

機関番号 : 34511
研究種目 : 基盤研究 (C)
研究期間 : 2008~2010
課題番号 : 20591095
研究課題名 (和文)
下垂体腫瘍分化誘導療法に向けた、エムポウのプロラクチン細胞分化誘導作用の検討
研究課題名 (英文)
Analysis of inductive effect of mPOU on PRL cell differentiation for future application for pituitary tumor treatment
研究代表者
置村 康彦 (OKIMURA YASUHIKO)
神戸女子大学・家政学部・教授
研究者番号 : 30204100

研究成果の概要 (和文) :

プロラクチン (PRL) をつくる下垂体腫瘍は、既に内科的治療法が確立しており、薬物により治療可能なものが多い。今回、治療容易な PRL をつくる腫瘍に他の腫瘍も分化させれば治療が容易になるのではないかという発想のもと、PRL 細胞の分化を促進する因子、それに関連する因子の探索、機能解析を行なった。PRL 産生を直接増幅する因子として mPOU を見出した。さらに、mPOU は Pit-1 遺伝子発現をも促進し、間接的にも PRL 発現を増強することがわかった。

研究成果の概要 (英文) :

Prolactinoma is a treatable pituitary tumor that responds to dopamine agonists. Induction for PRL cell differentiation may be related to PRL and D2 receptor gene expression and resulted in treatable tumors. In the present study, to clarify the mechanism of PRL gene expression, we searched brain cDNA library and found that mPOU bound to PRL gene and increased PRL reporter gene expression. mPOU also stimulated Pit-1 reporter gene expression. RNA interference for mPOU resulted in a decrease in PRL content and Pit-1 mRNA levels in GH3 cells. Chromatin immuno-precipitation assay showed that mPOU bound to PRL and Pit-1 gene. Taken together, these results suggested that mPOU was a stimulating factor for PRL gene expression directly and indirectly via enhancement of Pit-1 gene expression.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 内科系臨床医学・内分泌学

キーワード : 下垂体腫瘍、プロラクチン、発生分化、転写因子、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、甲状腺刺激ホルモン (TSH) β 遺伝子に結合し、それらの発現を促進する下垂体特異的転写因子である Pit-1 のクローニング以来、下垂

体の発生、細胞分化機構は急速に明らかとなってきた (Cell. 55:519-29, 1988)。Pit-1 に次いで、Pit-1 発現を制御する転写因子として Prop1 が同定され (Nature 384:327-33, 1996)、さらに ACTH 細胞の分化を制御する

Tpit (Genes Dev 17:738-47, 2003)などの転写因子や下垂体の初期分化に関与する種々の転写因子が見いだされ、下垂体の分化過程の理解はおおいに進んだ。

Pit-1 変異によって、ヒトやマウスで GH、PRL、TSH が欠損する複合下垂体ホルモン欠損症が発症することから考えても、これらのホルモン発現における Pit-1 の重要性は明らかである。しかし、下垂体では、この3種のホルモンは通常共存しておらず、それぞれ別個の細胞に存在するので、Pit-1 単独では、それらのホルモンの細胞特異的発現は説明できない。私どもは、これまで、Pit-1 以外の因子が Pit-1 と共同して特定のホルモン発現を亢進させることを想定し、その因子の単離同定を試み、Pit1 存在下に PRL 遺伝子発現を増強する新規転写因子として mPOU をクローニングした。

2. 研究の目的

本研究では、内因性 mPOU の役割、意義について明確にすることに重点を置いた。

具体的には次のことを目標とした。下垂体細胞において mPOU RNA interference (RNAi) を行ない、PRL などの PRL 細胞の特性を決定している蛋白の mRNA 量を調べ、内因性 mPOU の役割を明確化する。ついで、その成績から推測された標的遺伝子における mPOU の作用点を明らかにすることを試みる。さらに、in vivo での mPOU の機能を検討するため、mPOU ノックアウトマウスを作製し、mPOU の個体における役割、意義を検討する。さらに、クロマチン免疫沈降法、ウェスタンブロットを併用し、mPOU の標的遺伝子上の作用点、他の転写因子、転写共役因子との相互作用を明確にすることである。

3. 研究の方法

(1) 内因性 mPOU の下垂体特異的蛋白発現に及ぼす効果

① PRL、GH 産生細胞特異的蛋白発現における mPOU の意義を明確にするため、GH3 細胞 (ラット下垂体由来 GH、PRL 産生細胞株) を使用して、Brn-5 (mPOU の rat orthologue) の RNAi を行ない、PRL、GH mRNA 発現に及ぼす効果を、real time quantitative PCR で検討した。

② 正常 PRL、GH 産生細胞においても、mPOU (Brn-5) が機能しているのか明らかにする目的で、ラット下垂体初代培養系で Brn-5 RNAi を行ない、PRL、GH、TRH 受容体 mRNA の発現量の定量を試みた。

(2) 内因性 mPOU の各種下垂体転写因子発現に及ぼす効果

下垂体の発生、分化に関与する転写因子発現に果たす mPOU の意義を明確にするため、GH

3 細胞で、Brn-5 (mPOU の rat ortholog) に対して RNAi を行ない、Pit-1, Prop1, Hesx1, Lhx3 等、種々の下垂体の発生、分化に関与する転写因子の mRNA 発現を real time quantitative PCR で検討した。

(3) mPOU の作用点の検討

内因性 mPOU を減少させることによって観察された標的遺伝子発現の変動が直接作用か否か、次の方法で確認した。標的遺伝子の 5' 上流配列とルシフェラーゼ cDNA を結合させたレポータープラスミド、および mPOU 発現ベクターを作製した。これらを GH3 細胞にトランスフェクトし、mPOU 発現によりレポーター活性が亢進するか調べた。

(4) mPOU (Emb) ノックアウトマウスを作製
Emb (mPOU の mouse ortholog) 遺伝子の 5' 側から C 末側を相同領域として利用するように組み換えベクターを作製し、Emb ノックアウトマウスの作製をこころみた。

(5) クロマチン免疫沈降法 (chip assay) による mPOU 結合部位の同定

1 mPOU を過剰発現させた GH3 細胞のメディアウムにホルマリンを加え、細胞内で蛋白質・DNA をクロスリンクした。細胞成分を可溶化した後、ソニケーションし、クロスリンクさせた DNA を断片化させた。mPOU 抗体を用いて、この DNA 断片を免疫沈降し、クロスリンクをはずしたのち、DNA を精製回収した。PRL、Pit-1 遺伝子の種々の領域を増幅しうる各種 PCR primer を用いて、DNA を増幅し、それぞれの遺伝子のどの領域に mPOU がリクルートされるのか検討した。

(6) Prop1 の作用を修飾するコファクターの単離

mPOU は PRL 遺伝子以外に、Pit-1 遺伝子にも結合し、Pit-1 遺伝子発現を亢進させる転写因子であることが、上記実験から明らかとなった。mPOU 以外にも Pit-1 遺伝子発現を調節する因子の存在が推測されるので、Pit-1 発現に対して最も重要な転写因子である Prop1 の作用を修飾するコファクターのクローニングを試みた。Prop1 の trans-activating domain をベイトとし、酵母を使用した two hybrid system で、ヒト中枢神経系ライブラリーから Prop1 結合因子のクローニングを試みた。

4. 研究成果

主な研究成果を次に記す。

(1) 内因性 mPOU の下垂体特異的蛋白発現に及ぼす効果

① RNAi により GH3 細胞の内因性 Brn-5 を減少させたところ、PRL 発現量は減少した。

一方、GH 発現量の減少は明確ではなかった。
② 正常下垂体初代培養系で Brn-5 の RNAi を行なったが、RNA 取り込み量が十分でなく、干渉がかからなかった。ウイルスベクターを使用して取り込み高率を上昇させ、さらに検討中である。

(2) 内因性 mPOU の各種下垂体転写因子発現に及ぼす効果

GH3 細胞において、Brn-5 の RNAi をおこなったところ、Pit-1 発現の低下が認められた。Pit-1 は PRL 遺伝子発現を促進する転写因子であるので、内因性 Brn-5 は Pit-1 発現をも促進していること、Brn-5 は PRL 遺伝子への直接作用ばかりでなく、Pit-1 遺伝子発現を介する間接作用を介しても PRL 遺伝子発現を増強させている可能性が示唆された。

(3) mPOU の作用点の検討

PRL 遺伝子の 5' 上流配列とルシフェレース cDNA を結合させたレポータープラスミド、および mPOU 発現ベクターを作製した。これらを GH3 細胞にトランスフェクトしたところ、mPOU は PRL レポータープラスミド活性を増加させた。5' 上流配列を順次切断したレポータープラスミドを使用し、mPOU の作用点を決定した。0.6kb の PRL 遺伝子 5' 上流配列をもつレポータープラスミドでも活性化は見られ、mPOU の作用点の少なくとも一部はその領域にあることが推測された。Pit-1 の 5' 上流配列をもつレポータープラスミドをトランスフェクトしたところ、mPOU は Pit-1 レポータープラスミド活性も増強させた。同様の切断実験から、pit-1 遺伝子上の作用点も 0.6kb 以内の領域にあると推定された。

(4) mPOU (Emb) ノックアウトマウスの作製
Brn-5 (mPOU の rat ortholog) には 5' 上流側が異なったスプライシングバリエーションがあることが明らかとなった。転写開始点は、当初考えられていた部位よりかなり上流であり、これまで未知であったエクソン 1 と長いイントロン 1 が存在し、これらをスキップして、私どもがクローニングした Brn-5 mRNA ができると明らかとなった。これは Emb (mPOU の mouse ortholog) 遺伝子においても同様と考えられる。以前にも Emb ノックアウトマウスの作出を試みたが、イントロン 1 を 5' 側の相同領域として利用するように組み換えベクターを作製したため、振り返ってみると、その箇所には他の遺伝子と共通する繰り返し配列が存在しているため、目的とした箇所を組み替えることができなかったものと考えられた。今回は、この点を改良し、今回明らかとなった 5' 上流側を 5' 側の相同領域として利用し、ノックアウトマウスを作製したが、やはり正しい相同組替え体は得

られなかった。

(5) クロマチン免疫沈降法 (chip assay) による mPOU 結合部位の同定
mPOU 抗体を使用して得られた免疫沈降物質中の DNA をテンプレートとして、PCR をおこなった。PRL 遺伝子の最も転写開始点の近くに存在する Pit-1 結合エレメントを増幅する PCR primer、Pit-1 遺伝子の Pit-1 結合配列を含む領域を増幅する PCR primer を使用した時、予測されたサイズの DNA が増幅された。この結果から、mPOU は少なくとも PRL 遺伝子の転写開始点に近い Pit-1 結合エレメント、および Pit-1 遺伝子自身の Pit-1 結合エレメントに結合することが示唆された。

(6) Prop1 の作用を修飾するコファクターの単離

ヒト中枢神経系ライブラリーから Prop1 結合因子の候補タンパクを 7 種拾いだした。最も多かった蛋白は、amino-terminal enhancer of split (AES) であった。Cos7 細胞で AES と Prop1 を発現させた時、Prop1 に対する抗体により、AES は共沈し、Prop1 と AES は実際に複合体を形成することが示唆された。Prop1 による Pit-1 レポーター活性の亢進は、AES 発現ベクターの同時トランスフェクションにより抑制されたことより、Prop1 の機能を抑制する因子であることが明らかとなった。また、mammalian two hybrid assay で AES の N 末端部の Q ドメインが、Prop1 との作用に必要な部位であることがわかった。

(7) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

mPOU に関する以上の成果は、いずれも世界に先駆けて発表したものであり、しばしば発表論文は引用されている。

また、AES に関する成績は、米国の Camper のグループの発表成績と一致するものである。

これまで研究してきた転写因子の異常では、先天性下垂体ホルモン複合欠損症をきたすが、今回、後天性下垂体ホルモン複合欠損症を見出した。この成因は不明であるが、pit-1 に対する自己抗体が出現しており、自己免疫機序が関与しているものと思われる。今回の研究の副産物として、この新規疾患概念を提唱することができた。

今後、本研究を継続し、下垂体細胞分化の機構をさらに明確にすることにより、安全かつ有効な下垂体腫瘍の治療法を開発することができるものと考えられる。

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 Yamamoto M, Okimura Y. (19人中4番目), Adult combined GH, prolactin, TSH deficiency associated with circulating Pit-1 antibody in humans. J Clin Invest, 121:113-9, 2011, 査読有
- ② Shibahara M, Okimura Y. (14人中14番目), W194XProp1 and S156insT prop1, both of which have intact DNA-binding domain, show a different DNA-binding activity to the Prop-1 binding element in human Pit-1 gene. Mol Cell Endocrinol 323:167-71, 2010, 査読有
- ③ Iida K, Okimura Y. (6人中4番目), Difference between Japanese and Caucasian populations in the allelic frequency of growth hormone receptor polymorphisms. J Pediatr Endocrinol Metab. 22:41-6, 2009, 査読有
- ④ Ikeshita N, Okimura Y. (13人中13番目), Identification and analysis of Prop1-binding sites in human Pit-1 gene. Endocrinology 149:5491-9, 2008, 査読有
- ⑤ Toda K, Okimura Y. (10人中10番目), Involvement of mPOU (Brn-5), a class VI POU protein, in the gene expression of Pit-1 as well as PRL. Mol Cell Endocrinol 280:20-29, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計31件)

- ① Okimura Y., cloning of a Prop1-binding factor that regulates Pit-1 gene expression, 14th International Congress of Endocrinology, March 26-30, 2010, Kyoto.
- ② 置村康彦, 成長ホルモン・プロラクチン遺伝子発現とその調節因子に関する分子内分泌学的研究(吉村賞受賞講演)、第24回日本下垂体研究会合同学術集会、2009年8月27-29日、三沢
- ③ 井口元三、Pit-1に対する自己抗体と関連した後天性GH、PRL、TSH欠損症3例の解析、第82回日本内分泌学会学術総会、2009年4月23-25日、前橋
- ④ 置村康彦、内分泌代謝領域最近の進歩／下垂体、第19回日本内分泌学会臨床内分泌代謝update、2009年3月13,14日、東京
- ⑤ 芝原優美、共にDNA結合ドメインがインタクトと想定されている変異 Prop1S154insTとW194Xは、ヒトPit-1位電子におけるProp1結合部位に対して異なった結合能を示す、第35回日本神経内分泌学会、2008年8月28-30日、東京
- ⑥ 杉山裕香、転写因子 Prop1 と作用するコファクターの同定、第35回日本神経内分泌学会、2008年8月28-30日、東京

〔図書〕(計4件)

- ① 置村康彦、中山書店、症候群ハンドブック、2011、401
- ② 置村康彦、千原和夫、中山書店、看護のための最新医学講座第2版 第7巻 代謝疾患内分泌疾患、2009、170-176
- ③ 置村康彦、医学書院、下垂体腫瘍のすべて、2009、56-63
- ④ 置村康彦、中外医学社、脳神経外科エキスパート 間脳下垂体、2008、69-81

6. 研究組織

(1) 研究代表者

置村 康彦 (OKIMURA YASUHIKO)
神戸女子大学・家政学部・教授
研究者番号：30204100

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

高橋 裕 (TAKAHASHI YUTAKA)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：70301281
飯田 啓二 (IIDA KEIJI)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80324911

(4) 研究協力者

井口 元三 (IGUCHI GENZO)
神戸大学・大学院医学研究科・助教
戸田 圭三 (TODA KEIZOU)
神戸大学・保健学研究科・大学院生
山本 大輔 (YAMAMOTO DAISUKE)
神戸大学・保健学研究科・大学院生
池下 伸子 (IKESHITA NOBUKO)
神戸大学・保健学研究科・大学院生
芝原 優美 (SHIBAHARA MASAMI)
神戸大学・保健学研究科・大学院生
杉山 裕香 (SUGIYAMA YUKA)
神戸大学・保健学研究科・大学院生