

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462276

研究課題名(和文)下垂体腺腫に存在するSOX2陽性細胞の内分泌学的機能解析

研究課題名(英文)Endocrinological analysis of SOX2 positive cells in pituitary adenoma

研究代表者

湯之上 俊二(Yunoue, Shunji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20404478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：下垂体の発生にSOX2は重要な役割を果たす転写因子であることが最近分かってきたが、下垂体腺腫にもSOX2陽性細胞が存在し、腺腫の内分泌学的発現形に関わっているのではないかと仮説の下、研究を開始した。

下垂体腺腫にSOX2陽性細胞が存在することが分かった。次に下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞はホルモン産生腺腫により多く観察されたが、ホルモン産生能がないことが判明した。また、SOX2陽性細胞の一部は濾胞星状細胞とも考えられた。

SOX2陽性細胞は下垂体腺腫の維持のためや内分泌能をもつ細胞の前駆状態として存在しているのではないかと考えられた。この仮説を証明するため今後も解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：Recent study revealed that SOX2 protein was transcriptional factor that contributed a development of pituitary gland. Therefore, we speculated that SOX2 positive cells play an important role in endocrinologic phenotypes of pituitary adenoma.

In this study, we show that the pituitary adenoma contains a small population of SOX2 positive cells that, is preferentially present in functioning adenoma. But, SOX2 positive cell is not hormone producing cells.

We hypothesized that SOX2 positive cells in pituitary adenoma also maintain the tumor, that these cell is present as a reserve of hormone producing cells or folliculostellate cells. To elucidate the role of SOX2 positive cells in pituitary adenoma, further study is necessary.

研究分野：脳神経外科、分子生物学

キーワード：下垂体腺腫 SOX2

1. 研究開始当初の背景

Sox2 は Sox (SRY-related HMG box) 遺伝子ファミリーに属し、DNA 結合能を持つ HMG ドメインと転写活性化ドメインから成る転写因子である。マウスにおけるその発現は生殖細胞をはじめ、初期胚で神経系の幹細胞や前駆細胞にみられ、その機能の未分化性への関与を強く示唆することが知られていた。以前から SOX2 遺伝子の欠失変異では bilateral anophthalmia/microphthalmia などが発生することが知られ特に中枢神経系器官の発生にも大きく関与することが示されていた。その様な背景の中で2006年にはSOX2 遺伝子の変異により下垂体の低形成が誘導されるという研究成果が発表され下垂体の発生にも大きく関与している遺伝子であることが知られるようになってきた (Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. Kelberman et al., J Clin Invest. 2006 Sep;116(9):2442-55.)。2008年には胎生期マウスの下垂体発生におけるSOX2 陽性細胞の存在とその機能報告がなされたが、この報告の中で、胎生期のSOX2 陽性細胞は増殖活性が高く器官形成に関与しているが、生後は、SOX2 同様(SRY-related HMG box) 遺伝子ファミリーに属する転写因子であるSOX9を発現するようになるという。このSOX2+/SOX9+細胞は多分化能を有し、その他の転写因子の制御の下、各種の下垂体ホルモンを産生するために存在するという報告がなされた (SOX2-expressing progenitor cells generate all of the major cell types in the adult mouse pituitary gland., Fauquier T, Rizzoti K, Dattani M, Lovell-Badge R, Robinson IC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 26;105(8):2907-12.)。

さて、われわれは以前から悪性神経膠腫における Tumorigenesis に関与する腫瘍幹細胞として知られている CD133 陽性細胞に関する研究を行いつつ、同時に下垂体腺腫に存在する幹細胞様細胞を同定し報告してきた。悪性神経膠腫より抽出した CD133 陽性細胞から樹立した細胞は sonic hedgehog シグナルによって遊走能が亢進するという知見を見出し報告した (Role of sonic hedgehog signaling in migration of cell lines established from CD133-positive malignant glioma cells. Uchida H, Arita K, Yunoue S, Yonezawa H, Shinsato Y, Kawano H, Hirano H, Hanaya R, Tokimura H. J Neurooncol. 2011, Sep;104(3):697-704)。ほぼそれと同時期に CD133 陽性細胞が下垂体腺腫に存在することを腫瘍の免疫染色によって突き止め、その存在意義は下垂体腺腫の血管新生に関与する細胞集団であることを見出し Neuroendocrinology 誌に発表した (Identification of CD133+ cells in pituitary adenomas., Yunoue S, Arita K, Kawano H, Uchida H, Tokimura H, Hirano H., Neuroendocrinology. 2011;94(4):302-12.)。当初われわれは悪性神経膠腫における CD133 陽性細胞のように下垂体腺腫における CD133 陽性細胞も Tumorigenesis に関与しているのではないかと仮説を立てていた。しかしながら下垂体腺腫に存在する CD133 陽性細胞は angiogenesis に関与する細胞集団であった。そこで我々は CD133 陽性細胞以外の細胞集団が内分泌学的に多様性のある下垂体腺腫というユニークな腫瘍発生に関与しているのではないかと考えた。今回、SOX2 陽性細胞が下垂体の発生初期に大きく関与していることをに着目し、下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞についての研究をすでに開始している。下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞の報告はこれまでになかったが、我々は下垂体腺腫に SOX2 陽性細胞が存在していることを

見出し報告してきた(図1)。正常の成人の下垂体において SOX2 の陽性率は 0.05%程度と知られているが下垂体腺腫に SOX2 陽性細胞があった場合には SOX2 の陽性率はその 10 倍以上であった。さらに非機能性下垂体腺腫(19%)よりもホルモン分泌能を有する機能性下垂体腺腫のほうに発現を認めやすい傾向があった(53%)。また、SOX2 陽性症例群と陰性症例群の比較において、腫瘍の増大に関する指標として用いられる Ki67LI は双方とも有意な違いは認めなかった。これらの結果より下垂体腺腫に存在している SOX2 陽性細胞は下垂体腺腫の腫瘍増大にかかわる細胞集団ではなく、内分泌学的発現形に関わっている可能性が示唆された。この推論を支持する所見を見出すために、下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞が、下垂体発生初期段階で見られるような多分化能を有する SOX2+/SOX9+ として存在しているのか、それとも細胞増殖活性の高い SOX2+/SOX9- として存在しているかを解析した。その結果、下垂体腺腫に存在する SOX2 陽性細胞は SOX9 を発現している細胞であった。このことからわれわれの仮説である下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞は腫瘍増大に関わるというよりも内分泌学的発現形に関わる細胞集団であるということがさらに言えるということとなった。さらにわれわれは興味あることに SOX2 陽性細胞は成長ホルモン、プロラクチン、副腎皮質刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、ゴナドトロピンを産生しないホルモン非産生細胞であることを見出した(図3)。するとここで、下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞は内分泌学的発現形に関わる細胞集団であるという仮説と矛盾する結果が得られたこととなった。しかしながら、SOX2 陽性細胞が多分化能を有したまま、未分化な状態で存在しているのみであり、内分泌機能を獲得した段階では SOX2 が脱落してくるという推論も成り立つ。すなわち、SOX2 陽性細胞は下垂体腺腫においてホ

ルモン産生細胞への前駆細胞としての意義を有しているのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

下垂体腺腫は内分泌学的表現形の多様性を持っているが、その発生にかかわるメカニズムについては不明な点が多い。下垂体が個体において発生し、その後、各種のホルモンを分泌するための転写因子が下垂体腺腫においても同様に機能することで下垂体腺腫における内分泌学的表現形の違いが生じるとする説が現在のところ主流であるといえる。下垂体の発生には今日、SOX2 陽性細胞として存在する幹細胞が深く関与していることが知られるようになってきた。本研究では下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞の存在意義を解明するが、下垂体腺腫における内分泌学的発現形の違いに SOX2 陽性細胞の分化が関与しているのかどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

患者下垂体腺腫の免疫染色し、免疫染色(光学的顕微鏡使用下の ABC(Avidin-biotin complex)法)の情報をデータベース化する。

下垂体腺腫に存在する SOX2 陽性細胞が各内分泌学的発現形を誘導するような転写因子を発現しているかどうかを解析する。具体的には、下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞も下垂体と同様に各転写因子によって、分化しているのかどうかをまずは免疫染色にて解析する。患者下垂体腺腫組織の蛍光多重免疫染色を SOX2 抗体を基本とし以下の転写因子について解析する。

下垂体腺腫組織より無血清培地(Sphere法)による subpopulation(pituisphere)の抽出

下垂体腺腫由来の pituisphere の機能解析
蛍光多重免疫染色によって pituisphere にお

ける SOX2 陽性細胞の確認を行ない、SOX2 陽性細胞が上記転写因子 (Prop-1, Pit-1, GATA-2, T-Pit, POMC, SF-1) を発現しているかどうかを解析する。

4 . 研究成果

各下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞の検出率

	Positive	Negative
No (%) n=105	39 (37.1)	66
age	50.8	51.2
Ki-67 LI	1.26	1.81
Subtype		
NF	8 (19.0)	34
GH	20 (52.6)	18
PRL	7 (43.7)	9
ACTH	2 (40.0)	3
TSH	2 (50.0)	2

表 1. 各下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞の検出率

SOX2 陽性細胞は機能性下垂体腺腫により多くみられる傾向があったが、非機能性下垂体腺腫には見られないということはなかった。

NF; 非機能性腺腫

GH; 成長ホルモン産生腺腫

PRL; プロラクチン産生腺腫

ACTH; 副腎皮質刺激ホルモン産生腺腫

TSH; 甲状腺刺激ホルモン産生腺腫

下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞 (免疫組織学的解析)

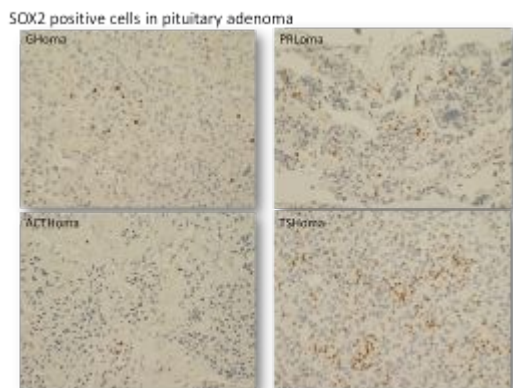


図 1. 下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞

下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞は免疫組織学的に明らかであり、SOX2 蛋白質の細胞内局在は核である。

悪性下垂体腺腫に SOX2 陽性細胞が存在するかの検討

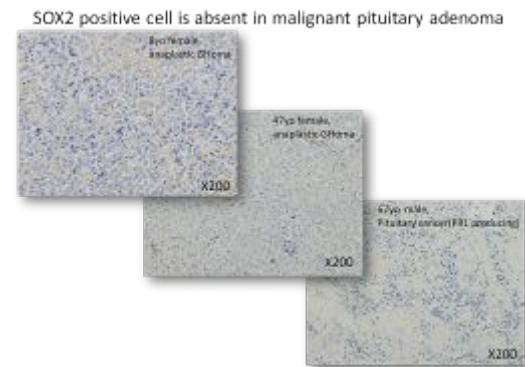


図 2. 悪性下垂体腺腫に SOX2 陽性細胞は存在しない

悪性下垂体腺腫において、SOX2 陽性細胞がより多く存在するのではないかと (悪性グリオーマでは SOX2 陽性細胞と悪性度の相関性が報告されている) という仮説のもとに 3 例の悪性下垂体腺腫で組織染色したがいずれにも SOX2 陽性細胞は見いだせなかった。

下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞は内分泌能を有するか? の検討

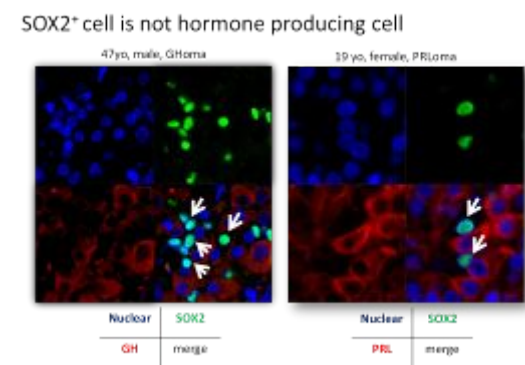


図 3. 下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞は内分泌能を有しない

下垂体腺腫における SOX2 陽性細胞と各ホルモンを二重染色したところ、ホルモン産生し

ていないことが見出された。図3は成長ホルモン（GH）産生腺腫におけるGH（左）とプロラクチン（PRL）産生腺腫におけるPRL（右）をSOX2とともに二重染色したところ、いずれでも、SOX2陽性細胞はホルモン産生がないことが分かった。

尚、その他の甲状腺刺激ホルモン産生腺腫、副腎皮質産生腺腫、非機能性下垂体腺腫でも同様の実験を行ったが、やはり、SOX2陽性細胞はホルモン産生を行っていないことが分かった。

下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞は支持細胞である濾胞星状細胞であるのではという仮説の下、同細胞のマーカであるS100蛋白質の抗体を使用し、SOX2との二重染色を行った。その結果、一部のSOX2陽性細胞は共染が見られた。

Most of S100β⁺ cells express SOX2, but all SOX2 cells express S100β.

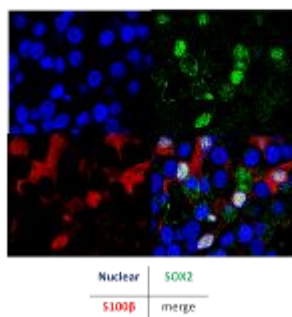


図4.下垂体腺腫におけるSOX2陽性細胞の一部はS100蛋白質との共染が見られる

下垂体腺腫をcell dissociationし条件培養液で初代培養しpituisphereを作成し、下垂体における内分泌的分化に影響する転写因子との多重染色を試みたが、信頼可能な結果が得られず、現在でも実験を進行中である。進捗状況がおくれている原因としては、対象となるものが、両者とも核内蛋白質であり、蛋白質の極性の違いが出やすく、その為に染色条件が画一的なものではないためではないかと推測している。

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）

〔学会発表〕(計 1件)

湯之上俊二、下垂体腺腫に存在するSOX2陽性細胞の存在意義に関する研究、第23回間脳下垂体腫瘍学会、2013年3月15日、鹿児島市

6. 研究組織

(1)研究代表者

湯之上俊二 (Yunoue Shunji)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20404478

(2)研究分担者

有田和徳 (Arita Kazunori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90212646

平野宏文 (Hirano Hirofumi)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：00264416

高野 幸路 (Takano Kouji)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：20236243

大吉 達樹 (OYOSHI, Tatsuki)

鹿児島大学・医歯学域医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：80315407