治療法を開発するための礎となると考えられる。

研究成果の概要（英文）： Although Anti-VEGF therapy may be an alternative treatment for refractory pituitary adenomas, the effects of anti-VEGF agents on the pituitary gland are not yet well understood. Prop1 is the first pituitary specific transcription factor in pituitary development, and is related to the Notch pathway.

In this study, we first examined the expression of PROP1 in corticotroph adenomas. PROP1 was prominently expressed in less differentiated corticotroph adenomas. This result suggests that PROP1 may have a role in tumorigenesis of pituitary adenomas, and is expected to be a new therapeutic target for refractory pituitary adenomas. Next, we found that mice administered with OSI-930, an inhibitor of VEGF receptor 1 and 2, frequently exhibited hemorrhage in the pituitary gland. This result demonstrates that anti-VEGF agents have a risk of pituitary apoplexy. Pituitary apoplexy should be kept in mind as an adverse effect of anti-VEGF therapy.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：Prop1 Notch VEGF OSI-930 難治性下垂体腺腫 クッシング病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫は良性腫瘍であるが、増殖が速く浸潤性で難治性の場合があり、それに対する有効な治療法は確立されていない。難治性下垂体腺腫に対して、ヨーロッパの内分泌学会ではテモゾロミドでの治療が推奨されているが、効果は十分とは言い難く、新たな治療法の開発が期待されている。VEGF阻害薬の効果も期待されているが、下垂体血管への影響については解明されていない。

Prop1は下垂体発生過程で最初に発現する下垂体に特異的な転写因子であり、Pit1の上流因子である。PROP1は下垂体腺腫に発現していることが報告されているが、病因における役割は不明である。また、Prop1の発現は、Notch-Hes経路との関連性が報告されている。NOTCHに関しては阻害薬の研究が進んでおり、PROP1を直接治療の標的とするだけでなく、NOTCHを標的として新規治療法を研究する方が、新規治療法開発へとつながる可能性が高いと考えられる。

血管新生におけるVEGFシグナル経路とNotch経路の関連性としては、マウスの網膜において、VEGFシグナル経路がNotchのリガンドのDll4を介して血管新生を制御すると報告されているが、下垂体での報告は無い。今後、難治性下垂体腺腫への治療の選択肢としてVEGF阻害薬を用いる場合、下垂体における血管新生への影響を理解しておく必要があるが、十分には解明されていない。

### 2. 研究の目的

まず、下垂体腺腫においてPROP1の病因への関与を解析する。次に、Notch経路とVEGFシグナル経路に着目し、阻害薬の下垂体血管への影響を解析する。以上により、難治性下垂体腺腫の新規治療法の開発の礎とすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ACTH産生下垂体腺腫におけるPROP1の解析

クッシング病は、非PIT1系列のACTH産生下垂体腺腫により発症する。Prop1は、Pit1系列以外の下垂体ホルモン細胞の分化にも関与していることが報告されており、本研究では、ACTH産生下垂体腺腫におけるPROP1の発現を解析することとした。まず、ACTH産生下垂体腺腫の手術標本において、PROP1の発現を解析した。手術標本には正常下垂体も混入するため、RT-PCRでの解析は困難である。このため、免疫染色で解析した。次に、CAM5.2染色で、内分泌活性による分類を行い、それぞれの群でPROP1の発現を解析した。

#### (2) Notch阻害薬、VEGF受容体阻害薬の投与による解析

次に、マウスにNotch阻害薬のDAPT、VEGF受容体阻害薬のOSI-930を投与し、下垂体への影響を解析した。8~12週齢のC57BL/6N雄マウスに、VEGF受容体阻害薬OSI-930を100mg/kgの用量で腹腔内に1日間、3日間、6日間の期間投与を行い、最終投与から24時間後に下垂体を採取した。HE染色で下垂体形態変化を解析した。Isolectin B4染色、抗PECAM1抗体および抗PLVAP抗体での免疫染色で、下垂体血管を評価した。Isolectin B4染色で下垂体前葉と中葉の血管の定量化を行った。摘出した下垂体からmRNAを抽出し、定量的RT-PCR解析を行った。周皮細胞マーカーである抗PDGFR-抗体と、抗VE-cadherin抗体で免疫染色を行い解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ACTH 産生下垂体腺腫における PROP1 の解析

###### 1) PROP1 は非 PIT1 系列の ACTH 産生下垂体腺腫に高率に発現している

ACTH 産生下垂体腺腫 6 症例を検討した。まず、ACTH、GH、TPIT、PIT1 に対する抗体で免疫染色を行い解析した。全例 ACTH と TPIT が陽性で、GH と PIT1 は陰性であった。これは、ACTH 産生下垂体腺腫が PIT1 系列ではなく TPIT 系列であることに矛盾せず、WHO の 2017 年の分類に合致している。次に、PROP1 の発現を免疫染色で解析した。6 例中 3 例で PROP1 が陽性であった。PROP1 は PIT1 の上流因子であるが、非 PIT1 系列の ACTH 産生下垂体腺腫で高率に陽性であった。

###### 2) ACTH 産生下垂体腺腫を CAM5.2 染色により内分泌活性で分類

次に、サイトケラチンに対する抗体 CAM5.2 での免疫染色で、腺腫を分類した。GH 産生下垂体腺腫では、CAM5.2 抗体でびまん性に染色される場合は、腫瘍細胞は分化の程度が高く、正常の GH 産生細胞に似ていると報告されている。同様の方法を用い、CAM5.2 抗体での免疫染色で分類した。染色パターンから、びまん性型と非びまん性型に分けることができた。びまん性型の腺腫の方が、ACTH 値が高い傾向があり、GH 産生細胞と同様により分化した腫瘍細胞から構成されると考えられた。

###### 3) PROP1 は CAM5.2 染色で非びまん性型の ACTH 産生腺腫に高率に発現

CAM5.2 染色による分類で、非びまん性型の 3 例では、全て PROP1 が陽性であった。また、びまん性型の 3 例では、全て PROP1 が陰性であった。非 PIT1 系列の ACTH 産生下垂体腺腫のうち、非びまん性型、つまり分化の程度の低い腺腫で、PROP1 が高率に陽性であった。

以上から、PROP1 は下垂体腺腫の腫瘍原性に関与していると考えられ、難治性下垂体腺腫の治療標的となり得ることが示唆された。ここまでの結果を、Interdisciplinary Neurosurgery 誌に報告した。

##### (2) Notch 阻害薬、VEGF 受容体阻害薬の投与による解析

###### 1) VEGF 受容体阻害薬 OSI-930 を投与すると高率に下垂体卒中をきたす

OSI-930 の 1 日間投与群では下垂体卒中は生じなかったが、3 日間投与群では 6 例中 4 例に、6 日間投与群では 5 例中 5 例に下垂体卒中が生じていた。脳出血は 1 例も生じなかった。3 日間投与群ではラトケ腔を中心に出血が生じていたが、6 日間投与群では前葉と中葉と後葉からも出血が生じており、投与日数に依存して出血の増悪がみられた。以上の結果から、OSI-930 の投与日数に依存して、下垂体卒中が誘発されることが示された。

###### 2) 下垂体血管の評価は isolectin B4 染色で可能

Isolectin B4 染色で下垂体血管を描出して解析する妥当性を評価するため、血管内皮細胞マーカーである抗 PECAM1 抗体および抗 PLVAP 抗体での免疫染色で検討した。その結果、isolectin B4 染色によって、下垂体血管の構造を解析することが可能と考えられた。以後、isolectin B4 染色で下垂体血管を解析することとした。

###### 3) VEGF 受容体の阻害は下垂体血管構造を変化させる

Isolectin B4 染色で下垂体前葉と中葉の血管の定量化を行うと、OSI-930 の投与日数に依存して前葉の

血管面積や分枝数、中葉の血管数の減少がみられた。毛細血管の減少は、ラトケ腔周囲に顕著に認められた。下垂体から抽出した mRNA を定量的 RT-PCR で解析すると、VEGFR1 と VEGFR2 が有意に減少していた。ラトケ腔周囲に高率に毛細管の変化をきたしていたことは、下垂体卒中の発生機構に関与していると考えられた。

#### 4) 周細胞と VE-cadherin が下垂体卒中の誘発に影響を及ぼす

出血のよく生じるラトケ腔周囲の血管を抗 VE-cadherin 抗体と抗 PDGFR- 抗体での免疫染色で解析したところ、この部分の毛細血管には VE-cadherin と周皮細胞が乏しいことが示された。VEGF 受容体阻害薬投与により下垂体卒中が生じやすいラトケ腔周囲の毛細血管には VE-cadherin や周皮細胞が乏しく、また VEGF 受容体阻害薬投与による血管の退縮が強く、このことが出血の原因と考えられた。

以上のように、VEGF 受容体阻害薬の投与により下垂体卒中を生じるリスクがあることを初めて示すことができた。抗 VEGF 療法の下垂体血管に対する作用の解明につながり、より安全な化学療法の開発の礎となると考えられる。以上の結果を、PLOS ONE 誌に報告した。

ACTH 産生下垂体腺腫のうち、分化の程度の低い腺腫細胞に PROP1 が高率に発現していることを示し、PROP1 が難治性下垂体腺腫の治療標的となる可能性を示した。Prop1 に関連する因子として Notch、Notch に関連する因子として VEGF 着目し、VEGF 受容体の阻害により高率に下垂体に出血をきたすことを示した。本研究の結果は、難治性下垂体腺腫の新たな治療法を開発するための礎となると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takebe Noriyoshi, Hojo Masato, Takada Shigeki, Sugita Yoshito, Tanigaki Kenji, Tanji Masahiro, Miyamoto Susumu	4. 巻 31
2. 論文標題 Contribution of PROP1 in the pathogenesis of Cushing's disease: A preliminary study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Interdisciplinary Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 101691 ~ 101691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.inat.2022.101691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sugita Yoshito, Takada Shigeki, Tanigaki Kenji, Muraki Kazue, Uemura Munehiro, Hojo Masato, Miyamoto Susumu	4. 巻 18
2. 論文標題 Inhibition of VEGF receptors induces pituitary apoplexy: An experimental study in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0279634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0279634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	谷垣 健二 (Tanigaki Kenji)  (70362473)	滋賀県立総合病院（研究所）・神経病態研究部門・専門研究員  (84203)	
研究分担者	丹治 正大 (Tanji Masahiro)  (50766657)	京都大学・医学研究科・助教  (14301)	

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