

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18390405  
 研究課題名 (和文) 下垂体腺腫の細胞浸潤に関する分子形態学的研究  
 研究課題名 (英文) Molecular pathological approach to mechanism of cell invasion  
 In pituitary adenoma.  
 研究代表者  
 寺本 明 (TERAMOTO AKIRA)  
 日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
 研究者番号：50133070

## 研究成果の概要：

研究代表者による下垂体腺腫の手術標本と培養下垂体腺腫細胞を用いた。低酸素状態に陥った状態での研究を行った。その結果細胞表面に発現する RECK 蛋白が低酸素刺激により MMP への刺激を介在し、その発現を促進させることで細胞浸潤を亢進させていることが明らかになった。さらに血管内皮細胞の前駆細胞を骨髄から呼び寄せる因子 SDF-1 も低酸素刺激によって産生され、浸潤傾向の強い下垂体腺腫ほど高く発現していることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2007年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：(1) 下垂体腺腫 (2) 細胞浸潤 (3) 3-D invasion assay

(4) RECK (5) SDF-1 (6) siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫は良性腫瘍に分類されるが、臨床症例では周囲の脳や隣接した海綿静脈洞に浸潤していることが多い。一方で下垂体前葉は静脈系の門脈によって血流を支配されているので、通常の毛細血管により還流を受けている器官と比べ組織酸素分圧が低下していると考えられる。さらに下垂体腺腫の病理切片でも、微少血管の分布は必ずしも均一ではなく、下垂体腺腫実質はその組織酸素分圧は低下している部分があるのではないかと考えられた。事実 我々は低酸素関連

転写因子が下垂体腺腫組織に強く発現していることを報告し、血管新生因子の発現を制御していることを明らかにした。

## 2. 研究の目的

今回、培養下垂体腺腫細胞を用いて低酸素刺激によって細胞膜表面に存在する RECK の発現を刺激することで細胞浸潤を制御する酵素 MMP を制御するか、さらに血管内皮前駆細胞を骨髄から誘導する SDF-1 が実際の臨床例において腫瘍浸潤との相関を解析することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 下垂体腺腫62例のパラフィンブロック (NF-oma 19例、GH-oma 20例、PRL-oma 11例、TSH-oma 6例、ACTH-oma 6例) をもちいてtissue microarrayを作成し、蛍光免疫染色を行った。蛍光pixelよりRECKの発現をbeta actinとの relative expression indexを算出し、subtype, size, Knosp gradingごとに解析した。

(2) ヒト非機能性下垂体腺腫細胞HP-75を対照として、HP-75にRECK full length mRNAを transfectして強制発現させたもの、RECKをターゲットとしたsiRNAでgene silencingした細胞を作成し、RT-PCR, Western blottingで発現の変化を確認した。zymography, reverse zymographyでMMP, TIMPの分泌の変化を解析し、3-D invasion assayを行った。

(3) 抗SDF-1抗体と骨髄前駆細胞に特異的な抗CD34抗体を用いて、蛍光二重免疫染色を行った。SDF-1の発現と微小血管密度の関係を subtypeや腺腫の浸潤のgradingなどで相関性を統計学的に解析し、さらには培養細胞を用いたELISA法により、低酸素刺激における下垂体腺腫細胞のSDF-1分泌を定量的に解析した。

(4) 酸素濃度を1, 3, 5, 15, 21%と変え、24時間培養した下垂体腺腫細胞のmRNAを real-time RT-PCR法でRECKとSDF-1のmRNAを定量解析した。

### 4. 研究成果

(1) RECK発現はnon-functioning adenomaに高く、GH, PRL産生adenomaに有意に低かった。一方でKnosp gradingの低いmicroadenomaに有意に高かった。(2) HP-75細胞のRECKを強制発現させた細胞はMMP-2, -9の活性化や分泌が低下し、一方でgene silencingさせた細胞では逆に上昇していた。3-D invasion assayでは同様にRECKは細胞浸潤を抑制していた。従って下垂体腫瘍細胞では細胞外でMMP-2, -9の活性をRECKが抑制し、同時に細胞

内ではcell cycleを制御するsignal cascadeを制御していた。RECKは下垂体腺腫の成長および浸潤をdown-regulateする膜表面に domainを有する蛋白であることが明らかとなった。

(3) Subtype における SDF-1 発現の相違には有意差がなく、SDF-1 発現と微小血管密度に正の相関が見られた。この結果下垂体腺腫細胞にも SDF-1 が発現しており、従来検討された VEGF による組織に既存の血管内皮細胞による血管構築とは別個に、SDF-1 の homing effect によって骨髄から血管内皮前駆細胞を誘導する機序が存在し、下垂体腺腫の血管新生に密接に関わっている事が示唆された。同時に浸潤傾向の強い腺腫ほど有意に SDF-1 の発現が多く、腫瘍浸潤に SDF-1 が関与するシグナル伝達路が存在することを示唆していた。

(4) SDF-1 と RECK は両者ともに低酸素状態で mRNA の発現が上昇しており、低酸素刺激が下垂体腺腫の浸潤を制御していることが明らかとなった。

### 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20件)

1: Morimoto D, Yoshida D, Noha M, Sasaki M, Takahashi H, Teramoto A. Transient uptake of thallium-201 into a cerebral infarction: a case report. J Nippon Med Sch. 2008 Dec;75(6):344-6.

2: Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Trilostane-induced inhibition of cortisol secretion results in reduced negative feedback at the hypothalamic-pituitary axis. Domest Anim Endocrinol. 2009 Jan;36(1):32-44.

3: Miyakoshi T, Takei M, Kajiyama H, Egashira N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. Expression of Wnt4 in human pituitary adenomas regulates

activation of the beta-catenin-independent pathway. *Endocr Pathol.* 2008 Winter;19(4):261-73.

4: Sakai N, Kim K, Sanno N, Yoshida D, Teramoto A, Shibasaki T. Elevation of growth hormone-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in growth hormone-secreting pituitary adenoma with Gsalpha protein mutation. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2008;48(11):481-7;

5: Takumi I, Mori O, Mizutani N, Akimoto M, Kobayashi S, Teramoto A. Expansile neurenteric cyst arising in the frontal lobe associated with status epilepticus: report of a case and discussion of epileptogenesis. *Brain Tumor Pathol.* 2008;25(2):97-101.

6: Kogiku M, Ohsawa I, Matsumoto K, Sugisaki Y, Takahashi H, Teramoto A, Ohta S. Prognosis of glioma patients by combined immunostaining for survivin, Ki-67 and epidermal growth factor receptor. *J Clin Neurosci.* 2008 Nov;15(11):1198-203.

7: Teshima T, Hara Y, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Expression of genes related to corticotropin production and glucocorticoid feedback in corticotroph adenomas of dogs with Cushing's disease. *Domest Anim Endocrinol.* 2009 Jan;36(1):3-12.

8: Teshima T, Hara Y, Taoda T, Koyama H, Takahashi K, Nezu Y, Harada Y, Yogo T, Nishida K, Osamura RY, Teramoto A, Tagawa M. Cushing's disease complicated with thrombosis in a dog. *J Vet Med Sci.* 2008 May;70(5):487-91.

9: Yoshida D, Nomura R, Teramoto A. Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). *J Neurooncol.* 2008 Sep;89(2):141-50.

10: Suzuki M, Egashira N, Kajiya H, Minematsu T, Takekoshi S, Tahara S, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. ACTH and alpha-Subunit are Co-expressed in

Rare Human Pituitary Corticotroph Cell Adenomas Proposed to Originate from ACTH-Committed Early Pituitary Progenitor Cells. *Endocr Pathol.* 2008 Jan 29.

11: Matsuno A, Mizutani A, Takekoshi S, Itoh J, Okinaga H, Nishina Y, Takano K, Nagashima T, Osamura RY, Teramoto A. Analyses of the mechanism of intracellular transport and secretion of pituitary hormone, with an insight of the subcellular localization of pituitary hormone and its mRNA. *Brain Tumor Pathol.* 2006 Apr;23(1):1-5.

12: Morita K, Takano K, Yasufuku-Takano J, Yamada S, Teramoto A, Takei M, Osamura RY, Sano T, Fujita T. Expression of pituitary tumour-derived, N-terminally truncated isoform of fibroblast growth factor receptor 4 (ptd-FGFR4) correlates with tumour invasiveness but not with G-protein alpha subunit (gsp) mutation in human GH-secreting pituitary adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008 Mar;68(3):435-41.

13: Takei M, Suzuki M, Kajiya H, Ishii Y, Tahara S, Miyakoshi T, Egashira N, Takekoshi S, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. Immunohistochemical detection of somatostatin receptor (SSTR) subtypes 2A and 5 in pituitary adenoma from acromegalic patients: good correlation with preoperative response to octreotide. *Endocr Pathol.* 2007 Winter;18(4):208-16.

14: Katsuno M, Yokota H, Yamamoto Y, Teramoto A. Bilateral traumatic abducens nerve palsy associated with skull base fracture--case report. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2007 Jul;47(7):307-9.

15: Minematsu T, Egashira N, Kajiya H, Takei M, Takekoshi S, Itoh Y, Tsukamoto H, Itoh J, Sanno N, Teramoto A, Osamura RY. PTTG is a secretory protein in human pituitary adenomas and in mouse pituitary tumor cell lines. *Endocr Pathol.* 2007 Spring;18(1):8-15.

16: Yoshida D, Teramoto A. The use of 3-D culture in peptide hydrogel for

analysis of discoidin domain receptor 1-collagen interaction. *Cell Adh Migr*. 2007 Apr;1(2):92-8.

17: Bao Y, Yoshida D, Morimoto D, Teramoto A. Expression of laminin beta2: a novel marker of hypoxia in pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2006 Fall;17(3):251-61.

18: Yoshida D, Teramoto A. Elevated cell invasion is induced by hypoxia in a human pituitary adenoma cell line. *Cell Adh Migr*. 2007 Jan;1(1):43-51.

19: Minematsu T, Suzuki M, Sanno N, Takekoshi S, Teramoto A, Osamura RY. PTTG overexpression is correlated with angiogenesis in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol*. 2006 Summer;17(2):143-53.

20: Yoshida D, Teramoto A. Enhancement of pituitary adenoma cell invasion and adhesion is mediated by discoidin domain receptor-1. *J Neurooncol*. 2007 Mar;82(1):29-40.

[学会発表] (計 14件)

1. Daizo Yoshida, Ryutaro Nomura, Akira Teramoto. Signaling pathway by SDF-1/CXCR4 in pituitary adenoma. Annual Meeting of American Association of Neurological Surgeons. (2008 Apr 28, Chicago, USA)
2. 吉田大蔵、野村竜太郎、寺本明。下垂体腺腫における CXCR7 発現の細胞内シグナル伝達における意義。第67回日本脳神経外科学会総会 (2008年10月 盛岡)
3. 吉田大蔵、野村竜太郎、田原重志、石井雄道、寺本明。下垂体腺腫における Stem cell-derived factor と CXCR7 を介した autocrine signaling 第18回日本間脳下垂体腫瘍学会 (2008、福井)
4. 野村竜太郎、吉田大蔵、寺本明。下垂体腺腫における SDF-1 発現の意義。第67回日本脳神経外科学会総会 (2008年10月 盛岡)
5. 吉田大蔵、野村竜太郎、寺本明。下垂体腺腫細胞のHP-75におけるRECKを介した細胞内シグナルの制御。第66回日本脳神経外科学会総会 (2007、東京)
6. 吉田大蔵、野村竜太郎、高橋弘、寺本明。下垂体腺腫細胞における RECK を介した signal pathway ウォーターフロントカンファレンス (2007 横浜)
7. 吉田大蔵、野村竜太郎、寺本明。下垂体腺腫細胞 HP-75 における RECK を介した細胞内シグナルの制御に関する研究。第39回日本臨床分子形態学会総会、第48回日本組織細胞学会総会合同学術集会。(2007 甲府)
8. Daizo Yoshida, Ryutaro Nomura, Akira Teramoto. Regulation of cell invasion and signalling pathways in the pituitary adenoma cell line, HP-75, by reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK). 2007 Congress of Neurosurgeons Annual Meeting. (2007, San Diego, CA, USA)
9. 吉田大蔵、森本大二郎、包義君、北川亮、寺本明。ペプタイドハイドロゲルを用いた下垂体腺腫細胞の 3D culture model の意義。第16回日本間脳下垂体腫瘍学会 (神戸) 2006.
10. Yijun Bao, Daizo Yoshida, Daijiro Morimoto, Yoshiyuki Osamura, , and Akira Teramoto. Expression of Laminin  $\beta 2$ ; A Novel Marker of Hypoxia in Pituitary Adenomas. 第16回日本間脳下垂体腫瘍学会 (神戸) 2006.
11. 吉田大蔵、寺本明。下垂体腺腫における Discoidin Domain Receptor 1 (DDR1) の腫瘍浸潤における生物学的意義に関する研究。第10回日本内分泌病理学会総会 (東京)、2006
12. Daizo Yoshida, Daijiro Morimoto, Akira Teramoto. Cell Invasion and Adhesion of Pituitary Adenoma Cell Mediated by Discoidin Domain Receptor-1 to Matrix Metalloproteinase-2 and -9 pathway. 2006 AANS Annual Meeting (San Fransisco), 2006
13. 吉田大蔵、野村竜太郎、Hu shaoshan、寺本明。下垂体腺腫細胞 HP-75 の RECK 発現の細胞浸潤における意義。第17回日本間脳下垂体腫瘍学会 (山形 2006年)
14. 吉田大蔵 森本大二郎 包義君 金景成 饒波正博 寺本明 鈴木雅規 長村義之。下垂体腺腫における Discoidin Domain Receptor 1

(DDR1)の細胞浸潤に果たす意義に関する研究。第37回日本臨床分子形態学会（大阪 2006年）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺本 明 (TERAMOTO AKIRA)  
日本医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50133070

(2) 研究分担者

吉田 大蔵 (YOSHIDA DAIZO)  
日本医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 30210701

金 景成 (KIM KYONSONG)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号 30339387

(3) 連携研究者