

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591079

研究課題名(和文) 成長ホルモン産生細胞腫瘍化における AIP 遺伝子の役割

研究課題名(英文) Role of the AIP gene in tumorigenesis of growth hormone-producing cells

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：

## 1.我が国における家族性成長ホルモン(GH)産生腺腫家系における遺伝子解析

巨人症を示した2人の兄弟とその叔父の3名のGH産生腺腫を示す A家系において、第11染色体長腕13.3領域に位置するAIP遺伝子にc.286-287delGTの胚細胞変異を認めた。本変異の結果、短縮型AIP蛋白が生成されることとなる。しかもGH産生腺腫それぞれにAIP遺伝子座位に正常対立遺伝子の消失(LOH)を認めた。

## 2.孤発性GH産生腺腫の解析

家族性発症が認められない40例のGH産生腺腫において、1例にAIP遺伝子c.145G>A(パリンからメチオニンへの変化)を検出した。発症への関与については今後の検討が必要である。

## 3.AIP過剰発現による細胞増殖抑制

HEK293, GH3, TIG3細胞に野生型AIPを発現させると細胞増殖抑制が認められた。変異型では、その作用を有していなかった。

## 4.正常下垂体および下垂体腺腫におけるAIP蛋白の発現解析

正常下垂体ではAIP蛋白はGHとプロラクチン細胞に局在し、分泌顆粒に存在すること、孤発性下垂体腺腫においては、全てのサブタイプに発現していることを認めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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：癌、内分泌腺、下垂体、家族性腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 家族性 GH 産生腺腫 (IFS)

- ・家系内 2 名以上の先端巨大症あるいは巨人症症例が認められることを定義とする。
- ・常染色体優性遺伝を示す疾患である。
- ・浸透率は高くない。

・原因遺伝子は *MEN1* 近傍の 11q13 領域にあることが予測されていた。

## (2) 孤発性 GH 産生腺腫

- ・約半数に *Gsa* 変異が認められる。
- ・一部の GH 産生腺腫にがん抑制遺伝子のメチル化異常が認められる。

・残りのGH産生腺腫の腫瘍化機構は不明。

(3) フィンランドのグループによる報告 (Science, 312:228, 2006)

- ① pituitary adenoma predisposition (PAP)は家族性GH産生腫瘍疾患である。GH産生腺腫あるいはプロラクチノーマを示す2家系の家系員の連鎖解析を行った。本疾患はPAPと命名された。
- ② Aryl hydrocarbon receptor-interacted protein (AIP)がPAPの原因遺伝子である。11q13に位置するAIP遺伝子に2種のnonsense変異と1種のスプライシング異常をもたらす変異がフィンランドの2家系およびイタリアの1家系において検出された。
- ③ AIPは癌抑制遺伝子である。腺腫においては、正常アレルの欠失(LOH)が認められ、AIPは癌抑制遺伝子として作用していることが示唆された。
- ④ 若年者の孤発性GH産生腺腫にAIPの胚細胞性変異が検出される。遺伝性があきらかでない孤発性GH産生腺腫症例の白血球DNAを解析したところ、45例中7例に変異を検出した。しかも手術時年齢を35歳以下とすると15例中6例に変異を検出した。

AIPの機能に対する知見

- (1) AIPはaryl hydrocarbon receptor (AhR)のリガンドである。当初、hepatitis B virus X-associated proteinとして単離されていた分子がaryl hydrocarbon receptor (AhR)と結合し、AHRの転写活性、細胞内局在などを調節しているAIPであることが明らかにされている。ダイオキシンなどが結合するAhRは細胞質内でhsp90, AIPなどと結合して不活性型として存在する。またエストロゲン非存在下では、リガンド結合型AhRは転写共役活性化因子として作用することによりエストロゲン作用を示す。
- (2) AIPはcAMP特異的phosphodiesteraseであるPDE4A5と結合しcAMP分解を阻害する。
- (3) AIPはアポトーシス抑制蛋白であるsurvivinと結合しアポトーシスを抑制する。PDE4A5およびsurvivinとの結合の観点からは、AIPは癌抑制遺伝子よりも、むしろ癌遺伝子として作用する可能性がある。

## 2. 研究の目的

- (1) 5家系の家族性GH産生腺腫にAIP遺伝子異常が関与しているか。
- (2) 孤発性GH腺腫症例と診断された症例に、AIP胚細胞変異陽性を示すPAP症例が含まれているのか。
- (3) 孤発性GH産生腺腫の腫瘍化にAIP異常が体細胞変異レベルで関与しているかどうか。
- (4) AIP遺伝子の癌抑制遺伝子としての機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) IFS家系の解析  
これまでの2家系と新たな3家系の計5家

系について、AIP遺伝子の胚細胞変異の有無について検討する。

AIP遺伝子変異が陰性の場合にはMEN1遺伝子、Carney症候群の原因遺伝子であるPRKARIA遺伝子、p27遺伝子の遺伝子解析を行う。さらに

- ・A家系：未確認の家系員の胚細胞変異の有無を解析する。腫瘍組織におけるLOHの有無を検討する。
- ・B家系：AIP遺伝子のプロモーター領域の変異について検討する。

## (2) 孤発性GH産生腺腫の解析

1例にc.145G>A(バリンからメチオニンへの変化)を検出している。このc.145G>Aのミスセンス変異は非常に低頻度の一塩基多型か、それとも腫瘍化に関与しているか否か検討する。

## (3) AIPのGH産生腺腫における腫瘍化抑制機構の解析

AIPは下垂体に発現しているか?、AIP量の変化によりGH産生細胞核の増殖は?

- ・ヒト下垂体におけるAIPの発現を免疫組織学的に検討する。
- ・ヒトGH産生腺腫、プロラクチン産生腺腫、ACTH産生腺腫、TSH産生腺腫、ゴナドトロピン産生腺腫における発現を免疫組織学的に検討する。
- ・GH産生細胞株(GH細胞)におけるAIP過剰発現による発現抑制時の細胞増殖能を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 我が国における家族性成長ホルモン(GH)産生腺腫家系における遺伝子解析

5家系について、AIP遺伝子の胚細胞変異の有無について検討した。巨人症を示した2人の兄弟とその叔父(巨人症)の3名のGH産生腺腫を示すA家系において、第11染色体長腕13.3領域に位置するAIP遺伝子にc.286-287delGTの胚細胞変異を認めた。本変異の結果、短縮型AIP蛋白が生成されることとなる。しかも兄弟におけるGH産生腺腫それぞれにAIP遺伝子座位に父親由来と考えられる正常対立遺伝子の消失(LOH)を認めた。すなわち、腫瘍においては両対立遺伝子が不活化していることから、本遺伝子が癌抑制遺伝子と作用していることを確認した。さらに、3男における1個のGH産生腺腫において、AIP遺伝子の近傍(2.7 Mbの距離がある)に位置する多発性内分泌腫瘍症1型の原因遺伝子であるMEN1の体細胞変異とLOHを認め、MEN1も不活化していることを確認した。さらに、全くGH産生腺腫の症候が認められない母親、長兄にも、以前に解析した11q13領域のハプロタイプ解析の結果と一致してAIP変異が認められ、浸透率の低さが示唆された。

B家系(巨人症を示す姉・妹の2例)につい

て：

AIP遺伝子のエクソンおよびイントロン部分には胚細胞変異を認めなかった。プロモーター部分1,200 bpの塩基配列を検討したところ、c.-270-269CG>AAとc.-220G>Aの変化を両名に認めた。この変化は健常なコーカサス人や日本人には認められなかった。これらの部位は転写因子の結合配列を有することから、遺伝子発現に関与している可能性があり、今後の検討が必要である。

残りの3家系においてはAIP変異は認められなかった。また家族性にGH産生腺腫を来しうるMEN1遺伝子、PRKAR1A遺伝子、p27遺伝子の遺伝子変異は認められなかった。

#### (2) 孤発性GH産生腺腫の解析

家族性発症が認められない40例のGH産生腺腫においてAIP遺伝子の変異を解析した。3種類の新規一塩基多型の他、1例にc.145G>A(バリンからメチオニンへの変化)を検出した。この変化は健常日本人には認められなかったが、家族歴がないことおよび腺腫において正常対立遺伝子が保たれていることより、発症に関与しているか否かについては今後の検討が必要である。

#### (3) AIP過剰発現による細胞増殖抑制

HEK293, GH3, TIG3細胞に野生型AIPを発現させると細胞増殖抑制が認められた。変異型では、その作用を有していなかった。

#### (4) 正常下垂体および下垂体腺腫におけるAIP蛋白の発現解析

免疫組織化学法および免疫電顕法により発現を検討した。正常下垂体ではAIP蛋白はGHとプロラクチン細胞に局在し、分泌顆粒に存在すること、散発性下垂体腺腫においては、全てのサブタイプに発現していることを認めた。GH腺腫においては正常GH細胞と同様に分泌顆粒に存在するが、プロラクチン産生腺腫、ACTH産生腺腫、非機能性腺腫においては分泌顆粒ではなく細胞質に局在していることを認めた。

#### 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14件)

1. 岩田武男：副甲状腺機能亢進症—顎腫瘍症候群の原因遺伝子産物パラフィプロミン  
四国歯学会雑誌 21：327-332, (2009) 査読なし

2. Nakagawa T, Yin Y, Hattori A, Zenitani T, Hara S, Yonemoto H, Nakamura A, Nakano M, Mawatari K, Teshigawara K, Arai H, Hosaka T, Takahashi A, Yoshimoto K, Nakaya Y.

Identification of cis-acting promoter sequences required for expression of the glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 gene in mice. *Biochim Biophys Acta.* 1791:39-52 (2009) 査読あり

3. Qian ZR, Asa SL, Siomi H, Siomi MC, Yoshimoto K, Yamada S, Wang EL, Rahman MM, Inoue H, Itakura M, Kudo E, Sano T. Overexpression of HMGA2 relates to reduction of the let-7 and its relationship to clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod Pathol.* 22:431-441 (2009) 査読あり

4. 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.* 20:114-121 (2009) 査読あり

5. Leontiou CA, Gueorguiev M, van der Spuy J, Quinton R, Lolli F, Hassan S, Chahal HS, Igreja SC, Jordan S, Rowe J, Stolbrink M, Christian HC, Wray J, Bishop-Bailey D, Berney DM, Wass JA, Popovic V, Ribeiro-Oliveira A Jr, Gadelha MR, Monson JP, Akker SA, Davis JR, Clayton RN, Yoshimoto K, Iwata T, Matsuno A, Eguchi K, Musat M, Flanagan D, Peters G, Bolger GB, Chapple JP, Frohman LA, Grossman AB, Korbonits M. The role of the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene in familial and sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 93:2390-2401 (2008) 査読あり

6. Md. Golam Hossain, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Shozo Yamada, Qian Zhi Rong, Toshiaki Sano, Katsuhiko Yoshimoto: Role of cyclin-dependent kinase inhibitors in

- pituitary tumorigenesis: an update. *Shikoku Acta Medica*, 64, 226-231 (2008) 査読あり
- Yoshida M, Harada N, Yamamoto H, Taketani Y,
7. 水澤典子: 家族性副甲状腺機能亢進症として診断された家系における HRPT2 遺伝子の解析 四国歯学会雑誌 20: 229-234, (2008) 査読なし
  8. 吉本勝彦, 岩田武男, 水澤典子: アディポサイトカインと生活習慣病 四国歯学会雑誌 20: 261-263 (2008) 査読なし
  9. Yamashita Y, Akiyama T, Mizusawa N, Yoshimoto K, Goto M: A case of hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome found in the treatment of an ossifying fibroma in the maxillary bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 36:365-369 (2007) 査読あり
  10. Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K: The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66:499-502 (2007) 査読あり
  11. Sylvia L Asa, Rebecca DiGiovanni, Jing Jiang, Megan L Ward, Kimberly Loesch, Shozo Yamada, Toshiaki Sano, Katsuhiko Yoshimoto, Stuart J. Frank, Schereen Ezzat: A Growth Hormone Receptor Mutation Impairs Growth Hormone Autocrine Signaling in Pituitary Tumors. *Cancer Res*, 67:7505-7511 (2007) 査読あり
  12. Iwata T, Mizusawa N, Taketani Y, Itakura M, Yoshimoto K: Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in the cells expressing SV40 large T antigen. *Oncogene*, 26:6176-6183 (2007) 査読あり
  13. Zhi Rong Qian, Toshiaki Sano, Katsuhiko Yoshimoto, Sylvia L Asa, Shozo Yamada, Noriko Mizusawa, Eiji Kudo: Tumor-specific down-regulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas. *Mod Pathol*, 20:1269-1277 (2007) 査読あり
  14. 岩田武男, 水澤典子, Hossain Md. Golam, 吉本勝彦: 癌抑制因子パラフィブロミンは SV40 large T 抗原存在下では細胞増殖促進に働く ホルモンと臨床 2008 冬季増刊号 「内分泌病理学最近の進歩 2007」医学の世界社 p 147-155 (2007) 査読なし
- [学会発表] (計 16 件)
1. 岩田武男、水澤典子, 板倉光夫, 吉本勝彦: YKL-40 と MMP-1 は脂肪組織のリモデリングに関与する. 第 29 回日本肥満学会 (大分) 2008 年 10 月 17-18 日
  2. 安永佳世, 水澤典子, 畠山節子, 吉本勝彦: isletin の機能解析. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2008.9.23-25 東京
  3. 小野信二, ワン・ナザトル・シマ, 水澤典子, 吉本勝彦: インクレチン発現における LXR 合成アゴニストの影響. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2008.9.23-25 東京
  4. Md. Golam Hossain, Takeo Iwata, Noriko Mizusawa, Katsuhiko Yoshimoto: Compressive force-induced inhibition of adipocyte differentiation is mediated through down-regulation of PPAR $\gamma$ 2. The International Symposium on "Oral Sciences to Improve The Quality of Life", Tokushima, Japan, September 6, 2008
  5. Wan Nazatul Shima, Noriko Mizusawa, Takeo Iwata, Katsuhiko Yoshimoto: Effect of Liver X Receptor (LXR) Agonist on GLP-1 Expression. The International Symposium on "Oral Sciences to Improve The Quality of Life", Tokushima, Japan, September 6, 2008
  6. 水澤典子, 岩田武男, 吉本勝彦: LXR アゴ

ニストによるインクレチン発現への影響. 第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会、東京、2008 年 5 月 22 日-24 日

7. 吉本勝彦, Hossain Golam, 岩田武男, 水澤典子, 内野眞也, 鈴木やすよ, 水越常德, 田原英樹, 櫻井晃洋, 紅粉睦男, 八代享, 鈴木眞一, 松野彰, 西岡宏, 田村哲郎: 家族性副甲状腺機能亢進症家系および家族性下垂体腺腫家系における p27Kip1 遺伝子解析. 第 81 回日本内分泌学会学術総会 2008.5.16-18 青森

8. Hossain Md. Golam, Takao Iwata, Noriko Mizusawa, Shozo Yamada, Qian Zhi Rong, Toshiaki Sano, Katsuhiko Yoshimoto: Mutational analysis and gene expression profile of CDKN2C/p18INK4C in pituitary adenomas. The 2nd International Symposium on "The Future Direction of Oral Sciences in the 21st Century"-Oral Sciences for Our Healthy Life-, December 8, 2007, Tokushima

9. Qian Zhi Rong, Sano Toshiaki, Yamada Shozo, Yun Feng Yuan, Yoshimoto Katsuhiko, Kudo Eiji: Reduced expression of the let-7 microRNAs in human pituitary adenomas in association with pituitary tumorigenesis through regulating HMGA2. 第11回日本内分泌病理学会学術総会 2007.10.19-20 札幌

10. Yun Feng Yuan, Qian Zhi Rong, Sano Toshiaki, Yoshimoto Katsuhiko, Yamada Shozo, Kudo Eiji: The pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) may be a novel tumor suppressor gene in pituitary tumorigenesis. 第11回日本内分泌病理学会学術総会 2007.10.19-20 札幌

11. 岩田武男, 水澤典子, 板倉光夫, 吉本勝彦: 「マクロファージ培養上清が脂肪前駆細胞株 SGBS の MMP 発現に与える影響」第 28 回日本肥満学会 (東京) 2007 年 10 月 19-20

日

12. 吉田将紀, 原田永勝, 原小百合, 伊雲潔, 吉本勝彦, 中屋豊: 「新規グリセロール-3-リン酸アシルトランスフェラーゼ (xGPAT1) の遺伝子クローニング」第 28 回日本肥満学会 (東京) 2007 年 10 月 19-20 日

13. 岩田武男, 水澤典子, 竹谷豊, 板倉光夫, 吉本勝彦: 「副甲状腺癌抑制因子パラフィブロミンは SV40 large T 抗原存在下では細胞増殖促進に働く」第 32 回日本比較内分泌学会大会 (日光) 2007 年 10 月 11-12 日

14. 水澤典子, 畠山節子, 吉本勝彦: isletasin 遺伝子の膵β細胞特異的発現と細胞内局在、第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2007.8.29-31 札幌

15. 岩田武男, 山田正三, 水澤典子, ホサインゴラム, 西岡宏, 松野彰, 佐野壽昭, 吉本勝彦: 家族性および孤発性 GH 産生腺腫における AIP 遺伝子解析、第 80 回日本内分泌学会学術総会 2007.6.14-16 東京

16. 水澤典子, 岩田武男, 吉本勝彦: 膵β細胞に高発現する isletasin 遺伝子の解析. 第 50 回日本糖尿病学会年次学術集会、仙台、2007 年 5 月 24 日-26 日

#### 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