

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670034

研究課題名(和文)下垂体前葉からの分泌型miRNAの同定と内分泌因子としての作用の解明

研究課題名(英文)Identification and study of miRNA in anterior pituitary gland

研究代表者

田上 昭人(Tanoue, Akito)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・薬剤治療研究部・部長

研究者番号：60301800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下垂体機能、特に成長ホルモン(GH)産生細胞におけるmiRNAに注目し検討するため、GH産生細胞特異的にmiRNA成熟化に関わるDgcr8を欠損するGH-cre;Dgcr8f/fマウスを作成し、表現型の解析を行った。GH-cre;Dgcr8f/fマウスは野生型マウスに比べ低体重を示し、下垂体の矮小化が認められた。また、GH産生を制御するmiRNAの同定を行うため、GH産生細胞とGH非産生細胞におけるmiRNA発現プロファイルを比較し、GH産生細胞において発現が高い複数のmiRNAを同定した。また、GH産生細胞由来エキソソームが他の細胞へ取り込まれることを確認した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated growth hormone (GH) producing cell (somatotroph)-specific Dgcr8 deficient (GH-cre;Dgcr8f/f) mouse, which is maturation enzyme of pro-miRNA, and found that these mouse showed underweight and small pituitary gland. Furthermore, to identify miRNAs which regulate GH production, we compared the miRNA expression profiles between GH producing cells and GH non-producing cells and found that several miRNA were expressed significantly higher in GH-producing cells than in GH-non-producing cells. In addition, we found that exosomes including miRNA derived from GH-producing cells were uptake into other cells. These results suggest that miRNA in GH-producing cell is important to cell differentiation and/or hormone production in GH producing cells and miRNA derived from GH-producing cells regulate other cell functions.

研究分野：小児科学・分子薬理学

キーワード：miRNA 下垂体

## 1. 研究開始当初の背景

下垂体前葉ホルモン(成長ホルモン(GH)、プロラクチン(PRL)、甲状腺刺激ホルモン(TSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、性腺刺激ホルモン(GTH))の産生・分泌は、間脳視床下部で産生され正中隆起外層から下垂体門脈系へ放出される各種下垂体ホルモン産生細胞刺激ホルモンにより制御される。つまり、視床下部からの刺激ホルモンによって下垂体前葉のホルモン産生細胞が刺激され、各下垂体ホルモンが分泌され末梢の標的器官の機能を制御する。このように下垂体は視床下部と標的器官のインタフェースとして捉えられ、生体恒常性を維持する上で重要な器官である。一方、近年マイクロRNA(miRNA)による遺伝子発現・翻訳制御機構と生体恒常性維持・疾患発症との関連が注目されている。18-25塩基長の小さな一本鎖RNAであるmiRNAの機能は、遺伝子発現を負に調節することである。哺乳類において、miRNAは発生、分化、増殖、がん化およびアポトーシスなどの細胞機能の根幹に関わっていると考えられている。このmiRNAは2000種類以上存在しており、様々な遺伝子発現様式を介して最終的に細胞の機能制御に関わっていると考えられている。疾患領域においては特に癌とmiRNAの関係が精力的に研究され、ある種のmiRNAの発現量の亢進が細胞のがん化を誘発していることが明らかにされている。また、最近の研究から、miRNAは細胞内のみならず、細胞から放出される小胞であるエクソソームに封入され細胞外に分泌され、周囲の細胞に伝播・取り込まれることにより周囲の細胞の機能を調節することが示されている。このことは、miRNAが液性因子と同様に、傍分泌的に作用する可能性を示している。また、血液中にもmiRNAの存在が認められており、このことはmiRNAが遠隔臓器間を伝播する可能性を示唆する。

## 2. 研究の目的

本研究では、下垂体前葉ホルモン産生細胞、特にGH産生細胞に注目し、GH産生細胞より合成・分泌されるmiRNAを同定した。また、同定したmiRNAの作用を、下垂体機能制御の面から検討し、下垂体由来分泌型miRNAが新規内分泌因子“miRNAホルモン”として遠隔臓器機能を制御する可能性を検証した。本研究はmiRNAの合成・エクソソームへの封入、エクソソームの分泌、エクソソームの標的細胞への融合、分泌型miRNAの標的細胞への作用を内分泌系の中核である下垂体を中心に検討し、新規の内分泌因子としての“miRNAホルモン”の可能性を探求する研究であり、これまでの内分泌系の概念に新たな概念を加えようとする挑戦的な研究である。本研究は、単一の細胞・組織内でのみの現象にとどまらず、遠隔臓器間の情報伝達・相互作用をmiRNAの側面より明らかにするものであり、本研究により得られる知見は、内分泌代謝分

野における基礎科学および基礎医学的知見を大きく発展させるものである。

## 3. 研究の方法

これまでの研究から種々の細胞がエクソソームに封入されたmiRNAを分泌することが明らかになってきているが、分泌型miRNAの内分泌因子としての機能は明らかではない。本研究では、内分泌系の中核を担う下垂体に注目し、miRNAの内分泌因子としての本質に迫る。このため、本研究ではGH産生細胞特異的にmiRNAの成熟化に関わる因子であるDgcr8の遺伝子を欠損したマウスを用い、GH産生細胞におけるmiRNA発現動態とその分泌動態を明らかにし、また培養細胞を用いた細胞上清における分泌型miRNAの同定を行う。さらに、同定した分泌型miRNAの血中レベルを測定し、同定したmiRNAの細胞への取り込みを検討し、下垂体分泌型miRNAの遠隔臓器機能制御の可能性を検証した。

(1) GH産生細胞において発現しているmiRNAの同定と分泌の検討

本研究ではGH産生細胞において発現し分泌されるmiRNAを同定するため以下の検討を行う。

GH産生細胞特異的miRNA欠損マウスの作成  
GH産生細胞が分泌するmiRNAを同定するため、cre-loxPシステムによりGH産生細胞特異的にmiRNAの成熟化に関わる因子であるDgcr8遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウス(GH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>)を作成する。本研究項目はすでに、GH-creマウスとDgcr8-flloxマウスとの交配を開始しており、GH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>マウスの取得に成功している(図1)。今後さらにコロニーの拡大を図り、以下の検討を行っていく。

GH産生細胞において発現しているmiRNAの同定

GH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>マウスは、GH産生細胞特異的に成熟miRNA合成が阻害されていると考えられる。したがって、野生型マウス下垂体およびGH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>マウス下垂体でのmiRNA発現プロファイルと比較し、GH産生細胞で発現しているmiRNAを同定する。さらに、siRNAを用いてGH産生細胞株においてDgcr8をノックダウンし、miRNA発現プロファイルの変化を解析することにより、GH産生細胞で発現しているmiRNAをin vivoおよびin vitroの両面から同定する。

GH産生細胞分泌型miRNAの同定

上記2)において同定したmiRNAがGH産生細胞から分泌されているか検討するため、GH産生細胞株より分泌されるエクソソーム内のmiRNAを単離し、miRNAの発現を検討する。さらに、野生型マウスおよびGH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>マウスの血中miRNA発現動態を比較し、GH-cre;Dgcr8<sup>fl/fl</sup>マウス血中において低下しているmiRNAを同定し、GH産生細胞分泌型miRNAの同定、分泌の評価を行う。

#### 4. 研究成果

(1) GH 産生細胞において発現している miRNA の同定と分泌の検討

GH 産生細胞特異的 miRNA 欠損マウスの作成

Dgcr8 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウト (CKO) マウス (GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup>) を作出したところ、(GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup>) マウスは、野生型マウス (Dgcr8<sup>fl/fl</sup> マウス) に比べ低体重を示し (図 1)、下垂体の矮小化を呈した (図 2)。さらに、血中 IGF-1 濃度の低下を認めた。これらの結果は、GH 産生細胞において miRNA が細胞分化と成長ホルモンの産生を制御していることを示唆する。

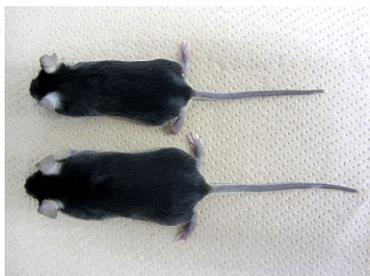


図 1. 野生型マウス (下) と GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup> マウス (上)

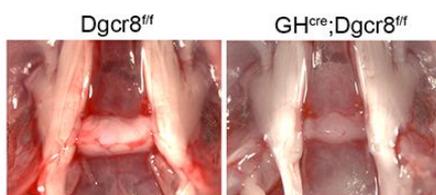


図 2. 野生型マウス (左) と GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup> マウス (右) の下垂体。GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup> マウスで矮小化が認められる

GH 産生細胞において発現している miRNA の同定

GH 産生を制御する miRNA の同定を行うため、下垂体特異的転写因子であり、GH 産生細胞、プロラクチン (PRL) 産生細胞および甲状腺刺激ホルモン (TSH) 産生細胞の分化を規定する Pit1 を発現し GH を産生しない MtT/E 細胞と GH を産生する MtT/S 細胞における miRNA 発現プロファイルを比較し、MtT/S 細胞において発現が高い複数の miRNA を同定した。これら miRNA を MtT/E 細胞へ強制発現させ、GH 産生を制御する複数の miRNA を同定した。その一つである miR-200c は GH 遺伝子発現を抑制すると考えられる転写抑制因子 Zeb1 を標的とし、MtT/E 細胞においても、miR-200c の強制発現により Zeb1 発現が低下した。

GH 産生細胞分泌型 miRNA の同定

GH-cre; Dgcr8<sup>fl/fl</sup> マウス血中において野生型マウスと比べ発現が変動している複数の miRNA を同定した。これらの結果から、GH 産生細胞に由来する miRNA が血中に存在する可

能性が考えられた。一方、下垂体 GH 産生細胞の培養上清よりエクソソームを単離し、内包する RNA を蛍光ラベルした後、他の下垂体細胞培養株へ添加したところ、蛍光シグナルが他の細胞へ取り込まれる像を観察した (図 3)。このことは、下垂体 GH 産生細胞由来のエクソソームに内包される miRNA が下垂体の他の細胞に伝播することを示し、下垂体内において細胞間コミュニケーションのツールとして、エクソソームに内包される miRNA が利用されている可能性を示す。

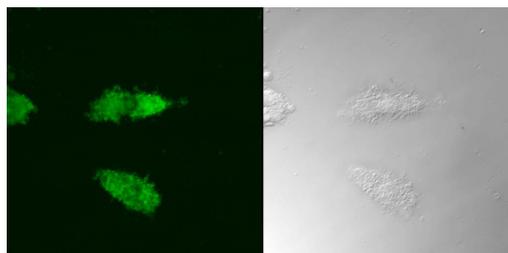


図 3. 下垂体細胞間のエクソソームの取り込み。GH 産生細胞の培養上清から精製したエクソソームを蛍光標識し、GH 非産生細胞へ添加して、その取り込みを観察した (左)、エクソソームが下垂体細胞間を伝播することが確認できた。右: 明視野像

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Akama T, Luo Y, Sellitti DF, Kawashima A, Tanigawa K, Yoshihara A, Ishido Y, Nakamura K, Tanoue A, Suzuki K. Thyroglobulin increases thyroid cell proliferation via the suppression of specific microRNAs. *Molecular Endocrinology*. 2014 28, 368-379.

[学会発表] (計 1 件)

中村和昭、相澤和子、堀尚子、Kyaw Htet Aung、田上昭人、マイクロ RNA による下垂体 GH 産生制御機構の解析、第 29 回日本下垂体研究会学術集会 (2014、八王子)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 昭人 (TANOUE, Akito)  
国立成育医療研究センター研究所・薬剤治療研究部・部長  
研究者番号: 60301800

(2) 連携研究者

中村 和昭 (NAKAMURA, Kazuaki)  
国立成育医療研究センター研究所・薬剤治療研究部・実験薬理研究室・室長  
研究者番号: 80392356

(3)協力研究者

相沢 和子 (AIZAWA, Kazuko)

Kyaw Htet Aung (Kyaw Htet AUNG)