

## 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 5 月 25 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591180

研究課題名（和文） 癌抑制および癌促進の相反する作用を有するパラフィブロミンの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of parafibromin with activities of tumor suppressor and oncogene

研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO KATSUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90201863

研究成果の概要（和文）：

解析した家族性副甲状腺機能亢進症家系 3 家系のうち 1 家系に HRPT2 の胚細胞変異 (p.E29X) を認めた。HRPT2 遺伝子発現により U6 の発現が低下することを見いだした。U6 は RNA ポリメラーゼ III により転写され、mRNA のスプライシングに関与する small RNA で、種々の癌細胞で発現が上昇すること、細胞増殖を正に制御していることが報告されている。これらの結果から、U6 がパラフィブロミンの関わる細胞増殖制御機序の一端を担っている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found a germ-line mutation (p.E29X) of the HRPT2 gene in one of three familial hyperparathyroidism families. We found reduced expression of U6 by over-expression of the HRPT2 gene. U6 is a small non-coding RNA and transcribed by RNA polymerase III. U6 is involved in splicing of mRNA, over-expressed in many tumors, and positively regulates cell growth. These results suggested that U6 might play an important role of regulation of parafibromin-related cell growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内分泌学

キーワード：がん遺伝子、がん抑制遺伝子、副甲状腺腫瘍

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国の家族性副甲状腺機能亢進症家系における HRPT2 の胚細胞変異は 3 家系のみに検出されている。

(2) HRPT2 遺伝子産物であるパラフィブロミンの機能解析の研究では以下の報告がある

① 細胞増殖抑制能を有している。SV40 T antigen 存在下ではがん遺伝子として働

く。

② ヒト Paf1 複合体の構成蛋白質である。

③  $\beta$ -カテニンと相互作用し、Wnt シグナルを活性化する。

④ Hrpt2 欠失マウスは胎生致死を示す。同マウス由来の胚線維芽細胞では、パラフィブロミンは IGF1、IGF2、IGFBP4 などの成長因子の発現を正に制御している。

(3) パラフィブロミンと microRNA の関係、副甲状腺腺腫や癌における microRNA の関与については不明である。

## 2. 研究の目的

我が国における家族性副甲状腺機能亢進症家系における HRPT2 変異を解析し、「家族性副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群」の実態を明らかにする。また、がん抑制遺伝子およびがん遺伝子産物の性質を有するパラフィブロミンの機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 3家系の家族性副甲状腺機能亢進症家系の家系員について HRPT2 変異を解析する。白血球からゲノム DNA を抽出する。17 エクソンからなる HRPT2 遺伝子に対して、16組のプライマーセットを設定する。PCR 産物を用いて、direct sequencing 法にて塩基配列を ABI PRISM 3100 analyzer を用いて解析する。

(2) HEK293 細胞、293F 細胞あるいはヒト副甲状腺細胞株(sHPT-1)に HRPT2 cDNA を遺伝子導入した際の細胞増殖に及ぼす影響を検討する。細胞増殖は cell counting kit 8 を用いて測定する。

(3) HRPT2 cDNA の C 端側に FLAG タグを付加した HRPT2-FLAG あるいは HRPT2 mRNA を抑制するために HRPT2 siRNA を遺伝子導入した際の mRNA および microRNA の発現変化をマイクロアレイを用いて解析する。また、アレイで変化が認められた miRNA については real-time RT-PCR 法を用いて解析する。

(4) mRNA のスプライシングに関与する small RNA の U6 は、近年種々の癌細胞での発現上昇及び細胞増殖に与える影響が示唆されている。さらに U6 は RNA polymerase III により転写され、Rb、p53、BRCA1、PTEN 等の癌抑制蛋白質がその発現を制御することが報告されている。そこで、パラ

フィブロミンが RNA polymerase III による U6 の転写を調節するという仮説を立て、ルシフェラーゼアッセイによるパラフィブロミンの U6 発現変動を検討する。RNA polymerase III の転写複合体 (TFIIIB) の構成蛋白質とパラフィブロミンの相互作用について検討する。

## 4. 研究成果

(1) 家族性副甲状腺機能亢進症家系の家系員についての HRPT2 変異解析

① 第一家系。45 歳女性。22 歳時に副甲状腺機能亢進症にて手術（右葉 2 腺摘出術。経過観察中、高 Ca 血症及び iPTH 上昇を指摘された。22 歳上顎洞腫瘍（ossifying fibroma）手術。23 歳下顎腫瘍手術。36 歳多発子宮腫瘍手術。家族歴として妹：副甲状腺腫瘍摘出、顎腫瘍手術、子宮腫瘍手術。弟：副甲状腺腫瘍摘出術、顎腫瘍手術。左下腫大した副甲状腺（1393mg）を切除、摘出。典型的な HPT-JT の家系である。この症例に特徴的な点は一度副甲状腺腫瘍の手術を受けているが、23 年後に再発した点にある。このように遺伝性疾患では副甲状腺のいずれの腺においても腫瘍が発生する可能性がある。また上顎・下顎ともに腫瘍が生じているのも珍しい。HRPT2 の遺伝子検索では p.E29X を認めた。

② 第二家系。42 歳女性が原発性アルドステロン症・サブクリニカル Cushing 症候群と家族性副甲状腺機能亢進症を合併している。母親も副甲状腺機能亢進症である。母・娘とも顎腫瘍は認めない。HRPT2 の遺伝子変異を認めない。

③ 31 歳男性、急性膵炎発症の際、副甲状腺機能亢進症を指摘された。28 歳時に顎腫瘍（骨形成線維腫）の既往あり、家族歴では特記事項なし。左副甲状腺腫瘍摘出術を施行（病理組織は副甲状腺腺腫）。HRPT2 の遺伝子変異を認めない。

(2) パラフィブロミンの機能解析

① パラフィブロミンの増殖に及ぼす影響

sHPT-1 細胞に HRPT2-FLAG を遺伝子導入すると、細胞増殖を抑制することができた。HRPT2-FLAG 導入時に、CPEB1、cyclin B1、cyclin D1、c-myc、Paf1 mRNA の量には大きな変化を認めなかった。HRPT2 siRNA 導入時に、cyclin B1、cyclin D1、c-myc mRNA の量には大きな変化を認めなかったが、Paf1 complex の構成成分で

ある Paf1 mRNA の減少を認めた。

② パラフィブロミン強制発現時の mRNA および miRNA 発現の変化

293FT細胞に HRPT2 を導入した場合、mRNA アレイにおいて発現レベルが 2 倍以上増加したのは LOC100131796 (LP2570 gene)、ZNF847P で、2 倍以上低下したものはなかった。また HEK 細胞への遺伝子導入で 2 倍以上増加したのではなく、2 倍以上低下を示したのは BTBD11 (ankyrin repeat and BTB/POZ domain-containing protein) であった。このようにパラフィブロミン強制発現時の大きな発現量変化を示す遺伝子が少なかった。

miRNA のアレイ解析の結果では、HRPT2-FLAG の遺伝子導入により、2 種類 (miR-1539、let-7e\*)、低下していたものが 8 種類 (miR-34c-3p、miR-487b、miR-182\*、miR-339-3p、miR-574-3p、miR-32、miR-532-3p、miR-139-5p) であった。

miR-32 についてアレイの結果を real-time RT-PCR で確認したところ、miR-32 の変化は HRPT2 遺伝子導入によりほとんど認められなかったが、内部標準として用いた U6 が遺伝子導入により低下していることを見いだした。しかしながら、U6 における real-time RT-PCR の結果が安定しないので、U6 の転写活性レベルを検討するために、U6 プロモーター (300 bp) の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポーター遺伝子 (pGL4.10-U6) を構築した。positive control として Rb-FLAG 発現ベクターを用いた。sHPT1 細胞に HRPT2 発現ベクターと共発現させたところ、HRPT2 発現ベクター量依存的にルシフェラーゼ活性は低下した。この結果は、パラフィブロミンが RNA ポリメラーゼ III の転写にも関与すること、また U6 がパラフィブロミンの関わる細胞増殖制御機序の一端を担っている可能性が示唆された。

HRPT2-FLAG を導入した細胞において、細胞抽出液を抗 FLAG 抗体ビーズを用いて免疫沈降した。TFIIIB 構成成分である Brf1 および Brf2 の抗体を用いて western blotting を行った。Brf1 および Brf2 のシグナルを検出することができなかったので、使用している抗体が適切なものか検討を進めている。

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 8 件)

① Hirata Y, Iwata T, Le CTH, Jambaldorj B, Teshigawara K, Harada N, Sakaue H, Sakai T, Yoshimoto K, Nakaya Y: Vimentin binds IRAP and is involved in GLUT4 vesicle trafficking. *Biochem Biophys Res Commun.* 405(1):96-101, 2011, 査読あり, doi:10.1371/journal.pone.0033402.t001

② Igreja S, Chahal HS, King P, Bolger GB, Srirangalingam U, Guasti L, Chapple JP, Trivellin G, Gueorguiev M, Guegan K, Stals K, Khoo B, Kumar AV, Ellard S, Grossman AB, Korbonits M, Akker S, Atkinson B, Aylwin S, Baldeweg S, Bevan J, Cheetham T, Chew S, Choudry K, Clayton R, Damjanovic S, Darzy K, Dattani M, Davis J, Drake W, Dzeranova L, Edén B, Eguchi K, Fica S, Flanagan D, Frohman L, Gadelha M, Gallego P, Gláz E, Goldman J, Goldstone T, Howlett T, Inder W, Iwata T, Kaplan F, Karavitaki N, Laws E, Lechan R, Levy M, Matsuno A, Miljic D, Modenesi S, Molitch M, Musat M, Orme S, Patócs A, Popovic V, Powell M, Quinton R, Randeva H, Ribeiro de Oliveira JR A, Schöfl C, Soares B, Spada A, Strasburger C, Swords F, Tsagarakis St, Vaks V, Wass J, Widell H, Yarman S, Yoshimoto K: Characterization of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) mutations in familial isolated pituitary adenoma families. *Hum Mutat.* 31(8):950-960, 2010, 査読あり, DOI: 10.1002/humu.21292

③ Rahman MM, Qian ZR, Lu Wang E, Yoshimoto K, Nakasono M, Sultana R, Yoshida T, Hayashi T, Haba R, Ishida M, Okabe H, Sano T: DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b overexpression and clinical significance in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Hum Pathol.* 41(8):1069-1078, 2010, 査読あり, <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2010.01.011>

④ Wang EL, Qian ZR, Rahman MM, Yoshimoto K, Yamada S, Kudo E, Sano T: Increased expression of HMGA1 correlates with tumour invasiveness and proliferation in human pituitary adenomas. *Histopathology.* 56(4):501-509, 2010, 査読あり, DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03495.x

⑤ Hossain MG, Iwata T, Mizusawa N, Qian ZR, Shima SW, Okutsu T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K: Expression of p18(INK4C) is Down-regulated in Human Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol.* 20(2):114-121, 2009, 査読あり,

〔学会発表〕(計 30 件)

① 竹本潤哉、佐久間一基、京原麻由、滝口朋子、橋本直子、松澤陽子、齋藤淳、大村昌夫、吉本勝彦、山田正三、西川哲男: AIP 遺伝子変異を認めなかった家族性下垂体腺腫の一例 第 12 回日本内分泌学会関東甲信越支部学術集会 2012 年 3 月 23 日~24 日、ラフレさいたま (さいたま市)

② 藤本寛太、浜本芳之、河崎祐貴子、本庶祥子、森可南子、龍岡久登、山田正三、岩田武男、吉本勝彦、越山裕行: 家族性先端巨大症 2 家系における AIP 遺伝子の検討 第 21 回 臨床内分泌代謝 Update 2012 年 1 月 27 日~28 日、アクトシティ浜松 (浜松)

③ 安藤明彦、長坂昌一郎、齋藤芽里、山崎智行、高橋仁麗、野牛宏晃、大須賀淳一、水澤典子、吉本勝彦、石橋俊: 原発性アルドステロン症・サブクリニカル Cushing 症候群を合併した家族性副甲状腺機能亢進症の一例 第 39 回内分泌代謝研究会 2011 年 12 月 17 日、東京 UDX カンファレンス (東京)

④ 都島由希子、宮 章博、舛岡裕雄、藪田智範、福島光浩、友田 智哲、木原実、井上博之、東山卓也、高村勇貴、伊藤康弘、小林薫、吉本勝彦、廣川満良、宮内 昭: 再発を来した副甲状腺機能亢進症顎腫瘍症候群の一例、第 43 回日本甲状腺外科学会学術集会 2010 年 10 月 14 日~15 日 倉敷市民会館 (倉敷)

⑤ Katsuhiko Yoshimoto, Md. Golam Hossain, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Schadan Wan Nazatul Shima, Toru Okutsu, Kyoko Ishimoto, Zhi Rong Qian, Toshiaki Sano, Shozo Yamada: Down-regulated expression of p18INK4C in pituitary adenomas. 14th International Congress of Endocrinology, 2010 年 3 月 29 日 国立京都国際会館 (Kyoto)

⑥ ZR Qian, EL Wang, K Yoshimoto, S Yamada, T Sano: Characterization of estrogen receptor beta 1 in human pituitary adenomas 99th Annual Meeting of USCAP, 2010 年 3 月 20 日~26 日, Marriott Wardman Park Hotel (Washington, DC)

⑦ ZR Qian, T Tanahashi, K Yoshimoto, S Yamada, S Katsuura, EL Wang, K Rokutan, T Sano: MicroRNA Expression Abnormalities in Pituitary Adenomas Are Associated with Distinctive Pathologic Features and May

Contribute to Tumorigenesis. 99th Annual Meeting of USCAP 2010 年 3 月 22 日, Marriott Wardman Park Hotel (Washington, DC)

⑧ 錢志榮, 王路, 吉本勝彦, 山田正三, 佐野壽昭: 下垂体性腺腫の ER  $\beta$ 1, 2 の発現と DNA の hypermethylation および機能分析について、第 20 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2010 年 2 月 19 日~21 日、兵庫医科大学平成記念会館 (武庫川)

⑨ Qian Zhi Rong, Tanahashi Toshihito, Yoshimoto Katsuhiko, Yamada Shozo, Katsuura Sakurako, Rokutan Kazuhito, Sano Toshiaki : MicroRNA Expression Abnormalities in Pituitary Adenomas are Associated with Distinctive Pathologic Features and May Contribute to Tumorigenesis, 第 55 回日本病理学会秋期特別総会 2009 年 11 月 19 日~20 日、九段会館 (東京)

⑩ Qian Zhi Rong, Tanahashi Toshihito, Yoshimoto Katsuhiko, Yamada Shozo, Katsuura Sakurako, Rokutan Kazuhito, Sano Toshiaki: MicroRNA expression abnormalities in pituitary adenomas are associated with distinctive pathologic features and may contribute to tumorigenesis, 第 13 回日本内分泌病理学会学術総会 2009 年 10 月 24 日~25 日、山梨大学 (甲府)

⑪ 王路, 錢志榮, ラハマン・ムスタフイズル, 吉本勝彦, 山田正三, 工藤英治, 佐野壽昭: Overexpression of HMGA1 correlates with tumor invasiveness and proliferation in pituitary adenomas, 第 98 回日本病理学会年総会 2009 年 5 月 1 日~3 日、国立京都国際会館 (京都)

⑫ 錢志榮, 王路, ラハマン・ムスタフイズル, 吉本勝彦, 山田正三, 工藤英治, 佐野壽昭: Tumor-specific down-regulation of ER- $\beta$ 1 and ER- $\beta$ 2 in Human Pituitary Adenomas, 第 98 回日本病理学会年総会 2009 年 5 月 1 日~3 日、国立京都国際会館 (京都)

⑬ 吉本勝彦: メインシンポジウム 3 下垂体腺腫: 最近の展開 2. 家族性成長ホルモン産生腺腫, 第 82 回日本内分泌学会学術総会 2009 年 4 月 21 日~25 日、群馬県民会館 (前橋)

〔図書〕(計 4 件)

① 佐野壽昭, 吉本勝彦, 下垂体腺腫の分子病理学 p.72-77 下垂体腫瘍のすべて 編集: 寺本明、長村義之 医学書院 2009 年

10月

② 吉本勝彦、多発性内分泌腫瘍症1型など  
p. 276-280 下垂体腫瘍のすべて 編集:寺本  
明、長村義之 医学書院 2009年10月

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.tokushima-u.ac.jp/yakuri/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO KATSUHIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号: 90201863

### (2) 研究分担者

岩田 武男 (IWATA TAKEO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 10350399

水澤 典子 (MIZUSAWA NORIKO)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教  
研究者番号: 80254746