

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17544

研究課題名（和文）プロラクチン産生下垂体腺腫における腫瘍発生・増殖を担う新規遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of Novel Genes Responsible for Tumorigenesis and Growth in Lactotroph PitNET

研究代表者

服部 裕次郎 (Hattori, Yujiro)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：40528436

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）：プロラクチン産生下垂体神経内分泌腫瘍（lactotroph PitNET）のうち、術前にドパミンアゴニスト等の薬剤治療を受けていない手術検体を用い、RNAシーケンス解析を行った。結果、対照群である正常下垂体との間で異なる遺伝子発現パターンが明らかになり、正常下垂体と比較しプロラクチン産生下垂体神経内分泌腫瘍において1275個の発現上昇遺伝子ならびに2153個の発現低下遺伝子が同定された。上位30個のDEGの中には9個の長鎖間非コードRNAが含まれていた。Integrity Pathway解析により、エストロゲン受容体シグナル、酸化リン酸化シグナル、EIFシグナルの活性化が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既報でもプロラクチン産生下垂体神経内分泌腫瘍の発現遺伝子を検討した研究の報告はあるが、いずれも術前に薬剤治療を受け、それにより遺伝子発現に影響を及ぼした腫瘍を扱ったものであった。本研究は術前に薬剤治療を受けていない、すなわち腫瘍における遺伝子発現が薬剤修飾を受けていない腫瘍のみ選択し解析したことに新規性がある。本研究で明らかになった発現変動遺伝子はプロラクチン産生下垂体神経内分泌腫瘍の治療ターゲットとなりうる可能性があり、本研究結果の意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：RNA sequencing analysis was performed on surgical specimens from lactotroph pituitary neuroendocrine tumor (lactotroph PitNET) that had not been treated with dopamine agonists or other drugs prior to surgery. The results revealed a different gene expression pattern in lactotroph PitNET compared to the normal pituitary, with 1275 up-regulated genes and 2153 down-regulate genes identified. The top 30 differential expression genes contained 9 inter-long noncoding RNAs. Integrity Pathway analysis revealed activation of estrogen receptor signaling, oxidative phosphorylation signaling, and EIF signaling.

研究分野：神経内分泌学

キーワード：下垂体 下垂体腫瘍 神経内分泌学 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

下垂体は頭部のほぼ中央にあるトルコ鞍内に位置する約 1cm ほどの楕円体のホルモン産生器官であり、上方には視神経交叉が、左右には内頸動脈や眼球運動に關与する脳神経が通過する海綿静脈洞が位置している。下垂体にはプロラクチン(PRL)、成長ホルモン(GH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、黄体形成ホルモン(LH) / 卵胞刺激ホルモン(FSH)の各種ホルモン分泌細胞が存在しており、それら下垂体前葉ホルモン分泌細胞が何らかの原因により腫瘍化したものを下垂体神経内分泌腫瘍 (Pituitary neuroendocrine tumor, PitNET) という (注: 研究開始当初は下垂体腺腫の名称であったが、近年 WHO 分類が変更され、研究終了時点では下垂体腺腫とは呼ばず下垂体神経内分泌腫瘍の名称に変更された。本報告書でも以下、下垂体神経内分泌腫瘍 (PitNET) に統一する)。腫瘍の増大に伴う周囲構造の圧迫により頭痛や視機能障害をきたすだけでなく、ホルモン過剰分泌が生じるタイプのもは先端巨大症(GH 産生腫瘍) やクッシング病 (ACTH 産生腫瘍) などの疾患を呈する。プロラクチン産生下垂体腫瘍 (PRL 産生下垂体神経内分泌腫瘍、以下 lactotroph PitNET) では女性では乳汁分泌や月経不順・無月経が生じ、不妊の一因となっている。

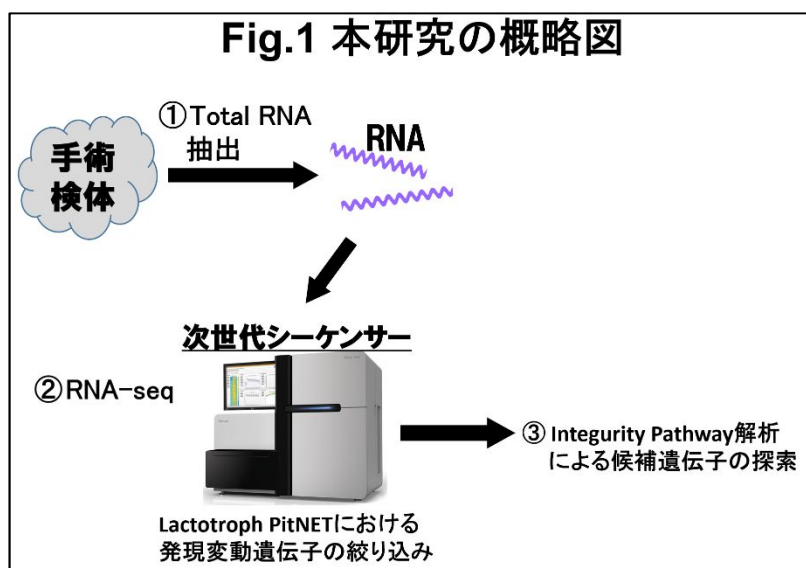
PitNET の治療の第一選択は lactotroph PitNET 以外では手術、とりわけ経鼻的腫瘍摘出術である。一方、lactotroph PitNET においては原則、第一選択はドパミン作動薬による内服治療である。しかし長期間の内服継続が必要であり、患者の利便性、嘔気や心臓弁膜症といった副作用にも配慮が必要であるほか、薬剤抵抗性により手術を余儀なくされる症例も多い。手術は必ずしも 100%安全ではなく回避できるのであれば望ましいことは言うまでもないが、手術では全摘出できない場合など引き続き薬剤治療が必要となる場合にドパミン作動薬以外に確立された薬剤は存在しない。それらの観点から現状において新たな治療法が望まれている。

2. 研究の目的

現在、先端巨大症やクッシング病においては、GNAS、USP8、BRAF、USP48 などの腫瘍発生に關わる遺伝子変異が報告されている他、既存のソマトスタチンアナログなどの薬剤治療も存在している。一方、lactotroph PitNET の発生に關する特異的な遺伝子については未解明であり、本研究でその探索を目指す。

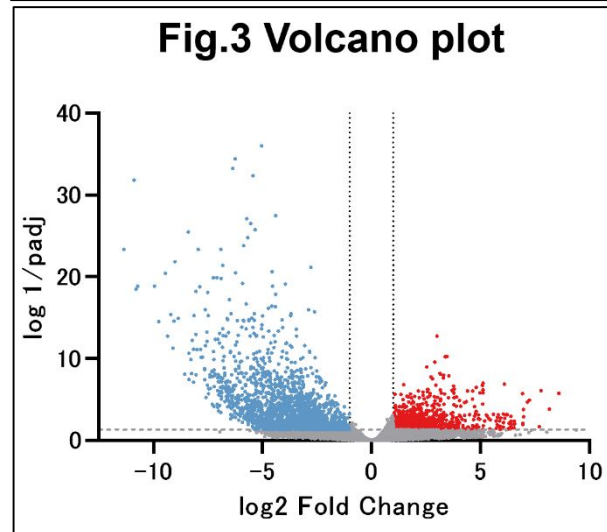
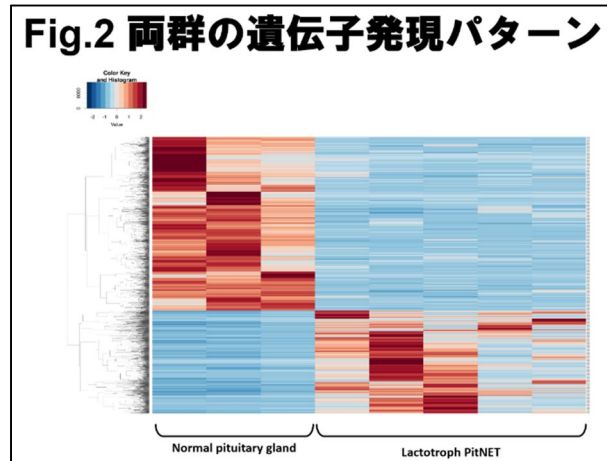
3. 研究の方法

日本医科大学附属病院倫理委員会承認のもと、術前にドパミン作動薬等の薬物を内服せずに手術に至った lactotroph PitNET 患者 5 症例の腫瘍検体、対照群として、下垂体機能正常であるが下垂体以外の疾患 (嚢胞性疾患など) で手術を必要とするも術野確保のため下垂体の一部の切離を余儀なくされた 3 症例の下垂体検体を用い、total RNA を抽出し、RNA sequence 解析を行い、lactotroph PitNET 群で発現変動している遺伝子を探索した。その後、それら遺伝子群を対象とした Integruity Pathway 解析を行い、遺伝子ネットワークを含め lactotroph PitNET に關与が示唆される遺伝子の探索を行った。Fig.1 として概略図を示す。



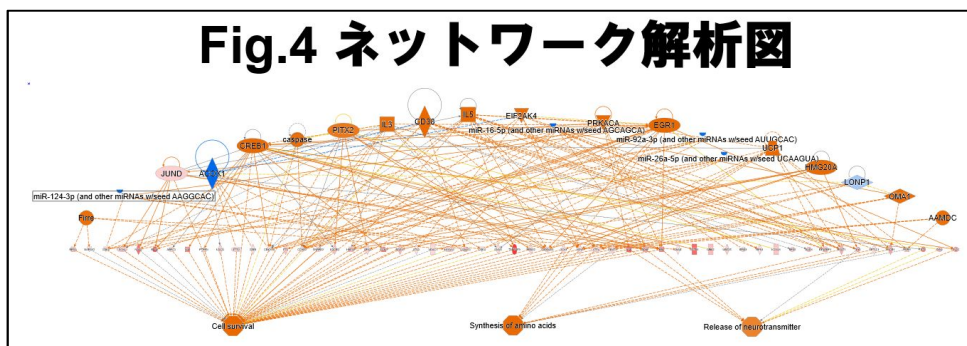
4 . 研究成果

RNA sequence 解析では、lactotroph PitNET 群と対照群である正常下垂体との間で異なる遺伝子発現パターンが明らかになった (Fig.2) 正常下垂体と比較し lactotroph PitNET において 1275 個の発現上昇遺伝子ならびに 2153 個の発現低下遺伝子が同定された (Fig.3)。



lactotroph PitNET で発現低下した遺伝子群は、単に正常下垂体組織におけるプロラクチン産生細胞以外の細胞群が存在しないことに起因する可能性を考慮し、本研究では発現上昇した遺伝子にのみ焦点を当てた。その中で、TPM (transcript per million: サンプル中に全転写産物が 100 万個存在するとき、各転写産物に何個あたりの転写産物が存在するのかを表す値) が 1 未満のものはサンプルノイズとみなし、1 以上の 1172 遺伝子を更なる解析対象とした。なお、上位 30 個の DEG の中には 9 個の長鎖間非コード RNA が含まれていた。

それら遺伝子について Integrity Pathway 解析を行った。パスウェイ解析では、エストロゲン受容体シグナル経路、酸化リン酸化シグナル経路、EIF シグナル経路の活性化が明らかになった。ネットワーク解析では、lactotroph PitNET に関与する上流遺伝子群として、EGR1 や CREB1 などの関与が示唆された (Fig.4)。



既報から lactotroph PitNET と合致する遺伝子についてはプロラクチン産生性ラット下垂体細胞株である GH3 細胞、MMQ 細胞を用い、その遺伝子が発現するタンパクを投与して細胞増殖能の変化やプロラクチン分泌能の変化を検討したが、本研究期間内においては新型コロナウイルス感染症の影響もあり実験試薬の調達に遅れが生じたこと等もあり、最適な実験条件を検討した段階で終了となった。よって、本研究の成果としては細胞株実験は含めず、遺伝子解析の結果を主軸に英文論文にまとめ、2023 年 5 月時点で国際的学術誌に投稿中の段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ozawa Mina, Hattori Yujiro, Higo Shimpei, Otsuka Mai, Matsumoto Keisuke, Ozawa Hitoshi, Ishii Hirota	4. 巻 55
2. 論文標題 Optimized Mouse-on-mouse Immunohistochemical Detection of Mouse ESR2 Proteins with PPZ0506 Monoclonal Antibody	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 159 ~ 168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.22-00043	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 Morishita Masahiro, Higo Shimpei, Hattori Yujiro, Ozawa Mina, Otsuka Mai, Matsumoto Keisuke, Ozawa Hitoshi, Ishii Hirota	4. 巻 in press
2. 論文標題 Immunohistochemistry for ESR2 with a mouse monoclonal antibody (PPZ0506)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2023_90-209	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 Hattori Yujiro, Ishii Hirota, Higo Shimpei, Otsuka Mai, Kanaya Moeko, Matsumoto Keisuke, Ozawa Mina, Ozawa Hitoshi	4. 巻 523
2. 論文標題 Optimization of immunohistochemical detection of rat ESR2 proteins with well-validated monoclonal antibody PPZ0506	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Endocrinology	6. 最初と最後の頁 111145 ~ 111145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mce.2020.111145	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 服部裕次郎, 石井寛高, 田原重志, 森田明夫, 小澤一史	4. 巻 97 suppl
2. 論文標題 非機能性下垂体腺腫におけるデジタルPCR法および免疫組織化学染色法を用いたエストロゲン受容体発現の定量解析	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本内分泌学会雑誌	6. 最初と最後の頁 101 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Hattori Yujiro, Ishii Hiroataka, Tahara Shigeyuki, Morita Akio, Ozawa Hitoshi	4. 巻 260
2. 論文標題 Accurate assessment of estrogen receptor profiles in non-functioning pituitary adenomas using RT-digital PCR and immunohistochemistry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 118416 ~ 118416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2020.118416	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 -

1. 著者名 Hattori Yujiro, Ishii Hiroataka, Tahara Shigeyuki, Morita Akio, Ozawa Hitoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 Quantitative expression data of human estrogen receptor variants in non-functioning pituitary adenomas obtained by reverse transcription-digital polymerase chain reaction analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data in Brief	6. 最初と最後の頁 106452 ~ 106452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.106452	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 服部裕次郎、石坂栄太郎、鈴木幸二、田原重志、森田明夫
2. 発表標題 内視鏡下経鼻的手術時の硬膜縫合用の安価な練習機作製の試み
3. 学会等名 第32回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部裕次郎、小澤実那、肥後心平、森下雅大、大塚真衣、松本恵介、小澤一史、石井寛高
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的モノクローナル抗体 (PPZ0506) を用いたラット及びマウスER タンパク質に対する免疫組織化学染色法の確立
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部裕次郎、石坂栄太郎、田原重志、鈴木幸二、寺本紳一郎、森田明夫
2. 発表標題 内視鏡下経鼻的手術における硬膜縫合のための安価かつ簡便な練習機の開発
3. 学会等名 第29回日本神経内視鏡学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部裕次郎、石井寛高、肥後心平、大塚真衣、金谷萌子、松本恵介、小澤実那、小澤一史
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的モノクローナル抗体 (PPZ0506) を用いたラットER タンパク質に対する免疫組織化学検出法の最適化
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小澤実那、服部裕次郎、石井寛高、肥後心平、大塚真衣、松本恵介、小澤一史
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的モノクローナル抗体 (PPZ0506) を用いたMouse-on-Mouse免疫組織化学染色法の確立とマウスER タンパク質の発現・局在解析
3. 学会等名 第62回日本組織細胞化学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小澤実那、服部裕次郎、石井寛高、肥後心平、大塚真衣、松本恵介、小澤一史
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的モノクローナル抗体 (PPZ0506) を用いたMouse-on-Mouse免疫組織化学染色法の確立とマウスER タンパク質の発現・局在解析
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井寛高、服部裕次郎、小澤一史
2. 発表標題 C末端欠損型ESR1アイソフォームの細胞内局在と構造 - 転写活性化連関
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部裕次郎、石坂栄太郎、鈴木幸二、田原重志、森田明夫
2. 発表標題 内視鏡下経鼻的手術時の硬膜縫合用の安価な練習機作製の試み
3. 学会等名 第32回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 服部裕次郎、石井寛高、肥後心平、大塚真衣、金谷萌子、松本恵介、呉立洋、小澤実那、小澤一史
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的モノクローナル抗体 (PPZ0506) を用いたラット組織に対する免疫組織化学的検出方法の最適化
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会,
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部裕次郎、石井寛高、田原重志、森田明夫、小澤一史
2. 発表標題 非機能性下垂体腺腫におけるデジタルPCR法および免疫組織化学染色法を用いたエストロゲン受容体発現の定量解析
3. 学会等名 第31回日本間脳下垂体腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 服部裕次郎、石井寛高、肥後心平、大塚真衣、金谷萌子、松本恵介、小澤実那、小澤一史
2. 発表標題 抗ヒトER 特異的抗体 (PPZ0506) を用いたラット組織に対する最適な免疫組織化学的検出法の検討
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yujiro Hattori, Hiroataka Ishii, Shimpei Higo, Mai Otsuka, Moeko Kanaya, Keisuke Matsumoto, Mina Ozawa, Hitoshi Ozawa
2. 発表標題 Optimized immunohistochemical detection of rat ESR2 proteins using the specific anti-ESR2 monoclonal antibody PPZ0506
3. 学会等名 The Endocrine Society's Annual Meeting, ENDO 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap研究者ページ https://researchmap.jp/yujiro
--

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