

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390414

研究課題名（和文） 下垂体腺腫における miRNA 発現と mRNA の制御に関する研究

研究課題名（英文） Function and distribution of of miRNA in pituitary adenoma

研究代表者

寺本明（TERAMOTO AKIRA）

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：50133070

研究成果の概要（和文）：

<諸言> 今回我々は下垂体腺腫細胞における PRL 発現に関与する miRNA の signal cascade を検討した。

<方法> 下垂体腺腫細胞 GH3 と rat normal pituitary cell (RPC) の mRNA と miRNA の発現プロファイリングを cDNA microarray で解析し、有意に負の相関のあるものの中から、PRL 産生に関与する遺伝子を選択した。それらの miRNA の 3'側非翻訳領域に相補的な塩基配列を構築して GH3 細胞の miRNA をノックダウンし、PRL 分泌変化を ELISA で定量し、同時にシグナル下流域を cDNA microarray で解析した。

<結果> RPC よりも GH3 で過剰発現していた miRNA のうち PRL に関しては、rno-miR-101b と-191, -194 の発現過剰がみられた。PRL 産生は rno-miR-101b のノックダウンした GH3 細胞にのみに PRL 分泌が有意に増加した。cDNA microarray でも PRL 産生に関するシグナルは有意に up-regulate していた。さらに今年度は rno-miR-101b を GH3 細胞に強制発現させたら PRL, PRL receptor は発現が低下していた。さらに 180 例の下垂体腺腫の手術サンプルでは in situ hybridization を行い発現量を検討したが、PRL 産生腫瘍に特異的に発現抑制をみた。この事実は我々が行った PRL 産生に関する rno-miR-101b の PRL 産生に果たす役割を示唆していた。

<結論> GH3 では RPC に比して種々の miRNA の発現変化がみられるが、このうち rno-miR-101 は PRL 発現を抑制する機能を有していると思われた。この miRNA に対する分子標的療法は将来の PRL 産生腫瘍に対する治療法として可能性が高いと思われた。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, we focused on signaling cascade via miRNA regulating prolactin (PRL) in pituitary adenoma cell. Profiling analysis comparing rat normal pituitary (RPC) and GH3, rat pituitary adenoma cell line, was examined to identify miRNA showing negative co-relation. Subsequently, each miRNA was knocked-down by targeting siRNA followed by ELISA study to evaluate PRL secretion. Furthermore, signaling cascade was analyzed by cDNA microarray analysis. Among miRNA significantly elevated in GH3 cells than RPC, we found rno-miR-101b, -191, and -194 were related to PRL secretion. Meanwhile, GH3 cells transfected of rno-miR-101b gene revealed reduced expression of PRL and its receptor. In conclusion, GH3 expressed different amount of miRNA and in particular, rno-miR-101 mediated PRL production. The miRNA can be a promising target for the treatment of pituitary adenoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000

年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

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、miRNA、シグナルカスケード、プロラクチン

### 1. 研究開始当初の背景

我々は以前より mRNA の機能を研究するに当たり、RNA 干渉 (RNAi) を行って来た。RNAi の中でも short interference RNA (siRNA) を人工的に作成して細胞に導入することで標的になる mRNA を干渉し、特定のタンパクへの翻訳を阻害することで起こる細胞内のシグナルカスケードの変化を cDNA microarray を通じて様々な解析を行った (文部科学省科学研究助成金 基盤研究 (B) (No. 17591536) 及び (C) (No. 20591726))。近年この人工的な siRNA と同じ機能を有する miRNA がヒトの細胞にも存在することが徐々に明らかとなった。

miRNA (micro-RNA) とは、細胞内に存在する長さ 20 から 25 塩基ほどの 1 本鎖 RNA をいい、他の遺伝子の発現を調節する機能を有すると考えられている ncRNA (ノンコーディング RNA: タンパク質への翻訳はされない) の一種である。これまで「RNA の安定化」として言われてきた現象は miRNA に起因するという議論も見受けられる。さらに発生、細胞死、造血などの種々の生物学的プロセスへの miRNA の関与が次第に報告され始めた (Nature, 435:828-838)。研究期間内に miRNA の内分泌学的な機能が明らかとなる。

下垂体腺腫における miRNA の発現も国内外を問わず発現を報告したものは一報しかない。ほかの腫瘍から敷衍した単一の 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趣旨であった。既知の miRNA 全体を網羅して検討して、その機能解析に踏み込んだ研究はまだなされていない。従って本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義としては、ホルモン分泌における miRNA 発現の機能解析に加えて 現在効果が極めて微弱な人工合成核酸でしか制御できない miRNA が siRNA で強力に制御できるようになれば、将来的な臨床応用の基礎研究になることが期待される。

### 2. 研究の目的

研究期間を通じて下垂体腺腫におけるホルモン異常分泌を引き起こす miRNA を発見し、正常なホルモン分泌を逸脱せしめる新たなシグナルカスケードを明らかにすることと、miRNA 発現の制御を我々が新し

く考案した miRNA を標的とする siRNA 法でコントロールし、ホルモン異常分泌を抑制可能にし、臨床応用へ向けての準備をすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

下垂体腺腫細胞 GH3 と rat normal pituitary cell (RPC) の mRNA と miRNA の発現プロファイリングを cDNA microarray で解析し、有意に負の相関のあるものの中から、PRL 産生に関与する遺伝子を選択した。それらの miRNA の 3' 側非翻訳領域に相補的な塩基配列を構築して GH3 細胞の miRNA をノックダウンし、PRL 分泌変化を ELISA で定量し、同時にシグナル下流域を cDNA microarray で解析した。

### 4. 研究成果

RPC よりも GH3 で過剰発現していた miRNA のうち PRL に関しては、rno-miR-101b と -191, -194 の発現過剰がみられた。PRL 産生は rno-miR-101b のノックダウンした GH3 細胞にのみ PRL 分泌が有意に増加した。cDNA microarray でも PRL 産生に関するシグナルは有意に up-regulate していた。さらに今年度は rno-miR-101b を GH3 細胞に強制発現させたら PRL, PRL receptor は発現が低下していた。さらに 180 例の下垂体腺腫の手術サンプルでは in situ hybridization を行い発現量を検討したが、PRL 産生腫瘍に特異的に発現抑制をみた。この事実は我々が行った PRL 産生に関する rno-miR-101b の PRL 産生に果たす役割を示唆していた。結果として GH3 では RPC に比して種々の miRNA の発現変化がみられるが、このうち rno-miR-101b は PRL 発現を抑制する機能を有していると思われた。この miRNA に対する分子標的療法は将来の PRL 産生腫瘍に対する治療法として可能性が高いと思われた。

### 5. 主な発表論文等

(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 11 件) 全て査読有

#### 1. Yoshida D, Teramoto A.

Digital imaging for statistical analysis of tissue microarrays. J. Nippon Med Sch 2011; 78(6) 338-339.

- Doi: 10.1272/jnms.78.338
2. Terao T, Mishina M, Takumi I, Komaba Y, Mizunari T, Kobayashi S, Yoshida D, Teramoto A. Early computed tomography signs as early predictors of hemorrhagic transformation under heparinization in patients with cardiogenic embolism. *Geriatr Gerontol Int*. 2011 Dec 23. doi: 10.1111/j.1447-0594.2011.00782.x.
  3. Nakae R, Yokota H, Yoshida D, Teramoto A. Transcranial Doppler ultrasonography for diagnosis of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: mean blood flow velocity ratio of the ipsilateral and contralateral middle cerebral arteries. *Neurosurgery*. 2011 Oct;69(4):876-83; doi: 10.1227/NEU.0b013e318222dc4c
  4. 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. Doi: 10.2176/nmc.51.108
  5. Yoshida D, Teramoto A. Digital imaging for statistical analysis of tissue microarrays. *J Nihon Med Sch*. 2011;78(6):338-9. PubMed PMID: 22197865. Doi: 10.1272/jnms.78.338
  6. Yoshida D, Koketsu K, Nomura R, Teramoto A. The CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses hypoxia-mediated growth hormone production in GH3 rat pituitary adenoma cells. *J Neurooncol*. 2010;100(1):51-64. DOI: 10.1007/s11060-010-0152-6
  7. 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):402-404. Doi: 10.2176/nmc.50.402
  8. Nomura R, Yoshida D, Kim K, Kobayashi S, Teramoto A. Intracerebral hemorrhage caused by a neoplastic aneurysm from pleomorphic lung carcinoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2009 Jan;49(1):33-6. Doi:10.2176/nmc.49.33
  9. Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. Signaling Pathway Mediated by CXCR7, an Alternative Chemokine Receptor for Stromal-Cell Derived Factor-1alpha, in AtT20 mouse ACTH-secreting pituitary adenoma cells. *J Neuroendocrinol*. 2009 21(5) . 481-485. doi: 10.1111/j.1365-2826.2009.01867.x
  10. Nomura R, Yoshida D, Teramoto A. Stromal cell-derived factor-1 expression in pituitary adenoma tissues and upregulation in hypoxia. *J Neurooncol*. 2009 Sep;94(2):173-181. DOI: 10.1007/s11060-009-9835-2
  11. Nomura R, Yoshida D, Kim K, Kobayashi S, Teramoto A. Intracerebral hemorrhage caused by a neoplastic aneurysm from pleomorphic lung carcinoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2009 Jan;49(1):33-6. Doi: 10.2176/nmc.49.33
- [学会発表] (計 7件)
1. Yoshida D, Koketsu K, Teramoto A. Alternative pathway by miRNA relating growth hormone synthesis in GH3, rat pituitary adenoma cells. 2011 Congress of neurological Surgeons Annual Meeting (2011. 10. 22 Washington DC, USA,)
  2. 吉田大蔵, 瀨瀬 健太, 寺本 明。下垂体腫瘍細胞 GH3 における成長ホルモン分泌を制御する miRNA を介した細胞内シグナルカスケードに関する分子生物学的研究。脳神経外科学会第 70 回学術総会 (2011. 10. 14、東京)
  3. 吉田大蔵, 瀨瀬健太, 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 (2010. 4、東京)
  4. 吉田大蔵, 瀨瀬 健太, 寺本 明。ラット下垂体腺腫細胞 GH3 における GH, PRL 産生に關与する miRNA の機能解析。第 20 回日本間脳下垂体腫瘍学会

(2010.2.19、西宮)

5. 吉田 大蔵、瀬瀬 健太、野村 竜太郎、石井 雄道、田原 重志、寺本 明。  
CXCR4 antagonist AMD3100 を用いた成長ホルモン産生腫瘍に対する分子標的療法の基礎的研究。日本脳神経外科学会 第 68 回学術総会 (2009 年 10 月 15 日、東京)
6. 吉田 大蔵、瀬瀬 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 6 月 5 日、高松)
7. 吉田 大蔵、瀬瀬 健太、野村 竜太郎、石井 雄道、田原 重志、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 2 月 27 日、東京)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寺本 明 (TERAMOTO AKIRA)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50133070

### (2) 研究分担者

吉田 大蔵 (YOSHIDA DAIZO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：30210701

金 景成 (KIM KYONSONG)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30339387

太組 一郎 (TAKUMI ICHIRO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60307923

山口 文雄 (YAMAGUCHI FUMIO)  
日本医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70267219