

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 25 日現在

機関番号：32666

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659697

研究課題名（和文） 下垂体腺腫における miRNA の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis 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> micro-RNA (miRNA) 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、non-coding RNA (ncRNA) の一種である。最近様々な遺伝子発現の調節機能について報告があるが、下垂体腺腫におけるホルモン関連遺伝子に関しては未だ少ない。今回我々は下垂体腺腫細胞における GH と PRL 発現に関与する miRNA の signal cascade を検討したので報告する。

<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、GH、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、GH、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、GH 産生に関して相補的な mRNA と一致したものはなく、むしろ rno-miR-494 と -146a が発現低下をして mRNA と負の相関をしていた。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。

<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-101b は PRL 発現を抑制する機能を有していると思われた。

研究成果の概要（英文）：

Micro-RNA (miRNA) is belonged to non-coding RNA, which is single-stranded RNA ranging 20 to 25 bases. Recent studies have disclosed its molecular function in gene expression, however, the regulation on genes regarding hormonal regulation in pituitary adenoma has been little discussed. In this study, we highlighted on signaling cascades that regulate GH or PRL by several miRNAs.

Firstly, profiling of mRNA and miRNA in rat pituitary adenoma cells, GH3 was analyzed comparing rat normal pituitary (RPC) as the control and followed by selection of the negative correlation of mRNA and miRNA among those regulate GH or PRL expression. Subsequently, complimentary sequence for the mi-RNA was transfected aiming to knock-down and secretion of GH or PRL was evaluated with ELISA study. Microarray analysis was finally performed to analyze signal cascades.

In miRNA that over-expressed more than RPC, none of miRNA had no negative correlation with GH-related mRNA. Meanwhile, rno-miR-494, -146a were expressed decreasingly and had negative correlation with mRNA. Separately, rno-miR-101b, -191, and -194, closely relating to PRL expression, were over-expressed. In knock-down cells with those complimentary sequences, PRL secretion was elevated by rno-miR-101b-knock down GH3 cells. Also in cDNA microarray analysis, GH3 cells up-regulated PRL-production-related signals

after knock-down of rno-miR-101b.

In conclusion, rno-miR-101b is a miRNA regulating PRL production.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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, mRNA, GH, PRL

1. 研究開始当初の背景

micro-RNA (miRNA) 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、non-coding RNA (ncRNA) の一種である。その機能とは遺伝子発現の抑制であることが知られている。最近様々な遺伝子発現の調節機能について報告があるが、下垂体腺腫におけるホルモン関連遺伝子に関しては未だ少ない。

下垂体腺腫においても幾つかの miRNA の存在が報告されてはいるが、正常下垂体組織と同等か、いかなる機序で下垂体腫瘍組織がホルモン分泌異常を起こすにいたったかという観点からの取り組みは残念ながらされてはいない。下垂体腺腫の全身に及ぼす影響とは下垂体ホルモンの異常分泌か分泌低下による機能低下症によるものである。この異常なホルモン分泌を制御する miRNA を各下垂体ホルモンごとに個別に特定し、mRNA の翻訳阻害、または mRNA の分解を起こす機序、さらには分泌異常に関わるシグナルカスケードを明らかにする。

当該分野における本研究の学術的な特色・独創的な点を述べる。

miRNA の元になる DNA 配列は miRNA より長く、miRNA の配列と、それにほぼ相補的な逆向きの配列とを含む。この DNA 配列が 1 本鎖 RNA に転写されると、miRNA 配列とその逆相補配列は相補的に結合して 2 本鎖になり、全体としてはヘアピンループ構造 (tRNA に似た形) をとる。これを primary miRNA (pri-miRNA) という。通常、ヘアピンループ構造をとる部分以外にも mismatches が含まれており、スターフォームとよばれる。核内にある Drosha と呼ばれる酵素がこの pri-miRNA 分子の一部を切断して pre-miRNA (miRNA の直接の前駆体) を作る。次いで pre-miRNA 分子は Exportin-5 と呼ばれるキャリアタンパク質によって核外に輸送され、これからダイサー (Dicer: RNAi を参照) により 20-25 塩基の miRNA 配列が切り出される (植物では pri-miRNA が直接ダイサーによって処理される) ことに我々は着目した。

2. 研究の目的

miRNA の機能は遺伝子発現の抑制にあると思われる。miRNA は一部の mRNA (大抵は 3' 側非翻訳領域) に相補的な配列を有する。この mRNA と miRNA との結合により、翻訳が阻害される場合 (下述の stRNA)、また RNAi のように mRNA の分解を引き起こす場合があると考えられている。

この miRNA の効果は 1993 年に R. C. Lee らによって *C. elegans* で初めて発見された (これは small temporal RNA = stRNA と呼ばれた)。その後 miRNA はいろいろな植物 (シロイヌナズナなど) や動物 (*C. elegans* やヒトなど) で確認されている (Baulcombe 2002)。細菌にも、mRNA に結合して mRNA 量や翻訳を調節する似たような遺伝子が発見されているが、ダイサーは関与しないので、一般には miRNA とは考えられていない。

miRNA の語はサイエンスの 3 報の論文 (2001 年) で提唱された。

植物では類似の RNA である short-interfering RNA (siRNA) がウイルス RNA の転写を阻止する機能を有し、また一部は細胞自身の遺伝子の調節にも関わっている。siRNA は 2 本鎖であるが、ヘアピンループ構造を有し、作用機構は miRNA に近いと思われる。miRNA の活性は、実験的には人工合成核酸であるモルホリノアンチセンスオリゴを用いて阻害できるとされている。

一般的に腫瘍における miRNA の研究は端緒にすぎたばかりで、miRNA の発現分布、正常組織との発現差としての研究が主流であるが、下垂体腺腫においても miR-7 をはじめとした幾つかの miRNA の発現が正常組織と比較して多いという報告が散見されるが、しかしながら何れの miRNA も下垂体ホルモン分泌とは無関係の腫瘍細胞の成長因子と関連がある mRNA を抑制するのであり、他の悪性脳腫瘍でも報告がされている。したがって下垂体腫瘍が全身に及ぼす異常な下垂体ホルモン分泌とは無関係であることが指摘されてはいるが、未だに研究はなされては無く、本研究を

通じて腫瘍学、或いは内分泌学としての新しい学問体系の樹立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) miRNA-microarray をもちいた miRNA の発現解析

ヒト下垂体腺腫細胞 HP-75、同じくマウス細胞 AtT-20、ラット細胞 GH3 の miRNA を抽出して miRNA-microarray を行う。microarray の probe には 723 の既に報告された miRNA の配列に基づいて網羅的に用意されている。

(2) real-time miRNA-PCR

実際の手術症例での上記で候補に挙げた miRNA の発現を手術サンプルで定量解析を行う。申請者の施設では年間 100—150 手術例があり、年齢、腫瘍 subtype、腫瘍浸潤などの多彩な parameter を用いた多変解析が可能である。実際には、今回申請した統計解析システム(GraphPad Prism, ver. 5)で多項ロジスティック回帰を行う(吉田、寺本による)。この多変量解析においては、腫瘍サイズ、腫瘍浸潤の grading に寄与する項目の統計学的有意差、寄与度検定も検定可能である。患者さんの同意は文書を作成し、説明する。

on-line database を用いた標的 mRNA の検索
(3) 上記で候補に挙げた miRNA の配列を基に on-line database である Pub&Med NCBI を通じて相補的な sequence のある mRNA を検索する。

4. 研究成果

RPC よりも GH3 で過剰発現していた miRNA のうち、GH 産生に関して相補的な mRNA と一致したものはなく、むしろ rno-miR-494 と-146a が発現低下をして mRNA と負の相関をしていた。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。

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 12 件)

1. Yoshida D, Kim K, Takumi I, Yamaguchi F, Teramoto A. (2013) A transfection method for short interference RNA with the lipid-like self-assembling nanotube, A6K. Medical Molecular Morphology (in press)
2. Adachi K, Yoshimura A, Aso R, Miyashita T, Yoshida D, Teramoto A, Shimura T. Clinical clerkship

course for medical students on lumbar puncture usingsimulators. J Nippon Med Sch. 2012;79(6):430-437.

3. 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. 2012 Jul;12(3):418-424.
4. Yoshida D, Teramoto A. (2011) Digital imaging for statistical analysis of tissue microarrays. J Nihon Med Sch. 78(6):338-339.
5. Nakae R, Yokota H, Yoshida D, Teramoto A. (2011) 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. 69(4):876-883.
6. Kim K, Isu T, Sugawara A, Matsumoto R, Isobe M, Morimoto D, Mishina M, Kobayashi S, Yoshida D, Teramoto A. (2011) Selective posterior decompression of the cervical spine. Neurol Med Chir (Tokyo). 51(2):108-112.
7. Yoshida D, Koketshu K, Nomura R, Teramoto A. (2010) The CXCR4 antagonist AMD3100 suppresses hypoxia-mediated growth hormone production in GH3 rat pituitary adenoma cells. J Neurooncol. 100(1):51-64.
8. Kim K, Katsuno M, Isu T, Mishina M, Yoshida D, Kobayashi S, Teramoto A. (2010) Concomitant cranial and lumbar subdural hematomas -case report-. Neurol Med Chir (Tokyo). 50(5):402-404.

9. Nomura R, Yoshida D, Kim K, Kobayashi S, Teramoto A. (2009) Intracerebral hemorrhage caused by a neoplastic aneurysm from pleomorphic lung carcinoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 49(1):33-36.
10. Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. (2009) 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*. 21(5) : 481-485.
11. Nomura R, Yoshida D, Teramoto A. (2009) Stromal cell-derived factor-1 expression in pituitary adenoma tissues and upregulation in hypoxia. *J Neurooncol*. 94(2):173-181.
12. Nomura R, Yoshida D, Kim K, Kobayashi S, Teramoto A. (2009) Intracerebral hemorrhage caused by a neoplastic aneurysm from pleomorphic lung carcinoma. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 49(1):33-36.

[学会発表] (計 5 件)

1. Yoshida D, Koketsu K, Teramoto A. Alternative pathway by miRNA relating growth hormone synthesis in GH3, rat pituitary adenoma cells. 2011 Annual Meeting of Congress of Neurosurgical Society (Washington, DC, USA). 2011.
2. Yoshida D, Koketsu 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.
3. Koketsu K, Yoshida D, Teramoto A. Suppression of Growth Hormone Production by Inhibin, antagonist for CXCR4, a Receptor for Stromal Cell-derived Factor -1. Annual Meeting of the Congress of Neurological Surgeons (New Orleans, USA). 2009.
4. Yoshida D, Koketsu K, Teramoto A.

novel transfection method for short interference RNA with lipid-like self-assembling nanotube, A6K. Annual Meeting of The Congress of Neurological Surgeons (New Orleans, USA). 2009.

5. Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. Signaling pathway by SDF-1/CXCR4 in pituitary adenoma. Annual Meeting of American Association of Neurological Surgeons (Chicago, USA). 2008.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

トランスフェクション剤

出願番号：特願 2010-526725

国際出願番号：PCT/JP2009/064814 (2009年8月26日)

優先権主張番号：特願 2008-217958 (2008年8月27日)

国際公開番号：WO2010/024262 (2010年3月4日)

出願人：株式会社スリー・ディー・マトリックス、学校法人日本医科大学

発明者：吉田 大蔵、武井 次郎

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：20591726

山口文雄 (YAMAGUCHI FUMIO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：70267219

太組一朗 (TAKUMI ICHIRO)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：60307923

金景成 (KIM KYONSONG)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30339387