様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１７４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１０７６０

研究課題名（和文）インスリン分泌調節遺伝子を標的とした難治性下垂体腺腫の機能制御と新規治療法開発

研究課題名（英文）Development of novel therapy for intractable pituitary adenomas focused on functional control of hormone secretion targeting insulin secretion regulatory gene in the tumor cells

研究代表者

矢野　茂敏（Yano, Shigetoshi）

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：６０３３２８７１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：治療困難な先端巨大症の原因となる下垂体腫瘍のホルモン分泌機構を明らかにすべく、インスリン分泌調節タンパクであるCDKAL1の下垂体腫瘍細胞における機能解明に挑んだ。
まず摘出された下垂体腫瘍サンプル中にCDKAL1が含まれていることを明らかにした。次にさまざまな培養腫瘍細胞におけるCDKAL1の発現量を比較したところ、成長ホルモン分泌腫瘍において明らかな低下が認められた。人為的にこの遺伝子を抑制してみると細胞内カルシウムが上昇し、成長ホルモンの分泌が増加した。このことにより、難治性成長ホルモン分泌細胞ではCDKAL1の機能低下がホルモンの異常分泌に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
難治性下垂体腺腫におけるホルモン分泌のメカニズムはいまだ明らかでないため、あらたな治療法がほとんどない。本研究は糖尿病でよく研究されているインスリン調節遺伝子の作用を下垂体腺腫細胞で確認し、少なくとも成長ホルモン分泌調節に関与していることを明らかにした。この機能制御をさらに詳しく解明していけば腫瘍の治療抵抗性の指標、あるいは予後の指標を設定することができるであろう。さらにこの遺伝子を生体内で制御することができれば、難治性下垂体腺腫に対する新たな治療法を構築することが期待でき、長期にわたる治療で苦しむ患者の利益に大いに資することが期待できる研究である。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the hormone secretion mechanism of pituitary tumor which causes intractable acromegaly, we tried to elucidate the function of insulin regulatory protein "CDKAL1" in pituitary tumor cells.
CDKAL1 was expressed in various pituitary tumor samples removed by surgery. Expression level of mRNA and protein of CDKAL1 was significantly lower in growth hormone secreting tumors than nonfunctioning tumors. Mechanical suppression of cdkal1 gene expression caused elevation of intracellular calcium level and resulted in increased secretion of growth hormone. These results indicate that functional decline of CDKAL1 is involved in the abnormal secretion of hormones in growth hormone secreting pituitary adenomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：下垂体腺腫　CDKAL1　先端巨大症　ホルモン分泌　インスリン

１．研究開始当初の背景

難治性の先端巨大症やクッシング病を引き起こす下垂体腺腫の特徴として、不規則な形で進展増殖し（図１A）、ホルモン分泌顆粒が少なく、分泌ホルモン産生量も腫瘍の大きさに比べ少ないことが知られている（図１B）。　しかしその原因や、腫瘍の増殖能との関係についてはいまだ明らかではない。
CDKAL1 はリジンに対応する転移 RNA（tRNA）をチオメチル化する修飾酵素であり、mRNA の翻訳段階において、リジン tRNA と mRNA の結合を強固にする作用がある。近年、この遺伝子 *cdkal1* の変異により分泌型のインスリンが生成できず糖尿病を発症するという一連の機構が明らかにされた[1)]。またインスリンを持続分泌する腫瘍であるインスリノーマ細胞においてCDKAL1 をノックダウンすると、インスリンの分泌顆粒ができず、小胞体ストレスを起こすことが報告された[2)]。我々はインスリン分泌と下垂体ホルモン分泌には類似点が多く、難治性下垂体腺腫に分泌顆粒が少ないことに着目して、下垂体細胞における CDKAL1 の機能解析を行うこととした。

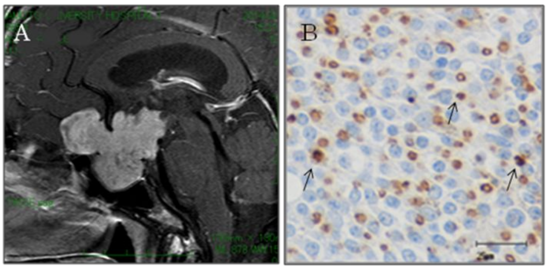

図１．代表的な難治性下垂体腫瘍
A: MRI 側面像。不規則に大きく増殖した腫瘍が認められる。
B: サイトケラチンによる分泌顆粒染色。腫瘍細胞の細胞質に fibrous body（矢印）が強く染色されている

２．研究の目的

本研究の目的は、膵臓β細胞においてインスリン分泌に中心的な役割を果たしている CDKAL1 の下垂体腺腫における機能を明らかにし、そのタンパクあるいは遺伝子の働きをコントロールすることにより、難治性下垂体腺腫の新しい治療法を構築することである。

３．研究の方法

１）臨床サンプルを用いた実験

下垂体腫瘍の患者検体を凍結、あるいはパラフィン標本とし、用いて CDKAL１タンパク質の発現を調べる。また CDKAL1 の翻訳制御活性（チオメチル化修飾活性）を測定する。腫瘍の種類別、ホルモン産生能力別に発現量が異なるかどうかを検討する。

２）培養細胞を用いた実験

培養下垂体腫瘍細胞を用いて *cdkal1 mRNA* の発現解析を行い、この遺伝子の相補的 RNA あるいはオリゴ DNA を投与した際のホルモン産生能を調べる。ホルモン産生分泌における CDKAL1 の作用機序を検討する。

４．研究成果

１）成長ホルモン（GH）産生性下垂体腺腫サンプルにおいて CDKAL1 は低下していた

非機能性下垂体腺腫に比較して GH 産生性下垂体腺腫におけるチオメチル化修飾活性は有意に低かった。*CDKAL1* mRNA の発現量も GH 産生性下垂体腺腫において低下していた。一方 *CDKAL1* 遺伝子の SNP は両者間で差を認めなかった。（図２）

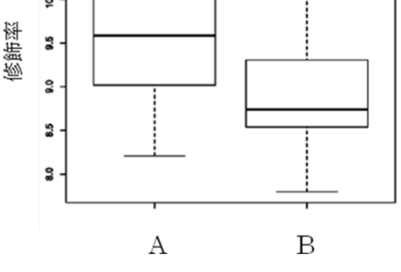

図２　非機能性下垂体腺腫(A)および成長ホルモン産生性下垂体腺腫(B)における $tRNA^{Lys}$(UUU)の CDKAL1 による修飾率の評価。(B)において有意に（＊）修飾率が低く、CDKAL1 の機能欠損が示唆された。

２）cdKal1のknockdownによりGHホルモン産生と分泌は上昇した
GH産生性下垂体腺腫細胞（GH3）に対して *cdkal1* siRNAを導入すると細胞内のcdkal1mRNAおよびチオメチル化修飾活性を有意に低下させた。この状態でコントロールに比較して細胞内GHタンパク発現量、培養細胞中のGH濃度は有意に上昇を示した。

３）cdkal knock downにより細胞内カルシウム濃度が上昇した
GH産生上昇のメカニズム検索のため、GH3細胞における細胞内カルシウム変化を蛍光色素で観察すると、*cdkal1* siRNAを導入した場合に有意に細胞内カルシウムが上昇した。
細胞内カルシウムを小胞体に取りこむことで上昇を防ぐ作用を持つタンパク（Dnajc10）の発現が有意に低下していた。

４）cdkal knock downによりPit-1の発現が上昇した
GHmRNA の発現を上昇させる主要な転写因子である Pit-1 の発現量を調べると、cdkal knock down　細胞において有意に高い値を示し、GHmRNAの発現量も有意に上昇していた。

以上の結果より、GH産生性下垂体腺腫ではCDKAL1の発現と機能が低下しており、この機能低下が細胞内カルシウムを上昇させ、Pit-1の発現上昇を介してGHホルモンの持続産生を引き起こしていることが示唆された。その機序の一つとして小胞体内へのカルシウム取り込みタンパクの発現抑制を介して調節されていることが考えられた。（図３）しかしCDKAL1のチオメチル化修飾活性がGH産生におけるどのタンパク質の翻訳に最も重要であるのかは未だ不明であり、今後のさらなる解析が必要である。

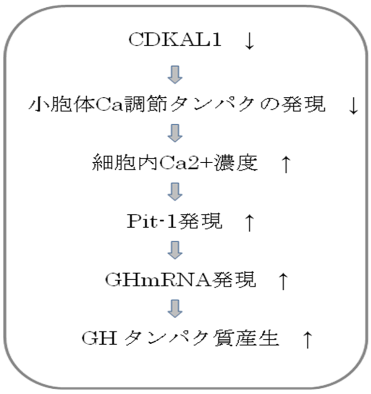

図３　GH産生性下垂体腺腫細胞におけるCDKAL1の発現とGH産生の関連

＜引用文献＞
１）Wei FY et.al., Deficit of tRNA(Lys) modification by Cdkal1 causes the development of type 2 diabetes in mice. J Clin Invest. 2011: 3598-608

２）Brambillasca S et al., CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1 (CDKAL1) is a tail-anchored protein in the endoplasmic reticulum (ER) of insulinoma cells. J Biol Chem. 2012:41808-19.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 ９件）
Takesue Y, Wei F, Yamamoto T, Shinojima N, Yano S, Morioka M, Mukasa A, Kuratsu J, Tomizawa K.　Regulation of growth hormone biosynthesis by CDKAL1 in pituitary adenomas. Endocrine J. 2019 in press

Yano S, Shinojima N, Kitajima M, Uetani H, Hide T, Mukasa A. Usefulness of Oblique Coronal Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in the Endoscopic Endonasal Approach to Treat Skull Base Lesions.　World Neurosurg. 2018 May;113:e10-e19

Yano S, Shinojima N, Kawashima J, Kondo T, Hide T. Intraoperative Scoring System to Predict Postoperative Remission in Endoscopic Endonasal Transsphenoidal Surgery for Growth Hormone-Secreting Pituitary Adenomas. World Neurosurg. 2017 Sep;105:375-385.

Fujimoto K, Yano S, Shinojima N, Hide T, Kuratsu JI. Endoscopic endonasal transsphenoidal surgery for patients aged over 80 years with pituitary adenomas: Surgical and follow-up results. Surg Neurol Int. 2017 Sep 6;8:213.

Yano S, Hide T, Shinojima N. Efficacy and Complications of Endoscopic Skull Base Surgery for Giant Pituitary Adenomas. World Neurosurg. 2017 Mar;99:533-542.

Yano S, Hide T, Uekawa K, Honda Y, Mikami Y, Kuratsu JI. Mixed Pituitary Gangliocytoma and Prolactinoma Resistant to the Cabergoline Treatment. World Neurosurg. 2016 Nov;95:620.e17-620.e22.

Yano S, Kudo M, Hide T, Shinojima N, Makino K, Nakamura H, Kuratsu J. Quality of Life and Clinical Features of Long-Term Survivors Surgically Treated for Pediatric Craniopharyngioma. World Neurosurg. 2016 Jan;85:153-62.

Kameno K., Yano S.*, Shinojima N., Kuratsu J. Spontaneous regression of nonfunctioning pituitary macroadenoma: A case report. Interdisciplinary Neurosurgery: Advanced Techniques and Case Management. 2016 5: 45-7

矢野茂敏、秀 拓一郎、篠島直樹、倉津純一 巨大下垂体腺腫に対する経鼻内視鏡手術の有用性と合併症対策 日本内分泌学会雑誌 92, 60-62 (2016)

〔学会発表〕(計 6 件)

武末吉広、魏 范研、篠島直樹、矢野茂敏、武笠晃丈、富澤 一仁. 下垂体腺腫における tRNA 転写後修飾を介した成長ホルモン産生の制御 第 29 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2019 年

矢野茂敏、平岡史大、相川博、風川清、篠島直樹、秀 拓一郎、武笠晃丈. 経鼻的内視鏡下頭蓋底手術における Four hands approach の導入と術者教育 第 25 回日本神経内視鏡学会 2018 年

矢野茂敏、篠島直樹、秀 拓一郎.下垂体腺腫摘出術後の視機能悪化原因分析 第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2017 年

矢野茂敏、篠島直樹、秀 拓一郎、武笠晃丈. 内視鏡下下垂体腺腫摘出術における 安全な摘出を目指した術中確認項目の有用性検証 第 22 回日本脳腫瘍の外科学会 2017 年

矢野茂敏 、篠島直樹 、秀 拓一郎 、武笠晃丈 、上谷浩之 、北島美香. 内視鏡下経鼻的経蝶形骨洞アプローチにおける術前 CT, MRI の oblique coronal imaging の有用性 第 76 回日本脳神経外科学会総会 2017 年

矢野茂敏、秀 拓一郎、篠島直樹、倉津純一. 巨大下垂体腺腫に対する経鼻内視鏡手術の有用性と合併症対策 第 26 回間脳下垂体腫瘍学会 シンポジウム 2016 年

6．研究組織

(1)研究分担者

秀 拓一郎（Hide Takuichiro）
北里大学・医学部・准教授
研究者番号：40421820

篠島直樹（Shinojima Naoki）
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：50648269

魏 范研（Wei Fan Yan）
熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・准教授
研究者番号：90555773

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。