

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08568

研究課題名（和文）プロオピオメラノコルチン遺伝子の転写抑制メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of transcriptional repression mechanism of proopiomelanocortin gene

研究代表者

高安 忍（Shinobu, Takayasu）

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：80466507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：難病であるACTH産生下垂体腫瘍（クッシング病）は良性腫瘍にもかかわらず、結果として副腎ステロイドの過剰産生を引き起こし、生命予後に重大な影響を及ぼす。ACTHの遺伝子であるプロオピオメラノコルチン（POMC）の調節機構を解明し、治療につなげることを目的とした。マウスのACTH産生下垂体腫瘍の培養細胞を用いて、全遺伝情報の中から活性化されたDNA領域を特定する技術と、どのDNA領域がどこに接しているかを特定する解析手法を組み合わせることによって、POMC遺伝子の調節領域を見つける手段を構築した。いくつかの候補領域を解析した結果、実際にPOMC遺伝子調節に関わる新たな部位の発見に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、クッシング病においてACTHの過剰分泌を抑える有効な薬物療法はない。POMC遺伝子を調節している領域のうち、POMC発現の抑制に働く因子を増強、あるいはその逆で、発現を増加させているものを抑える方法を検討することで、新たなクッシング病治療の開発につなげることができる。さらにこの方法は他の細胞や遺伝子にも応用ができる。特に有効な治療法のないホルモン過剰産生や、産生低下が問題となっている疾患については、原因となっている細胞の中の標的とする遺伝子に同様の技術と解析を用いて検討を行い、それらを抑制する、増強させる方法を構築し、これまでになかったまったく新しい治療法の開発につなげることができる。

研究成果の概要（英文）：ACTH producing pituitary tumor (Cushing's disease) leads to excess adrenal steroid production, and it is recognized as a life-threatening disease. Therapies to treat the autonomous hypersecretion of ACTH are limited. Therefore, the regulatory mechanisms of ACTH precursor proopiomelanocortin (POMC) gene in pituitary ACTH producing tumors are investigated. The specific genomic regions where physically interact with POMC locus, and active DNA regions, were found in mouse ACTH producing pituitary tumor cells using unique methods. Then, we identified new DNA regions and genes that positively or negatively regulate POMC expression. Further analyzing the regions can lead to develop novel therapies for Cushing's disease. Potential therapies for the other hormone excess or insufficient hormone production can be developed using the same approach.

研究分野：内分泌

キーワード：プロオピオメラノコルチン ACTH クッシング病

1. 研究開始当初の背景

クッシング病の内科治療は、血中コルチゾールレベルをいかに正常域に維持するかということになるが、現在の ACTH 抑制療法はソマトスタチン誘導体とドパミン作動薬のみであり、何れも寛解率は低い。クッシング病の腫瘍化（細胞増殖）と ACTH 自律産生分泌獲得の原因として、いくつかの遺伝子の変異や、EGFR シグナルの活性化などが示されている一方で、ACTH の前駆体である *POMC* 遺伝子の、グルココルチコイド (GC) による転写抑制機構への抵抗性についての詳細な検討報告は少ない。GC 受容体 (GR) の不活型変異、heat shock protein 90 あるいは核内受容体 TR4 の過剰発現、GR と転写因子 NR4A1 の競合、BRG1 ならびにヒストン脱アセチル化酵素の発現低下が GC 抵抗性に寄与していることがわかっているのみである。

2. 研究の目的

GC による *POMC* ネガティブフィードバックのメカニズム、ひいてはクッシング病における GC 抵抗性の機序の詳細を明らかにすることが、新たな ACTH 抑制療法の開発につながると思われる。

本研究では 2 つの解析ツールを組み合わせ、マウス ACTH 産生下垂体腫瘍細胞株 AtT-20 細胞における *Pomc* 転写を制御する新規ゲノム領域やエンハンサー RNA (eRNA) を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

AtT-20 細胞を用いて Cap analysis of gene expression; CAGE (文献 1) と *Pomc* プロモーター、既知のエンハンサーに対する遺伝子座特異的クロマチン免疫沈降法; enChIP (文献 2) を用い、それぞれがオーバーラップする部分を抽出し、その部分を RNA 干渉や強制発現させることで *Pomc* の発現に変化が起こるかについて定量 PCR とレポーターアッセイで評価した。

4. 研究成果

AtT-20 細胞において、CAGE 解析からは 12,000 か所の de novo Enh 候補領域が得られた。

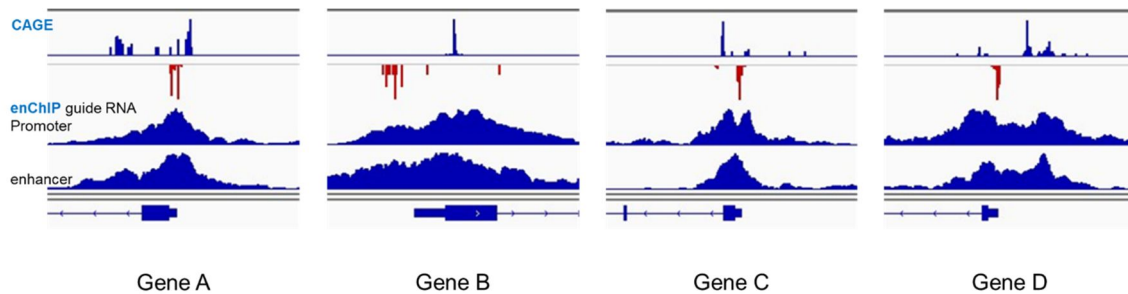
しかし、先行研究で得られた活性化 Enh のマーカーと考えられている Mediator complex のクロマチン免疫沈降シークエンスの data と、CAGE から得られた data には乖離が生じており、*Pomc* 遺伝子転写調節には Mediator complex の誘導に依存する部分、しない部分があることが確認された。

次に Guide RNA を既知の *Pomc* のプロモーター (Prom) あるいはその 7 kb 上流の既知のエンハンサー (Enh) 領域に設定のうえ enChIP を施行し、それぞれが物理的に相互作用していることを確認した。enChIP シークエンスでは、*Pomc* の Prom、あるいは 7 kb Enh と相互作用しているゲノム領域が約 24,000 か所抽出された。

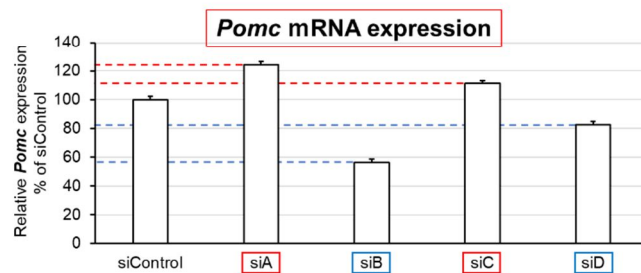
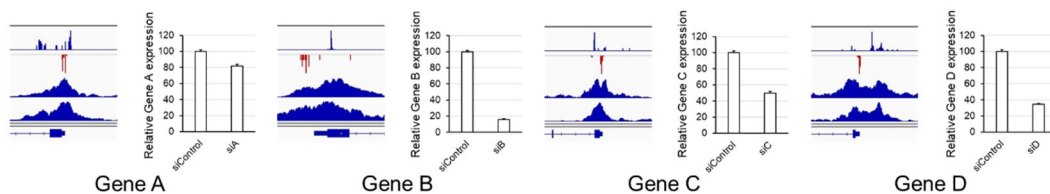
CAGE から得られた活性化 DNA 領域と enChIP シークエンスのピークがオーバーラップしている領域の中で、*Pomc* の Prom/-7kb Enh と相互作用している領域を自身の Prom として使用している遺伝子がいくつか検出された。このうち 4 つの遺伝子について siRNA を用いて knockdown したところ、2 つは *Pomc* 遺伝子発現を正、もう 2 つは負に制御する新たな因子であることが確認された。*Pomc* 遺伝子発現を正に制御する遺伝子の 1 つを強制発現させることで *Pomc* プロモーター活性は増強され、実際の *Pomc* 遺伝子転写調節を行っている因子であることが証明された。

CAGE と enChIP の組み合わせによって *Pomc* 遺伝子発現の新たな調節領域を同定し、ホルモン投与による CAGE シグナルの変化、あるいは enChIP での高次構造の変化を評価することで、ホルモン依存性の *Pomc* 遺伝子調節領域の検索を可能とする新たなシステムを開発した。ヒト ACTH 産生腫瘍細胞の *POMC* 発現調節に関与する因子の検索についても応用が可能となった。

今後 CAGE と enChIP のオーバーラップ部分の抽出を進め、新規 *Pomc* 遺伝子転写調節領域のうち有意な 2 つを選択し、ガイド RNA と CRISPR-Cas9 をレンチウイルスによって AtT-20 細胞に安定的に導入してゲノム編集を行い、RNA シークエンス (RNA-seq) 解析することによって標的遺伝子を同定する。GC 添加後の変化についても同様に検討し、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery を用いて KEGG®へのマッピングや gene ontology 解析からパスウェイを推定し、関連する遺伝子やタンパク質の増減を定量 PCR、western blotting 法、阻害剤等を用いて確認し、詳細なシグナル伝達メカニズムを同定することを目標とし、現在解析を進めている。



それぞれの遺伝子を siRNA を用いて knockdown



Gene A と C は *Pomc* の repressor、Gene B と D は activator として働いている可能性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高安 忍
2. 発表標題 マウス下垂体ACTH産生細胞株AtT-20におけるシグナル依存性/非依存性遺伝子の転写調節機構
3. 学会等名 第47回日本神経内分泌学会学術総会 （招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------