

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24591365
研究課題名(和文)下垂体腺腫におけるマイクロRNA分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Network of microRNA in pituitary adenomas

研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90201863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：正常下垂体に比べACTH産生腺腫で低発現を示したmiR-551bを、ACTH産生細胞由来細胞株AtT-20に過剰発現させると細胞増殖が抑制された。

miR-551bの標的遺伝子候補の一つであるERBB4 mRNAを高発現しているACTH産生腺腫を認めた。さらにmiR-551bとルシフェラーゼ-ERBB4 3'UTRを含むレポータープラスミドの導入細胞のルシフェラーゼアッセイにより、ERBB4がmiR-551bの標的遺伝子であることを示した。ACTH産生腺腫におけるmiR-551bの低発現と、そのプロモーター部位のCpGアイランドのメチル化には関連性を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Transfection of miR-551b, which were underexpressed in human ACTH-producing pituitary adenomas, was found to suppress cell growth of AtT-20 cells, a cell line of mouse ACTH-producing tumors.

We found several human ACTH-producing adenomas in which high expression of ERBB4 mRNA, one of target candidate genes of miR-551b, were observed. We confirmed that ERBB4 mRNA was a target of miR-551b by co-transfection of miR-551b and a reporter plasmid including luciferase-ERBB4 3'-untranslated region in HEK293 cells. Positive correlation between low expression of miR-551b and methylation status of CpG islands in the possible promoter of miR-551b gene was not found.

研究分野：内分泌学

キーワード：下垂体 腫瘍化 microRNA ACTH産生腺腫

1. 研究開始当初の背景

下垂体腺腫においては、GH 産生腺腫の約半数で Gsa 蛋白質をコードする遺伝子の体細胞変異が認められる以外は、特定の遺伝子変異は報告されていない。そのため下垂体腺腫の発症機序に遺伝子の転写・翻訳後調節の破綻が関与していることが示唆される。

2. 研究の目的

miRNA は mRNA 発現制御に関わる機能分子で、癌などの種々の疾患における発現異常が報告されている。そこで、本研究では各タイプの下垂体腺腫で特徴的な発現を示す miRNA の同定と、その機能解析を行い、下垂体腺腫発症への miRNA の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常下垂体および GH 産生腺腫、PRL 産生腺腫、ACTH 産生腺腫、FSH/LH 腺腫、ナルセル腺腫の下垂体腫瘍組織を用いた。

(2) 細胞培養

下垂体細胞株として AtT-20、αT3-1 および LBT2、GH3 および MtT/S、MMQ、RC-4B/C を用いた。また細胞増殖の検討及びルシフェラーゼアッセイには、293FT 細胞と AtT-20 細胞を用いた。

(3) miRNA 発現量測定

各下垂体腺腫、マウス組織および細胞株から ISOGEN 口を用いて、small RNA 画分を含む total RNA を抽出した。total RNA を鋳型として、各 miRNA に対応する逆転写用プライマーと TaqMan MicroRNA RT Kit を用いて cDNA を合成した。cDNA を鋳型に各 miRNA 特異的プライマー及びプローブを用いて、7300 real-time PCR System による定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) により miRNA 発現量を評価した

内部標準の小分子 RNA としてヒト腫瘍サンプルでは RNU44 および RNU48 を、マウス組織では snoRNA202 (sno202) を、マウス由来細胞株およびラット由来細胞株では RNU6B (U6) を用いた。各 miRNA 発現量を、それぞれの内部標準の発現量に対する相対値として表した。

(4) 細胞増殖の評価

miR-132, miR-551b の pre-miRTM miRNA precursor を、Effectene Transfection Reagent により導入した。導入後 0、1、2、3 日目の細胞に 20 μl/well の Cell Counting Kit 8 を加え 3 時間培養後、450 nm の吸光度を測定した。

(5) miRNA の標的遺伝子候補の検索

それぞれ独自のアルゴリズムで miRNA の標的を検索するオンラインプログラムである Target Scan などを用い、細胞増殖との関連性や腫瘍での発現異常が報告されている遺伝子を選別した。

(6) mRNA 発現量測定

miRNA の発現量測定と同様に small RNA 画分を含む total RNA を抽出した。total RNA を鋳型として、Primescript RT reagent kit を用いて cDNA を合成し、それぞれの遺伝子に対しての特異的プライマーを用いた。

(7) ルシフェラーゼアッセイ

miR-551b の標的遺伝子候補である Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog-4 (ERBB4) 遺伝子の miR-551b 結合予測領域を含む約 1 kb の 3'-非翻訳領域をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを構築した。293FT を 24 穴プレートに播種し、0.2 μg のルシフェラーゼ発現ベクターと 30 nM pre-NC あるいは pre-miR-551b precursor を各ウェルに Effectene を用いて導入した。導入後 2 日目の細胞中のルシフェラーゼ活性を Dual-Glo Luciferase Assay System を用いて Mithras LB940 で測定した。

(8) メチル化解析

各 2 例の正常下垂体組織と ACTH 産生腺腫における miR-551b のプロモーター領域のメチル化解析をバイサルファイトシーケンシング法により行った

4. 研究成果

マイクロアレイ解析のデータから、各タイプの腺腫で特徴的な発現を示す miRNA 候補を選別し、各タイプの下垂体腺腫でのそれらの miRNA 発現量を qRT-PCR で検証した。

正常下垂体、GH、PRL、ACTH、FSH/LH、ナルセルの各腺腫間で発現量に差異が認められる miRNA を同定した。このうち正常下垂体と ACTH 産生腺腫あるいは FSH/LH 産生腺腫間で顕著な発現量の差異が認められた miR-132、miR-137、miR-551b について、マウスの各組織での発現量を比較検討し、これらが下垂体と大脳で高発現していることを示した。

ACTH 産生腺腫で低発現を示した miR-132 および miR-551b を、ACTH 産生細胞由来細胞株 AtT-20 に過剰発現させると細胞増殖が抑制されたが、ヒト腎線維芽細胞株 293FT 細胞では抑制が認められなかったことから、これらの miRNA が ACTH 産生細胞特異的に細胞増殖を抑制することを示した。

miR-551b の標的遺伝子候補を in silico 解析により検討し、候補遺伝子として選んだ ERBB4 mRNA を高発現している ACTH 産

生腺腫を認めた。さらに miR-551b とルシフェラーゼ-ERBB4 3'UTR を含むレポータープラスミドの導入細胞のルシフェラーゼアッセイにより、ERBB4 が miR-551b の標的遺伝子であることを示した。ACTH 産生腺腫における miR-551b の低発現と、そのプロモーター部位の CpG アイランドのメチル化には関連性を認めなかった。

以上のように、本研究は各種下垂体腺腫において特徴的な発現を示す miRNA を新たに同定し、そのうち ACTH 産生腺腫で低発現を示す miR-551b が、ERBB4 の高発現を介して腫瘍発症に関与する可能性を初めて見出した。

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4件)

T Iwata, T Tamanaha, R Koezuka, M Tochiya, H Makino, I Kishimoto, N Mizusawa, S Ono, N Inoshita, S Yamada, A Shimatsu, K Yoshimoto. Germline deletion and a somatic mutation of the PRKAR1A gene in a Carney complex-related pituitary adenoma. *Eur J Endocrinol* 2015;172(1):K5-10. (査読あり)

Li XH, Wang EL, Zhou HM, Yoshimoto K, Qian ZR. MicroRNAs in Human Pituitary Adenomas. *Int J Endocrinol*. 2014;435171. (査読あり)

Iwata T, Yamada S, Ito J, Inoshita N, Mizusawa N, Ono S, Yoshimoto K. A Novel C-terminal Nonsense Mutation, Q315X, of the Aryl Hydrocarbon Receptor-Interacting Protein Gene in a Japanese Familial Isolated Pituitary Adenoma Family. *Endocr Pathol*. 2014;25(3):273-281. (査読あり)

Nakano-Tateno T, Tateno T, Hlaing MM, Zheng L, Yoshimoto K, Yamada S, Asa SL, Ezzat S. FGFR4 Polymorphic Variants Modulate Phenotypic Features of Cushing Disease. *Mol Endocrinol*. 2014;28(4):525-533. (査読あり)

[学会発表](計11件)

肥塚諒、玉那覇民子、菱田藍、椽谷真由、大畑洋子、榎野久士、島津章、岩田武男、吉本勝彦、井下尚子、山田正三、岸本一郎。PRKAR1A を含む広範な胚細胞性欠失を認めた下垂体性巨人症の一例。第24回臨床内分泌代謝 Update 2014年11月28日-29日 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

小野信二、岩田武男、水澤典子、岩脇有軌、吉本勝彦。ACTH 産生腺腫で低発現を認めた miR-551b の腺腫発症への関与。

第56回歯科基礎医学会学術大会・総会

2014年9月25日-27日 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

小野信二、岩田武男、水澤典子、山田正三、吉本勝彦。成長ホルモン産生腺腫における PRKACA 遺伝子活性化変異の検討。第14回日本内分泌学会四国地方会 2014年9月6日 徳島大学 (徳島県・徳島市)

肥塚諒、玉那覇民子、菱田藍、椽谷真由、大畑洋子、榎野久士、島津章、岩田武男、吉本勝彦、井下尚子、山田正三、岸本一郎。下垂体腫瘍組織に PRKAR1A 遺伝子の体細胞変異を認めた下垂体巨人症の一例。第86回京都内分泌同好会 2014年3月1日メルパルク京都 (京都府・京都市)

小野信二、岩田武男、水澤典子、吉本勝彦。下垂体腺腫における miRNA 発現解析。第55回歯科基礎医学会学術大会・総会 2013年9月20日-22日 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

Katsuhiko Yoshimoto. Mechanisms of tumorigenesis in GH adenomas. 2nd Pituitary Expert Meeting in Asia. August 30-31, 2013. Lotte Hotel Seoul (Seoul・Korea)

吉本勝彦。ホルモンとがん。第42回国歯学会例会 2013年3月28日 徳島大学 (徳島県・徳島市)

吉本勝彦。遺伝性・家族性の下垂体腫瘍の基礎と臨床。第22回臨床内分泌代謝 Update 2013年1月19日 大宮ソニックシティ (埼玉県・さいたま市)

福井崇人、福原紀章、西岡宏、井下尚子、鈴木尚宣、竹下章、竹内靖博、岩田武男、吉本勝彦、山田正三。GH 産生巨大下垂体腺腫の臨床的および組織学的特徴の検討。日本脳神経外科学会第71回学術総会 2012年10月17日-19日、帝国ホテル大阪 (大阪府・大阪市)

Tae Tateno, Toru Tateno, Lei Zheng, Maw Maw Hlaing, Katsuhiko Yoshimoto, Shozo Yamada, Sylvia Asa, Shereen Ezzat. The FGFR4 Transmembrane Polymorphism Signals through Distinct Stat3 Modifications To Regulate Corticotroph Hormone Feedback and Cell Growth *ENDO* 2012: The 94th Annual

Meeting & EXPO June 23-26, 2012
George R. Brown Convention Center
(Houston・Texas・USA)

安藤明彦、長坂昌一郎、高橋仁麗、野牛
宏晃、大須賀淳一、水澤典子、吉本勝彦、石
橋俊、原発性アルドステロン症・サブクリニカ
ル Cushing 症候群を合併した家族性副甲状
腺機能亢進症の 1 例. 第 85 回日本内分泌学
会学術総会 2012 年 4 月 19 日-21 日 名
古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

〔図書〕(計 3 件)

Katsuhiko Yoshimoto, Takeo Iwata,
Noriko Mizusawa, Zhi Rong Qian,
Shahidan Wan Nazatul Shima, Shinji Ono,
Kyoko Ishimoto. Pituitary adenomas: role
of cyclin-dependent kinase inhibitors.
Tumors of the Central Nervous System,
Volume 10 Pineal, Pituitary, and Spinal
Tumors Hayat, M.A. (Ed.) Springer,
2013, 349 p (p133-139)

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子、小野信
二. アクロメガリーの発症にかかわる遺伝
子異常. 78 頁 (39-44 頁) 改訂版
Acromegaly Handbook 監修 千原和夫、寺
本明、島津章 メディカルレビュー社 発行
日 2013 年 7 月 1 日

吉本勝彦、岩田武男、水澤典子. 遺伝
性・家族性下垂体腫瘍. 300 頁(200-201 頁)
下垂体疾患診療マニュアル 編集: 平田結喜
緒、山田正三、成瀬光栄 診断と治療社 発
行日 2012 年 4 月 20 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 勝彦 (YOSHIMOTO, Katsuhiko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部・教授

研究者番号: 90201863

(2) 研究分担者

岩田 武男 (IWATA, Takeo)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号: 10350399

水澤 典子 (MIZUSAWA, Noriko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号: 80254746