

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09432

研究課題名(和文)下垂体腺腫発症に関連するlncRNAの探索とその機能解析

研究課題名(英文) Exploration and functional analysis of lncRNA associated with pituitary tumorigenesis

研究代表者

福岡 秀規 (Fukuoka, Hidenori)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80622068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はACTH産生下垂体腺腫(ACTHoma)の増殖性、浸潤性に関連するlong non-coding RNA (lncRNA)を探索するため、ACTHoma検体7例をKnosp分類2未満と以上に分けてマイクロアレイ解析を行った。さらに30例のACTHomaでの発現量と腫瘍の臨床データとの関連を解析したところKnosp分類>2で3.6倍高いlncRNAとしてCRNDEを同定した。

CRNDEはマクロ腺腫においてミクロ腺腫の3倍の発現を認め、ACTHomaの増殖、浸潤性に関連することが示された。CRNDEはACTHomaにおいて細胞質に有意な発現を認め、現在さらなる分子機序の解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：In this research, we explored long non-coding RNA (lncRNA) which associated with proliferation and invasiveness in ACTH producing pituitary adenoma (ACTHoma). First, we divided specimens of ACTHoma from 7 patients according to Knosp grade; grade <2, and grade 2 and more, and compared their lncRNA expression levels using microarray analysis. Furthermore, we measured RNA levels of 30 ACTHoma specimens and compared with their clinical characterization. Then we found lncRNA CRNDE, which expressed 3.6 fold in tumors with grade 2 and more.

CRNDE expressed 3 fold in macroadenoma than in microadenoma, suggesting this lncRNA is associated with tumor proliferation in addition to invasiveness. CRNDE located in cytoplasm of ACTHoma, indicating the mechanism related to proliferation and invasiveness by CRNDE is mediated via microRNA or mRNA stability as an epigenetic regulation. Further molecular mechanism needs to be analyzed of CRNDE in ACTHoma as a potential therapeutic target.

研究分野：内分泌内科

キーワード：Cushing disease long non-coding RNA proliferation invasiveness ACTH

### 1. 研究開始当初の背景

1) 下垂体腺腫の腫瘍化機序としてヒトの解析から *MEN1*, *PKAR1A*, *AIP*, *CDKN1B* の胚細胞性変異 *GNAS1* 変異の体細胞変異が同定され、マウスの解析から Rb/サイクリン依存性キナーゼ (CDK) とその阻害剤 CDKI の異常が関連することが示されている。しかし、さらなる網羅的遺伝子解析によっても、新たな遺伝子異常が明らかとなつて来ていない事実があり、エピジェネティックな異常が病態にかかわっている可能性が高い。

2) 近年、次世代シーケンス技術の発展に伴うトランスクリプトーム解析研究から、蛋白に翻訳されない non-coding RNA の生理的、病理的作用が明らかになり、200bp 以上の long non-coding RNA (lncRNA) が腫瘍形成、増殖調整にも関連している事が示された。lncRNA は転写調節やエピジェネティックな遺伝子発現、蛋白翻訳調節を担っていることが示され、細胞周期調節にも関連し、膀胱癌、肝臓癌、肺癌などの多くの癌の腫瘍化機構に重要な役割を担っていることが示された。我々は今回新たなエピゲノム調節因子として注目されている lncRNA に着目し、下垂体腺腫におけるその機能と異常の有無を解析した。

### 2. 研究の目的

lncRNA の下垂体腺腫腫瘍化メカニズムにおける役割を網羅的に解析し下垂体腺腫に対する分子標的薬の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

下垂体腺腫の中で Cushing 病の原因である ACTH 産生下垂体腺腫 7 検体を、浸潤性を表す Knosp 分類で grade 0 - 1 と 2 - 4 の 2 群に分け、マイクロアレイチップ V2 を用い網羅的に RNA 発現の違いを解析した。手術後検体として RNA 抽出用に RNA later に一年以内に保存されたヒト下垂体腺腫を、RNAeasy キットを用いて RNA 抽出を行った。抽出した検体を Knosp

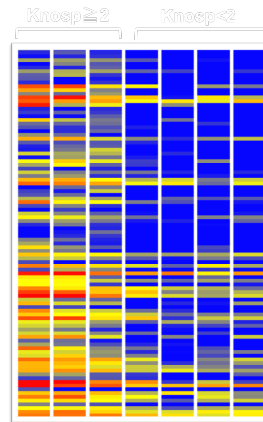
grade により grade <2 と grade 2 の 2 群に分け、共通に発現量の異なる lncRNA をマイクロアレイチップにより網羅的に解析し、発現が 5 倍以上異なるものを候補遺伝子として選定した。

16 例の ACTH 産生腺腫を用い、Realtime PCR 法で候補遺伝子をさらに選定した 30 例の ACTH 産生腺腫を用い、臨床データとの関連性を比較検討した

lncRNA の細胞内局在を明らかにするため、細胞成分を核内と細胞質に分けて RNA を抽出し、同定した lncRNA が核内に存在するのか、細胞質に存在するのかを検討した。

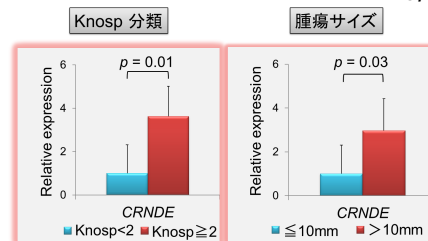
### 4. 研究成果

1) 7 例のマイクロアレイ解析結果から浸潤性の高い腫瘍で 5 倍以上の発現を認める因子として Linc00525, Linc01193, NAPL6, CRNDE, FAM182B の 5 つの遺伝子が候補として選定された。



2) これらの遺伝子について 16 例の ACTH 産生腺腫を用いて Realtime PCR 法と腫瘍の浸潤性とを比較したところ、CRNDE が最も強い関連性を示した (3.65 倍)

さらに CRNDE について 30 例の ACTH 産生腺腫で検証したところ、やはり Knosp 2 の検体で 3.6 倍の発現上昇を認めた ( $p = 0.01$ )。腫瘍サイズとの関連を検討したところ CRNDE は 1cm 以上の腫瘍で 1cm 未満のマイクロ腺腫と比較して 3 倍の発現上昇を認めた ( $p = 0.03$ )。



一方ホルモン産生能との関連では ACTH、コルチゾール、尿中コルチゾールとの関連性は認めなかった。

3) さらに細胞内局在について検討したところ、CRNDE は有意に細胞質に局在していることが明らかとなった。

4) これらの事から Cushing 病の浸潤増殖性に関わる lncRNA として CRNDE が同定され、その細胞局在が主に細胞質にある事が明らかとなった。CRNDE は大腸において正常と比較して選手および癌で発現が上昇している lncRNA として同定されたもので、神経膠腫、卵巣癌でもその発現が多く、予後不良因子となる事が知られている。これらの腫瘍でも CRNDE は細胞質局在が多く、細胞質で miRNA や mRNA と相補的な結合を行う事が報告されている。ACTH 産生線種においても、浸潤性、増殖性を抑制する蛋白の翻訳を、エピジェネティックな機序で低下させ、ACTH 産生下垂体腺腫の性質を規定している因子であることが考えられ、今後の腫瘍における治療標的として期待される。現在その分子機序について検討を行っている。

#### 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 15 件)

1. Matsumoto R, Koga M, Kasayama S, Fukuoka H, Iguchi G, Odake Y, Yoshida K, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Ogawa W, Takahashi Y. Factors correlated with serum insulin-like growth factor-I levels in health check-up subjects. *Growth Horm IGF Res*. 査読有 [Epub ahead of print] 2018.
2. Yoshida K, Fukuoka H, Odake Y, Nakajima S, Tachibana M, Ito J, Hosokawa Y, Yamada T, Miura H, Suematsu N, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Ogawa W, Takahashi Y. Multiple Salivary Cortisol Measurements Are a Useful Tool to Optimize Metyrapone Treatment in Patients with Cushing's Syndromes Treatment: Case Presentations. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 査読有;8: 2018:375.
3. Kanie K, Iguchi G, Bando H, Fujita Y, Odake Y, Yoshida K, Matsumoto R, Fukuoka H, Ogawa W, Takahashi Y. Two Cases of Atezolizumab-Induced Hypophysitis. *J Endocr Soc*. 査読有;2;2017:91-95.
4. Araki T, Liu X, Kameda H, Tone Y, Fukuoka H, Tone M, Melmed S. *J Endocr Soc*. 査読有;1; 2017:127-143.
5. Komada H, Hirota Y, So A, Nakamura T, Okuno Y, Fukuoka H, Iguchi G, Takahashi Y, Sakaguchi K, Ogawa W. Insulin Secretion and Insulin Sensitivity Before and After Surgical Treatment of Pheochromocytoma or Paraganglioma. *J Clin Endocrinol Metab*. 査読有;102; 2017:3400-3405.
6. Odake Y, Fukuoka H, Yamamoto M, Arisaka Y, Konishi J, Yoshida K, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Yamada S, Ogawa W, Takahashi Y. Cross-sectional prevalence of pancreatic cystic lesions in patients with acromegaly, a single-center experience. *Pituitary*. 査読有; 2017:509-514.
7. Bando H, Iguchi G, Okimura Y, Odake Y, Yoshida K, Matsumoto R, Suda K, Nishizawa H, Fukuoka H, Mokubo A, Tojo K, Maniwa Y, Ogawa W, Takahashi Y. A novel thymoma-associated autoimmune disease: Anti-PIT-1 antibody syndrome. *Sci Rep*. 査読有;7; 2017:43060.
8. Nishizawa H, Iguchi G, Fukuoka H, Takahashi M, Suda K, Bando H, Matsumoto R, Yoshida K, Odake Y, Ogawa W, Takahashi Y. IGF-I induces senescence of hepatic stellate cells and limits fibrosis in a p53-dependent manner. *Sci Rep*. 査読有;6; 2016:34605.
9. Matsumoto R, Izawa M, Fukuoka H, Iguchi G, Odake Y, Yoshida K, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Inoshita N, Yamada S, Ogawa W, Takahashi Y. Genetic and clinical characteristics of Japanese patients with sporadic somatotropinoma. *Endocr J*. 査読有;63; 2016:953-963.
10. Yamamoto M, Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Takahashi M, Nishizawa H, Suda K, Bando H, Takahashi Y. Prevalence of Simple Renal Cysts in Acromegaly. *Intern Med*. 査読有;55; 2016:1685-90.
11. Suda K, Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Hirota Y, Nishizawa H, Bando H, Yoshida K, Odake Y, Takahashi M, Sakaguchi K, Ogawa W, Takahashi Y. The influence of type 2 diabetes on serum GH and IGF-I levels in hospitalized Japanese patients. *Growth Horm IGF Res*. 査読有;29; 2016:4-10.
12. Matsumoto R, Fukuoka H, Iguchi G, Odake Y, Yoshida K, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Takahashi M, Yamada S, Ogawa W, Takahashi Y. Accelerated Telomere Shortening in Acromegaly; IGF-I Induces Telomere Shortening and Cellular Senescence. *PLoS One*. 査読有;10; 2015:e0140189.
13. Yoshida K, Fukuoka H, Matsumoto R, Bando H, Suda K, Nishizawa H, Iguchi G, Ogawa W, Webb SM, Takahashi Y. The quality of life in acromegalic patients with biochemical remission by surgery alone is superior to that in those with pharmaceutical therapy without radiotherapy, using the newly developed Japanese version of the AcroQoL. *Pituitary*. 査読有;18;2015:876-83.
14. Hirata Y, Fukuoka H, Iguchi G, Iwahashi Y, Fujita Y, Hari Y, Iga M, Nakajima S, Nishimoto Y, Mukai M, Hirota Y, Sakaguchi K, Ogawa W, Takahashi Y. Median-lower normal levels of serum thyroxine are associated with low triiodothyronine levels

and body temperature in patients with central hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*. 査読有;173; 2015:247-56.

15. Fukuoka H. New potential targets for treatment of Cushing's disease: epithelial growth factor receptor and cyclin-dependent kinases. *Pituitary*. 査読有;18; 2015:274-8.

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Yukiko Odake, Hidenori Fukuoka, Yoshifumi Arisaka, Junya Konishi, Kenichi Yoshida, Ryusaku Matsumoto, Hironori Bando, Kentaro Suda, Hitoshi Nishizawa, Genzo Iguchi, Shozo Yamada, Wataru Ogawa, Yutaka Takahashi. The high prevalence of pancreatic cystic neoplasms in patients with acromegaly. ENDO2016, Apr/2/2016, Boston, USA
2. Kenichi Yoshida, Hidenori Fukuoka, Yukiko Odake, Jun Ito, Tomoko Yamada, Hiroshi Miura, Natsu Suematsu, Ryusaku Matsumoto, Hironori Bando, Kentaro Suda, Hitoshi Nishizawa, Genzo Iguchi, Wataru Ogawa, and Yutaka Takahashi The usefulness of salivary cortisol for a marker of therapy evaluation in patients with Cushing's syndrome. ENDO2016, Apr/2/2016, Boston, USA
3. Hidenori Fukuoka. ErbB signaling in the pathogenesis of corticotroph adenomas. ISPGR2016, Sep/3/2016 Waikiki, Hawaii
4. 小武由紀子、福岡秀規、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、高橋路子、井口元三、山田正三、小川 涉、高橋 裕、ACTH 産生下垂体腫瘍における ErbB4 の発現と臨床像との関連。間脳下垂体腫瘍学会 2016 年 2 月 19 日 ザセレクトイン福島
5. 小武由紀子、福岡秀規、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、高橋路子、井口元三、山田正三、小川涉、高橋裕、ACTH 産生下垂体腫瘍における ErbB4 受容体の役割の解明。日本神経内分泌学会 2016 年 10 月 15 日アクトシティ浜松
6. 福岡 秀規、小武 由紀子、吉田 健一、高橋 裕、Cushing 病の腫瘍化メカニズムについて。第 43 回日本神経内分泌学会学術集会 2016 年 10 月 15 日アクトシティ浜松
7. 福岡 秀規、小武 由紀子、Song-Guang Ren、吉田 健一、松本 隆作、坂東 弘教、隅田 健太郎、西沢 衡、小川 涉、Shlomo Melmed、山田 正三、高橋 裕。ACTH 産生下垂体腺腫における ErbB ファミリー機能の解析。第 34 回内分泌代謝学サマーセミナー 2016
8. 小武由紀子、福岡秀規、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、高橋路子、井口元三、山田正三、小川涉、高橋裕、ACTH 産生下垂体腫瘍における ErbB4 の発現と臨床像との関連、第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016 年 4 月 22 日、国立京都国際会館
9. 吉田健一、福岡秀規、小武由紀子、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、井口元三、小川涉、高橋裕、ACTH 産生下垂体腫瘍において Cyclin E は HOTAIR を負に制御する、第 89 回日本内分泌学会学術総会 2016 年 4 月 21 日、国立京都国際会館
10. Hidenori Fukuoka. ERBB4 in Cushing Pathogenesis. 15th International Pituitary Congress. Mar/30/2017, Orlando, USA
11. Yukiko Odake, Hidenori Fukuoka, Kenichi Yoshida, Ryusaku Matsumoto, Hironori Bando, Kentaro Suda, Hitoshi Nishizawa, Michiko Takahashi, Genzo Iguchi, Shozo Yamada, Wataru Ogawa and Yutaka Takahashi. An EGFR family member, ERBB4 expression is associated with tumor invasiveness in ACTH-producing pituitary adenomas. 15th International Pituitary Congress. Mar/30/2017, Orlando, USA
12. 吉田健一、福岡秀規、小武由紀子、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、井口元三、小川涉、山田正三、高橋裕、Long noncoding RNA, CRNDE は ACTH 産生下垂体腺腫の増殖浸潤に関連する。間脳下垂体腫瘍学会 2017 年 2 月 24 日、大日経ホール&カンファレンスルーム
13. 小武由紀子、福岡秀規、吉田健一、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、高橋路子、井口元三、山田正三、小川涉、高橋裕、ACTH 産生下垂体腫瘍における ErbB4 発現量は浸潤性に関連する。間脳下垂体腫瘍学会 2017 年 2 月 24 日、大日経ホール&カンファレンスルーム
14. 福岡秀規、下垂体腺腫に対する分子標的薬の可能性、第 90 回日本内分泌学会学術総会 2017 年 4 月 20 日 ロームシアター京都みやこメッセ
15. 小武由紀子、福岡秀規、吉田健一、山田正三、井口元三、小川涉、高橋裕、ACTH 産生下垂体腫瘍における ErbB4 受容体の役割の解明、第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 27 日 フェニックス・シーガイア・リゾート
16. 吉田健一、福岡秀規、小武由紀子、松本隆作、坂東弘教、隅田健太郎、西沢衡、井口元三、小川涉、山田正三、高橋裕、Long noncoding RNA, CRNDE は ACTH 産生下垂体腺腫の増殖浸潤に関連する、第 91 回日本内分泌学会学術総会 2018 年 4 月 26 日 フェニックス・シーガイア・リゾート

〔図書〕(計 10 件)

1. Hidenori Fukuoka "Prolactina" Permanyer,

HIPÓFISIS., 2015:71-88

2. Odelia Cooper & Hidenori Fukuko. "Pituitary Gene Signalling Pathway." John Wiley & Sons, eLS, 2016:1-8.
3. Hidenori Fukuoka "Hipofisitis" ENDOCRINOLOGIA CLÍNICA, 2016: 142-148
4. Hidenori Fukuoka "Genetics of Pituitary Adenoma." John Wiley & Sons, eLS, 2017:1-4
5. 福岡 秀規、小川 渉 インスリン抵抗性と癌発症. 最新臨床大腸癌学 ー基礎研究から臨床応用へー日本臨床社, 2015:699-704.
6. 福岡 秀規 EGFR 阻害薬と ACTH 産生腫瘍 診断と治療社、クッシング症候群診療マニュアル (改訂第 2 版), 2015:255-256.
7. 福岡 秀規 高プロラクチン血症とプロラクチノーマ 診断と治療者、**内分泌代謝専門医ガイドブック (改訂第 4 版)** 2016
8. 福岡 秀規、高橋 裕 下垂体疾患の QOL 評価 診断と治療社、**下垂体疾患診療マニュアル (改訂第 2 版)** 2016
9. 福岡 秀規、高橋 裕 下垂体腫瘍の成因 診断と治療社、**下垂体疾患診療マニュアル (改訂第 2 版)** 2016
10. 福岡 秀規、高橋 裕 下垂体腫瘍における新規薬物療法の展望、診断と治療社、**下垂体疾患診療マニュアル (改訂第 2 版)** 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福岡 秀規 (FUKUOKA, Hidenori)  
神戸大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：80622068

(2) 研究分担者

高橋 裕 (TAKAHASHI, Yutaka)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：40282587

(3) 連携研究者

山田 正三 (YAMADA, Shozo)  
虎の門病院・間脳下垂体腫瘍外科  
研究者番号：80260131

(4) 研究協力者

吉田 健一 (YOSHIDA, Kenichi)