

人情報が機関外に漏洩しないよう資料や解析データは厳重に管理している。また成果のとりまとめを行い、内外の学会や学術雑誌に積極的に研究成果の発表を行ったが、発表に際しては個人情報漏洩することがないように、また患者や家族に不利益が生じないように十分配慮した。なお本研究計画に基づき実施する遺伝子組換え実験は、神戸大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得たものであり、カルタヘナ法に則して神戸大学遺伝子組換え実験実施規則に基づき、これを遵守して行った。また、動物実験においては学内の動物実験倫理委員会の承認を得た上で、学内規則に則り動物愛護の精神を持って行った。

C. 研究成果

69例のAGHD患者を対象に、健常コントロール1994例から年齢、性別、BMIをマッチさせた83例と比較したところ、AGHD群ではNAFLD、NASHの合併頻度がそれぞれ77%（コントロールの6.4倍）、21%と著明に上昇していた。そして6-12ヶ月のGH補充療法によって肝機能、線維化マーカーの改善、治療前後で肝生検によって確認出来た症例においては、NAFLD activity score (NAS) においても有意な組織学的改善を認めた。その機序を明らかにするためにGH欠損ラットを用いて解析を行ったところNASHを認めるとともに酸化ストレス上昇、ミトコンドリア形態異常を伴っていた。そして1ヶ月のGHあるいはIGF-I投与を行ったところいずれにおいても生化学的、組織的改善を認めた。さらに一般のNASHモデル動物であるコリン、メチオニン欠乏食負荷db/dbマウスに対して1ヶ月のGHあるいはIGF-I投与を行ったところ、GHとくにIGF-Iで組織学的改善を認めた。そしてその機序として酸化ストレス、ミトコンドリア機能の改善

と星細胞の活性抑制を介していることが明らかとなった。

D. 考察

今回、AGHDには肥満と独立してNAFLD合併が関連していることが明らかになった。さらに予後の悪いNASHも高頻度に合併していた。AGHDに伴う代謝異常として内臓肥満に関連して脂質、糖代謝異常が増加することが知られているが、今回の結果はNAFLDも重要な合併症であることを示唆している。特にNASHは予後の悪い病態であるため、AGHDの予後の悪化に関わる可能性があり、NAFLD/NASHの有無を念頭に置いたGH補充療法が重要である。

AGHDにおけるNAFLDの増加は、内臓肥満、インスリン抵抗性が深く関わっていると考えられるが、今回の結果はそれに加えて肝臓においてGHが主にIGF-Iを介して肝臓における代謝、線維化抑制に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。一般にIGF-I受容体は肝細胞自身にはほとんど発現していないことが報告されているが、今回IGF-Iが作用した機序としては、①内臓脂肪などIGF-I受容体を発現した臓器の代謝異常改善を介した間接作用、②インスリン受容体を介した作用、③炎症などで発現が増強したIGF-I受容体を介した作用が考えられる。また線維化を調節している星細胞にはIGF-I受容体が発現しているため、IGF-Iが星細胞機能を直接調節している可能性が示唆されている。

私たちはGH/IGF-Iが、AGHDに合併したNASHのみならず、一般のNASHモデルにおいても改善効果、特に線維化抑制を示すことを明らかにした。NASHにおいては予後不良が線維化と関連していることが報告されてい

ることから、GH/IGF-Iによる一般のNASHに対する治療応用は、NASHの予後を改善するために寄与できる可能性がある。

E. 結論

今回の結果は、GH/IGF-I系の肝臓における本質的な役割とNAFLD/NASHがAGHDに伴う代謝異常の重要な表現型のひとつであること、さらにGH/IGF-Iが一般のNASH治療で有用である可能性を示している。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

(著書)

- 1) 高橋 裕：総合医学社，代謝・内分泌疾患診療最新ガイドライン，成人GH分泌不全症 2012, in press
- 2) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル，成長ホルモン，診断と治療社 2012, in press
- 3) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル，先端巨大症 診断と治療社 2012, in press
- 4) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル，成人GH分泌不全症 診断と治療社 2012, in press
- 5) 高橋 裕：下垂体診療マニュアル，ドーパミンアゴニストと心臓弁膜症，診断と治療社 2012, in press
- 6) 井口元三，高橋 裕：下垂体診療マニュアル，抗PIT-1抗体症候群，診断と治療社 2012, in press
- 7) 井口元三，高橋 裕：下垂体診療マニュアル，下垂体の転写因子，診断と治療社 2012, in press
- 8) 井口元三，高橋 裕：下垂体診療マニ

アル，下垂体茎断裂症候群，診断と治療社 2012, in press

(英文論文)

- 1) Takahashi M, Okimura Y, Iguchi G, Nishizawa H, Yamamoto M, Suda K, Kitazawa R, Fujimoto W, Takahashi K, Zolotaryov FN, Hong KS, Kiyonari H, Abe T, Kaji H, Kitazawa S, Kasuga M, Chihara K, Takahashi Y. Chemerin regulates β -cell function in mice. *Scientific Reports* 2011, 1 123DOI:10. 1038/srep00123
- 2) Handayaningshi AE, Iguchi G, Fukuoka H, Nishizawa H, Takahashi M, Yamamoto M, Herningtyas HE, Okimura Y, Kaji H, Chihara K, Seino S, Takahashi Y Reactive oxygen species play an essential role in IGF-I signaling and IGF-I-induced myocyte hypertrophy in C2C12 myocytes. *Endocrinology* 2011, 152: 912-21
- 3) Yamamoto M, Iguchi G, Takeno R, Okimura Y, Sano S, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningshi AE, Fukuoka H, Tobita M, Saitoh T, Tojo T, Mokubo A, Morinobu A, Iida K, Kaji H, Seino S, Chihara K, Takahashi Y Adult combined GH, prolactin and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody in humans. *J Clin Invest* 2011, 121: 113-9
- 4) Hashimoto N, Kawamura Y, Nakamura T, Murawaki A, Nishiumi T, Hirota Y, Sakagushi K, Kurahashi T, Miyake H, Fujisawa M, Sasano H, Takahashi Y A case of primary aldosteronism caused by multiple adrenocortical macronodules. *Intern Med* 2011, 50: 585-90

(和文論文)

- 1) 高橋 裕：CKDと成長ホルモン(総説) ホ

- ルモンと臨床 58: 1-4, 2011
- 2) 高橋 裕: 視床下部腫瘍(総説). 日本臨床 増刊号 69: 142-145, 2011
 - 3) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症の成人期管理(総説). ホルモンと臨床 58: 41-45, 2011
 - 4) 高橋 裕: 遺伝学的解析から明らかになる内分泌代謝系と寿命調節(総説). 成長・代謝 2: 3-4, 2011
 - 5) 井口元三, 山本雅昭, 高橋 裕: 抗PIT-1抗体症候群(総説). 内分泌・糖尿病科 33: 240-246, 2011
 - 6) 高橋 裕: 先端巨大症(総説). 今日の臨床サポート 2012, in press
 - 7) 高橋 裕: 小児内分泌疾患のトランジション(総説). 小児科診療 2012, in press
 - 8) 高橋 裕: 症例に学ぶNASH/NAFLDの診断と治療: 成人成長ホルモン分泌不全症にNASHが合併し成長ホルモンが著効した症例. 診断と治療, 別冊 2012, in press
 - 9) 高橋 裕: 自己抗体研究の新展開: 内分泌領域の自己抗体研究の進歩(総説). 臨床化学 2012, in press
 - 10) 高橋 裕: 内分泌疾患-疑うヒントと専門医へ紹介するポイント-先端巨大症(総説). 診断と治療 2012, in press
 - 11) 高橋 裕: 知っておきたい内科症候群, 抗PIT-1抗体症候群(総説). 内科 2012, in press
 - 12) 高橋 裕: 下垂体機能低下症を呈する新たな疾患概念, 抗PIT-1抗体症候群(総説). 成長・代謝 2012, in press
2. 学会発表
(国際学会)
- 1) Nishizawa H, Iguchi G, Takahashi M, Yamamoto M, Suda S, Okimura Y, Kaji K, Chihara K, Takahashi Y. GH and IGF-I

- ameliorate liver steatosis and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis mouse model. The 93th Annual Meeting of the Endocrine Society, 2011
- 2) Suda K, Iguchi G, Yamamoto M, Handayaningsih AE, Nishizawa H, Takahashi M, Okimura Y, Kaji K, Chihara K, Takahashi Y. A case of gigantism associated with a missense mutation in SOCS2 gene. The 93th Annual Meeting of the Endocrine Society, 2011
 - 3) Takahashi Y, Yamamoto M, Iguchi G, Takeno, R Okimura Y, Sano T, Takahashi M, Nishizawa H, Handayaningsih AE, Tojo K, Mokubo A, Iida K, Kaji K, Chihara K. Novel autoimmune polyendocrine syndrome: Adult combined GH, prolactin and TSH deficiency associated with circulating PIT-1 antibody. The 93th Annual Meeting of the Endocrine Society, 2011
- (国内学会)
- 1) 高橋 裕: GH, IGF-Iの肝臓における新たな作用の解明(厚労省班会議)間脳下垂体機能障害に関する調査研究(難治性疾患克服研究事業班会議), 2012
 - 2) 高橋 裕: 成長ホルモン, IGF-Iの肝臓における新たな作用と治療応用. (イブニングセミナー). 第21回臨床内分泌代謝: Update, 2012
 - 3) 高橋 裕: 成人GH分泌不全症におけるNAFLD/NASH発症を防止するためのGH補充療法(シンポジウム). 第22回日本間脳下垂体腫瘍学会, 2012
 - 4) 高橋 裕: 新しい下垂体の病気の発見とその意義(市民公開講座). 間脳下垂体機能障害に関する調査研究(難治性疾患克服研究事業班会議), 2011

- 5) 高橋 裕：成人GH分泌不全症をきたす新たな疾患概念－後天性GH, PRL, TSH欠損症－(スポンサーセッション). 第20回臨床内分泌代謝：Update, 2011
- 6) 高橋 裕：成人GHDの合併症としてのNAFLD/NASH－トランジションに関する問題点－(シンポジウム). 第20回臨床内分泌代謝：Update, 2011
- 7) 高橋 裕：新たな多腺性自己免疫症候群：抗PIT-1自己抗体と関連した後天性GH, PRL, TSH欠損症(特別講演). 第6回KOPEM-MDC(慶応大学医学部セミナー), 2011
- 8) 高橋 裕：下垂体機能低下症をきたす新たな疾患概念 後天性GH, PRL, TSH欠損症(特別講演). 第5回長崎間脳下垂体疾患カンファレンス, 2011
- 9) 高橋 裕：成人GHDの合併症としてのNAFLD/NASH－臨床的意義, メカニズムと臨床応用(シンポジウム). 第84回日本内分泌学会学術総会, 2011
- 10) 高橋 裕：寿命, 代謝を制御する成長ホルモン/IGF-IとNAFLD/NASHの密接な関係(シンポジウム). 第11回日本抗加齢医学会総会, 2011
- 11) 高橋 裕：GH-IGF-I系, Sirt1による寿命調節機構とその意義について考える. GH/IGF-I & Longevity Meeting, 2011
- 12) 高橋 裕：下垂体機能低下症をきたす新たな疾患概念 後天性GH, PRL, TSH欠損症(特別講演). 第11回日本内分泌学会九州地方会, 2011
- 13) 高橋 裕：GHDのトランジションをめぐる問題～イントロダクション(ワークショップ). Forum on Growth Hormone Research, 2011
- 14) 高橋 裕：先端巨大症update 基礎(シンポジウム). アクロメガリーフォーラム, 2011
- 15) 高橋 裕：下垂体機能低下症をきたす新たな疾患概念 後天性GH, PRL, TSH欠損症(ランチョンセミナー). 第38回日本神経内分泌学会学術集会, 2011
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

MEN1 の内分泌臓器特異的腫瘍発生と MLL/p27^{Kip1} 経路

研究分担者 森 昌朋 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学
研究協力者 山田 正信 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学
田口 亮 群馬大学大学院医学系研究科病態制御内科学

研究要旨:多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)は、副甲状腺や下垂体、膵島などの内分泌臓器特異的に腫瘍が発生する。MEN1の遺伝子産物であるmeninはヒストンメチルトランスフェラーゼ活性を持つmixed lineage leukemia(MLL)と核内複合体を形成し、p27^{Kip1}やp18^{Ink4c}遺伝子発現を制御している。今回我々は、MEN1における内分泌臓器特異的腫瘍発生機構の解明のため、野性型、Men1及びMLLノックアウトマウス(Men1KO、MLLKO)を用いてMen1、MLL、p27^{Kip1}、p18^{Ink4c}発現について検討した。Men1KOとMLLKOホモ接合体は胎生致死であり、Men1KOのLOHの起きる以前のヘテロ接合体の12週齢を用い、内分泌臓器と非内分泌臓器での上記発現をmRNA及び蛋白レベルで解析した。Men1 mRNAは非内分泌臓器も含めほぼ均一に発現していた。一方、MLLとp27^{Kip1} mRNAは下垂体や膵島で肝臓の10倍以上の高発現、p18^{Ink4c} mRNAは精巣にて100倍以上の高発現であった。Men1KOではいずれの臓器のMLL、p27^{Kip1}、p18^{Ink4c}発現量の変化はなく、一方、MLLKOでは下垂体のp27^{Kip1}mRNAが約30%低下し、膵島ではp27^{Kip1}、p18^{Ink4c} mRNAともに約40%低下した。これらの変化は蛋白レベルでも確認された。MEN1の下垂体腫瘍を含む内分泌臓器特異的腫瘍発生はMLL以下の内分泌臓器特異的発現とHaploinsufficiencyによって規定されていることが示唆された。

A. 研究目的

多発性内分泌腫瘍症1型(MEN1)は、副甲状腺、下垂体、膵消化管内分泌腺の3腺のうち2腺以上に腫瘍発生を認める症候群である。半数以上が家族性発症で、常染色体優性遺伝形式を示し、MEN1型の80%以上がMen1遺伝子の変異による。Men1は癌抑制遺伝子であり、その発症様式はKnudsonのtwo-hit theoryに従うと考えられ、Men1の片方のalleleに胚細胞変異が存在し、さらにもう一方の正常Men1 alleleに体細胞変異を来して腫瘍が発生するというメカニズム(LOH: Loss of Heterozygosity)が想定される。Men1遺伝子産物はmeninと呼ばれ、少

なくとも3つの核移行シグナルを有することから核内蛋白質であることが示唆されるが、既知の蛋白質との相同性が低く、機能の詳細は不明である。現在までに確認されたmeninに結合する蛋白質は20以上の分子が報告され、それらは転写調節因子群やゲノム安定性に関与する群、細胞分化因子群、細胞周期調節因子群に大別される。この中でも、近年注目されているのがMLL(mixed lineage leukemia)であり、核内において、meninがMLLと巨大複合体(Histone methyltransferase complex, HMT complex)を形成していることが報告された。MLLは染色体転座によりMLLのN端側蛋白質と他の蛋白質の融合蛋

白質を形成し、急性骨髄性白血病の原因となると考えられている。一方で、MLLは、ショウジョウバエの *trithorax* の ortholog として同定され、C端側にはヒストン3のリジン4残基(H3K4)を特異的にメチル化するヒストンメチルトランスフェラーゼ活性をもつSETドメイン構造を持つ。MLL/menin複合体の標的遺伝子として、当初はHox遺伝子群が同定され、さらに腓島にて細胞周期を制御する *p27^{Kip1}* や *p18^{Ink4c}* 遺伝子のプロモーター領域のヒストンに直接作用し転写を活性化していることが明らかとなった。そして、MEN1では *menin* の変異によりMLLのヒストンのメチル化が阻害され *p27^{Kip1}* や *p18^{Ink4c}* 遺伝子の転写活性が低下し、細胞周期制御が破綻すると考えられている。

しかし、なぜ標的組織である内分泌臓器特異的に腫瘍が発生するかは依然として不明である。そこで、今回MEN1における内分泌臓器特異的腫瘍発生機構の解明のため、野生型、Men1及びMLLノックアウトマウス(Men1KO、MLLKO)を用いてMen1、MLL、*p27^{Kip1}*、*p18^{Ink4c}* 発現について検討した。

B. 研究方法

- 1) Men1KOとMLLKOホモ接合体は胎生致死であるため、ヘテロ接合体マウスを用いた。また、Men1KOのLOHの起きる以前の12週齢雄マウスを用いた。
- 2) それぞれのマウスの内分泌臓器(下垂体、腓島、副腎、精巣)と非内分泌臓器(腎臓、大脳、肝臓)におけるMen1、MLL、*p27^{Kip1}*、*p18^{Ink4c}* の mRNA 発現をTaqMan probeを用いたreal-time PCRにて定量的に解析した。
- 3) 同様に上記発現をWestern blot法にて蛋白

レベルで解析した。

C. 研究結果

- 1) 野生型マウスにおけるMen1 mRNAは各臓器において一様な発現を呈したが、副腎、大脳における発現は肝臓の約6倍、約5倍とそれぞれ有意な高値を認めた($n=4$, $p < 0.01$)。標的臓器では下垂体が肝臓の約4倍であったが、精巣や腎臓とほぼ同レベルであった。腓島は肝臓の約2倍と比較的低値であった。MLL mRNAは下垂体において肝臓の約17倍と著明な高値を呈し($n=4$, $p < 0.001$)、腓島、副腎においてもそれぞれ約8倍、約4倍と内分泌臓器において強い発現を認めた($n=4$, $p < 0.01$)。同様に *p27^{Kip1}* mRNAも下垂体において肝臓の約8倍と高値を示し($n=4$, $p < 0.001$)、副腎と精巣においてもそれぞれ約4倍、約3倍と有意な発現を認めた($n=4$, $p < 0.05$)。一方で、*p18^{Ink4c}* mRNAは精巣において肝臓の約120倍と著明な高発現を呈した($n=4$, $p < 0.001$)。
- 2) Men1KOにおけるMen1 mRNAの発現は予想されたように、いずれの臓器においても野生型の約50%のレベルであった。Men1KOにおける各臓器におけるMLL、*p27^{Kip1}*、*p18^{Ink4c}* の発現は、野生型マウスと比較していずれも有意差を認めなかった。
- 3) MLLKOにおけるMLL mRNAの発現は予想されたように、いずれの臓器においても野生型の約50%のレベルであった。MLLKOではMen1KOと異なり、下垂体で *p27^{Kip1}* mRNA の発現が野生型の約70%と有意な低値を呈し、腓島においても *p27^{Kip1}* mRNA、*p18^{Ink4c}* mRNA の発現は、それぞれ野生型の約70%、約60%と有意

な低値を認めた ($n=6$, $p < 0.05$)。この変化は、蛋白レベルでも確認された。Men1 mRNA の発現はいずれの臓器においても野生型と同レベルであった。

D. 考察

MEN1 の原因遺伝子産物である menin は各臓器において一様な発現を呈することが知られ、MEN1 の内分泌臓器特異的腫瘍発生機構の詳細は不明である。近年、Pellegata らは、Men1 遺伝子に変異を認めず、下垂体及び副甲状腺腫瘍を呈し、臨床的にMEN1 型様の表現系を示す一家系において p27^{Kip1} の胚細胞変異を同定した。さらに、2009 年になり、p18^{Ink4c} 遺伝子変異も家族性副甲状腺機能亢進症例において1例報告された。ノックアウトマウスを用いた検討では、p27^{Kip1} ノックアウトマウスや p18^{Ink4c} ノックアウトマウスではそれぞれ下垂体腫瘍が発生する。また、興味深い事に、p27^{Kip1} と p18^{Ink4c} のダブルノックアウトマウスでは下垂体だけでなく、甲状腺や副甲状腺、副腎髄質、膵内分泌腺、精巣に腫瘍形成を呈することが報告されており、menin/MLL- p27^{Kip1}/p18^{Ink4c} 経路の内分泌腫瘍における重要性が示唆される。そのため、今回、私達はMEN1 関連遺伝子である Men1、MLL、p27^{Kip1}、p18^{Ink4c} の発現について、野生型マウス、Men1KO、MLLKO の3種類のマウスを用いて定量的に解析した。Men1 mRNA は以前の報告通り、野生型マウスの各臓器において有意な発現が認められたが、標的臓器である下垂体や膵島における発現レベルは非内分泌臓器である腎臓や大脳とほぼ同程度であった。一方で、MLL や p27^{Kip1} mRNA の発現は内分泌臓器において強い発現を呈し、特に標的臓器である下垂体においてはいずれも著明な高値であっ

た。これらの結果は、MLL- p27^{Kip1} 経路が下垂体をはじめとする内分泌臓器において重要な因子であることを示している。さらに、MLLKO の下垂体や膵島では p27^{Kip1} の有意な発現低下を呈し、この変化はMen1KO では認められなかったことから、MLL の内分泌臓器特異的な Haploinsufficiency が認められた。また、以前に私達のグループが、下垂体細胞株GH4C1 における MLL の過剰発現にて p27^{Kip1} の mRNA 量およびプロモーター活性が増強することを報告した (Clin Cancer Res. 15 (8):2620-9. 2009) が、これらの結果も menin ではなく、MLL が p27^{Kip1} の発現を規定することを示している。以上から、MLL- p27^{Kip1} の内分泌臓器特異的な発現と Haploinsufficiency が MEN1 の内分泌臓器特異性を規定することを示唆する結果となった。

E. 結論

MEN1 の下垂体腫瘍を含む内分泌臓器特異的腫瘍発生は MLL 以下の内分泌臓器特異的発現と Haploinsufficiency によって規定されていることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taguchi R, Yamada M, Horiguchi K, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Mori M. Haploinsufficient and Predominant Expression of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1)-Related Genes, MLL, p27^{Kip1} and p18^{Ink4c} in Endocrine Organs. Biochem Biophys Res Commun.

2011:415:378-383

- 2) Ishida E, Yamada M, Horiguchi K, Taguchi R, Ozawa A, Shibusawa N, Hashimoto K, Satoh T, Yoshida S, Tanaka Y, Yokota M, Tosaka M, Hirato J, Yamada S, Yoshimoto Y, Mori M. Attenuated expression of menin and p27 (Kip1) in an aggressive case of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) associated with an atypical prolactinoma and a malignant pancreatic endocrine tumor. *Endocr J*. 2011; 58:287-296
- 3) Sakurai A, Suzuki S, Kosugi S, Okamoto T, Uchino S, Miya A, Imai T, Kaji H, Komoto I, Miura D, Yamada M, Uruno T, Horiuchi K, Miyauchi A, Imamura M; MEN Consortium of Japan. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 in Japan: Establishment and Analysis of a Multicentre Database. *Clin Endocrinol*. 2011 Sep 27
- 4) Yoshida M, Hiroi M, Imai T, Kikumori T, Himeno T, Nakamura Y, Sasano H, Yamada M, Murakami Y, Nakamura S, Oiso Y. A case of ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *Endocr J*. 2011; 58:269-277.
- 5) Hashimoto K, Matsumoto S, Ishida E, Miura A, Horiguchi K, Ozawa A, Shibusawa N, Satoh T, Yamada M, Yamada S, Mori M. Liver X receptor- α/β expression ratio is increased in ACTH-secreting pituitary adenomas. *Neurosci Lett*. 2011;494:34-37

2. 学会発表

- 1) 小澤厚志, 山田正信, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, MEN1 遺伝子変異を認めない MEN1 型の褐色細胞腫合併例, 第 20 回臨床内分泌代謝 Update, 札幌, 2011
- 2) 小澤厚志, Garay Guerrero J, 田口亮, 山田正信, 森昌朋, 多発性内分泌腫瘍症 1 型の組織特異的腫瘍発生分子メカニズムの解明 モデルマウスの解析, 第 84 回日本内分泌学会学術集会, 神戸, 2011
- 3) 渋沢信行, Garay Guerrero J, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 山田正信, 森昌朋, TRH 遺伝子欠損マウスにおける隣ランゲルハンス島遺伝子発現解析, 第 84 回日本内分泌学会学術集会, 神戸, 2011
- 4) 山田正信, 小澤厚志, 田口亮, 梶博史, 今井常夫, 櫻井晃洋, 本邦の多発性内分泌腺腫症 I 型における MEN1 遺伝子変異陰性例の特徴 p27 並びに p18 遺伝子変異の検討, 第 84 回日本内分泌学会学術集会, 神戸, 2011
- 5) 石田恵美, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 岡田秀一, 山田正信, 清水弘行, 森昌朋, 摂食抑制ペプチド nesfatin-1 の受容体探索と細胞内シグナル伝達, 第 54 回日本糖尿病学会学術集会, 札幌, 2011
- 6) 山田正信, 田口亮, Garay Guerrero J, 小澤厚志, 渋沢信行, 橋本貢士, 佐藤哲郎, 森昌朋, レプチンの TRH-TSH-甲状腺系制御機構, 第 54 回日本糖尿病学会学術集会, 札幌, 2011
- 7) 山田正信, 小澤厚志, 田口亮, 石田恵美, 森昌朋, 梶博史, 今井常夫, 櫻井晃洋, MEN1 遺伝子変異陰性例における p27 ならびに p18 遺伝子の意義: 悪性度の高い MEN I 症例における特徴から, 第 17 回日本家族性腫瘍学会学術集会, 京都, 2011
- 8) 竹越一博, 児玉ひとみ, 緑川早苗, 新里寿美子, 磯部和正, 星野雅也, 川上康, 田村秀樹, 山田正信, 渡邊淳, 櫻井晃洋, SDHB 変異による悪性褐色細胞腫の本邦

- 症例について，第17回日本家族性腫瘍学会学術集会，京都，2011
- 9) 山田正信，田口亮，中島康代，渋谷信行，Garay Guerrero J，小澤厚志，橋本貢士，佐藤哲郎，森昌朋，レプチンの視床下部一下垂体—甲状腺系制御機構：TRHノックアウトマウス (TRHKO) の解析，第32回日本肥満学会学術集会，淡路，2011
- 10) 渋谷信行，Garay Guerrero J，小澤厚志，橋本貢士，佐藤哲郎，山田正信，森昌朋，TRHによる膵臓β細胞FGF21遺伝子発現調節，第54回日本甲状腺学会学術集会，大阪，2011
- 11) 石田恵美，橋本貢士，三浦敦子，佐藤哲郎，岡田秀一，山田正信，清水弘行，森昌朋，摂食抑制因子nesfatin-1の細胞内シグナル伝達と受容体探索，第38回日本神経内分泌学会学術集会，東京，2011
- 12) 小澤厚志，山田正信，田口亮，登丸琢也，渋谷信行，橋本貢士，佐藤哲郎，森昌朋，変異JunDによる膵内分泌腫瘍発症機構：マウスモデルの解析，第38回日本神経内分泌学会学術集会，東京，2011
- 13) 田口亮，山田正信，小澤厚志，渋谷信行，橋本貢士，佐藤哲郎，森昌朋，MEN1の内分泌臓器特異的腫瘍発生はMEN1関連遺伝子の内分泌臓器特異的発現とHaploinsufficiencyが規定する，第38回日本神経内分泌学会学術集会，東京，2011

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

下垂体で高発現する遺伝子の下垂体細胞内や 下垂体関連培養細胞株での発現解析

研究分担者 巽 圭太 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学
研究協力者 高坂 和芳 大阪大学大学院医学系研究科臨床検査診断学

研究要旨：本年度は、下垂体で高発現する遺伝子の機能解析を進める一助として、構造・機能がほとんど解析されていない KIAA1324/maba1 と ARHGAP36/FLJ30058 の下垂体組織内や下垂体関連培養細胞株での遺伝子発現を、ラット下垂体での *in situ* hybridization、ラット下垂体と内分泌腫瘍由来細胞株での RT-PCR により検討した。KIAA1324/maba1 は、ラット下垂体を用いた *in situ* hybridization では前葉及び中間葉の細胞に普遍的に発現を認めた。ARHGAP36/FLJ30058 は、ラット下垂体を用いた *in situ* hybridization では前葉の好酸性細胞に発現を認めた。ところが、内分泌腫瘍由来の GH3 細胞株、AtT-20 細胞株、PC12 細胞株では発現レベルが低かった。従って、ARHGAP36/FLJ30058 がこのような下垂体関連培養細胞株では発現抑制の機能解析に適していない一方、その発現レベルが分化・腫瘍化の指標となる可能性がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

先天性下垂体複合欠損症を始めとする下垂体疾患の診断・病因解明・加療には下垂体で発現する遺伝子の全体像を知ることが望ましい。表1に、我々はこれまでに同定してきた既知のホルモン・ホルモン蛋白関連以外の下垂体で高発現する遺伝子を列挙した。すなわち、1997年にBodyMap法で下垂体特異的に発現する新規遺伝子PGSF (pituitary gland specific factor) 1、PGSF2と、下垂体で高発現する新規遺伝子Pi-a (KIAA1324/maba1/EIG121) を同定し、PGSF1が自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があることを示した。2005年には他のデータベースからヒトとマウス共に高発現を認めた遺伝子で、ホルモン遺伝子、ホルモン関連遺伝子以外に、新たにDLK1, PLAGL1, PEG3, NNAT, SEZ6L2, FLJ30058の6つの遺伝子に関して、下垂体で他の全組織と同等以上の高

発現する脊椎動物に共通の遺伝子であることを明らかにしてきた。昨年度までは、これらの遺伝子の機能解析のモデルとすべく、下垂体で高発現する膜タンパク KIAA1324/maba1 について解析してきた。本年度は、これらの遺伝子の機能解析を進める一助として、表1の下垂体で高発現する遺伝子の内、構造・機能がほとんど解析されていない KIAA1324/maba1 と ARHGAP36/FLJ30058 について下垂体組織内や下垂体関連培養細胞株での遺伝子発現を検討した。

B. 研究方法

1) ラット下垂体での *in situ* hybridization による発現の検討
標本スライドの作成

炭酸ガスにより安楽死させたラットより下垂体を採取した。パラフォルムアルデヒド固定後ショ糖に浸し、-80°Cで凍結し、クライ

オスタットで薄切した切片をスライドガラスに載せて、標本スライドを作成した。

DIG 標識 RNA プローブの作成

炭酸ガスにより安楽死させたラットとマウスより下垂体を採取し、RNA を抽出した。ラット下垂体の RNA より RT-PCR により KIAA1324/maba1 と ARHGAP36/FLJ30058 各々の蛋白コード領域を増幅、挿入部の両端に異なる2つの RNA ポリメラーゼを持つ発現ベクターにクローニング後、各々の RNA ポリメラーゼを用いて in vitro transcripton を行うことにより DIG-UTP 標識した antisense 鎖と sense 鎖の RNA プローブを作成した。

in situ hybridization

標本スライドに KIAA1324/maba1 あるいは ARHGAP36/FLJ30058 の DIG-UTP 標識した RNA プローブを反応させた。標本スライドの下垂体切片に結合した RNA プローブをアルカリフォスファターゼ標識抗DIG抗体と反応させた後、基質を加えて発色させた。

2) ラット下垂体と内分泌腫瘍由来細胞株での RT-PCR による発現の検討

ラットとマウスの両者の ARHGAP36/FLJ30058 mRNA を増幅可能な primer を作成し、ラットとマウス各々の下垂体の ARHGAP36/FLJ30058 mRNA を RT-PCR により増幅できることを確かめた。このような primer を用いて、ラット下垂体、GH と PRL を産生するラット GH3 細胞株、GH3 細胞株からクローニングした PRL 産生能のみを持つ GH3/TR (PRL) 細胞株、マウス ACTHoma 由来の AtT-20 細胞株、ラット褐色細胞腫由来の PC12 細胞株を用いて ARHGAP36/FLJ30058 mRNA 量を半定量した。

C. 研究結果

KIAA1324/maba1 は、ラット下垂体での in

situ hybridization の結果、antisense 鎖では前葉及び中間葉の細胞に普遍的に発現が認められ、後葉では negative control の sense 鎖と同レベルのシグナルしか認めず、有意な発現を認めなかった。

ARHGAP36/FLJ30058 は、ラット下垂体での in situ hybridization の結果、前葉の好酸性細胞に発現が見られた。RT-PCR による解析では、ラット下垂体では高発現を認めた一方、ラット GH3 細胞株、ラット GH3/TR (PRL) 細胞株、マウス AtT-20 細胞株、ラット PC12 細胞株の何れでも発現が低かった。

D. 考察

先天性下垂体複合欠損症を始めとする下垂体疾患の診断・病因解明・加療には下垂体で発現する遺伝子の全体像を知ることが望ましい。我々はこれまでに表1に挙げた下垂体で高発現する既知のホルモン・ホルモン蛋白関連以外の遺伝子を同定してきた。すなわち、1997年に BodyMap 法で下垂体特異的に発現する新規遺伝子 PGSF (pituitary gland specific factor) 1、PGSF2 と、下垂体で高発現する新規遺伝子 Pi-a (KIAA1324/maba1/EIG121) を同定し、PGSF1 が自己免疫性視床下部下垂体炎の補助診断に役立つ可能性があることを示した。2005年には他のデータベースからヒトとマウス共に高発現を認めた遺伝子を抽出し、ホルモン遺伝子とホルモン関連遺伝子を除外した中から、新たに DLK1, PLAGL1, PEG3, NNAT, SEZ6L2, FLJ30058 の6つについて下垂体が他の全組織と同等以上の高発現する脊椎動物に共通の遺伝子であることを明らかにしてきた。

今回解析した一つ目の遺伝子 KIAA1324/maba1 は、BodyMap 法で我々が Pi-a と呼んで解析していた遺伝子で、当時機能が未知で

あった遺伝子のうち下垂体で最も高発現するものであった。ヒトでは1,013アミノ酸の膜貫通ドメインを一つCXXC構造を9つ持つタンパク質をコードし、下垂体、気管、乳腺、膵臓、胃で高発現する。脊椎動物以外に線虫にも相同遺伝子があり、ヒトで予測されるタンパク質はマウスと91%、線虫と29%アミノ酸が一致するので、個体にとって重要な働きをすることが予測される。昨年度の我々の解析より、二量体や他分子との複合体を作っていると考えられた。また、大腸癌、乳腺腫瘍、子宮腫瘍で高発現することが報告され、子宮内膜では組織がestrogen依存だと高発現を認めたことからEIG121 (estrogen induced gene 121) の呼称もある。

この遺伝子は、GH3細胞株でも高発現していたので、我々は一昨年度よりKIAA1324/maba1をこれらの遺伝子の機能解析のモデルとして解析を始めた。一昨年度は、KIAA1324/maba1がプロラクチン分泌に及ぼす影響についてKIAA1324/maba1に対するRNAi用ベクター、あるいは、過剰発現ベクターをGH3細胞株に安定に導入して解析する系をセットアップした。昨年度はKIAA1324/maba1について細胞生物学的手法により接着活性を、生化学的手法により分子動態を解析した。

本年度は、これらの遺伝子の機能解析を進める一助として、下垂体組織内や下垂体関連培養細胞株での遺伝子発現を検討した。

KIAA1324/maba1は、ラット下垂体でのin situ hybridizationの結果、前葉及び中間葉の細胞に普遍的に発現が認められ、腺性下垂体に特異的な遺伝子であることを明らかにした。

今回解析した二つ目の遺伝子ARHGAP36/FLJ30058は、ヒトでは下垂体特異的で、マ

ウスでは視床下部、視索前野、下垂体で高発現する、ヒトで547アミノ酸、マウスで590アミノ酸のタンパク質をコードする遺伝子である。ヒトで予測されるタンパク質はマウスと80%、線虫と10%アミノ酸が一致するので、個体にとって重要な働きをすることが予測される。予測されるタンパク質の構造としては、RhoGAPドメイン(GTPase-activator protein for Rho-like GTPases)があるのが特徴である。また、X染色体上に存在し、隣接遺伝子は我々がBodyMap法で我々がPGSF2 (pituitary gland specific factor 2) と呼んだ下垂体特異的の特異的遺伝子IGSF1/PGSF2であるのも興味深い。

ARHGAP36/FLJ30058は、ラット下垂体でのin situ hybridizationの結果、前葉の好酸性細胞に発現が見られた。

ARHGAP36/FLJ30058は、RT-PCRによる解析では、ラット正常下垂体では高発現を認めた。一方、ラットGH3細胞株、ラットGH3/TR (PRL) 細胞株、マウスAtT-20細胞株、ラットPC12細胞株の下垂体関連培養細胞株では何れでも発現が低かった。この発現低下が細胞株化による

腺腫化が原因であるのであれば、ARHGAP36/FLJ30058の発現レベルが分化・腫瘍化の指標となる可能性がある。

ところで、ARHGAP36/FLJ30058はRhoGAPドメイン(GTPase-activator protein for Rho-like GTPases)をもつ。これまで膜貫通型のRhoGAPは他に報告がないので興味深い。一般的に、RhoGAPは下流で線維状アクチンを変化させるので、下垂体ないし神経内分泌細胞に特異的に発現しているので、開口分泌に関与する可能性があるのではないかと考える。

E. 結論

ラット下垂体ではKIAA1324/maba1は腺性下垂体に、ARHGAP36/FLJ30058は前葉特異的な遺伝子である。ARHGAP36/FLJ30058は、ラット下垂体では高発現を認めたものの、下垂体腫瘍由来のGH3細胞株、AtT-20細胞株、内分泌腫瘍由来のPC12細胞株の何れでも発現が低く、下垂体関連培養細胞株では発現抑制の機能解析に適していない。この下垂体関連培養細胞株での発現低下が細胞株化による

腺腫化が原因であるのであれば、ARHGAP36/FLJ30058の発現レベルが分化・

腫瘍化の指標となる可能性がある可能性が示唆された。

F. 研究成果発表

1. 論文発表

1) Association of functional polymorphisms in promoter regions of IL5, IL6 and IL13 genes with development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. Inoue, N, Watanabe, M, Morita, M, Tatusmi, K, Hidaka, Y, Akamizu, T, Iwatani, Y: Clin Exp Immunol, 163, 3, 318-323, 2011

表1. 下垂体で高発現する既知のホルモン、ホルモン蛋白関連以外の遺伝子

| human | mouse | |
|--------------------------------|----------------------|---|
| <u>1) 転写因子</u> | | |
| <i>POU1F1</i> | <i>Pou1f1</i> | POU class 1 homeobox 1/Pit-1/GHF-1 |
| <i>PITX1</i> | <i>Pitx1</i> | paired-like homeodomain 1/PTX1 |
| <i>PITX2</i> | <i>Pitx2</i> | paired-like homeodomain 2/RIEG |
| <u>2) 構造・機能がある程度解析されているもの</u> | | |
| <i>IGSF1</i> | <i>Igsf1</i> | immunoglobulin superfamily, member 1/PGSF2 |
| <i>DLK1</i> | <i>Dlk1</i> | delta-like 1 homolog (Drosophila)/FA1 |
| <i>PLAGL1</i> | <i>Plagl1</i> | pleiomorphic adenoma gene-like 1 |
| <i>PEG3</i> | <i>Peg3</i> | paternally expressed 3 |
| <i>NNAT</i> | <i>Nnat</i> | neuronatin/paternally expressed 5 |
| <i>SEZ6L2</i> | <i>Sez6l2</i> | seizure related 6 homolog (mouse)-like 2 |
| <u>3) 構造・機能がほとんど解析されていないもの</u> | | |
| <i>MIR7-3HG</i> | — | MIR7-3 host gene (non-protein coding)/PGSF1 |
| <i>ARHGAP36</i> | <i>Arhgap36</i> | Rho GTPase activating protein 36/FLJ30058 |
| <i>KIAA1324</i> | <i>5330417C22Rik</i> | maba1/EIG121/Pi-a |

ゴナドトロピン産生腺腫におけるホルモン産生の DNAメチル化制御機構

研究分担者 竹腰 進 東海大学医学部基盤診療学系病理診断学

研究要旨:FSH/LHは下垂体前葉に局在するゴナドトロフ細胞で産生・分泌されている。FSH/LHの産生は、GATA-2、SF-1、Pitx-1などの転写因子によって制御されていることはよく知られている。ゴナドトロピン産生腺腫ではこれらの転写因子の発現が高くFSHの産生は著明に増加しているが、一方、同じ転写因子群によって発現が制御されるLHは、ゴナドトロピン産生腺腫では顕著に発現が減少している。我々は、このゴナドトロピン産生腺腫におけるLH特異的発現抑制にはDNAメチル化が重要な役割を果たしていることを報告してきた。今回、下垂体由来細胞株(AtT20細胞およびLβT2細胞)を用いDNAメチル化阻害の作用とDNAメチル基転位酵素(DNMT1, 3a, 3b)発現誘導のホルモン発現に及ぼす作用を検討した。LβT2細胞およびAtT20細胞にDNAメチル化阻害剤である5-Aza-2'-deoxycytidineを作用させた結果、LHβおよびACTHの産生が顕著に増加した。また、DNMT1, 3a, 3bの遺伝子導入を行いこれらの分子を発現させたAtT20細胞では、ACTHの発現が抑制されることが判明した。以上の結果から、下垂体細胞のホルモン発現制御にはDNMTによるDNAのメチル化反応が関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ゴナドトロフ細胞由来の腫瘍は臨床分類において機能性腫瘍および非機能性腫瘍、病理組織学的分類においてはゴナドトロピン産生腫瘍(FSH産生腫瘍・LH産生腫瘍・FSH/LH産生腫瘍)、ホルモン非産生性腫瘍(Null cell adenoma)に大別され、合計すると全下垂体腫瘍の約40%、非機能性下垂体腺腫では80%を占めると報告されている。ゴナドトロピン産生腫瘍の中でもFSH産生腺腫の発生が高頻度であるのに対し、LH産生腫瘍の割合は約10%と低頻度であり、特にLH単独産生の症例は極めて稀であることが報告されている。正常の下垂体前葉ゴナドトロフ細胞におけるFSH/LHの発現制御はGATA-2、SF-1、Pitx-1などの転写因子群によって行われていると考えられている。ゴナドトロピン

産生腺腫では、これらのゴナドトロピン特異的転写因子の発現が高く、正常下垂体に比較してFSHの産生は著明に増加している。一方、同じ転写因子群によって発現が制御されるLHは、ゴナドトロピン産生腺腫では顕著に発現が減少している。我々は、同一細胞において、同一の転写因子に制御を受けていると考えられるFSHおよびLHの発現が、腫瘍化によって転写因子制御による理論を逸脱した発現を見せることに興味を持ち、LH産生抑制の分子的機序としてDNAメチル化に着目し検討を行ってきた。その結果、ゴナドトロピン産生腺腫では、LHβ遺伝子プロモーター領域が高度にメチル化されていること、また、FSHβ遺伝子のプロモーター領域ではDNAメチル化は殆ど認められないことを初めて明らかにした。このことからヒトゴ

ナドトロピン産生腺腫ではLHβ遺伝子プロモーター領域のメチル化がLHの発現抑制に関わっていることが判明した。更に、LHβプロモーター領域の転写開始点近傍のCpG配列にメチル化が生じている場合にはLHβの遺伝子発現が顕著に低下することがわかり、腫瘍化に伴うLHβ発現低下には転写開始点近傍のメチル化の有無が重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに主要な3種のDNAメチル基転移酵素(DNMT1、3a、3b)の発現解析の結果、DNMT3aが正常下垂体に比較して著明に増加しており、本酵素がゴナドトロフ産生腺腫細胞におけるDNAメチル化に重要な役割を担っていることが強く示唆された。今回は、上記のゴナドトロピン産生腺腫で明らかとなったDNAメチル化によるホルモン産生制御をさらに詳細に解析するため、下垂体由来の2種類の培養細胞株を用いDNMT阻害剤およびDNMT発現誘導のホルモン(ACTHおよびLHβ)発現に及ぼす作用を検討し、下垂体ホルモン産生に及ぼすDNAメチル化の役割とその分子機構を解析することを目的とした。

B. 研究方法

(1) DNMT阻害剤のACTHおよびLHβの発現に及ぼす作用の解析

ACTHホルモンを産生するマウス由来AtT20細胞、LHβホルモンを産生するマウス由来LβT2細胞に、DNMT阻害剤である5-Aza-2'-deoxycytidine(WAKO)を100 μM、10 μM、1 μM、0.1 μM、0.01 μMの濃度にて48時間処理した後、細胞を回収した。回収した細胞は、Tolyzole(Invitrogen)を用いて細胞溶解、RNA精製を行い、精製したRNAを鋳型として、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems

社)を用いて逆転写反応を行いcDNAの作成を行った。コントロールRNAは、刺激未処理群(DNMT阻害剤の溶媒として用いたDMSO処理したもの)を用いた。リアルタイムPCRは、TaqMan Gene Expression Assay kit(Applied Biosystems社)のマウスACTH、LHβをプローブとし、それら発現の変化についてDNA Engine Opticon 2 Real-Time Cycler(BIO-RAD社)を用いて行った。

(2) DNMT発現誘導によるACTHおよびLHβ発現に及ぼす作用の解析

ヒトDNMT1、ヒトDNMT3a、ヒトDNMT3b蛋白質のN末にHalo-tagを融合した融合蛋白質発現ベクター(プロメガ)を、AtT20、LβT2細胞にFugene6(プロメガ)を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入48時間後にTMR標識されたHalo-tag基質を培地に加え15分処理後、4%PFA/PBSにて細胞を固定した。固定後、0.5% TritonX-100 /PBS /1%BSA処理、10%BSA/PBSにて処理後、一次抗体反応をマウス抗ヒトACTH抗体(DAKO)、ラビット抗ヒトLHβ抗体(National institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease Labより分与)にて行った。二次抗体には、抗ウサギAlexa488抗体を用いた(Invitrogen)。50%Glycerol/PBS/DABKO(SIGMA)にて封入後、免疫蛍光染色サンプルとしZEISS LSM700にて染色画像を取得した。

C. 研究結果

(1) DNMT阻害剤のACTHおよびLHβの発現に及ぼす作用

AtT20細胞およびLβT2細胞に、DNAメチル化酵素であるDNMTの阻害剤を処理しLHβ、ACTHのmRNA発現の変化をリアルタイムPCR法にて検討した。DNMT阻害剤

未処理の細胞より調整されたcDNAのLHβの発現量をβ-actinの発現量で補正した値を1とし算出し、相対値として各ホルモンのmRNAの量的変化を検討した。LβT2細胞およびAtT20細胞にDNMT阻害剤(5-Aza-2'-deoxycytidine)の処理を行った結果、いずれの細胞においてもLHβの発現量は阻害剤の濃度依存的に増加することが判明した(図1)。また、LβT2細胞では、DNMT阻害剤の処理によってACTHの発現量が増加した(図2)。一方、ACTHの発現量が非常に高いAtT20細胞にDNMT阻害剤を処理したところACTHの発現量はむしろ減少傾向を示した(図2)。

(2) DNMT発現誘導のACTHおよびLHβ発現に及ぼす作用

遺伝子導入を行ったAtT20細胞では、DNMT1、DNMT3a、DNMT3bの各DNAメチル基転移酵素アイソフォームが誘導された細胞数はいずれのDNMTも約10%程度であった。DNMT1、DNMT3a、DNMT3bの各遺伝子の導入細胞では、赤で示すDNMTは核内に発現していた(図3)。また、DNMTが発現している細胞では緑で示すACTHの発現が低下した(図3)。特にDNMT3aおよび3bにおいてその減少傾向は顕著であった。DNMTの発現が誘導されなかったAtT20細胞ではACTH(緑)は減少せず陽性のままであった。

D. 考察

今回、ACTH産生細胞株として知られているAtT20細胞とLHβ産生細胞であるLβT2細胞を用いてDNAメチル化のホルモン産生に及ぼす作用を検討した。いずれの細胞株もマウスの下垂体由来である。マウスではACTHおよびLHβ遺伝子のcoding領域の上流500bp

内には、メチル化反応に感受性のCpG配列が、それぞれ21と9カ所存在する。これらのマウス由来の細胞株を用いてDNMT阻害剤(5-Aza-2'-deoxycytidine)のACTHおよびLHの発現に及ぼす作用を検討したところ、LβT2細胞ではACTHおよびLHの発現は増加し、AtT20細胞においてもDNMT阻害剤の投与によりLHの発現が増加した。この実験結果は、ヒトゴナドトロピン産生腺腫だけではなく、マウス下垂体においてもDNAメチル化によるホルモン発現制御が行われていることを示唆する。一方、AtT20細胞では、DNMT阻害剤処理によってACTHの発現はむしろ減少傾向を示した。この理由として、元々、ACTHの発現量が顕著に高いAtT20細胞では、DNAメチル化によりACTHの発現抑制がかかっておらず、DNMT阻害剤によるDNAメチル化解除がホルモン産生に影響を及ぼさなかったものと考えられた。

DNMT発現が誘導されたAtT20細胞では、ACTHの発現が減少することが明らかとなった。特にDNMT3aおよび3bの発現誘導による発現減少が顕著であった。DNMT群の中でも1aが遺伝子複製時のメチル化状態の保存、3a、3bが非メチルCpGをメチル化する反応に関与することが知られており、また、腫瘍において発現が増大することが報告されている。先に我々は、ゴナドトロピン産生腺腫ではLH遺伝子のプロモーター領域のメチル化が促進されていることを明らかにし、また、ゴナドトロピン産生腺腫ではDNMT3aの発現が顕著に増加していることを示し、DNMT3aがLH遺伝子プロモーター領域のメチル化に寄与していることを示唆した。本研究では実際に3種類のDNMTアイソフォーム遺伝子を導入しACTHの産生が抑制されることを明らかとしたが、LH発現に及ぼす

作用はわかっていない。今後の検討を必要とする。

E. 結論

下垂体由来培養細胞株であるAtT20細胞およびLβT2細胞では、DNMT阻害剤処理によりACTHおよびLHの発現が増加した。また、3種類のDNMTを高発現させた各細胞ではACTHの発現量が低下しており、特にDNMT3aおよび3bを発現させた細胞でACTHの発現低下が顕著であった。これらの結果から、マウス下垂体細胞においてもDNAメチル化反応によるホルモン産生制御が行われていることが示唆された。ホルモン産生には転写因子が重要な役割を果たしている。今後、下垂体ホルモン特異的転写因子の発現のエピジェネティクス制御機構に関して、更なる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsuno A, Mizutani A, Okinaga H, Takano K, Yamada S, Yamada SM, Nakaguchi H, Hoya K, Murakami M, Takeuchi M, Sugaya M, Itoh J, Takekoshi S, Osamura RY. Functional molecular morphology of anterior pituitary cells, from hormone production to intracellular transport and secretion. *Med Mol Morphol* 2011;44:63-70
- 2) Ishino H, Hara Y, Takekoshi S, Teshima T, Teramoto A, Osamura RY, Tagawa M. Ki-67 and minichromosome maintenance-7

(MCM7) expression in canine pituitary corticotroph adenomas. *Domest Anim Endocrinol.* 2011;14:207-213

- 3) Taniguchi Y, Tanaka O, Sekiguchi M, Takekoshi S, Tsukamoto H, Kimura M, Imai K, Inoko H. Enforced expression of the transcription factor HOXD3 under the control of the Wnt1 regulatory element modulates cell adhesion properties in the developing mouse neural tube. *J Anat.* 2011;219:589-600
- 4) Harasawa M, Yasuda M, Hirasawa T, Miyazawa M, Shida M, Muramatsu T, Douguchi K, Matsui N, Takekoshi S, Kajiwara H, Yoshiyuki Osamura R, Mikami M. Analysis of mTOR inhibition-involved pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Acta Histochemica Cytochemica* 2011;44:113-118

2. 学会発表

- 1) 2011年4月22日 下垂体腺腫のホルモン産生の病理 日本内分泌学会クリニカルアワー

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

図1. DNMT阻害剤のLHβ発現に及ぼす作用(縦軸: 相対値、横軸: 阻害剤濃度)

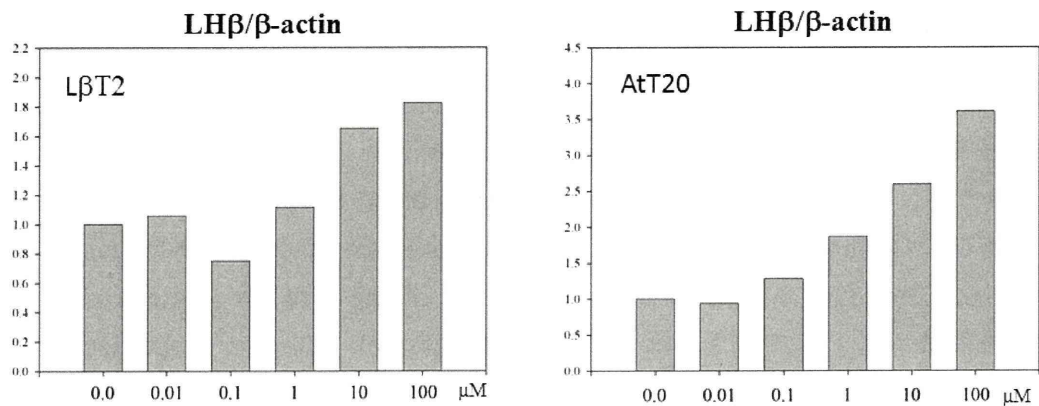


図2. DNMT阻害剤のACTH発現に及ぼす作用(縦軸: 相対値、横軸: 阻害剤濃度)

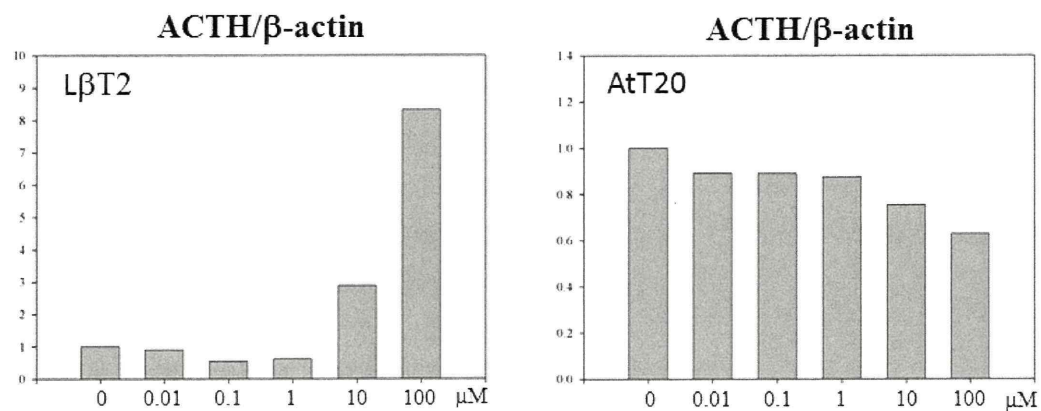
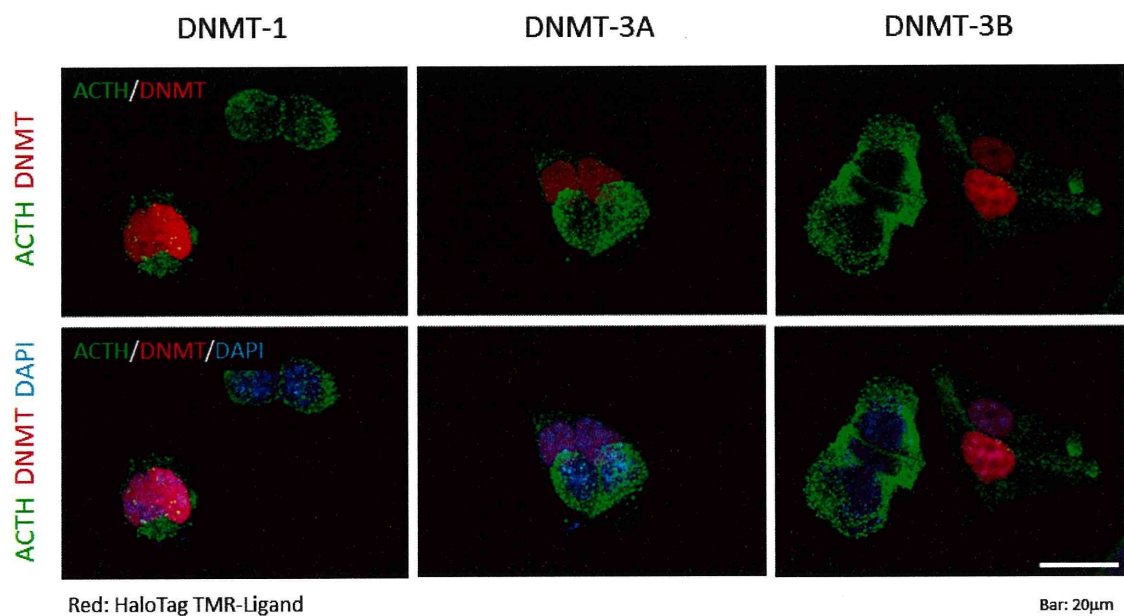


図3. DNMT発現誘導によるACTH産生の抑制(AtT20細胞)



多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の病態解明と ゴナドトロピン療法の個別化

研究分担者 峯岸 敬 群馬大学大学院医学系研究科産科婦人科学

研究要旨:本邦のPCOSの患者におけるFSHレセプターの遺伝子多型を調査し、アミノ酸配列とゴナドトロピン製剤に対する反応性の相関を明らかにすることを目的とした。PCOS症例の表現型、卵巣形態、ホルモン測定により診断を行い、当院倫理委員会の承認のもと、インフォームドコンセント施行し、研究参加への同意を得られた症例を対象にFSHレセプターの遺伝的多型の解析を行った。さらに培養細胞を用いて基礎的FSHレセプターの機能解析を行った。680Ser/Serの分布は欧米では24%と報告されているが、我々の日本人100例ほどの検討では10%に満たない。欧米の診断基準ではPCOSに含まれる日本の症例の中で680Ser/Asnの患者さんはFSHが高くなる傾向があり、LH/FSH値が1以上とならないために、日本の基準では除外される可能性が示唆された。日本と欧米のPCOSの診断基準の相違を解消していくための手段としても有用な研究と考えられた。

A. 研究目的

PCOSにおいては、ホルモン分泌の異常としてのLH高値と多嚢胞性の形態を示す卵巣が特徴的であり、視床下部-下垂体-卵巣系の調節の不全が関与していると推定されている。欧米におけるPCOSは、肥満やアンドロゲン高値が特徴となり、診断基準においてもNIH診断基準を拡大したロッテルダム診断基準が用いられている。すなわち、PCOSの表現型やホルモン状況が人種間で異なるため、本邦では2007年に日本産婦人科学会が示した独自の診断基準が用いられている。

LHレセプターの機能亢進型変異は男子思春期早発症患者やLeydig cell腫瘍の患者にみられ、TSHレセプターの機能亢進型遺伝子変異は甲状腺機能亢進を示す甲状腺腫や甲状腺癌患者に多数見いだされている。FSHレセプターにおいては、1996年GromollらはFSHレセプターの点突然変異に関する症例を報告した。症例は下垂体腫瘍のため下

垂体切除後、ゴナドトロピン欠損症を示した男性患者、テストステロンの補充後、受精が成立したという症例である。FSHレセプターの遺伝子解析では、1700番目のコドンがアデニンからグアニンに点突然変異したもので、この結果、細胞内第3ループを形成するAsp567がGlyに置換されたものであった。発現実験では、このmutant FSHレセプターのcAMPの基礎値はwild type FSHレセプターより上昇していたが、2倍以下程度の小さな上昇であった。その後、別々のグループにより追試されたが、mutant FSHレセプターとwild type FSHレセプターとの間にcAMPの基礎値の違いは認めることはなかった。このため患者の表現型と遺伝子変異との関連を否定する意見も多い。

一方、FSHレセプターの多型に関しては、人種差がありこの卵巣機能に関わる機能とPCOSとの関連を検討することは、PCOSの病態を理解する上で重要な意味を持った

め、検討を行った。卵胞発育過程には、FSHによる作用が主体となり、そのFSHレセプターには、遺伝子多型(SNPs)(Ala307Thr-Asn680Ser)があることが報告され、女性不妊症患者では680Ser/SerはFSH製剤に対する反応性が不良と報告されている(JCEM 90:4866-4872,2005)。さらに、本邦のPCOSの患者におけるFSHレセプターの遺伝子多型を調査し、アミノ酸配列とゴナドトロピン製剤に対する反応性の相関を明らかにすることで、排卵誘発における個別化を可能にし、多胎妊娠や卵巣過剰症候群などの合併症を予防することで安全性の高い医療を提供することを目的とする。PCOSはゴナドトロピンに対する有効閾値の範囲が狭く、不妊治療に際して、過剰刺激等の合併症を生じやすい病態であり、個別化して治療することにより、これを予防することは生殖医療と周産期医療の向上に貢献するものである。

B. 研究方法

症例の解析

当院の産婦人科では、生殖医療班で一般不妊症と体外受精に対する治療を行っており、この中に含まれるPCOSの患者の表現型、卵巣形態、ホルモン測定により診断を行う。

当院倫理委員会の承認のもと、当科不妊外来患者にインフォームドコンセント施行し、研究参加への同意を得られた症例を対象にFSHレセプターの遺伝的多型(Thr307Ala、Asn680Ser)をDNAシーケンサを用いて調べ、グループ1(G1) Thr/Thr-Asn/Asn(TT/NN)、グループ2(G2) Ala/Thr-Ser/Asn(AT/SN)またはAla/Ala-Ser/Ser(AA/SS)に分類した。

これらの症例から、FSHレセプターのタイプにより、以下の点で検討した。

①FSH製剤に対する反応性が異なり、FSH

製剤の総投与量に相違があるか。

②治療期間中の卵胞サイズの変化に特徴があるか。

③測定されたホルモン値の中で卵胞数、サイズと相関するものがあるか。

④ホルモン値と多型に相関するものがあるか。

レセプターの機能の解析

細胞レベルでの機能解析として、293細胞を用いての発現実験として、ヒトFSHレセプターのそれぞれの多型をPCRで組成した。それぞれを発現ベクターに導入して、プラスミドを増幅して、cDNAトランスフィクションに使用した。FSHを作用させた時の細胞中cAMPを測定することにより、変異型の機能の相違を検討した。

生体内では、同一細胞に正常のものと変異のあるレセプターが同時に発現している可能性がある。そこで、同一細胞に正常/変異レセプターのcDNA量を割合を変えて導入して、FSHに対する反応性を観察する。

以上の解析より、多型によるFSHに対する反応性を評価し、FSHレセプターの型と反応性に相関があるかを検討する。新規の多型、変異等があれば上記と同様の検討を行う。

C. 研究結果

遺伝的多型の割合は、TT/NN 49.5%、AT/SN 41.8%、AA/SS 8.7%であった。基礎FSH値の中央値は、G1で6.98 mIU/ml、G2で7.73 mIU/ml(p=0.112)、基礎LH値はG1で6.62 mIU/ml、G2で6.37 mIU/ml(p=0.545)で有意差を認めなかった。また、BMIはG1で23.6、G2で21.4(p=0.009)で有意差を認めた。経膈エコーで多嚢胞性卵巣所見を認め月経異常もある患者のうち、PCOSと診断