

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462279

研究課題名(和文)下垂体腺腫におけるGremlinの発現と細胞内シグナルの解析に関する研究

研究課題名(英文)Gremlin in pituitary adenoma neoangiogenesis

研究代表者

吉田 大蔵 (Yoshida, Daizo)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30210701

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)：目的；下垂体腫瘍におけるGremlinの意義について検討する。
方法及び結果；Gremlinの組織での発現とpositive controlとしてのbeta-actinとの発現対比率を蛍光免疫染色から解析し、検討した。別にendothelial progenitor cellに特異的な抗原CD133も同様にmicroarrayを染色した多重相関の解析においては、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った。ここにおいてCD34、CD133とのco-localizationを解析してその相関性を実証した。

研究成果の概要(英文)：Expression of Gremlin and CD34 was performed in pituitary adenoma tissues obtained during transsphenoidal surgery in 45 cases (7 PRLoma, 17 GHoma, 17, 2 ACTHoma, 2 TSHoma). CD34-positive vessels coexisted with Gremlin ($p<0.005$, $r^2=0.8589$), and Gremlin and CD34 colocalized significantly (mean=0.690). Gremlin and microvascular density (MVD) were detected by double-immunofluorescence microscopy in CD34-positive vessels from tissue microarray analysis of 60 cases of pituitary adenomas (6 PRLoma, 23 GHoma, 22 NFoma, 5 ACTHoma, and 4 TSHoma). MVD was significantly correlated with an increased Gremlin level (linear regression: $p<0.005$ $r^2=0.4958$). In contrast, Gremlin expression showed no correlation with tumor subtype or Knosp score. The high level of expression of Gremlin in pituitary adenoma tissue with many CD34-positive vessels and the strong coherence of these regions indicate that Gremlin is associated with angiogenesis in pituitary adenoma cells.

研究分野：下垂体腫瘍 脳腫瘍 分子シグナル

キーワード：Gremlin 下垂体腫瘍 tumor angiogenesis signal transduction

1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫の病態の一つに、下垂体卒中と呼ばれる腫瘍内出血で発症する様々な症状が知られている。画像上では出血性梗塞が疑われるものの、その機序については新生血管の脆弱性が考えられているものの、未だに定見を見ない。従来、腫瘍組織の血管新生とは腫瘍細胞が分泌する PDGF や VEGF といった HIF に encode される angiogenic factor が、低酸素状態に曝されている腫瘍局所で分泌され、周辺の内皮細胞を刺激して細胞の遊走や増殖を起こし、いわゆる tube formation を誘導することで新生血管を構築するという議論が盛んになされていた (Brem, 2004)。しかし申請者らは、下垂体腺腫細胞で HIF が低酸素刺激で発現が増加するにも関わらず、VEGF の発現増加は見られず、組織の免疫染色においても HIF と VEGF の co-localization は見られなかった点を報告した (金, 2005)。従って下垂体腺腫の血管新生は VEGF 以外のメカニズムを介している可能性があると思われた。一方低酸素組織に特異的に取り込まれる FMISO を用いた PET scan では脳梗塞の組織と同様に大きな下垂体腺腫ほど FMISO が取り込まれることを 2006 年に Jensen らが報告し、下垂体腺腫組織が低酸素状態に陥っていることが臨床研究で明らかにされている。しかし分子レベルでの低酸素および HIF によって引き起こされる signal の検討は申請者以外にはなされていない。我々は腫瘍細胞に SDF-1 が発現することで endothelial progenitor cell を誘導することで血管新生を惹起させるという研究 (Liau, 2007) に着目した。

申請期間内での研究の概要

我々は下垂体腺腫の血管新生の機序のひとつとして、下垂体腺腫細胞が分泌する stem cell-derived factor (SDF)-1 に着目した。この chemokine により骨髄で産生される endothelial progenitor cell を腫瘍局所に誘導し (homing effect)、下垂体腺腫の血管新生を促進する事と、さらに種々の SDF-1 の receptor を介した下垂体腺腫の未知の細胞内シグナルを解明することで、下垂体腺腫の成長における SDF-1 の機能を解明することを目的とする。

(2) この研究計画の独創的な点と予想される結果と意義

酸素供給の遮断による低酸素状態は生命にとって極めて重篤な危機的状況である。中枢神経の神経反射を介した呼吸促進や心拍の増加といった臓器単位での低酸素に応答した反射とは別個に細胞レベルにも低酸素ストレス刺激によって活性化される低酸素関連転写因子 hypoxia inducible factor (HIF) が存在していることが近年明らかになった (Teur, 2000)。この転写因子は人体の正常細胞に恒常的に存在し、様々な生体の

防御機構を制御することが次第に知られてきた。酸素供給の低下は腫瘍組織においても危機的状況と言えるが、ごく最近この因子はいくつかの腫瘍組織にも存在していることが、報告されている。それらの腫瘍細胞では低酸素刺激によって HIF が活性化し VEGF などの多くの遺伝子を encode することが報告されているが (Rusk, 2002)、腫瘍細胞が新生血管を通じて酸素供給を増加させることでいわば酸素を求めて自らの生存のために血管新生を起こす防御機構を有しているのかもしれない。FMISO という低酸素状態に陥った組織にのみ取り込まれる核種を用いた PET study では脳梗塞、悪性脳腫瘍と同様に下垂体腺腫も正常下垂体とは異なって取り込まれていた事が近年報告されている (Jensen, 2006)。事実、申請者も下垂体腺腫に HIF が発現することを報告した (Yoshida, 2005)。さらに HIF の full-length clone を下垂体腫瘍細胞に transfect して cDNA microarray で網羅的に遺伝子を検索した結果、chemokine の一種である SDF-1 は HIF によって転写される遺伝子に属していることを突き止めた。従って、低酸素に陥った下垂体腺腫組織では、HIF が SDF-1 が encode するとの着想から我々が免疫染色を進めた結果、腫瘍血管のみならず、実質の腫瘍細胞にも SDF-1 とその receptor の発現が確認されるに至った。SDF-1 は、当初は胎生期の虚血に陥った血管内皮細胞が血液に分泌する chemokine の一種であり、骨髄の造血幹細胞の分化誘導を刺激して、hematopoietic progenitor cell から endothelial progenitor cell まで誘導する、homing effect を有する正常血管の vasogenesis を司る因子として最近発見された (Zueger, 2005)。従って下垂体腺腫細胞も SDF-1 を分泌し、かつ receptor も発現しているということは、下垂体腺腫細胞自身が低酸素刺激によって自律的に SDF-1 を介した血管新生を促進しているのみならず、下垂体腺腫細胞同士が SDF-1 を分泌することでお互いに何らかのシグナルを刺激しあっている可能性を示唆している点に研究の意義があると思われる。下垂体腺腫の分子生物学的研究は細胞培養の困難さもあってか、病理切片を用いた分子病理学的研究を除いては in vitro の研究報告は極めて少ない。事実、樹立培養細胞を用いた血管新生の動態を分子形態学的に直接論じた研究は未だなされてはいない。我々は既存の内分泌病理学の観点に立脚した方法のみでこの腺腫細胞の血管新生の機序を論ずることは不可能であろうと考え、今回の培養細胞を用いた実験を含めた計画を企画した。低酸素により惹起された血管新生といった

観点にたつ下垂体腫瘍の研究は今までの内分泌学の立場での研究とは一線を引く新しい学問となりうる点で独創的であると予想され、新しい学問分野の構築が期待出来る点に意義があると思われた。

2. 研究の目的

下垂体腺腫における低酸素状態における SDF-1 及びそのレセプターである CXCR4,7 の発現とシグナルの下流域の解析を目的とした。

3. 研究の方法

1. tissue microarray を用いた下垂体腺腫における SDF-1 発現の定量的解析

申請者はすでに下垂体腺腫組織の手術標本をパラフィンブロックとして 100 例近く保存しており、同時に台帳に年齢、性、subtype、サイズ、臨床データをまとめてある。Tissue microarray をこれらのパラフィンブロックから作成し、SDF-1 の組織での発現と positive control としての beta-actin との発現対比率を蛍光免疫染色から解析し、検討する(金による)。実際には、今回申請した image analysis software (Image Analysis Pro. ver. 3.10)で蛍光の pixel を数量化し、統計解析システム(GraphPad Prism, ver. 4)で多項ロジスティック回帰を行う(吉田、寺本による)。さらに endothelial progenitor cell に特異的な抗原 CD133 も同様に microarray を染色する。従って logistic multivariate analysis が可能となり、腺腫の微小血管密度の濃度を決定する SDF-1 やその他の腫瘍サイズや subtype といった項目の寄与度が解析可能となる。無論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。

2. CXCR4, CXCR7(SDF-1 receptor)ノックダウン細胞と強制発現細胞の確立

ヒト樹立下垂体腺腫細胞(HP-75)に CXCR4, CXCR7 の full length clone をを transfect して強制発現させた細胞と、これらをターゲットとした RNA 干渉(siRNA 法)でノックダウンした細胞を作成する。これらの細胞に対して SDF-1 を培地中に加えれば、それぞれを比較することで SDF-1 の刺激によって receptor である CXCR4 もしくは CXCR7 を介した細胞内のシグナルを receptor 別に解析可能になることが期待される。大腸菌を用いた cDNA clone の増幅と細胞への vector を利用した transfection などは申請者の施設に稼働中の P2 level の実験室において行うが、研究代表者(吉田)は以前よりそれらの機器を使用して研究を進めており、操作も習熟している。今回申請する研究に関する使用願いも提出し、受理されている(日本医科大学組み換え DNA 実験承認番号 日医 H17-19)。

real-time RT-PCR, Western blotting で SDF-1 receptor の発現の変化を確認する。

cDNA microarray analysis

何も transfect してない細胞をコントロールとして、上述の細胞の発現遺伝子の変化を cDNA microarray で網羅的に検討する。クラスター解析で有意に量的変化のあったものを抽出し、さらには既知の血管新生や腫瘍成長に関連したシグナル伝達機構と照らし合わせることで、SDF-1 が細胞表面細胞の receptor を介した未知の機能と新たな細胞内シグナル伝達経路の構築を解析する。

3. 下垂体腺腫の細胞株の樹立

申請者が所属する施設では年間およそ 100 例前後の下垂体腺腫の症例を手術しているが、平成 21 年度より 23 年度までは摘出手術によって採取した下垂体腺腫組織を用いてヒト下垂体腺腫細胞の cell line を樹立する。従来樹立困難であった最大の理由は腺腫細胞が初代培養の際、フラスコの底面に附着しがたい点にあったが、我々は浮遊細胞を除去した後に細胞の洗浄をする際剥がれてくる腺腫細胞を別の collagen type I をコートしたフラスコで培養すれば附着能が上昇することでフラスコ底面に接着し、かつ血球成分や fibroblast を完全に除去できることを見出した。現時点ではヒト樹立下垂体腺腫細胞が驚くべきことに HP-75 のみ一種類しか知られていないので樹立細胞を増やして平成 21 年度以降の実験に備える。(金による。)

4. 上記樹立細胞を使った細胞内シグナルの研究

平成 20 年度に計画した研究で、低酸素刺激により HIF、SDF-1、SDF-1 receptor を介した signal cascade で制御される遺伝子の候補が同定される。同時に transfect に適正な細胞濃度、時間、薬剤濃度を絞り込む。従って平成 21 年度からはヒト下垂体腺腫樹立細胞を蓄積しつつ、cDNA microarray で有意な発現を呈し候補に挙げた個々の遺伝子の機能および signal pathway の検討を、これら複数の樹立細胞で分析結果を蓄積した上で行う。20 年度と同様に遺伝子 clone を腺腫細胞に transfect し強制発現させたもの細胞、clone の塩基配列をターゲットとした siRNA により mRNA の機能を knock-down した細胞を多数比較して候補遺伝子の発現を real-time RT-PCR, Western blotting で行うことで、ヒト下垂体腺腫細胞に共通した signal cascade として解析、選定する。

5. peptide gel への封入培養

前述したように下垂体腺腫細胞は一般的に継体を続けるに従って剥離しやすく、同時に細胞の増殖や遊走、浸潤の変化を定量的に厳密に測定しにくい。細胞密度を厳密に揃えて今回申請した研究を遂行する目的で

peptide gel(PuraMatrix)の中で培養維持する。この peptide gel は 2003 年にナノファイバー工学により Yokoi らにより合成された人工 peptide (分子量 1,712) である。従来使用されていた agarose や Matrigel と比較するとゲル化する際小孔が 20-400nm と大きく、液体はもとより蛋白分子の通過性が高いことが報告されていて 主に抗がん剤の徐放性や幹細胞を封入した再生医療を目指した研究に利用されている。研究代表者の吉田は、この物質の透過性に着目して培養上清に放出された各種の下垂体ホルモンや cytokine が極めて定量的に測定可能であることを報告した (Yoshida, 2007)。従って最終的には平成 21 年度以降樹立されるホルモン産生腫瘍の低酸素状態での SDF-1 分泌の動態と SDF-1 の receptor を介したシグナルから腫瘍成長や浸潤への関連、さらには各種下垂体ホルモン産生に関連する研究へと展開する。

4. 研究成果

(1) SDF-1 とその receptor である CXCR4 は培養酸素濃度を下げれば発現濃度が有意に上昇した。SDF-1a の receptor である CXCR4 は下垂体腺腫のうち GH-oma に有意に多く発現していたが、血中 GH の濃度と正の相関を認めしめた。

低酸素状態での CXCR4 下流の signaling pathway のうち Inhibin b-C (inhbc) を抑制していたために GH 分泌が却って上昇していた。選択的 CXCR4 antagonist である AMD3100 は Inhibin b-C mRNA の発現を促すことで、GH 分泌を抑制したと考えられる。

(2) 別の SDF-1 receptor である CXCR7 の発現を tissue microarray analysis で解析した。(72 例の下垂体腺腫手術症例 16 PRL-oma, 20 GH-oma, 28 NF-oma, 4 ACTH-oma, and 4 TSH-oma). RNA 干渉法 (shRNA) を用いて下垂体腺腫細胞 At-T 20, a mouse pituitary adenoma cell の CXCR7 mRNA をノックダウンして下流域のシグナルを cDNA microarray を用いて解析した。tissue microarray analysis では NF-oma と ACTH-oma での CXCR7 の発現が有意に高かった。(Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$). CXCR7 下流域のシグナルには Pyk2, extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), large-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels (BK(Ca)) channels, ACTH secretion を支配するシグナルに関与していた。従って、SDF-1 \square は下垂体腺腫の増殖と ACTH 分泌を CXCR7 を介して支配している事を明らかにした。

(3) 以上の実験を我々が考案した A6K という人工ペプチドを用いた新しい遺伝子導入法を用いて行った。

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7件)

Koketsu K et al
Gremlin, a bone morphogenetic protein antagonist, is a crucial angiogenic factor in pituitary adenoma. *Int J Endocrinol*. 査読有, 83, 2015, 37-41

Matano F, Yoshida D, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Morita A. Endocan, a new invasion and angiogenesis marker of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 査読有, 117, 2014, 485-491

Kokubo R, Kim K, Mishina M, Isu T, Kobayashi S, Yoshida D, Morita A. Prospective assessment of concomitant lumbar and chronic subdural hematoma: is migration from the intracranial space involved in their manifestation? *J Neurosurg Spine*. 査読有, 20, 2014, 157-163

Matano F, Yoshida D, Ishii Y, Tahara S, Teramoto A, Morita A. Endocan, a new invasion and angiogenesis marker of pituitary adenomas. *J Neurooncol*. 査読有, 36, 2014, 22-26

Kim K, Emoto N, Mishina M, Okada S, Isu T, Yoshida D, Kobayashi S, Teramoto A. Incidental detection of thyroid nodules at magnetic resonance imaging of the cervical spine. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 査読有, 53, 2013, 77-81

Yoshida D, Kim K, Takumi I, Yamaguchi F, Adachi K, Teramoto A. A transfection method for short interfering RNA with the lipid-like self-assembling nanotube, A6K. *Med Mol Morphol*. 査読有, 46, 2013, 86-91

Takumi I, Mishina M, Hironaka K, Oyama K, Yamada A, Adachi K, Hamamoto M, Kitamura S, Yoshida D, Teramoto A. Simple solution for preventing cerebrospinal fluid loss and brain shift during multitrack deep brain stimulation surgery in the semisupine position: polyethylene glycol hydrogel dural sealant capping: rapid communication. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 査読有, 53, 2013, 1-6

[学会発表](計2件)

吉田大蔵、その他 ProLactinoma 男性例に対する治療戦略に対する統計学的解析、日本脳神経外科学会第 74 回学術総会、2015.10.8、札幌

Fumihiro MATANO, Daizo YOSHIDA, Yudo ISHII, Shigeyuki TAHARA, Akira TERAMOTO, Akio MORITA. Endocan, a New Invasion and Angiogenic Marker in Pituitary Adenomas. 82nd AANS Annual

Scientific Meeting, 2014.10.2~2014.10.7
San Francisco,CA,USA

〔図書〕(計1件)

Daizo Yoshida,Akira Teramoto,Akio Morita, Nova Publishing Incl. Pituitary Adenoma:Pathophysiology,diagnosis and treatment option, 2016, 570

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:トランスフェクション剤

発明者:吉田大蔵、武井次郎

権利者:同上

種類:特許

番号:PCT/JP2009/064814

出願年月日:2014年4月2日

国内外の別:外国

取得状況(計3件)

名称:Transfection agent

発明者:DAIZO YOSHIDA, JIRO TAKEI

権利者:同上

種類:特許

番号:9,133,484

出願年月日:2015年9月6日

取得年月日:2015年9月15日

国内外の別:外国

名称:トランスフェクション剤

発明者:吉田大蔵、武井次郎

権利者:同上

種類:特許

番号:W02010/024262

出願年月日:2014年3月4日

取得年月日:2014年5月9日

国内外の別:国内

名称:Transfection reagent

発明者:YOSHIDA DAIZO,TAKEI JIRO

権利者:同上

種類:特許

番号:09809913.8

出願年月日:2014年8月6日

取得年月日:2014年9月5日

国内外の別:外国

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 大蔵 (YOSHIDA DAIZO)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号:20591726

(2)研究分担者

森田 明夫 (MORITA AKIO)

日本医科大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号:60302725

太組 一郎 (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